MARIANA BROLEZZI GOMES LATARULLO

**Caracterização de uma endopoligalacturonase (scEPG1) de
cana-de-açúcar e suas implicações para a produção de etanol**

Tese apresentada ao programa
de Pós-Graduação de Interunidades
em Biotecnologia, para obtenção do
título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Gabriel Padilla Maldonado
Co-orientador: Prof. Marcos Silveira Buckeridge

Versão original

São Paulo
2018

RESUMO

Latarullo M. Caracterização de uma endopoligalacturonase (scEPG1) de cana-de-açúcar e suas implicações para a produção de etanol. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

O maior desafio para a produção de bioenergia continua sendo a precisa desconstrução da parede celular de vegetal. Tendo em vista viabilizar a produção de etanol de segunda geração (2G) em larga escala, bem como otimizar o procedimento de produção do etanol de primeira geração (1G), estudos vêm sendo desenvolvidos com foco na produção de enzimas lignocelulósicas, principalmente as de origem fúngica. Esses estudos visam o aperfeiçoamento de coquetéis enzimáticos, compostos principalmente por enzimas que atacam celulose e hemiceluloses. No entanto, sabemos que as paredes celulares vegetais possuem também pectinas e recentemente foi demonstrado que pectinases podem melhorar sensivelmente o processo de hidrólise (até 30%). Após o levantamento de dados referentes a diferentes enzimas pectinolíticas denominadas endopoligalacturonases (EPGs) já caracterizadas e catalogadas no banco de dados CAZy, foi possível verificar que aquelas produzidas por fungos filamentosos contabilizam mais de 65%. A partir disso foi realizada uma análise filogenética de todas as EPGs caracterizadas produzidas por diferentes organismos. O resultado demonstrou que enzimas dessa família produzidas por bactérias – também com interesse biotecnológico – são mais próximas de plantas do que dos próprios fungos. Além disso, a proporção de enzimas caracterizadas de bactérias e plantas era significativamente menor que o observado para EPGs de fungos. Isso evidenciou uma lacuna no conhecimento sobre enzimas de plantas, ainda pouco exploradas no contexto de biotecnologia e bioenergia. Este trabalho apresenta a clonagem, expressão heteróloga e caracterização da EPG de cana-de-açúcar recombinante. O principal objetivo é obter informações a respeito de uma enzima com atividade chave na degradação de parede celular, haja vista ter sido ela isolada de um processo de ataque endógeno à pectina da própria cana-de-açúcar. Como resultado, a endopoligalacturonase de *Saccharum* sp. foi eficientemente expressa em sistema de expressão heterólogo com *Pichia pastoris* X33. O clone produtor selecionado gerou os maiores valores de proteínas totais no sobrenadante de cultivo com 96 horas de indução com metanol. A partir do extrato bruto do sobrenadante coleta, os melhores valores de atividade enzimática foram obtidos quando da incubação por 22 horas a 45 °C em tampão acetato de sódio pH 5,0. Sais, detergentes e quelantes atuaram como inibidores da atividade enzimática e, por outro lado, o agente redutor ditioneitol (DTT) foi responsável pelo incremento de atividade enzimática. Por fim, os parâmetros cinéticos obtidos para a enzima caracterizada indicam a possibilidade de utilizá-la como complemento de coquetéis enzimáticos, conhecidamente pobres em pectinases.

Palavras-chave: Endopoligalacturonase. Cana-de-açúcar. Pectina. *Pichia pastoris*. Etanol.

ABSTRACT

Latarullo M. Characterization of an endopolygalacturonase (scEPG1) of sugarcane and its implications for the ethanol production. [Ph.D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

The biggest challenge for bioenergy production remains the disassembly of the extracellular matrix of some plant species. For the large-scale production of second generation ethanol (2G), and optimizing the first generation ethanol (1G) production process, studies have been developed focusing on the production of lignocellulosic enzymes, especially those of produced by fungi. These studies aim at the improvement of enzymatic cocktails, composed mainly of enzymes that are capable of attacking cellulose and hemicelluloses. However, it is a known fact that the plant cell walls also contain pectins and it has been recently demonstrated that pectinases could significantly improve the hydrolysis process (up to 30%). After an analysis of different pectinolytic enzymes known as endopoligalacturonases (EPGs), already characterized and cataloged under the CAZy database, it was possible to verify that fungi enzymes account for more than 65% of all of the characterized EPGs. The result has shown that enzymes from this family produced by bacteria - also with biotechnological interest - are closer to plants than fungi. Besides, the proportion of characterized enzymes from bacteria and plants was significantly lower than that observed for fungal EPGs. This evidenced a gap in knowledge about plant enzymes, still little explored in the context of biotechnology and bioenergy. This work presents the cloning, heterologous expression, and characterization of recombinant sugarcane EPG. The primary objective is to obtain information about an enzyme with key activity in cell wall degradation since it has been isolated from a process of an endogenous attack on sugarcane pectin itself. As a result, the endopoligalacturonase of *Saccharum* sp. was efficiently expressed through the heterologous expression system with *Pichia pastoris* X33. The selected clone generated the highest total protein values in the culture supernatant at 96 hours of methanol induction. From the crude extract of the supernatant collected, the best enzyme activity values were obtained upon incubation for 22 hours at 45 °C in pH 5.0 sodium acetate buffer. Salts, detergents, and chelators acted as inhibitors of the enzymatic activity and, on the other hand, the reducing agent dithiothreitol (DTT) was responsible for the increase of enzymatic activity. Finally, the kinetic parameters obtained for the enzyme characterized indicate that it can be used as a complement to enzymatic cocktails, which are known to be poor in pectinases.

Keywords: Endopolygalacturonase. Sugarcane. Pectin. *Pichia pastoris*. Ethanol.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país agrícola, e diante do atual cenário econômico e suas perspectivas, a utilização consciente das matérias-primas disponíveis é uma das melhores formas de potencializar a economia. Dentre as plantas de interesse agrônomo produzidas no Brasil, a cana-de-açúcar é um dos cultivos de maior importância econômica.

Com as alterações climáticas, os biocombustíveis têm recebido bastante atenção como alternativa aos combustíveis fósseis. O etanol é um dos mais promissores pelas suas características, tais como: baixa emissão de CO₂, sustentabilidade e produção de bioeletricidade (que sustenta a usina em termos energéticos com parte do resíduo). O Brasil possui larga experiência na produção desse combustível (cerca de 50 anos desde o programa Próalcool em 1970), tendo conseguido avanços tecnológicos importantes. Graças a um sistema de produção de etanol com alta eficiência, tornamo-nos um polo mundial na ciência, tecnologia e produção maciça de automóveis *flexfuel* e distribuição por todo o país (De Souza et al. 2013a).

A safra 2017/2018 de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 641 milhões de toneladas e produziu 38 milhões de toneladas de açúcar e 27 milhões de m³ de etanol (UNICA 2018). Estes produtos são derivados do caldo da cana-de-açúcar e como resíduo foram gerados aproximadamente 300 milhões de toneladas de palha e bagaço.

O potencial de expansão da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil é enorme. Utilizando terra agricultável sem avanço sobre biomas preservados e sem avançar nas áreas de produção de alimentos até 2045, a produção de etanol por cana-de-açúcar tem potencial para substituir até 6% da gasolina mundial e mitigar em até 14% das emissões de CO₂ em relação à 2014 (Jaiswal et al. 2017).

Tal capacidade de produção e seu potencial futuro têm norteado estudos focados na produção de etanol 2G utilizando estes resíduos, sendo o principal entrave o pré-tratamento e hidrólise enzimática por serem as etapas mais custosas. Para aumentar a eficiência no processo global de produção de etanol é necessário reduzir o custo relacionado à fabricação deste produto.

As paredes celulares de plantas, inclusive as de cana-de-açúcar, possuem uma resistência natural à hidrólise enzimática denominada “recalcitrância”. Ela ocorre devido à alta complexidade gerada pelas interações entre os polímeros da parede celular, classificados em três domínios principais: celulose-hemicelulose, pectinas e lignina. Em conjunto, estes domínios formam um arranjo arquitetônico que é denominado Código Glicômico (Buckeridge and De Souza 2014).

A recalcitrância do Código Glicômico se deve, em parte, à interação entre componentes das pectinas com a lignina (De Souza et al. 2015).

As pectinas são formadas principalmente por um polímero composto por unidades de ácido galacturônico. Estão presentes na lamela média e preenchem os espaços intercelulares em toda a planta. Este grupo de polissacarídeos está presente em baixas proporções na parede celular de gramíneas (2-10%) e por isso, nos coquetéis enzimáticos comerciais, as enzimas que hidrolisam pectinas ou estão ausentes ou em baixas concentrações.

Com os avanços observados na área de biotecnologia atrelada ao conhecimento da arquitetura da parede celular (Buckeridge et al. 2019), os custos tendem a reduzir graças à produção de enzimas mais eficientes. De Souza et al. (2013b) e De Souza et al. (2015) discutem sobre a estrutura dos polímeros presentes nas paredes de cana-de-açúcar e *miscanthus* respectivamente e sugerem que a degradação da parede celular requer pelo menos 18 tipos diferentes de enzimas, sendo muitas destas relacionadas ao ataque de pectinas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioenergia e a cana-de-açúcar

O conceito de bioenergia se refere à utilização de recursos biológicos renováveis para a geração de energia. Pode ser produzida tanto em pequenas como em grandes unidades de produção e pode ser gerada em praticamente todo lugar onde os processos fotossintéticos garantam um mínimo de condições para a realização da síntese da vida vegetal (Rathore et al. 2015).

A ideia básica é transformar hidrocarbonetos produzidos por plantas ou algas (a maioria na forma de açúcar e lipídios) em compostos como diesel e etanol. No último caso, existem somente algumas espécies de plantas que são consideradas ou efetivamente utilizadas para produção em larga escala. Entre elas, há as que armazenam altas concentrações de sacarose (p. ex. cana de açúcar e beterraba), amido (p. ex. milho), lignocelulose a partir de materiais lenhosos (p. ex. salgueiro) ou gramíneas (p. ex. palha de milho, *switchgrass*, *miscanthus* e bagaço cana de açúcar) (De Souza et al. 2013a). Outros resíduos, tais como polpa de maçã, citrinos e beterraba, que são ricos em pectinas, também têm sido sugeridos como possíveis fontes de carbono para a produção de bioetanol (Edwards and Doran-Peterson 2012).

A cana-de-açúcar é composta basicamente de três porções: o caldo, o bagaço (umidade aprox. de 50%) e a palha (umidade aprox. de 15%). Cada parte representa aproximadamente 1/3 da capacidade energética deste material. O etanol de primeira geração é produzido somente a partir do caldo da cana-de-açúcar, e atualmente, somente uma parte do bagaço é destinada para obtenção de energia para a própria usina através da queima, enquanto a palha não é aproveitada, sendo queimada ou abandonada no próprio campo (Alonso Pippo et al. 2011a; Alonso Pippo et al. 2011b).

De acordo com a UNICA, a indústria brasileira de cana-de-açúcar contribui com 7,5% de toda energia fornecida pela Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), sendo assim a terceira mais importante fonte de energia do país, ficando atrás apenas da energia hidrelétrica e combustíveis fósseis. Com a introdução de veículos *flex* em 2003, que podem utilizar etanol ou gasolina como combustível, houve um aumento do consumo de etanol e consumo de gasolina caiu mais da metade. Outra razão para o aumento da demanda por álcool anidro foi a política adotada pelo Brasil e outros

países de aumentar o percentual de álcool na gasolina. Atualmente no Brasil é obrigatório haver uma mistura de 27% de etanol anidro na gasolina (Carpio and Simone de Souza 2017).

2.2 Etanol 1G e 2G

O Brasil e os EUA são os maiores produtores de etanol do mundo, utilizando como principais matérias-primas para a produção em grande escala a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e o milho (*Zea mays*) respectivamente (RFA 2015).

O rendimento da produção de etanol depende da variedade da cana-de-açúcar, estimada principalmente pela quantidade de sacarose obtida após a moagem, e da eficiência de utilização desse material. A eficiência industrial (utilização da sacarose) do Etanol 1G é de mais de 90% (Macedo et al. 2008). Por isso, diante do crescente aumento na demanda, será necessário aumentar a área plantada, utilizar fontes alternativas ou otimizar o processo de extração da sacarose.

O etanol de segunda geração (2G) é produzido a partir da biomassa do colmo e palha, ou seja, os resíduos gerados a partir da extração de sacarose para o etanol 1G. Este material rico em celulose e hemiceluloses passa por etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação de hexoses e pentoses (Ojeda and Kafarov 2009). A partir desta etapa, o processo de produção e o produto final é idêntico ao etanol 1G (Abramson et al. 2010).

Estudos focados no desenvolvimento de tecnologias eficientes para o pré-tratamento do bagaço, o melhoramento do coquetel enzimático e leveduras adequadas para a fermentação das pentoses e hexoses mostram que, além da pesquisa básica necessária para apoiar novos desenvolvimentos nesses campos, a solução para esses desafios parece depender de uma abordagem integrada e altamente multidisciplinar, pois essas linhas de pesquisa estão, de fato, muito fortemente relacionadas (Soccol et al. 2010).

2.3 Produção de Etanol 2G

A produção do etanol 2G acontece por etapas, sendo a primeira o pré-tratamento da biomassa da cana (bagaço ou palha). Este tratamento pode ocorrer por hidrólise alcalina, hidrólise ácida, explosão a vapor, sendo a última a mais utilizada.

Após o pré-tratamento, o material é submetido à hidrólise enzimática. Esta etapa é considerada o “gargalo” da produção do etanol 2G devido ao seu alto custo (Soccol et al. 2010; Buckeridge et al. 2019). As principais limitações são: a recalcitrância da biomassa à degradação por enzimas, ou seja, a resistência intrínseca da parede celular à hidrólise devido ao seu Código Glicômico, e a grande diversidade de ligações e ramificações que unem uma ampla gama de hexoses e pentoses na estrutura de polissacarídeos complexos (Somerville et al. 2010; Buckeridge and De Souza 2014). Entender a síntese e a desmontagem da parede celular da cana-de-açúcar e, sobretudo, sua estrutura, também pode ajudar a manipular e efetivamente degradar esses polímeros até açúcares fermentáveis e obter todo potencial energético, minimizando os custos de produção e/ou ampliando a gama de matérias-primas possíveis desse combustível (Vogel 2008; Leite et al. 2017).

2.4 Parede celular da cana-de-açúcar

Os carboidratos possuem diversas funções fisiológicas nas plantas, dentre elas, o controle do crescimento através dos balanços das fontes de carbono e energia, defesa contra o ataque de patógenos, sinalização, resistência mecânica e interações com o ambiente (Zagrobelny et al. 2004; Parre and Geitmann 2005; Wingler et al. 2006). Estas funções envolvem uma grande diversidade de enzimas que estão responsáveis pela síntese (glicosiltransferases), modificação (carboidrato esterases) e degradação (glicosil hidrolases e polissacarídeo liases) (Minic 2008).

O primeiro genoma completo de planta descrito foi o de *Arabidopsis thaliana* e a análise das sequências sugerem que as enzimas que agem em carboidratos podem ser muito mais abundantes do que nas espécies não-vegetais (Henrissat et al. 2001). E atualmente, com estudos mais recentes e específicos, ainda é possível afirmar que as plantas têm consideravelmente mais genes codificando enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos do que outros grupos taxonômicos (Davies et al. 2005; Geisler-Lee et al. 2006). Mesmo com este reservatório de glicosil hidrolases excepcionalmente grande e estruturalmente diverso, sabe-se relativamente pouco sobre sua enzimologia e muito menos sobre suas estruturas (Lopez-Casado et al. 2008).

As propriedades de cada polissacarídeo, suas proporções relativas e as inter-relações entre eles são aspectos relevantes a compor a complexidade da parede

celular, o que resulta em um agregado de moléculas bastante resistente à desmontagem. A parede celular da cana-de-açúcar é um composto de microfibrilas de celulose que interagem entre si formando macrofibrilas, que ficam embebidas em uma matriz de pectinas e β -glucano (Buckeridge et al. 2015). Proporcionalmente, os valores aproximados de carboidratos estruturais em colmos e folhas da cana-de-açúcar são: 30% de celulose, 50% de hemicelulose e 2-10% de pectinas (De Souza et al. 2013b). A arquitetura e as proporções de carboidratos caracterizam a parede celular da cana-de-açúcar como do tipo II, que contém arabinoxilano como a principal hemicelulose e possui valores relativamente baixos de pectina (Vogel 2008; Mohnen 2008; De Souza et al. 2013b). Apesar da baixa proporção, as pectinas estão possivelmente ligadas à lignina em cana-de-açúcar e *Miscanthus sinensis*, tendo grande interferência na recalcitrância e dificultando o processo de hidrólise (De Souza et al. 2013b; De Souza et al. 2015).

2.5 Substâncias pécticas

As pectinas são macromoléculas glicosídicas encontradas principalmente na lamela média e junções celulares das plantas. A Sociedade Americana de Química (*American Chemical Society*) classificou as substâncias pécticas em: (a) Ácido péctico: que são substâncias pécticas compostas de ácido poligalacturônico coloidal, onde os grupos carboxila estão essencialmente livres de grupos metil éster e seus sais são pectatos neutros ou ácidos; (b) Ácido pectínico: formado por um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico coloidal com poucos grupos metil éster e (c) Protopectina: é a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais (por exemplo o cálcio) e, em condições de hidrólise restrita, produzem ácidos pectínicos ou pectina. Possui a maior parte dos seus grupos carboxílicos esterificados sendo a única substância péctica insolúvel em água (Sakai et al. 1993; Kashyap et al. 2001).

Um dos principais compostos da classe das pectinas é um polissacarídeo de alto peso molecular formado por ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4 e pode ser classificado em diferentes domínios de acordo com a estrutura e grau de ramificação com outras moléculas. O homogalacturonano (HG) é a pectina mais abundante, consistindo em um polímero linear atingindo até 100 resíduos de comprimento. O HG, que pode ser metilado e/ou acetilado, contabiliza cerca de 65%

da pectina em alguns sistemas (Mohnen 2008; Babu and Bayer 2014). As demais pectinas são estruturalmente mais complexas e incluem os ramnogalacturonanos I e II (RG-I e II), produto da alternância de resíduos de ácido galacturônico e ramnose na cadeia principal, com ramificações por polímeros de cadeia relativamente curta que podem ser principalmente arabinanos e galactanos ou em ocorrências específicas, podem conter xilogalacturonanos (XGA) e apiogalacturonanos (AP).

Pectinas com alto grau de metilação são chamadas pectinas HM (High-methoxyl) e têm poder de geleificação na presença de açúcares e ácidos, enquanto que pectinas com baixo grau de metilação são chamadas LM (Low-methoxyl) e podem apresentar geleificação na ausência de açúcares e na presença de alguns íons metálicos, principalmente o cálcio. Esta geleificação ocorre pela formação de zonas de junção entre o homogalacturonano de diferentes cadeias, formando uma estrutura denominada “egg box” (caixas de ovos) (Sakai et al. 1993; Fernández-González et al. 2004; Sharma et al. 2006).

As enzimas com atividade de poligalacturonase hidrolisam as ligações glicosídicas de pectinas com baixo grau de metilação (LM). As enzimas pectina e pectatolases rompem as ligações glicosídicas das pectinas HM e LM, respectivamente, por um mecanismo de β -eliminação (Kravtchenko et al. 1993).

O grau de esterificação ou acetilação também varia de acordo com a origem da substância péctica, podendo influenciar diretamente na eficiência da hidrólise. Por exemplo, em maçãs encontram-se 71% de esterificação e 4% de acetilação, em beterraba a pectina pode estar até 55% esterificada e 20% acetilada, em batata o grau de esterificação chega a 31% e de acetilação até 14% (Voragen et al. 1986).

2.6 Pectinases

As pectinas compreendem uma classe de polímeros cuja síntese e degradação requer um complexo arranjo de enzimas. A síntese desse polissacarídeo pode envolver 67 enzimas diferentes, incluindo várias glicosil transferases, metiltransferases e acetiltransferases. O alto nível de complexidade estrutural implica a necessidade de diferentes enzimas para degradar estes polissacarídeos (Jayani et al. 2005; Mohnen 2008). A hidrólise desse carboidrato é muito importante no processo de desmontagem da parede celular porque pode influenciar diretamente na

acessibilidade das enzimas durante o processo de hidrólise enzimática. Isso é verdade na medida que sua presença pode impedir o acesso à celulose e/ou hemicelulose, bloqueando o acesso das enzimas responsáveis pela degradação dos outros componentes da parede celular (Marcus et al. 2008). Isto porque as pectinas são os principais compostos determinantes da porosidade da parede celular (Buckeridge et al., 2015).

De forma geral, as pectinases podem ser classificadas como ácidas ou alcalinas (Kashyap et al. 2001). As pectinases ácidas geralmente são produzidas por fungos, especificamente pela espécie *Aspergillus niger*, enquanto as alcalinas geralmente são produzidas por bactérias, geralmente do gênero *Bacillus* sp. Esta diferença resulta nas condições utilizadas nos processos industriais (Alimardani-Theuil et al. 2011). Pectinases também podem ser classificadas pelo modo de ação, preferência pelo substrato e produto gerado após a reação enzimática. Dentre as principais, estão:

- Pectina metil esterase (PE/PME) (EC 3.1.1.11) – Promovem a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, produzindo metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado).
- Pectina acetil esterase (PAE) (EC 3.1.1.6) – Promovem a desesterificação dos grupos acetil da pectina, produzindo acetato e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado).
- Endopoligalacturonase (EndoPG) (EC 3.2.1.15) – Catalisa a hidrólise do poligalacturonano desramificado, nas regiões internas, produzindo oligogalacturonanos.
- Exopoligalacturonase (ExoPG) (EC 3.2.1.67) – Catalisa a hidrólise do poligalacturonano desramificado, a partir da extremidade não redutora, produzindo monogalacturonanos.
- Exo-poli- α -galacturonosidase (EC 3.2.1.82) – Catalisa a hidrólise do poligalacturonano desramificado, a partir da extremidade não redutora, produzindo digalacturonanos.
- Endopectatoliase (EndoPaL) (EC 4.2.2.2) – Atua no poligalacturonano desramificado por transeliminação nas regiões internas, produzindo oligogalacturonatos insaturados. Requer Ca^{2+} .

- Exopectatoliase (ExoPaL) (EC 4.2.2.9) – Atua no poligalacturonano desramificado por transeliminção nas regiões terminais a partir da extremidade não redutora, produzindo digalacturonanos insaturados. Requer Ca^{2+} .
- Endopectinaliases (EndoPL) ou Pectinaliase (PL) (EC 4.2.2.10) – Atua na pectina por β -eliminação, entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados, sem absorção de água, produzindo oligogalacturonanos metilados insaturados.
- Protopectinases (PPase) – Estas enzimas solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada. Com base nas suas aplicações, são principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina e, protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares. Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina.

De modo geral, as hidrolases incorporam a molécula de água através de catálise ácida durante a quebra da ligação glicosídica entre duas unidades de sacarídeos. Por outro lado, as liases quebram a ligação glicosídica através de uma reação de β -eliminação que remove um próton, resultando em uma ligação insaturada entre o C4 e C5 da unidade sacarídica no final não-redutor.

Existem atualmente 112 famílias de glicosil hidrolases descritas em um banco de dados chamado CAZypedia (<http://www.cazypedia.org>). Nesse banco, a classificação das enzimas é baseada nas semelhanças na sequência de aminoácidos fundamentada pela relação direta entre a sequência e o dobramento.

A família GH28 é composta de enzimas com atividade de poligalacturonase e estão amplamente distribuídas na natureza (Hadfield and Bennett 1998). São produzidas por diferentes organismos como bactérias, fungos filamentosos, plantas, leveduras, insetos, nematoides entre outros. Entretanto, apesar desta grande diversidade, a maioria dos trabalhos com estas enzimas representa enzimas produzidas por fungos e bactérias (Sticklen 2008). Em palha de milho, foi observado o sinergismo entre enzimas de plantas e fungos. Han & Chen (2011) verificaram que houve incremento no acúmulo de glicose (60%) e na produção de etanol (63%)

quando foram adicionadas GHs de plantas a uma mistura que só continha celulases produzidas *Trichoderma reesei*.

Poligalacturonases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -(1,4) entre duas unidades de ácido galacturônico não esterificadas. Considerando a atividade de hidrólise destas enzimas, estas podem ser classificadas como endopoligalacturonases (endoPG; EC 3.2.1.15) ou exopoligalacturonases (exoPG; EC 3.2.1.67). Os prefixos Endo e Exo denominam se a clivagem se dá em ligações internas ou terminais, respectivamente, podendo ser encontradas no ambiente extracelular e no periplasma. Enzimas com atividade de endopoligalacturonases podem degradar formas altamente polimerizadas presentes na parede celular vegetal, enquanto as enzimas com atividade exopoligalacturonase podem ser mais eficientes na produção de pequenos oligogalacturonídeos que se acumulam no periplasma (Abbott and Boraston 2008). Além disso, devido às suas importantes características associadas à hidrólise da pectina, diminuindo a adesão celular e aumentando a porosidade da parede celular vegetal, podem ser aplicadas junto ao coquetel enzimático comercial para aumentar o rendimento da produção de etanol, representando um importante papel para bioenergia (Latarullo et al. 2016).

O fungo *Aspergillus niger* é o mais explorado para produção de enzimas pectinolíticas. Esta espécie é capaz de produzir diversos tipos de pectinases (Pectinametilesterase, Poligalacturonase e Pectina Liase) (Jia and Wheals 2000). Foram descritos sete tipos de endopoligalacturonases produzidas por este fungo (Tipo I, II, A, B, C, D e E). Uma característica enzimática que pode diferenciá-las é o comportamento processivo nos tipos I, A, C e D. Enzimas processivas não liberam o substrato após a reação de hidrólise, continuando a atividade no próximo sítio (Pouderoyen et al. 2003).

Portanto, a presença de pectinases em tecidos vegetais parece ser relevante para os primeiros passos da degradação da parede celular. O uso destas enzimas para bioenergia poderia favorecer não apenas os processos de etanol 2G, mas também os de 1G. Ao reduzir a rigidez da parede celular com estas enzimas, as células se tornariam mais susceptíveis ao rompimento, reduzindo significativamente a energia necessária para extrair a sacarose (Tavares 2015).

Considerando que as funções biológicas das endopoligalacturonases das plantas são razoavelmente bem descritas, caracterizações similares sobre as EPGs

de fungos não envolvem os mesmos aspectos funcionais abordados nas plantas. No caso dos fungos, o papel biológico destas enzimas parecem ser ou de obtenção de substrato para o crescimento ou de ganho de acesso ao citoplasma das células vegetais. Assim como as EPGs de plantas, as de fungos não são bem caracterizadas em relação às suas atividades bioquímicas sobre uma grande variedade de substratos (Lopez-Casado et al. 2008).

Desta forma, todos os esforços para a prospecção de enzimas têm um alto valor para a bioenergia, oferecendo novas alternativas para criar coquetéis enzimáticos e complementar os já existentes. As pesquisas em EPGs de plantas desempenham um papel importante sobre os seus papéis em diferentes processos fisiológicos, nos quais a parede celular é modificada e/ou hidrolisada. Ainda assim, os dados disponíveis na literatura ainda não permitem preencher as lacunas sobre como as EPGs vegetais atuam sobre os carboidratos da matéria-prima de bioenergia (Latarullo et al. 2016).

2.7 Emprego industrial de pectinases

Graças ao aumento da demanda pela substituição dos processos químicos tradicionais e com o avanço da biotecnologia, enzimas começaram a ser amplamente utilizadas em indústrias. Enzimas com ação de pectinases, xilanases e celulasas possuem grande valor econômico e ambiental (Pakarinen et al. 2012). Em 2010, o comércio e a aplicação de enzimas movimentaram cerca de US\$ 3,6 bilhões no mundo todo (Dewan 2014). Somente para o mercado de alimentos e bebidas houve movimentação de US\$ 1,2 bilhão em 2010 na produção de enzimas, sendo que as pectinases equivalem a aproximadamente 10% da produção total (Mukesh Kumar et al. 2012).

Pectinases foram as primeiras enzimas a serem utilizadas na indústria para a preparação de vinhos e sucos em meados de 1930, mas só a partir de 1960 iniciou-se a utilização destas enzimas para outras aplicações industriais (Meneses 2007). Uma forma de reduzir os custos de produção de enzimas seria através da utilização das enzimas presentes nos resíduos agroindustriais gerados na produção de sucos, vinhos e alguns alimentos à base de vegetais como substratos indutores para a produção de pectinases. Dessa maneira, os custos de produção dessas enzimas

diminuem e, de certa forma, o processo pode se retroalimentar, aumentando a sustentabilidade econômica (Kaur et al. 2004).

Atualmente, na indústria, melhorias no processo e redução de custos são extremamente importantes, e a pesquisa é dirigida para a descoberta de enzimas que sejam mais robustas com respeito aos parâmetros de funcionamento enzimático, como pH, temperatura e termoestabilidade (Ahlawat et al. 2008). Os principais organismos produtores de pectinases utilizadas industrialmente são bactérias, fungos e leveduras. Entre eles, os principais gêneros envolvidos são: *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Aspergillus*, *Alkaliflexus*, *Natronoflexus* e *Natranaerovirga* (Mei et al. 2013). Dentre esses grupos, a pectinase de *Bacillus halodurans* expressa em *E. coli* apresentou características importantes como termoestabilidade em altas temperaturas, conferindo uma longa meia-vida e tornando-a potencialmente viável em processos industriais.

2.7.1 Indústria têxtil

Fibras de plantas como algodão, juta, fibra de coco, linho, cânhamo, rami e banana, são usadas como matéria-prima para a indústria têxtil. As enzimas pectinolíticas podem ser usadas na indústrias têxtil para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, para a etapa de processamento (Esfandiari et al. 2007; Kalantzi et al. 2010; Garg et al. 2016). Estas pectinases, em conjunto com outras enzimas, removem os resíduos de pectina e cera do produto de forma mais segura, evitando o alto consumo de energia e os graves problemas de poluição associados à limpeza alcalina convencional com soda cáustica. Este bioprocessamento ocorre sem promover efeitos negativos na celulose, mantendo a qualidade do material para o posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia (Hoondal et al. 2002; Agrawal et al. 2007).

2.7.2 Pectinases na extração de suco de frutas

A principal aplicação de pectinases na indústria é na extração e clarificação de sucos de frutas. O uso de enzimas de maceração aumenta o rendimento da extração e melhora o processamento dos sucos. Essas enzimas são utilizadas após o corte da matéria-prima, para macerar a polpa até a liquefação parcial ou total da fruta, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a extração dos componentes da fruta (Bhat 2000). Como exemplo, extratos fúngicos com diferentes tipos de

pectinases (PG - poligalacturonase, PL - pectinase e PE - pectinesterase) foram empregados no processo de extração de suco de laranja (Figura 1-A) e maçã (Figura 1-B). Pode-se observar um aumento do rendimento de extração de sucos em relação ao controle (tubos C) e clarificação deles, principalmente quando PG é utilizada. Observa-se também que no tubo controle (C) de maçã, visualiza-se somente uma pequena quantidade de tampão, o que comprova a eficiência do uso de pectinases no processo de extração de sucos de frutas.

Figura 1 - Uso de extratos fúngicos com diferentes atividades de pectinases na extração de sucos de (A) laranja e (B) maçã

Legenda: C = Controle; PE = Extrato contendo maior atividade de pectinesterase; PL = Extrato contendo maior atividade de pectinase e PG = extrato contendo maior atividade de poligalacturonase. Fonte: (Santi et al. 1999).

2.7.3 Extração de óleos essenciais e vegetais

Óleos vegetais como o de oliva, girassol, coco, palma ou canola e óleos cítricos como o de limão são geralmente obtidos pela extração com solventes orgânicos como hexano, que é um potencial carcinogênico. Atualmente, o uso de coquetéis enzimáticos contendo celulasas, hemicelulasas e pectinases resulta em uma máxima extração do óleo pois atuam nas propriedades emulsificantes da pectina que interferem na coleta do óleo da casca aumentando não só o rendimento como o a qualidade do produto pelo aumento do conteúdo polifenólico e vitamina E (Kashyap et al. 2001; Hoondal et al. 2002; Iconomou et al. 2010).

Desta forma, a aplicação de pectinases no processo de extração de óleos, hidrolisa os complexos de pectina-proteína, liberando mais óleo, aumentando o rendimento final, diminuindo o tempo de processamento e melhorando a qualidade do produto final (Kashyap et al. 2001; Jayani et al. 2005).

2.7.4 Processamento de bebidas alcoólicas

Na indústria de vinhos, as pectinases estão relacionadas com a elaboração e obtenção de vinhos finos e de maior qualidade. Essas enzimas são adicionadas durante o processo de esmagamento das uvas ou no mosto de vinho, maximizando o rendimento do processo de extração, além de ser um facilitador no processo de filtração, contribuindo para a redução do tempo de clarificação e intensificando o sabor e a cor (Chaudhri and Suneetha 2012). Quando essas enzimas são adicionadas durante a maceração das uvas tintas, o procedimento resulta no melhoramento de características visuais, como cor e turbidez, melhor estabilidade e redução do tempo de filtração quando comparadas com vinhos não tratados enzimaticamente (Revilla and Gonzalez-San Jose 2003; Jayani et al. 2005).

2.7.5 Processamento de chá e café

Na indústria do café, a fermentação está relacionada à reação microbiana de leveduras e bactérias que destroem os açúcares da mucilagem, a camada externa. Enzimas pectinolíticas podem ser utilizadas na fermentação do café para remover o revestimento mucilaginoso. Este é principalmente constituído de três quartos de substâncias pécticas, que a ele conferem uma textura gelatinosa e viscosa. A degradação dessas substâncias por pectinases contribui para a qualidade do grão de café (Murthy and Naidu 2011).

A levedura *Pichia kluyveri* produz uma poligalacturonase que apresenta uma melhor atividade nas mesmas condições de fermentação do café e pode ser utilizada nas etapas iniciais do processo, promovendo a degradação da mucilagem. Além disso, esta levedura possui a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Aspergillus ochraceus* e consequentemente a produção da micotoxina Ocratoxina A (OTA) (Masoud and Jespersen 2006).

A aplicação de enzimas que atuam na hidrólise das paredes celulares das folhas de chá resulta na completa maceração das células e, consequentemente, um aumento nos compostos fenólicos do chá que pode melhorar sua qualidade e valor terapêutico (Thakur and Gupta 2012). No processamento, o tratamento com pectinases acelera a oxidação e destrói a espuma formada nos pós de chás instantâneos. A mudança na cor do chá durante a oxidação também resulta no desenvolvimento do aroma (Carr 1985; Barage et al. 2013).

2.7.6 Alimentação animal

A alimentação de ruminantes pode ser suplementada por coquetéis enzimáticos que contêm xilanases, pectinases e celulasas. O papel das pectinases em um coquetel enzimático é reduzir a viscosidade do alimento e aumentar a absorção dos nutrientes pela hidrólise de fibras não biodegradáveis ou por liberar nutrientes presos nestas fibras (Hoondal et al. 2002; Barage et al. 2013).

2.7.7 Sacarificação de produtos agrícolas

Diferentes enzimas como pectinases, hemicelulasas e celulasas são usualmente utilizadas para converter os polissacarídeos presentes na parede celular da planta em monossacarídeos. Atualmente, pectinases são utilizadas em biorefinarias por hidrolisar a pectina presente em resíduos agroindustriais ricos em nesse carboidrato, como os resíduos cítricos, aumentando a extração de açúcares e consequentemente aumentando o rendimento da produção (Biz et al. 2014). Além disso, a partir da hidrólise da pectina são recuperados diferentes monossacarídeos, dentre eles a galactose e a xilose. Por meio da utilização de microrganismos capazes de fermentá-los, esses açúcares podem ser empregados na produção de etanol, ácido acético e ácido láctico (Mohnen 2008; Zanella 2013; Seyfried et al. 2016).

Devido ao papel das pectinas na porosidade da parede celular e na adesão celular, a utilização de pectinases pode promover uma maior liberação de açúcares fermentáveis, por meio da redução da recalcitrância, com consequente aumento na produção de etanol de primeira e segunda geração (Latarullo et al. 2016). Estudos envolvendo o uso de pectinases na planta lentilha d'água (*Landoltia punctata*) demonstrou a eficiência da extração de açúcares após o tratamento enzimático com pectinases, apresentando um aumento de 142% de glicose quando comparado com o não tratado (Chen et al. 2012).

2.8 Produção de pectinases heterólogas

Conforme mencionado, preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngica, geralmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, mas também podem ser dos gêneros *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Monilia*, *Coniothyrium* e *Rhizopus* (Geocz 1994; Castilho et al. 2000). Apesar das propriedades destes fungos como bons produtores de pectinases, nem todos podem ser amplamente empregados

no contexto da biotecnologia, pois alguns deles são produtores de diferentes micotoxinas (Dalbøge 1997).

Xiao et al. (2008) caracterizaram cinco pectatolases (PL) e duas poligalacturonases (PG) de *Xanthomonas campestris* e *Streptomyces coelicolor*, expressas em *E. coli*. Das sete sequências selecionadas, somente uma não apresentou atividade enzimática. Entretanto, uma das poligalacturonases heterólogas apresentou uma eficiência catalítica 40-140 vezes menor do que outras poligalacturonases caracterizadas, sugerindo que a expressão heteróloga pode não refletir o mesmo comportamento da enzima nativa.

2.9 Sistema de expressão heteróloga

A produção de proteínas recombinantes purificadas e caracterizadas tornou-se uma tarefa fundamental para a indústria (Schmidt 2004). Em termos de eficiência, os sistemas de expressão oferecem diferentes características para a produção de proteínas recombinantes. Sistemas bacterianos ainda são os mais atrativos graças ao baixo custo, alta produtividade, rápida produção e extensa informação na literatura. Dentre os organismos mais estudados, *Escherichia coli* é de longe o mais explorado para expressão de proteínas heterólogas seguido de Bacilos gram-positivos (Terpe 2006).

Além de bactérias, leveduras também são amplamente utilizadas pois oferecem as mesmas vantagens dos sistemas procariotos (a velocidade de crescimento, fácil manipulação genética, baixo custo, alta produtividade) e também oferece algumas vantagens dos sistemas eucarióticos. Dentre as vantagens está o potencial de realizar muitas modificações pós-transcricionais tipicamente associadas com eucariotos superiores, como o processamento de sequências sinal, dobramentos, formação de pontes dissulfeto, adição de certos tipos de lipídios e sistemas de secreção. Os gêneros mais utilizados são: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* e *Yarrowia*. As principais desvantagens deste sistema são as hiper-glicosilações que podem ocorrer e o modo de respiração fermentativa, que resulta em um crescimento mais lento e, conseqüentemente, menor rendimento (Juturu and Wu 2018).

A levedura *Pichia pastoris* é metilotrófica (pode usar metanol como fonte de carbono) e passou a ser muito utilizada em biotecnologia especialmente para

produção de proteínas recombinantes na produção de biofármacos e enzimas industriais. Esta levedura foi introduzida há mais de 40 anos pela empresa “Phillips Petroleum” para produção comercial de proteínas para alimentação industrial baseado no processo de fermentação utilizando metanol como fonte de carbono. Entretanto, a crise do petróleo em 1973 resultou no aumento drástico do preço do metanol e tornou esta produção inviável (Ahmad et al. 2014).

A principal vantagem de utilizar a levedura *P. pastoris* se deve ao fato de que esta levedura secreta baixos níveis de proteínas endógenas. Logo, as proteínas recombinantes secretadas constituem a vasta maioria do total de proteína no meio. Sendo assim, o direcionamento da proteína recombinante para o meio extracelular pode servir como uma vantagem para o processo de purificação. Para que o direcionamento das proteínas recombinantes ocorra, a sequência codificadora das proteínas é geralmente fundida com o peptídeo-sinal do fator de secreção alfa (α -MF) de *S. cerevisiae* (Lin-Cereghino et al. 2013).

Além disso, esta levedura é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura (15 a 30°C) e possui relativa tolerância a variação de pH (3.0 a 7.0) (Macauley-Patrick et al. 2005). As condições de crescimento de *P. pastoris* são ideais para produção em larga escala porque os componentes do meio são baratos e definidos, consistindo de fontes puras de carbono, biotina, sais e água. O baixo pH do meio e a presença do metanol dificultam a contaminação por outros microrganismos (Cereghino and Cregg 2000).

Outro aspecto positivo é que o nível de transcrição, que responde ao promotor do gene AOX1, pode ser 3-5 vezes maior em células crescendo em metanol. Este promotor fortemente induzido é comumente utilizado para expressão de proteínas recombinantes. As principais vantagens de utilizá-lo são: 1) A expressão de proteínas heterólogas reguladas por este promotor sofre forte influência de mecanismos de repressão e desrepressão; 2) É possível alcançar altos níveis de produção da proteína heteróloga; 3) repressão do gene AOX1 pela maioria das fontes de carbono, exceto o metanol, garantindo um alto crescimento celular antes da indução; e 4) a indução ocorre facilmente pela simples adição de metanol. Por outro lado, as principais desvantagens são: 1) a dificuldade em monitorar a concentração de metanol durante a fermentação; 2) metanol é altamente inflamável e tóxico, o que dificultaria a produção em grande escala; e 3) o uso de duas fontes de carbono gera a dificuldade

de mudar a cultura da fase de crescimento (com glicerol) para o outro meio de cultura de indução (com metanol) (Juturu and Wu 2018).

A enzima álcool oxidase (AOX), codificada pelos genes AOX1 e 2, é responsável pela metabolização do metanol, sendo maior a contribuição de AOX1 nessa atividade (Ellis et al. 1985). As primeiras reações do metabolismo de metanol para obtenção de energia ocorrem no peroxissomo e depois continuam no citoplasma. Esta enzima oxida o metanol a formaldeído, e posteriormente a peróxido de hidrogênio, que então é degradado a oxigênio e água. Uma parte do formaldeído deixa o peroxissomo e vai para o citoplasma, onde é oxidado a formato e carbono (Cereghino and Cregg 2000).

A levedura *Pichia pastoris* pode apresentar diferentes fenótipos associados ao metabolismo de metanol. Linhagens que apresentam o gene AOX1 intacto (responsável por até 85% da utilização do metanol) tem fenótipo Mut⁺ (*methanol utilization plus*) e apresentam taxa de crescimento no metanol igual à linhagem selvagem. A linhagem com o gene AOX1 interrompido ou deletado utiliza somente o gene AOX2 (que possui menor contribuição sobre a metabolização do metanol) apresenta o fenótipo Mut^S (*methanol utilization slow*) e tem o crescimento mais lento com metanol como fonte de carbono. A linhagem com os genes AOX1 e AOX2 interrompidos ou deletados apresenta o fenótipo Mut⁻ sendo incapaz de crescer em meio com metanol como fonte única de carbono (Cereghino and Cregg 2000; Inan and Meagher 2001).

Com base nas informações descritas acima, é plausível pensar que a levedura *Pichia pastoris* pode representar um meio otimizado de produção de enzimas de interesse biotecnológico, haja vista a capacidade de produzir e secretar grandes quantidades de proteína heteróloga, dispensando, a princípio, a necessidade de purificação.

2.10 Modificações endógenas nas paredes celulares pelas plantas: o exemplo do aerênquima

A busca de enzimas para aplicações industriais tem sido feita em sua maioria em microrganismos. Fungos e bactérias, por exemplo, produzem um grande número de hidrolases que utilizam para decompor a biomassa vegetal. Para dar conta da

degradação da biomassa existente naturalmente, há grande variedade de microrganismos, cada um com sua especificidade. Há também um grande número de espécies que atacam células vegetais como patógenos e nestes casos, para ter acesso aos tecidos vegetais, têm que produzir hidrolases. Além da relativa simplicidade dos microrganismos, o que permite dominar seu crescimento e cultura, recentemente tem sido e mais rápido e eficiente o sequenciamento de seus genomas e obter sequências completas de genes de hidrolases que podem ser expressas heterológicamente.

Nas plantas, há uma série de mecanismos endógenos em que paredes celulares são completamente degradadas (Buckeridge 2010) ou modificadas (Leite et al. 2017). Grandis et al. (2014) e posteriormente Tavares et al. (2015) revisaram a literatura para fenômenos em que paredes celulares vegetais são degradadas/modificadas. Tais fenômenos ocorrem durante a mobilização de reservas, amadurecimento de frutos, abscisão foliar, entre outros.

No caso da cana de açúcar, uma investigação do processo de senescência foliar demonstrou que as paredes celulares das folhas não sofrem alterações significativas (Martins et al. 2016).

Por outro lado, havia anteriormente a menção, por Grandis (2014) de que a formação do aerênquima nas raízes de cana-de-açúcar se mostrava como um mecanismo promissor para a busca de um processo na própria planta que fosse capaz de modificar a parede celular usando enzimas.

De fato, uma das situações em que a planta pode produzir pectinases é durante a formação do aerênquima. O aerênquima ocorre em várias espécies de plantas e é um tecido que possui grandes espaços de ar, utilizado principalmente para o transporte de gases (Evans 2004). O aerênquima pode ser formado de dois diferentes modos, um deles é o processo esquizógeno onde ocorre pela separação celular, e o outro é o lisígeno, que envolve o processo de morte celular programada. A cana-de-açúcar apresenta a formação de aerênquima lisígeno de forma constitutiva, ou seja, forma o aerênquima nas raízes independente de fatores externos. Entretanto a formação do aerênquima também pode ser influenciada por estresses ambientais como alagamento e estresse nutricional (Tavares et al. submetido).

Estudos realizados por Leite et al. (2017) em cana-de-açúcar mostraram a formação do aerênquima constitutivo em 40% do córtex radicular mesmo sem nenhum fator ambiental associado. Durante a formação do aerênquima foi observado decréscimo nos níveis de homogalacturonano, concomitante com o aumento dos níveis de transcrito que codifica para uma EPG. Um gene denominado scEPG1 teve seus alelos completamente sequenciados, sugerindo um potencial para aplicações relacionadas à bioenergia na cana-de-açúcar (Tavares et al., submetido).

A prevalência do poligalacturonano na lamela média (verificada em cana-de-açúcar por Leite et al., 2017) na região da lamela média (região onde duas células adjacentes estão em contato) sugere que este constitua um ponto chave para a adesão celular, podendo seu decréscimo levar à redução da adesão, expondo mais as células para que outras enzimas atuem na degradação dos diferentes carboidratos de parede (Atkinson et al. 2002).

De fato, a superexpressão de uma poligalacturonase em maçãs transgênicas resultou em fenótipo de folhas acinzentadas e queda prematura das folhas causadas pela redução da adesão celular nas zonas de abscisão (Atkinson et al. 2002). Nesse sentido, a caracterização da enzima codificada por scEPG1 de cana-de-açúcar, possível responsável pelo efeito de redução de adesão celular e afrouxamento do tecido quando produzida em sistema nativo (Leite et al., 2017), poderia ter um bom potencial para aplicações em bioenergia e também para outras aplicações industriais.

9. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A endopoligalacturonase de *Saccharum* sp. foi eficientemente expressa em sistema de expressão heterólogo com *Pichia pastoris* X33. O mutante produtor desta enzima produziu os maiores valores de proteínas totais com 96 horas de indução com metanol. O extrato bruto obtido apresentou melhores valores de atividade enzimática quando incubada por 22 horas a 45 °C em tampão acetato de sódio pH 5,0, sofrendo interação positiva do agente redutor DTT a 60 mM.

Ensaio futuros de purificação desta enzima e obtenção dos parâmetros cinéticos poderão auxiliar na compreensão do modo de ação e especificidade pelo substrato.

A scEPG1 parece ter bom potencial para uso em biotecnologia, seja em aplicações como as de produção de sucos processados ou produção de vinho, seja para aplicação em bioenergia.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott DW, Boraston AB. Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72(2):301–16.

Abdulrachman D, Thongkred P, Kocharin K, Nakpathom M, Somboon B, Narumol N, et al. Heterologous expression of *Aspergillus aculeatus* endopolygalacturonase in *Pichia pastoris* by high cell density fermentation and its application in textile scouring. BMC Biotechnol. BioMed Central; 17(1):15.

Abramson M, Shoseyov O, Shani Z. Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. Plant Sci. Elsevier; 178(2):61–72.

Agrawal PB, Nierstrasz VA, Klug-Santner BG, Gübitz GM, Lenting HBM, Warmoeskerken MMCG. Wax removal for accelerated cotton scouring with alkaline pectinase. Biotechnol. J. 2(3):306–15.

Ahlawat S, Mandhan RP, Dhiman SS, Kumar R, Sharma J. Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. Appl. Biochem. Biotechnol. 149(3):287–93.

Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer; 98(12):5301–17.

Alfenas AC, Brune W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Eletroforese isoenzimas e proteínas afins. Viçosa; 1998. p. 151–82.

Ali Z, Brady C. Purification and Characterization of the Polygalacturonases of Tomato Fruits. Aust. J. Plant Physiol. 9(2):155.

Alimardani-Theuil P, Gainvors-Claisse A, Duchiron F. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. Process Biochem. Elsevier; 46(8):1525–37.

Alonso Pippo W, Luengo CA, Alonsoamador Morales Alberteris L, Garzone P, Cornacchia G. Energy Recovery from Sugarcane-Trash in the Light of 2nd Generation Biofuel. Part 2: Socio-Economic Aspects and Techno-Economic Analysis. Waste and Biomass Valorization. Springer Netherlands; 2(3):257–66.

Alonso Pippo W, Luengo CA, Alonsoamador Morales Alberteris L, Garzone P, Cornacchia G. Energy Recovery from Sugarcane-Trash in the Light of 2nd Generation Biofuels. Part 1: Current Situation and Environmental Aspects. Waste and Biomass Valorization. Springer Netherlands; 2(1):1–16.

Amid M, Manap Y, Zohdi K. Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. Eur. Food Res. Technol. Springer Berlin Heidelberg; 239(1):21–9.

Atkinson RG, Schröder R, Hallett IC, Cohen D, MacRae E a. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion. Plant Physiol. 129(1):122–33.

Babu Y, Bayer M. Plant Polygalacturonases Involved in Cell Elongation and Separation—The Same but Different? Plants. 3(4):613–23.

Barage SH, Jalkute CB, Dhanavade MJ, Sonawane KD. Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences. Virtual Screen. Mol. Dyn. Simul. study hECE-1 protease Inhib. 4(1):1279–91.

Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. Bioinformatics. Oxford University Press; 27(3):343–50.

Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, Saddler J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. Wiley-Blackwell; 97(2):287–96.

Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18(5):355–83.

Biz A, Farias FC, Motter FA, De Paula DH, Richard P, Krieger N, et al. Pectinase activity determination: An early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works! Uversky VN, editor. PLoS One. Public Library of Science; 9(10).

Blanco P, Sieiro C, Diaz a, Villa TG. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. 40(11):974–7.

Borin GP, Sanchez CC, De Souza AP, De Santana ES, De Souza AT, Leme AFP, et al. Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass. PLoS One. 10(6).

Breuil C, Saddler JN. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. Enzyme Microb. Technol. Elsevier; 7(7):327–32.

Buckeridge M, Santos W dos, Tiné MAS, Souza AP. The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance. Compend. Bioenergy Plants. CRC Press; 2015. p. 31–50.

Buckeridge MS. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. Plant Physiol. 154(3):1017–23.

Buckeridge MS, Grandis A, Tavares EQP. Disassembling the Glycomic Code of Sugarcane Cell Walls to Improve Second-Generation Bioethanol Production. Bioethanol Prod. from Food Crop. Academic Press; :31–43.

Buckeridge MS, De Souza AP. Breaking the “Glycomic Code” of Cell Wall Polysaccharides May Improve Second-Generation Bioenergy Production from Biomass. Bioenergy Res. 7(4):1065–73.

Bussink HJD, Buxton FP, Fraaye BA, Graaff LH De, Visser J. The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. 90:83–90.

Carpio LGT, Simone de Souza F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. Renew. Energy. Pergamon; 111:771–80.

Carr JG. Tea, coffee and cocoa. In: B.J.B, editor. Microbiol. Fermented Foods. II. London: Elsevier Applied Science; 1985. p. 133–54.

Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, DeLucas LJ. His-tag impact on structure. Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography (IUCr); 63(3):295–301.

Castilho LR, Medronho RA, Alves TL. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 71(1):45–50.

Celestino SMC, Maria de Freitas S, Javier Medrano F, Valle de Sousa M, Filho EXF. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *J. Biotechnol.* 123(1):33–42.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(1):45–66.

Channe PS, Shewale JG. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: Effect of culture conditions. *Folia Microbiol. (Praha)*. Springer Netherlands; 40(1):111–7.

Chant A, Kraemer-Pecore CM, Watkin R, Kneale GG. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expr. Purif.* 39(2):152–9.

Chaudhri A, Suneetha V. Microbially Derived Pectinases: A Review. *IOSR J. Pharm. Biol.* 2(2):1–5.

Chen Q, Jin Y, Zhang G, Fang Y, Xiao Y, Zhao H. Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. *Energies. Molecular Diversity Preservation International*; 5(8):3019–32.

Cho SW, Lee S, Shin W. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *J. Mol. Biol.* 311(4):863–78.

Correia R. Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris*. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2015.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16(1):23–52.

Dalbøge H. Expression cloning of fungal enzyme genes; a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiol. Rev.* 21(1):29–42.

Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit. 2005. p. 119–38.

Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol. 15(6):637–45.

Delabona P da S, Cota J, Hoffmam ZB, Paixão DAA, Farinas CS, Cairo JPLF, et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -l-arabinofuranosidase. Bioresour. Technol. Elsevier; 131:500–7.

Dewan SS. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - BIO030H. BCC Res. 2014. p. 1–157.

Edwards MC, Doran-Peterson J. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 95(3):565–75.

Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cell. Biol. 5(5):1111–21.

Esfandiari E, Shekari F, Shekari F, Esfandiari M. The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. 35(1):48–56.

Evans DE. Aerenchyma formation. New Phytol. Blackwell Publishing Ltd; 2004. p. 35–49.

Federici F. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Antonie Van Leeuwenhoek. 51(2):139–50.

Fernández-González M, ÚBeda JF, Vasudevan TG, Otero RRC, Briones AI. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. FEMS Microbiol. Lett. Oxford University Press; 237(2):261–6.

Ferrara MA, Severino NMB, Mansure JJ, Martins AS, Oliveira EMM, Siani AC, et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. *Enzyme Microb. Technol.* Elsevier; 39(7):1457–63.

Fox JD, Robyt JF. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.* 195(1):93–6.

Frazzon APG, Ramirez M V., Warek U, Balk J, Frazzon J, Dean DR, et al. Functional analysis of *Arabidopsis* genes involved in mitochondrial iron–sulfur cluster assembly. *Plant Mol. Biol.* 64(3):225–40.

Freudl R. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb. Cell Fact. BioMed Central*; 17(1):52.

Gadre R V., Van Driessche G, Van Beeumen J, Bhat MK. Purification, characterisation and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. *Enzyme Microb. Technol.* Elsevier; 32(2):321–30.

Gao S, Shain L. Characterization of an endopolygalacturonase produced by the chestnut blight fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol. Academic Press*; 45(3):169–79.

Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech. Springer*; 6(1):47.

Gayathri T, Kishor Mohan TC, Murugan K. Purification and Characterization of Polygalacturonase-3 from Jamaica cherry (*Muntingia calabura* Linn). *J. Plant Biochem. Biotechnol. Springer India*; 16(2):127–30.

Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, et al. Poplar Carbohydrate-Active Enzymes. Gene Identification and Expression Analyses. *PLANT Physiol.* 140(3):946–62.

Geoczé MLA. Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *Penicillium expansum*. UFV; 1994.

González-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA, Haydé González-Carranza Z, Whitelaw CA, et al. Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128(2):534–43.

Grandis A, de Souza AP, Tavares EQP, Buckeridge MS. Using natural plant cell wall degradation mechanisms to improve second generation bioethanol. *Plants and BioEnergy*. New York, NY: Springer New York; 2014.

Guillén M, Benaiges MD, Valero F. Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract. *Biochem. Eng. J.* 54(2):117–23.

Gunawardena A, Pearce D, Jackson M, Hawes C, Evans D. Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localised form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L) promoted by ethylene. *Plant, Cell Environ.* 24.

Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Biocomput.* 2001. p. 310–22.

Gusakov A V., Salanovich TN, Antonov AI, Ustinov BB, Okunev ON, Burlingame R, et al. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 97(5):1028–38.

Hadfield KA, Bennett AB. Update on Cell Walls Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function 1 PG and pectin disassembly in ripening fruit. :337–43.

Han Y, Chen H. Improvement of corn stover bioconversion efficiency by using plant glycoside hydrolase. *Bioresour. Technol.* Elsevier Ltd; 102(7):4787–92.

Hayward AC, Mariano RLR. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. *Revisão Anu. Patol. Plantas.* 5:199–234.

Heimo H, Palmu K, Suominen I. Expression in *Pichia pastoris* and Purification of *Aspergillus awamori* Glucoamylase Catalytic Domain. *Protein Expr. Purif. Academic Press*; 10(1):70–9.

Henrissat B, Coutinho PM, Davies GJ. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* Kluwer Academic Publishers; 47(1/2):55–72.

Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(2):89–102.

Hoondal G, Tiwari R, Tewari R, Dahiya N, Beg Q. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002 [cited 2018 Jul 29]. p. 409–18.

Houle V, Gagnon MC, Dubé E, Hurtubise Y, Beauregard M. Impact of Glycosylation on *Saccharomyces cerevisiae* Endopolygalacturonase PGU1 Activity and Stability. *Open Biotechnol. J.* 2008.

Iconomou D, Arapoglou D, Israilides C. Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. *Grasas y Aceites.* 61(3):303–11.

Inan M, Meagher MM. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.* 92(6):585–9.

Jaiswal D, De Souza AP, Larsen S, Lebauer DS, Miguez FE, Sparovek G, et al. Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use. *Nat. Clim. Chang.* Nature Publishing Group; 7(11):788–92.

Javaid Asad et al. Production, Purification and Characterization of Endopolygalacturonase by *Bacillus subtilis*. *Biochem. Anal. Biochem.* OMICS International; 04(03):1–12.

Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* Elsevier; 40(9):2931–44.

Jia J, Wheals a. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr. Genet.* 38(5):264–70.

Jin H, Liu G, Ye X, Duan Z, Li Z, Shi Z. Enhanced porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. *Biochem. Eng. J.* Elsevier; 52(1):91–8.

Juturu V, Wu JC. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem.* 19(1):7–21.

Kalantzi S, Mamma D, Kalogeris E, Kekos D. Improved properties of cotton fabrics treated with lipase and its combination with pectinase. *Fibres Text. East. Eur.* 82(5):86–92.

Kashyap D. R, Vohra P. K, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol. Elsevier*; 77(3):215–27.

Kaur G, Kumar S, Satyanarayana T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile Apinis*. *Bioresour. Technol.* 94(3):239–43.

Khedher IBA, Bressollier P, Urdaci MC, Limam F, Marzouki MN. Production and biochemical characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* α -amylase ScAmy1: Assay in starch liquefaction treatments. *J. Food Biochem.* 32(5):597–614.

Kipriyanov SM, Kupriyanova OA, Little M, Moldenhauer G. Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 196(1):51–62.

Kobayashi DY, Palumbo JD. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *Microb. endophytes.* 2000. p. 199–236.

Kohno K. Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *J. Biochem.* 147(1):27–33.

Kravtchenko TP, Penci M, Voragen AGJ, Pilnik W. Enzymic and chemical degradation of some industrial pectins. *Carbohydr. Polym. Elsevier*; 20(3):195–205.

Lang C, Looman AC. Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer-Verlag; 44(1–2):147–56.

Latarullo MBG, Tavares EQP, Padilla G, Leite DCC, Buckeridge MS. Pectins, Endopolygalacturonases, and Bioenergy. *Front. Plant Sci. Frontiers Media SA*; 7:1401.

Leite DCC, Grandis A, Tavares EQP, Piovezani AR, Pattathil S, Avci U, et al. Cell wall changes during the formation of aerenchyma in sugarcane roots. *Ann. Bot.* 120(5):693–708.

Li Y. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 55(2):73–83.

Lin-Cereghino GP, Stark CM, Kim D, Chang JJW, Shaheen N, Poerwanto H, et al. The effect of α -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene. NIH Public Access*; 519(2):311–7.

Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*. 50(5):325–8.

Lopez-Casado G, Urbanowicz BR, Damasceno CM, Rose JK. Plant glycosyl hydrolases and biofuels: a natural marriage. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(3):329–37.

Love KR, Shah KA, Whittaker CA, Wu J, Bartlett MC, Ma D, et al. Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*. *BMC Genomics*. BioMed Central; 17(1):550.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 22(4):249–70.

Macedo IC, Seabra JEA, Silva JEAR. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*. 32(7):582–95.

Maldonade IR, Carvalho PGB, Ferreira NA, Moulin BSF. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico.:1–4.

Malheiros Ferreira H, Ximenes Ferreira Filho E, Ferreira HM, Filho EXF. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Carbohydr. Polym.* Elsevier; 57(1):23–9.

Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45(D1):D200–3.

Marcus SE, Verhertbruggen Y, Hervé C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, et al. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.* 8(60):1–12.

Martins MTB, De Souza WR, Da Cunha BADB, Basso MF, De Oliveira NG, Vinecky F, et al. Characterization of sugarcane (*Saccharum* spp.) leaf senescence: Implications for biofuel production. *Biotechnol. Biofuels*. BioMed Central; 9(1):153.

Masoud W, Jespersen L. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 110(3):291–6.

McFeeters RF. A manual method for reducing sugar determinations with 2,2'-bicinchoninate reagent. *Anal. Biochem.* Academic Press; 103(2):302–6.

McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol. Biol. Int. Hindawi*; 2014:287430.

McKay AM. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. *FEMS Microbiol. Lett.* Oxford University Press; 56(3):355–8.

Mei Y, Chen Y, Zhai R, Liu Y. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from *Bacillus halodurans* M29. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 94:77–81.

Meneses A. Produção de enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico G088. :112.

Minic Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta.* 227(4):723–40.

Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(3):266–77.

Mopper K, Melvin Gindler E. A new noncorrosive dye reagent for automatic sugar chromatography. *Anal. Biochem.* Academic Press; 56(2):440–2.

Mukesh Kumar DJ, Saranya GM, Suresh K, Andal Priyadharshini D, Rajakumar R. Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp . MFW7 using Cassava Waste. *Asian J. Plant Sci. Res.* 2(3):369–75.

Murthy PS, Naidu MM. Improvement of Robusta Coffee Fermentation with Microbial Enzymes. *Eur. J. Appl. Sci.* 3(4):130–9.

Nelson N. A photometric adaptation of Somogyi Method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 03(2):375–80.

Niaz A, Malik QJ, Muhammad S, Shamim T, Asghar S. Bioscouring of cellulosic textiles. *Color. Technol.* Wiley/Blackwell (10.1111); 127(4):211–6.

Ojeda K, Kafarov V. Exergy analysis of enzymatic hydrolysis reactors for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Chem. Eng. J. Elsevier*; 154(1–3):390–5.

Oumer OJ, Abate D. Characterization of Pectinase from *Bacillus subtilis* Strain Btk 27 and Its Potential Application in Removal of Mucilage from Coffee Beans. *Enzyme Res.* 2017.

Pakarinen A, Zhang J, Brock T, Maijala P, Viikari L. Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin. *Bioresour. Technol.* Elsevier Ltd; 107:275–81.

Pařenicová L, Benen JA, Kester HC, Visser J. *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* 345 Pt 3:637–44.

Parre E, Geitmann A. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of *Solanum chacoense*. *Planta.* 220(4):582–92.

Pedrolli DB, Monteiro AC, Gomes E, Cano Carmona E. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes [Internet]. *Open Biotechnol. J.* 2009.

Pijning T, van Pouderooyen G, Kluskens L, van der Oost J, Dijkstra BW. The crystal structure of a hyperthermoactive exopolygalacturonase from *Thermotoga maritima* reveals a unique tetramer. *FEBS Lett.* Wiley-Blackwell; 583(22):3665–70.

Pouderooyen G Van, Snijder HJ, Benen JAE, Dijkstra BW. Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. 554:462–6.

Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN. Fruit ripening phenomena--an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47(1):1–19.

Rathore D, Nigam PS, Singh A. Biorefinery concept for a microalgal bioenergy production system. *Mar. bioenergy trends Dev.* Boca Raton: CRC Press; 2015. p. 179–94.

Revilla I, Gonzalez-San Jose ML. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *Int. J. Food Sci. Technol.* Wiley/Blackwell (10.1111); 38(1):29–36.

RFA. Renewable Fuels Association [Internet]. Statistics (Ber). 2015.

Roohvand F, Shokri M, Abdollahpour-Alitappeh M, Ehsani P. Biomedical applications of yeast- a patent view, part one: yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2017. p. 929–51.

Saad N, Briand M, Gardarin C, Briand Y, Michaud P. Production, purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* NRRL 1894. *Enzyme Microb. Technol.* Elsevier; 41(6–7):800–5.

Saarilahti HT, Heino P, Pakkanen R, Kalkkinen N, Palva I, Palva ET. Structural Analysis of the Peh-a Gene and Characterization of Its Protein Product Endopolygalacturonase of *Erwinia-Carotovora-Ssp-Carotovora*. *Mol. Microbiol.* 4(6):1037–44.

Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 39(C):213–94.

Santi L, Berger M, Silva W. Pectinases e Pectina: Aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Rev. Cad. Pedagógico*. Editora Univates; 1999.

Santoso A, Herawati N, Rubiana Y. Effect of Methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. 2012.

Sato R, Matsumoto T, Hidaka N, Imai Y, Abe K, Takahashi S, et al. Cloning and expression of carp acetylcholinesterase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr. Purif.* 64(2):205–12.

Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(4):363–72.

Serrat M, Bermúdez RC, Villa TG. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 97(3):193–208.

Seyfried M, Soldera-Silva A, Bovo F, Stevan-Hancke FR, Maurer JBB, Zawadzki-Baggio SF. Pectinas de plantas medicinais: Características estruturais e atividades imunomoduladoras. *Rev. Bras. Plantas Med. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais*; 2016. p. 201–14.

Sharma BR, Naresh L, Dhuldhoya NC, Merchant SU, Merchant UC. An Overview on Pectins. *Times food Process. J.* 51(June-July):44–51.

Socol CR, Vandenberghe LP de S, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.* 101(13):4820–5.

Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC, Long SP. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 329(5993):790–2.

Somogyi M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195(1):19–23.

Sørensen HR, Pedersen S, Meyer AS. Synergistic enzyme mechanisms and effects of sequential enzyme additions on degradation of water insoluble wheat arabinoxylan. *Enzyme Microb. Technol. Elsevier*; 40(4):908–18.

De Souza AP, Grandis A, Leite DCC, Buckeridge MS. Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol. *BioEnergy Res.* 7(1):24–35.

De Souza AP, Kamei CLA, Torres AF, Pattathil S, Hahn MG, Trindade LM, et al. How cell wall complexity influences saccharification efficiency in *Miscanthus sinensis*. *J. Exp. Bot.* 66(14):4351–65.

De Souza AP, Leite DCC, Pattathil S, Hahn MG, Buckeridge MS. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. *Bioenergy Res.* 6(2):564–79.

Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KTBG, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32(10):1478–88.

Sticklen MB. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat. Rev. Genet. Nature Publishing Group*; 9(6):433–43.

Stratilová E, Mislovicová D, Kacuráková M, Machová E, Kolarová N, Markovic O, et al. The glycoprotein character of multiple forms of *Aspergillus polygalacturonase*. *J. Protein Chem.* 17(2):173–9.

Tavares EQDP. Regulação da degradação da parede celular durante a formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar. 2015. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo

Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer-Verlag; 72(2):211–22.

Thakur A, Pahwa R, Singh S, Gupta R. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. *Enzyme Res.* Hindawi Limited; 2010:170549.

Thakur J, Gupta R. Improvement of tea leaves fermentation through pectinases. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* Akadémiai Kiadó ; 59(3):321–34.

UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar. Unica data. 2018.

Vogel J. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(3):301–7.

Voragen AGJ, Schols HA, Pilnik W. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectins by h.p.l.c. *Top. Catal.* Elsevier; 1(1):65–70.

Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y, et al. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. *Sci. Rep.* Nature Publishing Group; 7:41850.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1):W296–303.

Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 2006 [cited 2018 Aug 26]. p. 391–9.

Xiao Z, Boyd J, Grosse S, Beauchemin M, Coupe E, Lau PCK. Mining *Xanthomonas* and *Streptomyces* genomes for new pectinase-encoding sequences and their heterologous expression in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer-Verlag; 78(6):973–81.

Zagrobelny M, Bak S, Rasmussen AV, Jørgensen B, Naumann CM, Møller BL. Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry*. 2004. p. 293–306.

Zanella K. Extração da Pectina da Casca da Laranja-Pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com Solução Diluída de Ácido Cítrico. ; :23–33.

Zhang AL, Zhang TY, Luo JX, Chen SC, Guan WJ, Fu CY, et al. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Springer-Verlag; 34(2):117–22.

Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(7):2754–8.