



Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Ciências Biológicas - IB
Departamento de Biologia Celular - CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular - PGCEL

Produção e otimização de enzimas holocelulolíticas por *Paecilomyces formosus* em diferentes resíduos de café

Maria Carolina Andrade

Brasília-DF, novembro de 2020
Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Produção e otimização de enzimas holocelulolíticas por *Paecilomyces formosus* em diferentes resíduos de café

Maria Carolina Andrade

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como pré-requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Brasília – DF, novembro de 2020

Produção e otimização de enzimas holocelulolíticas por *Paecilomyces formosus* em diferentes resíduos de café

Maria Carolina Andrade

Tese de Doutorado

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Prof. Dr. Gabriel Sergio Costa Alves
Prof. Dr. Helder Andrey Rocha Gomes
Prof. Dr. Aisel Valle Garay

*Aos meus amados pais, Sônia e Luciano.
À minha irmã, Rafaella.
Ao meu namorado, Gabriel.
DEDICO*

Agradecimentos

A Deus, que sempre esteve comigo e me fortaleceu nessa jornada.

À minha família (minha base), meus pais, Sônia e Luciano, que me apoiaram em todos os momentos e nunca mediram esforços para me ver realizar meu sonho. À minha irmã, Rafaella, que nunca me deixou fraquejar. Ao meu amor, Gabriel, que, com tanta dedicação, cuidou de mim e sempre me incentivou a querer ir mais longe. À minha querida tia Lourdes, pelo acalento, lugar de paz e bons momentos vividos nessa Capital Federal. Amo vocês de todo o coração!

Ao meu orientador, professor Edivaldo, que sempre esteve de portas abertas para me receber, me transmitir seus conhecimentos e ajudar em tudo o que precisei. Agradeço por tudo, pela confiança e, principalmente, paciência.

Ao professor Aisel Valle, que me acolheu e ajudou em tantos momentos dentro da pesquisa e fora dela, encontrei em você mais do que um professor, um amigo. Muito obrigada pelo apoio de sempre!

Ao professor Carlos André, pela tutoria durante todo o doutorado e, suas contribuições sempre muito importantes e bem-vindas.

Ao professor Luiz Vale, pela disponibilidade e ajuda de sempre.

À professora Sônia Freitas, pelo suporte e por me receber tão bem em seu laboratório; encontrei na Biofísica uma família especial que levarei sempre comigo.

Ao Alexandre e todo o pessoal da fazenda Boa Sorte e Café Cazê, por me disponibilizarem com tão boa vontade os resíduos de café; sem vocês, essa pesquisa não teria acontecido.

Aos amigos Fabyano Alvares e Pedro Fontes, por toda a ajuda com a parte estatística e tantos outros experimentos, além dos nossos cafés e papos descontraídos. Vocês foram essenciais nessa jornada!

Aos amigos do laboratório de Enzimologia, Caio, Helder, Antonielle, Leonora, Raíssa, Diandra, Camila, Andreza, Guilherme, Jade e Leonardo: agradeço infinitamente por todos os nossos momentos divertidos, o companheirismo de sempre, risadas compartilhadas e conhecimentos divididos. Ao meu estagiário (e filho) Allisson, por sempre me auxiliar em tudo, entender o meu lado metódico e sempre ser tão companheiro.

Aos amigos da Biofísica, Izadora (minha flor de menina), Gideane, Amanda, Júlia, Fernanda, Wallace, Diogo, Jônatas, Renata, Patrícia, Napoleão e professor João, aprendi tanto com vocês, nossos cafés me ensinaram além da ciência.

Aos amigos do corredor, Carla, Juliana, Raul, Rafaella, Brendo, Philipe, Helena, Gabrielle, Francilene, Débora, Pedro e Mário, pelo bom humor e animação de sempre, a companhia tão enriquecedora e pelas nossas incríveis festas e happy hours, que todos os que passarem pela vida acadêmica tenham a sorte de ter companheiros como vocês!

Às técnicas Marisia e Margarete, pela ajuda constante, bons ensinamentos e amizade de sempre.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular (PPGBiomol) e à Universidade de Brasília, pela estrutura, recursos humanos e financeiros. Agradeço aos professores do programa todos os conhecimentos transmitidos durante as disciplinas, simpósios e outros momentos.

Aos amigos que, mesmo distante, me deram tanto apoio e entenderam as ausências causadas pela distância.

A tantas pessoas que, de forma tão simples, influenciaram direta e indiretamente nessa fase tão especial da minha vida. O doutorado é um sonho realizado!

Palavras não são suficientes para agradecer, mas, muito obrigada a todos vocês!

Apoio financeiro

Este trabalho foi desenvolvido com suporte financeiro da CAPES, CNPq (processo 303614/2017-0) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Pronex, processo 0193.001195/2016).

“Quando o mundo estiver unido na busca de conhecimento, e não mais lutando por dinheiro e poder, então nossa sociedade poderá enfim evoluir a um novo nível.”

Jack Schafer

Resumo

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, representando 35% da produção total. A grande produção, beneficiamento e consumo de café levam à geração de uma enorme quantidade de resíduos pós-colheita. Neste trabalho, o potencial de produção de enzimas holocelulolíticas por *Paecilomyces formosus* em resíduos agroindustriais de café é avaliado. Um screening enzimático realizado em oito cepas de *P. variotii* revelou as três maiores produtoras de pectinases (3RET13, 3RE14 e 3RE21) para este experimento. Para a identificação molecular destas cepas, foram utilizadas as regiões espaçadoras internas transcritas ITS (D1/D4) e as regiões gênicas calmodulina (*cal*) e β -*tubulina*. Os isolados indicaram similaridade às sequências de *P. formosus*. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para a busca de melhores condições de cultivo e pré-tratamento para indução de holocelulases. Diferentes fatores relacionados ao pré-tratamento (concentração de biomassa, tempo e temperatura de exposição) e ao cultivo (pH, agitação, temperatura e suplementação de nitrogênio) foram avaliados. Os perfis de pectinases foram descritos para a cepa 3RE21. O tratamento de baixa severidade com utilização de menor concentração de biomassa (140°C, 6 min., 1%) e condições mais brandas de cultivo (20°C, 87 rpm, pH 4,0 e sem suplementação de nitrogênio) foi selecionado para nova investigação da produção ótima de pectinases, devido à alta e rápida indução dessas enzimas pelo licor resultante. A semipurificação das pectinases (nomeada PEC_S200) foi realizada a partir do concentrado, sugerindo a formação de um hetero-oligômero composto por sete subunidades não ativas de massa molecular 65 e 62 kDa, e dez subunidades catalíticas de massa molecular de 38 kDa, sendo que a purificação mostrou rendimento de 16,6% e índice de purificação de 6,44 vezes. As melhores condições bioquímicas de atividade de PEC_S200 se mantiveram em faixas ácidas de pH (2 – 5), 65 °C, ativação na presença dos íons Zn, Co, K⁺, Mg²⁺, Mn, Na, dos modificadores de aminoácidos EDTA, SDS, DTT e β -mercaptoetanol e dos compostos fenólicos ácidos ferúlico e tânico, além de estabilidade em etanol 20%. Os parâmetros cinéticos

demonstraram alta afinidade pelo substrato (K_m 0,029 $\mu\text{g/ml}$) e taxa catalítica de 4,54 UI/mg. Pelas características apresentadas da pectinase deste estudo, as melhores aplicabilidades seriam nas indústrias alimentares humanas, têxteis, de rações animais e de produção de etanol de 2ª geração.

Abstract

Brazil is the world's largest producer and exporter of coffee, representing 35% of total production. The large production, processing and consumption of coffee lead to the generation of an enormous amount of post-harvest waste. In this work, the potential for the production of holocellulolytic enzymes by *P. formosus* in agro-industrial coffee residues is evaluated. An enzymatic screening performed on eight strains of *P. variotii* revealed the three largest pectinase producers (3RET13, 3RE14 and 3RE21) for this experiment. For the molecular identification of these strains, the internal spacer regions transcribed ITS (D1 / D4) and the gene regions calmodulin (lime) and β -tubulin were used. The isolates indicated similarity to the sequences to *P. formosus*. The response surface methodology was used to search for better culture conditions and pre-treatment for inducing holocellulases. Different factors were evaluated related to pre-treatment (biomass concentration, time and temperature of exposure) and cultivation (pH, agitation, temperature and nitrogen supplementation). The pectinases profiles were described for the 3RE21 strain. The treatment is of low severity and uses a lower concentration of biomass (140°C, 6 min., 1%) and milder culture conditions (20°C, 87 rpm, pH 4.0 and without nitrogen supplementation) was selected for further investigation of the optimal production of pectinases, due to the high and rapid induction of these enzymes by the resulting liquor. The semi-purification of the same (named PEC_S200) was carried out from the concentrate, suggesting the formation of a hetero-oligomer composed of seven non-active subunits of molecular mass 65 and 62 kDa and ten catalytic subunits of molecular mass 38 kDa; the purification showed a 16.6% yield and a 6.44 times purification yield. The best biochemical conditions for PEC_S200 activity were displayed in acidic pH ranges (2 - 5), 65 °C, activation in the presence of the Zn, Co, K +, Mg²⁺, Mn, Na ions, of the EDTA, SDS amino acid modifiers, DTT and β -mercaptoethanol and the phenolic compounds ferulic and tannic acids in addition to stability in 20% ethanol. The kinetic parameters demonstrated

high affinity for the substrate (K_m 0.029 $\mu\text{g} / \text{ml}$) and catalytic rate of 4.54 UI/mg. Due to the characteristics presented in the pectinase of this study, the best applications would be in the human food, textile, animal feed industries and second generation ethanol production.

Sumário

Capítulo I:.....	22
Introdução, objetivo geral e revisão bibliográfica	22
1 Introdução.....	23
2 Revisão bibliográfica.....	24
2.1. Café e suas especificidades.....	24
2.2. Biomassas lignocelulósicas	30
2.2.1. Celulose.....	32
2.2.2. Hemicelulose.....	34
2.2.3. Lignina	36
2.2.4. Pectina.....	38
2.3. Pré-tratamentos.....	41
2.4. <i>Paecilomyces formosus</i>	44
3 Justificativas.....	46
4 Objetivos gerais	47
5 Referências.....	47
Capítulo II.....	56
Seleção do microrganismo produtor de pectinase e pré-tratamentos das biomassas	56
lignocelulósicas.....	56
1. Introdução.....	57
2. Materiais e métodos	58
2.1. Reagentes	58
2.2. Origem dos resíduos de café.....	59
2.3. Screening das cepas utilizadas e potencial produtor de pectinases 59	
2.4. Caracterização dos extratos brutos	60

2.5. Determinação de proteínas totais.....	61
2.6. Análise estatística.....	61
2.7. Identificação molecular dos isolados	62
2.8. Pré-tratamento.....	63
2.9. Planejamento experimental e design fatorial	64
2.10. Análises composicionais dos diferentes licores e resíduos de café	68
3. Resultados e discussão.....	69
3.1. Screening e seleção dos isolados.....	69
3.2. Identificação das cepas.....	78
.....	79
3.3. Cultivo de <i>P. formosus</i> nos licores	80
3.4. Análise da superfície de resposta	93
3.5. Composição bromatológica dos licores e biomassas	98
4. Conclusões.....	104
5. Perspectivas	105
6. Referências bibliográficas.....	105
Capítulo III.....	113
Otimização da produção de pectinases por <i>Paecilomyces formosus</i> em águas residuárias do processamento de café	113
1. Introdução.....	114
2. Materiais e métodos	114
2.1. Reagentes	114
2.2. Origem dos resíduos de café.....	115
2.3. Origem do microrganismo e manutenção.....	115
2.4. Produção enzimática	115

2.5. Determinação da atividade enzimática	116
2.6. Ultrafiltração do extrato bruto enzimático	117
2.7. Purificação parcial da pectinase	117
2.8. Determinação da massa molecular enzimática	118
2.9. Determinação de massa molecular por espalhamento por luz dinâmica	119
2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	120
2.11. Determinação do efeito do pH na atividade enzimática	120
2.12. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática	121
2.13. Parâmetros cinéticos	121
2.14. Determinação do efeito de íons metálicos e modificadores de aminoácidos na atividade enzimática	121
2.15. Determinação do efeito de compostos fenólicos e etanol na atividade enzimática	122
3. Resultados e discussão	122
3.1. Produção de holocelulases em diferentes resíduos de café	122
3.2. Purificação parcial pectinase	125
3.6. Cromatografia de troca iônica	125
3.3. Cromatografia de exclusão molecular	128
3.4. Eletroforese: SDS-Page e Zimograma	130
3.5. Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes	132
3.6. DLS	136
3.7. Caracterização bioquímica pectinase	141
3.7.1. Determinação do efeito do pH na atividade enzimática	141

3.7.2. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática	143
3.7.3. Determinação do efeito de íons e modificadores na atividade enzimática.....	145
3.7.4. Determinação do efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática.....	150
3.7.5. Determinação de estabilidade da atividade enzimática em etanol	153
3.7.6. Determinação dos parâmetros cinéticos	155
4. Conclusões.....	156
5. Perspectivas futuras	157
6. Referências	157
Capítulo IV:	170
Applications of lignocellulosic biomass in the context of a biorefinery	170
1. Introduction.....	174
2. Crop residues in circular bioeconomy.....	174
3. Enzyme-based crop residue biorefineries.....	176
4. Global overview of crop residue generation.....	179
5. Applications of crop residues.....	187
5.1. Coffee.....	190
5.2. Soybean	194
5.3. Sugarcane	198
5.4. Corn.....	202
5.5. Wheat	205
5.6. Citrus Fruit	208
5.7. Rice	208

6. A few considerations on the implementation of crop residue biorefineries	212
7. Conclusion and perspectives	215
8. References	216
Anexo I	236
Indução enzimática de <i>Paecilomyces</i> sp em casca de café robusta	236

Lista de figuras

Capítulo I Capítulo III

Figura 1: Estrutura esquemática grão de café.....	26
Figura 2 Representação esquemática dos métodos de beneficiamento dos grãos de café e geração seus resíduos	27
Figura 4: Representação esquemática das ligações entre as fibras de celulose	33
Figura 5 Representação esquemática dos polissacarídeos que compõe as hemiceluloses.....	35
Figura 6 Representação esquemática das ligações entre as moléculas formadoras da lignina.....	37
Figura 7: Estrutura da molécula de pectina.....	39
Figura 8: Estruturas reprodutivas assexuais de <i>Paecilomyces formosus</i>	46

Capítulo II

Figura 9: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> 3RET13 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v).....	70
Figura 10: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> 3RE21 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v)..	71
Figura 11: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> 3DT13 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v).....	72
Figura 12: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> 3RE14 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v).....	73
Figura 13: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> 3RE22 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v).....	73
Figura 14: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> RC em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v).....	74
Figura 15: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> CF em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v).....	75
Figura 16: Perfil de indução holocelulolítico de <i>P. formosus</i> DC em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v).....	76
Figura 17: Sequências bidirecionais do gene <i>cal</i> da cepa 3RE21.....	79

Figura 18 Árvores filogenéticas parciais do gênero <i>Byssochlamys</i> . Relação de parentesco entre <i>P. formosus</i> e <i>P. variotii</i>	80
Figura 19: Representação proteômica de isolados de <i>P. formosus</i> e <i>P. variotii</i> obtidas por MALDI-TOF.	80
Figura 20: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo A. (a) CMCCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica.	84
Figura 21: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo B. (a) CMCCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.	86
Figura 22: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo C. (a) CMCCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.	88
Figura 23: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo D. (a) CMCCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.	90
Figura 24: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo ponto central. (a) CMCCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.....	92
Figura 25: Efeito conjunto das variáveis analisadas no cultivo e pré-tratamentos ao longo dos dias de incubação	96
Figura 26 Diagrama de Pareto referente aos efeitos das variáveis sobre a atividade de pectinases ao sexto dia de cultivo.....	97
Figura 27: Concentração de açúcares nos licores e biomassas hidrolisados.....	99
Figura 28 Concentração de açúcares nas biomassas residuais hidrolisadas.....	104

Capítulo III

Figura 29 Perfil holocelulolítico de <i>P. formosus</i> crescido em diferentes resíduos dos beneficiamentos de café onde.....	123
Figura 31: Perfil cromatográfico da troca iônica em resina de DEAE FF.....	126
Figura 32: Perfil cromatográfico da fração PEC_DEAE em resina HiPrep 26/10 Desalting Sephadex G25.....	127

Figura 33: Perfil cromatográfico da fração PEC2 em resina Superdex S-200 de exclusão molecular.....	129
Figura 34: Perfil cromatográfico da calibração de coluna Superdex S-200 HR.....	129
Figura 35: Equação para determinação do peso molecular das proteínas presentes nas frações com atividade pectinolíticas.	130
Figura 36: Gel de eletroforese em condições desnaturantes e zimograma.....	131
Figura 37: Avaliação das bandas do gel de eletroforese correspondente à fração PEC_S200 pelo software TotalLab 1D.	132
Figura 38: Perfil cromatográfico da fração PEC2 em resina Superdex S-200 de exclusão molecular desnaturante.....	133
Figura 39: Comparação dos perfis cromatográficos da fração PE_S200 em resina Superdex S-200 de exclusão molecular em condições normais e desnaturantes.....	135
Figura 40: Distribuição de tamanho das frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep16/60 Superdex S-200 HR na presença da água por dispersão dinâmica da luz.....	139
Figura 41: Fluxograma das etapas de purificação de PEC_S200	140
Figura 42: Efeito do pH na atividade enzimática pectinolítica do extrato bruto de <i>P. formosus</i>	142
Figura 43: Efeito da temperatura na atividade enzimática pectinolítica do extrato bruto de <i>P. formosus</i>	144
Figura 44: Efeito de íons e reagentes modificadores da atividade pectinolítica de <i>P. formosus</i>	147
Figura 45: Estrutura dos compostos fenólicos testados sobre a atividade de PEC_S200.....	151
Figura 46: Efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática pectinolítica de PEC_S200 de <i>P. formosus</i>	152
Figura 47 Efeito do etanol na atividade enzimática pectinolítica de <i>P. formosus</i> ...	154

Lista de tabelas

Capítulo II

Tabela 1 Sequência nucleotídica dos primers para as regiões ITS, calmodulina e β -tubulina.....	63
Tabela 2: Intervalo de variação, níveis e codificação das variáveis utilizadas no planejamento experimental	65
Tabela 3: Planejamento experimental Plackett-Brurmann para avaliação e triagem de variáveis indutoras de atividades pectinolíticas	66
Tabela 4 Apresentação e codificação das cepas de <i>P. variotii</i>	70
Tabela 5: Atividades pectinolíticas médias em casca de café arábica	78
Tabela 6: Fator de severidade tratamentos	81
Tabela 7: Subdivisão do planejamento estatístico fatorial	82
Tabela 8: Efeitos das variáveis independentes dos pré-tratamentos e cultivos e suas interações sobre a atividade pectinolítica em função dos dias de cultivo. .	93
Tabela 9: Licores e biomassas submetidos a análise composicional de açúcares ..	98
Tabela 10: Composição química da fração sólida de biomassas resultantes dos pré-tratamentos com água quente líquida.	102

Capítulo III

Tabela 11: Perfil pectinolítico de <i>P. formosus</i> no extrato bruto, concentrado e ultrafiltrado.....	125
Tabela 12: Resumo dos parâmetros do espalhamento de luz para os picos observados.....	139
Tabela 13: Rendimento e índice de purificação parcial de PEC_S200	141
Tabela 14: Parâmetros cinéticos de PEC_S200.....	155

Capítulo I:

Introdução, objetivo geral e revisão bibliográfica

1 Introdução

De acordo com a Comissão Mundial Ambiental e de Desenvolvimento das Nações Unidas, “desenvolvimento sustentável é o encontro das necessidades do presente sem que haja comprometimento das necessidades das gerações futuras” (Finkelstein and Sheehan 2009). Neste contexto, a bioenergia é um dos diversos recursos utilizados pela biotecnologia como instrumento para melhorar a vida da sociedade, empregando fontes renováveis para geração de “energia limpa” e bioprodutos economicamente ativos para redução da dependência por combustíveis fósseis (Energy 2018).

Grande parte da bioenergia utilizada provém de biomassas lignocelulósicas oriundas de materiais vegetais e algas, como resíduos de culturas, resíduos florestais, gramíneas cultivadas para este propósito, culturas de energia lenhosa, resíduos industriais, resíduos sólidos municipais de demolição e construção, de madeira, além de resíduos alimentares (Energy 2018). Estas fontes energéticas alternativas possuem enorme versatilidade, podendo ser convertidas em diversos produtos de amplo mercado, permitindo a redução da dependência por combustíveis fósseis.

O estabelecimento de uma bioeconomia baseada na substituição das emissões intensivas de poluentes e troca de fontes não renováveis – petróleo, carvão mineral e gás natural - por recursos renováveis alternativos torna-se imprescindível (Thorenz et al. 2018).

Os resíduos agroindustriais possuem alto potencial para tal função devido, principalmente, à sua grande disponibilidade e composição bromatológica variada, em virtude das inúmeras quantidades e qualidades de culturas agrícolas existentes em todo o mundo. Os aspectos econômicos para tamanho interesse em sua utilização são baseados no fato de que tais resíduos podem ser utilizados como materiais de baixo custo que podem ter valor agregado durante a produção de artigos biotecnológicos, além da expectativa de se reduzir os custos de produção e a poluição ambiental rural decorrente da sua inadequada disposição pós-colheita, efetuando-se seu processamento para consumo (Yang et al. 2016). Apresenta-se como uma preocupação ambiental o fato de que os resíduos agroindustriais contêm compostos fenólicos e outros compostos potencialmente tóxicos, que podem ser a

causa de poluição ambiental quando depositados na natureza sem tratamento prévio (Mussatto et al. 2012).

A grande produção de biomassa lignocelulósica, decorrente da crescente demanda da agricultura, alcança atualmente índices de problemática ambiental. Segundo levantamento realizado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), somente em 2016, 36 quatrilhões de toneladas de resíduos agroindustriais das mais diversas culturas foram produzidos em todo o mundo.

A origem de resíduos está diretamente associada às perdas entre a produção e o consumo, ao desperdício no uso de insumos e aos materiais que, gerados ao longo da cadeia agroindustrial, não possuem valor econômico evidente. Estima-se que, em média de 20% a 30% de toda a produção agrícola sejam perdidos durante beneficiamento (Thorenz et al. 2018).

Algumas culturas, porém, podem apresentar aproximadamente de 50% a 60% da produção em resíduos diferenciados que permanecem no campo após a colheita, como é o caso das lavouras de algodão, milho e café, com o intuito de auxiliar na fertilidade do solo por sua rápida decomposição (algodão e milho) (Lal 2005).

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas do mundo, e sua produção gera enormes quantidades de resíduos de diferentes naturezas durante seu beneficiamento para consumo, a depender do tipo de processamento utilizado (Jayachandra et al. 2011). A casca e a polpa são os resíduos sólidos obtidos por processamento via seca e úmida, respectivamente. Elas são, provavelmente, os maiores resíduos do café quando se considerada a quantidade. A água residual é gerada durante o beneficiamento por via úmida, assim como, em larga escala, é o resíduo com potencial poluidor ambiental, uma vez que é disposta no ambiente sem nenhum tratamento prévio (Pandey et al. 2000b; Orozco et al. 2008; Esquivel e Jiménez 2012).

2 Revisão bibliográfica

2.1. Café e suas especificidades

A importância econômica do café deve-se, principalmente, ao fato de ser a bebida ou infusão mais consumida no mundo (em alguns países, mais que a água

e o chá), preparada com os grãos torrados ou moídos (Esquivel e Jiménez 2012). Muito embora o produto final seja o de maior interesse ao consumidor, toda a cadeia produtiva gera importantes movimentações financeiras, que impactam a economia de maneira geral, desde o preparo do solo equipamentos utilizados no cultivo da lavoura e no consumo final, os aditivos, fertilizantes e agrotóxicos, transporte, importações, salários dos produtores, serviços indiretos e empregos gerados durante todo o ciclo do café (da lavoura à mesa) (National Coffee Association 2015). Nos EUA, o impacto econômico total da indústria cafeeira, em 2015, foi de U\$ 225,2 bilhões, enquanto, no Brasil, totalizou R\$ 5,47 bilhões somente no setor de exportações (National Coffee Association 2015; Conceição et al. 2019).

O Brasil destaca-se por ser o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo mercado consumidor. Sua importância na economia não está somente no setor de exportações, mas também em sua industrialização e geração de grande número de empregos em toda a cadeia produtiva desse grão.

Em 2016, a produção mundial foi de 9,2 milhões de sacas de café, e o Brasil contribuiu com 39% dessa produção. Os maiores países produtores, depois do Brasil, são Vietnã (19%), Colômbia (10%), Indonésia (8%) e Etiópia (6%), respectivamente (FAO 2018a). O processamento para industrialização gera significativas quantias de resíduos, alcançando de 30 a 50%, dependendo do tipo escolhido (Oliveira and Franca 2014).

Café é o nome dado à semente sadia e limpa pertencente à família dos *Rubiaceae*, gênero *Coffea* (Halal 2008). Das seis mil espécies dessa família, 124 são descritas neste gênero; porém, do ponto de vista econômico, as duas espécies mais importantes cultivadas no mundo são *Coffea arabica* L. (60% da produção mundial) e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (40% da produção mundial). Seus produtos são designados como café arábica e café robusta, respectivamente, sendo o primeiro mais explorado internacionalmente (ICO 2018; Gunning 2018).

O fruto do cafeeiro (também chamado de baga ou cereja), mostrado na figura 1, consiste em uma resistente camada exterior lisa, ou pericarpo, geralmente verde em frutos imaturos, mas que se torna vermelha ou profundamente vermelho-violeta quando estes estão maduros (até mesmo amarelo ou laranja em genótipos específicos) (Esquivel e Jiménez 2012). O pericarpo, que recobre o mesocarpo

(denominado polpa), é macio, amarelado, fibroso e adocicado, representa 29% do peso seco do fruto inteiro. É composto por 76% de água, 10% de proteína, 2% de fibras, 8% de cinzas e 4% de extrato livre de nitrogênio, os quais são representados pelos taninos, substâncias pécnicas, açúcares redutores e não redutores, cafeína, ácido clorogênico e ácido cafeico, celulose, hemicelulose, lignina, aminoácidos e minerais, como potássio, cálcio, ferro, sódio, magnésio e outros. A mucilagem está situada na parte interna do mesocarpo, fortemente aderida ao pergaminho do grão. Ela funciona como um sistema de hidrogel, sendo quimicamente composta por água, substâncias pécnicas, açúcares redutores e ácidos orgânicos (Lima Filho et al. 2013). O endocarpo é uma fina camada de coloração amarelada, também chamada de pergaminho, composto por celulose (40 – 49%), hemicelulose (25 – 32%), lignina (33 – 35%) e cinzas (0,5 – 1%). Finalmente, uma fina camada prateada recobre cada hemisfério do grão de café, o endosperma (Esquivel e Jiménez 2012).

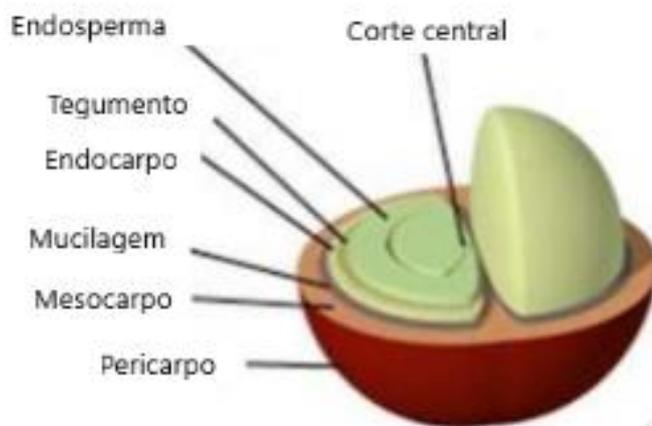


Figura 1: Estrutura esquemática grão de café (imagem extraída da internet)

Após a colheita, o preparo do café inicia-se com o processo de lavagem, que é uma importante prática para reduzir ou eliminar determinados defeitos, como a separação dos grãos verdes e/ou danificados, ou comumente chamados fração-boia. A seguir, trata-se do processamento, que pode ser realizado por via seca ou úmida (Figura 2) (Franca e Oliveira 2009).

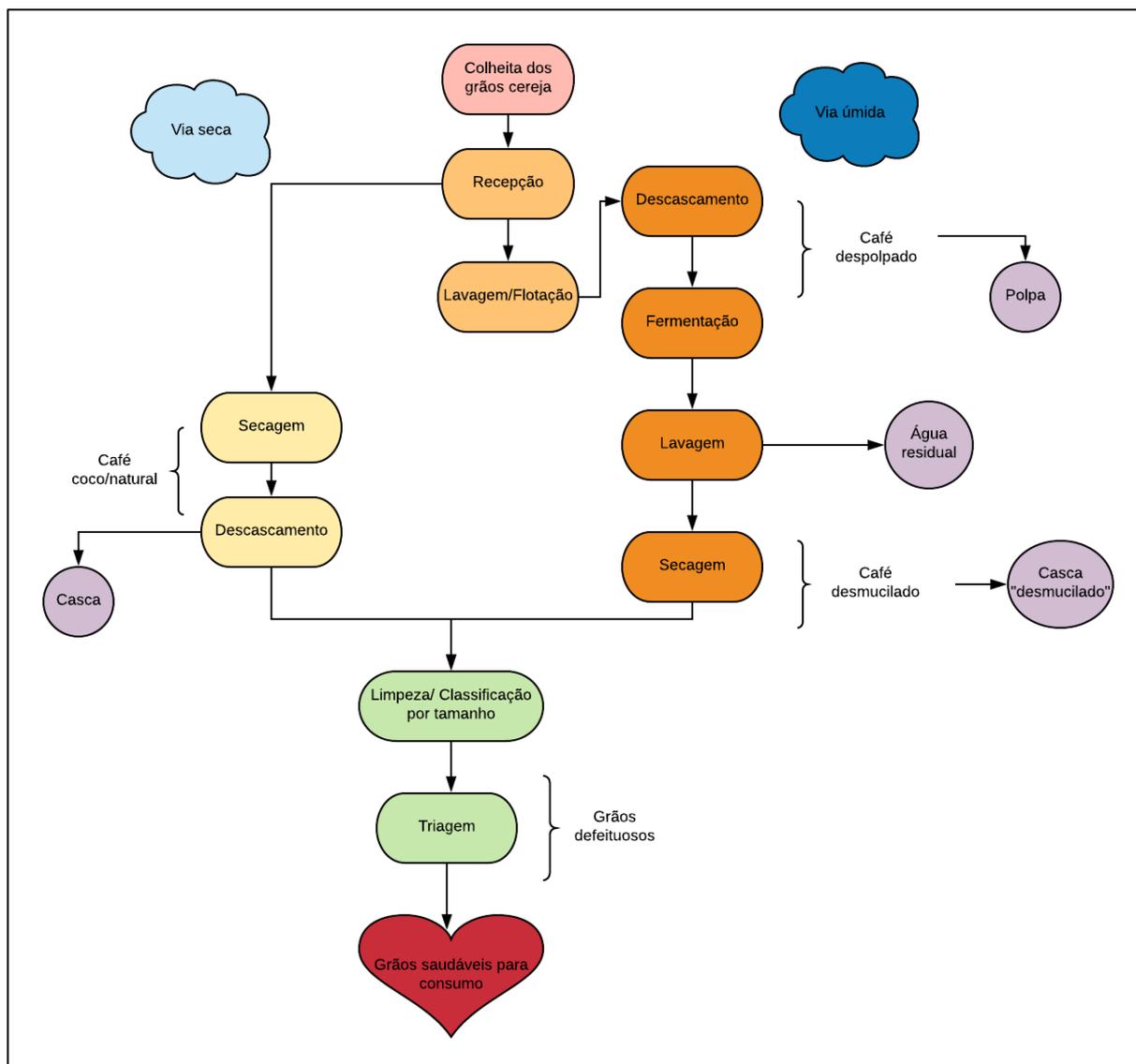


Figura 2 Representação esquemática dos métodos de beneficiamento dos grãos de café e geração seus resíduos

Na forma de preparo por via seca, o fruto, em sua forma integral, é seco (com casca e mucilagem), sem separação entre os frutos verdes e cereja, e espalhado em terreiros para uma secagem natural preliminar, podendo ser levado em seguida a um secador rotativo, onde ocorre a secagem final. O teor de umidade mínimo é de aproximadamente 12%, dando origem aos cafés denominados coco, de terreiro ou natural. Depois de seco, o café é levado à máquina de beneficiamento, que separa os grãos da casca (Silva 2012).

Os cafés despolpados, desmucilados e cereja descascados são originados a partir da forma de preparo por via úmida. A água permite, por meio de flotação, a

separação dos frutos em maduros, verdes e bagas danificadas (Lima et al. 2008; Esquivel e Jiménez 2012). Na obtenção do café cereja descascado, a casca e a polpa do fruto são removidas de forma mecânica, e parte da mucilagem ainda permanece aderida ao pergaminho dos frutos (Malta 2011). Nesse caso, ela é seca juntamente com o pergaminho, num processo conhecido como intermediário entre o natural e o despulpado, ou desmucilado. Este, apesar de ter características próprias, tende comumente para as características do café natural, uma vez que os produtos da mucilagem são transferidos para o grão (Bee et al. 2005). Na obtenção do café despulpado, após o descascamento, a parte da mucilagem que ainda estava aderida aos frutos é removida em tanques de fermentação “controlada” (12 - 48h) e, posteriormente, lavada em tanques de concreto ou de forma mecânica. A mucilagem é, portanto, hidrolisada por enzimas tanto dos tecidos do grão de café quanto dos microrganismos encontrados na superfície da casca (Belitz 2009), destacando-se que a população de microrganismos possui influência direta sobre a qualidade final dos grãos de café (Avallone et al. 2002). Se a remoção desta mucilagem for realizada mecanicamente, tem-se, então, o café desmucilado (Malta 2011). É importante destacar que a fração-boia tem seu preparo exclusivo por via seca (Lima et al. 2008).

Em virtude do método de processamento do café cereja, os sólidos residuais obtidos têm diferentes terminologias, sendo polpa o termo designado para os sólidos provenientes do processamento por via úmida, e casca, os resíduos oriundos do processamento de café por via seca (Pandey et al. 2000b). Para se evitar complicações provindas de mesma nomenclatura, ressalta-se polpa como mesocarpo externo do fruto de café, e resíduo de polpa de café constituído do epicarpo e parte do mesocarpo. Dessa maneira, a casca é obtida seca, e a polpa, úmida, não contendo o pergaminho, que fica preso ao grão como forma de proteção (Bee et al. 2005).

A água residual gerada no processamento úmido, por meio da flotação dos grãos de café, para separação e remoção da mucilagem adquire componentes solúveis e insolúveis da polpa e da própria mucilagem, tornando-a rica em compostos orgânicos constituídos por monossacarídeos (frutose, glicose e galactose), proteínas, pectinas, celulose, hemicelulose, polifenóis, taninos, cafeína,

corantes naturais (antocianinas) e lipídeos. Todos esses compostos carregados pelas águas residuais podem alterar e degradar solos, cursos d'água e poluir o ar quando lançados no ambiente sem tratamento prévio. O seu potencial poluidor surge desde a redução de oxigênio dissolvido e a eutrofização de corpos aquáticos até a produção de gases do efeito estufa, como metano, dióxido de carbono, gás sulfídrico e amônia, resultantes do metabolismo da microbiota anaeróbia aquática. Além disso, existe a possibilidade de contaminação dos lençóis freáticos subterrâneos (Hermosa 2014; Oliveira e Franca 2014).

As composições da casca e da polpa de café são diferentes, porém a natureza dos compostos presentes nelas é similar. Esta diferença pode ser percentual na composição dos constituintes, dependendo do tipo de processamento, cultivar analisada, condições de cultivo, dentre outros fatores (Pandey et al. 2000a). O nível de umidade oscila de 7 a 18% para a casca, de acordo com as condições de processamento e estoque. A polpa contém, aproximadamente, 75% de umidade *in natura*, porém quando submetida a secagem e armazenamento, seu teor diminui para aproximadamente 13%. O alto conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídeos e fibras de carboidratos insolúveis faz referência ao tipo de resíduo classificado, sendo que a casca e a polpa contém, aproximadamente, 24% de açúcares totais, 14% de açúcares redutores, 2% de sacarose, 10% de proteínas, 2,5 % de lipídeos, 6,5% de substâncias pécicas totais e 18% de fibras (Pandey et al. 1999; Oliveira e Franca 2014).

A existência de outros compostos orgânicos, incluindo cafeína, taninos e polifenóis, considerados de natureza tóxica e antinutricionais, não somente causa problemas de poluição ambiental como também restringe o uso destes resíduos à alimentação animal.

A cafeína é um dos compostos ativos estimulantes mais poderosos e viciantes da natureza. É a principal substância contida no café, responsável por seu efeito estimulador, presente em concentrações de 0,87 a 1,3% na polpa do café seco, podendo apresentar concentrações de duas a dez vezes menores que na casca do grão (Pandey et al. 2000a; Ulloa Rojas et al. 2003).

Os taninos são geralmente as substâncias tidas como o fator antinutricional que impossibilita o uso dos resíduos para a alimentação animal. Suas

concentrações podem variar de 1 a 10%, dependendo da espécie, variedade do café estudado e resíduo analisado (Pandey et al. 2000a; Oliveira e Franca 2014). Sabe-se que sua concentração aumenta ao longo da secagem da polpa e é maior nas variedades de café amarelo que nos vermelhos. Os níveis destes compostos, em arábica, correspondem a aproximadamente 1%, e a 2,3%, em robusta *in natura*; porém, após o processo de secagem, sobem para aproximadamente 5% nas cascas, e para 9% nas polpas (Esquivel e Jiménez 2012).

Os ácidos clorogênicos incluem diferentes formas isoméricas e são os compostos fenólicos predominantes nos grãos de café. Sua disponibilidade e concentrações são afetadas por diversos fatores e se alteram de acordo com a variedade da planta, localização geográfica da lavoura e estado de maturação dos grãos, sendo estes aspectos inversamente proporcionais aos grãos de café e ao tipo de torra para consumo (Liang et al. 2016). As principais isoformas são epicatequina (21,6%), ácido 3,5-dicafeoilquínico (19,3%), ácido 3,4-dicafeoilquínico (5,7%), ácido 4,5- dicafeoilquínico (4,4%), catequina (2,2), rutina (2,1%), ácido protocatequínico (1,6%) e ácido ferúlico (1%). As atividades antioxidantes são descritas para alguns compostos polifenólicos e podem descrever um novo alvo industrial para a valorização destas biomassas (Pujol et al. 2013).

Durante o processo de exposição dos grãos de café a altas temperaturas (torra industrial), os carboidratos, os compostos fenólicos e as proteínas são transformados e/ou degradados, levando à formação de compostos escuros - as melanoidinas - produtos finais da reação de Maillard em que os polissacarídeos são despolimerizados e sofrem transglicosilações não enzimáticas para formação de novos polímeros. Os compostos fenólicos são altamente reativos, e, durante a torra, são unidos aos polissacarídeos por ligações éster nas melanoidinas. As proteínas possuem papel regulatório nas transglicosilações e, portanto, na composição das melanoidinas (Lopes et al. 2016; Moreira et al. 2017).

2.2. Biomassas lignocelulósicas

Os resíduos agroindustriais, também chamados de biomassas lignocelulósicas, são descritos como “qualquer massa biológica que gere energia a

partir da decomposição de resíduos orgânicos” (Adam 2009). São compostas de lignina e polímeros de carboidratos (hemicelulose, celulose e pectinas), além de pequenas partes de outros compostos (extratos, ácidos, sais e minerais) presentes na parede celular vegetal (Dionisio et al. 2009).

A parede celular vegetal é uma matriz complexa, estruturada e resistente que envolve a célula vegetal, sendo subdivida em lamela média, parede primária e secundária, cuja distribuição de celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre essas camadas (Figura 3). A porção polissacarídica, formada por celulose, pectina e hemicelulose, é denominada holocelulose (Agustin-Salazar et al. 2018). A lamela média é a camada mais externa, composta, principalmente, por substâncias pécticas e proteínas, permitindo a formação de géis hidrofílicos que estabilizam as células adjacentes, fornecendo aderência e coesão tecidual. A distinção entre paredes primária e secundária é dada com base na fase de crescimento celular, quando são sintetizadas, e em sua composição, sendo que a primária é mais hidratada e gelatinosa (alta concentração de glicoproteínas, hemiceluloses, compostos pécticos e microfibrilas de celulose dispersas), enquanto a secundária é mais densa e menos hidratada, composta principalmente de celulose e hemicelulose, muitas vezes embebida em lignina (Siqueira e Filho 2010; Gomes 2017). A complexidade e a dinâmica desta estrutura favorecem diversas funções biológicas, como suporte mecânico, proteção física contra patógenos, regulação osmótica e transporte de materiais tanto ao nível celular quanto tecidual, além de promover a recalcitrância química e biológica necessária para adaptação ao ambiente terrestre e aplicação a processos industriais (Wei et al. 2009).

A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos constituídos por hexoses e pentoses envolvidos em uma matriz amorfa que age como barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas, tornando esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos. Porém, podem ser hidrolisados a açúcares e, eventualmente, fermentados a produtos de valor agregado de interesse industrial (Santos et al. 2012).

A composição química básica da biomassa lignocelulósica, geralmente, contém 23-53% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-35% de pectina, 10-30% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos,

variando em função do tipo de biomassa (Hargreaves 2008; Hernández-Beltrán et al. 2019).

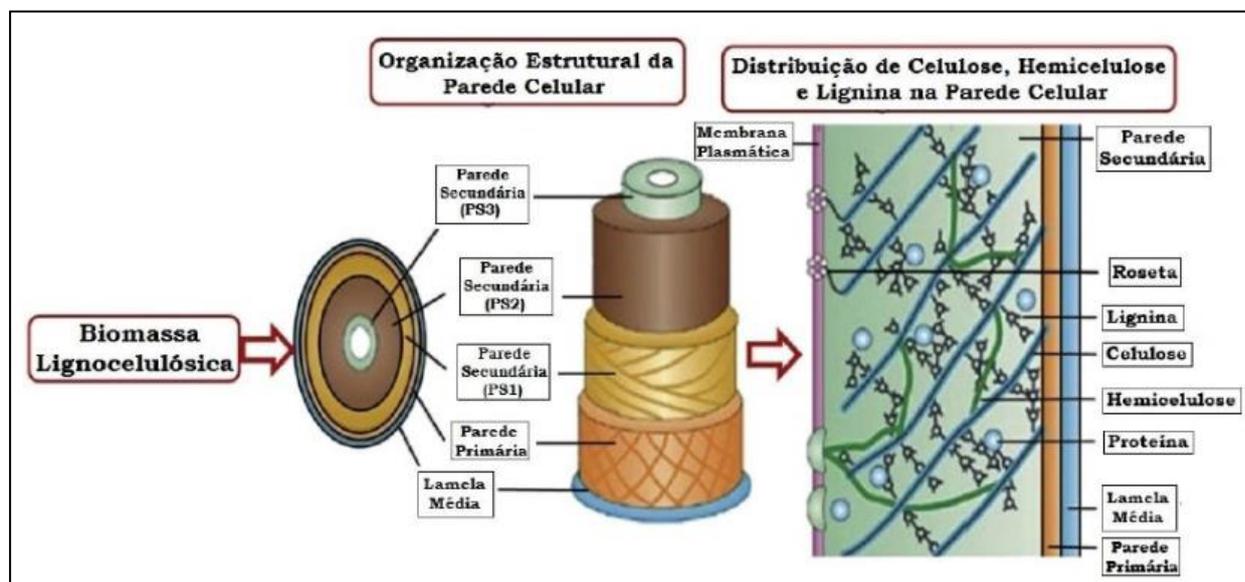


Figura 3: Ilustração esquemática da estrutura da parede celular vegetal (extraída de Lo Sciuto, 2015).

2.2.1. Celulose

A celulose é o polímero linear de maior ocorrência mundial, cujas fibras encontram-se imersas numa matriz complexa, protegida pela rede de hemicelulose e lignina. Esse homopolissacarídeo é composto por cadeias com grau de polimerização de 4.000 a 15.000 unidades de glicose unidas por ligações anidroglicopiranosídeas do tipo $\beta(1-4)$ (Figura 4), sendo que cada par dessa hexose é definido como celobiose - unidade conformacional mínima da celulose (Hargreaves 2008).

Sua estrutura pode ser classificada em três níveis: o primeiro é definido pela sequência de resíduos β -D-glicopiranosídicos, unidos por ligações covalentes, formando o homopolímero de anidroglicose com ligações β -D (1 \rightarrow 4) glicosídicas, de forma geral (C₆H₁₀O₅). O segundo descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, sendo caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos e também pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. Já o terceiro nível define a associação das moléculas, formando agregados com uma estrutura cristalina, conferindo elevada resistência

à tensão e tornando a celulose insolúvel em água, assim como um grande número de outros solventes de difícil acessibilidade enzimática (Santos et al. 2012).

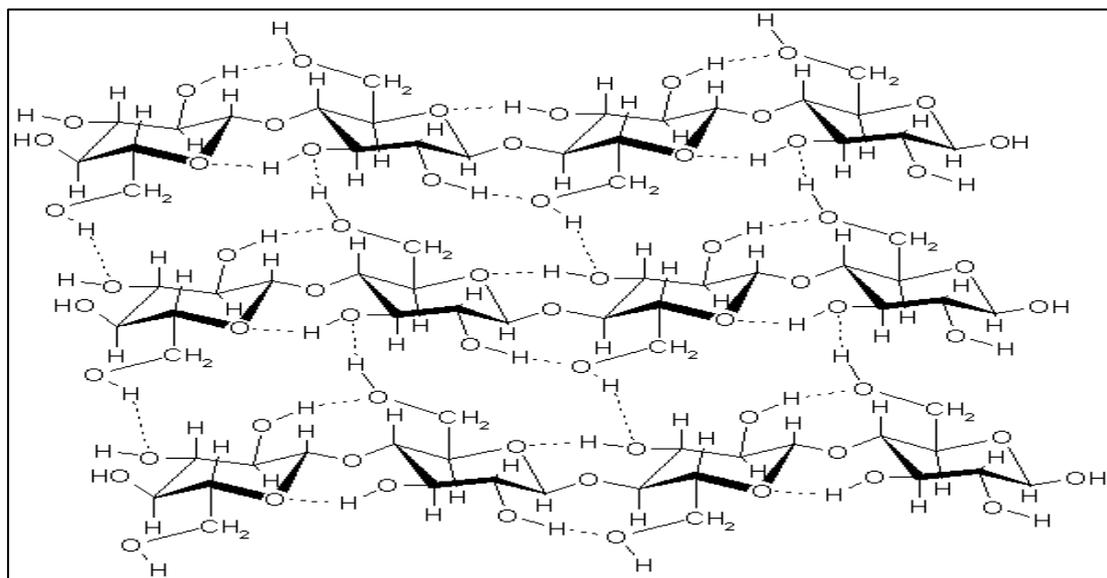


Figura 4: Representação esquemática das ligações entre as fibras de celulose (extraída da internet).

Geralmente, a celulose está presente no ambiente na forma cristalina e em pequenas quantidades de cadeias celulósicas paracristalinas não organizadas, de forma amorfa. Nesta última conformação, é mais susceptível à degradação enzimática (Sánchez 2009).

A hidrólise completa da celulose requer a ação de enzimas: (i) endo-1,4- β -glicosidase (conhecida por endocelulase ou endoglicosidase), que atua catalisando a hidrólise aleatória de ligações glicosídicas presentes em porções internas das regiões amorfas da fibra de celulose gerando duas novas extremidades, uma redutora e uma não redutora; (ii) exo-1,4- β -glicosidase (conhecida como celodextrinase ou celobiohidrolase), que age nas extremidades redutoras e não redutoras das fibras de celulose, gerando glicose (celodextrinase) ou celobiose (celobiohidrolase) como produto final; e (iii) β -glicosidase (conhecida por celobiase), que libera monômeros de D-glicose por meio da hidrólise de celobiose e das extremidades não redutoras de celulose. Entretanto, a hidrólise completa da celulose é limitada pela recalcitrância da biomassa vegetal e consequente dificuldade do acesso das enzimas hidrolíticas. Para contornar esse problema,

alguns fungos produzem proteínas, chamadas swoleninas, responsáveis por promover uma desordem molecular de regiões cristalinas da fibra de celulose, resultando em afrouxamento e conseqüente exposição e solubilização das moléculas de celulose - processo denominado amorfogênese (Martins 2012).

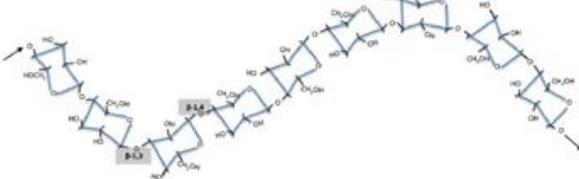
2.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são um grupo de heteropolissacarídeos complexos compostos por polímeros de pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e ácidos de açúcares (ácido-D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico) (Saha 2003). Geralmente, são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas (Figura 5) (Odega e Petri 2010).

A composição química e as características estruturais variam amplamente conforme a espécie, localização subcelular e estágio de desenvolvimento. De forma geral, as hemiceluloses estão quimicamente associadas ou reticuladas a outros polissacarídeos, proteínas ou ligninas. Sua estrutura apresenta ramificações (baixo grau de polimerização – 70 a 200) que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Kapoor et al. 2016).

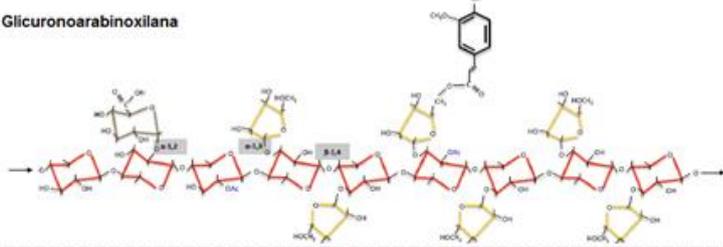
Comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Essa reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo desses polissacarídeos (Santos et al. 2012).

Ligação mista 1,3-1,4 b-glucano

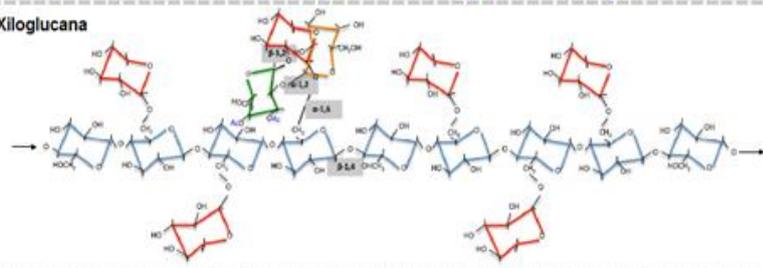


- Glucose
- Xilose
- Galactose
- Fucose
- Manose
- Ácido galeaturbônico
- Arabinose
- Ácido glucurônico
- OCH₃ O-metil
- OAc O-acetil
- ◻ Ácido ferúlico

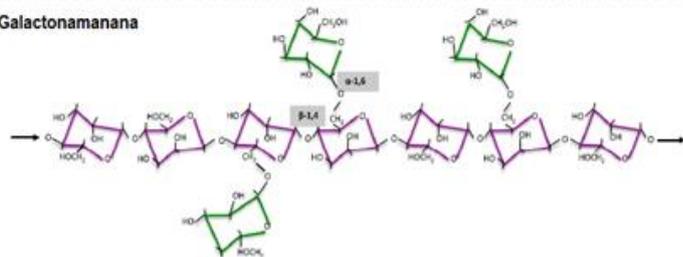
Glicuronoarabinoxilana



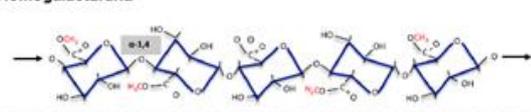
Xiloglucana



Galactonamanana



Homogalacturana



Ramnogalacturana I

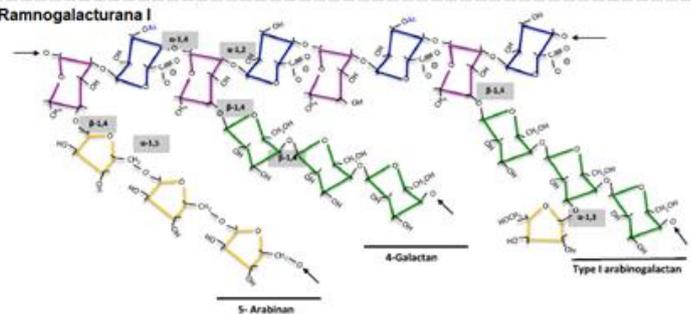


Figura 5 Representação esquemática dos polissacarídeos que compõe as hemiceluloses (extraído e adaptado de Buckeridge, 2014)

As hemicelulases incluem enzimas acessórias capazes de aumentar o rendimento de açúcares redutores durante a hidrólise enzimática dos substratos lignocelulósicos, e sua grande diversidade necessita de um conjunto variado de enzimas para degradação completa dos polissacarídeos (Robl et al. 2013). Para degradação da xilana, é necessário um arranjo de enzimas com diversos modos de ação, no qual (i) endo-1,4- β -xilânase clivam aleatoriamente a cadeia principal da xilana; (ii) β -xilosidases clivam os xilooligômeros, liberando xilose, enquanto as (iii) α -arabinofuranosidases removem as cadeias laterais de arabinose, que representam barreiras estéricas à cadeia principal da xilana. Os resíduos acetil e unidades de ácido glicurônico são removidos pelas (iv) acetil-xilana esterases e (v) α -glicuronidases, respectivamente (Walia et al. 2017). Por fim, as ramificações fenólicas são degradadas a partir da (vi) feruloil-esterases e (vii) p -coumaroil-esterases (Beg et al. 2001).

As enzimas envolvidas na clivagem no polímero de manana são as (i) endo- β -mananases, que clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas da cadeia principal de manana, as quais liberam os manooligômeros, que são substrato para as (ii) β -manosidases. As (iii) β -glicosidases removem as glicoses das cadeias laterais de glucomanana e galactomanana, enquanto as (iv) α -galactosidases e (v) acetil-manano esterases clivam cadeias laterais de galactomananos e liberam os grupos acetil de galactoglucomanano, respectivamente (Costa e Filho 2018).

2.2.3. Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula mais abundante dentre as biomassas lignocelulósicas. É um complexo fenólico amorfo, tridimensional, não solúvel em água, opticamente inativo, que forma uma vedação física impermeável na parede celular da planta devido à sua interação com as fibras de celulose e hemicelulose (Figura 6). Está presente principalmente na lamela média e nas paredes secundárias, onde confere resistência mecânica, impermeabilização celular, proteção química (estresse oxidativo) e biológica, além de contribuir para a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (Sánchez 2009).

Consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool p -cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico. A proporção de cada unidade pode variar conforme o tecido e os diferentes grupos de plantas vasculares. Além disso, tais

unidades podem se organizar de diversas formas, o que promove a grande heterogeneidade de ligações observadas na molécula, tornando-se um desafio à sua biodegradação (Martins 2012).

A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares. A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (Bortolazzo 2011).

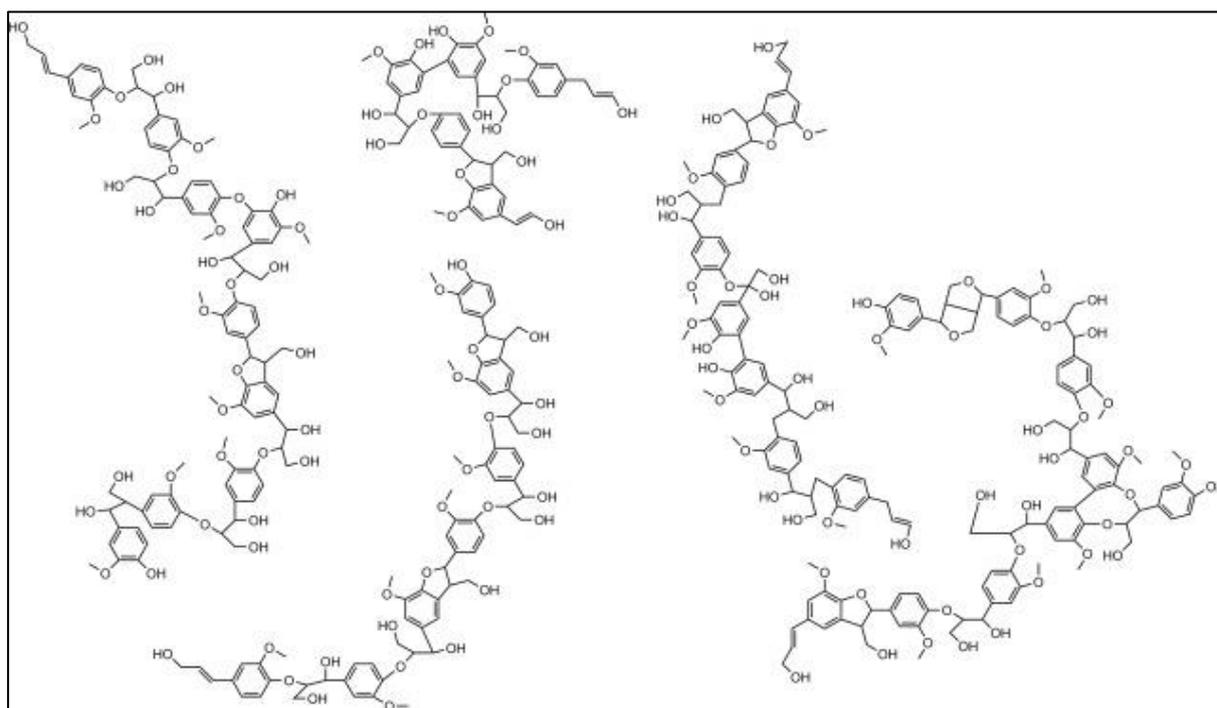


Figura 6 Representação esquemática das ligações entre as moléculas formadoras da lignina (extraída da internet).

Para despolimerização da lignina, várias enzimas oxidativas, que catalisam reações específicas, estão envolvidas, como lacases, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), peroxidases versáteis (VP), peroxigenases não específicas (UPO), cloroperoxigenases (CPO), dentre outras, cada uma com seu mecanismo de ação particular (MÄkelÄ et al. 2016). As enzimas de atividades auxiliares, denominadas monooxigenases de polissacarídeos líticas (LPMOs), promovem clivagem oxidativa aleatória em polissacarídeos e oligossacarídeos, requerendo oxigênio molecular e vias enzimáticas (celobiose desidrogenase) ou não enzimáticas (ácido ascórbico) como doadores de elétrons, para formação de

novas extremidades redutoras e nativas no decorrer das cadeias (Vaaje-Kolstad et al. 2010; Chylenski et al. 2017).

No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas, as quais podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (Santos et al. 2012).

Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir, a atuação microbiana sobre o material (Bortolazzo 2011).

2.2.4. Pectina

Pectinas são complexos de ácidos coloidais, de carga negativa, que, juntamente com as celulosas, são carboidratos abundantes presentes nas plantas, representando um terço de seu peso seco. Substância péctica é o nome genérico usado para os compostos que agem como substratos para atuação das enzimas pectinolíticas, como protopectina e ácidos pécticos, presentes na parede celular e na lamela média, contribuindo na firmeza e estrutura dos tecidos vegetais (Gummadi and Panda 2003; Jayani et al. 2005).

Quimicamente, as substâncias pécticas são formadas por um esqueleto principal de resíduos de ácidos galacturônicos unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, e os grupos carbonila são parcialmente esterificados de 60 – 90% com metanol, de alto peso molecular (25 - 360 KDa), podendo conter cadeias laterais de arabinose, galactose e xilose (Gummadi and Panda 2003). Suas cadeias podem ser divididas em duas regiões - “região lisa” e “região peluda” (Figura 7) - e seu grau de esterificação varia conforme a fonte, estágio de crescimento e maturação dos frutos, vegetais ou tecidos (Zavala-Páramo et al. 2020). Em sua maioria, consistem em três domínios bem caracterizados estruturalmente: homogalacturanas (HGA), ramnogalacturanas I e ramnogalacturanas II (RGI e RGII), os quais formam uma rede que possui considerável potencial de modulação de suas estruturas pela ação das enzimas de degradação da parede celular (Yadav et al. 2009).

As homogalacturanas representam cerca de 65% da cadeia principal da molécula de pectina, contendo resíduos de ácidos galacturônicos unidos por ligações α -1,4 glicosídicas, que podem ser metilados na posição O-6. As ramnogalacturanas I são heteropolímeros compostos por unidades dissacarídicas de resíduos de α -ramnopiranosose e ácidos galacturônicos unidos por ligações do tipo α -1,2 a cadeias laterais de açúcares neutros. Já a estrutura das ramnogalacturanas II consiste em uma cadeia principal de HGA com cadeias laterais formadas por cerca de 12 açúcares diferentes (arabinose, galactose, xilose, fucose, ácido acérico, ácido glucurônico, apiose, etc.), sendo que, em algumas plantas, tem sido identificada na parede celular como polímero estrutural (Yadav et al. 2009).

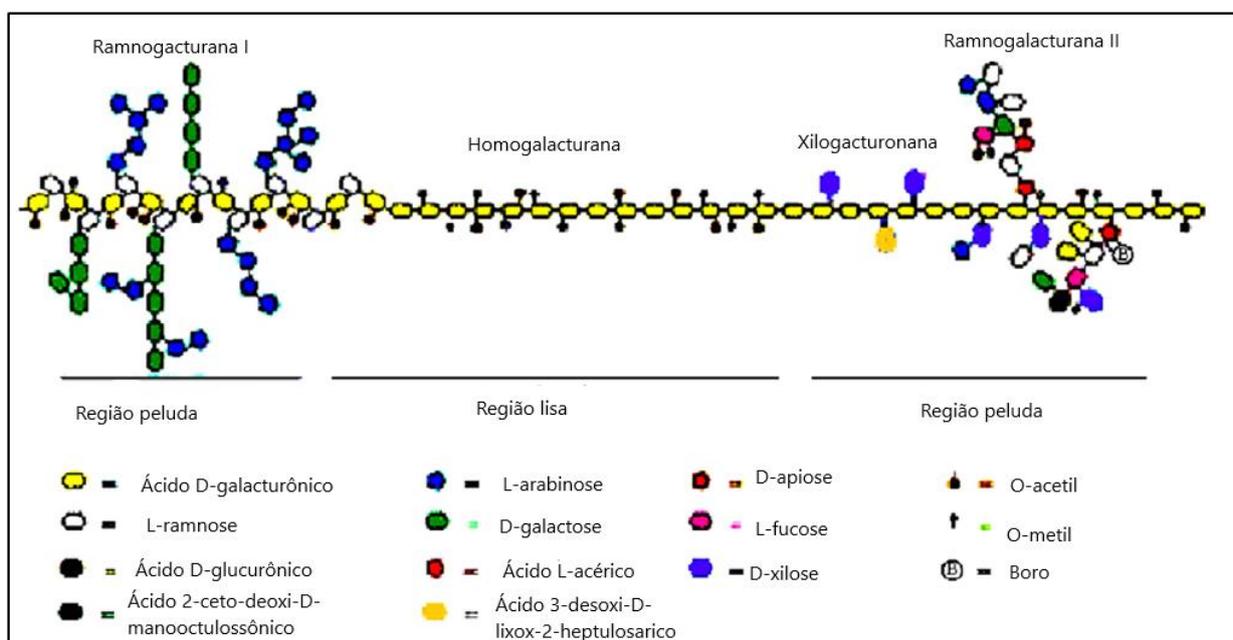


Figura 7: Estrutura da molécula de pectina (extraída e adaptada de Gupta, 2005).

As substâncias pécticas estão presentes de várias formas nas plantas, o que é uma provável razão para a existência de diversas formas de enzimas pectinolíticas, as quais representam de 0,5 - 4% do peso de materiais frescos (Jayani et al. 2005). Em frutos imaturos, a pectina está ligada às microfibrilas de celulose, na parede celular, sendo que tais pectinas estão insolúveis e, portanto, conferem rigidez a esta. Porém, durante a maturação, a estrutura da pectina é alterada pela ocorrência natural de enzimas nos frutos. Essas alterações envolvem

a quebra da cadeia pécica ou das suas cadeias laterais ligadas às unidades da cadeia principal. Nesse caso, as pectinas tornam-se mais solúveis, e sua aderência à parede celular é perdida, deixando os tecidos vegetais mais macios (Jayani et al. 2005).

Devido à diversidade de substâncias pécticas, um amplo sistema de enzimas de degradação é necessário. Essas enzimas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação, substrato preferencial e tipo de clivagem (Kashyap et al. 2001). Portanto, elas podem ser divididas em três grandes grupos: *protopectinases*, que degradam a protopectina insolúvel e polimerizam a pectina solúvel; *esterases*, que catalisam a deesterificação da pectina por meio da remoção dos ésteres metoxil; e *depolimerases* (polimetilgalacturonases - PMG e poligalacturonases - PG), que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações α -1,4 dos ácidos D-galacturônicos (Kashyap et al. 2001; Jayani et al. 2005).

As polimetilgalacturonases (PMG) realizam a hidrólise de ligações do tipo α -1,4 no cerne da estrutura da pectina, gerando 6-metil-D-galacturonato. Essas enzimas agem preferencialmente em cadeias de pectina altamente esterificadas (Jayani et al. 2005). Já as poligalacturonases (PG) efetuam a catálise de ligações do tipo α -1,4 na cadeia de ácido poligalacturônico, produzindo D-galacturonato. Ambos os grupos abrangem enzimas com ação endo-, que catalisam a quebra randômica do substrato, e exo-, que catalisam a hidrólise na extremidade não redutora da pectina, produzindo mono e digalacturonato (Mohnen 2008).

As pectina esterases (PE) catalisam a desesterificação do grupo metoxil, formando ácido péctico e metanol. Elas agem nos grupos metil-éster de unidades de galacturonato localizadas, preferencialmente, próximas a outras unidades não esterificadas (Kashyap et al. 2001).

As pectato liases (PGL) atuam no rompimento de ligações glicosídicas do ácido poligalacturônico, formando produtos insaturados por meio de mecanismos de transeliminação, podendo agir, também, de forma endo ou exo no substrato (Jayani., 2005). Já as pectina liases (PL) são enzimas que atuam de forma randômica em cadeias altamente esterificadas de pectina, produzindo metiloligogalacturonatos insaturados, através de mecanismos de transeliminação de ligações glicosídicas (Mohnen 2008; Jayani et al. 2005).

As enzimas pectinolíticas são amplamente empregadas nas indústrias alimentícias como auxiliares tecnológicos, além de possuírem ampla aplicação em extração e clarificação de sucos de frutas, redução da viscosidade, clarificação de vinhos, extração de óleos, remoção de cascas de frutas cítricas e desengomagem de fibras (Heerd et al. 2011).

2.3. Pré-tratamentos

A recalcitrância encontrada na parede celular vegetal, obtida por meio de um arranjo complexo de sua estrutura composta, torna-se o principal obstáculo para uso integral da biomassa resultante em processos industriais.

A forma de associação heterogênea entre as fibras microcristalinas de celulose e a presença de lignina, pectina e hemicelulose na superfície celular proporcionam baixa acessibilidade das enzimas hidrolíticas ao substrato, dificultando, assim, a liberação dos açúcares contidos nesses polímeros (Dashtban et al. 2009; Gomes 2017). O nível de recalcitrância de cada substrato lignocelulósico é único e se altera de acordo com a espécie, variedade e tecido vegetal (Silva e Filho 2017).

Uma possível elucidação biológica para o fenômeno da recalcitrância química e física nas paredes celulares vegetais seria a resistência e a proteção à degradação por herbívoros, nematoides e insetos, como também prevenção a infecções microbiológicas tissulares (Buckeridge e Souza 2014).

Considerando-se tais atributos das paredes celulares vegetais, o processo de conversão de quaisquer das biomassas lignocelulósicas cruas, em sua forma recalcitrante nativa, a uma forma hidrolisada passível de utilização biotecnológica exige um passo de pré-tratamento destas.

Os principais objetivos dos pré-tratamentos são remover ou fracionar os diferentes componentes da lignocelulose (em particular, a lignina), bem como reduzir a cristalinidade e o grau de polimerização da estrutura celulósica, aumentar a porosidade e a área de superfície acessível às enzimas de degradação, além de diminuir a força de coesão entre hemicelulose e celulose (Agbor et al. 2011; Gomes 2017). Dessa forma, a biomassa vegetal torna-se mais vulnerável à hidrólise, seja ela química (ácida) ou microbiológica (enzimática).

Existem vários métodos de pré-tratamentos sendo desenvolvidos, cujas aplicações são fundamentadas na natureza do material a ser utilizado e em sua finalidade, bem como em qual fração a ser recuperada é de interesse biotecnológico.

Pré-tratamentos físico-químicos associam fatores físicos (elevadas temperaturas) a fatores químicos (alteração de pH, líquidos iônicos, etc.) para impulsionar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Já os pré-tratamentos ácidos utilizam soluções ácidas, diluídas ou não, em contato com a biomassa para solubilizar parte da hemicelulose, resultando em um licor hidrolisado rico em monossacarídeos; e, nos pré-tratamentos alcalinos, a remoção da lignina é alcançada com maior sucesso por meio de soluções de NaOH, KOH, Ca(OH)₂ ou NH₃. Os líquidos iônicos atuam em níveis intra e intermoleculares das biomassas, destruindo algumas das ligações químicas existentes entre os componentes das paredes celulares vegetais, gerando, simultaneamente, a redução da cristalinidade da celulose e a separação da lignina. Além disso, os pré-tratamentos biológicos buscam remover as frações da lignina por meio de fermentação sólida realizada, em grande parte, por fungos filamentosos únicos ou em co-culturas mistas, sendo estes responsáveis por secretar enzimas holocelulolíticas (celulases, pectinases e hemicelulases) que promovem a degradação da biomassa lignocelulósica (Silva e Filho 2017).

Algumas características são levadas em consideração quanto à escolha do pré-tratamento a ser utilizado, como custo operacional do processo, se há necessidade prévia para a realização deste (etapas preparatórias, como moagem e/ou redução do tamanho das partículas), rendimento dos produtos de interesse e possibilidade de geração de compostos inibitórios durante o tratamento. Esta última característica é de extrema importância, uma vez que a lignina pode gerar compostos fenólicos, e os polissacarídeos, quando degradados, podem originar aldeídos e furanosídeos, que afetam ou inviabilizam o crescimento microbiano pós-tratamento - etapa fundamental para alguns produtos de valor agregado pretendidos (Agbor et al. 2011).

Muitas vezes, existe a combinação de pré-tratamentos mecânicos e físico-químicos para que haja melhor rendimento e recuperação dos açúcares

fermentescíveis a posterior tratamento biológico, visando a produtos de interesse. A moagem, a trituração ou o corte dos resíduos lignocelulósicos almejam à redução do tamanho das partículas e à diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização de seus constituintes, aumentando, portanto, a área de superfície acessível à degradabilidade enzimática subsequente (Hendriks and Zeeman 2009).

Dentre os diversos pré-tratamentos físico-químicos, os hidrotérmicos utilizam somente água como reagente catalisador, seja na forma líquida (*Liquid Hot Water - LHW*) ou de vapor (explosão a vapor). Por essa característica, são também denominados *auto-hidrolíticos* (Yu et al. 2015).

A grande efetividade destes pré-tratamentos é justificada por sua característica-chave, ou seja, a água quente promove a solubilização da hemicelulose e da lignina a 160°C, facilitando a formação de oligossacarídeos capazes de clivar as ligações hemiacetais e liberar ácidos catalíticos que auxiliam na gênese de monossacarídeos atuantes sobre as ligações éter da celulose amorfa, tornando-a, assim, mais acessível à fermentação, preservando sua forma cristalina. Como resultado, obtêm-se um líquido hidrolisado, rico em produtos hemicelulósicos, denominado licor, e uma fração sólida com maiores proporções de celulose e lignina menos recalcitrantes (Hendriks e Zeeman 2009; Agbor et al. 2011; Silva e Filho 2017).

Reações térmicas que excedem 180°C promovem a solubilização da lignina e, ao mesmo tempo, quase sempre produzem compostos fenólicos, heterocíclicos e aldeídos tóxicos e/ou inibitórios ao crescimento microbiano, tais como o furfural, 5-hidroxi metilfurfural (HMF), pentoses, vanilina, ácido vanílico, dentre outros. Mesmo em condições severas, não há delignificação completa da biomassa, uma vez que ocorre a precipitação e a recondensação de compostos solúveis da lignina (Hendriks e Zeeman 2009; Agbor et al. 2011; Behera et al. 2014).

A diferença entre os pré-tratamentos em água quente líquida (LHW) e explosão a vapor ocorre em razão da quantidade e da concentração de produtos gerados, sendo mais concentrados na explosão e mais solubilizados em LHW (Hendriks and Zeeman 2009). Porém, diferentes tipos de biomassas possuem estruturas diferenciadas e apresentam mecanismos de reações distintos (LI et al. 2014).

Como principais vantagens do LHW, têm-se a não inclusão de nenhum outro tipo de reagente químico ou catalítico, exceto água (1), evitando, assim, problemas de corrosão nos equipamentos (2), e a não geração de resíduos tóxicos (3), eliminando a necessidade de um passo de lavagem dos resíduos sólidos remanescentes para neutralização (4). Além disso, requer baixas temperaturas (150 - 200°C) para desempenho (5), baixo custo operacional e de manutenção (6), sendo passível de aplicação industrial em larga escala (7), e, ainda, não necessita de redução externa no tamanho das partículas da biomassa, uma vez que estas são quebradas durante o pré-tratamento (Wang et al. 2012; Behera et al. 2014).

O fator de severidade (denominado $\log R_0$) de um tratamento hidrotérmico é utilizado para comparar e avaliar diferenças entre pré-tratamentos quanto a respostas distintas, correlacionando seus parâmetros a elas. Ele pode ser calculado por meio da equação proposta por Overend e Chornet (1987), na qual tempo e temperatura de exposição da biomassa lignocelulósica são fatores que afetam diretamente a eficiência destes, como, por exemplo, no aumento da digestibilidade da celulose por celulasas ou na solubilização da hemicelulose. A seguir, é apresentada a equação de severidade.

$$\log R_0 = \log \left[t \times \exp \left(\frac{T_i - T_b}{\omega} \right) \right]$$

Equação 1: Fator de severidade proposto por Overend e Chornet (1987), onde t (tempo em minutos), T_i (temperatura empregada - °C), T_b (temperatura-base - 100°C), ω (parâmetro de ajuste - 14,75).

2.4. *Paecilomyces formosus*

O gênero *Paecilomyces* abriga fungos cosmopolitas encontrados em solos, plantas, animais, ambientes internos e gêneros alimentícios. As espécies pertencentes a ele são termotolerantes, de rápido crescimento, mesmo em baixas concentrações de oxigênio disponível no meio (microaerofilia) e na presença de conservantes (resistência a formaldeído), sendo também oportunistas e nematófagos (Houbraken et al. 2008; Oka et al. 2015). Pela combinação destas

características, tais espécies são frequentemente encontradas como deteriorantes de alimentos industrializados e bebidas pasteurizadas (Oka et al. 2014).

Historicamente, este gênero foi proposto por Bainer (1907) para acomodar uma única espécie de *P. variotii*. Posteriormente, foram realizadas revisões e modificações literárias por Brown & Smith (1975) e Samson (1974), em que foram descritas 31 espécies. Luangsa-ard et al. (2004) efetuaram análises filogenéticas comprovando que *Paecilomyces* é um grupo polifilético, estando suas espécies subdivididas entre as ordens *Sordariomycetidae* e *Eurotiomycetidae* (Samson et al. 2009).

De acordo com sua taxonomia, *Paecilomyces formosus* pertence ao filo dos *Ascomycetes*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotiomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae*, ordem *Eurotiales* e família *Trichocomaceae* (Sakaguchi et al. 2018). Dentre os membros da família *Trichocomaceae* que possuem ampla distribuição e utilização industrial, estão os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Esta espécie participa do complexo de espécies de *P. variotii*, que abrange uma gama de espécies desse gênero, devido, principalmente, a suas similaridades fenotípicas. Algumas delas são patógenos humanos que causam muitos tipos de infecções em pacientes imunossuprimidos, como endocardites e infecções cutâneas leves, sendo que, dentre as mais virulentas, estão *P. lilacinum* e *P. variotii*. O tratamento para infecções causadas por esses patógenos é realizado por meio da ingestão de pequenas concentrações de Anfotericina B e Voriconazol, respectivamente (Barker et al. 2014). É importante destacar que não foram descritas, na literatura, qualquer infecção provocada por *P. formosus*.

As características morfológicas (Figura 8) das colônias de *P. formosus* se configuram pelo rápido crescimento em temperatura ambiente, coloração marrom-amarelado e superfície pulverulenta. Apresentam conidióforos hialinos irregularmente ramificados, clamidósporos de paredes lisas, globosas e levemente pigmentadas, conídios isolados elipsoidais ou cilíndricos, com truncamento nas extremidades (Samson et al. 2009; Lopes et al. 2017).

Diversas aplicações industriais têm sido propostas para *P. formosus* em setores distintos: área biotecnológica, na produção enzimática de pectinases (Damásio et al. 2010b) e tanases (Houbraken et al. 2008); área ambiental, na

degradação e descoloração de corantes tóxicos (Bulla et al. 2017), detoxificação de águas residuais (Aftab et al. 2017), biofiltração de tolueno (Houbraken et al. 2008), produção de fito-hormônios (Waqas et al. 2015) e controle biológico de pragas urbanas - escorpiões (Brites-Neto 2018), dentre outras.

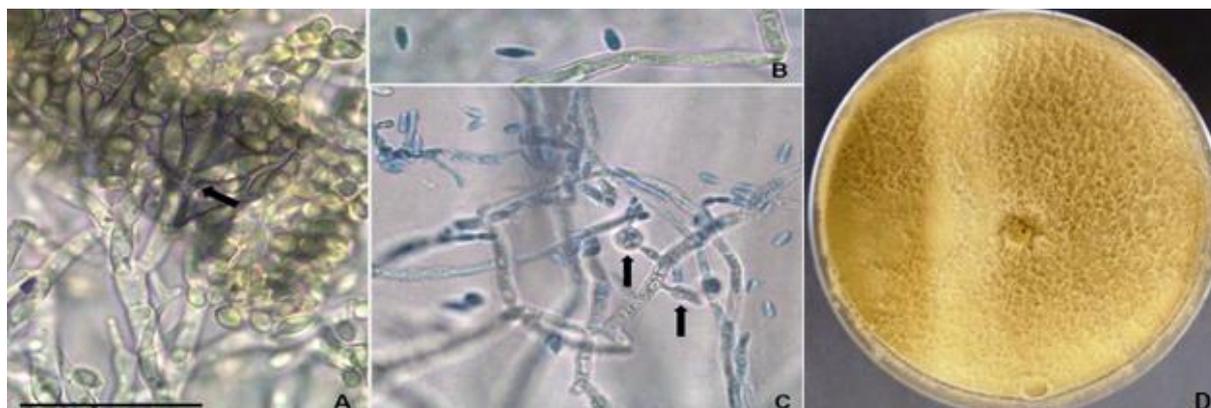


Figura 8: Estruturas reprodutivas assexuais de *Paecilomyces formosus*. A. Aspecto oliva-marrom dos conídios. Seta mostra o ponto de ramificação do conidióforo. B. Conídios elipsoidais. C. Isolado com conídios cilíndricos e setas apontando clamidósporos. D. Visão morfológica macroscópica em placa de Petri. Escala da barra = 20 μ m. Extraído e adaptado de LOPES, 2016.

3 Justificativas

A grande quantidade de resíduos agroindustriais gerada pela colheita e beneficiamento do café, bem como sua composição nutricional e bromatológica, torna esses resíduos interessantes substratos para o crescimento do fungo filamentoso *P. formosus*, produtor de ampla gama de enzimas e metabólitos secundários, uma vez que estes resíduos não possuem destinação apropriada.

Em razão do alto índice de pectina presente na mucilagem do café, a busca por utilizar tais resíduos na produção de pectinases torna-se uma alternativa viável para minimizar o impacto ambiental ocasionado pelo descarte inadequado destes no meio ambiente, atentando-se, também, à aplicação dessas enzimas em diversos processos industriais.

O interesse no uso dos licores obtidos por meio dos pré-tratamentos ocorre com o intuito de facilitar o cultivo de fungos filamentosos em fermentadores, visando à produção em larga escala dessas enzimas, visto que o emprego de substratos insolúveis dificulta o desenvolvimento e o controle da fermentação. A utilização de

fontes de carbono solúveis facilitaria este processo, já que a produção enzimática não estaria sujeita à hidrólise do substrato em sua forma natural.

4 Objetivos gerais

Aliado às tecnologias de pré-tratamento hidrotérmico como ferramentas para diminuição da recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial de produção enzimática holocelulolítica da fração líquida (licor) obtida a partir do pré-tratamento *em* água quente líquida (LHW) de resíduos agrícolas de café como fonte de carbono para cultivo por *P. formosus*, bem como purificar e caracterizar enzimas pectinolíticas oriundas dessas fermentações.

O efeito de três variáveis do processo de pré-tratamento (concentração de biomassa, tempo e temperatura de exposição desta) e de quatro variáveis do processo de cultivo (pH do licor, temperatura de incubação, agitação e concentração de nitrogênio) foi analisado sobre a composição dos licores gerados e a produção de pectinases por *P. formosus*. Uma extensa caracterização de composição dos licores e resíduos sólidos remanescentes do processo de pré-tratamento foi efetuada com o intuito de se traçar paralelos destes com a produção enzimática. Uma vez selecionadas as condições ideais de pré-tratamento e cultivo, novos cultivos foram realizados em frascos erlenmeyers. Ambos os parâmetros foram otimizados, almejando-se maximizar a produção pectinolítica para posteriores aplicações industriais.

5 Referências

- Adam E (2009) Conceituando biomassa. In: Instituto de Energia e Ambiente. <http://www.iee.usp.br/gbio/?q=livro/conceituando-biomassa>. Accessed 29 Mar 2018
- Aftab K, Akhtar K, Kausar A, Khaliq S, Nisar N, Umbreen H, Iqbal M (2017) Fungal strains isolation, identification and application for the recovery of Zn(II) ions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 175:282–290 . doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.028
- Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB (2011) Biomass pretreatment :

- Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29:675–685 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
- Agustin-Salazar S, Cerruti P, Medina-Juárez LÁ, Scarinzi G, Malinconico M, Soto-Valdez H, Gamez-Meza N (2018) Lignin and holocellulose from pecan nutshell as reinforcing fillers in poly (lactic acid) biocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules* 115:727–736 . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.120
- Avallone S, Brillouet JM, Guyot B, Olguin E, Guiraud JP (2002) Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International Journal of Food Science and Technology* 37:191–198 . doi: 10.1046/j.1365-2621.2002.00556.x
- Barker AP, Horan JL, Slechta ES, Alexander BD, Hanson KE (2014) Complexities associated with the molecular and proteomic identification of *Paecilomyces* species in the clinical mycology laboratory. *Medical mycology* 52:537–545 . doi: 10.1093/mmy/myu001
- Bee S, Brando CHJ, Brumen G, Carvalhaes N, Kölling-Speer I, Speer K, Suggi Liverani F, Teixeira AA, Teixeira R, Thomaziello RA, Viani R, Vitzthum OG (2005) The raw bean. In: Illy A, Viani R (eds) *Espresso Coffee: The Science of Quality*, Second. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, pp 87–178
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:326–338 . doi: 10.1007/s002530100704
- Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S (2014) Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 36:91–106 . doi: 10.1016/j.rser.2014.04.047
- Bortolazzo NG (2011) Isolamento de fungos celulóticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo ESALQ
- Brites-Neto J (2018) Atividade escorpionicida de metabólitos secundários de *Paecilomyces formosus* em bioensaios in vivo com *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
- Buckeridge MS, Souza AP de (2014) Breaking the “ Glycomic Code ” of Cell Wall Polysaccharides May Improve Second-Generation Bioenergy Production from

- Biomass. Bioenergy Resource. doi: 10.1007/s12155-014-9460-6
- Bulla LMC, Polonio JC, Portela-castro AL de B, Kava V, Azevedo JL, Pamphile JA (2017) Activity of the endophytic fungi *Phlebia* sp. and *Paecilomyces formosus* in decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes. *Environmental Monitoring and Assessment* 189: . doi: 10.1007/s10661-017-5790-0
- Carmo JR do (2013) Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando resíduos do processamento do café (*Coffea arabica* L .). Universidade Federal de Lavras
- Chylenski P, Forsberg Z, Ståhlberg J, Várnai A, Lersch M, Bengtsson O, Sæbø S, Horn SJ, Eijsink VGH (2017) Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. *Journal of Biotechnology* 246:16–23 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.02.009
- Conceição JCPR da, Junior RG de E, Conceição PHZ da (2019) Cadeia agroindustrial do café no brasil: agregação de valor e exportação. *Boletim de Economia e Política Interncaional* Jan/Abr:37–48
- Costa DAL, Filho EXF (2018) Microbial β -mannosidases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:535–547 . doi: 10.1007/s00253-018-9500-9
- Damásio ARL, Silva TM, Maller A, Jorge j. A, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2010) Purification and partial characterization of an Exo-polygalacturonase from *paecilomyces variotii* liquid cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:1496–1507 . doi: 10.1007/s12010-009-8682-0
- Dashtban M, Schraft H, Qin W (2009) Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues ; Opportunities & Perspectives. *International Journall of Biological Sciences* 5:578–595
- Dionisio FG, Santana FC., De MFF, Maria G (2009) Aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar
- Energy EE& R (2018) Bionergy basics. In: Energy.gov. <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/bioenergy-basics>. Accessed 2 Mar 2018
- Esquivel P, Jiménez VM (2012) Functional properties of coffee and coffee by-

- products. *Food Research International* 46:488–495 . doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028
- FAO (2018) Crop Residues. In: FAOSTAT Emissions Database Agriculture. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/GA>. Accessed 28 Jun 2017
- Finkelstein M, Sheehan J (2009) Biomass and Biotechnology: a key to sustainability
- Franca SA, Oliveira LS (2009) Coffee Processing Solid Wastes: Current Uses and Future Perspectives
- Gomes HAR (2017) Revelando o potencial de *Clonostachys byssicola* em produzir enzimas holocelulolíticas. Universidade de Brasília
- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. *Process Biochemistry* 38:987–996
- Halal SLM (2008) Composição, processamento e qualidade do café. Universidade Federal de Pelotas
- Hargreaves PI (2008) Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da Floresta Amazônica e Otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. Universidade Federal do Rio de Janeiro
- Heerd D, Yegin S, Tari C, Fernandez-lahore M (2011) Food and Bioproducts Processing Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp . in solid-state fermentation : A comparative study. *Food and Bioproducts Processing* 90:102–110 . doi: 10.1016/j.fbp.2011.08.003
- Hendriks ATWM, Zeeman G (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100:10–18 . doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.027
- Hermosa VAB (2014) Aproveitamento de resíduos do processamento semi-seco do café para produção de compostos de valor agregado. Universidade Federal de Lavras
- Hernández-Beltrán JU, Hernández-De Lira I, Cruz-Santos M, Saucedo-Luevanos A, Hernández-Terán F, Balagurusamy N (2019) Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: current state, challenges, and opportunities. *Applied Sciences* 9:29
- Houbraken J, Varga J, Rico-Munoz E, Johnson S, Samson RA (2008) Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus

- Byssoschlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology* 74:1613–1619 . doi: 10.1128/AEM.01761-07
- Jayachandra T, Venugopal C, Anu Appaiah K a. (2011) Utilization of phytotoxic agro waste— Coffee cherry husk through pretreatment by the ascomycetes fungi *Mycotypha* for biomethanation. *Energy for Sustainable Development* 15:104–108 . doi: 10.1016/j.esd.2011.01.001
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40:2931–2944
- Kapoor M, Panwar D, Kaira GS (2016) Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes: Technical Challenges and Commercialization Potential. In: *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. Elsevier Inc., pp 61–93
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R (2001) Applications of pectinases in the commercial sector : a review. *Bioresource technology* 77:215–227
- Lal R (2005) World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environment International* 31:575–584 . doi: 10.1016/j.envint.2004.09.005
- LI X, LU J, ZHAO J, QU Y (2014) Characteristics of Corn Stover Pretreated with Liquid Hot Water and Fed-Batch Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation for Bioethanol Production. *PloS One* 9: . doi: 10.1371/journal.pone.0095455
- Liang N, Xue W, Kennepohl P, Kitts DD (2016) Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chemistry* 213:251–259 . doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.041
- Lima Filho T, Della Lucia SM, Saraiva SH, Sartori MA (2013) Composição físico-química e qualidade sensorial de café conilon produzido no Estado do Espírito Santo e submetido a diferentes formas de processamento. *Semina: Ciências Agrárias* 34:1723–1730 . doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n4p1723
- Lima MV, Vieira HD, Martins MLL, Pereira SM. (2008) Preparo do café despulpado , cereja descascado e natural na região sudoeste da Bahia. *Revista Ceres* 55:124–130

- Lopes AM, Vitorino LC, Castro CFS, Nascimento JP, Souchie EL (2017) Primeiro relato da ocorrência dos fungos *Paecilomyces*: *P. formosus*, *P. saturatus* e *P. parvisporus* no Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 14:
- Lopes GR, Ferreira AF, Pinto M, Passos CP, Coelho E, Rodrigues C, Figueira C, Rocha SM, Nunes FM, Coimbra MA (2016) Carbohydrate content, dietary fibre and melanoidins: Composition of espresso from single-dose coffee capsules Guido. *Food Research International* 6156: . doi: 10.1016/j.foodres.2016.01.018
- Malta MR (2011) Processamento e qualidade do café. In: *Produção de café: opção pela qualidade*, 32 n 261. EPAMIG, Belo Horizonte, p 132
- Martins PA (2012) Caracterização do secretoma de *Aspergillus niger* crescido em bagaço de cana e purificação de xilanases de interesse biotecnológico. Universidade de Brasília
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11:266–277 . doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.006
- Moreira ASP, Nunes FM, Simões C, Maciel E, Domingues P, Domingues MRM, Coimbra MA (2017) Transglycosylation reactions , a main mechanism of phenolics incorporation in coffee melanoidins : inhibition by Maillard reaction. *Food Chemistry*. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.01.107
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: *Industrial Waste*. InTech's Journals, Portugal, pp 121–140
- Mäkelä MR, Bredeweg EL, Magnuson JK, Baker SE, De Vries RP, Hildén K (2016) Fungal Ligninolytic Enzymes and Their Applications. *Microbiology Spectrum* 4:1–13 . doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0017-2016.Correspondence
- National Coffee Association (2015) The economic impact of the coffee industry. In: National Coffee Association. <http://www.ncausa.org/industry-resources/economic-impact>
- Odega TL, Petri DFS (2010) Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Química Nova* 33:1549–1558
- Oka T, Ekino K, Fukuda K, Nomura Y (2014) Draft Genome Sequence of the Formaldehyde-Resistant Fungus *Byssochlamys spectabilis* No. 5 (Anamorph *Paecilomyces variotii* No. 5) (NBRC109023). *Genome announcements*

- 2:10.1128/genomeA.01162-13 . doi: 10.1128/genomeA.01162-13 [doi]
- Oka T, Komachi Y, Ohsima K, Kawano Y, Fukuda K, Nagahama K, Ekino K, Nomura Y (2015) Isolation, sequencing, and heterologous expression of the *Paecilomyces variotii* gene encoding S-hydroxymethylglutathione dehydrogenase (fldA). *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:1755–1763 . doi: 10.1007/s00253-014-6203-8
- Oliveira LS, Franca AS (2014) An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. In: *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., pp 283–291
- Orozco AL., Pérez MI, Guevara O, Rodríguez J, Hernández M, González-Vila FJ, Polvillo O, Arias ME (2008) Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 81:247–252 . doi: 10.1016/j.jaap.2007.12.002
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77:149–162
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000a) New developments in solid state fermentation : I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35:1153–1169
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R, Roussos S (2000b) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 6:153–162
- Pujol D, Liu C, Gominho J, Olivella MÀ, Fiol N, Villaescusa I, Pereira H (2013) The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products* 50:423–429 . doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.056
- Robl D, Delabona PS, Mergel CM, Rojas JD, Costa PS, Pimentel IC, Vicente VA, Pradella JGC, Padilla G (2013) The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC Biotechnology* 13:
- Saha B. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiology Biotechnology* 30:279–291
- Sakaguchi M, Samson RA, Houbraken J, Tada I & (2018) *Paecilomyces formosus*. In: *Paecilomyces*. [http://www.mycobank.org/name/Paecilomyces formosus](http://www.mycobank.org/name/Paecilomyces%20formosus). Accessed 1 Apr 2018

- Samson RA, Houbraken J, Varga J, Frisvad JC (2009) Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 22:14–27 . doi: 10.3767/003158509X418925
- Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:185–194 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.001
- Santos FA, Queiróz JH, Colodette JL, Fernandes SA, Guimarães VM, Rezende ST (2012) Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova* 35:1004–1010
- Silva COG, Filho EXF (2017) A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. *Bioenergy Resource*. doi: 10.1007/s12155-017-9815-x
- Silva JP da (2012) Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica* , L) in natura , e de seus Produtos Obtidos pelo Processo de Pirólise em Reator Mecanicamente Agitado Caracterização da Casca de Café (*coffea arábica* , L) in natura , e de seus Produtos Obtidos pelo Proc. Universidade Estadual de Campinas
- Siqueira FG, Filho EXF (2010) Plant cell wall as a substrate for the production of enzymes with industrial applications. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 7:54–60
- Thorenz A, Wietschel L, Stindt D, Tuma A (2018) Assessment of agroforestry residue potentials for the bioeconomy in the European Union. *Journal of Cleaner Production* 176:348–359 . doi: 10.1016/j.jclepro.2017.12.143
- Ulloa Rojas JB, Verreth JAJ, Amato S, Huisman EA (2003) Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology* 89:267–274 . doi: 10.1016/S0960-8524(03)00070-1
- Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørli M, Eijsink VGH (2010) An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides. *Science* 330:219–222 . doi: 10.1126/science.1192231
- Walia A, Guleria S, Mehta P, Chauhan A, Parkash J (2017) Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*

7:1–12 . doi: 10.1007/s13205-016-0584-6

- Wang W, Yuan T, Wang K, Cui B, Dai Y (2012) Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Populus tomentosa*. *Bioresource Technology* 107:282–286 . doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.116
- Waqas M, Khan AL, Shahzad R, Ullah I, Khan AR, Lee I-J (2015) Mutualistic fungal endophytes produce phytohormones and organic acids that promote japonica rice plant growth under prolonged heat stress. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 16:1011–1018 . doi: 10.1631/jzus.B1500081
- Wei H, Xu Q, Li LET, Baker JO, Tucker MP, Ding S-Y (2009) Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology* 20:330–3380 . doi: 10.1016/j.copbio.2009.05.008
- Yadav S, Kumar P, Yadav D, Yadav KDS (2009) Pectin lyase : A review. *Process Biochemistry* 44:1–10 . doi: 10.1016/j.procbio.2008.09.012
- Yang Y, Zhang P, Yang X, Xu X (2016) Spatial and temporal dynamics of agricultural residue resources in the last 30 years in China. *Waste Management & Research* 34:1230–1240 . doi: 10.1177/0734242X16670001
- Yu Q, Zhuang X, Yuan Z, Kong X, Qi W, Wang W, Wang Q, Tan X (2015) Influence of lignin level on release of hemicellulose-derived sugars in liquid hot water. *International Journal of Biological Macromolecules* 5459: . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.045
- Zavala-Páramo MG, Villa-Rivera MG, Lara-Márquez A, López-Romero E, Cano-Camacho H (2020) Applications of Fungal Pectinases. Reference Module in Life Sciences. doi: 10.1016/b978-0-12-809633-8.21086-8

Capítulo II

Seleção do microrganismo produtor de pectinase e pré-tratamentos das biomassas lignocelulósicas

1. Introdução

Os resíduos lignocelulósicos são fontes de carbono alternativas, de baixo custo, alta qualidade e consistência, que oferecem soluções potenciais para os desafios atrelados à crescente demanda por sustentabilidade (Gurram et al. 2016).

A indústria cafeeira gera, anualmente, grandes quantidades de resíduos ricos em compostos orgânicos (proteínas, lipídios, celulose, hemicelulose, lignina, compostos fenólicos, além de substâncias pécticas e outros polissacarídeos) que, geralmente, não possuem disposição final bem definida e são considerados tóxicos na natureza (Pandey et al. 2000b). Grandes estudos têm sido realizados com o objetivo de valorizar a natureza heterogênea dos compostos do café e introduzi-los no mercado. Diversas são as aplicações: na forma de biodiesel e etanol (Hermosa 2014; Caetano et al. 2017), biogás (Battista et al. 2016), produção de ácidos orgânicos, como o ácido levulínico (Licursi et al. 2018) e ácido giberélico (Machado et al. 2002), carotenoides (Dias 2016), além de enzimas variadas, como α -amilases (Murthy et al. 2009), pectinases (Antier et al. 1993), xilanases e celulases (Navya e Pushpa 2013; Cerda et al. 2017a). Algumas instituições envolvidas no desenvolvimento e gerenciamento de rejeitos também coletam parte destes resíduos e comercializam para outras empresas, que os empregam em diferentes nichos, como de insumos de compostagem e de jardinagem, produção de cogumelos comestíveis, dentre outros (Pujol et al. 2013).

A rica composição dos resíduos de café e outras biomassas lignocelulósicas somente se tornam disponíveis para a utilização biotecnológica se forem submetidas a algum tipo de pré-tratamento que exponha seus constituintes aos processos de conversão, sejam eles químicos ou microbiológicos (Jong et al. 2012).

As diferentes metodologias de pré-tratamentos têm como principal objetivo modificar a estrutura da parede celular de forma a diminuir sua recalcitrância, aumentar a porosidade, a digestibilidade e a eficiência de conversão dos seus polímeros constituintes em açúcares fermentescíveis (Hendriks and Zeeman 2009; Zahoor and Yuanyuan 2014).

Os métodos de pré-tratamentos são divididos em físicos, químicos, físico-químicos, biológicos, elétricos e as combinações geradas entre eles. Dentre os físicos, os pré-tratamentos térmicos são amplamente utilizados, nos quais as

biomassas são aquecidas a temperaturas acima de 100 °C. Se as temperaturas são aumentadas acima de 150 °C, partes das biomassas lignocelulósicas são solubilizadas; em primeiro estágio, os componentes hemicelulósicos e, posteriormente, a lignina (Hendriks e Zeeman, 2009).

O pré-tratamento utilizando água quente líquida (*Liquid Hot Water – LHW*) enquadra-se nos pré-tratamentos hidrotérmicos, que aliam altas temperaturas a altas pressões para realizar a dissolução dos componentes hemicelulósicos utilizando somente água como solvente (Silva e Filho 2017). Durante o processo de catálise, adicionalmente aos compostos da hemicelulose, podem ser formados potenciais inibidores que dificultam ou inviabilizam o crescimento microbiológico (Akhtar et al., 2016).

Os fungos filamentosos são microrganismos capazes de crescer em ambientes desfavoráveis. Neste âmbito, os fungos ascomicetos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* são cosmopolitas, possuindo características que facilitam a colonização de diferentes ambientes, desde solos a hospedeiros patogênicos humanos (Dong et al. 2012). As diferentes espécies incluídas neste gênero variam a produção de um arsenal bioquímico de enzimas, como fitases (Laguna et al. 2015), tanases (Battestin e Macedo 2007), lacases (Kluczek-Turpeinen et al. 2003), xilanases, celulases, pectinases (Damásio et al. 2010b; Patil et al. 2012a; Zerva et al. 2014), quitinases (Brites-Neto 2018), micotoxinas (Oka et al. 2014) e variados metabólitos secundários de aplicação biotecnológica.

Neste capítulo, buscamos identificar as cepas de *P. formosus* melhores produtoras de pectinases sobre os diferentes pré-tratamentos aos quais foram submetidas. Variações dos parâmetros dos pré-tratamentos hidrotérmicos e das condições de cultivo para indução enzimática foram avaliadas.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

Os reagentes pectina de frutas cítricas, xilana de aveia, carboximetilcelulose (CMC) e manana foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). Obteve-se a peptona bacteriológica C da empresa AcuMedia, Neogen, (Indaiatuba - SP), e o ácido clorídrico PA e o hidróxido de sódio PA, da empresa Dinâmica

Química Contemporânea (Indaiatuba - SP). A coluna e a pré-coluna Dionex CarboPac-PA1 cromatográficas foram adquiridas da ThermoFischer Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Origem dos resíduos de café

As cascas de café arábica e robusta, utilizadas no screening microbiológico, foram obtidas na cidade de Lavras – MG, armazenadas em temperatura ambiente e submetidas à moagem para redução da granulometria e adequação ao processo de fermentação submersa. Para os cultivos de triagem e seleção dos isolados, as cascas de café não sofreram nenhum tipo de pré-tratamento térmico ou químico anterior à indução enzimática.

Todos os resíduos do beneficiamento de café arábica, utilizados no planejamento experimental e pré-tratamentos, foram gentilmente cedidos pela Fazenda Boa Sorte, localizada no município de Campos Altos - MG. Antes de serem submetidos às etapas de pré-tratamento e fermentação, foram tomados alguns cuidados relativos a cada resíduo coletado:

- Polpa (casca melosa): foi congelada até o momento da utilização, quando foi seca e, posteriormente, triturada, para ajuste da granulometria.
- Casca tradicional: obtida do beneficiamento por via seca, foi armazenada em temperatura ambiente e triturada em moinhos de faca de bancada.
- Casca desmucilada: obtida após secagem e processamento do café desmucilado, foi armazenada em temperatura ambiente e triturada em moinhos de faca de bancada.

2.3. Screening das cepas utilizadas e potencial produtor de pectinases

A micoteca do Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, conta com nove cepas de *P. variotii* isoladas de diferentes ambientes, como distintos tipos de solos do cerrado (campo sujo,

cerradão floresta e cerrado *stricto sensu*), serrapilheiras e troncos de árvores do Distrito Federal.

Inicialmente, oito dessas cepas foram submetidas à triagem para produção de enzimas pectinolíticas. A utilização delas foi autorizada com a concessão de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010237/2015-1/CNPq. Além disso, essa micoteca é registrada (registro 1128) no *World Data Center for Microorganism (WDCM)*.

Para a indução da produção enzimática, os fungos foram crescidos sob fermentação submersa utilizando-se resíduos agrícolas gerados no beneficiamento do café (casca de café arábica), sendo que estes não sofreram qualquer tipo de pré-tratamento anterior.

As suspensões de esporos foram obtidas a partir da raspagem da superfície das diferentes placas, crescidas por sete dias, contendo meio MEA 2% (extrato de Malte Agar) a 28 °C, durante 10 dias, em incubadora do tipo BOD programada com fotoperíodo de 12 horas. A partir dessa suspensão de esporos, os meios de cultura foram inoculados com uma concentração de esporos equivalente a cerca de $1,35 \times 10^7$ esporos/g de fonte de carbono. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 500 ml, contendo 200 ml de meio mínimo mineral (g/L: KH_2PO_4 7,0; K_2HPO_4 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; extrato de levedura 0,6) enriquecido com uma das fontes de carbono complexas na concentração de 1% (m/v). Os cultivos foram realizados em duplicata, e os frascos, incubados a 28 °C, sob agitação de 120 rpm durante 7 dias. Após este período, os cultivos foram filtrados a vácuo com auxílio de papel-filtro Whatman nº 5, e o material filtrado, denominado extrato bruto, foi preservado em câmara fria a 4°C, acrescido de azida sódica 0,2%.

A cada dia durante o cultivo, foi retirada uma alíquota de 1 ml, devidamente congelada, para posterior determinação das atividades enzimáticas (CMCase, xilanases, mananases e pectinases) correspondentes àquele dia.

2.4. Caracterização dos extratos brutos

Os extratos brutos foram caracterizados quanto às atividades de carboximetilcelulases (CMCase), xilanases, mananases e pectinases. Os ensaios para detecção das atividades enzimáticas foram realizados em microescala,

utilizando-se uma alíquota de 5 µl de extrato bruto e 10 µl dos substratos carboximetilcelulose (CMC) 4%, xilana de farelo de aveia 1% (*oat spelts*), galactomanana 1% e pectina cítrica 1% (SIGMA), respectivamente.

Os ensaios foram conduzidos a 50°C, por 30 minutos, em microplacas de PCR incubadas em termociclador (BioRad). A determinação de açúcares redutores foi executada segundo o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), com a adição de 30µL de DNS à reação que foi submetida à fervura a 97°C por 10 minutos. A concentração de açúcares redutores liberados foi determinada a partir de leitura a 540nm em leitor de microplacas SPECTRAMAX (Molecular Devices, EUA). As atividades enzimáticas foram expressas em UI/ml, sendo que UI representa a quantidade de enzimas capaz de liberar 1 µmol de produto por minuto nas condições de ensaio. Foram realizadas curvas de calibração utilizando-se os monossacarídeos (glicose, xilose, manose e ácido galacturônico) como padrões para os cálculos das atividades de CMCase, xilanase, mananase e pectinase, respectivamente.

2.5. Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976), empregando-se o Kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EUA). Uma solução de BSA (albumina sérica bovina), de concentração 0,1 mg/ml, foi usada para construção da curva padrão.

2.6. Análise estatística

Com os dados referentes a cada curva de indução enzimática pelos oito diferentes isolados, realizaram-se a análise de variância multifatorial e o teste de Tukey, por meio do software R, para as médias, buscando-se avaliar os efeitos das cepas, tempo de cultivo, substrato e tipo de café que apresentaram as melhores atividades.

Os três melhores isolados, que exibiram as maiores atividades pectinolíticas, foram selecionados para a realização da identificação molecular e o prosseguimento do trabalho.

2.7. Identificação molecular dos isolados

Todas as cepas utilizadas neste trabalho foram identificadas morfologicamente como *Paecilomyces variotii* pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Luís Roberto Batista (Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade de Lavras), com base em suas características miceliais e de crescimento em diferentes temperaturas.

A identificação molecular dos isolados, anteriormente selecionados como melhores produtores pectinolíticos, foi realizada para assegurar a idoneidade das cepas trabalhadas, sendo que todo o processo foi executado em parceria com o grupo de pesquisa dos professores Dr. Robert Neil Gerard Miller e Dr. Gabriel Sérgio Costa Alves (Laboratório de Microbiologia: Interação Planta-Praga, Universidade de Brasília).

Para isso, foram selecionadas as sequências de DNA correspondentes aos genes de calmodulina, β -tubulina e ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal (regiões 1 e 4).

Culturas monospóricas dos três isolados fúngicos foram realizadas segundo protocolo de Keitt (1925), modificado por Ezekiel (1930) e Lambert (1939). As soluções de esporos foram diluídas de forma seriada e devidamente estriadas em placas contendo ágar-água até crescimento micelial inicial de único esporo (3 a 4 dias). Estes esporos foram retirados e transferidos para placas de meio MEA 2% mantidas a 28 °C por quatro dias, com o intuito de crescimento e esporulação das culturas. A partir dessa biomassa, houve transferência para frascos Erlenmeyers de 500 ml, contendo 200 ml de meio MEA 2%. Os cultivos foram realizados em duplicata, e os frascos, incubados a 28 °C, sob agitação de 120 rpm durante 5 dias. Após este período, os cultivos foram filtrados a vácuo com o auxílio de papel-filtro Whatman nº 5, e a massa micelial obtida foi encaminhada para extração de DNA e posterior reação em cadeia de polimerase (PCR).

A extração de DNA foi efetuada segundo protocolo de Doyle & Doyle (1991), modificado por Patrocínio (2007), também conhecido por método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

A amplificação dos fragmentos através de PCR foi realizada por meio do kit GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as

instruções do fabricante. As regiões ITS – sub-regiões (ITS1/ITS4), *cal* (calmodulina) e, *β-tubulina* foram amplificadas pelas misturas do kit contendo 10 µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 8 µL de solução MgCl₂ (25 mM¹), 1 µL mix de nucleotídeos (dNTP), 0,25 µL GoTaq® Hot Start Polymerase, 1 µL dos respectivos primers forward/reverse (Tabela 1) e 1 µL do DNA padrão a ser amplificado. As temperaturas de anelamento dos primers foram 55°C para ITS, 55°C para *β-tubulina* e 53 °C para calmodulina.

Tabela 1 Sequência nucleotídica dos primers para as regiões ITS, calmodulina e *β-tubulina*

Primers		Sequência
ITS		
ITS 1	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4	Reverse	TCCTCCGCTTTATTGATATGC
<i>β-tubulina</i>		
Bt2a	Forward	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
Bt2b	Reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
Calmodulina		
CMD5	Forward	CCGAGTACAAGGARGCCTTC
CMD6	Reverse	CCGATRGAGGTCATRACG TGG

As amostras amplificadas foram purificadas, quantificadas e enviadas para sequenciamento conforme instruções da empresa ACTgene Ludwig Biotecnologia (Alvorada/RS – Brasil).

Analisaram-se os resultados de cada sequenciamento por meio do software Geneious Bioinformatics 9.0.5; as sequências foram alinhadas, e a similaridade, analisada por Blast, contra a base de dados de sequências não redundantes (nr) do NCBI.

2.8. Pré-tratamento

A casca de café tradicional triturada foi o resíduo utilizado para pré-tratamento e geração dos licores indutores de holocelulases. Ela foi incubada com água destilada, em cilindros de aço inoxidável, vedáveis, de volume interno de 300 ml (Swagelok, Ohio, EUA), em diferentes concentrações (1, 3 e 5% m/m),

temperaturas (140, 185 e 230°C) e tempos de incubação (6, 14 e 23 minutos), de acordo com delineamentos fatoriais detalhados adiante. O peso final da mistura, entre biomassa e água, foi de 225 g em todos os pré-tratamentos.

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

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

2.9. Planejamento experimental e design fatorial

Foram testadas variações em diversos parâmetros, tanto do pré-tratamento hidrotérmico (LHW) quanto dos cultivos em frascos Erlenmeyers, para se determinar quais as melhores condições para produção de enzimas pectinolíticas.

Dentre as variáveis testadas para os cultivos, avaliaram-se a temperatura de incubação, o pH do licor, a agitação e a concentração final de nitrogênio, durante o processo fermentativo, além daquelas aferidas no decorrer do pré-tratamento LHW: concentração de biomassa, tempo e temperatura de exposição.

O efeito dos parâmetros do tratamento hidrotérmico e das condições de cultivo sobre a composição dos licores e a produção de holocelulases foi investigado por meio de planejamento experimental fatorial fracionado.

O design experimental Plackett-Burmann foi planejado a fim de identificar e avaliar os efeitos dos fatores mais importantes para indução e produção enzimática nos licores resultantes dos diferentes pré-tratamentos. A Tabela 2 mostra os intervalos de variação, os níveis e a codificação das variáveis independentes utilizadas no design experimental, e a Tabela 3, a combinação dos níveis de fatores avaliados.

Os ensaios de cada tratamento foram realizados em duplicata, e o ponto central, replicado dez vezes. O nível de significância aplicado aos efeitos dos fatores das variáveis foi estabelecido por predição matemática através de superfície de resposta, avaliada por teste *t*, empregado a um *p* valor < 0,05%. O intervalo de confiança utilizado em todas as análises foi de 95%.

Tabela 2: Intervalo de variação, níveis e codificação das variáveis utilizadas no planejamento experimental

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Tempo de PT* (min)	6	15	23
Temperatura do PT* (°C)	140	185	230
Concentração de biomassa (%)	1	3	5
Nitrogênio (g/L)	0	0.5	1
pH	4	7	10
Velocidade de agitação (rpm)	87	120	154
Temperatura do cultivo (°C)	20	28	36

*PT: pré-tratamento

O software *online* Protimiza Experimental Design (Campinas/SP – Brasil) foi utilizado para delineamento e avaliação das respostas obtidas.

Os licores obtidos foram empregados como meio de cultura para crescimento de *P. formosus* e produção de enzimas. Considerando-se o design estatístico, os licores foram ajustados para pH 4,0 (nível -1, com HCl puro absoluto, para evitar alterações volumétricas e influências composicionais) ou para pH 10,0 (nível 1, com NaOH 1M). Para suplementação de nitrogênio e alcance da concentração final designada, foi empregada Peptona Bacteriológica C.

Realizaram-se atividades de CMCases, xilanases, mananases e pectinases, além da quantificação de proteínas, durante os dez dias de cultivos para cada tratamento.

Tabela 3: Planejamento experimental Plackett-Brurmann para avaliação e triagem de variáveis indutoras de atividades pectinolíticas

Experimentos	Tempo de PT (min.)	Temperatura do PT (°C)	Concentração de Biomassa (%)	Concentração de Nitrogênio (g/L)	pH	Velocidade de agitação (rpm)	Temperatura do cultivo (°C)
1	23 (1)	140 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	4 (-1)	154 (1)	20 (-1)
2	23 (1)	230 (1)	1 (-1)	0 (-1)	4 (-1)	87 (-1)	36 (1)
3	23 (1)	230 (1)	5 (1)	0 (-1)	4 (-1)	87 (-1)	20 (-1)
4	23 (1)	230 (1)	5 (1)	1 (1)	4 (-1)	87 (-1)	20 (-1)
5	23 (1)	230 (1)	5 (1)	1 (1)	10 (1)	87 (-1)	20 (-1)
6	6 (-1)	231 (1)	5 (1)	1 (1)	10 (1)	154 (1)	20 (-1)
7	23 (1)	140 (-1)	5 (1)	1 (1)	10 (1)	154 (1)	36 (1)
8	6 (-1)	230 (1)	1 (-1)	1 (1)	10 (1)	154 (1)	36 (1)
9	23 (1)	140 (-1)	5 (1)	0 (-1)	10 (1)	154 (1)	36 (1)
10	23 (1)	230 (1)	1 (-1)	1 (1)	4 (-1)	154 (1)	36 (1)
11	6 (-1)	231 (1)	5 (1)	0 (-1)	10 (1)	87 (-1)	36 (1)
12	6 (-1)	140 (-1)	5 (1)	1 (1)	4 (-1)	154 (1)	20 (-1)
13	23 (1)	140 (-1)	1 (-1)	1 (1)	10 (1)	87 (-1)	36 (1)
14	23 (1)	230 (1)	1 (-1)	0 (-1)	10 (1)	154 (1)	20 (-1)
15	6 (-1)	231 (1)	5 (1)	0 (-1)	4 (-1)	154 (1)	36 (1)
16	6 (-1)	140 (-1)	5 (1)	1 (1)	4 (-1)	87 (-1)	36 (1)
17	23 (1)	140 (-1)	1 (-1)	1 (1)	10 (1)	87 (-1)	20 (-1)
18	6 (-1)	230 (1)	1 (-1)	0 (-1)	10 (1)	154 (1)	20 (-1)
19	23 (1)	140 (-1)	5 (1)	0 (-1)	4 (-1)	154 (1)	36 (1)
20	6 (-1)	230 (1)	1 (-1)	1 (1)	4 (-1)	87 (-1)	36 (1)
21	6 (-1)	140 (-1)	5 (1)	0 (-1)	10 (1)	87 (-1)	20 (-1)
22	6 (-1)	140 (-1)	1 (-1)	1 (1)	4 (-1)	154 (1)	20 (-1)
23	6 (-1)	140 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	10 (1)	87 (-1)	36 (1)

Tabela 3. Continuação...

Experimentos	Tempo de PT (min.)	Temperatura do PT (°C)	Concentração de Biomassa (%)	Concentração de Nitrogênio (g/L)	pH	Velocidade de agitação (rpm)	Temperatura do cultivo (°C)
24	23 (1)	140 (-1)	1 (-1)	0 (-1)	4 (-1)	87 (-1)	20 (-1)
25	14.5 (0)	185 (0)	3 (0)	0.5 (0)	7 (0)	120 (0)	28 (0)
26	14.5 (0)	185 (0)	3 (0)	0.5 (0)	7 (0)	120 (0)	28 (0)
27	14.5 (0)	185 (0)	3 (0)	0.5 (0)	7 (0)	120 (0)	28 (0)
28	14.5 (0)	185 (0)	3 (0)	0.5 (0)	7 (0)	120 (0)	28 (0)
29	14.5 (0)	185 (0)	3 (0)	0.5 (0)	7 (0)	120 (0)	28 (0)

(*) Valores entre parênteses correspondem aos níveis ajustados de acordo com design experimental (**) Ensaios 25-29 correspondem ao ponto central do delineamento estatístico.

2.10. Análises composicionais dos diferentes licores e resíduos de café

A composição e a quantificação dos oligossacarídeos e monossacarídeos presentes nos diferentes licores obtidos foram determinadas de acordo com o método estabelecido pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL), vinculado ao Departamento de Energia dos Estados Unidos (Sluiter et al. 2008).

Para a composição de biomassas, uma massa de 1,5 g de cada casca de café tradicional pré-tratada (ensaios Tabela 2) foi embalada em papel-filtro e submetida a extração em extrator de Soxhlet durante 24 horas. Cada amostra foi submetida a extração dupla - uma com água destilada como solvente, e a outra, com álcool etílico 95%.

Após cada extração, as amostras foram expostas a secagem em estufa de circulação de ar, a 60 °C, durante 12 horas. Posteriormente, duas etapas de hidrólise foram realizadas: na inicial, ácido sulfúrico 72% (m/m) foi empregado durante 1 hora, a 30 °C, e, em seguida, este mesmo ácido foi diluído a 4% (m/m), e a biomassa foi novamente hidrolisada por 1 hora, a 121 °C. Os teores de lignina ácido solúvel (ASL), lignina ácido insolúvel (AIL), teor de cinzas e umidade foram determinados conforme Sluiter et al. (2012), com absorbância a 205 nm (Rambo et al. 2013).

Para hidrólise dos licores resultantes dos pré-tratamentos, uma alíquota de 5 ml de cada licor foi hidrolisada por autoclavagem (121°C) com ácido sulfúrico 72% (m/m) durante uma hora, havendo posterior neutralização do pH com adição de carbonato de cálcio.

A determinação da quantidade de açúcares foi estabelecida por cromatografia de troca aniônica de alta pressão, acoplada ao detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), em um sistema de cromatografia DIONEX ICS3000 Ion Chromatography DC System (Dionex Co., CA, USA), utilizando-se coluna e pré-coluna CarboPac PA-1. A corrida foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Widmer (2011), e foram construídas curvas de calibração com soluções padrões em diferentes concentrações (0,625 - 40 µM) de fucose, arabinose, ramnose, glicose, xilose, sacarose, galactose, manose, frutose, celobiose e ácido galacturônico.

3. Resultados e discussão

3.1. Screening e seleção dos isolados

A escolha por *P. variotii* foi embasada nas características metabólicas deste fungo, devido à sua alta capacidade biotecnológica e ao vasto arsenal enzimático, que inclui desde enzimas hidrolíticas, como xilanases, celulasas, amilases, pectinases e quitinases, até enzimas envolvidas nas vias de degradação de compostos orgânicos considerados fatores antinutricionais, tais como fitases e tanases (Laguna et al. 2015). Sabe-se que os resíduos do café possuem grandes quantidades destes fatores antifisiológicos e antinutricionais, como cafeína, taninos, fitatos e polifenóis (Baggio 2006).

Além de todos esses fatores, os fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* possuem genes capazes de produzir resistência e degradação de formaldeídos, por meio dos genes que codificam sete enzimas responsáveis pela oxidação de formaldeído, dentre elas: duas enzimas ativadoras de formaldeído dependentes de glutatona, duas isoformas de S-hidroxi metilglutaciona desidrogenase (S-HMGSH), duas S-formilglutaciona hidrolases e uma formato desidrogenase dependente de NAD⁺ (Oka et al. 2014). *P. variotii* mostrou-se altamente resistente a formaldeído, quando a enzima S-HMGSH foi capaz de degradar 4 mM deste substrato em um período de 30 horas em condições anaeróbicas (Oka et al. 2015).

A adaptabilidade a ambientes adversos, que podem ser gerados durante o processo de pré-tratamento dos resíduos de café por meio de transformações bioquímicas de seus compostos de origem, foi determinante para a escolha do microrganismo a ser utilizado para a produção de pectinases a partir dessas biomassas lignocelulósicas.

Dessa forma, oito das cepas testadas produziram holocelulasas quando crescidas em meios de culturas líquidos contendo diferentes resíduos de café. A cepa 3RCSSE13, disponível na micoteca, não obteve crescimento micelial durante todo o processo de prospecção; portanto, não foi possível investigar sua secreção enzimática.

A Tabela 4 apresenta os isolados, nomeados conforme cadastro na coleção de culturas e a codificação usada para este trabalho.

Tabela 4 Apresentação e codificação das cepas de *P. variotii*

Cepas	Código
DCFS8	DC
DCFT5	CF
RCFS8	RC
3DSST13	3DT13
3RCSSE21	3RE21
3RCSSE14	3RE14
3RSST13	3RET13
3RCSSE22	3RE22

Os resultados das curvas de indução holocelulolítica das cepas testadas são apresentadas a seguir.

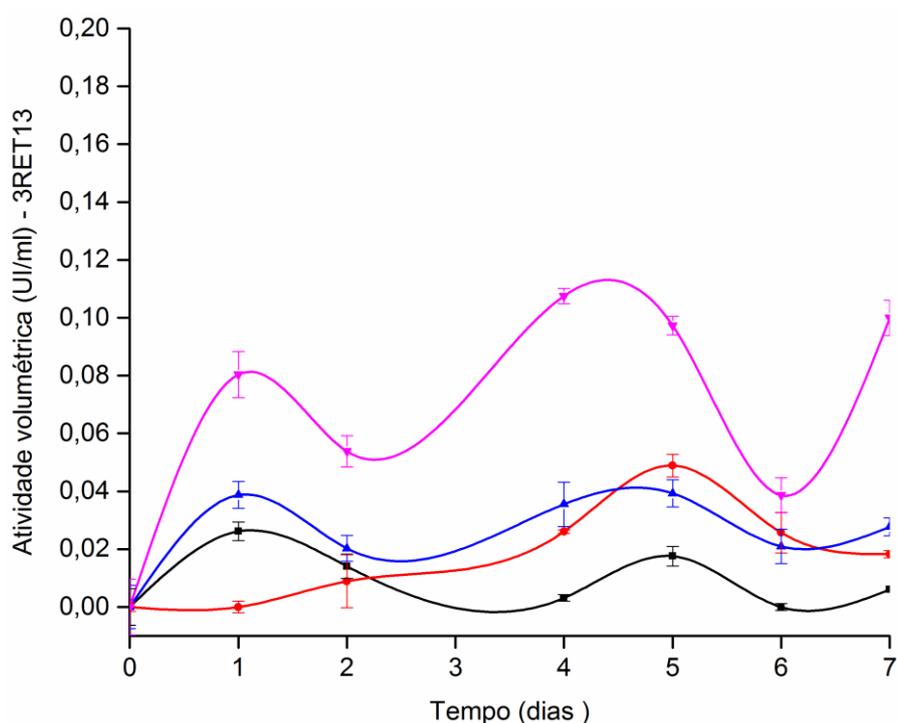


Figura 9: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* 3RET13 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (—) Atividade de CMCCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase.

A cepa 3RET13 (Figura 9) apresentou secreção enzimática holocelulolítica a partir do início do cultivo, com picos de atividades no primeiro dia para CMCCase (0,03 UI/ml), com decréscimo ao longo dos dias. As

mananases expressas tiveram picos de atividade ao primeiro e quinto dias de cultivo, 0,04 e 0,05 UI/ml, respectivamente, sendo que, para xilanase, houve aumento da atividade enzimática com ápice no quinto dia (0,04 UI/ml). As atividades pectinolíticas obtiveram ápice nos dias quatro e seis de cultivo: 0,11 e 0,10 UI/ml, consecutivamente.

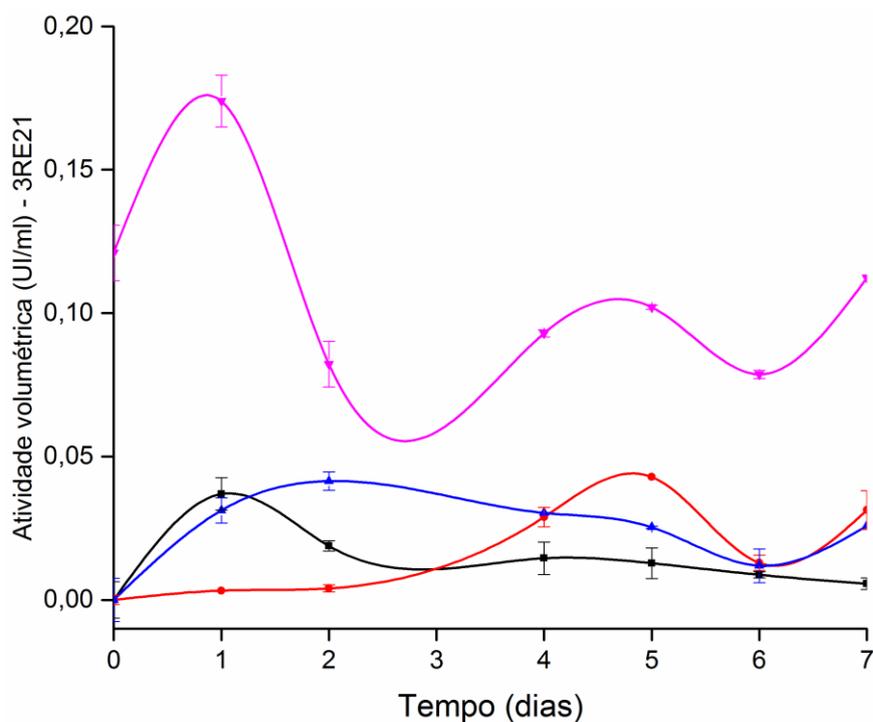


Figura 10: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* 3RE21 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (—) Atividade de CMCCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase.

A cepa 3RE21 (Figura 10) apresentou padrões de secreção semelhantes para indução de xilanase e pectinase a partir do terceiro dia, porém com picos de atividades de pectinase no primeiro e sétimo dias, 0,17 e 0,12 UI/ml, respectivamente, sendo que a atividade xilanolítica ocorreu no quinto dia, com pico de 0,04 UI/ml. Mananase teve atividade máxima no segundo dia (0,04 UI/ml), enquanto a atividade celulolítica obteve ápice no primeiro dia (0,03 UI/ml) de cultivo.

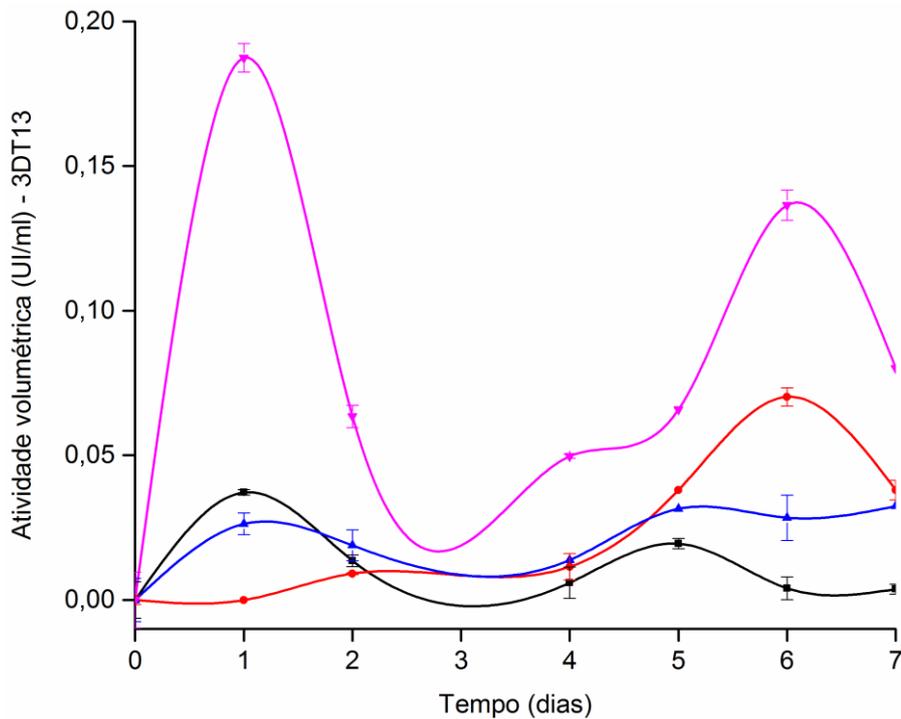


Figura 11: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* 3DT13 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (◼) Atividade de CMCCase, (●) atividade de xilanase, (▲) atividade de mananase, (▼) atividade de pectinase.

A cepa 3DT13 (Figura 11) demonstrou perfil pectinolítico, com pico de atividade no primeiro e sexto dias de cultivo (0,19 e 0,14 UI/ml, respectivamente); mananase (0,03 UI/ml) ao quinto dia, CMCCase (0,03 UI/ml), ao primeiro, e xilanase, com pico de ascendência ao sexto dia (0,07 UI/ml).

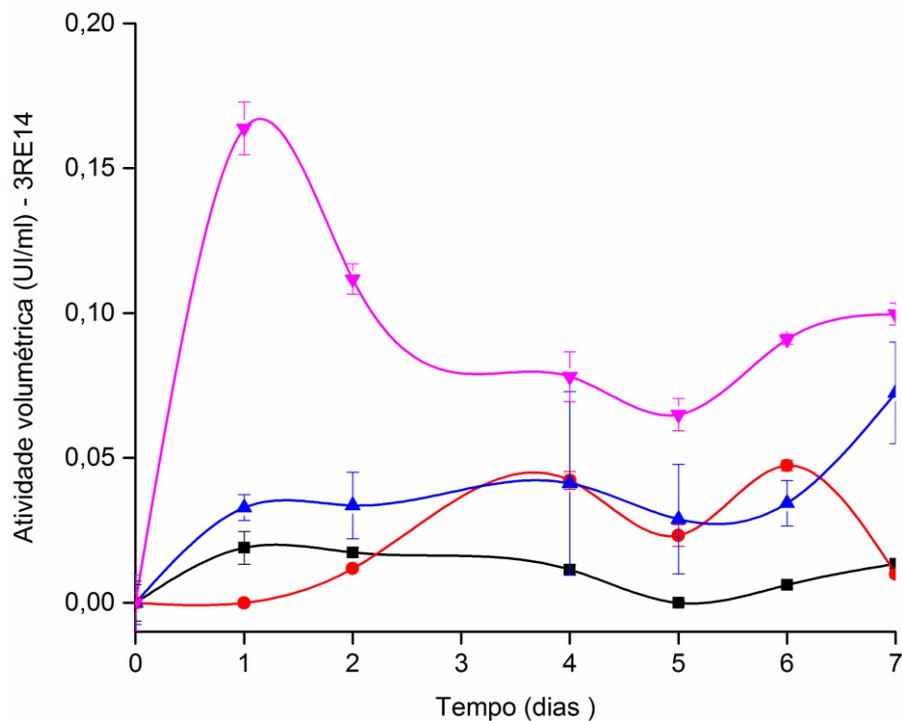


Figura 12: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* 3RE14 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (◄◄) Atividade de CMCCase, (◄◄) atividade de xilanase, (◄) atividade de mananase, (◄) atividade de pectinase.

A cepa 3RE14 (Figura 12) revelou padrão de aumento gradual a partir do segundo dia para xilanase, com pico de atividade nos dias quatro e seis de cultivo (0,04 e 0,05 UI/ml, nessa ordem). A pectinase (0,16 UI/ml) secretada atingiu pico no primeiro dia, com queda e estabilização a partir do quarto dia e novo aumento de atividade no sétimo (0,10 UI/ml). CMCCase e mananase mantiveram atividades estáveis a partir do primeiro dia de cultivo, com leve decréscimo no quinto, e pico no sétimo dia, para mananases (0,07 UI/ml).

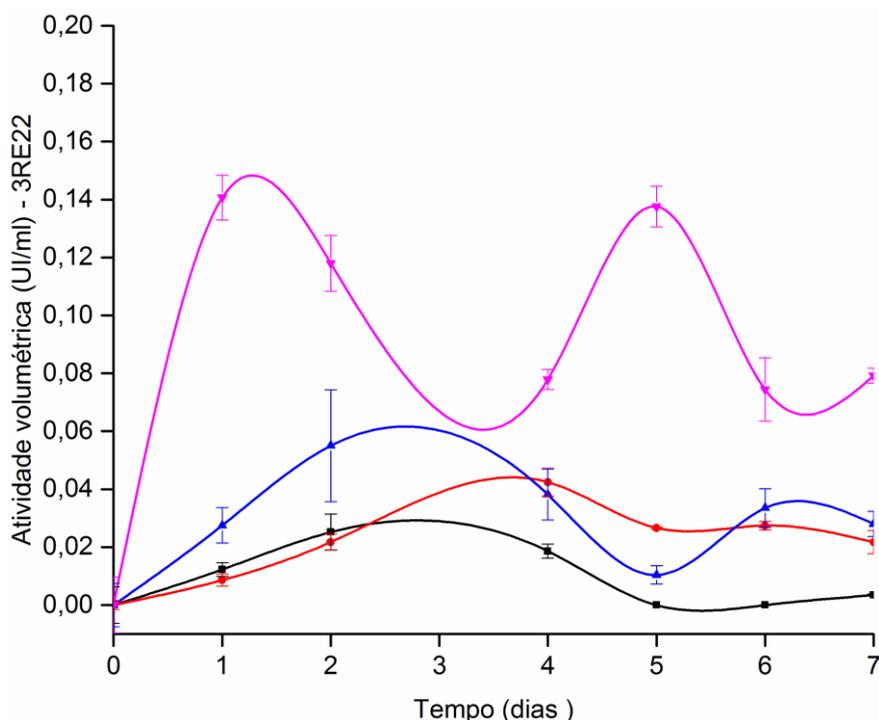


Figura 13: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* 3RE22 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (◄◄) Atividade de CMCCase, (◄◄) atividade de xilanase, (◄) atividade de mananase, (◄) atividade de pectinase.

O padrão de secreção e de picos de atividades estabelecido pela cepa 3RE22 está demonstrado na Figura 13. A biomassa lignocelulósica induziu aumento gradual das atividades de manase, xilanase e CMCCase a partir do primeiro dia, e decréscimo no quinto, alcançando picos de atividade no segundo dia, para mananases (0,05 UI/ml), e no quarto para CMCCase (0,02

UI/ml), que se manteve constante durante o tempo de fermentação. A atividade xilanolítica exibiu ápice de produção no quarto dia (0,04 UI/ml), e a pectinase, nos dias primeiro e quinto, respectivamente (0,14 e 0,13 UI/ml).

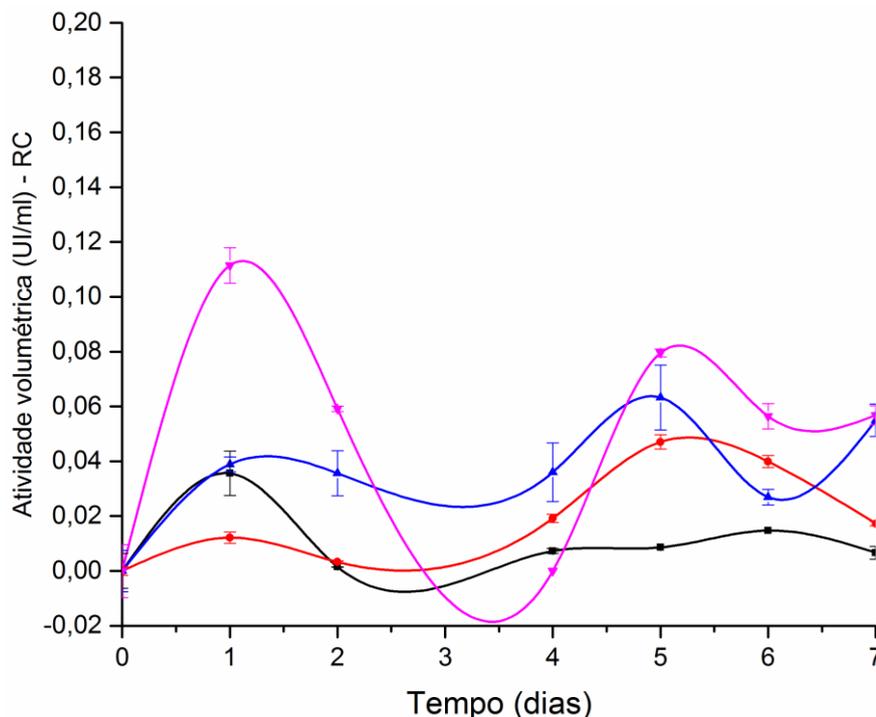


Figura 14: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* RC em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (—) Atividade de CMCCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase.

Os padrões similares de atividade revelados pela indução holocelulolítica da cepa RC são apresentados na Figura 14. Pectinases obtiveram pico de atividade no primeiro dia (0,11 UI/ml), com decréscimo até o quarto dia e recuperação no quinto (0,08 UI/ml). Padrões semelhantes ocorreram com xilanase e mananase, que tiveram aumento sucessivo até atingirem picos de atividade ao quinto dia, 0,05 e 0,06 UI/ml, respectivamente. CMCCase alcançou atividade máxima no primeiro dia (0,04 UI/ml) e, posteriormente, manteve estabilidade durante o processo fermentativo.

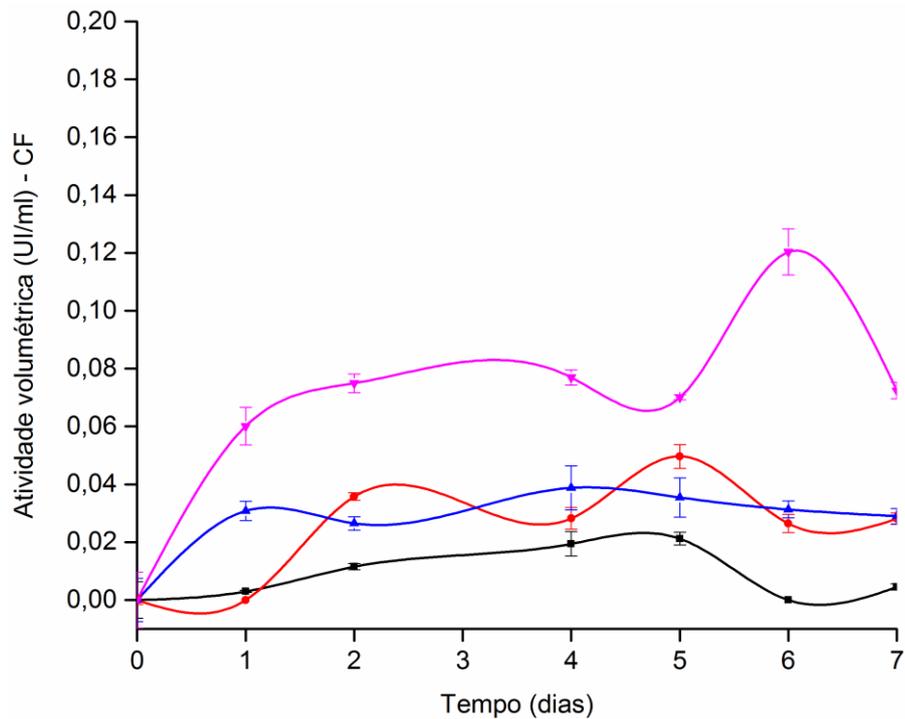


Figura 15: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* CF em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (—) Atividade de CMCCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase

Os padrões de secreção enzimática demonstrados pela cepa CF são mostrados na Figura 15. A atividade de pectinase teve aumento gradual até atingir seu ápice no quarto e sexto dias, 0,06 e 0,12 UI/ml, nessa ordem. O mesmo ocorreu para as atividades de CMCCase e xilanase, onde a atividade enzimática máxima ocorreu no quinto dia (0,02 e 0,05 UI/ml), respectivamente, sendo que, para mananases, o pico indutor aconteceu no quarto dia (0,03 UI/ml).

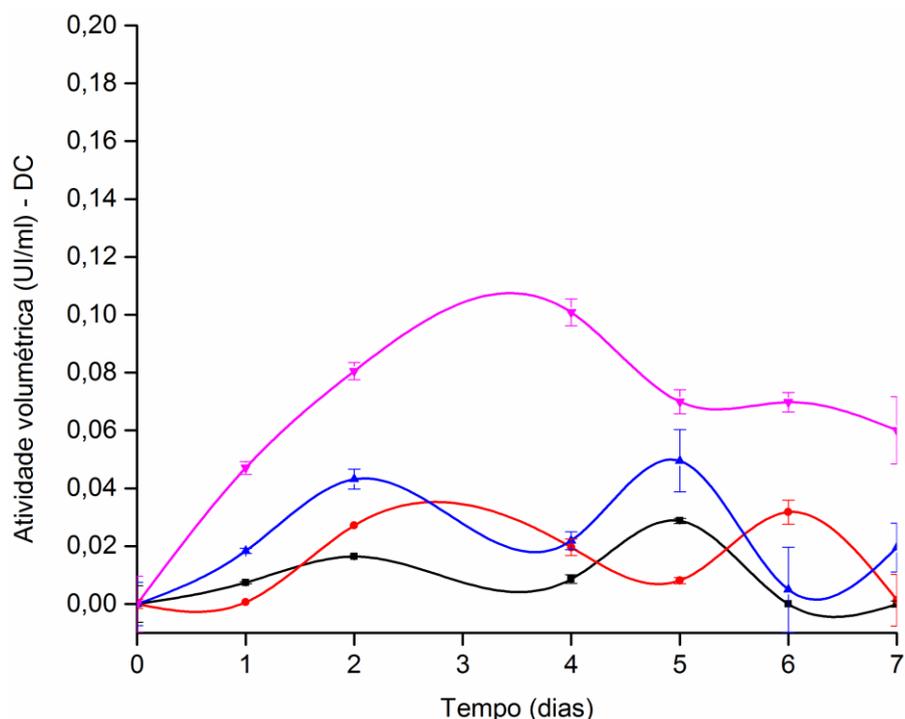


Figura 16: Perfil de indução holocelulolítica de *P. formosus* DC em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café arábica 1% (m/v). (—) Atividade de CMCCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase

Parâmetros semelhantes de secreção de enzimas distintas foram verificados pela cepa DC (Figura 16). Mananase (0,05 UI/ml), CMCCase (0,03 UI/ml) e xilanase (0,03 UI/ml), induzidas por café arábica, obtiveram dois picos de atividades - ao segundo e quinto dias - exceto a xilanase, cujo segundo pico ocorreu no sexto dia. Já as pectinases exibiram atividade máxima ao quarto dia (0,10 UI/ml).

Apesar das diferentes enzimas apresentarem atividades máximas em dias distintos para a mesma cepa, pode-se notar que existe certo padrão de secreção de hemicelulases quanto à degradação da biomassa lignocelulósica, em que o fungo secreta um arsenal único de enzimas para degradar diferentes substratos. Esta resposta biológica ímpar ocorre devido à capacidade de produção de ampla variedade de enzimas e compostos metabólicos pré-programados geneticamente (Cai et al. 2017; Silva e Filho 2017).

Analisando-se os resultados obtidos por meio da análise de variância, foi possível detectar quais os efeitos de cada parâmetro estudado sobre as atividades enzimáticas.

As atividades enzimáticas obtidas durante as curvas de indução dos resíduos de café arábica, em todas as cepas avaliadas, foram consideradas subestimadas. Tal fato ocorreu devido à não implementação de nenhum tipo de pré-tratamento anterior ao período de incubação fúngica e produção enzimática, podendo-se afirmar que não houve quebra/diminuição da recalcitrância do material lignocelulósico utilizado como fonte de carbono para crescimento microbiológico. Este resultado pode ser confirmado após a utilização de pré-tratamento hidrotérmico sobre a mesma biomassa lignocelulósica adiante neste trabalho.

Não obstante a este evento, a biomassa utilizada foi capaz de induzir a secreção heterogênea de holocelulases. As cascas de café arábica demonstraram ser pouco superiores para a indução de pectinase (0,10 UI/ml^a, respectivamente), seguida pela indução de mananase (0,032 UI/ml^c), que, discretamente, apresentou ser um melhor substrato indutor para estas enzimas do que para celulase e xilanase, não havendo diferenças significativas entre elas.

O tempo de secreção das enzimas no meio foi significativo, de forma individualizada para cada cepa em questão; porém, houve conformidade entre todas, para maiores atividades pectinolíticas a partir do quarto dia de cultivo.

Dentre as cepas que obtiveram melhores atividades pectinolíticas, a composição bromatológica da biomassa (resultados mostrados adiante) apresentou influência direta. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Atividades pectinolíticas médias em casca de café arábica

Cepas	Atividades
3RE21	0,10 UI/ml ^{ab}
3RE22	0,09 UI/ml ^{bcd}
3RET13	0,09 UI/ml ^{bcd}
3RE14	0,08 UI/ml ^{bcd}
CF	0,08 UI/ml ^{de}
3DT13	0,08 UI/ml ^{de}
DC	0,07 UI/ml ^{ef}
RC	0,05 UI/ml ^{fg}

*Letras minúsculas laterais indicam comparações das médias realizadas por teste de Tukey.

Comparando-se os resultados obtidos, as cepas determinadas para a continuação deste trabalho foram 3RE21, 3RET13 e 3RE14 por possuírem as maiores atividades em ambos os substratos utilizados (foram testados resíduos de café robusta conjuntamente aos resíduos de café arábica, porém estes dados serão mostrados em anexo). A cepa 3RE22 obteve melhores induções em café robusta, por isso não foi selecionada para prosseguimento do trabalho.

A indução enzimática por casca de café pode ser explicada graças à camada de mucilagem contida no interior do mesocarpo, que apresenta grandes quantidades de pectina no teor de sólidos solúveis, cafeína e acidez, presentes nestes resíduos (Halal 2008).

A ampla utilização de pectinases no processo de fermentação de café é feita durante a etapa de remoção da mucilagem (desmucilagem), na degradação da pectina existente, liberando componentes polifenólicos, como cafeína, taninos e ácidos clorogênicos, responsáveis por notas de sabores adquiridas após o processamento (Zavala-Páramo et al. 2020).

3.2. Identificação das cepas

O sequenciamento das cepas 3RE21, 3RET13 e 3RE14 possibilitou a identificação das sequências nucleotídicas dos fragmentos amplificados das três cepas em ambos os primers (*forward* e *reverse*), facilitando a

comparação das nossas sequências às aquelas depositadas na coleção de sequências de nucleotídeos do GenBank/NCBI (National Center for Biotechnology) por meio da ferramenta Standard Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). A Figura 17 mostra a qualidade das sequências utilizadas para alinhamento e identificação das cepas.

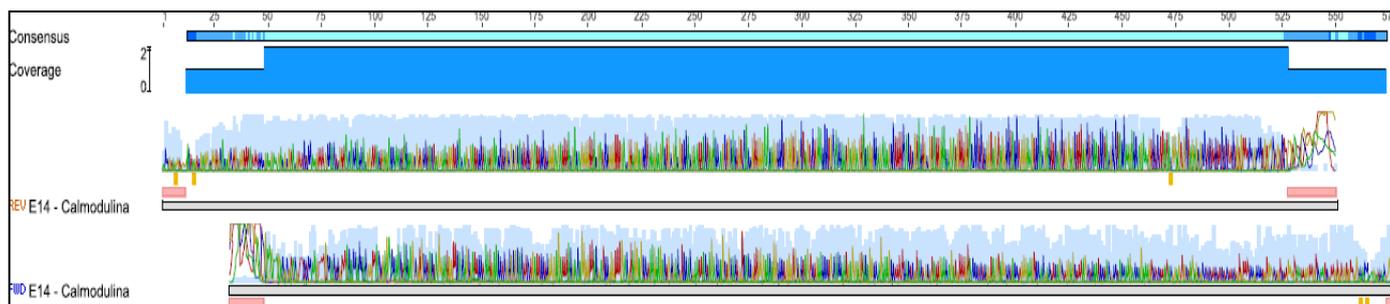


Figura 17: Sequências bidirecionais do gene *cal* da cepa 3RE21

As análises conjuntas e isoladas das sequências amplificadas de cada um dos três genes utilizados indicaram similaridade às sequências da espécie anamorfa *Paecilomyces formosus*, pertencente a um dos nove táxons do gênero *Byssochlamys*. Dentro deste gênero, cinco desses táxons são ditos teleomorfos (*B. fulva*, *B. laguncularidae*, *B. nívea*, *B. zollerniae* e *B. spectabilis* – anamorfo *P. variotii*), enquanto os outros quatro são estritamente anamorfos (*P. saturatus*, *P. brunneolus*, *P. divaricatus* e *P. formosus*) (Samson et al. 2009).

A utilização de três diferentes genes durante a identificação molecular garante a confirmação da espécie. Para este trabalho, utilizamos as sub-regiões *ITS 1* e *4*, sendo que Barker et al (2014) utilizaram as regiões *ITS D1/D2* e *β-tubulina*, encontrando identidade de sequências em 99,6% com *P. variotii*.

A junção das metodologias morfológicas e moleculares, aplicadas à pesquisa literária do microrganismo de interesse, que guiaram a escolha dos genes a serem utilizados na identificação possibilitaram a certificação do fungo *P. formosus*, no qual, por meio destas análises, puderam ser percebidas similaridades moleculares e proteômicas e pequenas diferenças morfológicas entre as cepas. As Figuras 18 e 19 exibem o grau de similaridade entre as

sequências genômicas de *P. formosus* e *P. variotii* demonstradas por diferentes metodologias de identificação encontradas na literatura (que não foram testadas neste estudo).

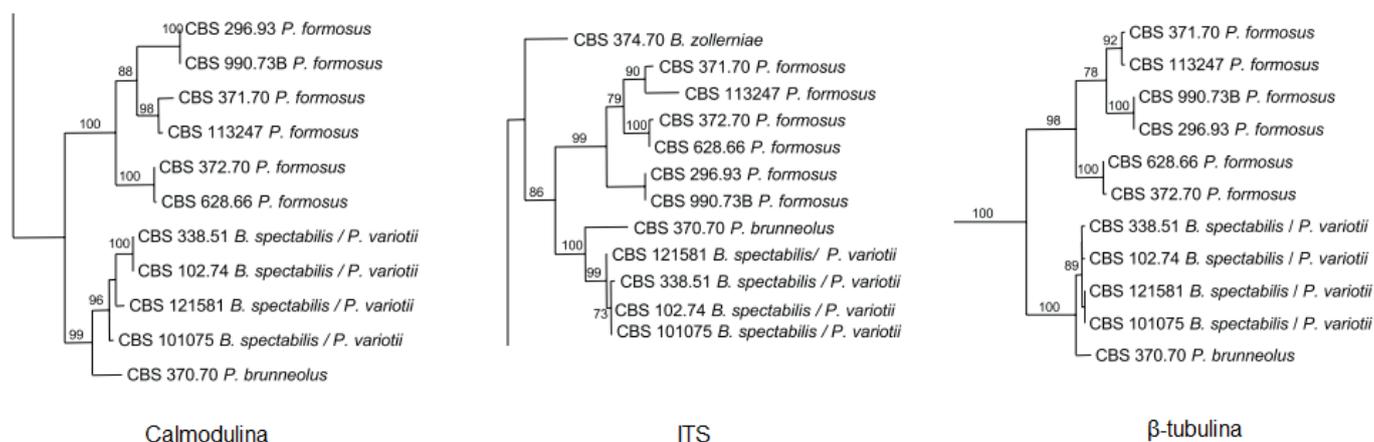


Figura 18 Árvores filogenéticas parciais do gênero *Byssoschlamys*. Relação de parentesco entre *P. formosus* e *P. variotii* (Extraída de Samson, 2009)

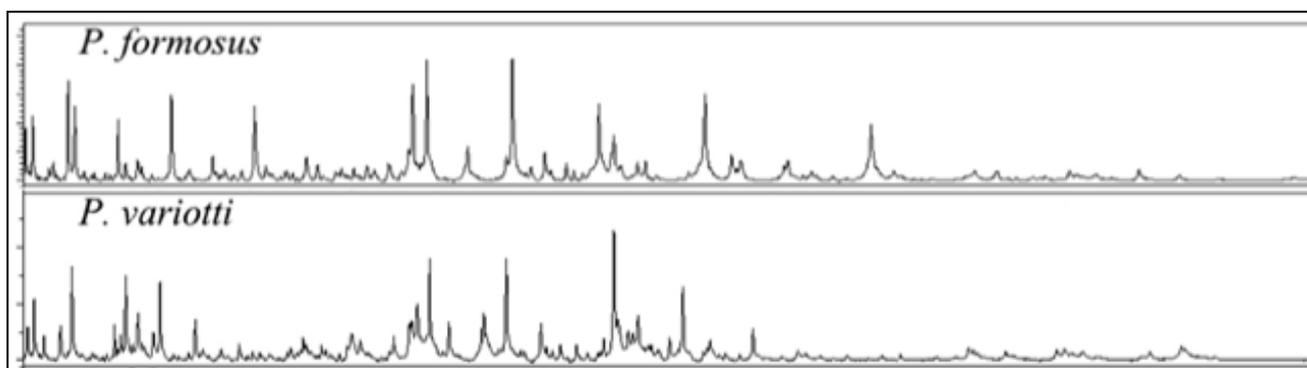


Figura 19: Representação proteômica de isolados de *P. formosus* e *P. variotii* obtidas por MALDI-TOF. (Extraída de Barker, 2014)

3.3. Cultivo de *P. formosus* nos licores

A Tabela 6 mostra o delineamento experimental utilizado com as variáveis independentes não codificadas de cada pré-tratamento e seu respectivo fator de severidade. Os valores dos fatores de severidade variaram entre 1,96 e 5,19.

Tabela 6: Fator de severidade tratamentos

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração (% m/m)	Fator de severidade
1	23	140	1	2.54
2	23	230	1	5.19
3	23	230	5	5.19
4	23	230	5	5.19
5	23	230	5	5.19
6	6	230	5	4.61
7	23	140	5	2.54
8	6	230	1	4.61
9	23	140	5	2.54
10	23	230	1	5.19
11	6	230	5	4.61
12	6	140	5	1.96
13	23	140	1	2.54
14	23	230	1	5.19
15	6	230	5	4.61
16	6	140	5	1.96
17	23	140	1	2.54
18	6	230	1	4.61
19	23	140	5	2.54
20	6	230	1	4.61
21	6	140	5	1.96
22	6	140	1	1.96
23	6	140	1	1.96
24	6	140	1	1.96
25	14.5	185	3	3.66
26	14.5	185	3	3.66
27	14.5	185	3	3.66
28	14.5	185	3	3.66
29	14.5	185	3	3.66

O cálculo do fator de severidade nem sempre é capaz de avaliar a eficiência e prever respostas dos tratamentos. Portanto, variações nos ajustes dos parâmetros da equação podem nos ajudar a correlacionar propostas para melhorar a análise dos dados.

Visando facilitar a ordem dos experimentos, o planejamento estatístico foi subdividido em quatro tratamentos que combinavam as mesmas condições de cultivo (temperatura de cultivo e velocidade de agitação). A Tabela 7 mostra a forma como foram conduzidos estes experimentos, nos quais somente a cepa *P. formosus* 3RE21 foi empregada durante esta análise.

Tabela 7: Subdivisão do planejamento estatístico fatorial

	Temperatura (°C)	Velocidade de agitação (rpm)
Condição A	20	87
Condição B	36	87
Condição C	36	154
Condição D	20	154
Ponto Central	28	120

Quando inoculado nos experimentos da condição A, *P. formosus* cresceu em todos os licores. O crescimento e o desenvolvimento deste fungo em meios líquidos ocorrem em forma de grumos de micélio médios ou grandes, únicos ou não. Este fato é observado devido às baixas rotações em que os meios de cultura foram acondicionados.

Os resultados das induções enzimáticas são apresentados na Figura 20. Verifica-se maior atividade enzimática no experimento 24 para todas as enzimas CMCase (a), xilanase (b), mananase (c) e pectinase (d), ao passo que os outros ensaios tiveram atividades menores, exceto para mananase (c) no segundo dia de cultivo. Já as concentrações proteicas (e) variaram durante o período de incubação, dependendo do experimento realizado.

O fator de severidade do pré-tratamento utilizado para cada um dos experimentos influenciou de forma sistemática nas atividades enzimáticas produzidas durante o período de incubação. Os ensaios 3, 4 e 5 obtiveram o

maior fator de severidade ($\log R_0$ 5,19) dentre todos os experimentos da condição, enquanto o ensaio 24, o menor ($\log R_0$ 1,96).

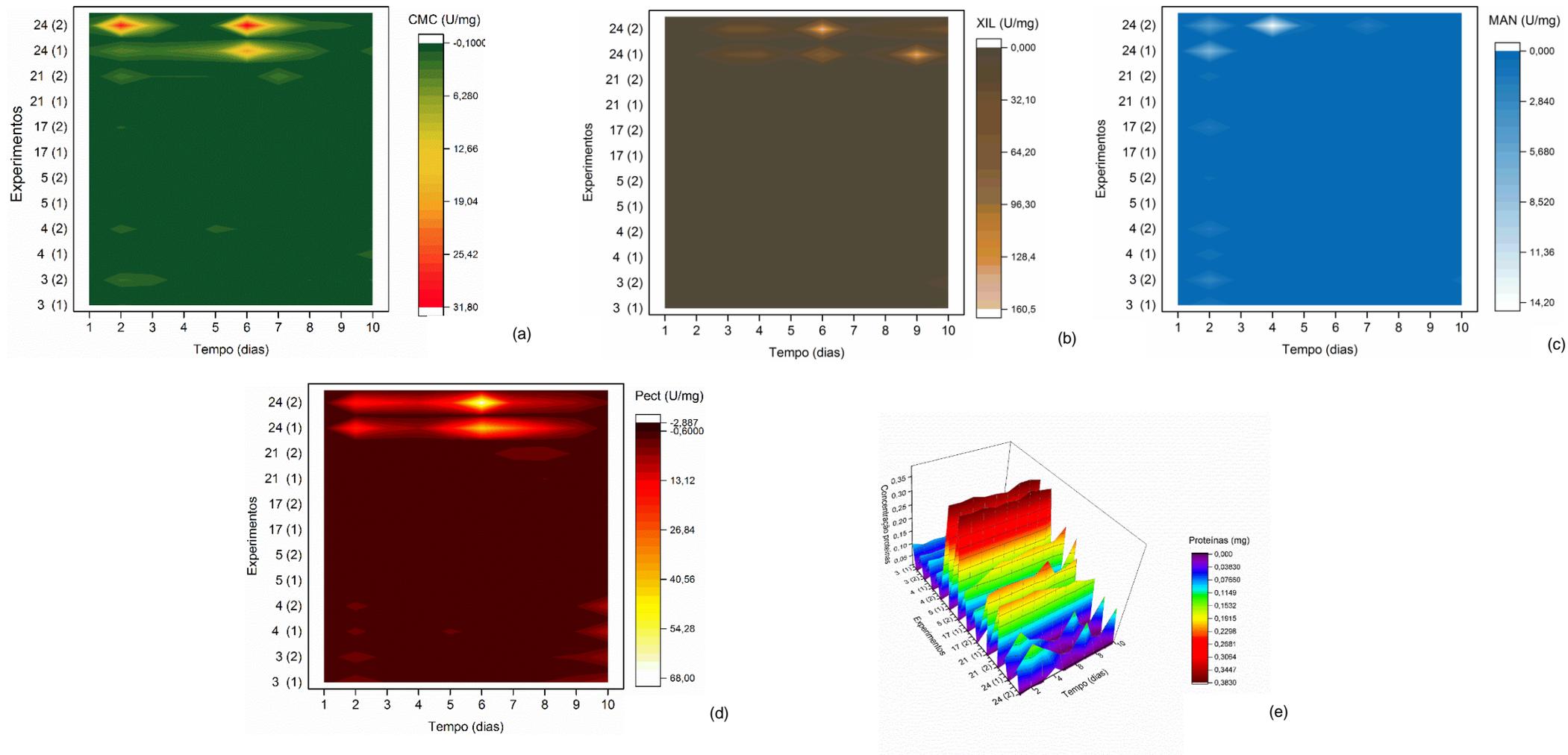


Figura 20: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo A. (a) CMCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica.

Na Figura 21, estão os perfis enzimáticos obtidos na condição B. Os licores utilizados para estes cultivos possuem fatores de severidade variados, em sua maioria ($\log R_0$ 1,96 a 5,19), influenciando individualmente cada atividade enzimática. Porém, uma maior indução enzimática para todas as enzimas analisadas pôde ser evidenciada entre o segundo e quinto dias de cultivo, podendo ser explicada pela adaptação do microrganismo em questão a altas temperaturas, lembrando-se da termotolerância já descrita para *P. formosus*.

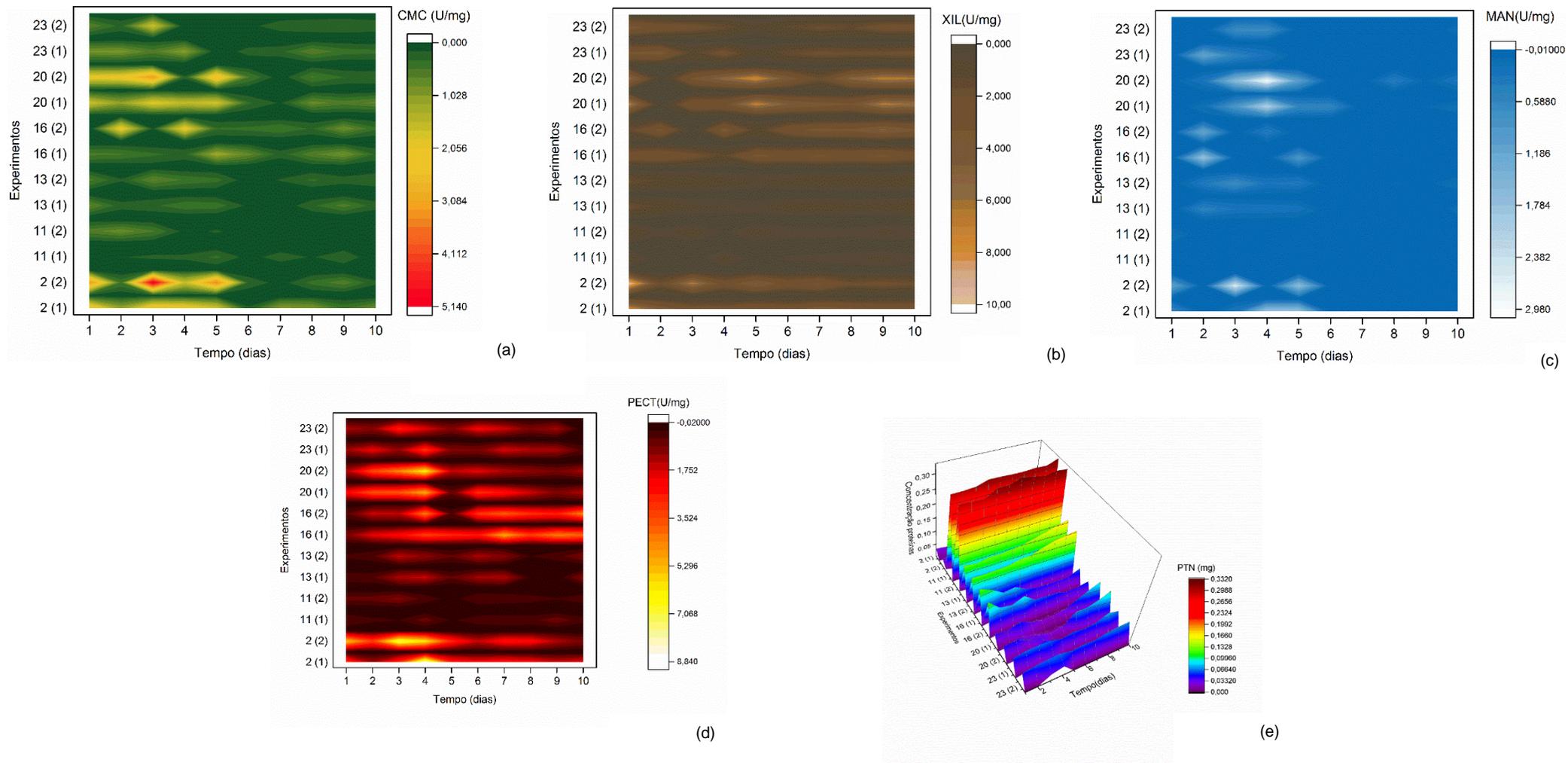


Figura 21: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo B. (a) CMCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.

Os perfis enzimáticos, obtidos na condição C, podem ser visualizados na Figura 22.

A combinação de alguns fatores, como a interação entre maior temperatura de incubação e alta agitação, além da composição dos licores, neste tratamento, teve reflexos sobre as atividades enzimáticas obtidas dentro de cada licor utilizado como meio de cultura. Verificou-se que o fator de severidade foi considerado mediano, em sua maioria ($\log R_o$ 2,54 – ensaios 7, 9 e 19).

Um mesmo padrão de indução foi obtido entre CMCases [Fig. 22 (a)], xilanases [Fig. 22 (b)] e mananases [Fig. 22 (c)], com altos níveis de secreção enzimática no segundo, quarto e nono dias de cultivo, sendo que pectinases (Fig. 22 (d)) alcançaram picos ativos no quarto dia.

Pôde-se observar quando a temperatura de cultivo foi maior em ambas as condições (B e C), maiores níveis de atividades enzimáticas entre o segundo e quinto dias foram obtidas. Além disso, uma maior agitação (154 rpm) ao final do cultivo propiciou novo pico de atividade, devido à restauração dos níveis de oxigenação ao meio de cultura.

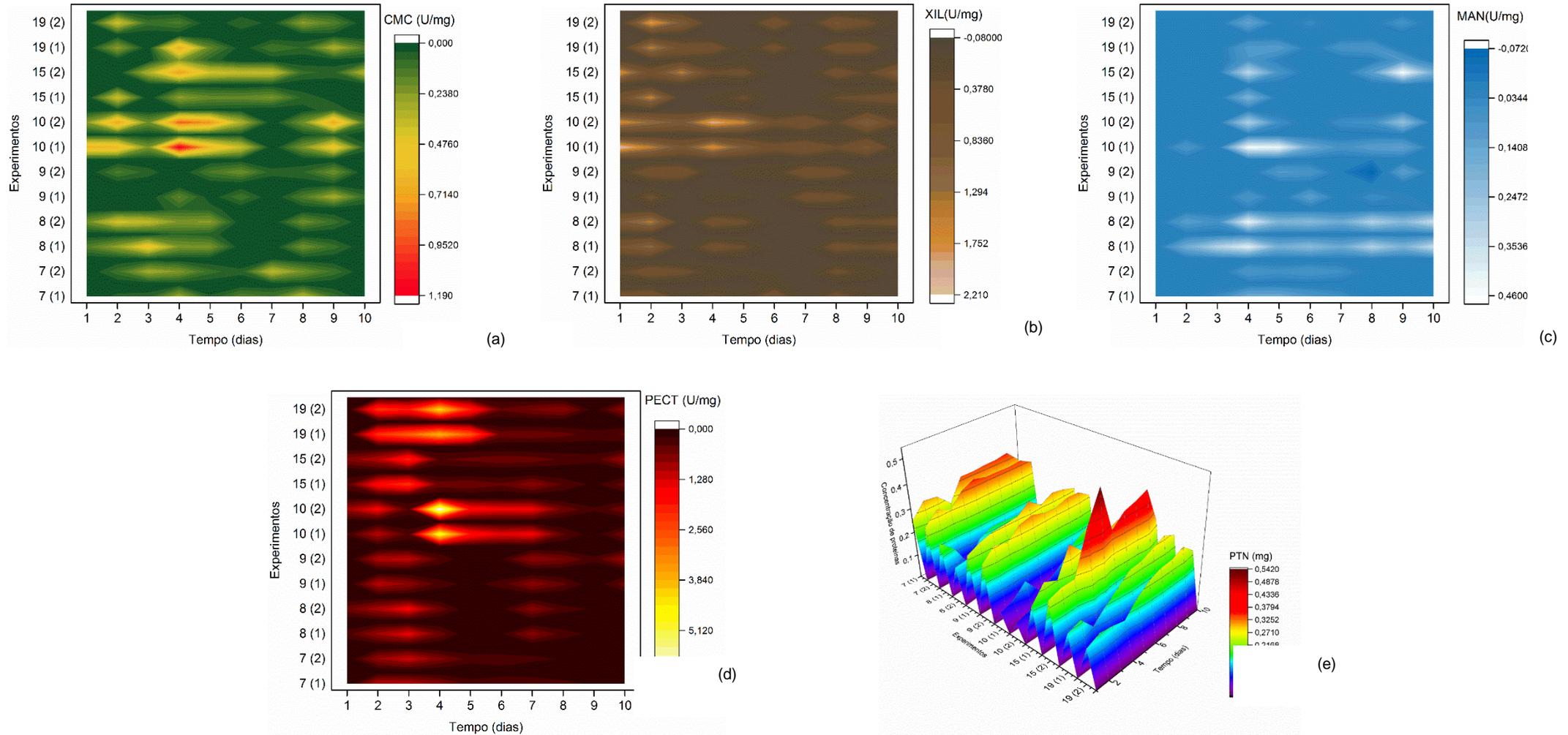


Figura 22: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo C. (a) CMCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.

Na Figura 23, podem ser visualizados os perfis enzimáticos atingidos na condição D.

As atividades enzimáticas obtidas pela maioria dos licores variaram durante os dias de cultivo, pois, para xilanases [Fig. 23 (b)] e mananases [Fig. 23 (c)], altos níveis de secreção foram alcançados no primeiro dia, e, para CMCases [Fig. 23 (a)], a indução enzimática ocorreu em dias variados.

Estes resultados corroboram aqueles obtidos no tratamento A (também crescido em temperatura de 20 °C), nos quais a ampla variação do fator de severidade dos licores interferiu na indução pectinolítica. Os licores 1, 12 e 22 exibiram os menores fatores de severidade dentro do tratamento ($\log R_0$ 2,54, 1,96 e 1,96), induzindo, conseqüentemente, maior atividade pectinolítica em dias alternados. Já os demais licores apresentaram fatores de severidade altos ($\log R_0$ 4,61 e 5,19), dificultando a indução de pectinases.

Embora a agitação tenha sido alta, a atividade catalítica das enzimas analisadas sofreu pouca interferência quanto à aeração dos meios indutores.

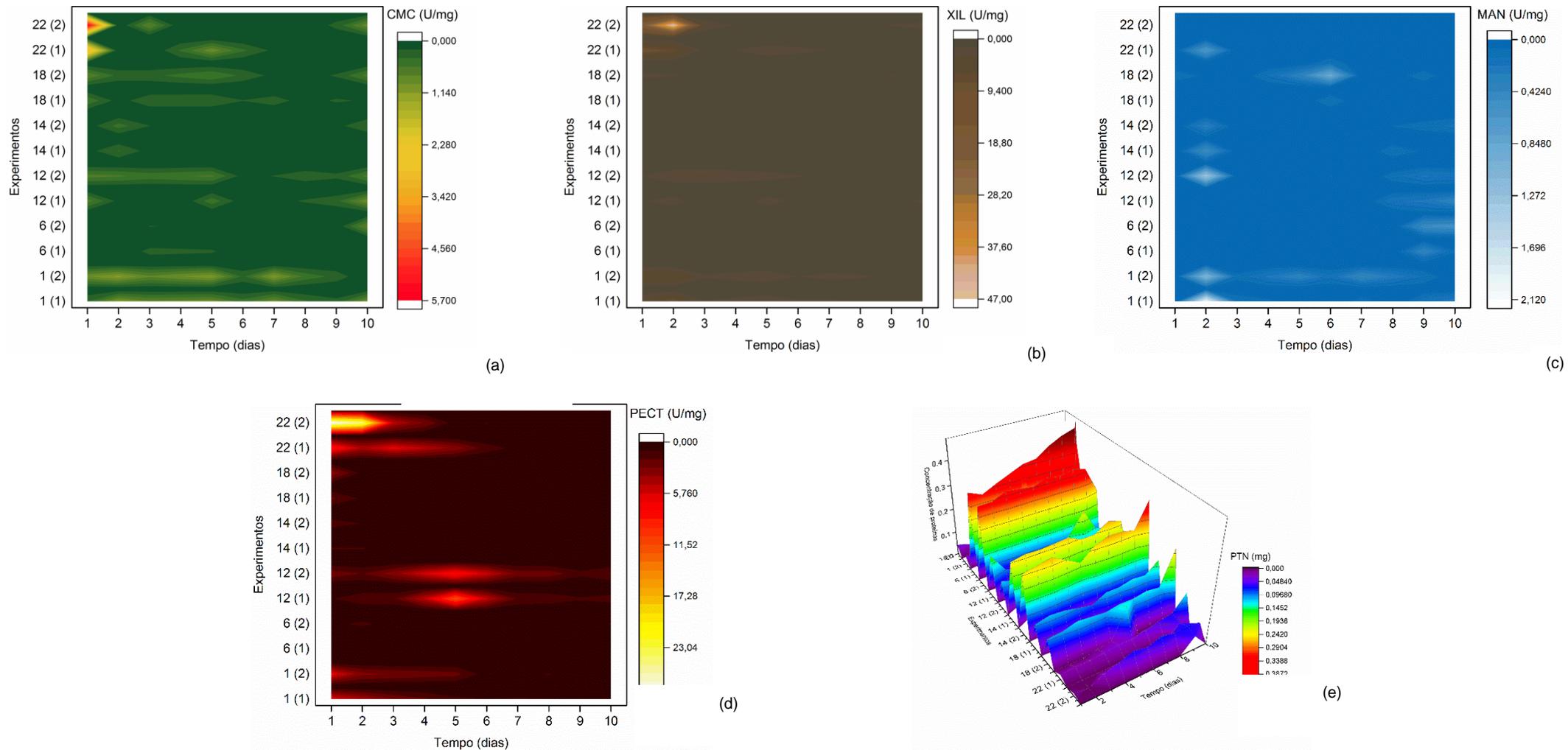


Figura 23: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo D. (a) CMCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.

A Figura 24 mostra os perfis enzimáticos obtidos a partir da fermentação do ponto central.

O ponto central foi planejado experimentalmente para abrigar as condições neutras das variáveis independentes, tanto de pré-tratamento quanto de cultivo. As atividades enzimáticas deste cultivo demonstraram ser um misto do perfil enzimático dos outros tratamentos submetidos anteriormente - com CMCases [Fig. 24 (a)] e mananases [Fig. 24 (c)] sendo secretadas no final do cultivo, e pectinases [Fig. 24 (d)] e xilanases [Fig. 24 (b)], no início. Verificou-se que a atividade pectinolítica permaneceu constante durante todos os dias de incubação.

O nível de oxigenação gerado pela agitação de 120 rpm demonstrou suprir a necessidade do microrganismo, possibilitando o aumento da secreção das enzimas analisadas a partir do sétimo dia de cultivo.

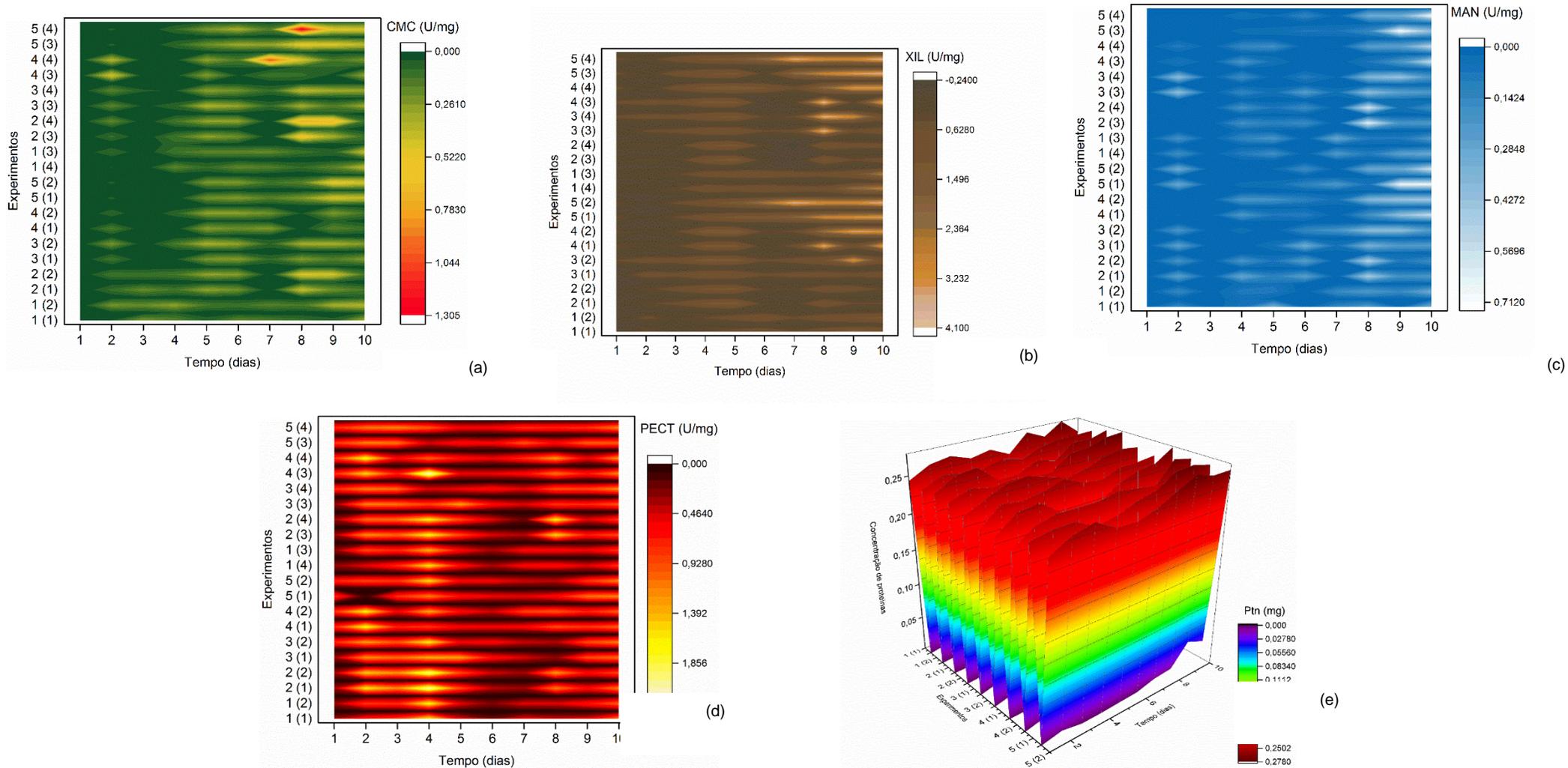


Figura 24: Mapas de calor demonstrando os perfis enzimáticos dos experimentos contidos nas condições de cultivo ponto central. (a) CMCCase (b) xilanase (c) mananase (d) pectinase (e) concentração proteica total.

Os padrões de atividade para cada uma das enzimas analisadas, produzidas a partir dos licores utilizados como meio indutor, em função do tempo de incubação e enriquecimento destes, evidenciam quais fatores do pré-tratamento e cultivo exerceram influência significativa sobre as atividades enzimáticas. Estas interferências serão discutidas no item a seguir.

3.4. Análise da superfície de resposta

O intuito de se realizar o design do planejamento experimental, incluindo, em conjunto, as variáveis independentes do pré-tratamento e do cultivo, foi avaliar quais delas exercem maior influência sobre a atividade pectinolítica de *P. formosus*.

Os efeitos de cada variável do processo sobre a atividade enzimática, em cada dia de incubação, foram calculados por meio da metodologia da superfície de resposta.

Na Tabela 8, estão os efeitos das variáveis do pré-tratamento e cultivo, bem como suas interações diárias sobre a secreção de pectinase, dentro do cultivo realizado.

Tabela 8: Efeitos das variáveis independentes dos pré-tratamentos e cultivos e suas interações sobre a atividade pectinolítica em função dos dias de cultivo.

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10
Tempo de PT	-1.38	-2.33*	-1.48*	-0.92	-1.90*	-5.31*	-2.05*	-1.33*	-0.68*	0.93*
Temperatura do PT	-1.41	-2.56*	-1.36*	-0.98	-2.37*	-5.05*	-2.05*	-1.28*	-0.50	0.80*
Concentração de Biomassa	-2.87*	-2.64*	-1.79*	-1.82*	-1.06	-4.61	-1.60	-0.60	0.03	1.59*
Concentração de Nitrogênio	0.54	-0.70	-0.91	-0.16	-0.81	-4.03	-1.46	-1.11*	-0.51	0.47
pH	-2.35*	-3.97*	-2.51*	-3.33*	-3.31*	-5.75*	-2.46*	-1.59*	-1.21*	-1.70*
Velocidade de agitação	1.86	-0.60	-0.69	-0.74	-0.76	-4.85	-2.46*	-1.65*	-1.47*	-1.90*
Temperatura do cultivo	-1.85	-2.75*	-0.28	0.66	-2.03*	-4.51	-1.04	-0.94*	-0.46	-1.07*

(i) Nível de significância aplicado com p valor $< 0,05$. (ii) valores demarcados com (*) apresentam diferença estatística significativa.

Com base nos efeitos calculados e na experimentação prática, algumas considerações podem ser inferidas.

No que tange às variáveis dos pré-tratamentos, o tempo de incubação e a temperatura à qual a biomassa é exposta estão intimamente relacionados, de forma que, quanto menor eles forem, maiores atividades enzimáticas serão obtidas. Estes elementos são utilizados para o cálculo do fator de severidade de cada licor gerado.

Como já se sabe, altos fatores de severidade implicam em maior geração de compostos inibitórios ao crescimento microbiano (Hendriks e Zeeman 2009), sendo o pré-tratamento LHW capaz de solubilizar mais de 80% da hemicelulose presente na parede celular de biomassas lignocelulósicas, principalmente na forma de oligômeros. Em temperaturas acima de 180 °C, ocorre, também, solubilização da lignina e seus compostos de formação; dentre eles, o furfural, o ácido glucurônico e o ácido acético são formados a partir da degradação de grupos O-acetilados de cadeias ramificadas da hemicelulose (Yu et al. 2015).

A concentração de biomassa utilizada em cada pré-tratamento influencia diretamente a concentração de açúcares redutores presentes nos licores. Pequenas porções de biomassas pré-tratadas disponibilizam maiores concentrações destes açúcares conforme o aumento da temperatura e o tempo que ficam incubadas. Porém, altas temperaturas e tempos promovem a degradação destes (Behera et al. 2014).

Com relação ao binômio tempo x temperatura de pré-tratamento, a atividade pectinolítica de *P. formosus* sobre o licor gerado a partir de baixas concentrações de resíduos de café (1% e 3%) foi aumentada durante os quatro primeiros dias de cultivo, não havendo interferências da quantidade de biomassa utilizada para geração do licor a partir do quinto dia. Dessa forma, supõe-se que a alta capacidade de resistência metabólica desta espécie seja responsável pela adaptação ao ambiente hostil. Silva e Filho (2017) encontraram o mesmo padrão quando identificaram maior atividade de xilanase, proveniente de *A. niger* crescido em licores oriundos de pré-tratamento hidrotérmico em bagaço de cana 1%, em relação ao mesmo licor obtido nas mesmas condições de tempo e temperatura de exposição (30 minutos a 170°C), porém com concentração de 11% da referida biomassa.

É importante ressaltar que menores quantidades de biomassas pré-tratadas, além de renderem maiores concentrações de açúcares redutores, também facilitam a recuperação do licor obtido ao final do processo. Tais características abrem espaço para seu emprego em larga escala, uma vez que a baixa severidade destes tratamentos amplia o leque de utilização destes licores industrialmente.

No que diz respeito aos efeitos das variáveis independentes dos cultivos, somente o pH inicial do meio exerceu influência direta sobre a atividade enzimática durante todo o processo de incubação, no qual *P. formosus* obteve maiores secreções pectinolíticas nos tratamentos com licores de pHs mais ácidos.

As reações que ocorrem durante o LHW propiciam a acidificação do meio aquoso utilizado. Sob altas temperaturas, o pH e o pKa da água são alterados, e esta passa a atuar como um ácido fraco por meio da liberação de íons hidrônio (H_3O^+) resultantes de sua autoionização. Isso porque, nos primeiros momentos, essa modificação química é o principal fator que leva à despolimerização da hemicelulose, devido à quebra de suas ligações glicosídicas. Além disso, grupos acetil e outros substituintes laterais da hemicelulose, como o ácido glucurônico e ácido O-metilglucurônico, oriundos da xilana, bem como o ácido galacturônico, advindo da hidrólise de substratos pectícos, são liberados para o meio aquoso, constituindo uma fonte local de ácidos orgânicos que contribuem para a acidificação do meio (Li and Zheng 2017).

O efeito da interação entre pH e temperatura altera a estabilidade de pectinases, uma vez que estas enzimas são pH dependentes (Kohli e Gupta 2015a). Pectinases alcalinas são, geralmente, produzidas por bactérias, enquanto pectinases ácidas são geradas por fungos filamentosos e leveduras (Gummadi e Panda 2003).

A suplementação de nitrogênio por meio de uma fonte orgânica deste composto não gerou qualquer intervenção sobre as atividades enzimáticas de *P. formosus*, contrariando resultados encontrados por Giraldo et al. (2012) e Minussi et al. (1997), nos quais a adição de 1% de peptona e 1% de extrato de levedura, respectivamente, aumentou a secreção enzimática de *P. variotii* e *P. griseoroseum*.

A não necessidade de suplementação ao meio pode ser interpretada como excesso de disponibilidade de nitrogênio, uma vez que a solubilização deste por meio do LHW pode suprir as carências metabólicas do fungo. Battestin e Macedo (2007) verificaram que fontes complexas de nitrogênio inibiram a produção enzimática de *P. variotii* e causaram decréscimo da atividade de tanase em seus experimentos. Em contrapartida, o uso de fontes inorgânicas estimulou a síntese de proteínas e a rápida utilização de nitrogênio. Tais resultados sugerem que há exigência de baixas concentrações de nitrogênio para produção enzimática, podendo este ser um fator limitante na secreção proteica.

A variação da velocidade de agitação e do consequente nível de oxigenação gerado por ela obteve efeitos mais significativos sobre o rendimento enzimático somente a partir do sétimo dia de cultivo de *P. formosus*, no qual a demanda de oxigênio ao final do cultivo é pronunciada.

Embora *P. formosus* seja amplamente identificado como microrganismo termotolerante, os resultados alcançados durante este trabalho demonstraram que temperaturas mais brandas levaram a uma menor secreção proteica e maior atividade enzimática (Figura 17), podendo sugerir uma economia metabólica.

A combinação dos efeitos de ambas as variáveis do pré-tratamento e cultivo é mostrada na Figura 25.

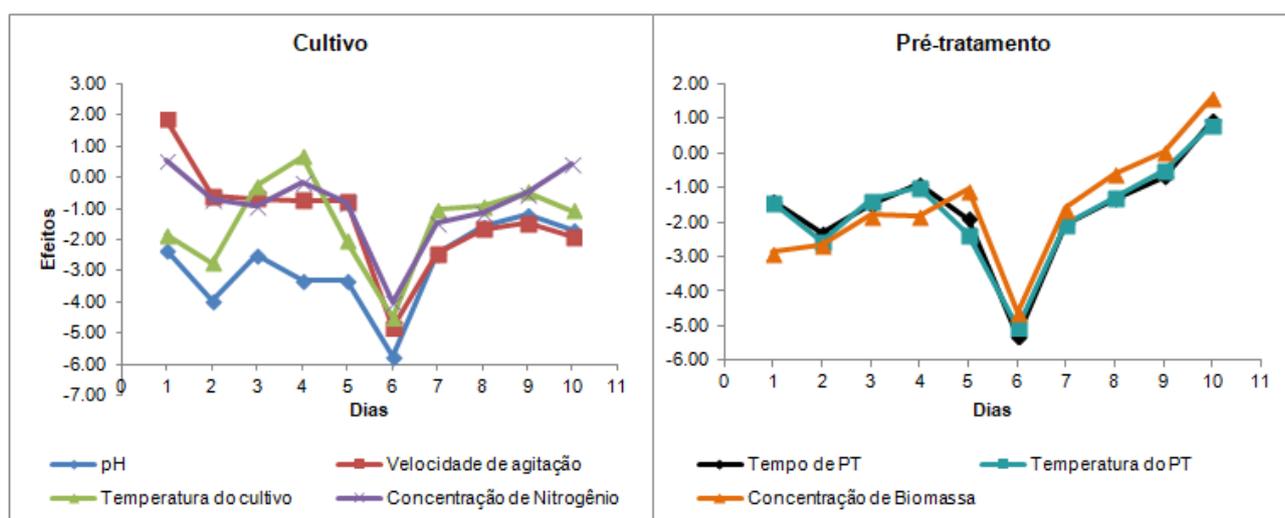


Figura 25: Efeito conjunto das variáveis analisadas no cultivo e pré-tratamentos ao longo dos dias de incubação

Analisando-se os resultados, observamos que todas as variáveis seguem aproximadamente o mesmo padrão, com efeitos ascendentes durante o tempo de incubação. Vale ressaltar que as respostas obtidas nestes efeitos são correlacionadas a todos os tratamentos, realizados em tempos espaciais diferentes.

O diagrama de Pareto, apresentado na Figura 26, mostra graficamente a magnitude dos efeitos das variáveis sobre o sexto dia de incubação.

Um decréscimo acentuado em todos os efeitos conjuntos é observado no sexto dia de inóculo, tornando-o mais negativo. Essa disposição significa que, quanto maior forem os valores para as variáveis estudadas, em maior grau a resposta é influenciada na redução de seu valor. No caso observado do sexto dia, os valores mais negativos para os efeitos, interrompendo a tendência de crescimento de efeito do primeiro ao quinto dia, levam a supor que valores menores para as variáveis (experimento 24 da Tabela 3 - temperatura de pré-tratamento de 140°C, tempo de exposição de 6 minutos, 1% de biomassa, pH 4,0, 20°C, 87 rpm e sem adição de nitrogênio) ocasionam atividades específicas maiores.

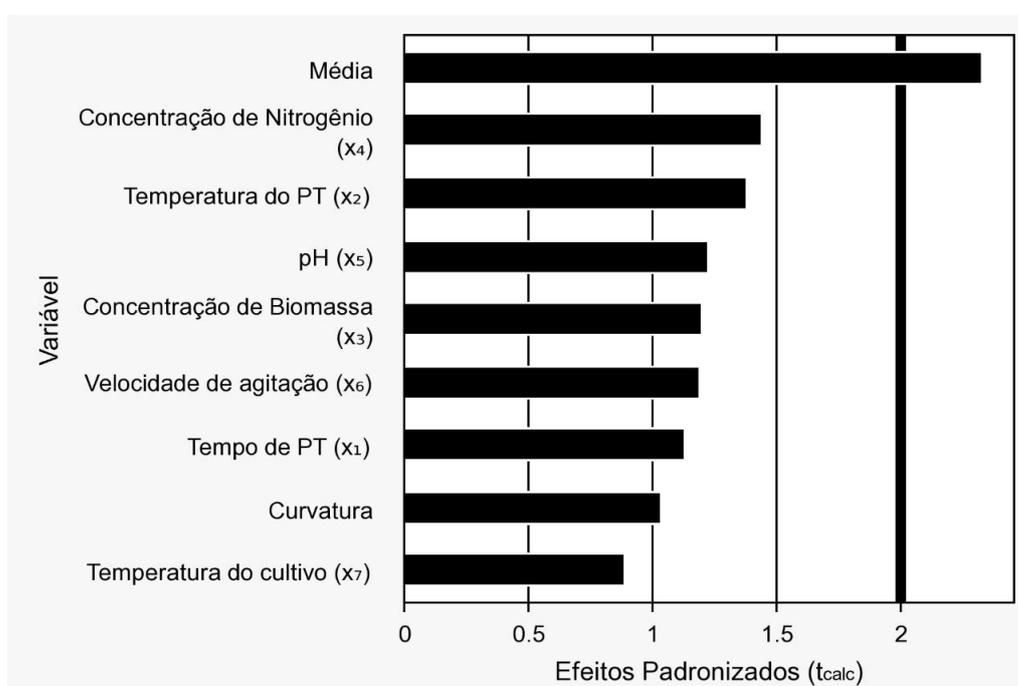


Figura 26 Diagrama de Pareto referente aos efeitos das variáveis sobre a atividade de pectinases ao sexto dia de cultivo.

3.5. Composição bromatológica dos licores e biomassas

A água residual do processamento de café, os licores e a fração sólida de biomassa, obtidos a partir da combinação das variáveis referentes aos diversos pré-tratamentos, foram caracterizados quanto à composição dos açúcares.

Na Tabela 9, encontram-se a codificação utilizada para cada licor e a biomassa resultante deles, além da descrição dos fatores por meio dos quais foram gerados.

Tabela 9: Licores e biomassas submetidos a análise composicional de açúcares

Código	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração de biomassa (% m/m)	Fator de severidade (logR _o)
PC	14,5	185	3	3,56
1	23	230	1	5,19
2	6	230	1	4,61
3	23	140	5	2,54
4	23	230	5	5,19
5	6	140	1	1,96
6	6	230	5	4,61
7	6	140	5	1,96
8	23	140	1	2,54
Água	Água residual (sem pré-tratamento)			-

PC: ponto central

A Figura 27 mostra a concentração de açúcares presentes nos licores obtidos após os pré-tratamentos.

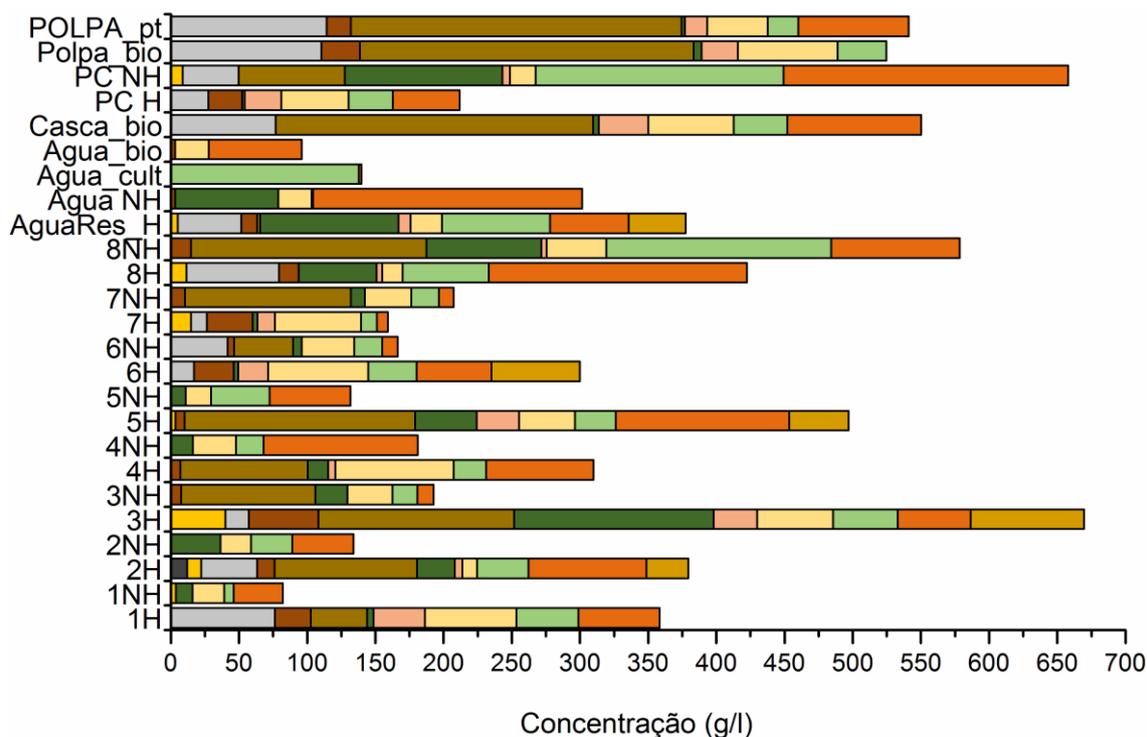


Figura 27: Concentração de açúcares nos licores e biomassas hidrolisados (H), não hidrolisados (NH), (bio) biomassa não cultivada e não tratada (cult) resíduo pós-cultivo. (■) Ácido galacturônico (■) Celobiose (■) Frutose (■) Manose (■) Xilose (■) Glicose (■) Sacarose (■) Galactose (■) Ramnose (■) Arabinose (■) Fucose.

A composição química dos resíduos de café pode variar em diversos aspectos, como no genótipo, altitude, variedade da cultura analisada, condições de cultivo, estágio de desenvolvimento dos grãos no momento da colheita, dentre outros. Em cafés verdes, os carboidratos representam cerca de 40 - 50% de sua composição química, consistindo em ambas frações solúveis e insolúveis (Bonilla-Hermosa et al. 2014). A partir da análise dos dados apresentados, verifica-se que, embora o mesmo resíduo (casca de café tradicional) tenha sido utilizado, as diferentes condições dos pré-tratamentos foram capazes de solubilizar variados açúcares. É importante atentar-se ao fato de que a hidrólise ácida dos licores obtidos pós-tratamento mostra uma variedade de composição ainda maior quando relacionada aos mesmos licores não hidrolisados.

As formas oligoméricas de carboidratos foram encontradas principalmente nos licores não hidrolisados, como esperado para pré-tratamentos hidrotérmicos. A presença de celobiose pode ser justificada devido à moagem prévia ao pré-tratamento hidrotérmico e à quebra das fibras de celulose durante este. No caso da sacarose, sua concentração varia

conforme o grau de amadurecimento dos grãos, podendo atingir até 12% (peso seco) em café arábica e 5% em café robusta (Bee et al. 2005). A sacarose possui papel fundamental no desenvolvimento de propriedades organolépticas (flavors, aromas e cores) durante a torrefação dos grãos e elaboração das bebidas, uma vez que as melanoidinas são formadas por meio da incorporação de compostos fenólicos, sacarose e aminoácidos durante a reação de Maillard (Mussatto et al. 2011b; Esquivel e Jiménez 2012; Regazzoni et al. 2016).

Manose, frutose, glicose, galactose, ramnose e xilose compreendem os monossacarídeos mais frequentemente encontrados na composição dos licores, seguidos por arabinose, ácido galacturônico e fucose. A identificação de ácido galacturônico pode ter sido subestimada devido à utilização de coluna detectora de monômeros (CarboPac PA1), pois, em suas especificações, o fabricante indica a utilização das colunas aniônicas CarboPac PA20 e/ou CarboPac PA200 para uma melhor determinação de açúcares provenientes da lignocelulose e ácidos urônicos (Basumallick e Rohrer 2015).

Durante o desenvolvimento e a maturação dos grãos de café, a parede celular sofre progressivas mudanças fisiológicas na constituição dos polissacarídeos e das características estruturais. Estudos recentes apontam que a fração solúvel da parede celular é composta por sacarose e polímeros não celulósicos de galactomananas e arabinogalactanas, enquanto sua fração insolúvel inclui compostos celulósicos e pequenas quantias de hemicelulósicos (Fischer et al. 2001; Bee et al. 2005; Redgwell e Fischer 2006). Fischer e colaboradores (2001) estudaram a composição polissacarídica de grãos de café arábica e robusta, sendo que, em seus resultados, os monossacarídeos mais abundantes foram manose, galactose, glicose e arabinose, sugerindo que a espécie arábica teve conteúdo levemente maior de manose (48%) que a robusta (45%), indicando alta solubilidade destes polissacarídeos e de suas cadeias laterais.

Os conteúdos de glicose e frutose são variáveis durante os estágios de maturação dos grãos de café, estando em maior concentração quando estes estão verdes, associados ao perisperma, sendo que os teores de frutose representam metade dos de glicose. Ao final do amadurecimento, as

concentrações de glicose e frutose diminuem, ao passo que há elevação dos níveis de sacarose associada ao endosperma dos grãos (Rogers et al. 1999). Knopp et al. (2006) sugerem que os níveis de glicose e frutose são diretamente afetados pelo método de beneficiamento pós-colheita ao qual os grãos são submetidos. Segundo os autores, cafés tratados por via seca apresentam maior conteúdo das referidas hexoses, enquanto os grãos tratados por via úmida contêm menores frações destas. Porém, os resultados apresentados neste trabalho não corroboram estas afirmativas, contrapostas pelas quantificações dos resíduos casca_bio e polpa_bio, exibidas na Figura 19, que compreendem as respectivas biomassas sem pré-tratamento, ambas com baixas quantidades de glicose e frutose em sua composição.

A eficiência dos pré-tratamentos foi comprovada, devido à presença de grandes quantidades de oligossacarídeos de íntima associação da parede celular disponíveis nos licores. As condições variáveis presentes em cada pré-tratamento possibilitaram não somente a ampla solubilização de carboidratos em quantidades variadas dos licores, mas também em sua qualidade, uma vez que os açúcares se apresentam de forma alterada na composição destes. Estes resultados demonstram potenciais biotecnológicos promissores, dependendo dos oligossacarídeos de interesse no processo de conversão da biomassa em produto.

Em modelos de biorrefinarias, monossacarídeos possuem alto valor agregado. Xilose e arabinose podem ser convertidas em xilitol (Hernández-Pérez et al. 2016) ou arabitol (Kumdam et al. 2014), furfural (Agirrezabal-Telleria et al. 2011) e etanol (Dasgupta et al. 2017). A glicose e outras hexoses participam da síntese de ácido levulínico por meio da produção do intermediário hidroximetilfurfural gerado durante os pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas (Chang et al. 2007; Schmidt et al. 2017). Já manose e galactose têm grande utilidade em indústrias alimentícias e farmacêuticas, na fabricação de gomas e espessantes (Panegassi et al. 2000), produção de manitol (Mussatto et al. 2011a) e como aditivo na produção de rações animais (Scapinello et al. 2008). Sobre o ácido galacturônico e a ramnose, são empregados na composição de

biosurfactantes e tensoativos (Barros et al. 2007) e no tratamento de efluentes industriais (Martins e Bueno 2019), dentre outros.

A fração sólida residual dos pré-tratamentos contendo as biomassas teve composição química avaliada depois de cada tratamento. Os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Composição química da fração sólida de biomassas resultantes dos pré-tratamentos com água quente líquida. Todos os valores representam percentuais (%)

Pré-tratamento	Cinzas	AIS	ASL	LT	Umidade
1	14,6 ± 0,00	0,7 ± 0,04	13,47 ± 0,01	14,17	58
2	24,7 ± 0,00	0,82 ± 0,05	2,07 ± 0,02	2,89	57
3	14,8 ± 0,00	0,74 ± 0,04	12,1 ± 0,00	12,84	58
4	26,4 ± 0,00	0,79 ± 0,04	1,52 ± 0,01	2,31	49
5	14,7 ± 0,00	0,90 ± 0,03	12,34 ± 0,00	13,24	56
6	14,6 ± 0,00	0,89 ± 0,03	13,41 ± 0,01	14,3	57
7	14,2 ± 0,00	0,73 ± 0,03	10,04 ± 0,00	10,77	55
8	13,8 ± 0,00	0,82 ± 0,03	12,47 ± 0,02	13,29	58
PC	15,1 ± 0,00	0,93 ± 0,03	15,61 ± 0,01	16,54	51
Sólidos água	11,1 ± 0,41	0,87 ± 0,02	37,79 ± 0,00	38,66	60
Casca	14,6 ± 0,00	0,70 ± 0,03	19,72 ± 0,00	20,42	49
Polpa nt	13,6 ± 0,00	1,39 ± 0,03	19,33 ± 0,00	20,72	61
Polpa pt	13,5 ± 0,00	0,89 ± 0,02	13,44 ± 0,00	14,33	63

AIS: lignina ácido-insolúvel

AIL: lignina ácido-solúvel

LT: lignina total

Nt: não tratada

Pt: pré-tratada

A partir da análise dos dados apresentados, verifica-se que os pré-tratamentos promoveram a delignificação parcial dos resíduos. Segundo Silva e Filho (2017), frações sólidas de pré-tratamentos hidrotérmicos possuem proporções mais altas de lignina e celulose menos recalcitrantes e mais favoráveis à conversão microbiológica após o pré-tratamento, uma vez que este tratamento hidrotérmico pode remover até 80% da hemicelulose e aumentar a digestibilidade enzimática da fração lignocelulósica restante.

Todas as comparações foram realizadas com a biomassa casca (LT 20,42% - Tabela 9), com redução de cerca de 11% no teor de lignina total nas biomassas submetidas aos pré-tratamentos 2 e 4. A alta temperatura, aliada ao tempo máximo de exposição da biomassa, resultou na solubilização dos

compostos formadores da lignina na fração líquida do tratamento. Concomitantemente, a composição de carboidratos nos licores de ambos os tratamentos foi semelhante, exceto pela presença de fucose, somente identificada no tratamento 2.

Notou-se que as biomassas com severidades baixa (7 e 5) e média (3 e PC) apresentaram baixa redução de lignina resultante, cerca de 5 - 6% e 6 - 8%, nessa ordem. O ponto comum destes tratamentos encontra-se na temperatura média utilizada neles (185 °C para PC, e 140 °C para os demais). Hendriks e Zeeman (2009) afirmam que temperaturas próximas a 160°C causam, além da solubilização da hemicelulose, a solubilização de lignina. O mesmo perfil foi detectado quando a biomassa analisada foi a polpa de café, que, após pré-tratamento (condição 5), apresentou 7% menos lignina em seus resíduos.

O alto valor de lignina resultante dos sólidos presentes na água residual (38,66%) se deve a compostos desconhecidos que são diluídos em seu meio durante o processamento de café. Rattan et al. (2015), e Bonilla-Hermosa et al. (2014) identificaram, em seus estudos, que 15,8% e 2,44%, respectivamente, do conteúdo total da água residual do processamento de café arábica são componentes adquiridos durante os processos de despulpamento e desmucilagem do café.

Na Figura 28, pode ser visualizada a concentração de açúcares presentes nas biomassas recuperadas após os pré-tratamentos.

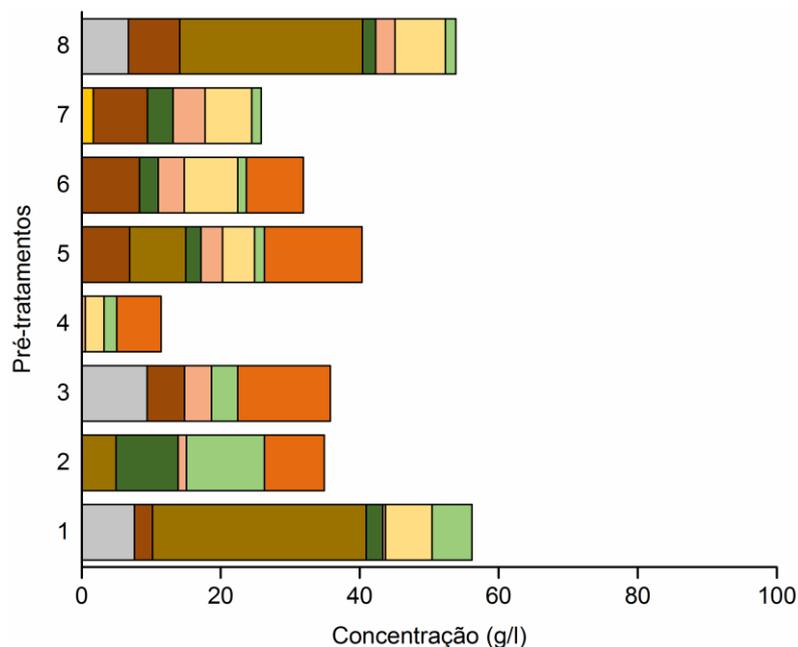


Figura 28 Concentração de açúcares nas biomassas residuais hidrolisadas (■) Ácido galacturônico (■) Celobiose (■) Frutose (■) Manose (■) Xilose (■) Glicose (■) Sacarose (■) Galactose (■) Ramnose (■) Arabinose (■) Fucose.

Na análise de carboidratos das biomassas pós-tratamento, nota-se que houve grande redução dos açúcares na porção sólida, estando presentes em baixas quantidades. Este resultado era esperado, uma vez que a principal vantagem em se utilizar o LHW como pré-tratamento é a solubilização da porção hemicelulósica na fração líquida, de forma a evitar a formação de compostos inibitórios.

4. Conclusões

Um screening enzimático realizado em oito cepas de *P. variotii* revelou as três maiores produtoras de pectinases (3RET13, 3RE14 e 3RE21) para este experimento, das quais a cepa selecionada para a continuidade do trabalho foi a 3RE21. A tripla identificação molecular destas cepas mostrou-se bem-sucedida, sendo os isolados identificados como *P. formosus*. A metodologia de superfície de resposta foi empregada visando as melhores condições de cultivo e pré-tratamento para indução de pectinases, identificando-se a condição de baixa severidade como melhor indicada para investigação da produção ótima de pectinases, devido à alta e rápida indução dessas enzimas pelo licor resultante. Os diferentes pré-tratamentos utilizados foram capazes de solubilizar variados carboidratos em formas monoméricas

e oligoméricas, além de porções de lignina com menor grau de polimerização entre as biomassas resultantes pós-tratamento.

5. Perspectivas

Como perspectivas futuras, propõe-se a análise composicional de aminoácidos e proteínas dos licores e biomassas lignocelulósicas, bem como de compostos fenólicos produzidos nos licores a partir dos pré-tratamentos. Ressalta-se que ambas as análises serão realizadas em HPLC.

6. Referências bibliográficas

- Agirrezabal-Telleria I, Larreategui A, Requies J, Güemez MB, Arias PL (2011) Furfural production from xylose using sulfonic ion-exchange resins (Amberlyst) and simultaneous stripping with nitrogen. *Bioresource Technology* 102:7478–7485 . doi: 10.1016/j.biortech.2011.05.015
- Akhtar N, Gupta K, Goyal D, Goyal A (2016) Recent Advances in Pretreatment Technologies for Efficient Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 35:489–511 . doi: 10.1002/ep
- Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniestra-Gonzalez G (1993) Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 15:254–260 . doi: 10.1016/0141-0229(93)90146-S
- Baggio J (2006) Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*Coffea arabica* L.) como provável fonte de substâncias bioativas. Universidade Federal de Santa Catarina
- Barker AP, Horan JL, Slechta ES, Alexander BD, Hanson KE (2014) Complexities associated with the molecular and proteomic identification of *Paecilomyces* species in the clinical mycology laboratory. *Medical mycology* 52:537–545 . doi: 10.1093/mmy/myu001
- Barros FFC, De Quadros CP, Maróstica MR, Pastore GM (2007) Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova* 30:409–414 . doi: 10.1590/S0100-40422007000200031
- Basumallick L, Rohrer J (2015) Determination of Uronic Acids and Wood

Sugars in Wood-Based Hydrolysates

- Battestin V, Macedo GA (2007) Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98:1832–1837 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.06.031
- Battista F, Fino D, Mancini G (2016) Optimization of biogas production from coffee production waste. *Bioresource Technology* 200:884–890 . doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.020
- Bee S, Brando CHJ, Brumen G, Carvalhaes N, Kölling-Speer I, Speer K, Suggi Liverani F, Teixeira AA, Teixeira R, Thomaziello RA, Viani R, Vitzthum OG (2005) The raw bean. In: Illy A, Viani R (eds) *Espresso Coffee: The Science of Quality*, Second. Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA, pp 87–178
- Behera S, Arora R, Nandhagopal N, Kumar S (2014) Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 36:91–106 . doi: 10.1016/j.rser.2014.04.047
- Bonilla-Hermosa VA, Duarte WF, Schwan RF (2014) Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. *Bioresource Technology* 166:142–150 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.05.031
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254
- Brites-Neto J (2018) Atividade escorpionicida de metabólitos secundários de *Paecilomyces formosus* em bioensaios in vivo com *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Scorpiones: Buthidae). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
- Caetano NS, Caldeira D, Martins AA, Mata TM (2017) Valorisation of spent coffee grounds: production of biodiesel via enzymatic catalysis with ethanol and a co-solvent. *Waste and Biomass Valorization* 8:1981–1994 . doi: 10.1007/s12649-016-9790-z
- Cai Y, Gong Y, Liu W, Hu Y, Chen L, Yan L, Zhou Y, Bian Y (2017) Comparative secretomic analysis of lignocellulose degradation by *Lentinula edodes* grown on microcrystalline cellulose, lignosulfonate and glucose. *Journal of Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2017.04.023

- Cerda A, Mejías L, Gea T, Sánchez A (2017) Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresource Technology* 243:1059–1068 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.076
- Chang C, Cen P, Ma X (2007) Levulinic acid production from wheat straw. *Bioresource Technology* 98:1448–1453 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.03.031
- Damásio ARL, Silva TM, Maller A, Jorge J. A, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2010) Purification and partial characterization of an Exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:1496–1507 . doi: 10.1007/s12010-009-8682-0
- Dasgupta D, Ghosh D, Bandhu S, Adhikari DK (2017) Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. *Microbiological Research*. doi: 10.1016/j.micres.2017.04.002
- Dias M (2016) Aproveitamento de resíduos do processamento de café para produção de carotenoides por leveduras e bactérias. Universidade de Lavras
- Dong Q, Wang H, Xing X, Ji S (2012) Identification and characterization of a special species of *Paecilomyces*. *Annals of Microbiology* 62:1587–1592 . doi: 10.1007/s13213-011-0414-3
- Esquivel P, Jiménez VM (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46:488–495 . doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028
- Fischer M, Reimann S, Trovato V, Redgwell RJ (2001) Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research* 330:93–101 . doi: 10.1016/S0008-6215(00)00272-X
- Giraldo MA, Silva TM, Salvato F, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LHS (2012) Thermostable invertases from *Paecilomyces variotii* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:463–472 . doi: 10.1007/s11274-011-0837-9

- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. *Process Biochemistry* 38:987–996
- Gurram R, Al-Shannag M, Knapp S, Das T, Singaas E, Alkasrawi M (2016) Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: A renewable feedstock. *Clean Technologies and Environmental Policy* 18:269–278 . doi: 10.1007/s10098-015-1015-9
- Halal SLM (2008) *Composição, processamento e qualidade do café*. Universidade Federal de Pelotas
- Hendriks ATWM, Zeeman G (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100:10–18 . doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.027
- Hermosa VAB (2014) *Aproveitamento de resíduos do processamento semi-seco do café para produção de compostos de valor agregado*. Universidade Federal de Lavras
- Hernández-Pérez AF, de Arruda PV, Felipe M das G de A (2016) Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Brazilian Journal of Microbiology* 47:489–496 . doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.019
- Jong E de, Higson A, Walsh P, Wellisch M (2012) Bio-based Chemicals: Value Added Products from Biorefineries. IEA Bioenergy - Task 42 Biorefinery 36
- Kluczek-Turpeinen B, Tuomela M, Hatakka A, Hofrichter M (2003) Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:374–379 . doi: 10.1007/s00253-003-1272-0
- Knopp S, Bytof G, Selmar D (2006) Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. *European Food Research and Technology* 223:195–201 . doi: 10.1007/s00217-005-0172-1
- Kohli P, Gupta R (2015) Alkaline pectinases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4:279–285 . doi: 10.1016/j.bcab.2015.07.001
- Kumdam H, Murthy SN, Gummadi SN (2014) Arabitol production by microbial fermentation - biosynthesis and future applications. *International Journal of Sciences & Applied Research* 1:1–12
- Laguna IHB, Marante FJT, Mioso R (2015) *Enzymes and bioproducts*

- produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *Journal of Applied Microbiology* 119:1455–1466 . doi: 10.1111/jam.12934
- Li X, Zheng Y (2017) Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. *Biotechnology Advances* 35:466–489 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.010
- Licursi D, Antonetti C, Fulignati S, Corsini A, Boschi N, Galletti AMR (2018) Smart valorization of waste biomass: Exhausted lemon peels, coffee silverskins and paper wastes for the production of levulinic acid. *Chemical Engineering Transactions* 65:637–642 . doi: 10.3303/CET1865107
- Machado CMM, Soccol CR, De Oliveira BH, Pandey A (2002) Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 102–103:179–191 . doi: 10.1385/ABAB:102-103:1-6:179
- Martins IF, Bueno SM (2019) Uso de pectina para tratamentos de efluente na indústria de laticínios. *Open Journal Systems* 1:
- Miller G (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31:426–428
- Minussi RC, Baracat-Pereira MC, Coelho JLC, Silva DO (1997) Methylxanthines as inducers of pectinlyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. *Letters in Applied Microbiology* 24:369–372 . doi: 10.1038/sj.jim.2900389
- Murthy PS, Naidu MM, Srinivas P (2009) Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84:1246–1249 . doi: 10.1002/jctb.2142
- Mussatto SI, Carneiro LM, Silva JPA, Roberto IC, Teixeira JA (2011a) A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers* 83:368–374 . doi: 10.1016/j.carbpol.2010.07.063
- Mussatto SI, Machado EMS, Martins S, Teixeira JA (2011b) Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology* 4:661–672 . doi: 10.1007/s11947-011-0565-z
- Navya PN, Pushpa SM (2013) Production, statistical optimization and application of endoglucanase from *Rhizopus stolonifer* utilizing coffee

- husk. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36:1115–1123 . doi: 10.1007/s00449-012-0865-3
- Oka T, Ekino K, Fukuda K, Nomura Y (2014) Draft Genome Sequence of the Formaldehyde-Resistant Fungus *Byssochlamys spectabilis* No. 5 (Anamorph *Paecilomyces variotii* No. 5) (NBRC109023). *Genome announcements* 2:10.1128/genomeA.01162-13 . doi: 10.1128/genomeA.01162-13 [doi]
- Oka T, Komachi Y, Ohsima K, Kawano Y, Fukuda K, Nagahama K, Ekino K, Nomura Y (2015) Isolation, sequencing, and heterologous expression of the *Paecilomyces variotii* gene encoding S-hydroxymethylglutathione dehydrogenase (*fldA*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:1755–1763 . doi: 10.1007/s00253-014-6203-8
- Overend RP, Chornet E, Gascoigne JA (1987) Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 321:523–536 . doi: 10.1098/rsta.1987.0029
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R, Roussos S (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 6:153–162
- Panegassi VR, Serra GE, Buckeridge MS (2000) Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20:406–415 . doi: 10.1002/9781444328622.oth1
- Patil NP, Patil KP, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2012) Production, Purification of Exo-Polygalacturonase from Soil Isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and Its Application. *Indian Journal of Microbiology* 52:240–246 . doi: 10.1007/s12088-011-0162-x
- Pujol D, Liu C, Gominho J, Olivella MÀ, Fiol N, Villaescusa I, Pereira H (2013) The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products* 50:423–429 . doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.056
- Rambo MKD, Amorim EP, Ferreira MMC (2013) Potential of visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics for analysis of some constituents of coffee and banana residues. *Analytica Chimica Acta* 775:41–49 . doi: 10.1016/j.aca.2013.03.015

- Rattan S, Parande AK, Nagaraju VD, Ghiwari GK (2015) A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing. *Environmental Science and Pollution Research International* 22:6461–6472 . doi: 10.1007/s11356-015-4079-5
- Redgwell R, Fischer M (2006) Coffee carbohydrates. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:165–174 . doi: 10.1590/S1677-04202006000100012
- Regazzoni L, Saligari F, Marinello C, Rossoni G, Aldini G, Carini M, Orioli M (2016) Coffee silver skin as a source of polyphenols: High resolution mass spectrometric profiling of components and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 20:472–485 . doi: 10.1016/j.jff.2015.11.027
- Rogers WJ, Michaux S, Bastin M, Bucheli P (1999) Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science* 149:115–123 . doi: 10.1016/S0168-9452(99)00147-8
- Samson RA, Houbraken J, Varga J, Frisvad JC (2009) Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 22:14–27 . doi: 10.3767/003158509X418925
- Scapinello C, Faria HG de, Furlan AC, Michelan AC, Santolin ML da R (2008) Efeito do uso de oligossacarídeo manose e acidificantes em rações com alto teor de amido, para coelhos em crescimento. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 23:1039 . doi: 10.4025/actascianimsci.v23i0.2664
- Schmidt LM, Mthembu LD, Reddy P, Deenadayalu N, Kaltschmitt M, Smirnova I (2017) Levulinic acid production integrated into a sugarcane bagasse based biorefinery using thermal-enzymatic pretreatment. *Industrial Crops and Products* 99:172–178 . doi: 10.1016/j.indcrop.2017.02.010
- Silva COG, Filho EXF (2017) A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. *Bioenergy Resource*. doi: 10.1007/s12155-017-9815-x
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Nrel DC (2012) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass
Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass
- Sluiter A, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D (2008) Determination of

Extractives in Biomass

- Widmer W (2011) Analysis of biomass sugars and galacturonic acid by gradient anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection without post-column addition. *Biotechnology Letters* 33:365–368 . doi: 10.1007/s10529-010-0447-x
- Yu Q, Zhuang X, Yuan Z, Kong X, Qi W, Wang W, Wang Q, Tan X (2015) Influence of lignin level on release of hemicellulose-derived sugars in liquid hot water. *International Journal of Biological Macromolecules* 54:59: . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.045
- Zahoor O, Yuanyuan T (2014) Pretreatments to Enhance the Digestibility of Wheat Straw. *International Journal of Renewable and Sustainable Energy* 3:26 . doi: 10.11648/j.ijrse.20140301.15
- Zavala-Páramo MG, Villa-Rivera MG, Lara-Márquez A, López-Romero E, Cano-Camacho H (2020) Applications of Fungal Pectinases. Reference Module in Life Sciences. doi: 10.1016/b978-0-12-809633-8.21086-8
- Zerva A, Savvides AL, Katsifas EA, Karagouni AD, Hatzinikolaou DG (2014) Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology* 162:294–299 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.137

Capítulo III

Otimização da produção de pectinases por *Paecilomyces formosus* em águas residuárias do processamento de café

1. Introdução

O Brasil destaca-se por ser o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo mercado consumidor (Conab 2017). A indústria de processamento de café é uma das principais indústrias agropecuárias, contribuindo significativamente para o crescimento econômico nacional. Sua importância não está somente no setor de exportações, mas também em sua industrialização e geração de grande número de empregos em toda a sua cadeia produtiva (FAO 2018a).

Os frutos do café são processados por dois métodos, classificados em beneficiamento úmido ou seco, dependendo da quantidade de água utilizada em seu preparo. A demanda por cafés de alta qualidade e, conseqüentemente, sua bebida torna o processamento úmido o preferido para que melhores características sensoriais do café e melhores preços no mercado sejam alcançados. Portanto, é utilizado em cerca de 40% de todo o café beneficiado mundialmente (Aguiar et al. 2016; Garde et al. 2017). Nesse método, os frutos de café são submetidos a remoção mecânica da polpa com o auxílio da água, gerando enormes quantidades de efluentes de alta resistência, denominados águas residuais do café, ou efluentes do café, exigindo tratamento sistemático antes do descarte (Rattan et al. 2015). Estima-se que a quantidade de água necessária para realização do beneficiamento úmido varia entre 8000 e 20000 litros por tonelada de café processado (Kulandaivelu e Bhat 2012).

O presente trabalho pretende avaliar o potencial de produção de poligalacturonase por meio do cultivo do fungo *P. formosus* em águas residuais do processamento úmido de café como fonte de carbono, bem como purificar e caracterizar enzimas pectinolíticas provenientes dessas fermentações.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

Os reagentes pectina de frutas cítricas, ácido dinitrosalicílico e tartarato de sódio e potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA); as colunas cromatográficas DEAE FF, HiPrep16/60 Superdex S-200 HR,

Hitrap Desalting GE foram obtidas da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA), e o kit de marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (UPMWM), da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Origem dos resíduos de café

As águas residuárias do beneficiamento de café arábica foram gentilmente cedidas pela Fazenda Boa Sorte, localizada no município de Campos Altos - MG.

Antes de serem submetidas à fermentação, as águas residuais foram pasteurizadas seguindo-se o procedimento de aquecimento a 100°C, por 10 minutos, em autoclave, seguido por resfriamento e armazenagem a 4°C até o momento de utilização, de modo a evitar mudanças das características físico-químicas e possível contaminação exógena.

2.3. Origem do microrganismo e manutenção

A cepa 3RE21 de *P. formosus* isolada de solo, pertencente à micoteca do Laboratório de Enzimologia, foi submetida à triagem para produção de enzima pectinolítica em experimento anterior neste mesmo estudo, e, dentre as três melhores produtoras, foi selecionada para prosseguimento da produção enzimática.

Para a produção enzimática, as suspensões de esporos do isolado foram obtidas por meio da raspagem da superfície das diferentes placas crescidas por sete dias contendo meio MEA 2% (Extrato de Malte Agar) a 28 °C, durante 10 dias, em câmara de demanda biológica de oxigênio (BOD) programada com fotoperíodo de 12 horas.

Para manutenção do isolado, amostras de seu micélio foram armazenadas em tubos contendo glicerol 50% (v/v), mantidas em ultrafreezer a -80°C para posterior uso.

2.4. Produção enzimática

Para produção enzimática, os cultivos foram realizados em frascos de 2L, contendo 600 ml de água residual de café, inoculados com uma

concentração de esporos equivalente a aproximadamente $2,4 \times 10^7$ esporos/ml de fonte de carbono, durante 6 dias, sob agitação de 87 rotações por minuto (rpm), temperatura de 20°C e pH 4,0. Após este período, os cultivos foram filtrados a vácuo com auxílio de papel-filtro Whatman nº 5, e o material filtrado, denominado extrato bruto, foi preservado em câmara fria a 4°C, acrescido de azida sódica 0,2%. As mesmas condições de cultivo foram aplicadas aos licores de casca e polpa de café, para verificação do melhor meio indutor de pectinases.

Tais condições de cultivo foram instauradas por meio de análise fatorial realizada anteriormente neste mesmo estudo (condição A, experimento 24, item 2.10, capítulo II), em que os licores provenientes dos pré-tratamentos em água quente líquida de cascas de café foram utilizados para se determinar quais as melhores condições para produção de enzima pectinolítica. Dentre as variáveis testadas para os cultivos, avaliaram-se: temperatura de incubação, pH do licor, concentração final de nitrogênio e agitação, sendo que as variáveis testadas nos pré-tratamentos foram concentração de biomassa, tempo e temperatura de exposição destas aos tratamentos.

2.5. Determinação da atividade enzimática

Para determinação da atividade de pectinase, foram realizados ensaios pelo método de DNS, conforme descrito por Miller (1959) e adaptado por Vale (2012). O substrato (pectina de frutas cítricas) foi preparado em água Milli-Q na concentração final de 1%. As atividades enzimáticas de CMCase, xilanase e mananase foram dosadas, porém não apresentaram valores significativos.

Realizaram-se ensaios em microplacas de PCR 96 poços (Applied Biosystems), incubadas em termociclador (BioRad), utilizando-se 5 µL de enzima e 10 µL de substrato. A mistura foi incubada a 50°C por 10 minutos, e, após esse período, foram adicionados 30 µL de DNS, fervendo-se a mistura por 10 minutos a 97°C (Miller 1959). Adicionaram-se 150 µL de água destilada para posterior quantificação dos açúcares redutores através de leitura da absorbância a 540 nm, por meio de um leitor de placa (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA).

As atividades enzimáticas foram expressas em UI/ml, sendo definidas como a quantidade de açúcares redutores liberados por minuto por mililitro de extrato bruto (μmol de açúcar redutor/min/ml).

Para determinação da quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos, foram construídas curvas de calibração com ácido D-galacturônico. Estas foram elaboradas a partir de uma solução-estoque de 2 mg/ml do monossacarídeo, variando a concentração do açúcar redutor entre 0,2 - 2 mg/ml, totalizando o volume final de 15 μL .

2.6. Ultrafiltração do extrato bruto enzimático

O extrato bruto enzimático foi concentrado 10 vezes por meio do processo de ultrafiltração, utilizando-se uma membrana com retenção de 30 kDa no sistema Amicon Filtration System-Stirred Cells (Amicon Millipore Co., Bedford, MA, USA), com pressão de 75 psi, em ar comprimido, a 4°C. O limite de exclusão da membrana foi selecionado com base na alta massa molecular esperada nas pectinases (Jayani et al. 2005; Damásio et al. 2010b). As alíquotas do concentrado e do ultrafiltrado foram armazenadas a 4°C, para posterior avaliação do perfil holocelulolítico.

2.7. Purificação parcial da pectinase

A purificação parcial da pectinase foi realizada a 28°C, no sistema cromatográfico automatizado *Akta Prime*, com *software* Unicorn 5.0 integrado (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA).

A fração concentrada proveniente do processo de ultrafiltração (200 ml) foi aplicada em coluna de troca iônica DEAE FF (dimensões h= 14 cm, d= 5 cm, para 60 ml de volume) pré-equilibrada com tampão A (fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4). A eluição foi realizada mediante uma lavagem inicial de 70 ml de mistura de solução tampão A e 25% de solução tampão B (tampão A contendo 1M de NaCl). Posteriormente, efetuou-se um gradiente linear desde 25% até 70% de solução tampão B, sendo que a cromatografia foi realizada com um fluxo de 3 ml/min (fluxo linear 54 ml/h), coletando-se frações de 3ml, e o resultado, monitorado pela absorbância a 280 nm. As atividades enzimáticas de cada fração foram determinadas, e as frações

correspondentes aos picos de atividade enzimática de pectinase foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12% (Laemmli 1970); depois, armazenadas em câmara fria a 4°C, com 0,01% (m/v) de azida sódica até sua utilização.

As frações de proteínas correspondentes aos picos de atividade pectinolítica foram liofilizadas, dissolvidas em água Milli-Q e dessalinizadas em colunas de 5 ml *Hitrap Desalting* (GE Healthcare Life Sciences).

2.8. Determinação da massa molecular enzimática

As frações de proteínas dessalinizadas e com atividade pectinolítica foram submetidas a fracionamento por cromatografia de exclusão molecular em coluna *HiPrep16/60 Superdex S-200 HR* (120 ml) pré-equilibrada com água Milli-Q. Foram aplicados 2 ml de amostra a um fluxo de 1 ml/min, sendo coletadas frações de 1 ml. A absorbância a 280 nm e a atividade enzimática das frações foram determinadas conforme protocolo do item 2.5. As frações de proteínas correspondentes aos picos de atividade enzimática de pectinase foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12% (Laemmli 1970) e por zimografia (Bischoff et al. 1998).

As frações equivalentes aos picos de atividade pectinolítica da cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex S200* foram novamente eluídas na mesma coluna, na presença de tampão ureia 8 M, a fim de se detectar a presença de oligômeros. A coluna *Superdex S-200 HR* foi pré-equilibrada com Ureia 8M em água, com aplicação de 2 ml de amostra a um fluxo de 1 ml/min, eluídas isocraticamente, coletando-se frações de 1 ml. A eluição foi realizada em banho de gelo e acompanhada por absorção óptica a 280 nm.

As massas moleculares das pectinases foram estimadas mediante calibração da coluna por ajuste linear da curva entre os coeficientes de partição (K_{av}) e os pesos moleculares dos marcadores: com blue dextran 2000 (2000 kDa), tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). O coeficiente de partição (K_{av}) foi calculado pela seguinte equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

onde:

V_e : volume de eluição das proteínas

V_o : volume de eluição da blue dextran (volume vazio)

V_c : volume geométrico da coluna

2.9. Determinação de massa molecular por espalhamento por luz dinâmica

As medições de dispersão dinâmica da luz (DLS, do inglês *Dynamic light scattering*) foram feitas em um *Zetasizer Nano Series Nano-ZS* (Malvern Instruments, Reino Unido), para a determinação do tamanho de partícula a 25°C, com o programa *Zetasizer Software v7.11* (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Um laser He-Ne com $\lambda = 633\text{nm}$ foi usado para as medições em 173° de detecção por retrodispersão, usando-se cubetas de vidro *PCS8501* com abertura redonda. Os experimentos foram feitos com 3 medições para cada uma das frações de proteínas das cromatografias de exclusão molecular em condições nativas e desnaturantes (8 mol/L de ureia). As amostras foram centrifugadas durante 5 min a 10000 rpm em microcentrífuga de bancada e 1 ml do sobrenadante degaseificado com bomba a vácuo, antes das medições.

Os parâmetros adicionais utilizados para as medidas foram: material = proteína (RI = 1,45, absorção = 0,001), dispersante na condição nativa água (viscosidade 0,8872 cp, RI = 1,330) e na condição desnaturante de 8 mol/L de ureia (viscosidade 1,5464 cp, RI = 1,397). Utilizou-se a viscosidade do dispersante como a viscosidade da amostra e foram empregados os parâmetros Mark-Houwink no cálculo do peso molecular por DLS. No processamento, utilizou-se o modelo de análise de várias populações com alta resolução (*Multiple narrow modes (high resolution)*).

2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

O grau de pureza da enzima parcialmente purificada foi analisado por SDS-PAGE (Laemmli 1970), e as amostras do extrato bruto, concentrado, DEAE FF e frações da exclusão molecular (Superdex S-200) foram analisadas. A um volume de 20 μ L de amostra previamente precipitada com ácido tricloacético (TCA 10%), foram adicionados 5 μ L de tampão de amostra 5X (tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,05%, glicerol 20% e β -mercaptoetanol 5%), fervidos por 10 min e aplicados no gel de poliacrilamida 12%.

A eletroforese foi realizada em sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) contendo SDS 0,1% (v/v). Para cada corrida, utilizaram-se 4 μ L de marcador de massas moleculares (UPMWM) contendo: β -galactosidase (116,3 kDa), soroalbumina bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), lactato desidrogenase (35,0 kDa), REase Bsp98I (25,0 kDa) e lisozima (14,4 kDa). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3) a 4 °C, submetida a 25 mA constantes por 90 minutos.

Após a corrida eletroforética, as bandas proteicas foram coradas pelo método de nitrato de prata (Blum et al. 1987) e zimograma (Bischoff et al. 1998).

2.11. Determinação do efeito do pH na atividade enzimática

Para determinação do efeito do pH na atividade pectinolítica, as amostras do extrato bruto e parcialmente purificadas foram avaliadas na presença de tampões citrato-fosfato-glicina 50 mM de diferentes valores de pH no intervalo de 2.0 - 12.0. Determinou-se o efeito do pH por meio do método de DNS (Miller 1959), alterando-se o protocolo do item 2.5 da seguinte maneira: manteve-se a quantidade de enzima das amostras (5 μ l), porém dobrou-se a concentração do substrato (5 μ l de pectina cítrica 2%) e foram adicionados 5 μ l ao tampão concentrado (100 mM), de forma que, ao final da reação, o substrato encontrava-se tamponado no pH desejado, na concentração ideal (1%), para ensaio de atividade.

A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática-controle da reação em substrato com pH neutro (7,0).

2.12. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática

Para avaliação do efeito da temperatura na atividade pectinolítica, foram realizados ensaios enzimáticos com as amostras do extrato bruto e parcialmente purificadas, alterando-se a temperatura de incubação de 30°C a 80°C a cada 10°C. Determinou-se o efeito da temperatura pelo método de DNS (Miller 1959), adaptado ao protocolo do item 2.5.

A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática-controle da reação em 50°C.

2.13. Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos (K_M e V_{MAX}) das amostras semipurificadas foram definidos por meio da variação da concentração de substrato (0,5 – 10 mg/ml) com atividade constante da enzima (2,10 UI/ml) em suas condições ótimas de pH e temperatura. A constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade de reação (V_{MAX}) foram estabelecidas pelo método de regressão não linear e ajuste de curva hiperbólico calculados pelo *software* OriginPro (OriginLab, Northampton, MA, USA).

2.14. Determinação do efeito de íons metálicos e modificadores de aminoácidos na atividade enzimática

Para determinação dos efeitos de íons metálicos e modificadores de aminoácidos sobre a atividade pectinolítica, as amostras parcialmente purificadas foram pré-incubadas durante 20 minutos, a 28 °C, na presença dos íons metálicos Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} nas concentrações finais de 1 e 10 mmol.L⁻¹. A influência dos seguintes reagentes na atividade enzimática, nas mesmas concentrações finais, foi

testada: DTT (ditiotreitól), SDS (dodecil sulfato de sódio), β -mercaptoetanol e EDTA.

A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática-controle, sem a presença do íon ou modificador.

2.15. Determinação do efeito de compostos fenólicos e etanol na atividade enzimática

O efeito de ativação/inibição na atividade pectinolítica pelos compostos fenólicos (ácido transferúlico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido *p*-cumárico, siringaldeído, ácido transcinâmico, ácido tânico, ácido gálico e vanilina), assim como pelo etanol foi adaptado do item 2.5 da seguinte maneira: as amostras semipurificadas foram incubadas previamente durante 20 minutos a 28 °C com 2 mg/ml dos reagentes ou 20% (v/v) de etanol.

A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade enzimática controle, sem a presença do composto fenólico ou etanol.

3. Resultados e discussão

3.1. Produção de holocelulases em diferentes resíduos de café

Os resíduos agroindustriais são fontes de nutrientes altamente atrativas para o crescimento microbiológico e produção enzimática, devido, principalmente, à sua grande disponibilidade (visto as inúmeras quantidades e qualidades de culturas agrícolas existentes no mundo) e não competitividade alimentícia. Além disso, têm composição bromatológica variada, constituindo-se, portanto, substratos alternativos para elaboração de diferentes biomateriais (Caicedo et al. 2016; Yang et al. 2016).

A utilização de fungos filamentosos pode ser vantajosa por causa da sua capacidade de decompor resíduos lignocelulósicos através da secreção de complexos arsenais enzimáticos, baixo custo material, alta produtividade e modificação de enzimas sob condições distintas (Caraméz et al. 2012; Souza et al. 2017). A capacidade de *P. formosus* de produzir holocelulases quando

crescido em resíduos de café pré-tratados como fonte de carbono foi avaliada por meio de indução enzimática durante 6 dias de crescimento (condição A, experimento 24, item 2.8, capítulo II).

A Figura 29 apresenta o perfil holocelulolítico do extrato bruto de *P. formosus* quando crescidos em água residual, casca e polpa de café.

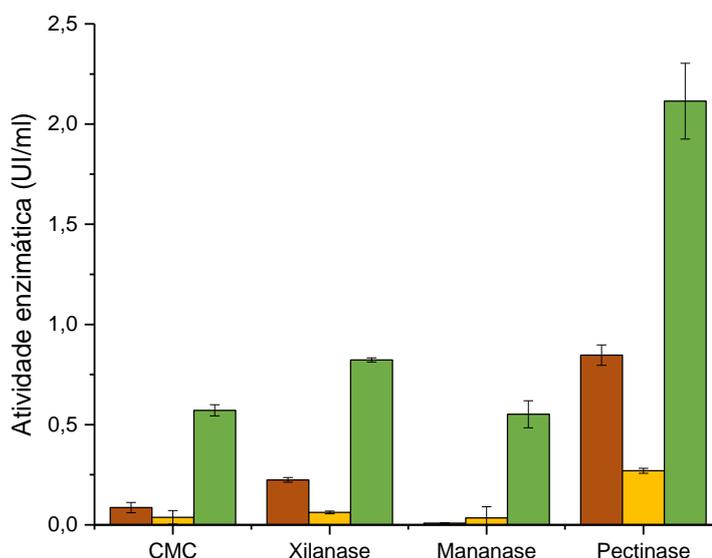


Figura 29 Perfil holocelulolítico de *P. formosus* crescido em diferentes resíduos dos beneficiamentos de café onde (■) licor de polpa de café, (■) licor de casca de café e (■) água de lavagem residual.

Observa-se que *P. formosus* foi capaz de produzir diferentes atividades holocelulolíticas quando crescidos nos diferentes resíduos do processamento de café por via úmida (polpa e água residual) e via seca (casca de café). Diversos estudos demonstram a utilização dos resíduos de café na produção de enzimas, metabólitos secundários, compostos bioativos e antioxidantes (Velázquez-Cedeño et al. 2002; Murthy et al. 2009; Navya e Pushpa 2013; Bonilla-Hermosa et al. 2014; Dias et al. 2015; Figueroa et al. 2016; Novita 2016; Pinto et al. 2018).

Embora derivados do mesmo produto (café arábica), os resíduos possuem composições distintas, sendo a casca diferente da polpa de café, porém com natureza similar dos compostos presentes nelas. Esta diferença pode ser percentual na composição dos constituintes, dependendo do tipo de processamento, cultivar analisada, condições de cultivo, dentre outros

elementos (Pandey et al. 2000). Sendo a água residual rica em matéria orgânica, obtida durante a polpação do café e remoção da mucilagem, pode-se observar que esta foi melhor indutora de enzimas pectinolítica (2,11 UI/ml) e xilanolítica (0,82 UI/ml) em comparação aos demais resíduos - polpa (0,85 UI/ml e 0,22 UI/ml) e casca de café (0,27 UI/ml e 0,06 UI/ml), respectivamente. Por este motivo, a água residual foi selecionada para dar continuidade aos estudos.

Pectinases possuem um importante papel na hidrólise lignocelulósica, pois permitem maior acesso de celulases e xilanases às porções de celulose e xilana das paredes vegetais (Zhang et al. 2013). O sinergismo entre pectinases, celulases e xilanases foi descrito por Zhang et al. (2013) na hidrólise de cânhamo fresco, pré-tratado por explosão a vapor e ensilado com ácido fórmico 3,4%. Seus resultados demonstraram que, após 48h de incubação, as pectinases foram mais eficientes que as xilanases na solubilização de carboidratos em cânhamo fresco e ensilado, exibindo menor quantidade no que foi pré-tratado a vapor, devido à solubilização do conteúdo de pectina durante o pré-tratamento. No entanto, o sinergismo entre todas as enzimas analisadas foi observado na hidrólise e na consequente solubilização dos carboidratos em cânhamo pré-tratado e ensilado, correspondendo a 59,4% e 45,5%, nessa ordem.

A produção de poligalacturonases e xilanases tem sido descrita na fermentação de resíduos cítricos, devido à natureza heterogênea dos substratos, uma vez que os resíduos agroindustriais são estrutural e nutricionalmente complexos. Nos estudos de Mamma et al. (2008) e Rodríguez-Fernández et al. (2011), ambas as enzimas foram produzidas a partir de 48h de fermentação na presença de pectina e/ou xilana no meio de crescimento e na ausência de monômeros ou açúcares simples que poderiam atuar como inibidores da síntese enzimática.

Resíduos cítricos possuem, aproximadamente, 20% de pectina de peso seco (Rivas-Cantu et al. 2013) enquanto resíduos do café podem variar de 0,91% a 6,5% (Antier et al. 1993; Esquivel e Jiménez 2012) dependendo de qual resíduo se trata e qual a metodologia de beneficiamento aplicada. Embora o teor de pectina seja menor, a possível disposição da pectina em regiões mais expostas nos resíduos cafeeiros pode influenciar na indução de

alta produção de pectinases, justificando o padrão observado no presente trabalho.

3.2. Purificação parcial pectinase

O extrato bruto obtido pelo crescimento de *P. formosus* em água residual foi fracionado por ultrafiltração usando-se membrana de corte de 30 kDa. Os volumes correspondentes ao extrato bruto, fração do ultrafiltrado e concentrado foram de 300 ml, 250 ml e 50 ml, respectivamente.

Pectinases microbianas apresentam faixa de peso molecular variadas entre 30 e 80 kDa (Jayani et al. 2005; Sharma et al. 2013). A escolha da fração concentrada para estudos de purificação se deu em função da atividade específica da pectinase se apresentar maior no concentrado em comparação ao extrato bruto. Na Tabela 11, é apresentado o perfil pectinolítico.

Tabela 11: Perfil pectinolítico de *P. formosus* no extrato bruto, concentrado e ultrafiltrado.

Fração	Atividade enzimática volumétrica (UI/ml)	Atividade enzimática específica (UI/mg)
Extrato bruto	2,11 ± 0,03	52,36 ± 0,01
Concentrado	2,84 ± 0,06	80,45 ± 0,01
Ultrafiltrado	0,33 ± 0,02	*

*Abaixo do limite de detecção do método

3.6. Cromatografia de troca iônica

Após ultrafiltração, a fração concentrada foi fracionada em coluna de troca iônica débil com matriz DEAE FF, sendo que o perfil cromatográfico resultante é apresentado na Figura 31.

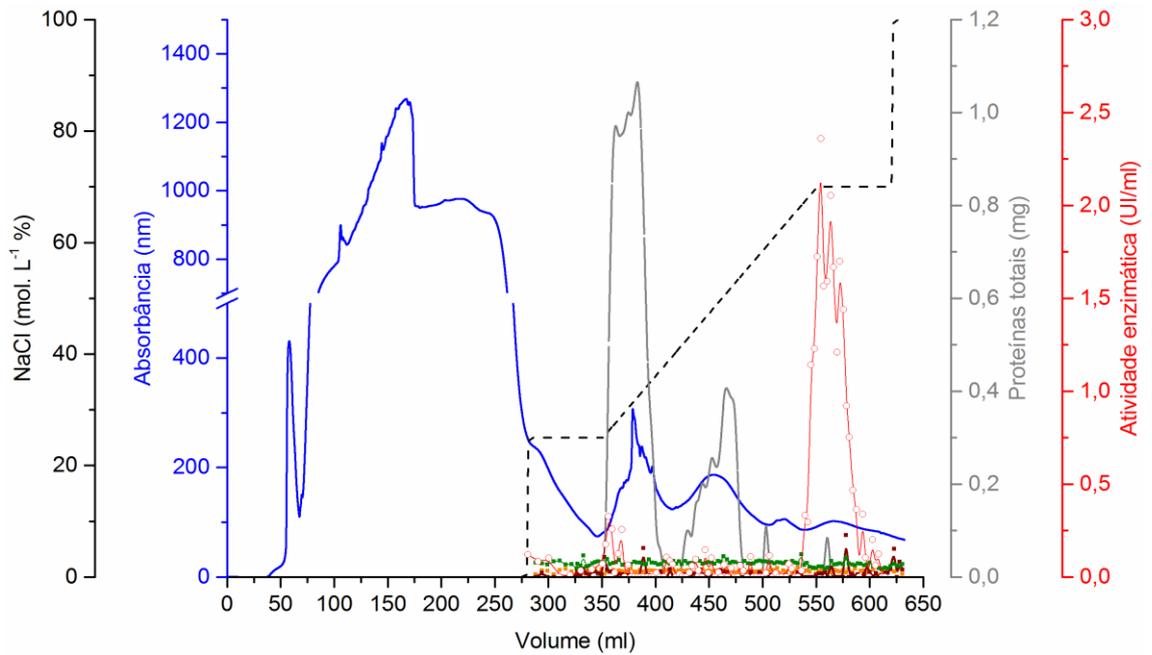


Figura 30: Perfil cromatográfico da troca iônica em resina de DEAE FF. Volume de coluna = 60 ml, volume de amostra = 200 ml, lavagem com 25% de tampão com 1 mol/L de NaCl e gradiente linear de 20-90% de tampão B, coletadas 96 frações de 3 ml em fluxo de 3 ml/min. (—) Espectro de absorvância a 280 nm, (---) Gradiente de NaCl 1M, (—) CMCCase, (—) Xilanase, (—) Mananase, (—○—) Pectinase, (—) Proteínas totais.

O cromatograma mostra que grande parte das proteínas contaminantes presentes no concentrado não se ligou à resina DEAE FF, saindo antes do gradiente de NaCl aplicado a partir de 281 ml de corrida.

A cromatografia foi realizada em passos com diferentes lavagens em porcentagens de NaCl e um gradiente linear, objetivando-se liberar gradualmente as proteínas contaminantes de acordo com o grau de interação das proteínas com a resina presente na coluna. Grande parte das proteínas totais, dentre elas celulase, xilanase e mananase eluiu logo ao início do gradiente de NaCl. Esta pré-lavagem possibilitou a eliminação de proteínas contaminantes à pectinase de interesse, que apresentou interação com a resina de troca aniônica, eluindo como um único pico e proteína dentro do gradiente de NaCl, exibindo atividade pectinolítica.

Este pico começou na fração 70, com uma atividade volumétrica de 0,34 UI/ml, (eluído com condutividade de 25,5 mS/cm de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7.4 e aproximadamente 34% de NaCl), e terminou na fração 87, com uma atividade enzimática de 0,10 UI/ml.

As frações 70 - 87 (nomeadas PEC_DEAE) foram coletadas, congeladas a -20°C e liofilizadas para posterior cromatografia de dessalinização. O processo de cromatografia em troca iônica foi repetido diversas vezes, para acúmulo de amostras.

Após liofilização, a fração PEC_DEAE foi ressuspensa em 5 ml de água Milli-Q e aplicada em coluna de cromatografia *HiPrep™ 26/10 Desalting* (Sephadex® G25 Fine) (GE Healthcare). O perfil cromatográfico da dessalinização é apresentado na Figura 32.

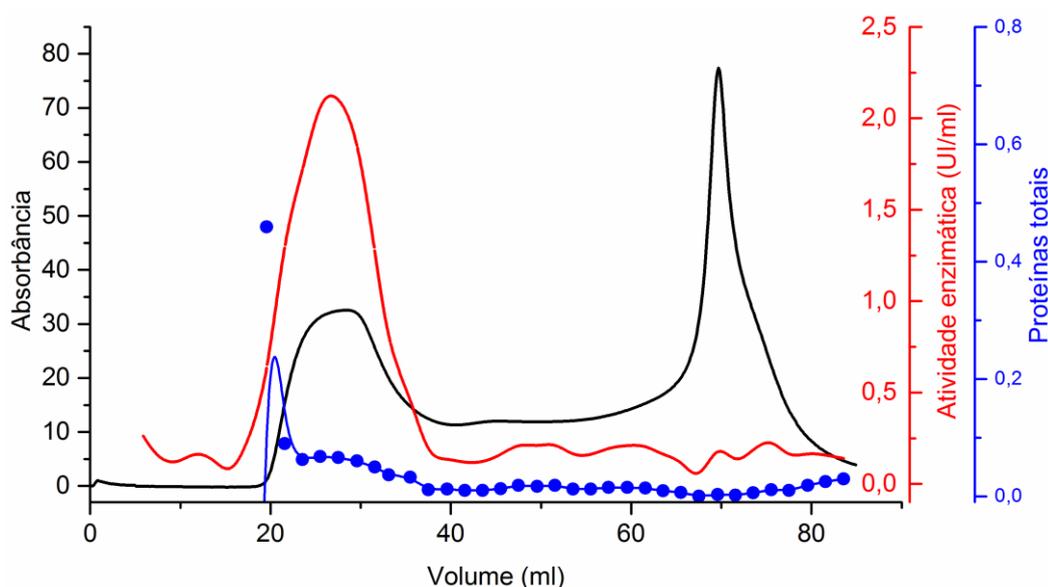


Figura 31: Perfil cromatográfico da fração PEC_DEAE em resina HiPrep 26/10 Desalting Sephadex G25. Volume de coluna = 53 ml, volume de amostra = 10 ml, coletadas 20 frações de 2 ml fluxo de 10 ml/min. (—) Absorbância a 280 nm, (—) Atividade enzimática volumétrica (UI/ml), (—•—) Proteínas totais (mg).

Ao se analisar o cromatograma, podemos observar um primeiro pico de atividade pectinolítica que coincide com o de proteínas totais. Embora a quantidade de proteínas seja pequena (0,10 mg), uma grande atividade enzimática (2,10 UI/ml) é evidenciada, demonstrando alta atividade específica (21 U/mg) da pectinase em questão. Um segundo pico é distinguido, correspondente a condutância presente na amostra PEC_DEAE, certificando a total separação das proteínas, dos contaminantes coloridos de pequeno peso molecular, contidos no extrato bruto, e dos sais presentes na amostra.

As frações 7 - 17 (nomeadas PEC2) foram reunidas para posterior cromatografia em exclusão molecular.

3.3. Cromatografia de exclusão molecular

Na cromatografia de exclusão molecular, em resina Superdex S-200 HR, a amostra resultante da cromatografia de dessalinização (Figura 33) foi fracionada, gerando um perfil de eluição contendo um pico principal bem definido. Porém, a atividade de pectinase foi observada somente no começo desse ápice. No pico predominante, observa-se que a pectinase foi eluída a partir da fração 3, com uma atividade de 0,53 UI/ml, correspondente a 44 ml de eluição (limite de exclusão superior da coluna), até a fração 12, com uma atividade de 0,19 UI/ml, o equivalente a 55 ml de eluição (Figura 34). Não houve eluição de outras proteínas com atividades enzimáticas durante o processo cromatográfico, indicando separação significativa entre as proteínas totais. Dessa forma, as frações 3 - 12 (nomeadas PEC_S200) foram reunidas para posterior análise de caracterizações bioquímicas e biofísicas.

As análises do peso molecular das proteínas presentes nas frações iniciais e finais do pico (Figura 35), a partir da calibração da coluna com proteínas padrões (marcadores moleculares – Figuras 36 e 37), demonstraram que as frações com maior atividade pectinolítica possuem 853 kDa; entretanto, as de menor atividade possuem 472 kDa.

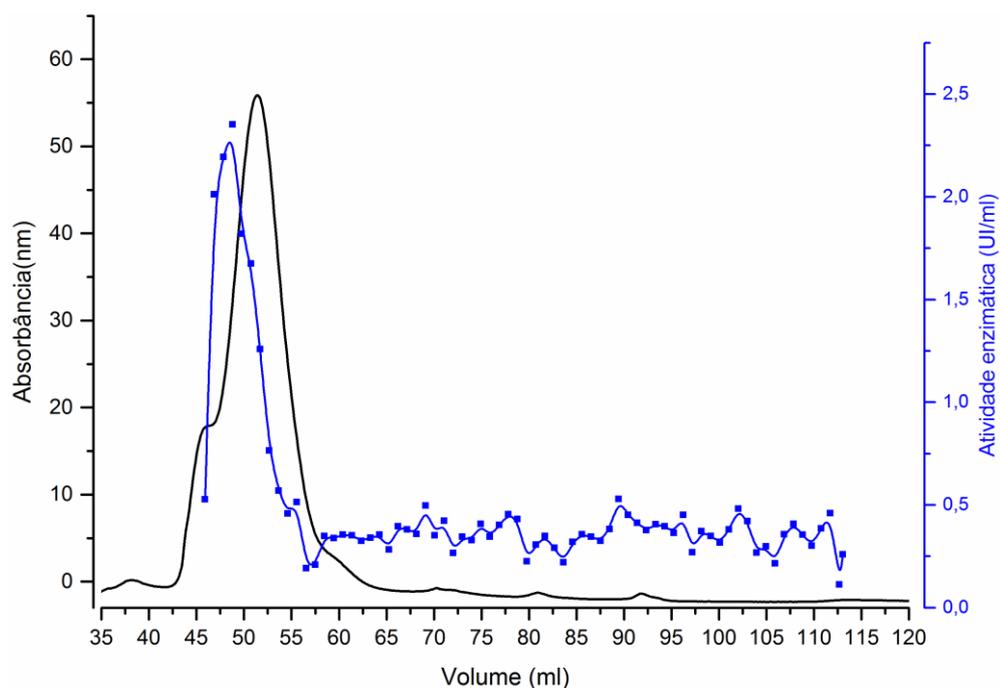


Figura 32: Perfil cromatográfico da fração PEC2 em resina Superdex S-200 de exclusão molecular. Solvente de eluição: água Milli-Q. Volume de coluna = 120 ml, volume de amostra = 2 ml, coletadas frações de 1 ml fluxo de 1ml/min. (—) Absorbância a 280 nm, (—■) Atividade enzimática volumétrica.

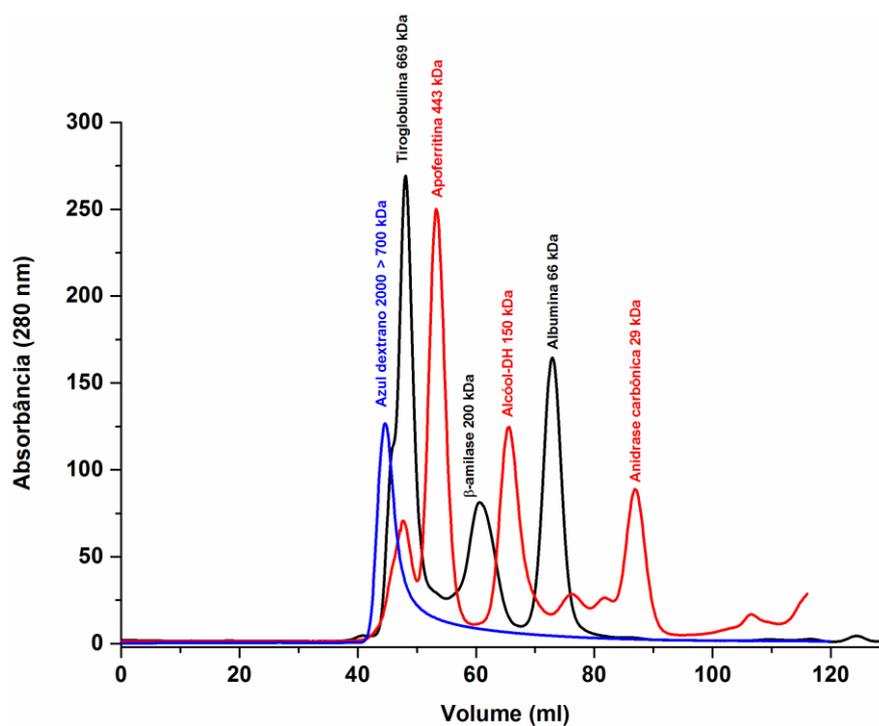


Figura 33: Perfil cromatográfico da calibração de coluna Superdex S-200 HR.

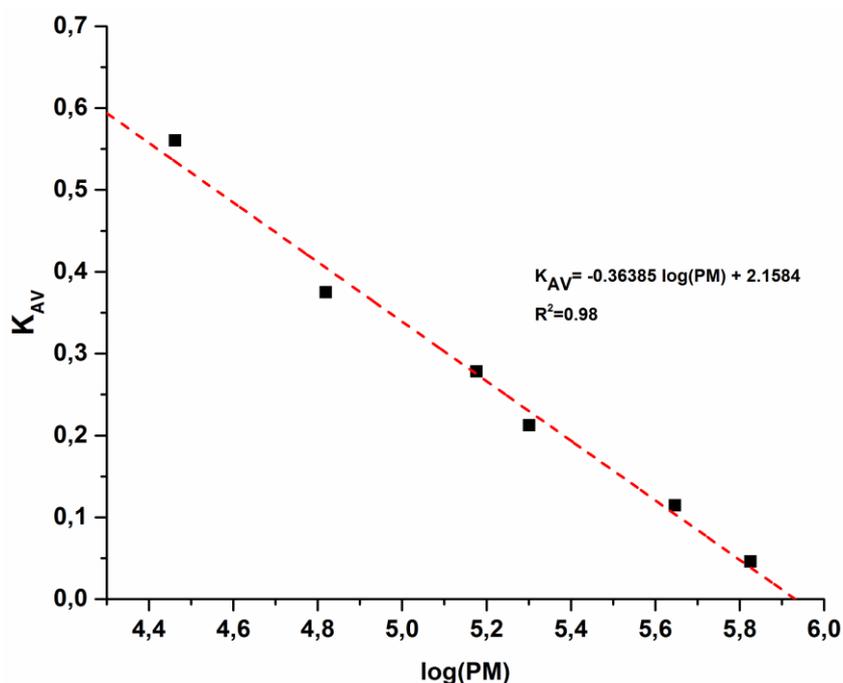


Figura 34: Equação para determinação do peso molecular das proteínas presentes nas frações com atividade pectinolíticas.

3.4. Eletroforese: SDS-Page e Zimograma

As análises por SDS-Page 12% geraram perfis eletroforéticos das proteínas do extrato bruto, fração obtida pela DEAE e fração obtida da Superdex S-200 (PEC_S200). A diversidade de proteínas da amostra do extrato bruto e fração DEAE é demonstrada pelas distintas bandas formadas no gel de eletroforese (Figura 36 - EB e DEAE). Após todas as etapas de purificação, nota-se que a multiplicidade de bandas reduz expressivamente, sendo visível a presença de aproximadamente 3 bandas após a etapa de filtração em gel, confirmando a purificação parcial da pectinase (Figura 38).

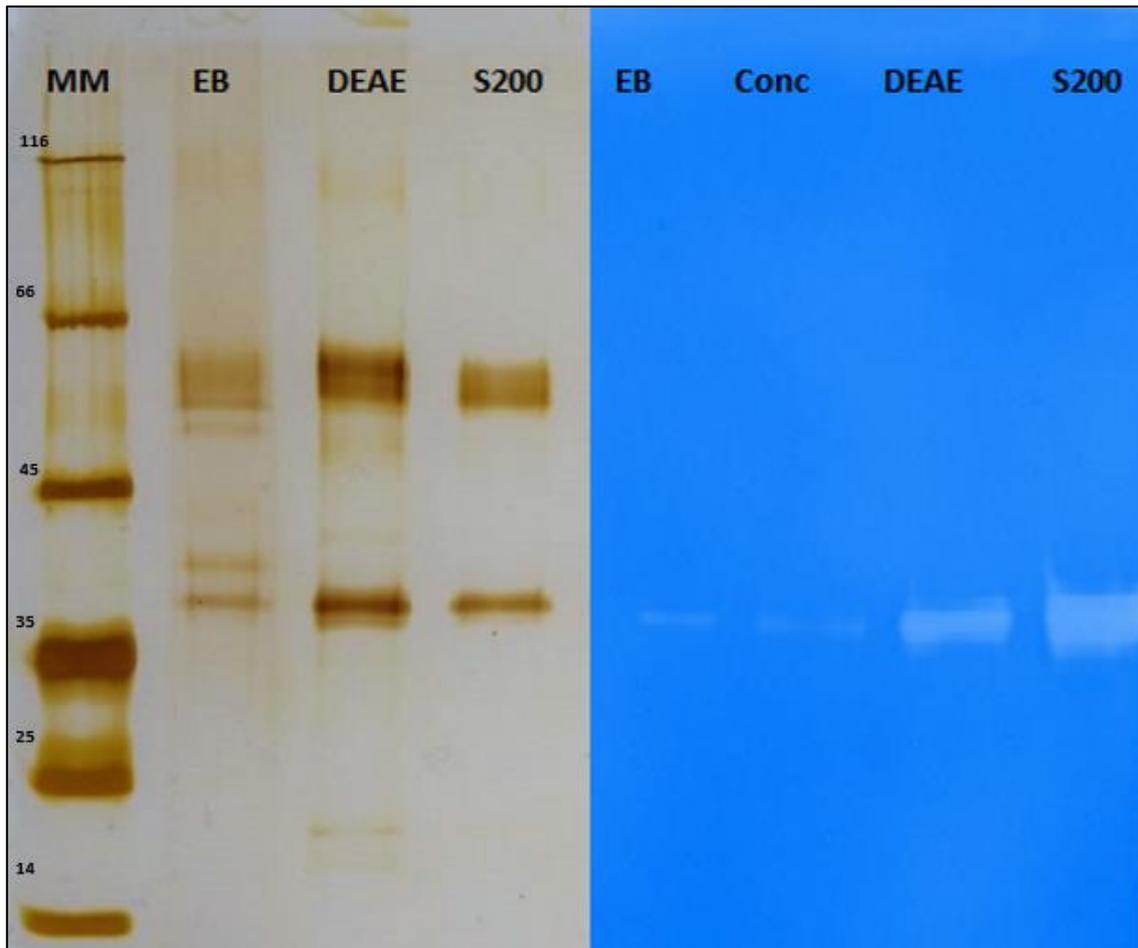


Figura 35: Gel de eletroforese em condições desnaturantes e zimograma. (MM) Marcador de massa molecular em kDa, (EB) Extrato bruto, (DEAE) fração obtida na cromatografia de troca iônica DEAE FF, (S200) fração obtida na cromatografia de exclusão molecular Superdex

Considerando-se as condições desnaturantes do SDS-Page, também é possível que a proteína com atividade pectinolítica seja constituída por um oligômero de subunidades catalíticas (≈ 38 kDa) (Figura 36) e não catalíticas (≈ 62 e 65 kDa) (Figuras 36 e 37).

Por meio do zimograma, é possível confirmar a presença de pelo menos uma proteína ou subunidade com massa molecular de 38 kDa com alta atividade pectinolítica. Contudo, não se pode descartar que as subunidades de 62 e 65 kDa também possam apresentar atividade pectinolítica, mas não foi possível registrá-la, uma vez que não ocorreu renaturação adequada durante o tratamento de coloração do método utilizado.

A ampla variação de massa molecular entre pectinases fúngicas e bacterianas é relatada na literatura na ordem de 25 a 115 kDa, a depender

do grupo de enzimas ao qual pertencem e ao substrato pécico a ser hidrolisado (Gummadi e Panda 2003; Jayani et al. 2005; Prathyusha e Suneetha 2011; Kohli e Gupta 2015; Rahman et al. 2019). Semenova e colaboradores (2003) isolaram um complexo pectinolítico composto por cinco pectinases ativas de cultura líquida de *Aspergillus japonicus*, dentre as quais duas endo-poligalacturonases de 38 e 65 kDa, duas pectina esterases com pesos moleculares semelhantes de 46 e 47 kDa, além de uma pectina liase de 50 kDa.

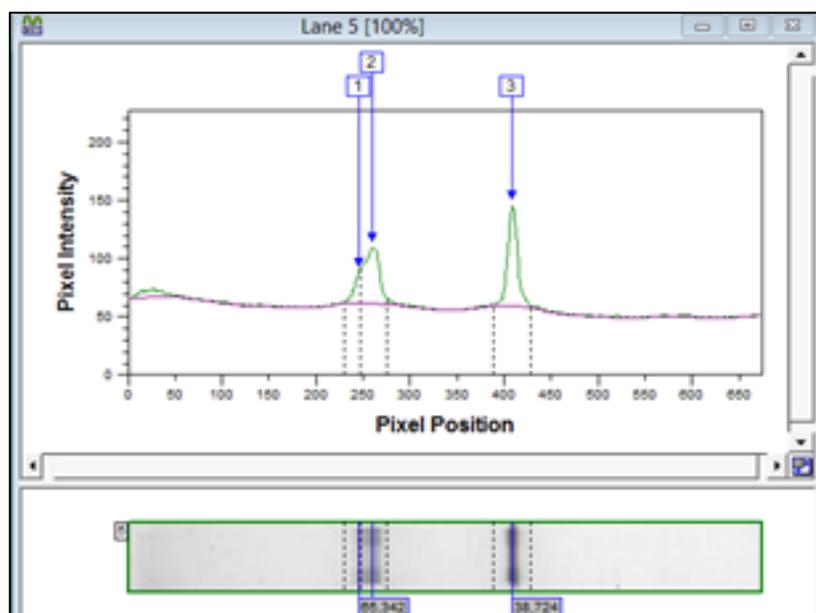


Figura 36: Avaliação das bandas do gel de eletroforese correspondente à fração PEC_S200 pelo software TotalLab 1D.

3.5. Cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes

Observando-se o perfil de eluição a partir da fração PEC2, a cromatografia de exclusão molecular em condições desnaturantes com 8 mol/L de ureia foi realizada, visando-se à identificação de uma enzima oligomérica. A Figura 38 apresenta o perfil de eluição.

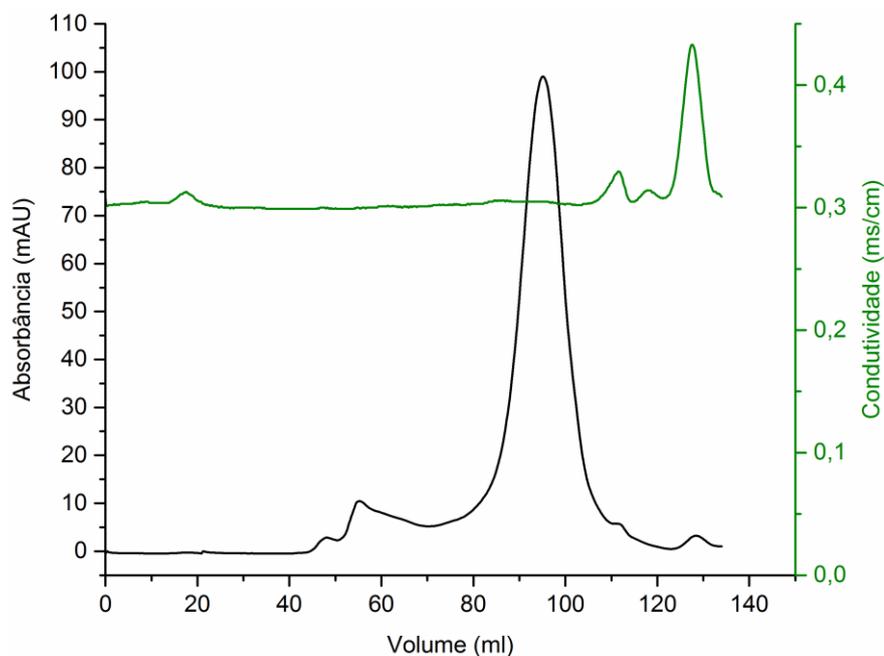


Figura 37: Perfil cromatográfico da fração PEC2 em resina Superdex S-200 de exclusão molecular desnaturante. Tampão de eluição: Ureia 8M. Volume de coluna = 120 ml, volume de amostra = 2 ml, coletadas frações de 1 ml fluxo de 1ml/min. (—) Absorbância a 280 nm, (—) Condutividade

A ureia tem sido um potente agente desestabilizante de complexos proteicos por meio da desnaturação das proteínas que a formam, podendo esta ser reversível ou não (Parente e Wetlaufer 1984). Na concentração de ureia 8 M, pode-se observar a desassociação das proteínas, verificadas como pico único na Figura 33, obtendo-se, portanto, três picos - dois dos quais bastante pronunciados, alcançando cerca de 36 kDa e 122 kDa eluídos em 55,7 e 95,6 ml, respectivamente.

Analisando-se a Figura 38, a identificação do peso molecular das proteínas eluídas nos primeiros dois picos, eluídos aos 48 e 55,7 ml, nessa ordem, permite concluir que estes apresentam massas de 853 kDa e 472 kDa, respectivamente. Esses dois picos, provavelmente, são traços dos oligômeros observados nas condições sem ureia (Figura 33), devido à similaridade apresentada pelas massas moleculares deles. O peso molecular estimado para as proteínas que eluem aos 55,7 ml é de 122 kDa (Figura 38). A partir dos resultados e considerando-se o caráter redutor das condições de SDS-PAGE e não redutor da exclusão molecular, propõe-se que as unidades catalíticas (≈ 38 kDa) e não catalíticas, ou estruturais (≈ 62 e 65 kDa), possam

permanecer unidas combinadamente sob as condições desnaturantes da ureia por ligações dissulfeto em oligômeros entre 90-122 kDa.

A Figura 39 apresenta a comparação entre os perfis cromatográficos da fração PEC_S200 em condições normais (água Milli-Q) e desnaturantes (ureia 8 M). Considerado-se o peso molecular mínimo de 853 kDa para oligômero com atividade pectinolítica (ombro linha azul) e 472 kDa para o oligômero sem atividade (resto do pico), existe uma diferença de 381 kDa entre eles, determinada principalmente pela presença das subunidades catalíticas. Então, dividindo-se os 381 kDa pelo peso molecular das subunidades catalíticas, sugere-se que, como peso máximo, o oligômero ativo possui 10 subunidades catalíticas a mais que o não ativo, e a massa molecular do oligômero não ativo e a massa média das subunidades não catalíticas (63 kDa) indicam que este é formado por 7 subunidades não catalíticas. Resumindo, os oligômeros não catalíticos são formados aproximadamente por 7 subunidades não catalíticas (62-65 kDa), que permanecem unidas, provavelmente, por ligações dissulfeto como dímeros (120 kDa) nas condições desnaturantes da ureia. Estes oligômeros podem associar-se às subunidades catalíticas, as quais também permanecem ligadas covalentemente por pontes dissulfeto às subunidades não catalíticas em dímeros ou trímeros de 90-120 kDa.

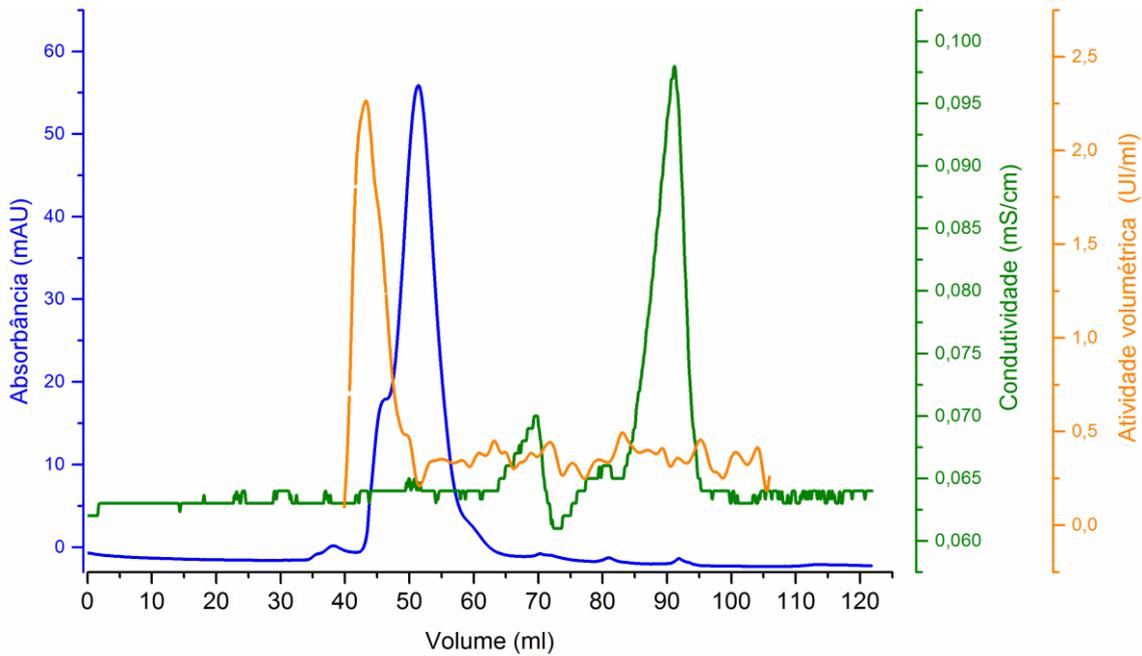


Figura 38: Comparação dos perfis cromatográficos da fração PE_S200 em resina Superdex S-200 de exclusão molecular em condições normais e desnaturantes. Volume de coluna = 120 ml, volume de amostra = 2 ml, coletadas frações de 1 ml fluxo de 1 ml/min. (—) Absorbância a 280 nm do oligômero ativo, (—) Condutividade do oligômero não ativo, (—) Atividade volumétrica (UI/ml)

A presença de diferentes enzimas na forma de oligômeros é amplamente difundida entre diferentes grupos de seres vivos. Endo e colaboradores (1993) isolaram uma α -fucosidase tetramérica de subunidades idênticas de caramujo *Pomace canaliculata*, de massa molecular de 60 kDa em SDS-Page e 260 kDa, por filtração em gel. Silva (2010) também isolou e caracterizou uma α -fucosidase oligomerizada de carrapato *Amblyomma cajennense* com massa molecular aproximada de 110 kDa em condições nativas.

Entre os microrganismos, uma infinidade de complexos oligoméricos formados por subunidades catalíticas idênticas (homo-oligomêros), ou não (hetero-oligômeros), foi identificado. Fungos metilotróficos, leveduras e ascomicetos produzem metanol oxidase (MOX) peroxissomal, ocorrendo a tradução de seus monômeros (70 – 75 kDa) no citosol, sendo posteriormente importados para os peroxissomos, para modificações pós-traducionais e montagem dos octâmeros ativos (Gunkel et al. 2004). Oliveira e colaboradores (2012) demonstraram a produção e a secreção extracelular de uma MOX por *Moniliophthora pernicioso* (basidiomiceto causador da “vassoura de bruxa”)

capaz de metabolizar metanol a partir da degradação da pectina presente nas plantas de cacau. Já Souza e colaboradores (2011) avaliaram as características bioquímicas e biofísicas de uma α -L-arabinofuranosidase hexadimérica da família GH51 produzida pela bactéria hipertermófila *Thermotoga petrophila* RKU1.

Nos vegetais, a celulose é comumente sintetizada a partir de um hétero-oligômero obrigatório, denominado complexo de síntese de celulose (CSC), que catalisa a polimerização das cadeias de glucanas individuais. Este complexo transmembrânico possui estrutura em forma de “roseta”, organizada em hexâmeros contendo 36 subunidades catalíticas de celulose sintase individuais (CESA) (Mutwil et al. 2008; Li et al. 2019). Vários genes CESA compõem os genomas de plantas superiores, estando presentes dez vezes em *Arabidopsis*, 18 no choupo e pelo menos nove em arroz (Li et al. 2019).

Alguns microrganismos anaeróbios possuem um sistema de degradação da celulose que envolve a formação de um grande complexo multienzimático extracelular chamado celulosoma. Este complexo se diferencia dos sistemas já amplamente estudados de degradação celulolítico de outros microrganismos aeróbios devido à secreção de enzimas individuais, que atuam sinergicamente na desconstrução da parede celular vegetal, embora alguns fungos anaeróbios também apresentem a produção destes complexos. Os celulosomas são compostos por proteínas fibrilares (*scaffolding protein*), com subunidades enzimáticas posicionadas ao longo das fibrilas (coesinas e módulos de ligação a carboidratos). A ancoragem destes à parede microbiana ocorre por meio de um módulo não catalítico chamado doquerina. Além de celulasas, o celulosoma pode incluir muitas outras enzimas auxiliares que degradam os compostos das paredes celulares, tais como hemicelulasas, pectinases e quitinases (Doi e Kosugi 2004).

3.6. DLS

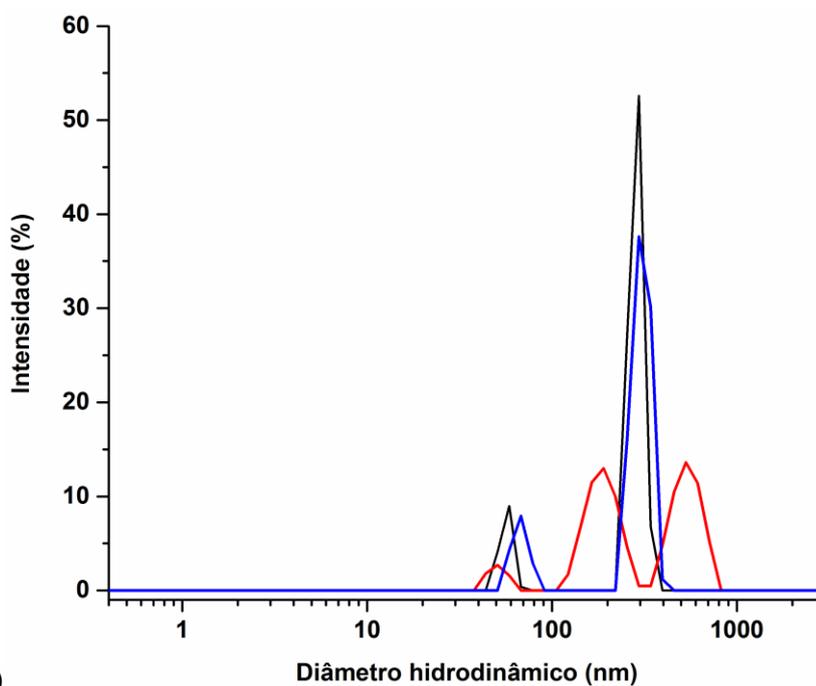
O tamanho das proteínas contidas nas frações de eluição F3-12 (nomeadas PEC_S200) do fracionamento por cromatografia de exclusão molecular em coluna *HiPrep16/60 Superdex S-200 HR*, na presença de água Milli-Q, foi determinado por medições de dispersão dinâmica da luz. Os

resultados das três medições realizadas (Figura 40) mostraram duas ou três populações de partículas, sendo que as duas com maior tamanho [Figura 40 (a)] correspondem, provavelmente, a grandes contaminantes de pó presentes na água da dissolução, como observado nas medições-controle da água. Somente foi notada uma população de proteínas monodispersa representada por o 29 - 51 % do total de partículas detectadas, com diâmetro entre 56 - 67 nm (Tabela 12). A estimativa do peso molecular dessas proteínas, utilizando-se um modelo globular e linear, indica que, com o último modelo, possuem o menor valor de 700-1200 kDa (Tabela 12). Esse valor como proteína linear é muito similar ao de peso molecular estimado para as proteínas da fração por cromatografia de exclusão molecular em coluna *HiPrep16/60 Superdex S-200 HR*. Portanto, os resultados sugerem que as proteínas eluidas no volume morto da exclusão molecular, provavelmente, possuem uma conformação não globular, porém mais linear ou fibrosa.

As análises por DLS dos dois picos de frações proteicas eluidas aos 48 ml (F11-23 PEC_S200 com ureia) e 55,7 ml (F46-67 PEC_S200 com ureia), respectivamente, da exclusão molecular desnaturante com 8 mol/L de ureia em coluna *HiPrep16/60 Superdex S-200 HR* são mostradas na Figura 40 (b). A fração F11-23 PEC_S200 ureia é minoritária e possui o mesmo volume de eluição que as proteínas que eluíram nas condições nativas em água. Portanto, o peso molecular estimado para essas proteínas é similar (600-1200 kDa) ao dos oligômeros observados nas condições sem ureia (Figura 33). Os resultados de DLS estão em correspondência com esta previsão, pelo fato de que foram detectadas populações de proteínas majoritárias (>92 %), monodispersas, com menor tamanho (≈ 20 nm) e com peso molecular estimado similar por modelo globular de 700-800 kDa (Tabela 12). Estes resultados sugerem que traços dos oligômeros, observados nas condições sem ureia (Figura 33), são estáveis ainda abaixo das condições extremas de 8 mol/L de ureia. Com relação aos resultados das análises de DLS da fração F46-67 PEC_S200 com ureia, notam-se populações de proteínas majoritárias (82-88 %), monodispersas, com menor tamanho ($\approx 16-17,3$ nm) e com peso molecular estimado similar por modelo de estrutura linear de 94-102 kDa (Tabela 12). Esses tamanhos são semelhantes aos estimados pela cromatografia de exclusão molecular em coluna *HiPrep16/60 Superdex S-200*

HR na presença de 8 mol/L de ureia em água Milli-Q. As populações de partículas com maior tamanho, observadas em ambas frações de proteínas analisadas, correspondem a grandes contaminantes de pó presentes na água com ureia da dissolução, como percebido nas medições-controle.

Os resultados estimados de peso molecular, obtidos pelas cromatografias de exclusão molecular, em condições nativas e desnaturantes, e pelas análises de DLS dessas frações, igualam-se em relação ao fato de que a enzima com atividade pectinolítica, provavelmente, é um oligômero de 600-1200 kDa formado por protômeros de 100-122 kDa, os quais, por sua vez, poderiam estar constituídos por subunidades de menor tamanho (38 kDa e 62-65 kDa), como indicam os resultados de SDS-PAGE e zimograma, que poderiam estar estabilizadas por ligações dissulfeto, em decorrência de não terem sido conduzidos experimentos na presença de agente redutor.



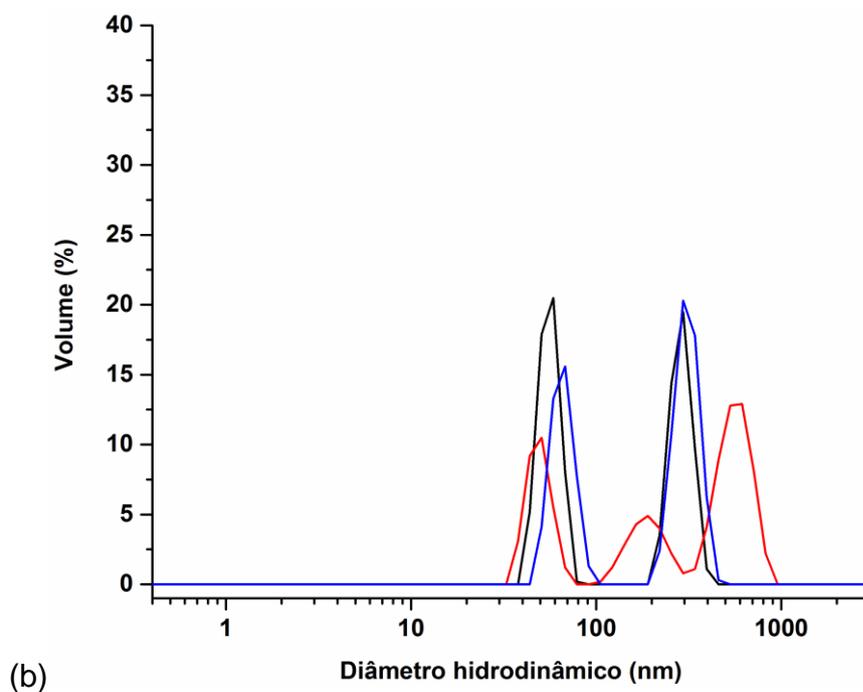


Figura 39: Distribuição de tamanho das frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep16/60 Superdex S-200 HR na presença da água por dispersão dinâmica da luz. Distribuição de intensidade (a) e volume (b) indicando que duas populações de partículas estão presentes, principalmente. As linhas pretas, vermelhas e azuis representam as leituras realizadas (—) leitura 1 (—) leitura 2 (—) leitura 3.

Tabela 12: Resumo dos parâmetros do espalhamento de luz para os picos observados: diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade (I.P.), Polidispersidade (P, Mono= Monodisperso) e pesos moleculares (P.M.).

Medições F3-12 PEC_S200	Picos	Diâmetro (nm)	Intensidade (%)	Volume (%)	I.P. (%)	P	P.M. (kDa) (globular)	P.M. (kDa) (linear)
1	1	56,63 ± 4,20	13,5	51,8	7,4	Mono	8410	873
	2	286,3 ± 24,51	86,5	48,2	8,6	Mono	373 000	16 500
2	1	50,80 ± 5,54	6,0	29,2	10,9	Mono	6520	717
	2	188,6 ± 36,76	47,7	20,3	19,5	Mono	140 000	7740
	3	537,1 ± 97,39	46,3	50,5	18,1	Mono	1 620 000	517 000
3	1	67,54 ± 6,83	15,1	42,1	10,1	Mono	12 700	1 200
	2	305,6 ± 33,3	84,9	57,9	10,9	Mono	434 000	18 600

O esquema simplificado dos passos estratégicos utilizados na purificação de pectinase de *P. formosus* é apresentado na Figura 41, e a Tabela 13 apresenta os cálculos de rendimento e índice de purificação parcial da enzima PEC_S200.

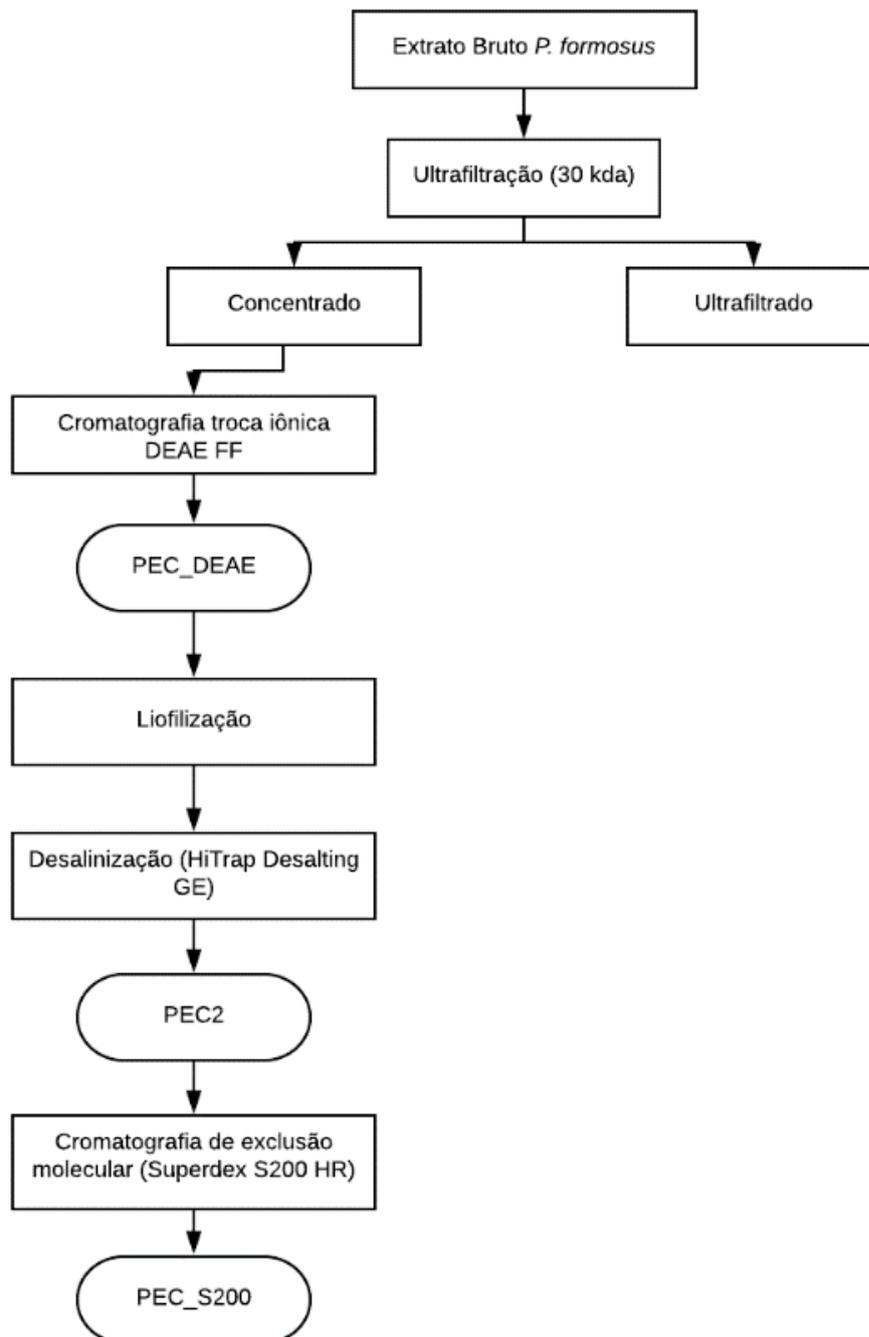


Figura 40: Fluxograma das etapas de purificação de PEC_S200

Tabela 13: Rendimento e índice de purificação parcial de PEC_S200

Etapa	Volume (ml)	Proteína (mg)	Atividade (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Índice de purificação (Vezeas)	Rendimento (%)
Extrato bruto	300	4,03	211	52,36	1	100
Concentrado	100	3,53	284	80,45	1,5	87,6
DEAE FF	55	2,37	238	100,42	1,92	58,8
HiTrap Desalting GE	20	0,89	214	240,45	4,59	22,1
Superdex S200 HR	10	0,67	226	337,31	6,44	16,6

Após as etapas de ultrafiltração, dessalinização e cromatografias, foi constatado um índice de purificação de 6,44%. Porém, como confirmado pelo perfil de proteínas da Figura 36 (S200), não foi possível alcançar a purificação total da pectinase.

O baixo grau de purificação e rendimento (16,6 vezes) pode ser potencialmente definido devido à baixa porcentagem de massa ativa (38 kDa) da enzima que compõe o oligômero, apresentando este maior massa de subunidades não catalíticas (65 e 62 kDa). Outra possível hipótese é a ausência de interação entre moléculas ativas não oligomerizadas e as resinas utilizadas nas diversas cromatografias realizadas, dificultando sua captura e isolamento para posterior análise de purificação e caracterização bioquímica.

3.7. Caracterização bioquímica pectinase

3.7.1. Determinação do efeito do pH na atividade enzimática

A Figura 42 apresenta o efeito do pH sobre as atividades enzimáticas da pectinase contidas no extrato bruto e PEC_S200 parcialmente purificada.

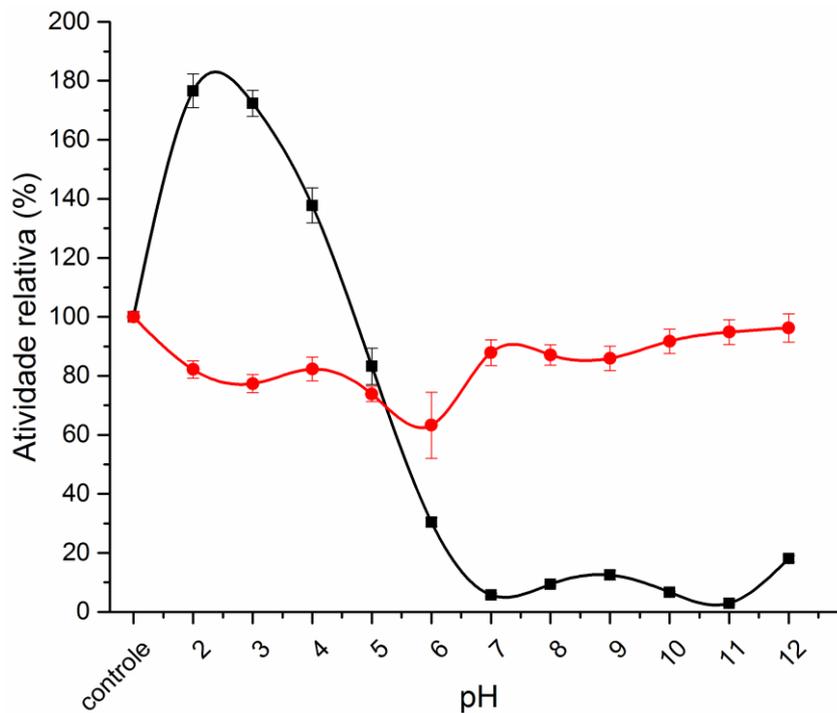


Figura 41: Efeito do pH na atividade enzimática pectinolítica do extrato bruto de *P. formosus*. (—●—) Extrato bruto (—■—) PEC_S200

A estabilidade em pH, para o extrato bruto, foi ampla, com as maiores retenções de atividade (cerca de 90%) na faixa de pH 6.5-8.0. Porém, PEC_S200 apresentou maiores retenções em faixas ácidas no intervalo de pH 2,0-5,0, indicando possível ativação em pH 2,0, onde seus níveis de atividade subiram para 176%. Resultados semelhantes foram obtidos por Li e colaboradores (2020) quando investigaram a produção de pectinase e α -galactosidase por *A. niger* em diferentes condições de pH e temperatura. Em todos os sistemas de combinações realizados, observaram que as condições de pH afetaram fortemente a produção e o funcionamento da atividade enzimática, ao passo que o pH diminuía no decorrer do crescimento celular, sendo que uma maior atividade pectinolítica era observada quando o pH do meio se apresentava entre 1,9 e 2,3, a 20°C, havendo um consistente declínio quando o pH do meio estava acima de 5,5, corroborando os resultados apresentados neste estudo.

Alterações de pH após procedimento de purificação não são comumente relatadas na literatura, exceto em casos de imobilização enzimática. Mohammadi e colaboradores (2020) realizaram estudo de

imobilização de uma pectinase de *A. aculeatus* em suporte de argila montmorilonita sililada e analisaram o efeito do pH na atividade enzimática antes e após a imobilização. O pH de maior atividade da enzima livre foi de 5,5; já para a enzima imobilizada, houve um deslocamento de apenas 0,5 ponto, atingindo pH 5.

O fato de a atividade enzimática do extrato bruto manter-se estável em faixas básicas de pH pode indicar a existência de sinergismo entre enzimas diferentes, que foram separadas durante os processos de purificação, uma vez que os fungos são descritos na literatura como produtores de pectinases ácidas, não justificando as altas atividades enzimáticas em faixa de pH alcalino.

A mudança no pH de maior atividade observada para a enzima PEC_S200 sugere aplicação na indústria animal, onde pectinases são utilizadas em consórcio com proteases, liberando peptídeos, aminoácidos e monossacarídeos, prontamente digeríveis e facilmente absorvidos, ao mesmo tempo que reduzem a viscosidade, propiciando aumento de crescimento, ganho de peso, aumento da eficiência de conversão de alimentação, aumento da digestibilidade de matéria orgânica, além da redução de fezes em aves e ruminantes (Ali 2009; Murad e Azzaz 2011).

3.7.2. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática

A Figura 43 apresenta o efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas do extrato bruto e fração PEC_S200 da água residual.

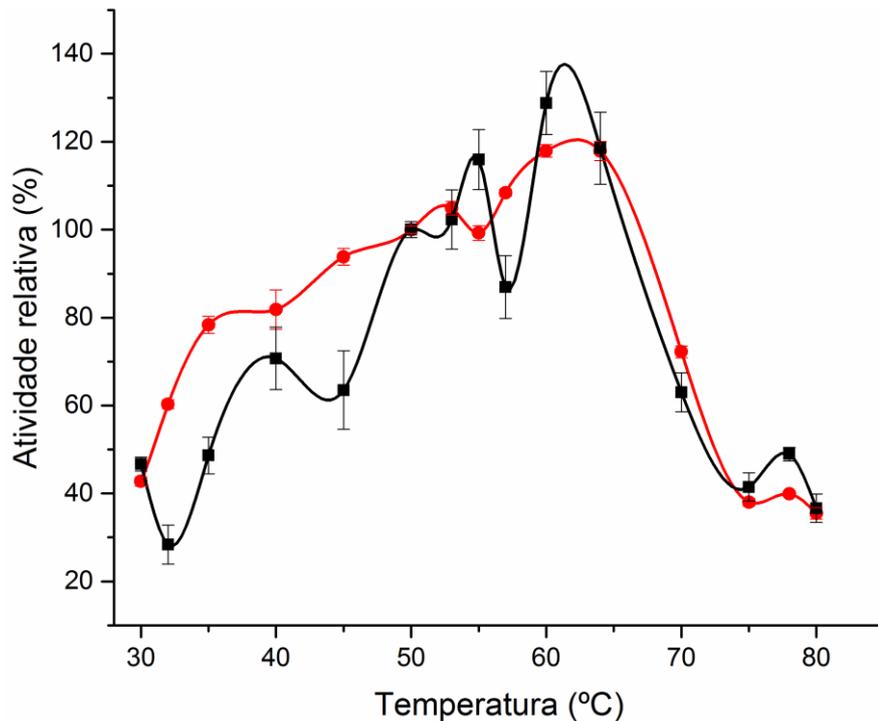


Figura 42: Efeito da temperatura na atividade enzimática pectinolítica do extrato bruto de *P. formosus* (—●—) Extrato bruto e (—■—) PEC_S200

Para a amostra de pectinase contida no extrato bruto, houve maior retenção de atividade na faixa de 55 - 65° C, enquanto a maior atividade na fração PEC_S200 foi obtida a 60 - 65 °C. Foram retidos, pelo menos, 70% da atividade máxima na faixa de temperatura entre 40 e 50 °C em todas as amostras analisadas, sugerindo que o potencial de aplicação industrial destas enzimas ocorra em altas temperaturas.

Diferentes estudos mostram que enzimas pectinolíticas podem ser estáveis e ativas em uma ampla faixa de temperaturas, variando de 30 a 80°C (KC et al. 2020). Silva e colaboradores (2002) realizaram estudos de produção e caracterização de pectina liase e poligalacturonase secretadas de *Penicillium viridicatum* a partir de seu crescimento em biomassas lignocelulósicas mistas (baraço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo e cascas de banana e manga). As frações contendo poligalacturonase apresentaram melhor temperatura de trabalho a 55 °C, enquanto aquelas que continham amostras de pectina liase, a 50 °C. Patil e colaboradores (2012) utilizaram resíduos industriais para produção e secreção de exopoligalacturonase de *P. variotii* (peso molecular 39,4 kDa), que apresentou

condições ótimas de trabalho à temperatura de 30°C. Damásio e colaboradores (2010) estudaram características físico-químicas de uma poligacturonase termoestável de *P. variotii* crescido em meio Czapeck, enriquecido com 1% pectina cítrica, que exibiu melhor temperatura de trabalho a 65°C. Já Ur Rehman e colaboradores (2020) avaliaram características físico-químicas de uma pectinase secretada por *Bacillus liqueniformis* encapsulada em gel de poli(acrilamida) (9,5% acrilamida e 0,5% bisacrilamida). A ampliação da atividade relativa da pectinase encapsulada em relação à pectinase livre manteve-se em ampla faixa de pH ácido e básico, bem como para temperaturas mais altas (acima de 45 °C).

Pectinases são amplamente utilizadas na indústria têxtil associadas a amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas, para facilitar a degradação e a eliminação da pectina e de ceras contidas nas fibras de algodão de maneira segura e ecologicamente confiável. Neste âmbito, pectinases alcalinas são mais utilizadas, enquanto pectinases ácidas e termotolerantes têm sido objeto de vários estudos (Garg et al. 2016). Antes do processo de coloração final de peças têxteis, a despigmentação das fibras naturais de algodão precisa ser executada. Preša e Tavčer (2008) realizaram o branqueamento e a limpeza de fibras de algodão utilizando uma mistura de ácido peracético 15% e coquetel comercial ácido Forylase KL (Alemanha) a 55 °C durante 1h. Após 30 minutos de incubação, 88% da viscosidade foi reduzida, sem acréscimo de redução no decorrer do tempo. No entanto, a eliminação significativa de ceras só foi eficiente em temperaturas acima de 80 °C (temperatura na qual ocorre a dissolução destas).

3.7.3. Determinação do efeito de íons e modificadores na atividade enzimática

Entender as interações específicas de enzimas com compostos iônicos ou com aqueles que não atuam em suas reações catalíticas fornece base para amplas funções e aplicações enzimáticas.

O processo de ativação enzimática por íons e outros compostos (proteínas, lipídios, peptídeos e pequenas moléculas orgânicas) ocorre devido a mudanças na conformação, estabilização e rearranjo do sítio catalítico da

enzima, promovendo, conseqüentemente, aumento da velocidade de sua atividade básica. Outros fatores podem aumentar a atividade metabólica das enzimas e também a ativação por cofatores e alterações do substrato (Smith e Simons 2004). Alguns cátions podem interagir diretamente com o substrato, modificando e intensificando suas propriedades de modo a aumentar a afinidade da enzima com este. Os íons ativadores mais relatados na literatura são Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e K^+ (Lopina 2016).

O processo de inibição enzimática pode ocorrer de diferentes formas, que incluem desde a inibição do produto e substrato, resistência da transferência de massas entre eles, efeitos do tamanho de partículas e ligação improdutiva entre a enzima e lignina (Ximenes et al. 2010). Como resultado da ligação do inibidor à molécula da enzima, acontece a supressão da atividade que interrompe a reação catalítica (Lopina 2016). O modo de ação dos inibidores enzimáticos pode ser reversível ou irreversível, sendo que inibidores irreversíveis geralmente reagem com a enzima de forma a alterá-la química ou estruturalmente. Inibidores reversíveis podem ser competitivos ou não competitivos, dependendo de seu ponto de entrada no esquema de reação enzima-substrato. Em ambos os casos, o inibidor é ligado à enzima por meio de uma combinação adequada de forças tempo dependente (Smith e Simons 2004; Ximenes et al. 2011; Lopina 2016). Destaca-se que os principais íons com atividade inibitória são Hg^+ , Fe^+ , Cu^+ (Lopina 2016).

A fração parcialmente purificada PEC_S200 foi submetida a ensaios com reagentes que poderiam modular sua atividade enzimática, e o resultado dessa dessa caracterização pode ser visto na Figura 44.

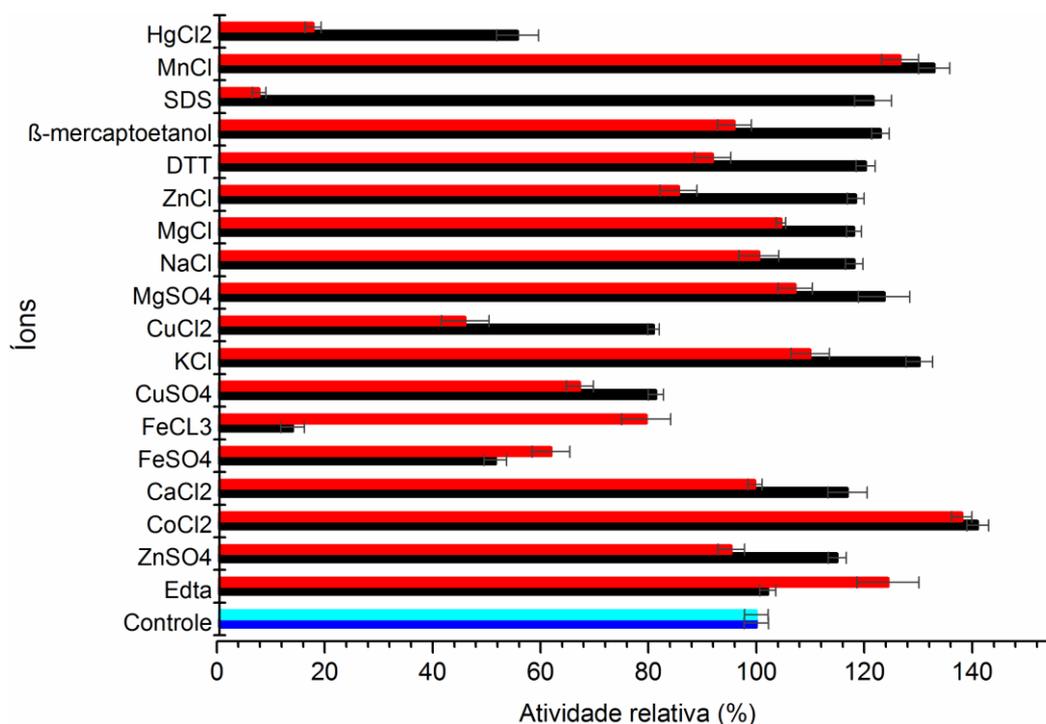


Figura 43: Efeito de íons e reagentes modificadores da atividade pectinolítica de *P. formosus*. (■) reagentes na concentração de 1 mM (■) Controle enzimático concentração 1mM (■) reagentes na concentração de 10 mM (■) Controle enzimático concentração 10mM

Dentre os íons que apresentaram ativação do sítio ativo, em ambas as concentrações analisadas (1 e 10 mM), estão os compostos CoCl₂, KCl e MnCl₂. O efeito ativador de K⁺ sobre enzimas holocelulolíticas é amplamente descrito na literatura, por estar incluído no grupo de moléculas inorgânicas que atuam como cofatores enzimáticos (Smith e Simons 2004). Em contrapartida, a grande maioria dos estudos apresenta Co²⁺ e Mn⁺ como inibidores enzimáticos (Karbassi e Vaughn 1980; Ahmed 2018), sendo que o presente estudo identificou aumento da atividade pectinolítica de 41% e 38% quando as enzimas foram expostas a CoCl₂, bem como 33% e 27% ao composto MnCl₂ em concentrações de 1 e 10 mM, respectivamente. Uma possível hipótese para ativação enzimática por cloreto de manganês se deve ao fato de sua alta capacidade de gerar soluções ligeiramente ácidas (pH 4,0) em soluções aquosas, uma vez que a faixa ácida de pH foi a que melhor reteve a atividade enzimática da pectinase do presente estudo (Swaddle 1997).

Analisando-se a concentração de 1 mM, observa-se ativação pectinolítica na presença dos compostos ZnSO₄, ZnCl, CaCl₂, MgSO₄, NaCl, DTT, β-mercaptoetanol, SDS, aumentando a atividade em 15%, 18%, 24%, 20%, 18%, 23% e 22%, respectivamente.

Os cátions metálicos Zn²⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ são cofatores que possibilitam a catálise enzimática e que podem atuar como ativadores ou inibidores, dependendo da concentração com que são aplicados. Em concentrações de 0 – 30 mM, metais alcalinos, bem como K⁺ e Na⁺, podem aumentar a atividade enzimática (Banu et al. 2010). Em alguns casos, tais cofatores podem aumentar a atividade enzimática por meio da formação de complexos com outras moléculas (Smith e Simons 2004; Lopina 2016). O pectato de cálcio e o pectato de magnésio, presentes nas substâncias pecticas da lamela média em vegetais, podem interferir na formação de tais complexos, uma vez que pectato liases são dependentes de cálcio para catálise, e pectina liases podem ser estimuladas por Ca² e outros cátions (Jayani et al. 2005). O íon Mg²⁺ (assim como Mn⁺) é um ácido de Lewis fraco que atrai pares de elétrons livres dos átomos de oxigênio, formando ligações glicosídicas na presença de água, ocasionando a terminação da ligação da enzima com o substrato e a formação de monômeros de açúcares redutores. Além disso, reage com íons cloreto, formando complexos metálicos durante sua oxidação. A determinação do efeito de Mg²⁺ na atividade pectinolítica de *Bacillus firmus* foi avaliada por Anggraini e colaboradores (2020), que, durante a caracterização, observaram que concentrações abaixo de 4 mM funcionavam como ativadores da enzima, formando um complexo com o substrato. Já em concentrações na faixa de 6 a 10 mM, a atividade enzimática diminuiu devido à não atração livre da pectinase com a pectina e ao bloqueio da ligação da enzima ao substrato.

O efeito de vários íons metálicos foi avaliado por Ahmed (2018) na caracterização de uma pectinase produzida pela levedura *Geotrichum candidum* fermentada em pectina cítrica como única fonte de carbono. Os resultados indicaram ativação enzimática na presença de 1 mM de ZnSO₄ e CaCl₂ e 5 mM de MnCl₂, NaCl e inibição alostérica por CoCl₂, MgSO₄ e EDTA.

A ativação pectinolítica por DTT, β-mercaptoetanol e SDS sugere a presença de grupamentos tiol no sítio catalítico desta enzima, uma vez que estes compostos atuam no afrouxamento das ligações dissulfeto presentes no

sítio catalítico enzimático (Jiang et al. 2019). A baixa concentração aplicada, associada ao curto intervalo de tempo durante a caracterização, permitiu a desagregação do oligômero e conseqüente expansão do sítio ativo sem que houvesse perda da conformação enzimática, criando acesso livre ao sítio catalítico, aumentando, assim, a velocidade da reação enzimática.

Na concentração de 10 mM, observou-se a ativação enzimática por EDTA, a qual se deve à supressão de inibidores atuando como agente quelante na ligação de cátions inibidores, eliminando o efeito destes, além da formação de complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, como magnésio e cálcio, em condições alcalinas, e Mn, Fe, Zn, Co, Cu, Pb e Ni em condições ácidas (Swaddle 1997; Lopina 2016). A utilização de EDTA em associação a uma pectinase termoestável de *B. subtilis* como agente quelante e umectante na desengomagem e bioescoragem de tecidos de algodão e micropólio foi avaliada por Ahlawat e colaboradores (2009). Notou-se que a adição de EDTA na solução de enzima acelerou significativamente ambos os processos de remoção das impurezas do tecido de algodão e a degradação das frações de tegumento, indicando efeito sinérgico entre enzima e EDTA. Além disso, modificou a estrutura do substrato, removendo os íons de cálcio das pontes cruzadas que ligam as macromoléculas de pectina entre si, sugerindo auxílio na criação de áreas livres e acessíveis para a enzima presente.

A desativação/inibição da atividade pectinolítica por FeCl₃, FeSO₄, CuCl₂ e HgCl₂, em ambas as concentrações analisadas, além de SDS 10 mM, foi demonstrada. O efeito inibitório de Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Hg⁺ sobre pectinases é relatado em diversos trabalhos (Karbassi e Vaughn 1980; Smith e Simons 2004; Ximenes et al. 2010; Patil et al. 2012; Martos et al. 2014; Lopina 2016; Trindade et al. 2016; Ahmed 2018). A inibição realizada pelo íon Hg²⁺ reforça a interação deste com grupos sulfidríla (-SH) e com os resíduos de cisteínas presentes no grupamento tiol do sítio catalítico enzimático ou em seus arredores (Silva 2014; Jiang et al. 2019).

Surfactantes constituem uma importante classe de químicos industriais que apresentam capacidade de agregar estruturas em soluções aquosas. A formação de micelas ocorre quando tais soluções estão diluídas, e a concentração crítica de micelas, da qual os agregados são observados,

depende da estrutura molecular do surfactante, caráter iônico, concentração e condições termodinâmicas da reação. Pelo fato de o SDS ser um surfactante iônico que se autoagrega em micelas esféricas em concentrações aproximadas de 8 mM a 8,5 mM, quando acondicionados em água, em temperaturas de 4 a 25 °C, sem nenhuma adição de sal, pode-se inferir que, no atual estudo, a concentração crítica micelar foi atingida de forma a inibir a atividade pectinolítica em questão (Khan e Shah 2008; Ruiz-Morales e Romero-Martínez 2018).

Um padrão de comportamento foi identificado na atividade enzimática a partir da inclusão de íons Cl aumentando a atividade pectinolítica, de forma a ativá-la. Por ser um forte agente oxidante presente em uma infinidade de compostos iônicos, bem como em materiais orgânicos clorados, que variam desde substâncias inertes a tóxicas, tais como pesticidas e clorofluorcarbonetos (Vaillancourt et al. 2005), a ativação enzimática a partir destes íons sugere que eles possam estar diretamente interligados ao seu sítio ativo ou mesmo à capacidade de detoxificação de compostos químicos presentes no gênero do fungo secretor de tal enzima (Ogawa et al. 2003; Oka et al. 2014; Laguna et al. 2015; Mioso et al. 2015; Oka et al. 2015)

3.7.4. Determinação do efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática

Os compostos fenólicos solúveis, derivados de lignina, são gerados a partir das tecnologias de pré-tratamento e possuem diferentes maneiras de interagir com as proteínas. Uma delas é através da formação de ligações covalentes e não covalentes, causando mudanças na conformação proteica e ocasionando a desativação/inibição enzimática, bem como a capacidade fermentativa de bactérias e leveduras (Ladeira Ázar et al. 2018). Embora tais mecanismos de inibição ainda não estejam completamente elucidados, a investigação do modo de atuação sobre as enzimas holocelulolíticas é importante para aprimoramento dos processos de conversão, sacarificação e degradação enzimática destes.

Para investigar o potencial inibitório sobre a atividade da pectinase contida na fração PEC_S200, foram realizados ensaios enzimáticos na

presença de cada um dos compostos analisados (Figura 45) separadamente. O termo inibição será empregado para se referir à diminuição imediata da atividade enzimática.

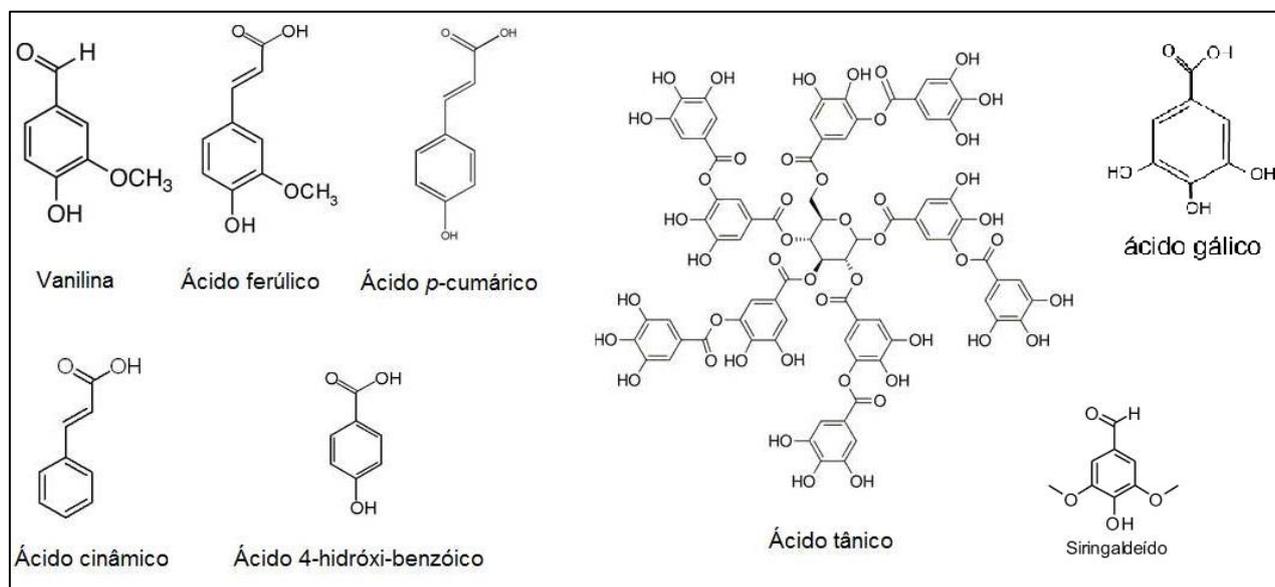


Figura 44: Estrutura dos compostos fenólicos testados sobre a atividade de PEC_S200

Os resultados de inibição, obtidos a partir da incubação dos compostos fenólicos e PEC_S200, são apresentados na Figura 46.

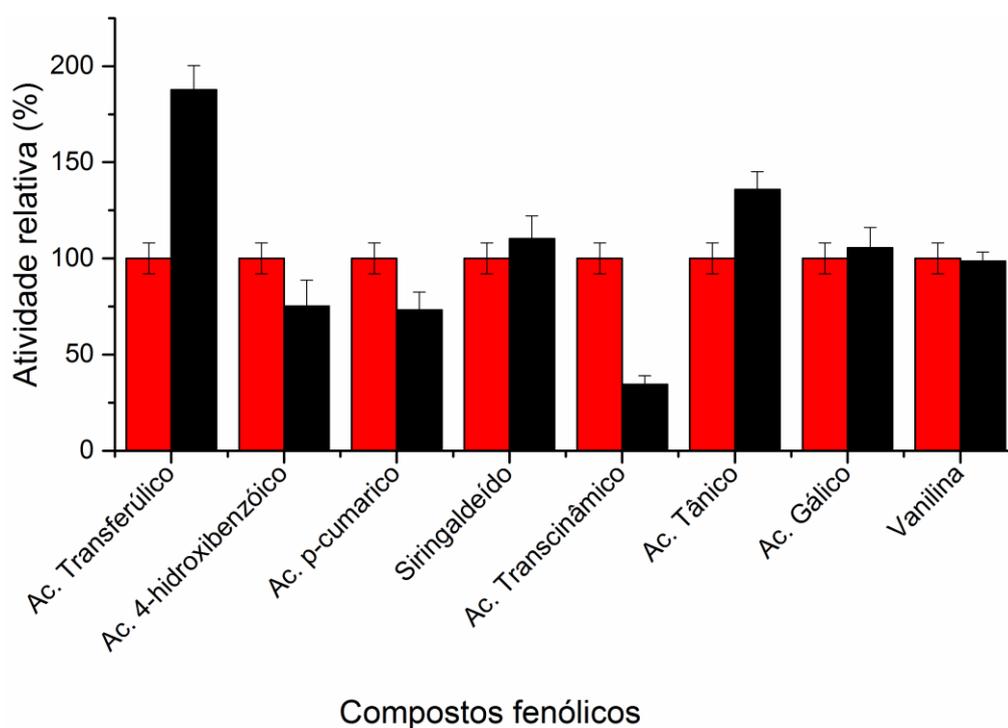


Figura 45: Efeito de compostos fenólicos na atividade enzimática pectinolítica de PEC_S200 de *P. formosus*. (■) Controle enzimático concentração 2 mg/ml

Como mostrado na figura 48 pode-se observar que os compostos: ácido 4-hidroxibenzóico, ácido *p*-cumárico e ácido transcinâmico inibiram a atividade pectinolítica em 25%, 26% e 66%, respectivamente. Ácido transferúlico e ácido tânico mostraram aumento da atividade relativa, enquanto siringaldeído, ácido gálico e vanilina não alteraram a atividade.

O ácido tânico popularmente chamado tanino pertence ao grupo dos compostos fenólicos produzidos em alguns vegetais como metabólito secundário que possui importante papel de proteção no mecanismo de defesa destes contra infecções microbianas, principalmente. Por serem polifenóis hidrossolúveis apresentam como característica determinante a adstringência (capacidade de se ligar a outras moléculas) e turbidez; estão presentes na maioria dos tecidos vegetais (folhas, sementes, raízes e frutos) (Prommajak et al. 2020). Em subprodutos de café são componentes estruturais liberados durante o processo de pré-tratamento (Murthy e Madhava Naidu 2012; Murthy e Naidu 2012; Villa-Montoya et al. 2017).

O gênero *Paecilomyces* é descrito como produtor de tanases (Battestin e Macedo 2007), portanto sua alta familiaridade a esse composto possibilita efeito sinérgico entre tanases e pectinases, uma vez que as pectinases atuam na remoção imediata da turbidez e tanases agem na diminuição da adstringência (Cerreti et al. 2016). Acredita-se, portanto, que este seja o principal motivo pelo quais os resultados obtidos nesse estudo sejam controversos a literatura existente, demonstrando aumento de 35% da atividade pectinolítica imediata e 15% após 24h (dados não mostrados) na presença de ácido tânico quando em sua maioria este reduz hidrólise enzimática.

O ácido transferúlico não causou inibição ou desativação de PEC_S200 de *P. formosus*, aumentando sua atividade em 187% inicialmente e retendo sua atividade em 120% após 24h (dados não mostrados). O aumento de atividade pectinolítica foi descrito em outros trabalhos. A hidrólise de pectina pelo extrato bruto e pectinase parcialmente de *A. terreus* foi aumentada em 190% e 160% pela presença de ácido ferúlico (Vaz et al. 2020). A

metabolização de ácido ferúlico pelos fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* foi descrita por Rahouti e colaboradores (1989), sugerindo que a ativação por este composto seja possível pela eliminação do efeito inibidor, uma vez que o grau de inibição por fenólicos é dependente da correlação linear e não-linear entre as proteínas e os compostos derivados de lignina (Ximenes et al. 2011; Qin et al. 2016).

A comparação dos resultados deste trabalho com a literatura mostra que o efeito de compostos fenólicos sobre pectinases varia de acordo com as enzimas, os compostos, as concentrações utilizadas, as temperaturas de ensaio testadas e os microrganismos produtores, podendo haver inibição, desativação, manutenção ou ativação da enzima.

3.7.5. Determinação de estabilidade da atividade enzimática em etanol

A partir dos experimentos com compostos fenólicos foi possível observar que a atividade de PEC_S200 manteve-se estável por longos períodos de tempo. Tal efeito estimulou a investigação do efeito do etanol sobre a atividade pectinolítica de *P. formosus*. A figura 47 mostra o efeito do etanol sobre a atividade enzimática.

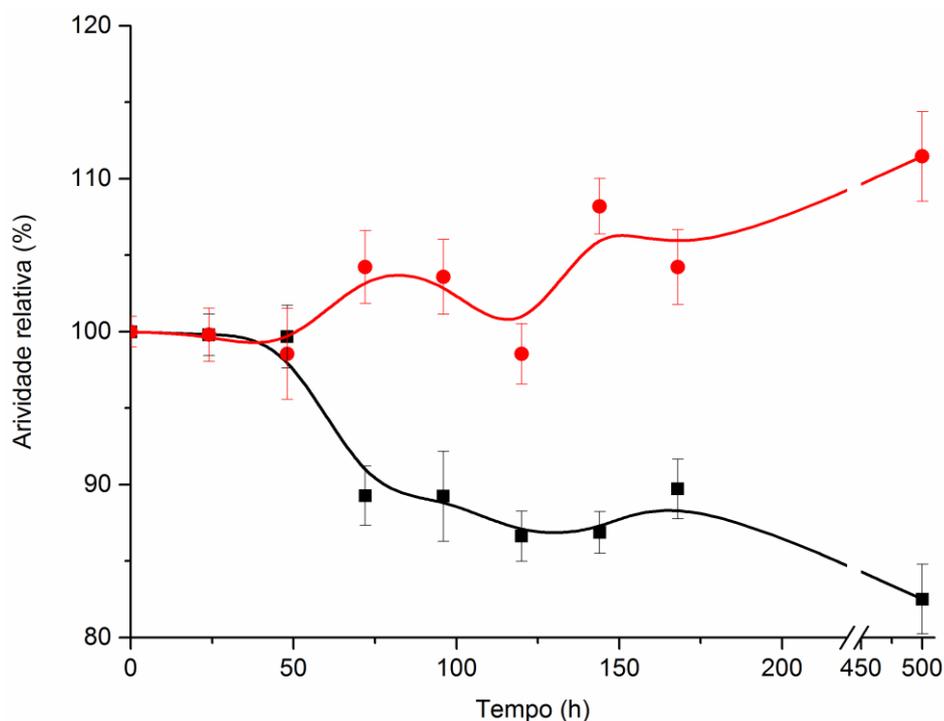


Figura 46 Efeito do etanol na atividade enzimática pectinolítica de *P. formosus* (▪) PEC_S200 (•) PEC_S200 incubada em etanol 20%

Os dados apresentados anteriormente mostram que PEC_S200 é estável na presença de etanol a 28°C. Além do mais, este aumentou 11% de sua atividade a 20% (v/v) (correspondendo a 157,8 g/L), em contraste com a perda de atividade em 18% na ausência deste composto. A inibição de holocelulases por etanol é um problema potencial em processos que utilizam fermentação e sacarificação simultâneas, diminuindo os rendimentos finais de etanol (Wu e Lee 1997). A identificação de meia-vida de 72h indica que este complexo enzimático é um candidato à aplicação em processos fermentativos sólidos onde alta tolerância a etanol é requerida. Adicionalmente, 100% da atividade pectinolítica foram mantidos depois de 6 meses (dados não mostrados) em incubação com etanol a 4°C. Os mecanismos pelos quais o etanol interfere na atividade enzimática são desconhecidos, mas alterações conformacionais e na flexibilidade da estrutura proteica podem estar envolvidas, sendo que estudos mais aprofundados devem ser realizados para desvendá-las.

Inúmeras aplicações de enzimas pectinolíticas têm sido descritas na indústria biotecnológica: emprego na produção e clarificação de sucos,

auxiliando na redução da viscosidade durante esses processos (Sethi et al. 2016; Mahmoodi et al. 2017); produção de etanol de primeira e segunda geração, onde o enriquecimento com estas enzimas melhora a eficiência da conversão enzimática dos polissacarídeos em monômeros fermentescíveis pelas leveduras produtoras de bioetanol (Zavala-Páramo et al. 2020); durante o processo de produção de vinho, sendo as mais importantes enzimas utilizadas, pois atuam de forma multifuncional na trituração das uvas, liberação de pigmentos e fenólicos, na sedimentação de partículas suspensas e na melhora das características organolépticas frente aos compostos fenólicos e antocianinas, além de colaborarem na intensificação do sabor e do aroma finais (Sieiro et al. 2012).

Pectinases capazes de se manterem ativas em altas concentrações de etanol são relevantes para as indústrias, pois se tornam inibidores no decorrer do processo fermentativo. Merín e de Ambrosini (2015) avaliaram o potencial enológico de pectinases produzidas por leveduras não *Saccharomyces* em baixas temperaturas e verificaram alta tolerância a compostos inibitórios, como etanol 15% e dióxido de enxofre (120 mg/ml), na retenção de 84% da atividade. Em consonância com estes resultados, Sahay e colaboradores (2013) identificaram enzimas pectinolíticas ativas de *Cystofilobasidium capitatum* e *Rhodotorula mucilaginosa* em baixas temperaturas de crescimento (6 e 12°C, respectivamente, capazes de manter cerca de 50% e 80% de suas atividades ótimas, nessa ordem, em condições ácidas de pH (3,5) e temperaturas variando entre 6 e 12°C.

3.7.6. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos para a pectinase da fração PEC_S200 foram determinados a partir de regressão não linear e do ajuste de curva hiperbólico, sendo apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros cinéticos de PEC_S200

Enzima	K_m ($\mu\text{g/ml}$)	$V_{\text{máx}}$ (UI/ml)
PEC_S200	0,029	4,51

A $V_{\text{máx}}$ mostra a taxa catalítica máxima de conversão de substrato para o produto desejado quando todos os locais ativos da enzima estão saturados com o substrato. A concentração de substrato na metade do valor $V_{\text{máx}}$ é considerada como o valor da constante de afinidade (K_m). Um K_m alto indica afinidade fraca da enzima para seu substrato, que depende dos efeitos de difusão do tipo de substrato e das condições ambientais, como pH, temperatura e força iônica (Anggraini et al. 2020; Mohammadi et al. 2020).

De acordo com a literatura, os resultados apresentados sugerem alta afinidade enzimática pelo substrato com taxa de conversão mediana. Valores similares de K_m têm sido descritos por vários microrganismos produtores de poligacturonases, tais como 0,173 mg/min em *Wickerhamomyces anomalus* (Martos et al. 2014), 0,3105% de *Bacillus firmiculis* com substrato enriquecido por magnésio (Anggraini et al. 2020), 0,021 mg/ml e $V_{\text{máx}}$ 410,43 U/mg de *Bacillus paralicheniformis* (Rahman et al. 2019). Alguns trabalhos apresentam valores elevados de K_m e $V_{\text{máx}}$ sobre a cinética de pectinases, como apresentado por Vaz e colaboradores (2020) na caracterização de PGA livre de *A. terreus* relatados por 24,54 $\mu\text{g/ml}$ e 1,39 $\mu\text{g/min}$. No trabalho de Banu et al. (2010), foi expressa uma pectinase de *P. chrysogenum* de massa 31 kDa com K_m de 1,0 mg/ml e $V_{\text{máx}}$ de 85 U/mg, respectivamente. Suresh e Viruthagiri (2010) caracterizaram uma pectinase de *A. niger* produzida em farelo de trigo e casca de arroz sob condições ótimas de pH e temperatura com massa de kDa, K_m de 294,12 e $V_{\text{máx}}$ de 2,33 U/mg.

4. Conclusões

O presente capítulo teve como objetivos a produção e a purificação de uma pectinase a partir da água residual do processamento de café como meio indutor de *P. formosus*. Este resíduo se mostrou eficiente na indução enzimática sem necessidade de nenhum tipo de pré-tratamento lignocelulósico.

Foram aplicadas diferentes abordagens de purificação; no entanto, não foi possível chegar à purificação total da pectinase, determinando-se que essa enzima é formada por um hetero-oligômero entre proteínas de massas moleculares distintas, onde somente parte deste oligômero possui atividade catalítica caracteristicamente ácida, termoestável, estável em etanol e

altamente catalítica ao seu substrato. Destaca-se a não ocorrência, na literatura, de uma pectinase com tais características oligoméricas.

Diante das especificidades apresentadas pela pectinase deste estudo, as melhores aplicações seriam nas indústrias: alimentar humana, têxtil, de rações animais e de produção de etanol de 2ª geração.

5. Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras, propõe-se otimizar o processo de purificação enzimática, de modo a aumentar o rendimento final, e também dar prosseguimento aos estudos estruturais do oligômero, realizando-se experimentos de cunho biofísico (ultracentrifugação, dicroísmo circular e coeficiente de extinção molecular proteico), com identificação da enzima purificada por meio de análise em MALDI-TOF LS, além da análise da termoestabilidade na presença dos principais ativadores enzimáticos. Outra perspectiva é a elaboração de mapas proteômicos para identificação das diferentes proteínas secretadas por *P. formosus*, crescido nos variados resíduos de café (água residual, casca e polpa), e a verificação da presença de pectinases glicosiladas. A análise do secretoma auxiliará na descrição da indução diferenciada das fontes de carbono e como estas influenciam no processo de excreção enzimática do fungo.

6. Referências

- Aguiar LL, Andrade-Vieira LF, de Oliveira David JA (2016) Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133:366–372 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.019
- Ahlawat S, Dhiman SS, Battan B, Mandhan RP, Sharma J (2009) Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry* 44:521–526 . doi: 10.1016/j.procbio.2009.01.003
- Ahmed A (2018) Production and regulation of pectinases from indigenously isolated yeast strains. University of Karachi

- Ali A (2009) Use of Pectinases to Improve the Nutritive Value of Lupins for Poultry. University of Western Australia
- Anggraini DP, Sulistiana D, Agustina DK, Ulimaz A (2020) Determination of Kinetic Parameters and The Effect of Ion Mg²⁺ Inhibition Into Pectinase Activities. *Jurnal Penelitian dan Pengkajian Ilmu Pendidikan: e-Saintika* 4:112 . doi: 10.36312/e-saintika.v4i2.170
- Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniestra-Gonzalez G (1993) Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 15:254–260 . doi: 10.1016/0141-0229(93)90146-S
- Banu AR, Devi MK, Gnanaprabhal GR, Pradeep B V., Palaniswamy M (2010) Production and Characterization of Pectinase Enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology* 3:377–381
- Battestin V, Macedo GA (2007) Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* 98:1832–1837 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.06.031
- Bischoff KM, Shi L, Kennelly PJ (1998) The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 260:1–17 . doi: 10.1006/abio.1998.2680
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins. *Electrophoresis* 8:93–99
- Bonilla-Hermosa VA, Duarte WF, Schwan RF (2014) Utilization of coffee by-products obtained from semi-washed process for production of value-added compounds. *Bioresource Technology* 166:142–150 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.05.031
- Caicedo M, Barros J, Ordás B (2016) Redefining agricultural residues as bioenergy feedstocks. *Materials* 9:1–22 . doi: 10.3390/ma9080635
- Carames M, Damaso T, Terzi C, Farias AX, Oliveira CP De, Fraga ME, Couri S (2012) Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates. *55:513–520*

- Cerreti M, Liburdi K, Benucci I, Esti M (2016) The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. *LWT - Food Science and Technology* 73:326–333 . doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.030
- Conab (2017) Acompanhamento da safra brasileira. Brasília
- Damásio AR de L, Silva TM da, Maller A, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MDLT De (2010a) Purification and partial characterization of an Exo-polygalacturonase from *paecilomyces variotii* liquid cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:1496–1507 . doi: 10.1007/s12010-009-8682-0
- Damásio ARL, Silva TM, Maller A, Jorge j. A, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2010b) Purification and partial characterization of an Exo-polygalacturonase from *paecilomyces variotii* liquid cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:1496–1507 . doi: 10.1007/s12010-009-8682-0
- Dias M, Melo MM, Schwan RF, Silva CF (2015) A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to β -glucosidase production by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 61:588–595 . doi: 10.1111/lam.12498
- Doi RH, Kosugi A (2004) Cellulosomes: Plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nature Reviews Microbiology* 2:541–551 . doi: 10.1038/nrmicro925
- Esquivel P, Jiménez VM (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46:488–495 . doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028
- FAO (2018) Crop Residues. In: FAOSTAT Emissions Database Agriculture. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/GA>. Accessed 28 Jun 2017
- Figuroa GA, Homann T, Rawel HM (2016) Coffee Production Wastes: Potentials and Perspectives. *Austin Food Sci* *Austin Food Sci* 1:1014–3
- Garde WK, Buchberger SG, Wendell D, Kupferle MJ (2017) Application of

- Moringa Oleifera seed extract to treat coffee fermentation wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 329:102–109 . doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.01.006
- Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R (2016) Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6:1–13 . doi: 10.1007/s13205-016-0371-4
- Godoy EA, Aguirre SD, Díaz MA (2019) Rational use of forest residues. In: FAO. <http://www.fao.org/3/y1237e/y1237e11.htm>. Accessed 13 Apr 2019
- Gummadi SN, Panda T (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. *Process Biochemistry* 38:987–996
- Gunkel K, Dijk R van, Veenhuis M, Klei IJ van der (2004) Routing of Hansenula polymorpha alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery. *Molecular Biology of the Cell* 15:1347–1355 . doi: 10.1091/mbc.E03
- Heerd D, Yegin S, Tari C, Fernandez-lahore M (2011) Food and Bioproducts Processing Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp . in solid-state fermentation: A comparative study. *Food and Bioproducts Processing* 90:102–110 . doi: 10.1016/j.fbp.2011.08.003
- Hermosa VAB (2014) Aproveitamento de resíduos do processamento semi-seco do café para produção de compostos de valor agregado. Universidade Federal de Lavras
- Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40:2931–2944
- Jiang HS, Zhang Y, Lu ZW, Lebrun R, Gontero B, Li W (2019) Interaction between Silver Nanoparticles and Two Dehydrogenases: Role of Thiol Groups. *Small* 15:1–12 . doi: 10.1002/smll.201900860
- Karbassi A, Vaughn RH (1980) Purification and properties of polygalacturonic acid trans-eliminase from *Bacillus stearothermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology* 26:377–384 . doi: 10.1139/m80-061
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R (2001) Applications of pectinases

- in the commercial sector : a review. *Bioresource technology* 77:215–227
- KC S, Upadhyaya J, Joshi DR, Lekhak B, Kumar Chaudhary D, Raj Pant B, Raj Bajgai T, Dhital R, Khanal S, Koirala N, Raghavan V (2020) Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. *Fermentation* 6:59 . doi: 10.3390/fermentation6020059
- Khan AM, Shah SS (2008) Determination of critical micelle concentration (Cmc) of sodium dodecyl sulfate (SDS) and the effect of low concentration of pyrene on its Cmc using ORIGIN software. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 30:186–191
- Kohli P, Gupta R (2015) Alkaline pectinases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4:279–285 . doi: 10.1016/j.bcab.2015.07.001
- Kulandaivelu V, Bhat R (2012) Changes in the physico-chemical and biological quality attributes of soil following amendment with untreated coffee processing wastewater. *European Journal of Soil Biology* 50:39–43 . doi: 10.1016/j.ejsobi.2011.11.011
- Ladeira Ázar RIS, Morgan T, dos Santos ACF, de Aquino Ximenes E, Ladisch MR, Guimarães VM (2018) Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 109:25–30 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.09.007
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685 . doi: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laguna IHB, Marante FJT, Mioso R (2015) Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *Journal of Applied Microbiology* 119:1455–1466 . doi: 10.1111/jam.12934
- Li Q, Ray CS, Callow N V., Loman AA, Islam SMM, Ju LK (2020) *Aspergillus niger* production of pectinase and α -galactosidase for enzymatic soy processing. *Enzyme and Microbial Technology* 134:109476 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.109476

- Li X, Speicher TL, Dees DCT, Mansoori N, McManus JB, Tien M, Trindade LM, Wallace IS, Roberts AW (2019) Convergent evolution of hetero-oligomeric cellulose synthesis complexes in mosses and seed plants. *Plant Journal* 99:862–876 . doi: 10.1111/tpj.14366
- Lopina OD (2016) Enzyme Inhibitors and Activators. In: Senturk M (ed) *Enzyme Inhibitors and Activators Provisional*. IntechOpen, Rijeka, Croatia, pp 242–257
- Mahmoodi M, Najafpour GD, Mohammadi M (2017) Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *Journal of Food Science and Technology* 54:4123–4128 . doi: 10.1007/s13197-017-2829-8
- Mamma D, Kourtoglou E, Christakopoulos P (2008) Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology* 99:2373–2383 . doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.018
- Martos MA, Butiuk AP, Rojas NL, Alberto R (2014) Purification and Characterization of a Polygalacturonase Produced by *Wickerhamomyces anomalus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57:587–594
- Merín MG, de Ambrosini VIM (2015) Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-*Saccharomyces* yeasts for enzymatic production during winemaking. *Letters in Applied Microbiology* 60:467–474 . doi: 10.1111/lam.12390
- Miller G (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31:426–428
- Mioso R, Toledo Marante FJ, Herrera Bravo de Laguna I (2015) The Chemical Diversity of the Ascomycete Fungus *Paecilomyces variotii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 177:781–791 . doi: 10.1007/s12010-015-1783-z
- Mohammadi M, Rezaei Mokarram R, Shahvalizadeh R, Sarabandi K, Lim LT, Hamishehkar H (2020) Immobilization and stabilization of pectinase on an activated montmorillonite support and its application in pineapple juice

- clarification. *Food Bioscience* 36:100625 . doi: 10.1016/j.fbio.2020.100625
- Murad HA, Azzaz HH (2011) Microbial pectinases and ruminant nutrition. *Research Journal of Microbiology* 6:246–269 . doi: 10.3923/jm.2011.246.269
- Murthy PS, Madhava Naidu M (2012) Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. *Resources, Conservation and Recycling* 66:45–58 . doi: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005
- Murthy PS, Naidu MM (2012) Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology* 5:897–903 . doi: 10.1007/s11947-010-0363-z
- Murthy PS, Naidu MM, Srinivas P (2009) Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84:1246–1249 . doi: 10.1002/jctb.2142
- Mutwil M, Debolt S, Persson S (2008) Cellulose synthesis: a complex complex. *Current Opinion in Plant Biology* 11:252–257 . doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.007
- Navya PN, Pushpa SM (2013) Production, statistical optimization and application of endoglucanase from *Rhizopus stolonifer* utilizing coffee husk. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36:1115–1123 . doi: 10.1007/s00449-012-0865-3
- Novita E (2016) Biodegradability Simulation of Coffee Wastewater Using Instant Coffee. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9:217–229 . doi: 10.1016/j.aaspro.2016.02.138
- Ogawa N, Miyashita K, Chakrabarty AM (2003) Microbial genes and enzymes in the degradation of chlorinated compounds. *Chemical Record* 3:158–171 . doi: 10.1002/tcr.10059
- Oka T, Ekino K, Fukuda K, Nomura Y (2014) Draft Genome Sequence of the Formaldehyde-Resistant Fungus *Byssoschlamys spectabilis* No. 5

(Anamorph *Paecilomyces variotii* No. 5) (NBRC109023). Genome announcements 2:10.1128/genomeA.01162-13 . doi: 10.1128/genomeA.01162-13 [doi]

Oka T, Komachi Y, Ohsima K, Kawano Y, Fukuda K, Nagahama K, Ekino K, Nomura Y (2015) Isolation, sequencing, and heterologous expression of the *Paecilomyces variotii* gene encoding S-hydroxymethylglutathione dehydrogenase (*fldA*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:1755–1763 . doi: 10.1007/s00253-014-6203-8

Oliveira BV de, Teixeira GS, Reis O, Barau JG, Teixeira PJPL, do Rio MCS, Domingues RR, Meinhardt LW, Paes Leme AF, Rincones J, Pereira GAG (2012) A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. *Fungal Genetics and Biology* 49:922–932 . doi: 10.1016/j.fgb.2012.09.001

Oliveira LS, Franca AS (2014) An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. In: *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., pp 283–291

Parente ES, Wetlaufer DB (1984) Influence of urea on the high performance cation exchange chromatography of hen egg white lysozyme. *Journal of Chromatography* 4:39–55

Patil NP, Patil KP, Chaudhari BL, Chincholkar SB (2012) Production, Purification of Exo-Polygalacturonase from Soil Isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and Its Application. *Indian Journal of Microbiology* 52:240–246 . doi: 10.1007/s12088-011-0162-x

Pinto MPM, Mudhoo A, Neves TA, Berni MD, Forster-Carneiro T (2018) Co-digestion of coffee residues and sugarcane vinasse for biohythane generation. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6:146–155 . doi: 10.1016/j.jece.2017.11.064

Pires JF, Cardoso L de S, Schwan RF, SILVA CF (2017) Diversity of microbiota found in coffee processing wastewater treatment plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: . doi: 10.1007/s11274-017-2372-9

- Prathyusha K, Suneetha V (2011) Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/juice production industry: a review. *Journal of Phytology* 3:16–19
- Preša P, Tavčer PF (2008) Bioscouring and bleaching of cotton with pectinase enzyme and peracetic acid in one bath. *Coloration Technology* 124:36–42 . doi: 10.1111/j.1478-4408.2007.00118.x
- Prommajak T, Leksawasdi N, Rattanapanone N (2020) Tannins in fruit juices and their removal. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* 19:76–90 . doi: 10.12982/CMUJNS.2020.0006
- Qin L, Li WC, Liu L, Zhu JQ, Li X, Li BZ, Yuan YJ (2016) Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnology for Biofuels* 9:1–10 . doi: 10.1186/s13068-016-0485-2
- Rahman MS, Choi YS, Kim YK, Park C, Yoo JC (2019) Production of novel polygalacturonase from *Bacillus paralicheniformis* CBS32 and application to depolymerization of ramie fiber. *Polymers* 11:1–11 . doi: 10.3390/polym11091525
- Rahouti M, Seigle-Murandi F, Steiman R, Eriksson KE (1989) Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:2391–2398 . doi: 10.1128/aem.55.9.2391-2398.1989
- Rattan S, Parande AK, Nagaraju VD, Ghiwari GK (2015) A comprehensive review on utilization of wastewater from coffee processing. *Environmental Science and Pollution Research international* 22:6461–6472 . doi: 10.1007/s11356-015-4079-5
- Rivas-Cantu RC, Jones KD, Mills PL (2013) A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: Technical advances and analysis of engineering challenges. *Waste Management and Research* 31:413–420 . doi: 10.1177/0734242X13479432
- Rodríguez-fernández DE, Rodríguez-León JA, Carvalho JC de, Sturm W, Soccol CR (2011) The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource*

Technology 102:10657–10662 . doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.106

Ruiz-Morales Y, Romero-Martínez A (2018) Coarse-Grain Molecular Dynamics Simulations to Investigate the Bulk Viscosity and Critical Micelle Concentration of the Ionic Surfactant Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry B* 122:3931–3943 . doi: 10.1021/acs.jpcc.7b10770

Sahay S, Hamid B, Singh P, Ranjan K, Chauhan D, Rana RS, Chaurse VK (2013) Evaluation of pectinolytic activities for oenological uses from psychrotrophic yeasts. *Letters in Applied Microbiology* 57:115–121 . doi: 10.1111/lam.12081

Semenova M V., Grishutin SG, Gusakov A V., Okunev ON, Sinitsyn AP (2003) Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biokhimiya* 68:686–697

Sethi B, Satpathy A, Tripathy S, Parida S, Singdevsachan SK, Behera B (2016) Production of ethanol and clarification of apple juice by pectinase enzyme produced from *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. *International Journal of Biological Research* 4:67 . doi: 10.14419/ijbr.v4i1.6134

Sharma N, Rathore M, Sharma M (2013) Microbial pectinase: Sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 12:45–60 . doi: 10.1007/s11157-012-9276-9

Sieiro C, García-fraga B, López-seijas J (2012) Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry a b. In: Valdez B (ed) *Food Industrial Process - Method and Equipament*. IntechOpen, Croatia, pp 201–218

Silva COG (2014) *Emericella nidulans* E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR : FERRAMENTAS PARA PRODUÇÃO DE ENDO- β -1, 4-. Universidade de Brasília

Silva D, Da Silva Martins E, Da Silva R, Gomes E (2002) Pectinase production by *Penicillium viridicatum* Rfc3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Microbiology* 33:318–324 . doi: 10.1590/S1517-83822002000400008

- Silva RM da (2010) Isolamento e caracterização de α -fucosidases digestivas em Arachnida. Universidade de São Paulo
- Siu Y, Mejia G, Mejia-Saavedra J, Pohlan J, Sokolov M (2007) Heavy metals in wet method coffee processing wastewater in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78:400–404 . doi: 10.1007/s00128-007-9094-x
- Smith HJ, Simons C (2004) *Enzymes and their inhibition drug development*
- Souza PM, Werneck G, Aliakbarian B, Siqueira F, Filho EXF, Perego P, Converti A, Magalhães PO, Junior AP (2017) Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology* 109:1103–1110 . doi: 10.1016/j.fct.2017.03.055
- Souza TACB, Santos CR, Souza AR, Oldiges DP, Ruller R, Prade RA, Squina FM, Murakami MT (2011) Structure of a novel thermostable GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Thermotoga petrophila* RKU-1. *Protein Science* 20:1632–1637 . doi: 10.1002/pro.693
- Suresh B, Viruthagiri T (2010) Optimization and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Indian Journal of Science and Technology* 3:867–870 . doi: 10.17485/ijst/2010/v3i8/29899
- Swaddle TW. (1997) *Inorganic Chemistry: An Industrial and Environmental Perspective*. Elsevier Science & Technology Books
- Trindade LV, Desagiacomo C, Polizeli MDLTD, Damasio ARDL, Lima AMF, Gomes E, Bonilla-Rodriguez GO (2016) Biochemical characterization, thermal stability, and partial sequence of a novel exo-polygalacturonase from the thermophilic fungus *rhizomucor pusillus* a13.36 obtained by submerged cultivation. *BioMed Research International* 2016: . doi: 10.1155/2016/8653583
- Ur Rehman H, Nawaz MA, Pervez S, Jamal M, Attaullah M, Aman A, Ul Qader SA (2020) Encapsulation of pectinase within polyacrylamide gel: characterization of its catalytic properties for continuous industrial uses. *Heliyon* 6: . doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04578

- Vaillancourt FH, Yeh E, Vosburg DA, O'Connor SE, Walsh CT (2005) Cryptic chlorination by a non-haem iron enzyme during cyclopropyl amino acid biosynthesis. *Nature* 436:1191–1194 . doi: 10.1038/nature03797
- Vaz RP, Vici AC, Teixeira de Moraes Polizeli M de L, Magalhães PO, Filho EXF (2020) Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus* . *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1–40 . doi: 10.1002/bab.2004
- Velázquez-Cedeño MA, Mata G, Savoie J-M (2002) Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: Changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:201–207 . doi: 10.1023/A:1014999616381
- Villa-Montoya AC, Ferro MIT, de Oliveira RA (2017) Removal of phenols and methane production with coffee processing wastewater supplemented with phosphorous. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14:61–74 . doi: 10.1007/s13762-016-1124-y
- Wu Z, Lee YY (1997) Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnology Letters* 19:977–979 . doi: 10.1023/A:1018487015129
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2010) Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 46:170–176 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.11.001
- Ximenes E, Kim Y, Mosier N, Dien B, Ladisch M (2011) Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 48:54–60 . doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.09.006
- Yang Y, Zhang P, Yang X, Xu X (2016) Spatial and temporal dynamics of agricultural residue resources in the last 30 years in China. *Waste Management & Research* 34:1230–1240 . doi: 10.1177/0734242X16670001
- Zavala-Páramo MG, Villa-Rivera MG, Lara-Márquez A, López-Romero E, Cano-Camacho H (2020) Applications of Fungal Pectinases. Reference

Module in Life Sciences. doi: 10.1016/b978-0-12-809633-8.21086-8

Zhang J, Pakarinen A, Viikari L (2013) Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp. *Bioresource Technology* 129:302–307 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.064

Capítulo IV:
**Applications of lignocellulosic biomass in the
context of a biorefinery**

Artigo de revisão aceito na revista *Frontiers in Energy* (Editora Springer). Fator de impacto 2,657. Qualis Capes A2 (Ciências Biológicas I).

Neste artigo, revisamos a vasta gama de diferentes resíduos agrícolas disponíveis para a produção de bioenergia e produtos de valor agregado. Revisamos o uso desses diferentes resíduos na perspectiva do desenvolvimento de uma bioeconomia circular em que todos os resíduos da produção agrícola podem ser usados como produtos de base para a produção agrícola e para outros usos industriais. A relevância da revisão reside na importância de desenvolver formas sustentáveis de produção de energia que limitem a emissão de gases de efeito estufa e reduzam maciçamente nossa dependência de combustíveis fósseis. A maioria dos resíduos agrícolas é atualmente considerada de baixo valor; no entanto, nossa revisão destaca as inúmeras maneiras pelas quais esses resíduos podem não apenas reduzir nossa dependência de combustíveis fósseis, consequentemente reduzindo a poluição e as mudanças climáticas, mas também gerar riqueza para uma série de indústrias, agregando valor comercial a esses resíduos.

Crop residues: Applications of lignocellulosic biomass in the context of a biorefinery

Maria Carolina Andrade¹, Caio de Oliveira Gorgulho Silva², Leonora Rios de Souza Moreira³, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho*

Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

*Corresponding author: eximenes@unb.br

¹andrade.mca.2012@gmail.com

²caio.gorgulho@gmail.com

³leonorasm@gmail.com

Running title: Crop residues and their applications

Abstract

Interest in lignocellulosic biomass conversion technologies has increased recently because of their potential to reduce the dependency on non-renewable feedstocks. Residues from a variety of crops are the major source of lignocellulose, which is being produced in increasingly large quantities worldwide. The commercial exploitation of crop residues as feedstocks for biorefineries which could be used to produce a variety of goods such as biofuels, biochemicals, bioplastics and enzymes is an attractive approach not only for adding value to residues but also for providing renewable products required by the expanding bioeconomy market. Moreover, the implementation of biorefineries in different regions has the potential to add value to the specific crop residues produced in the region. In this review, several aspects of crop residue application in biorefineries are discussed, including the role of crop residues in the bioeconomy and circular economy concepts, the main technical aspects of crop residue conversion in biorefineries, the main crop residues generated in different regions of the world and their availability, the potential value-added bioproducts that can be extracted or produced from each crop residue, and the major advantages and challenges associated with crop residue utilization in biorefineries. Despite their potential, most biomass refining technologies are not sufficiently advanced or financially viable. Several technical obstacles, especially with regard to crop residue collection, handling, and pre-treatment, prevent the implementation of biorefineries on a

commercial scale. Further research is needed to resolve these scale-up-related challenges. Increased governmental incentives and bioeconomic strategies are expected to boost the biorefinery market and the cost competitiveness of biorefinery products.

Keywords: crop residue, biorefinery, bioproduct, biomass, circular bioeconomy, enzyme

1. Introduction

Sustainable development is defined as “producing for the needs of today without compromising those of future generations” by the World Summit on Sustainable Development (Finkelstein and Sheehan 2009). In this context, bioenergy is one of the several resources used to improve living standards and promote sustainable development using renewable sources for the generation of "clean energy" and reduction of the dependence on fossil fuels (Energy 2018). The interest in lignocellulosic biomass conversion technologies has increased recently owing to their potential for energy and bioproduct generation without the use of non-renewable feedstocks; thus, these technologies can potentially contribute to air quality improvement and reduction of greenhouse gas (GHG) emissions (Silva et al. 2018).

Lignocellulosic biomass is mainly derived from plant materials, including crop residues, forest residues, wood crops, industrial wastes, municipal solid waste, and food waste. Additionally, grasses can be grown for biomass generation (Energy 2018). Lignocellulosic biomasses of different types are distributed worldwide, but vary spatiotemporally in their availability. Each region produces a specific set of biomasses according to its agricultural and agro-industrial activity. These alternative feedstocks can be converted into a variety of bioproducts in biorefineries, including bioenergy (in the form of biofuels and bioelectricity), enzymes, chemicals, and materials (e.g., biosorbents and bioplastics) that are valuable to the market.

Our review focuses on the importance of crop residues in the context of biorefineries and the circular bioeconomy concept. We summarize the main crop residues generated in different regions of the world and their availability, the potential value-added bioproducts that can be extracted or produced from crop residues, and the major advantages and obstacles associated with crop residues utilization in biorefineries.

2. Crop residues in circular bioeconomy

The European Commission defines bioeconomy as "the production of renewable biological resources and the conversion of these resources and waste streams into value-added products, such as food, feed, bio-based products and bioenergy" (European Commission 2018). The bioeconomy

concept covers all the economic and industrial sectors and systems that use or process renewable biological resources (animals, plants, microorganisms, and derived biomass, including organic waste) as well as their functions and principles (Bugge et al. 2016; European Commission 2018; BIOPRO BW 2019). Importantly, a fundamental aspect of the bioeconomy is the mitigation of GHG emissions using renewable resources rather than fossil resources. For this reason, a shift from a fossil-based economy to a bio-based economy is seen as essential for achieving global climate targets set in the Paris agreement (Silva et al. 2018). Complementary to the bioeconomy concept, a circular economy is based on the concept that the residues from one industrial process will be useful as feedstock for another, in such a way that the environmental impact will be almost zero and the residues, which were originally considered to be waste products, will have economic value (Bos et al. 2017), as demonstrated in Figure 1.

In a circular economy, the “restoration” pathway replaces the “end-of-life” concept and residues are recycled, resulting in high-value-added products. By using residues as feedstock, the circular economy aims to add commercial value to otherwise discarded waste products and reduce environmental, economic, and social problems that arise from inappropriate residue disposal (Tozlu et al. 2016; Nizami et al. 2017). Combining both concepts, the circular bioeconomy is an economic system in which the basic building blocks for materials, chemicals, and energy are derived from renewable biological resources (including crop residues and byproducts from crop residue processing) and is described as an industrial system that is restorative or regenerative by design. In this context, biorefineries that use crop residues as feedstock to produce value-added products are key players in the circular economy (Venkata Mohan et al. 2016; Bos et al. 2017).

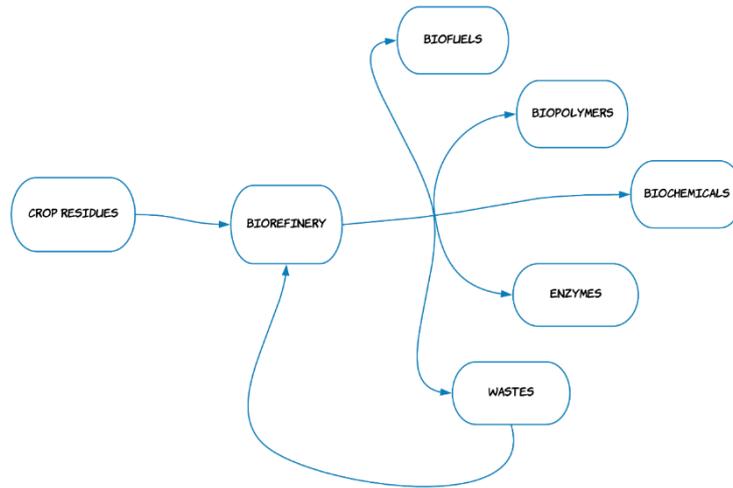


Fig. 1 Use of crop residues in the context of biorefineries and circular bioeconomy

3. Enzyme-based crop residue biorefineries

Crop residues have the potential to replace non-renewable resources owing to their high availability and structural composition (rich in polysaccharides and lignin). The increasing production of lignocellulosic biomass from crop residues as a result of the growing demand for agricultural products is currently raising environmental concerns. Consequently, interest in the utilization of crop residues as feedstock for biorefineries has increased, as it represents a biomass management tool that integrates recycling and remediation in an environmentally friendly manner [3], reduces the pollution generated by inappropriate disposal (Yang et al. 2016), and adds value via bioproduct generation.

Biorefineries based on lignocellulosic biomass, such as crop residues, have emerged as the most suitable substitutes for petroleum-based refineries. This new concept includes a wide range of new technologies capable of converting the structural components of biomass into bio-based products such as fuels, value-added co-products, and other applications (Silva et al. 2015; Squinca et al. 2018). There are several biorefinery platforms (e.g., carbohydrates, syngas, lignin, and pyrolytic liquid) that can be employed as key intermediates between raw materials and final products (Rosales-Calderon and Arantes 2019).

Holocellulose (cellulose, hemicellulose, and pectin) and lignin are the main structural components of lignocellulosic raw materials. The complex three-dimensional constitution of these substrates involves physical and chemical interactions between holocellulose and lignin, ensuring structural stability and resistance of the plant cell wall (Gomes et al. 2017; Thorenz et al. 2018). The degradation of polymers from lignocellulose into their structural monomers, usually achieved via an enzymatic pathway, is essential for further synthesis of biofuels and building block chemicals in biorefineries (Silva et al. 2018).

A pool of enzymes (e.g., cellulases, hemicellulases, lytic polysaccharide monooxygenases, ligninases, and cellobiose dehydrogenases), in combination with other proteins (swollenins and expansins), is required to fully degrade the cell wall from crop residues (Silva and Filho 2017). In a natural system, this degradation is performed by microbial consortia that synthesize a broad range of hydrolytic and non-hydrolytic enzymes with different modes of action and broad and restricted specificities that act synergistically to disrupt and fully degrade plant biomass (Lopes et al. 2018).

Based on this natural process, large-scale biomass degradation in biorefineries is achieved using enzymatic cocktails produced by selected microorganisms. Enzyme production is one of the most important steps for biomass refining to be economically viable, but the cost of production remains high. An understanding of enzymatic synergism is crucial to enhance the speed of enzymatic biomass conversion and reduce enzyme loads and hydrolysis time, important factors determining the cost of hydrolysis of lignocellulosic substrates (Silva and Filho 2017). It is necessary to select highly productive microorganism strains that demonstrate high expression of a wide range of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) and lignin-degrading enzymes when cultured on different types of lignocellulosic substrates [17]. Filamentous fungi are generally employed as enzyme-producing organisms. *Trichoderma* [98, 148], *Aspergillus* [149], and *Penicillium* species are frequently used for CAZyme production, whereas white-rot fungi are mostly used to produce lignin-degrading enzymes (Fillat et al. 2017).

Either off-site enzyme production (in which one single enzyme-producing plant provides enzymes for multiple biorefinery plants) or on-site enzyme production (in which enzymes are produced in an operational unit annexed to a biorefinery plant) approaches can be employed. On-site enzyme production in biorefineries may be a viable alternative to reduce costs and

GHG emissions associated with enzyme production. In this approach, crude enzyme cocktails can be directly applied to crop residue hydrolysis with minimal enzyme processing and no transportation requirements (Silva and Filho 2017). In addition, the use of lignocellulosic biomass such as crop residues as a carbon source for on-site enzyme production (a process referred to as integrated enzyme production) enables the synthesis of enzyme consortia tailored to the topographic and bromatological characteristics of each particular lignocellulosic material (Bech et al. 2015; Yang et al. 2016; Silva and Filho 2017; Lopes et al. 2018; Thorenz et al. 2018; Rosales-Calderon and Arantes 2019). In this case, depending on its structure and composition, each specific crop residue induces the production of a specific set of enzymes (Bech et al. 2015). Integrated enzyme production adds further value to crop residues and broadens the portfolio of products produced in biorefineries, since enzymes are highly valuable biocatalysts (more valuable than biofuels) that have industrial applications other than crop residue biorefining, such as in the pulp and paper industry, textiles, detergents, animal feed, food, beverage, and nutraceuticals (e.g., probiotics, antioxidants, and vitamins) [21, 25, 30-32]. Figure 2 summarizes the different types of lignocellulose-degrading enzymes involved in biomass refining and other potential biotechnological applications. The use of crop residues for the production of enzymes is a promising market. The global market for enzymes has grown in recent years, reaching almost \$4.6 billion and \$4.9 billion in 2014 and 2015, respectively (BBC 2017). This market is expected to expand to around \$6.3 billion by 2021, with a compound annual growth rate of 4.7% from 2016 to 2021 (BBC 2017).

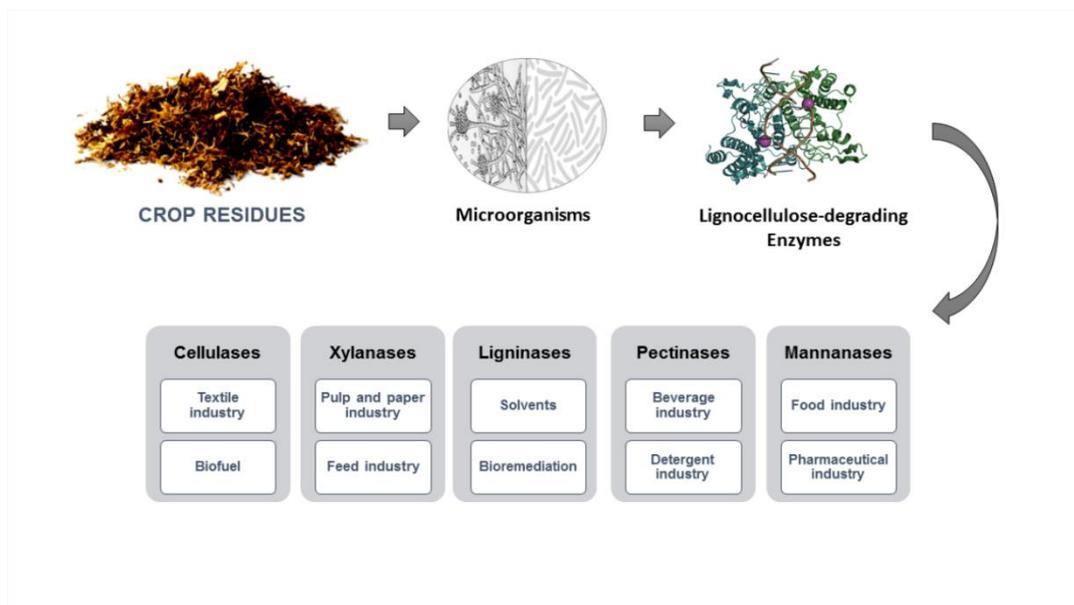


Fig. 2 Lignocellulose-degrading enzymes from microorganisms and their biotechnological applications

4. Global overview of crop residue generation

The term agricultural residue encompasses all plant biomass generated as a byproduct during harvesting or crop processing. Crop residues were defined by Searle and Marlins (Searle and Malins 2015) as the parts of the aboveground plant that are not eaten nor have other primary uses. The residue ratio, or ratio of residues to the main crop product, is highly variable. These residues can be classified as primary, secondary, or tertiary (Hoogwijk 2003; Zalfar 2019). Primary residues (e.g., rice straw, sugarcane top and straw, coffee husks, corn stalks and straw, wheat straw, empty palm fruit bunches and frond, and vine trimming shoots) are generated in the field at the time of harvest, while secondary residues (e.g., rice husks, sugarcane bagasse, corncobs, soybean hulls, distiller's dried grains, sand from sugarcane ash bagasse, wastewater, and black liquor) are co-produced during processing. Tertiary residues are the remains that arise from (partial) final consumption (e.g., food leftovers).

According to a study conducted by Tripathi et al. (Tripathi et al. 2019), cereal straw contributes to 66% of the world's residual plant biomass. Nevertheless, cereal primary residues (e.g., wheat straw, rice straw, and corn

stover) cannot be entirely removed from the field and destined for bioenergy production and biorefining since these biomasses play a key role in maintaining the fertility, organic carbon levels, nitrogen levels, humidity, and the micro- and macrobiota of soils; stabilizing soil temperature; and preventing soil erosion (Tarkalson et al. 2009; Monteleone et al. 2015; Cherubin et al. 2018). Importantly, if biomass is removed, soil fertilizer must be added to compensate for biomass removal, but that does not compensate for other factors such as erosion, temperature, and humidity control (Andrew 2006; Monteleone et al. 2015). Broad projections usually estimate that 60-70% of crop residues must be left in the field for ecological purposes (Searle and Malins 2015; Daioglou et al. 2016). When individual crop residues are considered, the estimated average sustainable removal rate is 40% for wheat straw (ranging from 15% to 60%), 50% for corn stover (ranging from 25% to 80%), and around 60% for rice straw (Scarlat et al. 2010); however, these are broad generalizations. The rates of sustainable biomass removal vary greatly according to not only crop type, but also a number of other site-specific factors such as soil characteristics, climate pattern, the slope of the terrain, and farming practices such as tillage and crop rotation (Scarlat et al. 2010; Monteleone et al. 2015). Residue removal from the field is also restricted by the costs and technical limitations of biomass collection, baling, handling, and transportation (Sietske Boschma et al. 2013). The amount of collected crop residues that may be utilized for bioenergy production and biorefining is further limited by other competing uses of the biomass, such as feed for livestock, animal bedding, horticulture, substrate for mushroom production, and traditional burning for heat (Scarlat et al. 2010; Searle and Malins 2015). The effects of crop residue removal on soil fertility, crop yields, and GHG emissions have been studied, but further efforts are required to calculate the sustainable balance between biomass-to-soil and biomass-to-bioproduction conversions with respect to their environmental, economic, and social impacts (Cherubin et al. 2018).

Crop residues are not equally distributed worldwide; they have distinct regional characteristics, and their availability varies spatiotemporally. Table 1 summarizes the agricultural production and the associated residue generation of different crops globally and the main countries producing each crop during

the 2016/17 harvest. Figure 3 shows a map of the main agricultural residues produced in each continent. The major crop residues produced in each global region are discussed below.

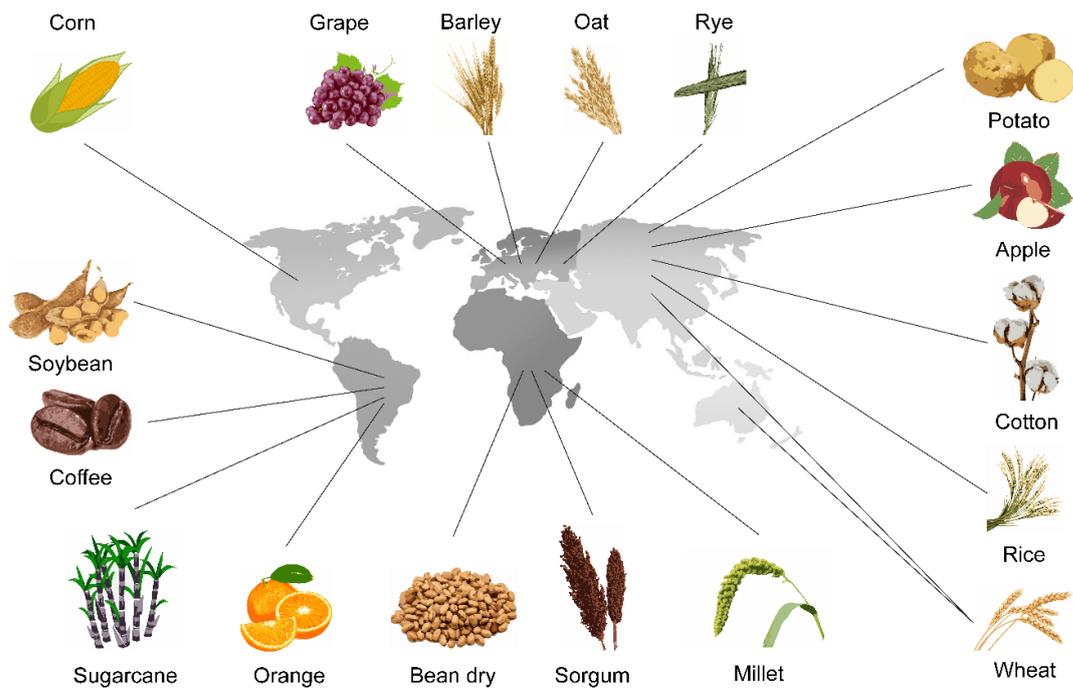


Fig. 3 An overview of the main agricultural crops produced in the world

Table 1 Correlation between the annual production of different crops and the generation of crop residues

Plantations	Leading producers	Global production (t)	Total global wastes (t)	Residues	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)	References
Cotton	China (25%), India (22%), USA (15%), Pakistan (8%), Brazil (5%)	6.54E+07	9.81E+07	Cotton sheets, cotton stalks	80	*	*	(Agbor et al. 2011; FAO 2018b; FAO 2018a)
Rice	China (19%), India (18%), Indonesia (8%), Bangladesh (6%), Vietnam (4%)	7.41E+08	1.10E+07	Rice straw, Rice hulls	25.1 - 38	27 - 37.1	8 - 15.2	(Nunes et al. 2013; FAO 2018b; FAO 2018a; Thorenz et al. 2018)
Coffee	Brazil (33%), Vietnam (16%), Colombia (8%), Indonesia (7%), Ethiopia (5%)	9.22E+06	3.67E+06	Coffee husks, Coffee pulp, Wastewater	37.2	24.9	*	(FAO 2018b; FAO 2018a; USDA 2018)

Sugarcane	Brazil (41%), India (18%), China (6%), Thailand (5%), Pakistan (3%)	1.89E+09	4.73E+08	Sugarcane bagasse, cane straw	43 -39	26 - 30	22 - 25	(Nunes et al. 2013; FAO 2018b; FAO 2018a; Thorenz et al. 2018)
Barley	Russia (20%), Germany (11%), France (11%), Australia (11%), Ukraine (10%)	1.41E+08	1.78E+06	Barley straw	39.6	24.7	17.2	(FAO 2018b; FAO 2018a; Thorenz et al. 2018)
Beans	Myanmar (19%), India (14%), Brazil (10%), USA (5%), United Republic of Tanzania (4%)	2.68E+07	3.66E+05	Peel beans	*	*	*	(FAO 2018b; FAO 2018a)
Orange	Brazil (24%), China (12%), India (10%), USA (10%)	7.32E+07	4.29E+07	Orange peel, Orange bagasse	*	*	*	(FAO 2018b; FAO 2018a)

	(7%), Mexico (6%)							
Apple	China (50%), USA (5%), Poland (4%), Turkey (3%), India (3%)	8.93E+07	5.85E+07	Apple pomace	*	*	*	(Shalini and Gupta 2010; FAO 2018b; FAO 2018a)
Corn	USA (36%), China (22%), Brazil (6%), Argentina (4%), Mexico (3%)	1.06E+09	7.49E+08	Corncobs, corn straw	37.3	25.5	13.8 - 16.7	(Lal 2005; Gomes et al. 2017; FAO 2018b; FAO 2018a; Thorenz et al. 2018)
Soybean	USA (35%), Brazil (28%), Argentina (17%), India (4%), China (3%)	3.35E+08	2.98E+08	Soybean hull	25	11.9	17.6	(FAO 2018b; FAO 2018a; Thorenz et al. 2018)
Sorghum	USA (19%), Nigeria (11%), Sudan (10%), Mexico (8%), Ethiopia (7%)	6.39E+07	3.54E+07	Sorghum straw	36	18	15.5	(FAO 2018b; FAO 2018a; Thorenz et al. 2018)

Wheat	China (17%), India (12%), Russia (10%), USA (8%), Canada (3%)	7.69E+08	1.13E+07	Wheat straw	35 - 37.3	24 - 28.7	17.8 - 25	(Nunes et al. 2013; FAO 2018b; FAO 2018a; Thorenz et al. 2018)
Grape	China (19%), Italy (11%), USA (9%), France (8%), Spain (8%)	7.74E+07	1.24E+07	Grape pomace	*	*	*	(FAO 2018b; FAO 2018a)

*No data available

Americas. A substantial area of land in the American continent is exploited for agriculture and, consequently, a considerable amount of crop residue is produced each year. Brazil and Argentina are the main producers and exporters of food in South America, with 43 and 37 million hectares available for agriculture, respectively. Brazil is the world's largest producer of sugarcane, coffee, and oranges and is a major producer of soybean, corn, cotton, and beans, while Argentina mainly produces corn, soybean, wheat, and grape production (FAO 2018a). Large-scale agricultural production results in the generation of large amounts of residues (FAO 2018a). The US, in turn, is the world's largest producer of corn, soybeans, and sorghum and a major producer of wheat. Currently, however, approximately 90% of corn residues in the US are left in the fields after harvesting, and less than 1% of the residue is collected for industrial processing (Kim and Dale 2004; Ray et al. 2013; FAO 2018a), indicating that these residues are still an untapped renewable resource and that the corn residue conversion industry is still in its infancy.

Asia. Asia is also a major producer of crop residue. After Brazil, India and China are the largest producers of sugarcane (Bezerra and Ragauskas 2016). The Asian continent is the main producer of wheat (43%), and China and India account for more than half of the global cotton production. Moreover, about 90% of the world's rice is produced in Asia, especially in Bangladesh, China, and India. About 65% of the apples produced in the world also come from Asia, with China accounting for 50% of the global production. After processing, approximately 25% of an apple's weight becomes a residue (Shalini and Gupta 2010).

Africa. In 2016, Africa produced 24 billion tons of agro-industrial residue (FAO 2018a). The pattern of African consumption has risen (5%) above the world average (2.3%), and residues from the production of rice, wheat, sorghum, millet, and beans represent a significant amount of waste in the North and South African regions (FAO 2013; Macauley 2015). Corn is the main crop cultivated in the African continent, with South Africa, Nigeria, and Ethiopia producing substantial quantities of this crop and thus generating large amounts of residue related to corn (FAO 2018a).

Europe. Europe is one of the world's largest producers and suppliers of food and fiber, accounting for about 20% of global cereal, 32% of wheat, and

more than 60% of oat production (FAO 2018a; Thorenz et al. 2018). Corn cultivation has high water requirements during crop development. Despite the periods of constant droughts and heat waves, Europe is the third-largest producer of corn in the world, surpassed only by the Americas and Asia (Olesen et al. 2011; Assefa et al. 2014). According to Olesen et al. [22], measures are currently being adopted in many European regions to adapt to climate changes and maintain the current crop yields, including the use of new cultivars and changes to the cultivation timing and tillage and fertilization practices with a focus on the conservation of soil and groundwater. Countries such as Ukraine, Russia, France, and Romania, which have the most significant resources for irrigation, lead the production and manufacture of feed and animal feed silage. However, 16% of the total production becomes residue (FAO 2018a).

Oceania. Oceania's agriculture is characterized by the production of low-intensity and large-scale crops due to vast tracts of arable land (Oerke and Dehne 2004). The primary cultures include wheat, oat, and sugarcane, all of which generate large amounts of residues. In many cases, oats serve as a rotation crop in some states of Australia due to its ability to break the pest life-cycle and renewal of pasture fields. Currently, with the encouragement of conservation agriculture and increased organic agriculture, Oceania is the largest organic producer in the world, with 17.3 million hectares planted (40% world production) (Willer et al. 2015). With this practice, lesser plant residues accumulate since they are largely recycled back to the soil as an organic soil management strategy (Wrigley et al. 2015).

5. Applications of crop residues

The use of crop residues as feedstock for bioproducts is promising because of their abundance and low cost (Medina et al. 2015). However, most technologies for the conversion of crop residues to biochemicals, biomaterials, and eco-friendly fuels are not yet fully developed to the industrial scale and are not cost competitive. Several technologies developed by academia and the private sector are available at different technology readiness levels (TRL) (Nasa 2017; Rosales-Calderon and Arantes 2019). Some of these technologies are at TRL 1 and 2, requiring extensive research and time before

they can be industrially applied. Others are at TRL 8, indicating that they are ready for implementation with an already existing technology or a technology platform. However, their commercial feasibility is uncertain. Tables 2, 3, 4, 5, 6, and 7 and Figure 4 show several potential biotechnological applications of crop residue products, including in the production of biofuels, biomaterials, enzymes, and nutraceuticals. None of the examples mentioned in Tables 2 – 7 are currently being practiced commercially, except for bioethanol production from sugarcane, corn, and wheat residues. The production of bioethanol from crop residues at a commercial scale has been carried out intermittently since 2014 by different companies around the world, including the USA, Brazil, and European countries such as Italy, and new commercial-size facilities are planned or are under construction in different countries. Nevertheless, several technical problems, as discussed later in the text, and the narrow profit margins of lignocellulosic ethanol have forced several commercial operating units to curtail or cease production, either permanently or temporarily, and dedicate research and development efforts toward overcoming technical hurdles (Silva et al. 2018; Bacovsky 2019; Energy.gov 2020).

Bioenergy production has traditionally been the focus of biomass conversion research. Different assessments on the bioenergy potentials by 2050 have been performed, and different researchers have reported divergent results due to differences in the methodological approaches and assumptions applied (Bentsen and Felby 2012). Beringer et al. (Beringer et al. 2011) pointed out that a combination of all biomass sources may provide between 130 and 270 EJ yr⁻¹ in 2050, equivalent to 15–25% of the world's future energy demand. In this case, energy crops would account for 20–60% of the total potential depending on land availability and the proportion of irrigated area. On the other hand, a reassessment of global bioenergy potential in 2050 made by Searle and Malins (Searle and Malins 2015) estimated that the maximum plausible limit for sustainable energy crop production would be 40–110 EJ yr⁻¹.

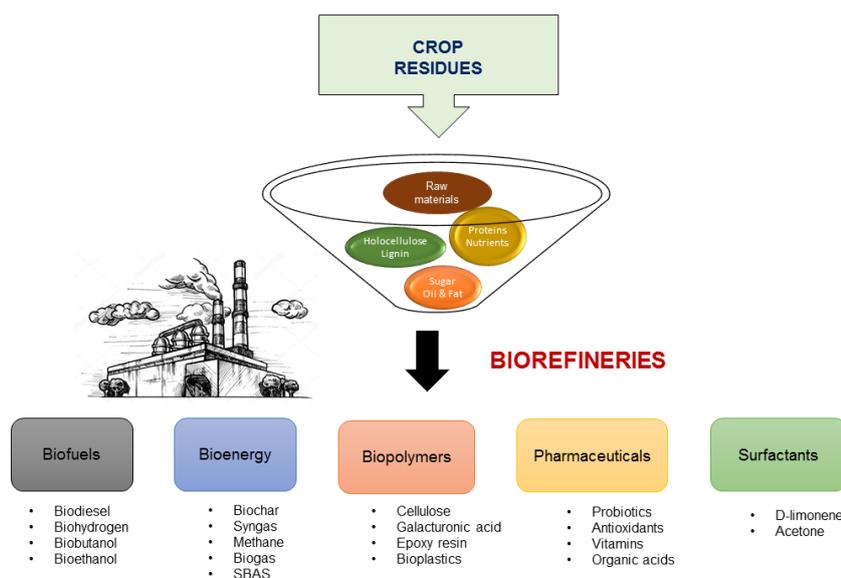


Fig. 4 An overview of crop residue applications in lignocellulose-based biorefineries

Although bioenergy has traditionally been the focus of biomass conversion, other bioproducts of higher value, such as chemicals, plastics, and enzymes, could improve the overall competitiveness of biorefineries. The production of organic acids, biodegradable plastics, or enzymes from biomass residue feedstock will add to twice the commercial value compared with electricity, animal feed, and fuel production (Kiran et al. 2015). From chemical and biotechnological perspectives, almost all chemicals and building blocks for plastics can be made using renewable raw materials (Gontard et al. 2018). For example, the replacement of bisphenol A (a chemical compound used since the 1960s in the manufacture of synthetic polymers [e.g., polycarbonate plastics and epoxy resins] and widely distributed in products used daily [e.g., packaging and bottles]), with aromatic building blocks from biological sources, such as phenols, is an innovative strategy for application in the polymers and plastic industries (Gontard et al. 2018). Moreover, the variety of natural polyphenols allows an array of different possibilities for fine-tuning to a specific application, which is not possible with monostructural chemicals such as bisphenol A (Aouf et al. 2014). According to de Jong et al. (Jong et al. 2012), the global production of bio-based chemicals and polymers is estimated to be around 50 million tons per year.

According to the 2018 market data (European Bioplastic 2018), the global production of bioplastics is expected to increase by approximately 3.8 % per year (from 2.05 million tons to approximately 2.44 million tons per year in the period 2017-2022). Approximately 62% of consumer product companies aim to switch their packaging to sustainable packing (Gontard et al. 2018). Despite the notable growth in bioplastics market, it is not prospering to its full potential possibly due to, at least in part, insufficient governmental incentives. Comparatively, the biofuel market in several countries such as Brazil, US, and members of the European Union is largely driven by national support policies and legislation, including mandates for obligatory biofuel blending, differential taxation systems, subsidies, and official targets for the reduction of GHG emissions (OECD/FAO 2019). Other bio-based products, such as bioplastics, that may replace fossil-based analogs are not under government incentives to the same extent as biofuels and should receive greater attention from policymakers (Philp 2014). The employment of similar bioeconomy strategies in the bioplastics sector as well as to other bio-based chemicals and materials, is expected to accelerate growth rates by expanding consumer markets and by enabling competitive pricing (Philp 2014).

In the upcoming sections, some of the major crop residues are described, together with their potential for bioproduct generation.

5.1. Coffee

Coffee is the world's 111th most-traded commodity in value and 119th in quantity, according to the International Trade Centre (ITC) (Newton 2017; Wagner 2019). Brazil is currently the largest producer, with 2.95 million tons produced in 2019 (Conab 2019). Depending on the type of post-harvest processing, different types of coffee residues can be generated, such as husks, skin, pulp, and wastewater (Pandey et al. 2000a; Orozco et al. 2008; Esquivel and Jiménez 2012). More than 45% of the biomass from coffee production represents residues [31]. The global production of coffee residues in 2016 was estimated to be 9.2 million tons; therefore, coffee residues represent a sizable opportunity to produce enzymes, biofuels, and other value-added products (FAO 2018a).

Several previous reports have discussed the possible applications of coffee residues (Table 2). The use of oil extracted from spent coffee grounds (SCG) for the production of biodiesel via enzymatic transesterification with ethanol is an example of a promising approach for the valorization of coffee grounds (Caetano et al. 2017). The use of SCG as a versatile feedstock for the production of biodiesel (from SCG extracted oil), biohydrogen (from glycerin generated as a co-product from biodiesel production), and ethanol or fuel pellets (from the remaining solid waste generated after oil extraction from SCG) has also been proposed (Kondamudi et al. 2008). Utilization of coffee residues such as coffee husks and pulp to feed animals has long been reported (Mazzafera 2002) as well as the use of SCG as livestock feed for ruminants, pigs, chickens, and rabbits (Givens and Barber 1986).

Coffee silverskin (CS) can be used as a raw material to obtain antioxidants and vitamin E (Costa et al. 2018) via aqueous or ethanolic extraction or for the production of various compounds, including biobutanol through acetone–butanol–ethanol fermentation (Hijosa-Valsero et al. 2018), levulinic acid (Licursi et al. 2018) via acid-catalyzed hydrothermal conversion or via solid-state fermentation (SSF) of CS via enzyme (e.g., α -amylase (Murthy et al. 2009), xylanases, cellulases (Cerdeira et al. 2017b) and pectinases (Antier et al. 1993)) produced by filamentous fungi such as *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger* or microbial communities of lignocellulose-degrading bacteria, filamentous fungi, and yeasts. The high carbohydrate (30%) and lignin (30%) contents make CS a suitable substrate for application in biorefineries (Sung et al. 2017). The high nitrogen content in CS and SGC makes these residues important sources of organic agricultural fertilizers or soil conditioners in small proportions (below 10%) without harming the environment (Carnier et al. 2019). Cellulose nanocrystals (CNC) are also a valuable material with a wide range of applications that can be obtained from CS through alkali treatment followed by sulfuric acid hydrolysis. CS-derived CNCs have been applied as reinforcing agents to obtain polylactic acid (PLA)/CNC bio-nanocomposites, which can improve the physical properties of PLA-based plastics. PLA-based plastics have been used in the industrial packaging of food and medical supplies, and the enhanced properties conferred by CNC addition can expand the applicability of this material (Sung

et al. 2017). Being a source of soluble dietary fibers and phenolic compounds, CS is also a potential functional food ingredient with antioxidant and prebiotic activity [125].

Several authors have also reported the use of different coffee samples to produce a range of different enzymes. For example, coffee husks were used as a substrate for endoglucanase production by *Rhizopus stolonifer*, and the enzymes were then applied in ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of coffee husks and as a detergent additive for improved washing (Navya and Pushpa 2013). Dias et al. (Dias et al. 2015) tested the production of β -glucosidases by *Bacillus subtilis* in coffee pulp in submerged fermentation, obtaining a maximum yield of 22.59 IU/L in 24 h at 36.6 °C with a pH of 3.64. Furthermore, a mixture of coffee pulp waste and pineapple waste was used for the production of cellulases by *Acinetobacter* sp. TSK-MASC under solid-state fermentation, yielding up to 888 U/mL under optimized conditions (Selvam et al. 2014).

Table 2 Biorefinery applications of coffee residues

Residue	Application	Conversion process	Reference
Coffee silverskin	Production of levulinic acid	Water-soluble phenolics were extracted from CS through hydrothermal pre-treatment in a microwave reactor. Pretreated CS was then subjected to diluted hydrochloric acid treatment in a microwave reactor with varying biomass loadings, acid concentrations and reaction temperature/time to produce levulinic acid	(Licursi et al. 2018)
Coffee silverskin	Production of α -amylase	SSF process using a fungal strain <i>Neurospora crassa</i> CFR 308	(Murthy et al. 2009)
Coffee wastes	Production of biogas	Alkaline and acid pre-treatments of a mixture composed of coffee seed skin, seed refuse and coffee product refuse followed by the inoculum of cow and chicken manure and an anaerobic sludge taken from a domestic water treatment system	(Battista et al. 2016)
Coffee wastewater	Production of bioethanol	Batch fermentation using <i>Hanseniaspora uvarum</i> UFLA CAF76 as inoculum in ground coffee pulp mixed with coffee wastewater	(Hermosa 2014)
Coffee husks	Production of endoglucanase	Steam-exploded coffee husks were used as substrate for cellulase production using <i>Rhizopus stolonifer</i> CFR 307 under SSF. Fermentation parameters (pH, moisture and fermentation time) were optimized through response surface methodology (RSM). Enzymes thus produced were applied in ethanol production from coffee husks and as additive in detergent formulation	(Navya and Pushpa 2013)
Coffee husks	Production of gibberellic acid	SSF and SmF fermentation of alkali pretreated coffee husks and cassava bagasse (7:3, dry wt) employing <i>Gibberella fujokuroi</i> LPB-06	(Machado et al. 2002)
Coffee husks	Production of carotenoids	Alkaline-pretreated coffee husks were used as substrate for <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CCMA0156 as carotenoid-producing strain under SmF. Intracellular carotenoids were extracted with different organic solvents	(Dias 2016)
Coffee husks	Production of xylanase and cellulase	Multispecies SSF process applying a specialized consortium of microorganisms (<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> , <i>Sphingobacterium composti</i> , <i>Cyberlindnera jardinii</i> and <i>Barnettozyma californica</i> among others)	(Cerdeira et al. 2017b)
Coffee pulp	Cultivation of mushrooms	Six strains of <i>Pleurotus</i> were grown in a mixture of coffee pulp and wheat straw	(Salmones et al. 2005)
Coffee pulp	Production of pectinase	SSF process employing <i>Aspergillus niger</i> AW96 and SmF process employing <i>A. niger</i> AW99	(Antier et al. 1993)
Spent Coffee Ground	Production of biodiesel	Oil was extracted from SCG with hexane. Oil transesterification reaction was performed with ethanol or methanol via enzymatic catalysis with three commercial enzymes (Lipozymes RM 1M, TL 100L, and CALBL)	(Caetano et al. 2017)

5.2. Soybean

Several studies have reported the biotechnological use of soy residues (Table 3). Soybean pulp, also known as okara and biji, is generated during the production of soymilk, tofu, or fried bean curd. Approximately 1.1 kg of fresh soybean pulp containing 76%–80% moisture was obtained by processing 1.0 kg of dry beans to produce soymilk or tofu (NguyenTrung Hau et al. 2017). Okara composition also makes it an appropriate material for the production of foodstuffs for human or pet consumption due to its antioxidant and anti-inflammatory activities. Solid-state fermentation of okara with *Saccharomyces cerevisiae* further improves its nutritional value by increasing its protein content, total phenolics, and antioxidant activity (Pereira 2017; Santos et al. 2018). Furthermore, other soybean residues have been investigated as raw materials for the generation of various bioproducts, usually by solid-state fermentation with filamentous fungi. Phytohormones such as gibberellic acid, have been produced via SSF of soy husks with *Fusarium moniliforme* (Rodrigues et al. 2016). SSF of residues from the soybean harvest (including small and broken grains, pods, stems, and leaves) with *Penicillium* spp. have also been applied for the production of protease, β -amylases, α -amylase, and CMCase (Cunha et al. 2016). Soybean meal has been used for lipase production by *Penicillium* spp. through SSF (Tombini 2015).

An engineered strain of *Trichoderma reesei* was grown in several agricultural residues, and soybean hulls were found to have suitable characteristics (low viscosity, nontoxicity, and high nutrient availability) to produce large quantities of cellulases. These enzymes were then used in the hydrolysis of sugarcane bagasse (SCB), which releases high amounts of glucose (Ellilä et al. 2017). Soybean hulls have also been used for the production of xylanases from *Aspergillus foetidus* [132].

Zhu et al. (Zhu et al. 2014) studied the potential use of processed soybean residues (straw and bran) supplemented with digested hay for anaerobic fermentation to generate biogas (methane). It was observed that the co-digestion of the substrates increased biogas yield by 148% compared to that from single fermentation.

Soybean oil deodorizer distillate (SODD) is a byproduct of soybean oil refineries and rich in free fatty acids and triglycerides, making it a cheap carbon source for biodiesel production and a potential substitute for neutral refined soybean oil and degummed trans-esterified soybean oil (typically used in the food industry). Trans-esterification of SODD has been performed with the addition of calcinated duck eggshells (source of cheap calcium carbonate, which is transformed into CaO at high temperatures) to produce 94.6% biodiesel (Yin et al. 2016). Granjo et al. (Granjo et al. 2017) integrated the production of biodiesel into a model soybean refinery and managed to reduce the cost of biodiesel per ton of processed soybeans by 16.6%, obtaining higher commercial values in cataloged byproducts (SODD and lecithin) that were not previously part of the production chain.

Table 3 Biorefinery applications of soybean residues

Residue	Application	Conversion process	Reference
Soybean hulls	Production of protease, β -amylase, α -amylase	SSF process using a fungal strain <i>Penicillium</i> spp. LEMIA 38221 in different conditions (pH, temperature and substrate concentration)	(Cunha et al. 2016)
Soybean hulls	Production of ethanol	Soybean residue was pretreated with dilute H ₂ SO ₄ and subjected to separate hydrolysis and fermentation employing commercial cellulase cocktails (a mixture of C-Tec 2 and Viscozyme L) and <i>S. cerevisiae</i> (wild-type strain or the KCCM 1129 strain adapted to high galactose concentrations)	(NguyenTrung Hau et al. 2017)
Soybean hulls and citric pulp	Production of gibberellic acid	SSF performed with <i>Fusarium moniliforme</i> LPB 03 optimized for physical and chemical conditions (pH, initial humidity and composition of nutritive solution)	(Rodrigues et al. 2016)
Soybean oil deodorizer distillate	Production of biodiesel	CaO obtained from calcined duck eggshell was used as catalyst for the esterification of SODD with methanol	(Yin et al. 2016)
Soybean straw	Production of biogas	Solid-state anaerobic digestion (SS-AD) of soybean processing waste (consisting of soybeans, soybean straw and soybean oil extraction residues) and hay with the effluent from a mesophilic liquid anaerobic digester as inoculum	(Zhu et al. 2014)
Okara	Production of β -glucosidase	Fresh and heat-treated okara were subjected to SSF process using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> r.f. <i>bayanus</i>	(Santos et al. 2018)
Okara	Production of probiotic	A probiotic creamy sauce was produced with <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3-fermented okara flour plus soymilk and different types of gelling components	(Filho et al. 2018)
Okara	Production of citric acid	Solid-state mixed fermentation of okara with <i>Aspergillus terreus</i> (involved in okara saccharification) and <i>Aspergillus niger</i> (responsible for citric acid production)	(Khare et al. 1995)
Soybean meal	Production of lipase	SSF process applying DCCR design to evaluate spore concentration, cultivation and humidity parameters affecting the enzymatic production by <i>Penicillium</i> sp. S4	(Tombini 2015)
Soybean meal	Production of cellulase	Cellulase production by <i>Chaetomium globosum</i> BCC5776 was performed under SmF conditions in optimized medium containing 1% soybean meal, 1% empty palm fruit bunch and 2% Avicel®. Home-made enzyme system was supplemented with commercial β -glucosidase (Novozyme® 188) and hemicellulases (Accellerase® XY) for the efficient hydrolysis of alkaline-pretreated rice straw	(Wanmolee et al. 2016)

Soybean residues	Production of bioethanol	Two residues, <i>i.e.</i> skim (protein-rich fraction) and insoluble fiber (carbohydrate-rich fraction), generated from soybean oil extraction were used as additives in dry-grind corn fermentation for ethanol production. The addition of skim and/or insoluble fiber enhanced ethanol production by decreasing the corn fermentation time, increased corn distillers oil recovery from this tillage and increased the protein content while reducing fiber and oil contents of distillers dried grains	(Sekhon et al. 2018)
------------------	--------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------

5.3. Sugarcane

Sugarcane processing generates an average of 12.5% and 14% of straw and bagasse and (dry basis), respectively, and both residues present immense potential for use as feedstock in biorefineries in sugarcane producing regions (Table 4) (Szczerbowski et al. 2014; RFA - Renewable Fuels Association 2017).

Sugarcane bagasse (SCB) is the main residue in sugarcane processing and it is obtained after the grinding process for extracting the juice (Bezerra and Ragauskas 2016). SCB has long been used to produce hemicellulolytic and cellulolytic enzymes. Xylanases have been successfully produced by *Aspergillus terreus* (Moreira et al. 2013b), *Emericella nidulans* (Silva et al. 2015), and *Penicillium echinulatum* (Camassola and Dillon 2014), among many other fungi, using SCB as a carbon source. Cellulases and cellulolytic cocktails have also been produced using SCB as a substrate and high-yielding strains such as *Aspergillus tubingensis* (Prajapati et al. 2020), *Talaromyces verruculosus* (Jain and Agrawal 2018), *Aspergillus niger* (pectinase and cellulases) (Kumar et al. 2011; Xue et al. 2012; Squinca et al. 2018), *Trichoderma harzianum* (Gelain et al. 2015), and *Galactomyces* sp. (He et al. 2013).

SCB usually requires a pre-treatment step prior to conversion or refining into valuable products. A combination of pretreated SCB and cane leaf matter has been investigated as a raw material for animal feeds and biofuel production in biorefineries. Steam explosion (StEx) and ammonium fiber expansion (AFEX™) increased the enzymatic digestibility of sugarcane crop residues, resulting in an estimated yield of 3881 L and 5214 L of cellulosic ethanol per hectare of sugarcane-cultivating land, respectively, under industrially relevant conditions (Mokomele et al. 2018). SCB can also be used as a source of hexoses for the synthesis of levulinic acid, a platform chemical with a wide range of applications. A combination of liquid hot water pre-treatment of pelletized SCB (200°C, 30 min, 1% biomass), enzymatic hydrolysis of pre-treatment-derived cellulignin with cellulases (50°C, pH 5 for 45 min), and acid-catalyzed thermal conversion of SCB-derived glucose to levulinic acid (206°C, 30 min, and 0.63 M methane sulfonic acid) resulted in a yield of 67.7% of the maximum predicted levulinic acid yield. Solvent and sulfur-free lignin with high molecular weight, an

interesting co-product with multiple applications, was also obtained (Schmidt et al. 2017).

Sand from sugarcane ash bagasse (SBAS) is a residue generated after SCB burning for energy production in sugarcane mills. Owing to its high silica content (approximately 60%) and since it can be generated in large quantities (4 million tons in Brazil in 2017), it has been used to partially replace natural sand in the production of plaster for civil construction (Almeida et al. 2015). It has been verified that 30% of natural sand can be substituted with SBAS in plaster without altering the mechanical qualities of consistency and porosity, in addition to increasing durability.

Sugarcane straw (SS) consists of dry leaves and green tops left behind on fields to naturally decompose to improve soil quality or collected for bioenergy production (cellulosic ethanol or bioelectricity) [117], representing one-third of the total primary energy obtained from sugarcane (Carpio and De Souza 2019). One ton of SS can produce 270 L of cellulosic ethanol (2G), while 1 ton of sugarcane produces only 80 L of ethanol (1G) (Menandro et al. 2017). SS and SCB have similar compositions, with glucan, hemicellulose, lignin, and ash contents of 33.77%, 27.38%, 21.28%, and 6.23% (SS) and 37.74%, 27.23%, 20.57%, and 6.53% (SCB), respectively (Szczerbowski et al. 2014).

As for SCB, SS is also usually pretreated prior to conversion. SS has been studied for 2G ethanol production using organosolv pre-treatment (Menandro et al. 2017; You et al. 2017). The potential of SS as a substrate for xylitol production has also been demonstrated by using dilute sulfuric acid pre-treatment and fermentation of the hemicellulose hydrolysate with *Candida guilliermondii* FTI 20037 (Hernández-Pérez et al. 2016). SS is a potential raw material for the synthesis of cellulose acetate (CA) and carboxymethylcellulose (CMC). Candido et al. (Candido and Gonçalves 2016) proposed a four-step method for CA and CMC production from SS involving sequential acid (H_2SO_4 10% v/v) and alkaline (NaOH 5% w/v) treatments, a chelating process with EDTA, and a final bleaching step with H_2O_2 (5% v/v). CA with a high degree of substitution (2.72) was efficiently obtained, whereas a high-quality CMC product was not possible with the same process.

A biorefinery model in which sugars from sugarcane juice are diversified for the production of n-butanol (by acetone–butanol–ethanol fermentation with

Clostridium cells), in addition to ethanol, sugar, and energy traditionally produced, was proposed by Mariano et al. (Mariano et al. 2013) seeking alternatives to the fuel and chemical markets since butanol has the characteristics of higher blends such as automotive and aviation fuels as well as potential for application in the production of a wide range of chemicals and polymers.

Table 4 Biorefinery applications of sugarcane residues

Residue	Application	Conversion process	Reference
Sugarcane bagasse and citrus residues	Production of glycosyl hydrolases	RSM methodology to select the best enzyme inducing biomass (sugarcane bagasse, soybean bran, wheat bran, apple bagasse or citrus bagasse) using <i>Annulohyphoxylon stygium</i> in SmF process	(Robl et al. 2015)
Sugarcane bagasse	Production of xylanases	Pretreated SCB was used as substrate for <i>Aspergillus terreus</i> in SmF	(Moreira et al. 2013a)
Sugarcane bagasse	Production of xylanase	SmF process employing pretreated SCB and <i>Emericella nidulans</i>	(Silva et al. 2015)
Sugarcane bagasse	Production of endoglucanase	Enzymatically liquefied sugarcane bagasse was used as substrate for endoglucanase production by <i>Aspergillus niger</i> A12. The produced enzymes were then applied to liquefy sugarcane bagasse for later use as substrate for enzyme production in a closed-loop strategy	(Squinca et al. 2018)
Sugarcane bagasse	Production of cellulase, β -glucosidase and xylanase	Mathematical model describes enzyme production by <i>Trichoderma harzianum</i> P4P11 through variation of substrate concentration, cell growth and induction of different enzyme classes (cellulases, β -glucosidases and xylanases) using steam-exploded and alkali-pretreated SCB	(Gelain et al. 2015)
Sugarcane bagasse	Production of biobutanol	Biorefinery model was created based on Aspen Plus® simulations to produce sugar, ethanol and butanol (25:50:25 configuration) employing strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> or mutant strain <i>Clostridium beijerinckii</i> BA101	(Mariano et al. 2013)
Sugarcane bagasse	Production of levulinic acid	Biorefinery model that fractionates SCB and wheat straw using liquid hot water pre-treatment and enzymatic hydrolysis with commercial cocktail Cellic® CTec2	(Schmidt et al. 2017)
Sugarcane straw	Production of bioethanol	Application of the semi-mechanistic model using SS hydrothermal pretreated with and without alkali delignification with 4% NaOH and enzymatic hydrolysis employing Cellic® CTec2	(Pratto et al. 2016)
Sugarcane straw	Production of lignin	Lignin with high degree of purity (> 98%) and low sulfur content (< 2%) was extracted from sugarcane straw through SO ₂ -ethanol-water fractionation at different temperatures (135-160°C)	(You et al. 2017)
Sugarcane straw	Production of xylitol	The hemicellulosic hydrolysate obtained through dilute acid pre-treatment of sugarcane straw with 1% H ₂ SO ₄ was fermented with <i>Candida guilliermondii</i> FT20037 using three nutritional supplementation conditions	[64]

5.4. Corn

Corn is traditionally used as human food and animal feed, and its residues are mainly composed of starch, protein, fiber, and oil (Table 5). Recently, corn has also been used to produce ethanol (Sekhon et al. 2018). In the United States, 38.4% and 37.6% of the total corn produced in 2015 were used for ethanol production and animal feed, respectively (Jin et al. 2018).

The unfermented residues from 1G corn ethanol production are referred to as distiller's dried grains with solubles (DDGS). The high levels of protein, fiber, and oil make DDGS a valuable residue from corn ethanol production. Usually, every 25 kg of corn grain produces approximately 10.5 L of ethanol, 7.5 kg of DDGS, and 0.3 kg of corn distillers oil (CDO) (Huang et al. 2012; RFA - Renewable Fuels Association 2017). DDGS has long been applied to produce soluble sugars for further ethanol fermentation (Bals et al. 2006; Sekhon et al. 2018). DDGS is also a promising raw material for the production of D-lactic acid. As proposed by Zaini et al. (Zaini et al. 2018), D-lactic acid can be produced via separate hydrolysis and fermentation or simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated DDGS using an Accelerate® 1500 cellulase mixture and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. Lactic acid is considered as one of the most useful chemicals and has attracted considerable global attention owing to its widespread applications in the food, chemical, cosmetic, textile, and pharmaceutical industries. It has also emerged in the bioplastics industry, where lactic acid serves as the building block for polylactic acid synthesis (Zaini et al. 2018).

Corn cobs are high bulky waste (38% dry weight after grinding) with a high cellulose content (58%) and different functional chemical groups such as alcohols, aldehydes, ketones, acids, hydroxides, ethers, and phenolic compounds in their composition. Corn cobs have a high adsorption capacity, and therefore, their use as biosorbents for the bioremediation of contaminated wastewater has been proposed. It has been demonstrated that corn cobs, when milled and chemically modified with sodium carbonate, show high porosity and surface area, high adsorption capacity, and serve as an efficient low-cost biosorbent of carbofuran, a highly hazardous pesticide (Foo 2016). Other corn residues, such as maize silk, maize husk, and maize tassel, can be employed as

biosorbents for the adsorption of methylene blue (Miraboutalebi et al. 2017), iron [132], and cadmium (Guyo et al. 2015).

Microcrystalline cellulose (MCC) is increasingly being used in the food and pharmaceutical industries in excipients, binders, and anti-adherents. Its production can be carried out through the pre-treatment of cellulose-rich lignocellulosic materials, such as corn cobs. Agblevor et al. obtained high MCC production when they performed a specific order of physical and chemical pre-treatments, including grinding of the residue, steam explosion to remove lignin and hemicellulose compounds, washing cellulosic fibers with 20% sodium hydroxide, and bleaching and neutralization with sulfuric acid. The degree of polymerization achieved was 549.8 compared to 427.4 for Avicel control (Agblevor et al. 2007).

Corn-oil-based feedstocks can be converted into biodiesel through a transesterification process. Lipase from *Thermomyces lanuginosa* was used in the transesterification of corn oil with ethanol. It was possible to obtain a reaction yield of 98.95 wt% with a fatty acid ethyl ester content of 69.2 wt%, with linoleate (C18:2) and oleate (C18:1) being the most significant esters (relative percentages, 42.97 wt% and 22.54 wt%, respectively) (Mata et al. 2012; Veljković et al. 2018).

Table 5 Biorefinery applications of corn residues

Residue	Application	Conversion process	Reference
Corn Stover	Production of methane	Chicken manure supplemented with corn stover or maize silage was used as substrate for methane production via anaerobic digestion	(Böjti et al. 2017)
Corncoobs	Production of prebiotic xylooligosaccharides	Milled corncoobs were alkaline pretreated with various concentrations (2%, 4%, 8% and 12%) of NaOH or KOH following incubation with <i>Enterococcus faecium</i> TCD3, <i>E. faecalis</i> CCD10, <i>Lactobacillus maltromicus</i> MTCC108 and <i>Lactobacillus viridiscens</i> NCIM2167	(Samanta et al. 2012)
Corncoobs	Production of biosorbent	Biosorbents were prepared by treating corncoobs with H ₃ PO ₄ , H ₂ SO ₄ , HNO ₃ , NaOH, or Na ₂ CO ₃	(Foo 2016)
Corncoobs	Production of biogas	Corncoobs were subjected to alkaline extrusion pre-treatment (0.4 % NaOH) and hydrolyzed with commercial endoglucanase (Novozymes Ultraflo® L) or crude enzyme extract from <i>Aspergillus terreus</i> CECT 2808 grown on corncoobs under SSF condition. A mesophilic anaerobic sludge was used as inoculum for biogas production through anaerobic digestion of hydrolyzed corncoobs	(Pérez-Rodríguez et al. 2017)
Corncoobs	Production of microcrystalline cellulose	Steam explosion pre-treatment of cotton gin wastes and corncoobs followed by 20% NaOH extraction, 25% H ₂ O ₂ bleaching and microcrystalline cellulose conversion with HCl, H ₂ SO ₄ and Spezyme CP® cellulase enzyme preparation	(Agblevor et al. 2007)
Corncoobs	Production of cellulase	SSF process employing <i>Trichoderma reesei</i> ZU-02	(Xia and Cen 1999)

5.5. Wheat

Wheat straw is a byproduct of the wheat grain harvest, consisting of approximately 57% internodes, 10% knots, 18% leaves, 9% straw, and 6% rachis. Wheat straw is a source of cell wall polymers such as cellulose, hemicelluloses (mainly xylans), and lignin. Considering the residue/harvest ratio for each kg of wheat grain processed, approximately 1.3 kg of straw is generated, and approximately 850 Tg of wheat residues are produced annually (Talebnia et al. 2010; Kapoor et al. 2016).

Wheat straw can be used as a raw feedstock for a wide variety of applications (Table 6). Biorefinery models based on wheat straw aiming to produce bioethanol (Ballesteros et al. 2006), butanol (Qureshi et al. 2007; Talebnia et al. 2010), biohydrogen, and methane (Kaparaju et al. 2009; Mancini et al. 2018) have been proposed. In the biorefinery model proposed by Kaparaju et al. (Kaparaju et al. 2009), wheat straw was hydrothermally pretreated, generating a hemicellulose-rich hydrolysate and a cellulose-rich solid. Liquefaction and fermentation were carried out on the solid fraction for the generation of bioethanol (0.41 g/g glucose), while dark fermentation of the hemicellulose hydrolysate generated biohydrogen (178 mL/g sugars). The wastes from both processes were combined and inoculated with digested manure to produce biogas (methane) through anaerobic fermentation (0.32 - 0.38 m³/kg volatile solids).

The chemical, electronic, and automotive industries generate large amounts of wastewater containing heavy metals, which must be treated before being discharged. Such treatments face methodological challenges such as precipitation and landfilling of solid sludge as well as financial constraints due to the high cost of operation and chemical equipment used during processing. Wheat straw is a potential economical source of biosorbent for removing metals such as cadmium and copper in wastewater, since it can be used directly without elaborate preparation (Dang et al. 2009).

Bacterial cellulose (BC) is a natural polymer of microorganisms that is free of hemicelluloses and lignins with high crystallinity and high degree of polymerization, in addition to high resistance to elastic traction. Wheat straw is a potential raw material for BC production. Chen et al. (Chen et al. 2013a) used an ionic liquid, [AMIM]Cl, for the pre-treatment of wheat straw in order to

increase the rate of enzymatic hydrolysis and the yield of fermentable sugars, which were then used as substrates for BC biosynthesis by *Gluconacetobacter xylinus*. After pre-treatment optimization (110 °C, 90 min, 3% biomass), the sugar yield from pretreated straw was 71.2%, which corresponds to 3.6 times more than that from untreated straw (19.6%). The yield of BC produced from pretreated wheat straw hydrolysates was higher than that from glucose-based media.

Table 6 Biorefinery applications of wheat residues

Residue	Application	Conversion process	Reference
Wheat Straw	Production of bioethanol	H ₂ SO ₄ -catalyzed steam explosion pre-treatment of wheat straw followed by SSF process employing Novozymes A/S cellulase/ β -glucosidase cocktail and <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875	(Ballesteros et al. 2006)
Wheat Straw	Production of biogas	Pre-treatment of wheat straw with N-methylmorphine, N-oxide, ethanol (Organosolv) or NaOH followed by anaerobic digestion using a digestate from local manure and dairy residue anaerobic digestion plant as inoculum	(Mancini et al. 2018)
Wheat Straw	Biosorption of cadmium and copper	Wheat straw was pretreated with 10% HNO ₃ and neutralized with 1N NaOH before being used as an efficient biosorbent of Cd ²⁺ and Cu ²⁺	(Dang et al. 2009)
Wheat Straw	Production of bacterial cellulose	Wheat straw was pretreated with ionic liquid [(AMIM)Cl] under optimized conditions, saccharified with commercial cellulase and the straw hydrolysate was employed as the carbon source for the production of bacterial cellulose by <i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 23770	(Chen et al. 2013a)
Wheat Straw	Production of levulinic acid	The production of levulinic acid from acid hydrolysis of wheat straw was optimized with RSM methodology (effects of temperature, sulfuric acid concentration, reaction time of production and liquid:solid ratio were analyzed to increase yield)	(Chang et al. 2007)
Wheat Straw	Mushroom cultivation	Rice and wheat straw without supplementation were used as a substrate for growing <i>Pleurotus sajor-caju</i> where relative humidity, temperature and ventilation were strictly controlled	(Zhang et al. 2002)
Wheat Straw	Production of bioethanol	Native non-adapted <i>Saccharomyces cerevisiae</i> are often used in a combination of physicochemical pre-treatments of wheat straw	(Talebnia et al. 2010)

5.6. Citrus Fruit

The industrial processing of citrus fruit for juice production generates a large amount of residue. Annually, approximately 121 million tons of citrus fruit residues are produced, which represents about 50% of the fruit weight (peels, pulps, and seeds). These residues are a good source of sugar, oil, polyphenols, enzymes, minerals, and vitamins, and have considerable potential for the production of multiple high-valuable bioproducts (Jin et al. 2018).

A potential application of citrus residues includes the production of ethanol, biogas, pectin, and D-limonene in an integrated biorefining approach proposed by Pourbafrani et al. (Pourbafrani et al. 2010). In this process, citrus waste is hydrolyzed with dilute acid under high temperature and pressure, yielding a hydrolysate containing limonene, pectin, and monosaccharides derived from the partial hydrolysis of cellulose and hemicellulose. Limonene, a potent inhibitor of ethanol and biogas fermentation, is efficiently evaporated from the hydrolysate through explosive pressure reduction (yield of 8.9 L limonene/ton citrus waste). Pectin is recovered from the hydrolysate through ethanol precipitation and dried (yield of 38.8 kg/ton), while the cellulose and hemicellulose-derived monosaccharides are fermented with *S. cerevisiae* to produce ethanol (39.6 L/ton). The remaining material from the distillation of ethanol and remaining solids are combined and used to produce biogas via anaerobic digestion (45 m³/ton) [161]. In another approach, lemon peels can be steam exploded to extract D-limonene-containing essential oils (recovered in the condensate from steam explosion treatment), and the solid fraction is subsequently hydrolyzed with pectinases, cellulases, and β -glucosidases, which are fermented to generate bioethanol (60 L/1000 kg of lemon peels). Galacturonic acid (not fermented by *S. cerevisiae*) is generated as a co-product and has applications in the food, chemical, and pharmaceutical industries (Boluda-Aguilar and López-Gómez 2013).

5.7. Rice

Paddy rice is the final product of the harvest, and threshing paddy rice grains produce, on an average, 25% husks, 10% bran and germ. Rice straw, on the other hand, is the byproduct of the vegetative part of the rice plant. Approximately 0.7 - 1.4 kg of rice straw is obtained from each kg of paddy rice

processed depending on varieties, cutting-height of the stubbles, and moisture content during harvest (Muthayya et al. 2014; Bienvenido 2016; Jin et al. 2018). The high cellulose content (40-60% cellulose), wide availability in major producing areas and low acquisition cost of rice straw make this residue a promising feedstock for cellulase (Wanmolee et al. 2016; Kogo et al. 2017) and bioethanol production (Table 7). The theoretical ethanol production from rice straw could potentially reach up to 205 billion liters per year in Asia (Bohlmann 2006; Pinzi and Dorado 2011). However, for economically viable management and development of ethanol production from rice residues, pre-treatments are needed to overcome biomass recalcitrance and release its constituents for later use.

Biological delignification of rice residues has been applied in different studies as an alternative to chemical pre-treatment, since it prevents the production of chemical inhibitors. Saritha et al. used an actinomycete isolate (*Streptomyces griseorubens*) under SSF of rice husk for 10 days to depolymerize 25% of the lignin, allowing subsequent saccharification efficiency of 97.8% while using an Accelerase® 1500 hydrolytic cocktail (Saritha et al. 2013). A micromycete fungi *Myrothecium roridum* grown on rice straw for 7 days caused structural changes in the lignin skeleton and altered cellulose crystallinity during the colonization period, significantly increasing the amount of reducing sugars released (455.81–509.65 mg/gds) and lignin removal (5.8–6.98 mg/gds) compared with those obtained when using raw biomass (Tiwari et al. 2013).

A biorefinery model using rice straw to produce a broad range of bioproducts was reported by Moniz et al. (Moniz et al. 2015). Rice straw was first autohydrolysed, resulting in a hemicellulose-rich liquid that could be purified to obtain oligosaccharides. The remaining solid was treated with ethanol to obtain rich liquid lignin and a solid cellulose fraction. The ethanol-treated solids had 10% higher enzymatic digestibility than the autohydrolysed solids, owing to the removal of lignin (Moniz et al. 2015). In a similar study, rice straw hydrolyzed at 210 °C under non-isothermal conditions produced liquor rich in oligosaccharides (40.1 g/100 g of initial xylan), which were purified by molecular weight using gel filtration chromatography. Different fractions containing oligosaccharides (XOS, GlcOS, and AcOS), small polysaccharides, di- and monosaccharides (xylose,

arabinose, and glucose) as well as separate fractions of products and byproducts resulting from the decomposition of sugars (acetic acid, furan derivatives, and phenols) were obtained. This approach has enabled efficient purification and recovery of interesting categories of XOS that may have potential applications in the pharmaceutical, food, and food industries (Tiwari et al. 2013).

Although several biotechnological proposals have been presented for the use of rice husks and straw, burning is still the most common method of disposal of these residues. The open burning of rice residues, in addition to causing environmental problems, also means a waste of the biotechnological potential of the residues. Recently, the production of biochar from rice residues has presented an option for sustainable reuse in many countries. The potential of rice residues for biochar production is, among other things, due to their capacity to reach temperatures up to 1000 °C (Mohammadi et al. 2017). Do et al. (Do et al. 2019) examined the effect of rice variety and pyrolysis temperature on the properties of biochars produced from rice straw and rice husk at temperatures of 300–800 °C. Biochars produced at high pyrolysis temperatures (>500 °C) presented greater surface area and higher silica content than did biochars produced at a lower temperature.

Organic silica dioxide is another bioproduct that can potentially be obtained from rice residues. Currently, the search for organic silica dioxide production from various sources has attracted considerable attention worldwide. It has been demonstrated that nanosilica can be obtained from rice straw and rice husk in two stages. First, ash from burnt rice residues was treated with a 25% sodium hydroxide solution and filtered to obtain dissolved sodium silicate. Then, the silica gel was precipitated from a solution of hydrochloric acid or sulfuric acid. The precipitate was washed, dried, and burned at 575 °C to obtain the nanosilica powder. The silica content of the nanosilicate from rice husk and rice straw powders was 54.8% and 60.2%, respectively (Nguyen et al. 2019).

Table 7 Biorefinery applications of rice residues

Residue	Application	Conversion process	Reference
Rice Straw	Production of cellulase	SmF process employing milled straw treated with 1.25% or 5% NH ₄ OH using <i>Trichoderma reesei</i> ATCC-66589 and <i>Humicola insolens</i> ATCC-26908 as enzyme producers	(Kogo et al. 2017)
Rice Straw	Production of biochar	Straw and rice husks of two different varieties (<i>Koshihikari</i> and IR50404) were exposed to high pyrolysis temperatures (300 °C – 800 °C)	(Do et al. 2019)
Rice Straw	Production of biobutanol	The enzymatic hydrolysate of non-pretreated rice straw was used as carbon source for ABE fermentation with <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4 for biobutanol production. High initial cell concentration under non-sterile conditions achieved the similar butanol yields obtained under sterile conditions	(Chen et al. 2013b)
Rice Straw	Production of bioelectricity	Impregnation of rice straw with FeCl ₃ solution (10% w/v) followed by heat pre-treatment and enzymatic hydrolysis with enzyme pool from <i>Aspergillus niger</i> and <i>Trichoderma reesei</i> . The fuel cell reactor was loaded with the diluted hydrolysate in an anode compartment including dissolved air as the final electron acceptor	(Kim et al. 2013)
Rice residues (straw and husk)	Production of nanosilica	Rice residues were burned until ash generation and treated with sodium hydroxide. Sodium silicate was precipitated with HCl or H ₂ SO ₄ , washed, dried and burned at 575 °C to obtain nanosilica powder	(Nguyen et al. 2019)
Rice Straw	Production of lignin-degrading enzymes	<i>Myrothecium roridum</i> LG7 was employed for the biological pre-treatment (delignification) of a mixture of rice straw and herbaceous weed <i>Parthenium</i> sp. under SSF condition. Partially delignified biomass was more susceptible to saccharification with commercial cellulase enzymes (Accellerase® 1500) than untreated biomass	(Tiwari et al. 2013)
Rice Husk	Production of lignin, cellulose nanocrystals and silica	Sequential acid leaching (HCl) and alkaline extraction (NaOH) were used to recover high purity lignin from rice husks. The remaining cellulose-rich solids were bleached with chlorine free treatment to yield cellulose nanocrystals. Silica was also recovered from the aqueous supernatant of lignin extraction	(Barana et al. 2016)

6. A few considerations on the implementation of crop residue biorefineries

One of the main obstacles limiting the development of a cost-effective crop residue biorefinery is the process of collecting the crop residue from the field and handling it through the refining process. Crop residues have low bulk density; therefore, densification (baling) of biomass is required before it can be transported to the biorefinery plant in order to optimize the transportation process. Secure storage of crop residues is also a challenge since fires have been reported in biorefinery plants of both pilot and commercial scales (Rivers 2012; Farias 2015). An alternative is to pre-treat crop residues in a facility close to the field and densify the pretreated biomass in pellets before shipping it to the biorefinery plant, further minimizing the costs of transportation and the risks of storage of low bulk density biomass (Rivers 2012). Pre-treatment itself, a fundamental step to ensure efficient enzymatic degradation, is an additional technical hurdle in pilot - and commercial-scale biorefineries. Scaling up biomass pre-treatment can be highly challenging, depending on the technology employed. Dilute acid pre-treatment, one of the leading pre-treatment technologies developed for biorefineries, is particularly difficult to control throughout the process on a large scale, especially with regard to temperature and pH parameters. Dilute acid pre-treatment is currently not capable of controlling these parameters, leading to unacceptable damage of the equipment and the formation of compounds that inhibit enzyme activity and fermentation (Bohlmann 2006; Rivers 2012). Further engineering work is required to achieve optimal pre-treatment efficiency on a large scale. Biomass impurities are also a problem in crop residue biorefineries. Since crop residues are usually allowed to touch the ground where they are left to dry, highly abrasive field debris such as soil, sand, and rocks are carried along with biomass in the biorefinery plant. The presence of mineral materials is tolerated to different extents depending on the equipment employed to handle biomass, and in some cases, they must be efficiently separated from biomass to avoid causing damage to the processing equipment. One possible solution to this issue would be to harvest biomass, without it touching the ground, which is technically possible but at the expense of slowing the harvest process. A middle ground between fast harvest and high-quality crop residue biomass

would have to be achieved for both sides to be financially successful (Rivers 2012). Another alternative would be to collect only the upper part of the plant, which contains less dirt, leaving the lower portions to maintain soil health (Energy.gov 2014).

In summary, current technologies are still not robust enough to be scaled up to a commercial size and provide stable industrial operations. The refining of structurally complex and recalcitrant lignocellulosic biomass requires twice the number of operational units and more expensive equipment (some not yet optimized from biomass handling at large scales) than food-based biorefineries. Large investments are required to scale up and successfully implement lignocellulosic biorefineries that can operate continuously (Rivers 2012).

A productive conversion process depends on the slow and progressive conversion of traditional fossil-based chains into innovative chains based on biomass. An increase in the use of residual biomass requires the establishment of new technological platforms through which the process of conversion, energy recovery, and the production of biological products are all integrated within an efficient and ecologically conscious biorefining system (De Corato et al. 2018).

A major issue associated with the production of first-generation biofuels is the fuel versus food debate. First-generation biofuels require biomass from food-based crops, such as bioethanol from corn grains or sugarcane juice, resulting in a competition between food and fuel. A study investigating the production of corn-derived first-generation ethanol in the US showed that as the demand for ethanol increases, part of the agricultural land used for the production of food crops, such as soybean and wheat, is utilized for the production of corn for fuels (in a process called direct land use change, dLUC), resulting in an increase in food prices (King 2010). As an indirect consequence of the expansion of first-generation biofuel croplands, the suppression of native vegetation, for example, forests (locally or in other countries), for food production, may increase faster than it would have without first-generation biofuel expansion (in a process called indirect land use change, iLUC) (Lapola et al. 2010). An interesting example of a strategy for mitigating dLUC associated with first-generation biofuels is the Brazilian Soy Moratorium, which

was able to slow down Amazon deforestation directly associated with soybean crop expansion (soybean oil is the main feedstock for first-generation biodiesel production in Brazil) by prohibiting soybean traders from purchasing soy grown on Amazon lands deforested after 2006. The Soy Moratorium, however, does not provide mechanisms to mitigate indirect Amazon deforestation (iLUC) for other purposes, such as cattle farming. Further zero-deforestation agreements and policies in the cattle sector and efforts to increase productivity in existing pasture lands are required to alleviate the iLUC in the Amazon associated with soybean production (and biodiesel produced therefrom) (Gibbs et al. 2015).

Both dLUC and iLUC can significantly compromise the GHG savings obtained by replacing fossil fuels with first-generation biofuels. A payback period that may last several years is required to compensate for the new GHG emissions associated with land use change provoked by first-generation biofuel croplands (Lapola et al. 2010). The extent of iLUC, in particular, is subject to much debate since it involves many variables and is not easily measured (Plevin et al. 2010; Kim and Dale 2011; O'Hare et al. 2011; Hombach et al. 2016). Both land use changes must be accounted for in the life-cycle GHG savings assessments related to first-generation biofuels and in decision-making for biofuel promotion.

Crop residue biorefineries display important advantages compared to food-based biorefineries in terms of GHG emissions and land use changes. In contrast to first-generation biofuels, the use of crop residues (instead of edible biomass) as feedstock for the production of second-generation biofuels avoids direct competition with food production and has implications on food prices. Second-generation biofuels also minimize land use change, promoting higher GHG emission savings compared to first-generation biofuels (Hombach et al. 2016). The higher GHG savings obtained from crop residues give second-generation fuels the status of 'advanced biofuels', i.e., having life-cycle GHG emissions reduced to at least 50% in comparison to fossil-derived fuel analogs (such as gasoline) (Sorda et al. 2010).

7. Conclusion and perspectives

Since the global requirement for food is expected to double within the next 50 years, and the global demand for transportation fuel is expected to increase even more rapidly, there is a great need for renewable energy resources that do not cause significant environmental harm and do not compete with food supply. Currently, enormous quantities of crop residues are generated worldwide and their production is expected to grow even further with the increased demand for food. In this scenario, crop residues show great potential for use as non-food, renewable feedstocks for the production of value-added bioproducts such as biofuels, biochemicals, and biomaterials that can replace their fossil-derived analogs. The use of crop residues (instead of edible biomass) as feedstock in biorefineries addresses the food versus fuel controversy, land use change, and GHG emissions associated with food-based bioproducts. In addition, by providing renewable bioproducts and adding commercial value to otherwise discarded wastes and alleviating problems associated with environmental pollution, crop residue-based biorefineries have the potential to leverage global bioeconomy and circular economy. Unlike fossil resources which are unevenly distributed among nations, crop residues are generated worldwide. This allows for each region to valorize their own particular set of crop residues via biorefining, contributing to local economic development. In addition, it is possible that each region will produce a specific set of biorefinery bioproducts that will vary according to demand and with the type of crop residues available in each region.

Despite their huge potential, most technologies proposed for the conversion of crop residues into bioproducts are not yet technologically mature and cost competitive. Second-generation ethanol production – one of the most advanced biomass refining technologies available – still faces several technical challenges for implementation on a commercial scale, such as collecting crop residues from the field and handling during processing, biomass pre-treatment, and enzymatic conversion. Further research is needed to overcome these scale-up-related obstacles. Increased governmental incentives and private initiatives on bioeconomy strategies, which are currently largely limited to biofuels, are also expected to boost the biorefinery market and the cost competitiveness of biorefinery products other than biofuels, such as bioplastics.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant 303614/2017-0), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES PrInt program, process **88887.364337/2019-00**), and the Foundation for Research Support of the Federal District (FAPDF, grant PRONEX 0193.001195/2016).

8. References

1. Finkelstein M, Sheehan J (2009) Biomass and Biotechnology: a key to sustainability
2. Energy EE& R (2018) Bionergy basics. In: Energy.gov. <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/bioenergy-basics>. Accessed 2 Mar 2018
3. Silva COG, Vaz RP, Filho EXF (2018) Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 12:277–289 . doi: 10.1002/bbb.1832
4. European Commission (2018) A sustainable bioeconomy for Europe : strengthening the connection between economy, society and the environment, Updated Bi. Luxembourg
5. Bugge MM, Hansen T, Klitkou A (2016) What is the bioeconomy? A review of the literature. *Sustainability* 8:22 . doi: 10.3390/su8070691
6. BIOPRO BW (2019) What is a Bioeconomy? In: Bioeconomy BW. <https://www.biooekonomie-bw.de/en/bw/definition>. Accessed 18 Nov 2019
7. Bos H, Annevelink B, R. van Ree O (2017) The Role of Biomass, Bioenergy and Biorefining in a Circular Economy. In: IEA Bioenergy. Paris, p 21
8. Tozlu A, Özahi E, Abuşoğlu A (2016) Waste to energy technologies for municipal solid waste management in Gaziantep. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 54:809–815 . doi: 10.1016/j.rser.2015.10.097

9. Nizami AS, Rehan M, Waqas M, Naqvi M, Ouda OKM, Shahzad K, Miandad R, Khan MZ, Syamsiro M, Ismail IMI, Pant D (2017) Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresource Technology* 241:1101–1117 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.097
10. Venkata Mohan S, Nikhil GN, Chiranjeevi P, Nagendranatha Reddy C, Rohit M V., Kumar AN, Sarkar O (2016) Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. *Bioresource Technology* 215:2–12 . doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.130
11. Yang Y, Zhang P, Yang X, Xu X (2016) Spatial and temporal dynamics of agricultural residue resources in the last 30 years in China. *Waste Management & Research* 34:1230–1240 . doi: 10.1177/0734242X16670001
12. Squinca P, Badino AC, Farinas CS (2018) A closed-loop strategy for endoglucanase production using sugarcane bagasse liquefied by a home-made enzymatic cocktail. *Bioresource Technology* 249:976–982. doi: 10.1016/j.biortech.2017.10.107
13. Silva COG, Aquino EN, Ricart CAO, Midorikawa GEO, Miller RNG, Filho EXF (2015) GH11 xylanase from *Emericella nidulans* with low sensitivity to inhibition by ethanol and lignocellulose-derived phenolic compounds. *FEMS Microbiology Letters* 362:1–8 . doi: 10.1093/femsle/fnv094
14. Rosales-Calderon O, Arantes V (2019) A review on commercial - scale high - value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels* 12:58 . doi: 10.1186/s13068-019-1529-1
15. Gomes HAR, Silva AJ da, Gómez-Mendoza DP, Santos Júnior ACM dos, Cologna N de M di, Almeida RM, Miller RNG, Fontes W, Sousa MV de, Ricart CAO, Filho EXF (2017) Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. *Journal of Biotechnology* 254:51–58 . doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.001
16. Thorenz A, Wietschel L, Stindt D, Tuma A (2018) Assessment of agroforestry residue potentials for the bioeconomy in the European Union. *Journal of Cleaner Production* 176:348–359 . doi:

- 10.1016/j.jclepro.2017.12.143
17. Silva COG, Filho EXF (2017) A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. *Bioenergy Resource*. doi: 10.1007/s12155-017-9815-x
 18. Lopes A de M, Ferreira Filho EX, de Souza Moreira LR (2018) An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *Journal of Applied Microbiology* 1–14 . doi: 10.1111/jam.13923
 19. Fillat U, Martín-Sampedro R, Macaya-Sanz D, Martín JA, Ibarra D, Eugenio ME (2017) Potential of lignin - degrading endophytic fungi on lignocellulosic biorefineries. In: *Endophytes: Crop Productivity and Protection*. pp 95–110
 20. Bech L, Herbst F, Grell MN, Hai Z, Lange L (2015) On-Site Enzyme Production by *Trichoderma asperellum* for the Degradation of Duckweed. *Fungal Genomics & Biology* 5:10 . doi: 10.4172/2165-8056.1000126
 21. Andreaus J, Ximenes Ferreira Filho E, Pinto da Silva Bon E (2008) Biotechnology of Holocellulose-Degrading Enzymes. In: *Biocatalysis and Bioenergy*. pp 195–229
 22. BBC R (2017) Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. In: BBC Research. <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>. Accessed 13 Jul 2018
 23. Searle S, Malins C (2015) A reassessment of global bioenergy potential in 2050. *GCB Bioenergy* 7:328–336 . doi: 10.1111/gcbb.12141
 24. Zalfar S (2019) A primer on agricultural residues. In: *Bioenergy consult*. <https://www.bioenergyconsult.com/tag/primary-residues/>. Accessed 17 Nov 2019
 25. Hoogwijk M (2003) Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass and Bioenergy* 25:119–133 . doi: 10.1016/S0961-9534(02)00191-5
 26. Tripathi N, Hills CD, Singh RS, Atkinson CJ (2019) Biomass waste utilisation in low-carbon products: harnessing a major potential resource. *npj Climate and Atmospheric Science* 35:10 . doi: 10.1038/s41612-019-0093-5

27. Cherubin MR, Oliveira DMDS, Feigl BJ, Pimentel LG, Lisboa IP, Gmach MR, Varanda LL, Morais MC, Satiro LS, Popin GV, De Paiva SR, Dos Santos AKB, De Vasconcelos ALS, De Melo PLA, Cerri CEP, Cerri CC (2018) Crop residue harvest for bioenergy production and its implications on soil functioning and plant growth: A review. *Scientia Agricola* 75:255–272 . doi: 10.1590/1678-992x-2016-0459
28. Tarkalson BDD, Brown B, Kok H, Bjorneberg DL (2009) Impact of Removing Straw from Wheat and Barley Fields: A Literature Review. *Better Crops* 93:17–19
29. Monteleone M, Cammerino ARB, Garofalo P, Delivand MK (2015) Straw-to-soil or straw-to-energy? An optimal trade off in a long term sustainability perspective. *Applied Energy* 154:891–899 . doi: 10.1016/j.apenergy.2015.04.108
30. Andrew SS (2006) Crop residue removal for biomass energy production: Effects on soils and recommendations. USDA-Natural Resource Conservation Service 7
31. Daioglou V, Stehfest E, Wicke B, Faaij A, van Vuuren DP (2016) Projections of the availability and cost of residues from agriculture and forestry. *GCB Bioenergy* 8:456–470 . doi: 10.1111/gcbb.12285
32. Scarlat N, Martinov M, Dallemand JF (2010) Assessment of the availability of agricultural crop residues in the European Union: Potential and limitations for bioenergy use. *Waste Management* 30:1889–1897 . doi: 10.1016/j.wasman.2010.04.016
33. Sietske Boschma D, Kees I, Kwant W (2013) Rice straw and wheat straw: potentials feedstocks for the biobased economy
34. FAO (2018) Crop Residues. In: FAOSTAT Emissions Database Agriculture. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/GA>. Accessed 28 Jun 2017
35. Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA (2013) Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS ONE* 8:e66428 . doi: 10.1371/journal.pone.0066428
36. Kim S, Dale BE (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy* 26:361–375 . doi: 10.1016/j.biombioe.2003.08.002

37. Bezerra TL, Ragauskas AJ (2016) A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6:246–256 . doi: 10.1002/bbb
38. Shalini R, Gupta DK (2010) Utilization of pomace from apple processing industries : a review. *Journal of Food Science and Technology* 47:365–371 . doi: 10.1007/s13197-010-0061-x
39. FAO (2013) Part 3: Feeding the world. In: *FAO Statistical Yearbook 2013*. pp 123–158
40. Macauley H (2015) Cereal crops: rice, maize, millet, sorghum, wheat. In: *Feeding Africa: An action plan for African agricultural transformation*. pp 1–36
41. Assefa Y, Roozeboom K, Thompson C, Schlegel A, Stone L, Lingenfelter J (2014) Corn and grain sorghum comparison: all things considered, 1^a Ed. Elsevier, Oxford, UK
42. Olesen JE, Trnka M, Kersebaum KC, Skjelvåg AO, Seguin B, Peltonen-Sainio P, Rossi F, Kozyra J, Micale F (2011) Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. *European Journal of Agronomy* 34:96–112 . doi: 10.1016/j.eja.2010.11.003
43. Oerke EC, Dehne HW (2004) Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* 23:275–285 . doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.001
44. Willer H, Lernoud J, Huber B, Sahota A (2015) The world of organic agriculture - Statistics and Emerging Trends, 1^a Ed. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Bonn
45. Wrigley C, Corke H, Seetharaman K, Faubion J (2015) *Encyclopedia of Food Grains - The world of food grains*, 2^a Ed. Elsevier
46. Medina J, Monreal C, Barea JM, Arriagada C, Borie F, Cornejo P (2015) Crop residue stabilization and application to agricultural and degraded soils : A review. *Waste Management*. doi: 10.1016/j.wasman.2015.04.002
47. Nasa (2017) Technology Readiness Level. https://www.nasa.gov/directorates/heo/scan/engineering/technology/txt_accordion1.html. Accessed 17 Nov 2019
48. Bacovsky D (2019) Production Facilities. In: *ETIP Bioenergy*.

- <http://www.etipbioenergy.eu/databases/production-facilities>. Accessed 25 Apr 2020
49. Energy.gov (2020) Integrated Biorefineries. In: Energy Efficiency & Renewable Energy. <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/integrated-biorefineries>. Accessed 25 Apr 2020
 50. Bentsen NS, Felby C (2012) Biomass for energy in the European Union - a review of bioenergy resource assessments. *Biotechnology for Biofuels* 5:1–10
 51. Beringer T, Lucht W, Schaphoff S (2011) Bioenergy production potential of global biomass plantations under environmental and agricultural constraints. *GCB Bioenergy* 3:299–312 . doi: 10.1111/j.1757-1707.2010.01088.x
 52. Kiran EU, Trzcinski AP, Liu Y (2015) Platform chemical production from food wastes using a biorefinery concept. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90:1364–1379 . doi: 10.1002/jctb.4551
 53. Gontard N, Sonesson U, Birkved M, Majone M, Bolzonella D, Celli A, Angellier-Coussy H, Jang GW, Verniquet A, Broeze J, Schaer B, Batista AP, Sebok A (2018) A research challenge vision regarding management of agricultural waste in a circular bio-based economy. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 48:614–654 . doi: 10.1080/10643389.2018.1471957
 54. Aouf C, Benyahya S, Esnouf A, Caillol S, Boutevin B, Fulcrand H (2014) Tara tannins as phenolic precursors of thermosetting epoxy resins. *European Polymer Journal* 55:186–198 . doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.03.034
 55. Jong E de, Higson A, Walsh P, Wellisch M (2012) Bio-based Chemicals: Value Added Products from Biorefineries. IEA Bioenergy - Task 42 Biorefinery 36
 56. European Bioplastic (2018) Bioplastics market data. In: Market Drivers. <https://www.european-bioplastics.org/market/>. Accessed 25 Sep 2018
 57. OECD/FAO (2019) Biofuels. In: *Oecd-Fao Agricultural Outlook 2019 - 2028*. pp 204–216
 58. Philp J (2014) Policies for bioplastics in the context of a bioeconomy
 59. Newton T (2017) Coffee Isn't World's 2nd-Most Traded Commodity (But

- It's Important). In: Perfect Daily Grind. [https://perfectdailygrind.com/2017/05/coffee-isnt-worlds-2nd-most-traded-commodity-but-its-important/#:~:text=May 11%2C 2017-,Coffee Isn't World's 2nd-Most,Traded Commodity \(But It's Important\)&text=“Coffee is the world's second,Senate Committee on Foreign](https://perfectdailygrind.com/2017/05/coffee-isnt-worlds-2nd-most-traded-commodity-but-its-important/#:~:text=May 11%2C 2017-,Coffee Isn't World's 2nd-Most,Traded Commodity (But It's Important)&text=“Coffee is the world's second,Senate Committee on Foreign)
60. Wagner J (2019) International trade in goods statistics by product Exports 2001-2019. In: International Trade in Goods. <https://www.intracen.org/itc/market-info-tools/statistics-export-product-country/>
 61. Conab (2019) Acompanhamento da safra brasileira de café. Brasília
 62. Esquivel P, Jiménez VM (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46:488–495 . doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.028
 63. Orozco AL., Pérez MI, Guevara O, Rodríguez J, Hernández M, González-Vila FJ, Polvillo O, Arias ME (2008) Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py–GC/MS analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 81:247–252 . doi: 10.1016/j.jaap.2007.12.002
 64. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000) New developments in solid state fermentation : I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35:1153–1169
 65. Caetano NS, Caldeira D, Martins AA, Mata TM (2017) Valorisation of spent coffee grounds: production of biodiesel via enzymatic catalysis with ethanol and a co-solvent. *Waste and Biomass Valorization* 8:1981–1994 . doi: 10.1007/s12649-016-9790-z
 66. Kondamudi N, Mohapatra SK, Misra M (2008) Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:11757–11760 . doi: 10.1021/jf802487s
 67. Mazzafera P (2002) Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Scientia Agricola* 59:815–821 . doi: 10.1590/S0103-90162002000400030
 68. Givens DI, Barber WP (1986) In vivo evaluation of spent coffee grounds

- as a ruminant feed. *Agricultural Wastes* 18:69–72 . doi: 10.1016/0141-4607(86)90108-3
69. Costa ASG, Alves RC, Vinha AF, Costa E, Costa CSG, Nunes MA, Almeida AA, Santos-Silva A, Oliveira MBPP (2018) Nutritional, chemical and antioxidant/pro-oxidant profiles of silverskin, a coffee roasting by-product. *Food Chemistry* 267:28–35 . doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.106
70. Hijosa-Valsero M, Garita-Cambronero J, Paniagua-García AI, Díez-Antolínez R (2018) Biobutanol production from coffee silverskin. *Microbial Cell Factories* 17:154 . doi: 10.1186/s12934-018-1002-z
71. Licursi D, Antonetti C, Fulignati S, Corsini A, Boschi N, Galletti AMR (2018) Smart valorization of waste biomass: Exhausted lemon peels, coffee silverskins and paper wastes for the production of levulinic acid. *Chemical Engineering Transactions* 65:637–642 . doi: 10.3303/CET1865107
72. Murthy PS, Naidu MM, Srinivas P (2009) Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84:1246–1249 . doi: 10.1002/jctb.2142
73. Cerda A, Mejías L, Gea T, Sánchez A (2017) Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresource Technology* 243:1059–1068 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.076
74. Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G (1993) Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 15:254–260 . doi: 10.1016/0141-0229(93)90146-S
75. Sung SH, Chang Y, Han J (2017) Development of polylactic acid nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals derived from coffee silverskin. *Carbohydrate Polymers* 169:495–503 . doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.037
76. Carnier R, Berton RS, Coscione AR, Pires AMM, Corbo JZF (2019) Coffee silverskin and expired coffee powder sed as organic fertilizers. *Coffee Science* 14:24 . doi: 10.25186/cs.v14i1.1514

77. Navya PN, Pushpa SM (2013) Production, statistical optimization and application of endoglucanase from *Rhizopus stolonifer* utilizing coffee husk. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36:1115–1123 . doi: 10.1007/s00449-012-0865-3
78. Dias M, Melo MM, Schwan RF, Silva CF (2015) A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to β -glucosidase production by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 61:588–595 . doi: 10.1111/lam.12498
79. Selvam K, Govarathanan M, Kamala-Kannan S, Govindharaju M, Senthilkumar B, Selvankumar T, Sengottaiyan A (2014) Process optimization of cellulase production from alkali-treated coffee pulp and pineapple waste using *Acinetobacter* sp. TSK-MASC. *RSC Advances* 4:13045–13051 . doi: 10.1039/c4ra00066h
80. NguyenTrung Hau, Ra CH, Sunwoo IY, Sukwong P, Jeong GT, Kim SK (2017) Bioethanol production from soybean residue via separate hydrolysis and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1–11 . doi: 10.1007/s12010-017-2565-6
81. Pereira DM (2017) Avaliação da capacidade antioxidante e anti-inflamatória do isolado proteico de soja, do okara e de seus hidrolisados. Universidade Estadual de Campinas
82. Santos VAQ, Nascimento CG, Schimidt CAP, Mantovani D, Dekker RFH, da Cunha MAA (2018) Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. *LWT - Food Science and Technology* 92:509–515 . doi: 10.1016/j.lwt.2018.02.067
83. Rodrigues C, Vandenberghe LPS, Goyzueta LD, Soccol CR (2016) Production, extraction and purification of gibberellic acid by solid state fermentation Using Citric Pulp and Soy Husk. *BAOJ Chemistry* 2:
84. Cunha JRB, Santos FCP dos, Assis FG do V de, Leal PL (2016) Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. *Revista Ceres* 63:597–604 . doi: 10.1590/0034-737X201663050002
85. Tombini J (2015) Produção de lipase fúngica a partir de subprodutos do processamento de soja. Universidade Tecnológica Federal do Paraná

86. Ellilä S, Fonseca L, Uchima C, Cota J, Goldman GH, Saloheimo M, Sacon V, Siika-Aho M (2017) Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnology for Biofuels* 10:1–17 . doi: 10.1186/s13068-017-0717-0
87. Zhu J, Zheng Y, Xu F, Li Y (2014) Solid-state anaerobic co-digestion of hay and soybean processing waste for biogas production. *Bioresource Technology* 154:240–247 . doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.045
88. Yin X, Duan X, You Q, Dai C, Tan Z, Zhu X (2016) Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate using calcined duck eggshell as catalyst. *Energy Conversion and Management* 112:199–207. doi: 10.1016/j.enconman.2016.01.026
89. Granjo JFO, Duarte BPM, Oliveira NMC (2017) Integrated production of biodiesel in a soybean biorefinery: Modeling, simulation and economical assessment. *Energy* 129:273–291 . doi: 10.1016/j.energy.2017.03.167
90. Szczerbowski D, Pitarelo AP, Zandoná Filho A, Ramos LP (2014) Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. *Carbohydrate Polymers* 114:95–101 . doi: 10.1016/j.carbpol.2014.07.052
91. RFA - Renewable Fuels Association (2017) Building Partnerships | Growing Markets 2017 ethanol industry outlook. In: Henderson M, Koehler N, Seurer J, Dinneen B (eds) National Ethanol Conference. Washington, DC, p 40
92. Moreira LR de S, Campos M de C, Siqueira PHVM de, Silva LP, Ricart CAO, Martins PA, Queiroz RML, Filho EXF (2013) Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genetics and Biology* 60:46–52 . doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.006
93. Camassola M, Dillon AJP (2014) Effect of different pretreatment of sugar cane bagasse on cellulase and xylanases production by the mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 grown in submerged culture. *BioMed Research International* 2014:9. doi: 10.1155/2014/720740
94. Prajapati BP, Jana UK, Suryawanshi RK, Kango N (2020) Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic

- cocktail for 2G bio-ethanol production. *Renewable Energy* 152:653–663 . doi: 10.1016/j.renene.2020.01.063
95. Jain L, Agrawal D (2018) Performance evaluation of fungal cellulases with dilute acid pretreated sugarcane bagasse: A robust bioprospecting strategy for biofuel enzymes. *Renewable Energy* 115:978–988 . doi: 10.1016/j.renene.2017.09.021
 96. Kumar S, Sharma HK, Sarkar BC (2011) Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Science and Biotechnology* 20:1289–1298 . doi: 10.1007/s10068-011-0178-3
 97. Xue DS, Chen HY, Lin DQ, Guan YX, Yao SJ (2012) Optimization of a natural medium for cellulase by a marine *Aspergillus niger* using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167:1963–1972 . doi: 10.1007/s12010-012-9734-4
 98. Gelain L, Pradella JG da C, Costa AC da (2015) Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. *Bioresource Technology* 198:101–107 . doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.148
 99. He YC, Xia DQ, Ma CL, Gong L, Gong T, Wu MX, Zhang Y, Tang YJ, Xu JH, Liu YY (2013) Enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide-tolerant cellulase from a newly isolated *Galactomyces* sp. CCZU11-1. *Bioresource Technology* 135:18–22. doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.156
 100. Mokomele T, da Costa Sousa L, Bals B, Balan V, Goosen N, Dale BE, Görgens JF (2018) Using steam explosion or AFEX™ to produce animal feeds and biofuel feedstocks in a biorefinery based on sugarcane residues. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 12:1–19 . doi: 10.1002/bbb.1927
 101. Schmidt LM, Mthembu LD, Reddy P, Deenadayalu N, Kaltschmitt M, Smirnova I (2017) Levulinic acid production integrated into a sugarcane bagasse based biorefinery using thermal-enzymatic pretreatment. *Industrial Crops and Products* 99:172–178 . doi: 10.1016/j.indcrop.2017.02.010

102. Almeida FCR, Sales A, Moretti JP, Mendes PCD (2015) Sugarcane bagasse ash sand (SBAS): Brazilian agroindustrial by-product for use in mortar. *Construction and Building Materials* 82:31–38 . doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.02.039
103. Pratto B, de Souza RBA, Sousa R, da Cruz AJG (2016) Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 178:1430–1444 . doi: 10.1007/s12010-015-1957-8
104. Carpio LGT, De Souza FS (2019) Competition between Second-Generation Ethanol and Bioelectricity using the Residual Biomass of Sugarcane: Effects of uncertainty on the production mix. *Molecules* 24:1–15 . doi: 10.3390/molecules24020369
105. Menandro LMS, Cantarella H, Franco HCJ, Kölln OT, Pimenta MTB, Sanches GM, Rabelo SC, Carvalho JLN (2017) Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 11:488–504 . doi: 10.1002/bbb.1760
106. You X, van Heiningen A, Sixta H, Iakovlev M (2017) Lignin and ash balances of sulfur dioxide-ethanol-water fractionation of sugarcane straw. *Bioresource Technology* 244:1111–1120 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.097
107. Hernández-Pérez AF, de Arruda PV, Felipe M das G de A (2016) Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Brazilian Journal of Microbiology* 47:489–496 . doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.019
108. Candido RG, Gonçalves AR (2016) Synthesis of cellulose acetate and carboxymethylcellulose from sugarcane straw. *Carbohydrate Polymers* 152:679–686 . doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.071
109. Mariano AP, Dias MOS, Junqueira TL, Cunha MP, Bonomi A, Filho RM (2013) Butanol production in a first-generation Brazilian sugarcane biorefinery: Technical aspects and economics of greenfield projects. *Bioresource Technology* 135:316–323 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.109
110. Sekhon JK, Rosentrater KA, Jung S, Wang T (2018) Effect of co-

- products of enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans, enzymes, and surfactant on oil recovery from integrated corn-soy fermentation. *Industrial Crops and Products* 121:441–451 . doi: 10.1016/j.indcrop.2018.05.033
111. Jin Q, Yang L, Poe N, Huang H (2018) Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. *Trends in Food Science and Technology* 74:119–131 . doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.014
 112. Huang H, Liu W, Singh V, Danao MGC, Eckhoff SR (2012) Effect of harvest moisture content on selected yellow dent corn: Dry-grind fermentation characteristics and ddgs composition. *Cereal Chemistry* 89:217–221 . doi: 10.1094/CCHEM-11-11-0142
 113. Bals B, Dale B, Balan V (2006) Enzymatic hydrolysis of distiller's dry grain and solubles (DDGS) using ammonia fiber expansion pretreatment. *Energy and Fuels* 20:2732–2736 . doi: 10.1021/ef060299s
 114. Zaini NABM, Chatzifragkou A, Charalampopoulos D (2018) Microbial production of d-lactic acid from dried distiller's grains with solubles. *Engineering in Life Sciences* 1–23 . doi: 10.1002/elsc.201800077
 115. Foo KY (2016) Value-added utilization of maize cobs waste as an environmental friendly solution for the innovative treatment of carbofuran. *Process Safety and Environmental Protection* 100:295–304 . doi: 10.1016/j.psep.2016.01.020
 116. Miraboutalebi SM, Nikouzad SK, Peydayesh M, Allahgholi N, Vafajoo L, McKay G (2017) Methylene blue adsorption via maize silk powder: Kinetic, equilibrium, thermodynamic studies and residual error analysis. *Process Safety and Environmental Protection* 106:191–202 . doi: 10.1016/j.psep.2017.01.010
 117. Indah S, Helard D, Sasmita A (2016) Utilization of maize husk (*Zea mays* L.) as low-cost adsorbent in removal of iron from aqueous solution. *Water Science and Technology* 73:2929–2935 . doi: 10.2166/wst.2016.154
 118. Guyo U, Makawa T, Moyo M, Nharingo T, Nyamunda BC, Mugadza T (2015) Application of response surface methodology for Cd(II) adsorption on maize tassel-magnetite nanohybrid adsorbent. *Journal of*

- Environmental Chemical Engineering 3:2472–2483 . doi: 10.1016/j.jece.2015.09.006
119. Agblevor FA, Ibrahim MM, El-Zawawy WK (2007) Coupled acid and enzyme mediated production of microcrystalline cellulose from corn cob and cotton gin waste. *Cellulose* 14:247–256 . doi: 10.1007/s10570-006-9103-y
120. Veljković VB, Biberdžić MO, Banković-Ilić IB, Djalović IG, Tasić MB, Nježić ZB, Stamenković OS (2018) Biodiesel production from corn oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 91:531–548 . doi: 10.1016/j.rser.2018.04.024
121. Mata TM, Sousa IRBG, Vieira SS, Caetano NS (2012) Biodiesel production from corn oil via enzymatic catalysis with ethanol. *Energy and Fuels* 26:3034–3041 . doi: 10.1021/ef300319f
122. Kapoor M, Panwar D, Kaira GS (2016) Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes: Technical Challenges and Commercialization Potential. In: *Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass*. Elsevier Inc., pp 61–93
123. Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* 101:4744–4753 . doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.080
124. Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M (2006) Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130:496–508 . doi: 10.1385/ABAB:130:1:496
125. Qureshi N, Saha BC, Cotta MA (2007) Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 30:419–427 . doi: 10.1007/s00449-007-0137-9
126. Mancini G, Papirio S, Lens PNL, Esposito G (2018) Increased biogas production from wheat straw by chemical pretreatments. *Renewable Energy* 119:608–614 . doi: 10.1016/j.renene.2017.12.045
127. Kaparaju P, Serrano M, Thomsen AB, Kongjan P, Angelidaki I (2009) Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a

- biorefinery concept. *Bioresource Technology* 100:2562–2568 . doi: 10.1016/j.biortech.2008.11.011
128. Dang VBH, Doan HD, Dang-Vu T, Lohi A (2009) Equilibrium and kinetics of biosorption of cadmium(II) and copper(II) ions by wheat straw. *Bioresource Technology* 100:211–219 . doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.031
129. Chen L, Hong F, Yang X xia, Han S fen (2013) Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. *Bioresource Technology* 135:464–468 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.029
130. Pourbafrani M, Forgács G, Horváth IS, Niklasson C, Taherzadeh MJ (2010) Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology* 101:4246–4250 . doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.077
131. Boluda-Aguilar M, López-Gómez A (2013) Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products* 41:188–197 . doi: 10.1016/j.indcrop.2012.04.031
132. Muthayya S, Sugimoto JD, Montgomery S, Maberly GF (2014) An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1324:7–14 . doi: 10.1111/nyas.12540
133. Bienvenido JO (2016) Rice straw. In: Rice Knowledge Bank. <http://www.knowledgebank.irri.org/step-by-step-production/postharvest/rice-by-products/rice-straw>
134. Kogo T, Yoshida Y, Koganei K, Matsumoto H, Watanabe T, Ogihara J, Kasumi T (2017) Production of rice straw hydrolysis enzymes by the fungi *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens* using rice straw as a carbon source. *Bioresource Technology* 233:67–73 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.075
135. Wanmolee W, Sornlake W, Rattanaphan N, Suwannarangsee S (2016) Biochemical characterization and synergism of cellulolytic enzyme system from *Chaetomium globosum* on rice straw saccharification. *BMC Biotechnology* 1–12 . doi: 10.1186/s12896-016-0312-7
136. Bohlmann GM (2006) Process economic considerations for production

- of ethanol from biomass feedstocks. *Industrial Biotechnology* 2:14–20 .
doi: 10.1089/ind.2006.2.14
137. Pinzi S, Dorado MP (2011) Vegetable-based feedstocks for biofuels production. Woodhead Publishing Limited
 138. Saritha M, Arora A, Singh S, Nain L (2013) *Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields. *Bioresource Technology* 135:12–17 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.040
 139. Tiwari R, Rana S, Singh S, Arora A, Kaushik R, Agrawal VV, Saxena AK, Nain L (2013) Biological delignification of paddy straw and *Parthenium* sp. using a novel micromycete *Myrothecium roridum* LG7 for enhanced saccharification. *Bioresource Technology* 135:7–11 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.079
 140. Moniz P, Lino J, Duarte LC, Roseiro LB, Boeriu CG, Pereira H, Carneiro F (2015) Fractionation of hemicelluloses and lignin from rice straw by combining autohydrolysis and optimised mild organosolv delignification. *BioResources* 10:2626–2641 . doi: 10.15376/biores.10.2.2626-2641
 141. Mohammadi A, Cowie AL, Cacho O, Kristiansen P, Anh Mai TL, Joseph S (2017) Biochar addition in rice farming systems: Economic and energy benefits. *Energy* 140:415–425 . doi: 10.1016/j.energy.2017.08.116
 142. Do PTM, Ueda T, Kose R, Nguyen LX, Okayama T, Miyanishi T (2019) Properties and potential use of biochars from residues of two rice varieties, Japanese *Koshihikari* and Vietnamese IR50404. *Journal of Material Cycles and Waste Management* 21:98–106 . doi: 10.1007/s10163-018-0768-8
 143. Nguyen DH, Zenitova LA, Le QD, Tien D, Bui T (2019) Use of burn rice residues for production of nanosilica. *Butlerov Communications* 57:155–161
 144. Rivers DB (2012) Biomass conversion technology: thoughts on the path forward to commercial adoption. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6:246–256 . doi: 10.1002/bbb
 145. Farias M (2015) Incêndio atinge estoque de palha da empresa Granbio em AL de novo. In: Globo.com.

- <http://g1.globo.com/al/alagoas/noticia/2015/12/incendio-atinge-novamente-estoque-da-empresa-granbio.html>
146. Energy.gov (2014) POET-DSM: Project Liberty You. In: Energy Efficiency & Renewable Energy. <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/poet-dsm-project-liberty>. Accessed 25 Apr 2020
 147. De Corato U, De Bari I, Viola E, Pugliese M (2018) Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 88:326–346 . doi: 10.1016/j.rser.2018.02.041
 148. King SD (2010) The Future of Industrial Biorefineries. In: World economic forum. Geneva, p 40
 149. Lapola DM, Schaldach R, Alcamo J, Bondeau A, Koch J, Koelking C, Priess JA (2010) Indirect land-use changes can overcome carbon savings from biofuels in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:3388–3393 . doi: 10.1073/pnas.0907318107
 150. Gibbs HK, Rausch L, Munger J, Schelly I, Morton DC, Noojipady P, Soares-Filho B, Barreto P, Micol L, Walker NF (2015) Brazil’s Soy Moratorium: Supply-chain governance is needed to avoid deforestation. *Science* 347:377–378 . doi: 10.1126/science.aaa0181
 151. O’Hare M, Delucchi M, Edwards R, Fritsche U, Gibbs H, Hertel T, Hill J, Kammen D, Laborde D, Marelli L, Mulligan D, Plevin R, Tyner W (2011) Comment on “Indirect land use change for biofuels: Testing predictions and improving analytical methodologies” by Kim and Dale: Statistical reliability and the definition of the indirect land use change (iLUC) issue. *Biomass and Bioenergy* 35:4485–4487 . doi: 10.1016/j.biombioe.2011.08.004
 152. Hombach LE, Cambero C, Sowlati T, Walther G (2016) Optimal design of supply chains for second generation biofuels incorporating European biofuel regulations. *Journal of Cleaner Production* 133:565–575 . doi: 10.1016/j.jclepro.2016.05.107

153. Plevin RJ, O'Hare M, Jones AD, Torn MS, Gibbs HK (2010) Greenhouse gas emissions from biofuels' indirect land use change are uncertain but may be much greater than previously estimated. *Environmental Science and Technology* 44:8015–8021 . doi: 10.1021/es101946t
154. Kim S, Dale BE (2011) Indirect land use change for biofuels: Testing predictions and improving analytical methodologies. *Biomass and Bioenergy* 35:3235–3240 . doi: 10.1016/j.biombioe.2011.04.039
155. Sorda G, Banse M, Kemfert C (2010) An overview of biofuel policies across the world. *Energy Policy* 38:6977–6988 . doi: 10.1016/j.enpol.2010.06.066
156. FAO (2018) Crops. In: FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 18 Mar 2018
157. Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB (2011) Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29:675–685 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005
158. Nunes R de M, Guarda EA, Serra JC V., Martins AA (2013) Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. *Revista Liberato* 14:113–238
159. USDA (2018) Production, Supply and Distribution. In: Foreign Agricultural Service. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>. Accessed 18 Mar 2018
160. Lal R (2005) World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environment International* 31:575–584 . doi: 10.1016/j.envint.2004.09.005
161. Battista F, Fino D, Mancini G (2016) Optimization of biogas production from coffee production waste. *Bioresource Technology* 200:884–890 . doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.020
162. Hermosa VAB (2014) Aproveitamento de resíduos do processamento semi-seco do café para produção de compostos de valor agregado. Universidade Federal de Lavras
163. Machado CMM, Soccol CR, De Oliveira BH, Pandey A (2002) Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering*

- and Biotechnology 102–103:179–191 . doi: 10.1385/ABAB:102-103:1-6:179
164. Dias M (2016) Aproveitamento de resíduos do processamento de café para produção de carotenoides por leveduras e bactérias. Universidade de Lavras
 165. Salmones D, Mata G, Waliszewski KN (2005) Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology* 96:537–44 . doi: 10.1016/j.biortech.2004.06.019
 166. Filho ML de M, Busanello M, Prudencio SH, Garcia S (2018) Soymilk with okara flour fermented by *Lactobacillus acidophilus*: Simplex-centroid mixture design applied in the elaboration of probiotic creamy sauce and storage stability. *LWT - Food Science and Technology* 93:339–345 . doi: 10.1016/j.lwt.2018.03.046
 167. Khare SK, Jha K, Gandhi AP (1995) Citric acid production from Okara (soy-residue) by solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 54:323–325 . doi: 10.1016/0960-8524(95)00155-7
 168. Robl D, Costa S, Büchli F, Juliana D, Delabona S, Marcio F, Chapaval I, Padilla G (2015) Bioresource technology enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Annulohyphomyces stygium* glycohydrolases. *Bioresource Technology* 177:247–254 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.082
 169. Moreira L, Campos MC, Siqueira PHVM, Silva LP, Ricart CAO, Martins PA, Queiroz RML, Filho EXF (2013) Two beta-xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genetics and Biology* 60:46–52
 170. Böjti T, Kovács KL, Kakuk B, Wirth R, Rákhely G, Bagi Z (2017) Pretreatment of poultry manure for efficient biogas production as monosubstrate or co-fermentation with maize silage and corn stover. *Anaerobe* 46:138–145 . doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.03.017
 171. Samanta AK, Senani S, Kolte AP, Sridhar M, Sampath KT, Jayapal N, Devi A (2012) Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food and Bioproducts Processing* 90:466–474 . doi: 10.1016/j.fbp.2011.11.001

172. Pérez-Rodríguez N, García-Bernet D, Domínguez JM (2017) Extrusion and enzymatic hydrolysis as pretreatments on corn cob for biogas production. *Renewable Energy* 107:597–603 . doi: 10.1016/j.renene.2017.02.030
173. Xia L, Cen P (1999) Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry* 34:909–912 . doi: 10.1016/S0032-9592(99)00015-1
174. Chang C, Cen P, Ma X (2007) Levulinic acid production from wheat straw. *Bioresource Technology* 98:1448–1453 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.03.031
175. Zhang R, Li X, Fadel JG (2002) Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresource Technology* 82:277–284 . doi: 10.1016/S0960-8524(01)00188-2
176. Chen WH, Chen YC, Lin JG (2013) Evaluation of biobutanol production from non-pretreated rice straw hydrolysate under non-sterile environmental conditions. *Bioresource Technology* 135:262–268 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.140
177. Kim I, Rehman MSU, Kim KH, Han JI (2013) Generation of electricity from FeCl₃ pretreatment of rice straw using a fuel cell system. *Bioresource Technology* 135:635–639 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.046
178. Barana D, Salanti A, Orlandi M, Ali DS, Zoia L (2016) Biorefinery process for the simultaneous recovery of lignin, hemicelluloses, cellulose nanocrystals and silica from rice husk and *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products* 86:31–39 . doi: 10.1016/j.indcrop.2016.03.029

Anexo I
Indução enzimática de *Paecilomyces* sp em
casca de café robusta

Introdução

O café robusta é originário da África, apresenta maior resistência a pragas e fatores climáticos adversos durante seu cultivo, não proporciona sabores variados e refinados, como o arábica, e possui natureza ácida e sabor único (Halal 2008). Diferenças no conteúdo total de polissacarídeos, bem como diferenças estruturais entre as espécies de cafés arábica e robusta, são discutidas na literatura. A maioria das fontes relata menor conteúdo polissacarídico para robusta em comparação com arábica, entre 38 a 48% para robusta, e 48-55%, para arábica (Fischer et al. 2001).

Os polissacarídeos, que compõem aproximadamente 50% do peso seco dos grãos verdes, consistem em três principais tipos: mananas ou galactomananas, proteínas arabinogalactanas e celulose. Além disso, existem pequenas quantidades de polissacarídeos pécticos e xiloglucano que também se mostraram presentes (Redgwell e Fischer 2006).

Clifford (1985) relata que cafés arábicas podem conter mais arabinogalactana (9–13%) do que robusta (6–8%) e mais galactomanano (25-30% vs. 19-22%). Ele sugere que o galactomanano em robusta é mais altamente ramificado e, portanto, menos cristalino, de tal forma que, para um mesmo grau de torrefação, robustas geralmente produzem mais sólidos solúveis do que arábicas.

No presente capítulo, são apresentadas as induções holocelulolíticas das 8 cepas de *P. variotii* pertencentes à micoteca do laboratório de enzimologia, com o intuito de selecionar a melhor produtora de enzima pectinolítica dentre elas.

Materiais e métodos

O screening das 8 cepas de *P. variotii* submetidas a triagem para produção de enzimas pectinolíticas foi conduzido de acordo com o item 2.7, capítulo II, deste mesmo trabalho.

Resultados

Todas as cepas investigadas foram capazes de secretar holocelulases em diferentes níveis, de acordo com o substrato. Os perfis de indução de cada cepa serão apresentados a seguir.

A cepa 3DT13 (Figura 1) demonstrou perfil pectinolítico, com picos de atividade no primeiro e sexto dias de cultivo; CMCCase (0,04 UI/ml no primeiro dia e xilanase (0,07 UI/ml) no segundo dia; mananase (0,03 UI/ml) manteve-se estável durante todo o período de fermentação.

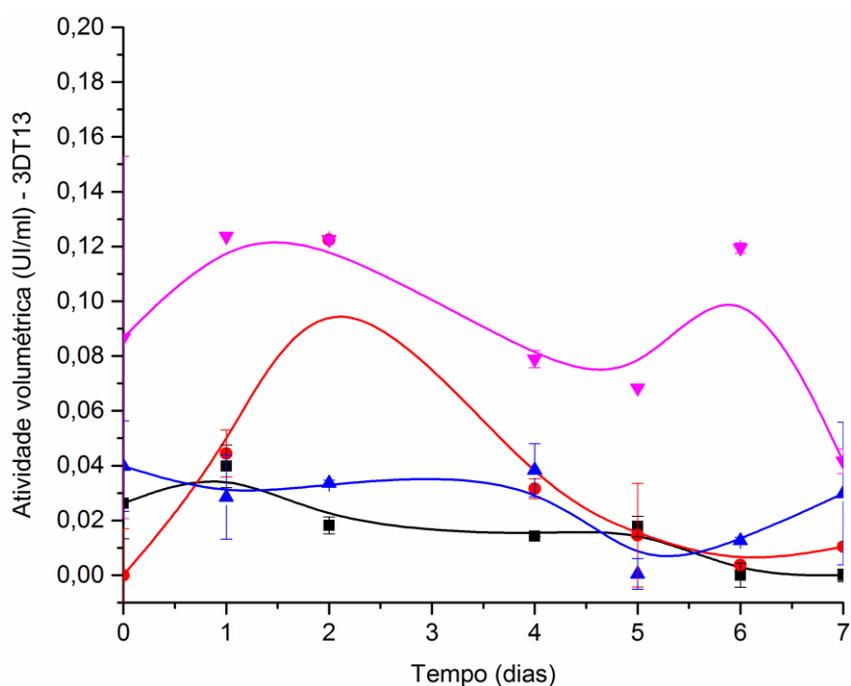


Figura 1: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* 3DT13 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (—■) Atividade de CMCCase, (—◀) atividade de xilanase, (—▶) atividade de mananase, (—▼) atividade de pectinase

A cepa 3RE14 (Figura 2) revelou aumento gradual de pectinase a partir do segundo dia e pico de atividade no sexto (0,18 UI/ml); xilanase exibiu ápice de atividade também no sexto dia (0,05 UI/ml), e mananase (0,05 UI/ml), no primeiro dia. CMCCase manteve atividades estáveis a partir do primeiro dia de cultivo.

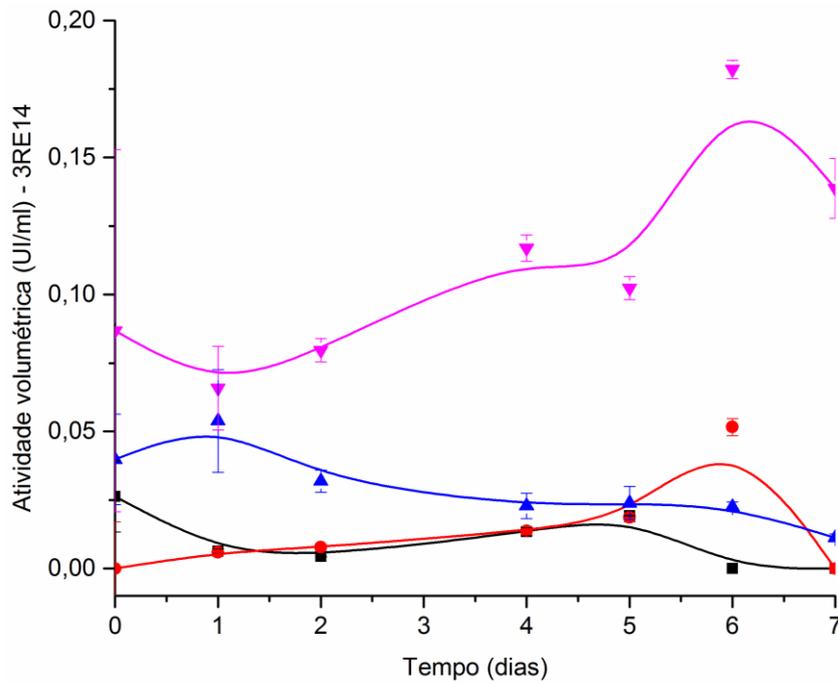


Figura 2: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* 3RE14 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (—) Atividade de CMCCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase

Um mesmo padrão de secreção e de picos de atividades foi estabelecido pela cepa 3RE22 (Figura 3), onde todas as enzimas tiveram aumento gradual de atividade a partir do segundo dia, com atividade máxima ao quinto, exceto pela atividade de pectinase, que apresentou ápice no quarto e quinto dias de cultivo (0,42 e 0,45 UI/ml, respectivamente).

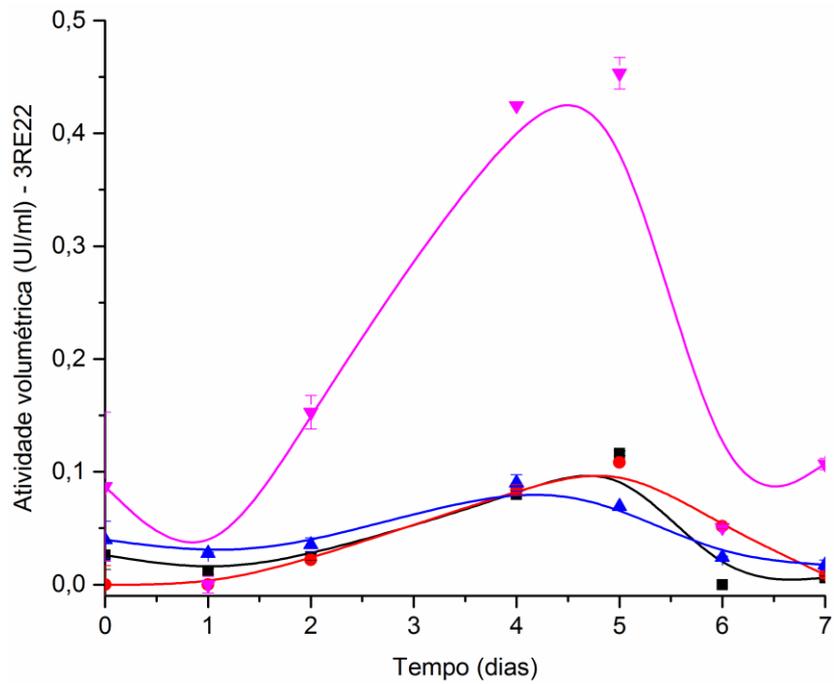


Figura 3: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* 3RE22 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (—) Atividade de CMCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase

A cepa 3RE21 (Figura 4) exibiu padrões de secreção semelhantes para indução de CMCase (0,02 UI/ml), mananase (0,05 UI/ml) e pectinase (0,15 UI/ml), que obtiveram atividades máximas no segundo dia, sendo que somente a atividade xilanolítica obteve pico ao quinto dia de cultivo (0,04 UI/ml).

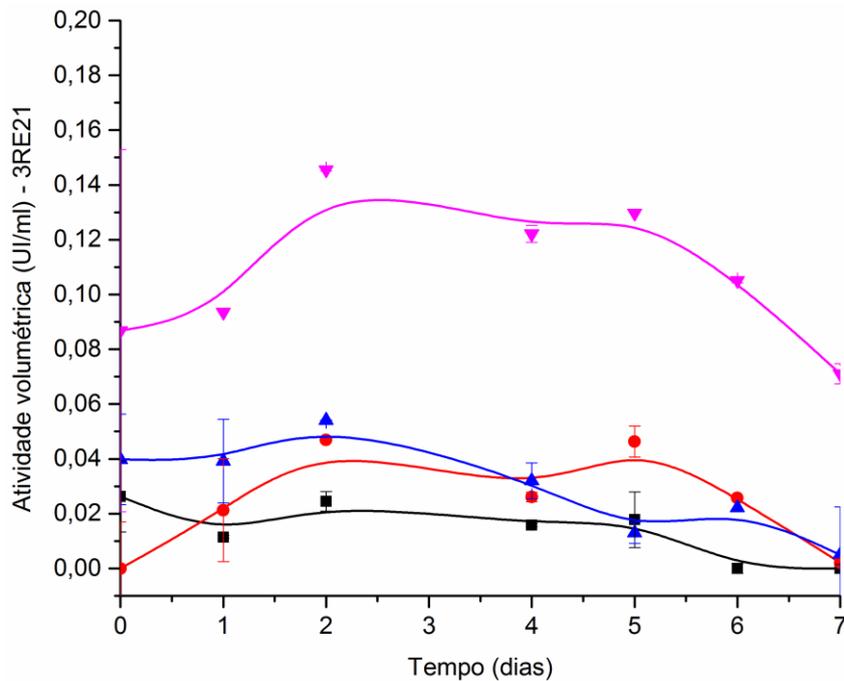


Figura 4: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* 3RE21 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (◄) Atividade de CMCCase, (◄) atividade de xilanase, (◄) atividade de mananase, (◄) atividade de pectinase

Os padrões de secreção enzimática demonstrados pela cepa CF são apresentados na Figura 5. A pectinase secretada teve aumento gradual até atingir ápice de suas atividades no quarto e sexto dias, 0,13 e 0,14 UI/ml respectivamente. O mesmo ocorreu para CMCCase (0,03 UI/ml) e xilanase (0,04 UI/ml), em que a estimulação enzimática máxima ocorreu no quarto dia, mas, para mananase, foi entre o segundo e o quarto dias (0,04 UI/ml).

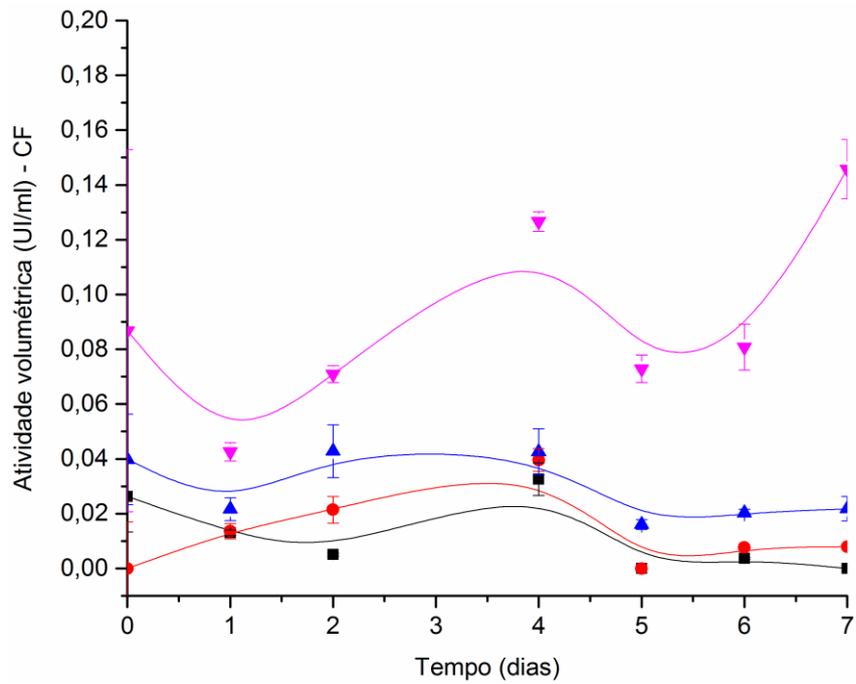


Figura 5: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* CF em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (■) Atividade de CMCase, (●) atividade de xilanase, (▲) atividade de mananase, (▼) atividade de pectinase

Parâmetros semelhantes de secreção enzimática foram verificados pela cepa DC (Figura 6). Mananase (0,04 UI/ml), CMCase (0,02 UI/ml) e xilanase (0,03 UI/ml) tiveram sucessiva atividade durante o quarto e o quinto dias, e a pectinase obteve atividade máxima no quarto dia (0,13 UI/ml).

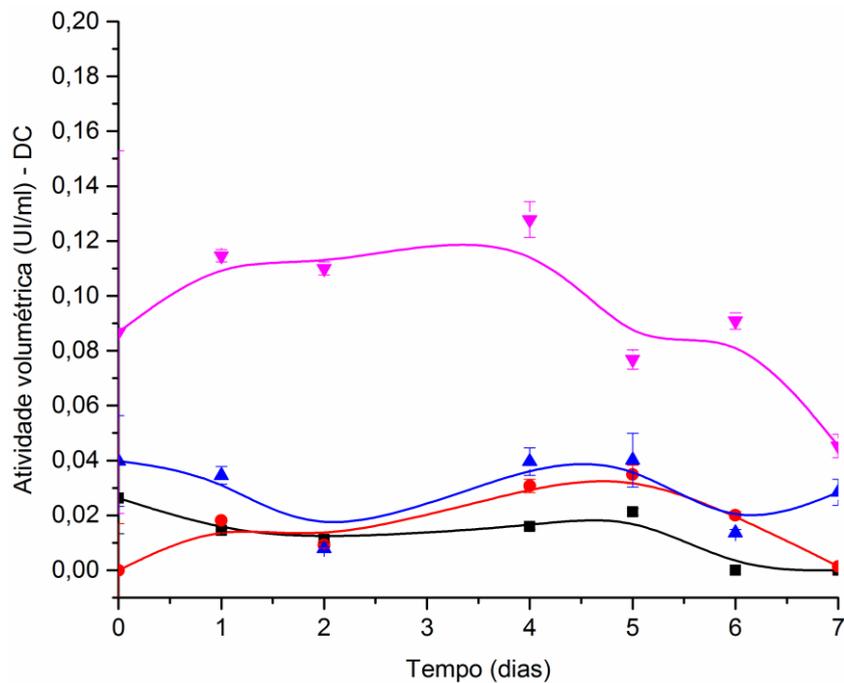


Figura 6: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* DC em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (■) Atividade de CMCCase, (●) atividade de xilanase, (▲) atividade de mananase, (▼) atividade de pectinase

Os padrões de indução holocelulolítica da cepa RC são mostrados na Figura 7. Pectinase (0,12 UI/ml) aumentou gradualmente sua atividade até atingir pico no quinto dia. Padrões semelhantes ocorreram para CMCCase (0,04 UI/ml) e mananase (0,05 UI/ml), que apresentaram atividade máxima no quarto dia, da mesma forma que xilanase (0,06 UI/ml), que teve aumento sucessivo até atingir pico no sexto dia.

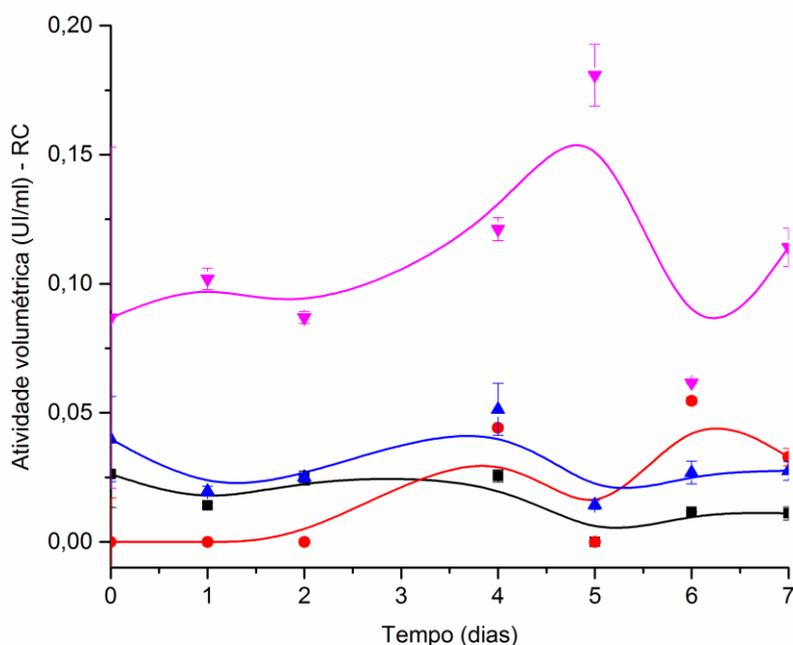


Figura 7: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* RC em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (■) Atividade de CMCCase, (●) atividade de xilanase, (▲) atividade de mananase, (▼) atividade de pectinase

A cepa 3RET13 (Figura 8) apresentou secreção enzimática a partir do início do cultivo, com picos de atividades ao primeiro dia. Para mananase (0,04 UI/ml), a atividade máxima ocorreu no primeiro dia, e, para xilanase, no sexto dia (0,05 UI/ml). A atividade pectinolítica obteve ápice no quinto e sexto dias de cultivo (0,11 e 0,12 UI/ml), respectivamente.

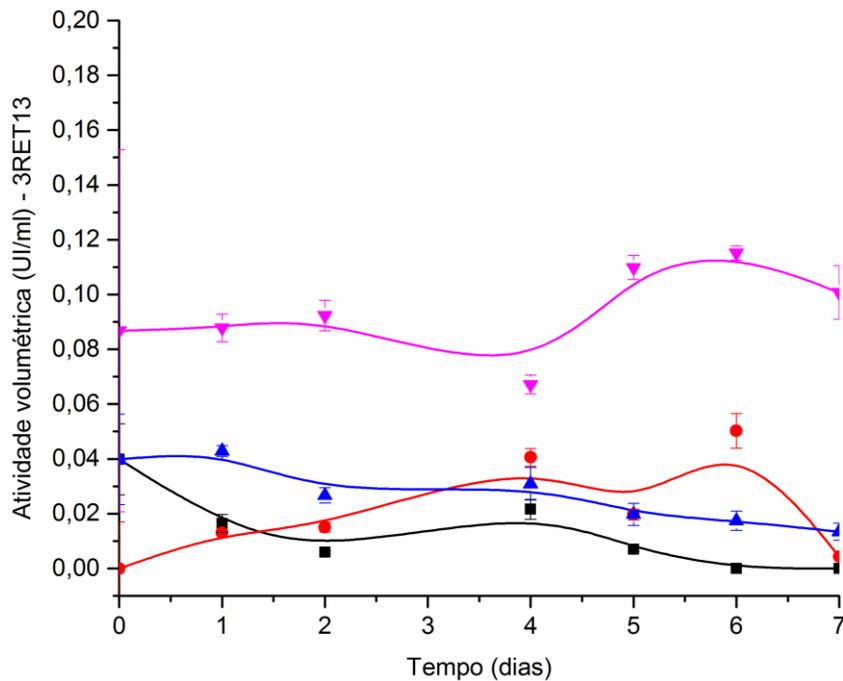


Figura 8: Perfil de indução holocelulolítica de *P. variotii* 3RET13 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v). (—) Atividade de CMCase, (—) atividade de xilanase, (—) atividade de mananase, (—) atividade de pectinase

As atividades enzimáticas obtidas durante as curvas de indução de todos os substratos (café arábica e robusta) por todas as cepas avaliadas foram consideradas subestimadas devido a não ter sido utilizado nenhum tipo de pré-tratamento físico sobre os resíduos. Porém, as cascas de café robusta demonstraram ser um pouco superiores em relação às cascas de café arábica para indução de pectinases (médias 0,10 UI/ml^a e 0,09 UI/ml^b, nessa ordem).

Dentre as cepas que obtiveram melhores atividades pectinolíticas, a composição bromatológica da biomassa apresentou influência direta. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Atividades pectinolíticas médias em casca de café robusta

Cepas	Atividades
3RE22	0,17 UI/ml ^a
3RE21	0,15 UI/ml ^a
3RE14	0,11 UI/ml ^{ab}
3RET13	0,11 UI/ml ^{abc}
3DT13	0,09 UI/ml ^{bcd}
RC	0,09 UI/ml ^{bcd}
CF	0,09 UI/ml ^{bcd}
DC	0,08 UI/ml ^{de}

*Letras minúsculas laterais indicam comparações das médias realizadas por teste de Tukey.

As cepas determinadas como melhores produtoras pectinolíticas sobre casca de robusta foram 3RE22, 3RE21 e 3RE14, por possuírem as maiores atividades enzimáticas.

Embora haja similaridade da composição bromatológica dos resíduos de café, a maior indução enzimática por casca de café robusta pode ser explicada graças ao maior teor de sólidos solúveis, cafeína e acidez em relação ao café arábica (HALAL, 2008).