



**ANA PAULA FERNANDES**

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE  
PROCESSAMENTO VIA SECA E VIA ÚMIDA  
DO CAFÉ PARA OBTENÇÃO DE PECTINASES**

**LAVRAS - MG**

**2014**

**ANA PAULA FERNANDES**

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO VIA  
SECA E VIA ÚMIDA DO CAFÉ PARA OBTENÇÃO DE PECTINASES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Aproveitamento de Resíduos Agrícolas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Fernandes, Ana Paula.

Aproveitamento de resíduos de processamento via seca e via  
úmida do café para obtenção de pectinases / Ana Paula Fernandes. –  
Lavras : UFLA, 2014.

135 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Bibliografia.

1. Resíduos agrícolas - Pectinases. 2. Pectina metilesterase. 3.  
Pectina liase. 4. Exo-poligalacturonase. 5. Endo-  
poligalacturonase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.634

**ANA PAULA FERNANDES**

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE PROCESSAMENTO VIA  
SECA E VIA ÚMIDA DO CAFÉ PARA OBTENÇÃO DE PECTINASES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Aproveitamento de Resíduos Agrícolas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 13 de novembro de 2013.

Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Heloisa Helena de Siqueira Elias	UFLA
Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dra. Margarete Marin Lordelo Volpato	EPAMIG

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2013**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para iniciar e finalizar meu trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade de cursar o Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café – INCT, pela concessão da bolsa de estudos, em especial ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende.

À Pesquisadora Sara Maria Chalfoun de Souza, pela orientação, confiança, ensinamentos, amizade e pelo tempo de convívio.

Aos membros da banca, professor Disney Ribeiro Dias, por todas as dúvidas esclarecidas e pelo tempo disponível para me receber; professor Luís Roberto Bastista, pelos ensinamentos e pela amizade; pesquisadora Margarete Marin Lordelo Volpato e a pós-doutoranda Heloisa Helena de Siqueira Elias, pelas contribuições e pela amizade.

Aos professores e à secretária Lucilene do DCA/UFLA.

Ao Departamento de Biologia, em especial a professora Rosane Freitas Schwan, pelo empréstimo de equipamentos e materiais.

À pós-doutoranda Deila Magna dos Santos Botelho e ao pós-doutorando Pedro, pela amizade e pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos laboratoristas Edinho (Departamento de Fitopatologia), pela ajuda na identificação dos fungos, Vicentina, Tina, Flávia e Denise, pela ajuda no laboratório e por vários momentos de distração.

A Tháís Odete de Oliveira, pela ajuda nas análises enzimáticas e pela amizade.

Ao pessoal da EPAMIG, em especial a Claudinha, Vicente e Dona Maritiz.

Aos meus pais, Antônio Fernandes Filho e Maria Aparecida Alves, que não mediram esforços, carinho e apoio; aos meus irmãos, Lucas Fernandes e Ana Flávia Fernandes e; também; por todas as orações dos meus familiares que torceram para que tudo desse certo.

A todas as pessoas com quem convivi, Marcela, Janaína, Jacqueline, Andressa, Virgínia, Ana Flávia e Íris, obrigada pela companhia de vocês e por todos os momentos de descontração.

Ao Márcio Fernandes que, embora hoje distante, esteve muitas vezes ao meu lado, proporcionado carinho e afeto durante muito tempo.

Por fim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

**Muito obrigada a todos vocês !!!**

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo  
do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o  
que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo  
de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

Que proveito tem o trabalhador naquilo em que trabalha?

Tenho visto o trabalho que Deus deu aos filhos dos homens, para com ele os  
exercitar.

Tudo fez formoso em seu tempo; também pôs o mundo no coração do homem,  
sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim.

Já tenho entendido que não há coisa melhor para eles do que alegrar-se e fazer  
bem na sua vida;

E também que todo o homem coma e beba, e goze do bem de todo o seu  
trabalho; isto é um dom de Deus.

Eu sei que tudo quanto Deus faz durará eternamente; nada se lhe deve  
acrescentar, e nada se lhe deve tirar; e isto faz Deus para que haja temor diante  
dele.

O que é, já foi; e o que há de ser, também já foi; e Deus pede conta do que  
passou.

Vi mais debaixo do sol que no lugar do juízo havia impiedade, e no lugar da  
justiça havia iniquidade.

Eu disse no meu coração: Deus julgará o justo e o ímpio; porque há um tempo

para todo o propósito e para toda a obra.

Disse eu no meu coração, quanto a condição dos filhos dos homens, que Deus os provaria, para que assim pudessem ver que são em si mesmos como os animais.

Porque o que sucede aos filhos dos homens, isso mesmo também sucede aos animais, e lhes sucede a mesma coisa; como morre um, assim morre o outro; e todos têm o mesmo fôlego, e a vantagem dos homens sobre os animais não é nenhuma, porque todos são vaidade.

Todos vão para um lugar; todos foram feitos do pó, e todos voltarão ao pó.

**Eclesiastes 3:1-20**

## RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo geral de utilizar a casca de café (seca e melosa) como substrato e como fonte de pectina para a obtenção de enzimas pectinolíticas. Os objetivos específicos foram caracterizar o resíduo, selecionar fungos quanto à produção de pectinases em meio sólido, avaliar a atividade enzimática pelo processo de fermentação em estado sólido e comparar a atividade enzimática produzida pelos fungos frente à atividade de enzima comercial. Foram utilizados 34 fungos para o teste semiquantitativo em placas de Petri com pectina como única fonte de carbono, em que a solução de lugol revelou os maiores halos para a produção de pectinases, dos quais foram selecionados sete isolados. Em seguida, estes isolados foram submetidos ao processo de fermentação em estado sólido, no intuito de avaliar a atividade enzimática quanto à obtenção das enzimas pectinolíticas: pectina metilesterase (PME), pectina liase (PL), exo-poligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG). Foram avaliados três tempos de fermentação (48, 96 e 168 horas). O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) e a análise de variância em esquema fatorial na parcela, sendo 2 substratos x 6 isolados. Dos microrganismos testados quanto ao potencial para a produção de pectinases em meio sólido, os que apresentaram índices enzimáticos  $\leq 2,00$  foram três isolados de *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma viride*, *Penicillium roqueforti* e *Rhizopus stolonifer*. Com relação à produção das enzimas pectinolíticas estudadas, observou-se interação tripla significativa entre os fatores substrato, tempo e isolados. O isolado *R. stolonifer* apresentou maior atividade enzimática de PME no substrato casca melosa (138,00 U/g) e no substrato casca seca (99,00 U/g), no período de 168 horas. Quando comparados com a enzima comercial (58,17 U/g), estes isolados apresentaram maior atividade enzimática. O isolado *C. cladosporioides* apresentou maior atividade enzimática de PL (898,67 U/g) no substrato casca seca, no período de 168 horas. O isolado *P. roqueforti* apresentou maior atividade enzimática de PL (418,67 U/g) no substrato casca melosa, no período de 96 horas. Quando comparados com a enzima comercial (2.169,35 U/g), nenhum dos isolados analisados produziu atividade enzimática superior a esta. O isolado *C. cladosporioides* apresentou maior atividade enzimática de Exo-PG no substrato casca melosa (3,10 U/g) e no substrato casca seca (0,98 U/g), no período de 96 horas. Maiores atividades enzimáticas foram encontradas pelos fungos analisados, quando comparados com a enzima comercial (0,16). O isolado *T. viride* apresentou maior atividade enzimática de Endo-PG (29.632 U/g) no substrato casca seca, no período de 168 horas. O isolado *R. stolonifer* apresentou maior atividade enzimática de Endo-PG (29.282,50 U/g), no período de 168 horas. Quando comparado com a enzima

comercial, maior atividade enzimática foi constatada por este isolado frente à enzima comercial (21.730,50 U/g). A casca de café seca e melosa pode ser considerada bom substrato e fonte para a obtenção de enzimas pectinolíticas. A redução na quantidade do resíduo variou de 15,00% a 24,14%, na casca seca e de 33,10% a 48,39%, na casca melosa.

Palavras-chave: Resíduos agrícolas. Pectina metilesterase. Pectina liase. Exo-poligalacturonase. Endo-poligalacturonase.

## ABSTRACT

This study was carried out with the overall goal of using coffee pulp/hulls (dried and sticky) as a substrate and as a source of pectin for obtaining pectinolytic enzymes. The specific aims were to characterize the coffee waste, select fungi in regard to production of pectinases in a solid medium, evaluate the enzymatic activity through the fermentation process in a solid state and compare the enzymatic activity produced by the fungi compared to commercial enzyme activity. A total of 34 fungi were used for the semi-quantitative test in Petri dishes with pectin as the sole source of carbon, in which Lugol's solution exhibited the largest halos for pectinase production, from which seven isolates were selected. These isolates were then subjected to the solid state fermentation process for the purpose of evaluating enzymatic activity in regard to obtaining pectinolytic enzymes: pectin methylesterase (PME), pectin lyase (PL), exo-polygalacturonase (Exo-PG) and endo-polygalacturonase (Endo-PG). Three fermentation times were evaluated (48, 96 and 168 hours). The experiment was conducted in a completely randomized experimental design (CRD) and analysis of variance in a factorial arrangement in the plot with 2 substrates and 6 isolates. Of the microorganisms tested in regard to potential for pectinase production in a solid medium, those that exhibited enzymatic indices  $\leq 2.00$  were three isolates of *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma viride*, *Penicillium roqueforti* and *Rhizopus stolonifer*. In relation to the production of the pectinolytic enzymes studied, a significant three-way interaction was observed among the substrate, time and isolate factors. The isolate *R. stolonifer* exhibited greater enzymatic activity of PME in the sticky pulp substrate (138.00 U/g) and in the dried pulp substrate (99.00 U/g) in the period of 168 hours. When compared to the commercial enzyme (58.17 U/g), these isolates exhibited greater enzymatic activity. The isolate *C. cladosporioides* exhibited greater enzymatic activity of PL (898.67 U/g) in the dried pulp substrate in the period of 168 hours. The isolate *P. roqueforti* exhibited greater enzymatic activity of PL (418.67 U/g) in the sticky pulp substrate in the period of 96 hours. None of the isolates analyzed produced greater enzymatic activity as compared to the commercial enzyme (2,169.35 U/g). The isolate *C. cladosporioides* exhibited greater enzymatic activity of Exo-PG in the sticky pulp substrate (3.10 U/g) and in the dried pulp substrate (0.98 U/g) in the period of 96 hours. Greater enzymatic activities were found by the fungi analyzed when compared to the commercial enzyme (0.16). The isolate *T. viride* exhibited greater enzymatic activity of Endo-PG (29,632 U/g) in the dried pulp substrate in the period of 168 hours. The isolate *R. stolonifer* exhibited greater enzymatic activity of Endo-PG (29,282.50 U/g) in the period of 168 hours. Greater enzymatic activity was observed for this isolate when compared to the commercial enzyme (21,730.50

U/g). Dried and sticky coffee pulp may be considered a good substrate and source for obtaining pectinolytic enzymes. Reduction in the quantity of waste ranged from 15.00% to 24.14% in dried pulp and from 33.10% to 48.39% in sticky pulp.

**Keywords:** Agricultural waste. Pectin methylesterase. Pectin lyase. Exo-polygalacturonase. Endo-polygalacturonase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química da pectina. Estrutura linear da pectina, conhecida como homogalacturana. Grupos carboxílicos metilados destacados em vermelho. Fonte: SANTI (2005) .....32
Figura 2	Membrana e parede celular vegetal .....33
Figura 3	Estrutura geral das substâncias pécticas.....36
Figura 4	Diferentes tipos de pectinases e seu mecanismo de ação nas substâncias pécticas. (A) R = H para poligalacturonases (PG) e CH <sub>3</sub> para polimetilgalacturonase (PMG), (b) para pectina esterase (PE) e (c) R = H para PGL e CH <sub>3</sub> para pectina liase (PL). A seta indica o local onde as pectinases agem nas substâncias pécticas .....43
Figura 5	Modo de ação da pectina metilesterase.....44
Figura 6	Modo de ação da pectina liase.....45
Figura 7	Modo de ação das poligalacturonases. Fonte: GUMMANDI; KUMAR, 2003 .....46
Figura 8	Casca de café melosa, à direita (A) e casca seca de café (B), à esquerda, antes e após a trituração.....66
Figura 9	Processo de fermentação em estado sólido em BOD a 28 °C .....73
Figura 10	Teste semiquantitativo da produção de pectinases após revelação com solução de lugol por <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128), à direita e à esquerda por <i>T. viride</i> (CMEC 00125). .....81
Figura 11	Teste semiquantitativo da produção de pectinases após revelação com solução de lugol por <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), à direita e à esquerda por <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130) .....81
Quadro 1	Classificação das enzimas pectinolíticas.....40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de pectinases por fungos filamentosos, avaliada pelo índice enzimático (IE).....	80
Tabela 2	Caracterização da casca seca e da casca melosa de café.....	84
Tabela 3	Valores médios da atividade enzimática específica de pectina metilesterase (PME) (U/g) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos: 48, 96 e 168 horas.....	90
Tabela 4	Valores médios da atividade enzimática específica de pectina metilesterase (PME) (U/g) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas.....	92
Tabela 5	Valores médios da atividade enzimática específica de pectina liase – PL (U/g) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos: 48, 96 e 168 horas.....	94
Tabela 6	Valores médios da atividade enzimática específica de Pectina liase – PL (U.g <sup>-1</sup> ) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas.....	95
Tabela 7	Valores médios da atividade enzimática específica de exopoligalacturonase (Exo-PG) (U/g) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos: 48, 96 e 168 horas.....	98
Tabela 8	Valores médios da atividade enzimática específica de Exopoligalacturonase (Exo-PG) (U/g) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas ...	100

Tabela 9	Valores médios de atividade enzimática específica de endopoligalacturonase (Endo-PG) (U/g) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos 48, 96 e 168 horas.....	102
Tabela 10	Valores médios da atividade enzimática específica de endopoligalacturonase (Endo-PG) (U/g) dos isolados <i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033), <i>T. viride</i> (CMEC 00125), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127), <i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128) e <i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas ...	104
Tabela 11	Quantificação do resíduo após o processo de fermentação em estado sólido no resíduo casca seca de café. ....	106
Tabela 12	Quantificação do resíduo após o processo de fermentação em estado sólido no resíduo casca melosa de café .....	107

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Aproveitamento de resíduos agrícolas</b> .....	19
<b>2.1.1</b>	<b>O café e seus resíduos</b> .....	23
<b>2.2</b>	<b>Enzimas</b> .....	27
<b>2.3</b>	<b>Enzimas microbianas</b> .....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Atividade enzimática</b> .....	29
<b>2.4</b>	<b>Estrutura da parede celular vegetal</b> .....	31
<b>2.5</b>	<b>Substâncias pécticas</b> .....	33
<b>2.6</b>	<b>Pectinases</b> .....	37
<b>2.6.1</b>	<b>Classificação das pectinases</b> .....	39
<b>2.7</b>	<b>Aplicação das enzimas pectinolíticas na indústria de alimentos</b> .....	47
<b>2.8</b>	<b>Microrganismos</b> .....	49
<b>2.9</b>	<b>Fungos produtores de pectinases</b> .....	51
<b>2.10</b>	<b>Fermentação em estado sólido</b> .....	58
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	65
<b>3.1</b>	<b>Local de realização do trabalho</b> .....	65
<b>3.2</b>	<b>Preparo do resíduo</b> .....	65
<b>3.2.1</b>	<b>Pré-tratamento do substrato</b> .....	66
<b>3.3</b>	<b>Microrganismos</b> .....	67
<b>3.4</b>	<b>Determinação do índice enzimático</b> .....	67
<b>3.5</b>	<b>Caracterização dos resíduos</b> .....	68
<b>3.5.1</b>	<b>Análise de atividade de água do substrato</b> .....	68
<b>3.5.2</b>	<b>Determinação de umidade do substrato</b> .....	68
<b>3.5.3</b>	<b>pH</b> .....	69
<b>3.5.4</b>	<b>Determinação do teor de umidade</b> .....	69
<b>3.5.5</b>	<b>Determinação do teor de cinzas</b> .....	69
<b>3.5.6</b>	<b>Determinação do teor de sólidos solúveis</b> .....	69
<b>3.5.7</b>	<b>Determinação de lipídios totais ou extrato etéreo</b> .....	70
<b>3.5.8</b>	<b>Determinação do teor de proteína bruta</b> .....	70
<b>3.5.9</b>	<b>Determinação do teor de fibra bruta</b> .....	70
<b>3.5.10</b>	<b>Determinação do teor de acidez titulável</b> .....	71
<b>3.5.11</b>	<b>Determinação de açúcares totais</b> .....	71
<b>3.5.12</b>	<b>Determinação do teor de taninos totais</b> .....	71
<b>3.5.13</b>	<b>Determinação do teor de pectina solúvel e total</b> .....	71
<b>3.6</b>	<b>Processo fermentativo</b> .....	72
<b>3.6.1</b>	<b>Fermentação em estado sólido</b> .....	72
<b>3.6.2</b>	<b>Obtenção do extrato enzimático bruto</b> .....	73
<b>3.7</b>	<b>Determinação da atividade de pectinases</b> .....	74

3.7.1	Pectina metilesterase (PME).....	74
3.7.2	Pectina liase (PL) .....	74
3.7.3	Exo-poligalacturonase (Exo-PG).....	75
3.7.4	Endo-poligalacturonase (Endo-PG) .....	76
3.7.5	Determinação de proteínas totais na amostra.....	76
3.7.6	Determinação da atividade enzimática específica.....	77
3.8	Quantificação dos resíduos.....	77
3.9	Delineamento experimental e análise estatística.....	78
3.9.1	Determinação do índice enzimático.....	78
3.9.2	Determinação da atividade enzimática .....	78
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	79
4.1	Resultado da seleção dos fungos quanto à produção de pectinases em meio sólido (teste semiquantitativo) .....	79
4.2	Caracterização dos resíduos .....	83
4.3	Resultado das atividades enzimáticas pectinolíticas avaliadas quanto à produção de pectina metilesterase (PME), pectina liase (PL), exo-poligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG) .....	88
4.4	Quantificação dos resíduos após o processo fermentativo.....	106
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	108
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	111

## 1 INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos têm conquistado lugar de destaque no desenvolvimento mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionalmente utilizados. O uso desses processos possibilita a produção de um grande número de metabólitos de interesse industrial, incluindo enzimas, as quais podem ser obtidas a partir de resíduos agroindustriais que podem ser encontrados em abundância no Brasil, contribuindo, assim, para a redução de problemas ambientais (MACIEL, 2006).

A utilização de enzimas nas indústrias é indispensável, pois, por meio dela, pode-se melhorar a qualidade de um produto ou tornar mais fácil a obtenção do mesmo. Essa capacidade deve-se ao fato de que as enzimas atuam sobre as substâncias que compõem um determinado produto, havendo, para cada substância, enzimas específicas que a degradam (LIMA et al., 2001). O uso de resíduos agrícolas como fonte de energia renovável tem colaborado para o desenvolvimento industrial e a preservação do meio ambiente (BENEDETTI, 2009).

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiológica (PANDEY et al., 2005). Economicamente, as enzimas são metabólitos comerciais importantes, produzidas a partir de microrganismos de diferentes gêneros e espécies. Estas enzimas têm uma infinidade de utilidades no cotidiano, com emprego na indústria de alimentos, de tecidos e de fármacos, e em tratamentos industriais e ambientais, entre outros (FERNÁNDEZ, 2009). Pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação de polímeros pécticos (KHAN; NAKKEERAN; UMESH-KUMAR, 2013). Elas têm importância significativa na atual era da biotecnologia, com suas abrangentes aplicações na extração e clarificação de suco de frutas, na lavagem

de algodão, na degomagem de fibras vegetais, no tratamento de água residuárias, na extração de óleo vegetal, na fermentação de chá e café, no branqueamento de papel, nos aditivos na alimentação de aves e na indústria de bebidas alcoólicas e de alimentos (JAYANI, SAXENA; GUPTA, 2005).

A fermentação em estado sólido tem recebido mais atenção, por parte dos pesquisadores, uma vez que em vários estudos tem sido demonstrado que este processo pode conduzir a rendimentos mais elevados e produtivos ou apresenta produtos com melhores características do que fermentação submersa. O baixo volume de água utilizado na fermentação em estado sólido tem grande impacto sobre a economia do processo, principalmente devido ao pequeno tamanho dos fermentadores, à redução na agitação e a menores custos de esterilização (PANDEY, 2003; HÖLKER; LENZ, 2005; NIGAM; GUPTA; ANTHWAL, 2009).

Com a ampla diversidade de resíduos agroindustriais e, principalmente, com a grande quantidade de casca de café que é gerada durante o seu processamento, estes resíduos podem ser utilizados como substrato para a produção de diversas enzimas. Os fungos têm grande capacidade de produzir uma ampla variedade de enzimas, quando cultivados em meios sólidos à base de resíduos agroindustriais.

De acordo com o exposto, este estudo foi realizado com o objetivo geral de utilizar a casca de café (seca e melosa) como substrato e como fonte de pectina para a produção de enzimas pectinolíticas. Os objetivos específicos foram caracterizar o resíduo (casca seca e a casca melosa); selecionar fungos quanto à produção de pectinases em meio sólido semiquantitativo; avaliar a atividade enzimática: pectina metilesterase, pectina liase, exo-poligalacturonase e endo-poligalacturonase pelo processo de fermentação em estado sólido e comparar a atividade enzimática produzida pelos fungos frente à atividade de enzima comercial.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aproveitamento de resíduos agrícolas

No cenário global, a contaminação do meio ambiente tem aumentado devido ao uso de produtos químicos em diversas aplicações industriais. Por isso, tem-se investido em pesquisas que possam melhorar o ambiente e promover tecnologias de baixo custo. Além disso, os resíduos agrícolas e agroindustriais são empregados como fontes de energia não somente para criar um ambiente limpo, mas também tornar o solo fértil e proveitoso, melhorando, assim, a propriedade e a produção agrícola e, conseqüentemente, mantendo o equilíbrio ecológico e a biodiversidade (NINAWÉ; KUHAD, 2005).

Os principais componentes dos resíduos agrícolas são celulose, amido, lignina, xilana e pectina. Estes materiais têm atraído considerável atenção como matéria-prima alternativa e fonte de energia, uma vez que estão disponíveis em abundância (ANTRANIKIAN, 1992). Estes componentes podem ser submetidos ao processo de hidrólise enzimática por microrganismo, liberando carboidratos que são utilizados como fontes de energia e carbono. Esse processo degradativo é de fundamental importância biológica e industrial (BENEDETTI, 2009). Vários microrganismos são capazes de utilizar essas substâncias como fonte de carbono, produzindo vasta gama de enzimas em diferentes nichos ambientais (ANTRANIKIAN, 1992).

Atualmente, os conceitos de minimização, recuperação e aproveitamento de subprodutos estão sendo cada vez mais difundidos (SANTOS, 2007). Estima-se que aproximadamente  $4 \times 10^9$  toneladas de celulose sejam formadas por ano, no entanto, o seu montante na terra não se acumula devido à presença de fungos e bactérias que eficazmente degradam os materiais da parede celular vegetal

(ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005). Estes microrganismos desempenham um papel fundamental na reciclagem de carbono que volta para o ecossistema.

O promissor mercado de enzimas vem substituindo o uso de substâncias químicas em diversos processos industriais e movimenta cerca de US\$ 10 bilhões, em todo o mundo. Atualmente, a quase totalidade das enzimas utilizadas em processos industriais no Brasil provém de importações. Em 2011, o país importou cerca de 10 mil toneladas do produto, utilizando recursos que ultrapassaram os US\$ 120 milhões de dólares (RAMOS, 2012; BRASIL, 2012 apud CARVALHO et al., 2012).

O Brasil tem potencial para produzi-las e isso pode ser evidenciado pela grande diversidade biológica, ainda pouco explorada, que serviria como fonte para a obtenção de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial e pela abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como a palha de arroz, o bagaço de cana, dentre outros), que constitui substrato de baixo custo para as fermentações (BON; FERREIRA; CORVO, 2008).

É possível efetuar a extração de pectinases a partir de subprodutos originados nas indústrias de alimentos. Com isso, podem-se reduzir os custos de produção, além de representar uma alternativa de lucro (HOONDAL et al., 2002; RESENDE et al., 2004; PELIZER; PONTIELI; MORAES, 2007; UENOJO; PASTORE, 2007).

A indústria brasileira de sucos gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais (cascas e bagaços). Estes resíduos, formados, principalmente, por celulose e pectina, constituem uma alternativa barata e vantajosa para a produção de enzimas, incluindo as pectinases (SANTI, 2005).

No Brasil, desde 1986, uma série de projetos de pesquisas para agregar valor a produtos agrícolas e a subprodutos tropicais utilizando a fermentação em estado sólido foi desenvolvida devido à grande quantidade de resíduos agrícolas gerados no país (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Devido ao baixo custo

dos substratos, a produção de enzimas microbianas tem resultado em um processo econômico e promissor (HEERD et al., 2012). Os processos fermentativos que empregam resíduos agroindustriais constituem um dos métodos mais utilizados para a produção de enzimas, pelo qual os microrganismos retiram do meio em que estão acondicionados os materiais necessários para a subsistência e, ao mesmo tempo, liberam nele substâncias que poderão ser empregadas em processos industriais. Dentre os processos fermentativos utilizados, têm-se a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido (FEITOSA, 2009).

A natureza do substrato sólido utilizado é um fator muito importante que afeta o processo de fermentação em estado sólido e a seleção depende de vários fatores, principalmente o custo e a disponibilidade e, assim, envolve a seleção de vários resíduos agroindustriais. No processo de fermentação em estado sólido, o substrato não só fornece os nutrientes da cultura, mas também serve como suporte para as células microbianas (PANDEY et al., 2000a; COUTO; SANROMÁN, 2006). O substrato que fornece todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos deve ser considerado um substrato ideal. No entanto, alguns nutrientes podem estar disponíveis em ótimas concentrações ou, até mesmo, podem não estar presentes em alguns substratos (PANDEY et al., 2000a).

Os materiais sólidos utilizados na fermentação em estado sólido (FES) devem possuir partículas de porosidade e tamanho adequado, para facilitar a acessibilidade e a penetração do organismo no substrato, proporcionando um crescimento microbiano na interface sólido/gás e levando a altas taxas de processos bioquímicos. Geralmente, as partículas muito pequenas de substrato fornecem uma área maior de superfície para o ataque microbiano. Mas, se elas forem demasiadamente pequenas, pode resultar na aglomeração do substrato, o que dificulta o crescimento do microrganismo. Ao mesmo tempo, partículas

maiores fornecem eficiente aeração, mas uma superfície limitada ao ataque microbiano (PANDEY et al., 1999; PANDEY et al., 2000a). Além disso, a matriz sólida não deve ser contaminada e o microrganismo utilizado para o processo de fermentação deve ser capaz de absorver as fontes nutricionais, como carboidratos (celulose, amido, açúcares), nitrogênio (amônia, ureia, peptídeos) e sais minerais (PANDEY, 1991; RAIMBAULT, 1998).

Pesquisas sobre a seleção de substratos adequados para fermentação em estado sólido têm se centralizado em resíduos agroindustriais tropicais. Esses resíduos incluem farelo e palha de trigo e arroz, casca de soja, milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar e mandioca, resíduos industriais do processamento de café, tais como polpa, casca e borra de café; resíduos industriais de processamento de frutas, tais como bagaço de maçã e de uva, e resíduos de abacaxi, entre outros (PANDEY et al., 2000a). Farelo de trigo, farelo de arroz, bagaço de cana, sabugo de milho e bagaço de maçã são, geralmente, considerados os melhores substratos para processos de fermentação em estado sólido (PANDEY et al., 1999).

A seleção correta do substrato sólido é de grande importância para uma produção eficiente e econômica do composto de interesse. Os rendimentos da produção dos metabólitos secundários podem ser melhorados com uma escolha apropriada do substrato ou com a mistura de substratos com nutrientes adequados (NIGAM, 2009).

A opção por estes materiais agroindustriais deve-se ao fato de eles apresentarem as seguintes características: são recursos renováveis, sua produção depende de outra atividade produtiva e, muitas vezes, é um subproduto ou produto secundário. São produzidos em grande quantidade e, normalmente, constituem um problema localizado, quando considerados rejeitos ou descarte industrial, que necessitam de algum tratamento ou alguma aplicação (SINGHANIA; SOCCOL; PANDEY, 2008).

### 2.1.1 O café e seus resíduos

A primeira estimativa da produção de café (arábica e conilon) para a safra 2013 indica que o país deverá colher entre 46,98 e 50,16 milhões de sacas de 60 kg do produto beneficiado. Este resultado representa uma redução entre 7,6% e 1,3%, quando comparada com a produção obtida em 2012. Essa redução se deve ao ano de baixa bienalidade (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

Existem duas formas de processamento do café: por via úmida e por via seca. O processamento por via seca é uma técnica mais simples e comum. Neste processo, os frutos são secos ao sol ou em secadores artificiais e levados a uma máquina descascadora para a remoção da casca seca que envolve os grãos de café, que é o produto de interesse econômico (OLIVEIRA et al., 2001; VILELA et al., 2001).

Por sua vez, o processamento por via úmida pode ocorrer por três diferentes caminhos distintos: o descascado, quando apenas a casca e parte da mucilagem são retiradas; o desmucilado, quando se removem a casca e, posteriormente, a mucilagem mecanicamente e o despoldado, quando se removem a casca mecanicamente e a mucilagem por fermentação (BORÉM, 2004). Dependendo do método de processamento de café cereja, seco ou úmido, os resíduos sólidos obtidos são denominados casca ou polpa, respectivamente (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). A composição da polpa de café difere da composição da casca, embora a natureza dos compostos presentes em ambos resíduos seja muito semelhante. Pode haver diferença na composição percentual dos componentes, dependendo do modo de processamento e da eficiência, da variedade de culturas e das condições de cultivo, como, por exemplo, o tipo de solo, entre outras (SINGHANIA; SOCCOL; PANDEY, 2008).

No Brasil, a forma mais comum de processamento pós-colheita é a via seca, sendo o fruto do café seco ao sol ou em pré-secadores e secadores artificiais, resultando em resíduos formados por casca e pergaminho com rendimento de, aproximadamente, 50% do peso colhido. Nos países da América Central, México, Colômbia, Quênia e África do Sul, o café no estágio fisiológico denominado cereja é preparado por via úmida, sendo despulpado antes da secagem, resultando em resíduos formados por mucilagem e polpa (não contém pergaminho, pois este adere ao fruto) (OLIVEIRA, 1999).

A atividade de separação hidráulica, ou lavagem, do café e o descascamento de frutos são geradores de grandes volumes de resíduos sólidos (casca, pergaminho) ou líquidos (água residuárias), ricos em material orgânico e inorgânicos que, se dispostos no meio ambiente sem tratamento, podem causar grande problemas ambientais, como degradação ou destruição da flora e da fauna, além de comprometer a qualidade da água e do solo (MATOS, 2008). Em geral, na cultura do café, os principais resíduos são casca, polpa, mucilagem e água residual (ROJAS et al., 2002; DIAS et al., 2014).

Existem dois tipos de casca de café resultantes do tipo de grão colhido e do processamento: a casca de café melosa e a casca de café seca. A casca de café melosa tem como peculiaridade, em relação à casca de café seca, a ausência de um componente fibroso, o pergaminho (OLIVEIRA, 2001).

Segundo Elias (1979), a polpa de café obtida durante o processamento úmido representa, em base seca, 29% do peso do fruto inteiro. No processo de beneficiamento a seco dos grãos de café, cerca de 50%, em massa, deles são considerados resíduos (BRAHAN; BRESSANI, 1978). Portanto, é grande a quantidade de resíduos gerados durante o processamento. Esse resíduo praticamente não é aproveitado, sendo deixado em pilhas perto das fazendas e causando um grande problema ambiental. A polpa do café e a casca contêm cafeína, taninos e matéria orgânica, tornando-se poluentes quando descartados

no meio ambiente. Uma possibilidade de aproveitamento da casca de café é como meio de cultivo para microrganismos, na produção de diferentes metabólitos ou biomassa (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

As cascas de café contêm, aproximadamente, em % baseada no peso seco, 55% de carboidratos, 10% de proteínas, 2% de gorduras, 4,5% de taninos, 1,3% de cafeína e 12% de pectina (PANDEY; SOCCOL 1998; PANDEY et al., 2000b).

A camada mucilagínosa dos frutos de café é composta, em sua maioria, de substâncias pécnicas. A presença de pectina na camada mucilagínosa constitui sério obstáculo para a rápida secagem da semente, sendo também um meio favorável ao desenvolvimento de microrganismos. O excesso da ação de microrganismos pode alterar o *flavor* e o valor comercial do café produzido. A fermentação decompõe a camada mucilagínosa em poucas horas, devido a uma rápida ação da microbiota e de enzimas pectinolíticas. Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza e seu substrato, a pectina, são polissacarídeos complexos, localizados, principalmente, na lamela média, entre células dos tecidos de plantas superiores. Bactérias e fungos são conhecidos por produzirem enzimas pectinolíticas, provocando perdas no campo e na pós-colheita (PAULA, 2001).

O café, após o processo de limpeza, sofre, então, o processo de descascamento, em descascadores de percussão ou fricção. Nestas máquinas, o café em “coco” é impulsionado violentamente pela rotação de um cilindro horizontal contra lâminas de aço. Dessa forma, os tecidos do epicarpo mesocarpo e do endocarpo que o envolviam são quebrados e, em consequência, separam-se das sementes. A separação das cascas é feita por ventilação, que as lança para fora, em montes ou depósitos próprios fora do armazém. Esta casca constitui o principal resíduo da industrialização do café, representando cerca de 50%, em massa, do mesmo. O café descascado é selecionado, embalado e

enviado para a indústria de torrefação e de fabricação de café solúvel (MATIELLO, 1991). Tradicionalmente, a casca e polpa de café só encontram uso em poucas aplicações, como fertilizantes, composto e ração de animais de granja. Essas aplicações utilizam apenas uma fração dos resíduos disponíveis (PANDEY et al., 2001).

Tem-se estudado a possibilidade de sua utilização para a alimentação de gado, devido à sua composição química. A maior dificuldade é a presença de compostos antifisiológicos, como cafeína e taninos, que podem causar transtornos estomacais nos animais. Portanto, uma ensilagem torna-se necessária para a eliminação destes compostos. Dessa forma, trabalhos vêm sendo realizados, no sentido de detoxificar a casca (ou a polpa) do café por meio de processos de fermentação no estado sólido, utilizando-se microrganismos que metabolizem os compostos tóxicos, empregando-os em seu crescimento. Os principais microrganismos estudados são dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, chegando-se a reduções de 100%, 98% e 87% de cafeína, respectivamente (BRAND et al., 2000; BRAND et al., 2001; BRAND et al., 2002).

É constante o esforço para utilizar resíduos em bioprocessos, seja na forma de suporte e/ou de substrato. Entretanto, a seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação (PANDEY; SOCCOL, 1998).

Outras aplicações da casca de café podem ser citadas, como compostagem, cultivo de cogumelos, ensilagem, combustível e geração de energia, recuperação de pectinas, de fenólicos e de outros compostos (DIAS et al., 2014).

## 2.2 Enzimas

As enzimas foram descobertas na segunda metade do século XIX e, desde então, têm sido extensivamente empregadas em diversos processos industriais (HOONDAL et al., 2002), utilizadas para catalisar inúmeras reações há muito tempo, pois se sabe que a produção de vinho, pão e queijo, por exemplo, antecede os tempos bíblicos, embora naquela época não se conhecesse tão profundamente o mecanismo das reações envolvidas no processo de produção desses produtos (HARGER; SPRADA; HIRATSUKA 1982; SPIER, 2005; WEINGARTNER, 2010).

Elas formam um grupo de componentes biológicos com atividade intra e/ou extracelular que têm funções catalisadoras de reações químicas ou bioquímicas, sendo parte principal dos processos metabólicos das células. Essas propriedades metabólicas das enzimas as tornam adequadas para aplicações industriais, encontrando emprego nos mais diversos processos, destacando-se as indústrias farmacêuticas e alimentícias (COWIESON; HRUBY; PIERSON, 2006).

As enzimas têm importante papel na produção de vários produtos, principalmente em processos biocatalíticos, aplicados nas indústrias alimentícias e de bebidas. Uma das vantagens da enzima é a grande especificidade de ação, condições simples para a catálise de reações e diversidade de processos passíveis de serem realizados em relação a catalisadores químicos. A possibilidade de obtenção de fontes microbianas é outra característica importante, levando a uma grande disponibilidade, comparativamente a outras fontes, como tecidos animais (PSZCZOLA, 2001). A desvantagem do uso das enzimas na aplicação industrial se deve ao alto custo para isolar e purificar, além de sua recuperação do meio reacional no final do processo catalítico (MORANA et al., 2006).

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiológica, sendo esta última a fonte mais recorrida na obtenção de enzimas para aplicação biotecnológica, devido aos menores custos, além da possibilidade de produção em larga escala (PANDEY et al., 2005).

### **2.3 Enzimas microbianas**

Os microrganismos são as principais fontes de enzimas industriais, devido, especialmente, à grande variedade de atividades catalíticas, à possibilidade da produção de enzimas por processos fermentativos em grande escala com regularidade necessária e à simplicidade dos requerimentos nutricionais. Muitas enzimas, entretanto, ainda são extraídas de tecidos animais e vegetais, sendo sua produção influenciada pela sazonalidade dessas fontes (BOM; FERRARA; CORVO, 2008).

As enzimas microbianas comerciais estão substituindo cada vez mais os catalizadores químicos convencionais, em muitos processos industriais. As enzimas têm várias vantagens sobre os catalisadores químicos, incluindo a capacidade de funcionar sob condições moderadas de temperatura, pH e pressão (WAITES et al., 2001).

A classificação das enzimas baseia-se num sistema originalmente estabelecido pela comissão da União Internacional de Bioquímica (1979). Há seis principais classes, agrupadas de acordo com o tipo de reação que catalisam (WAITES et al., 2001) e que são:

- Classe 1 Oxidorredutases: catalisam a oxidação/redução das reações, transferem átomos de H, átomos de O ou elétrons.
- Classe 2 Transferases: catalisam a transferência de um grupo de molécula para outra.

- Classe 3 Hidrolases: catalisam a hidrólise, a clivagem de ligações por adição da molécula de água.
- Classe 4 Liases: catalisam a clivagem de ligações, por meio da hidrólise ou da oxidação.
- Classe 5 Isomerases: catalisam rearranjos estruturais de moléculas.
- Classe 6 Ligases ou sintetases catalisam a formação de novas cadeias, por exemplo, C-N, C-O, C-C e C-S com hidrólise de ATP.

Várias toneladas de enzimas comerciais são produzidas por ano e são avaliadas em US\$ 1.500 milhão. Poucas enzimas de animais e plantas são utilizadas, sendo a maioria das enzimas comerciais obtidas de fontes microbianas. Muitas dessas são enzimas extracelulares, a maioria derivada de várias espécies de *Bacillus*. Suas proteases e amilases são largamente utilizadas, havendo uma particular demanda por enzimas termoestáveis. A grande proporção de todas as enzimas comerciais corresponde a 34% de enzimas utilizadas na fabricação de detergentes, 14% relacionadas ao uso na indústria de laticínios, 12% para processamento de amido, 11% para aplicações na indústria têxtil e o restante 29% divididos em outras aplicações (WAITES et al., 2001). De acordo com Jayani; Saxena e Gupta (2005), as vendas de pectinases de origem microbiana correspondem a 25%.

### **2.3.1 Atividade enzimática**

A escolha de um método para a determinação da atividade de uma enzima requer conhecimento prévio da faixa de concentração enzimática que permite obter uma variação linear da concentração do produto (ou substrato) com o tempo, num intervalo que não seja suficientemente grande para que os fatores citados venham a interferir. Podem ser utilizados métodos variados para

avaliar a variação das concentrações, dentre eles os mais diretos (espectrometria, fluorimetria, titulometria) e outros menos (medida da variação da viscosidade) (SANT'ANNA JÚNIOR, 2001).

A dosagem de enzimas é sempre feita por meio da medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações de concentração do substrato possam afetar as medidas). A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma Unidade Internacional (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto, em condições experimentais estabelecidas (SELLA et al., 2009).

Em muitas situações, emprega-se, ainda, a determinação da atividade específica, que é expressa em U por massa de proteína. Para a determinação de concentrações totais de proteína, vários são os métodos disponíveis: biureto-reagente alcalino de cobre, Lowry-Folin-Ciocalteau, absorção de raios UV a 280 nm (aminoácidos aromáticos) ou a 205-220 nm (peptídeos), ácido bis-concêntrico e Bradford. Cada um desses métodos baseia-se em princípios diferentes, razão pela qual os resultados obtidos não são iguais e, portanto, não devem ser comparados. Além disso, mesmo que se adote uma única metodologia, o resultado obtido somente expressará a verdadeira concentração de proteínas se a curva de calibração for determinada em solução de proteínas de composição idêntica à solução alvo (LUCARINI; KILIKIAN, 1999; KILIKIAN; PESSOA JÚNIOR, 2001).

## 2.4 Estrutura da parede celular vegetal

A parede celular vegetal é formada por polissacarídeos, como celulose, hemiceluloses, pectina e lignina, que formam um complexo de estrutura rígida. A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza e um dos principais constituintes da parede celular da planta, proporcionando sua rigidez (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

Hemiceluloses, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, têm uma composição heterogênea de várias unidades de açúcar. São classificadas, de acordo com o principal resíduo de açúcar da cadeia polimérica, como D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose e D-glicose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. A principal hemicelulose é a xilana, encontrada em cereais e na madeira (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

A pectina presente na lamela média e na parede celular primária das plantas (WILLATS et al., 2001) é um grupo de polissacarídeos formados por unidades de ácido-D-galacturônico, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 (KULKARNI; SHENDYE; RAO 1999; ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005). Os grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos podem ser parcialmente esterificados a grupamentos metil parcialmente ou completamente neutralizados por sódio, potássio e amônio (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; GUMMANDI; PANDA, 2003). As substâncias pécticas, como pectina, protopectina e ácidos pécticos, contribuem para a firmeza e a estrutura dos tecidos das plantas (GUMMADI; PANDA, 2003). Pode-se observar a estrutura da pectina na Figura 1.

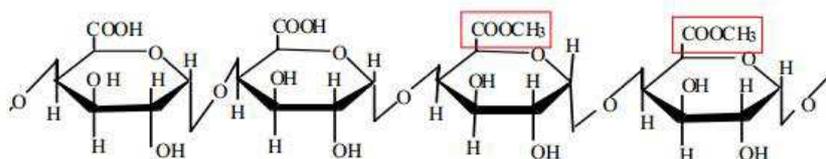


Figura 1 Estrutura química da pectina. Estrutura linear da pectina, conhecida como homogalacturana. Grupos carboxílicos metilados destacados em vermelho. Fonte: SANTI (2005)

A lignina é altamente resistente à degradação química e biológica, e confere dureza à madeira. É encontrada em concentrações maiores na lamela média, atuando como um cimento entre as fibras da madeira, e também está presente na parede celular, principalmente na parede celular secundária, formando, junto com a hemicelulose, uma matriz amorfa, na qual as microfibrilas de celulose estão embebidas e protegidas contra a degradação (MARTINEZ et al., 2005).

A degradação dos compostos da parede celular vegetal é um processo complexo que envolve a ação sinérgica de um grande número de enzimas extracelulares. Os fungos filamentosos degradam a parede celular vegetal por meio de enzimas, como celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases (MAYER; STAPLES, 2002; TEN HAVE et al., 2002).

Várias aplicações, tais como branqueamento de pasta de papel por enzimas xilanolíticas, clarificação de sucos com pectinases e biobranqueamento de têxteis por celulasas, estão atualmente em uso (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

## 2.5 Substâncias pécticas

As substâncias pécticas formam um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos com diferentes massas moleculares e graus de esterificação, os quais conferem rigidez e proteção à célula vegetal, sem interferir na permeabilidade da membrana. É responsável pela manutenção da turgidez do tecido vegetal (KOBLOITZ, 2010).

Substâncias pécticas estão largamente distribuídas em frutas e vegetais (10%-30% em nabos, cascas de laranja, polpa de tomate, abacaxi e limão) e, por isso, elas são importantes substratos naturais para as pectinases (GUMMADI; PANDA, 2003; VRIES; VISSER, 2001). Já Kashyap et al. (2001) e Sakai et al. (1993) relatam que as substâncias pécticas representam 0,5%-4,0% do peso fresco do material da planta. A membrana e a parede celular vegetal podem ser observadas na Figura 2.

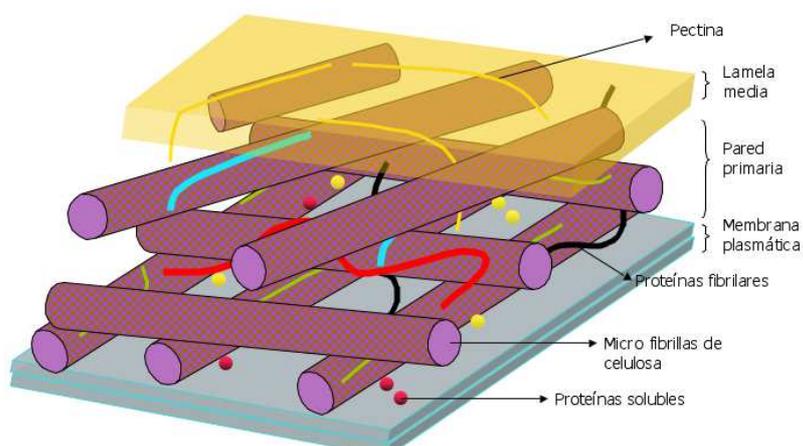


Figura 2 Membrana e parede celular vegetal  
Fonte: SCUELLAR, 2013

Nos frutos verdes, a pectina encontra-se em sua forma insolúvel (protopectina), associada a microfibrilas de celulose, o que confere rigidez à parede celular. Durante o amadurecimento, a estrutura da pectina é alterada por enzimas que ocorrem naturalmente nos frutos e que alteram a estrutura da pectina tornando-a mais solúvel. Tais alterações envolvem quebra da cadeia da pectina ou das cadeias laterais (KASHYAP et al., 2001).

Na natureza, aproximadamente 80% dos grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos estão esterificados com grupos metílicos e os grupos de ácidos livres podem ser parcialmente ou totalmente neutralizados com íons de sódio, potássio ou amônio. Esta proporção diminui para um grau variável durante a extração da pectina. A diferença entre pectinas de alta metoxilação e baixa metoxilação está na sua capacidade de formar gel e este comportamento determina o tipo de aplicação nos alimentos (KHAN; NAKKEERAN & UMESH-KUMAR, 2013). As pectinas de alta metoxilação formam gel com açúcar e ácidos; já as pectinas de baixa metoxilação requerem a presença de cátion divalentes, normalmente cálcio, para que ocorra adequada formação de gel (THAKUR; SING; HANDA, 1997).

As pectinas na indústria de alimentos atuam como agentes gelificantes e como fibras nutricionais. Vários fatores determinam propriedades gelificantes, incluindo temperatura, tipo de pectina, grau de esterificação, grau de acetilação, pH, açúcar e outros solutos, e, principalmente, a interação entre os íons de cálcio e pectina não esterificados dos grupos carboxílicos (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Por outro lado, podem representar um problema nas várias etapas do processamento de frutas e vegetais, visto que seu arraste, após o rompimento da parede celular, pode causar turbidez em sucos ou incrustações em tubulações e reatores industriais (LANG; DÖRNENBURG, 2000). Também é um componente abundante, onipresente e multifuncional da parede celular e de todas as plantas terrestres (ALKORTA et al., 1998).

A ação coloidal da pectina dificulta o processo de fabricação dos sucos, pois a turvação dificilmente pode ser removida apenas por filtração, devido à grande quantidade de partículas em suspensão. Quando tratados previamente por pectinases, os sucos são facilmente clarificados e filtrados, obtendo-se bebidas com maiores rendimentos e estáveis (BARROS; MENDES; PEREZ, 2004; MARTINS, 2006). Na indústria de sucos e vinhos, pode causar, ainda, um aumento considerável na viscosidade, dificultando os processos prensagem, filtração e subsequente concentração, diminuindo, assim, o rendimento da extração de sucos (SANTI, 2005).

Quimicamente, as substâncias pécicas são um complexo coloidal de polissacarídeos, composto de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil. A Sociedade Americana de Química (*American Chemical Society*) classificou as substâncias pécicas em quatro tipos principais, de acordo com o tipo de modificação na cadeia central (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; SOUZA et al., 2010):

- a) protopectina: substância pécica insolúvel em água presente no tecido intacto. A hidrólise restrita da protopectina produz pectina ou ácidos pécicos. Representa a maior parte da pectina de frutas imaturas;
- b) ácido pécico (pectatos): ácido poligalacturônico coloidal e isento de grupos metoxilas;
- c) ácidos pectínicos: ácido poligalacturônico que apresenta um número significativo de grupos metoxilas. Podem formar gel com açúcares e ácidos;

- d) pectina: material solúvel no qual pelo menos 75% dos grupamentos carboxílicos são metilados. Isso confere rigidez à parede celular, quando está ligado à celulose.

Algumas das razões para insolubilidade das protopectinas são: (1) seu grande peso molecular, (2) formação de uma ligação éster entre grupos ácido carboxílicos da pectina e de grupos hidroxil de outros constituintes da parede celular ou (3) ligação salina entre grupos carboxil das substâncias pécticas e grupos básicos de proteínas (HOONDAL et al., 2002). Pode-se observar a estrutura geral das substâncias pécticas na Figura 3.

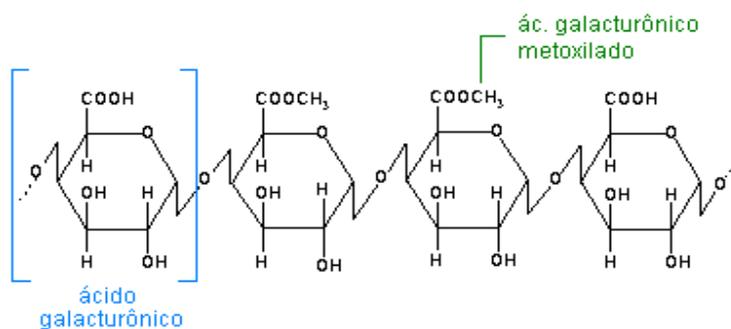


Figura 3 Estrutura geral das substâncias pécticas  
Fonte: INDEX..., 2013

As pectinas contribuem para a resistência mecânica da parede celular e também são responsáveis pela textura de frutos e vegetais em geral (BRANDÃO; ANDRADE, 1999). As pectinas têm especial influência sobre o comportamento reológico de sucos, envolvendo problemas relativos ao seu escoamento, importantes para a adequação de sistemas de tubulação, trocadores de calor, filtros, bombas, etc (QUEIROZ; VIDAL; GASPARETTO, 2000).

A degradação da molécula pectina é feita por meio da ação sinérgica e coordenada de várias enzimas pectinolíticas, incluindo pectina metilesterase,

poligalacturonase, pectato liase e pectina liase. A pectina liase e a poligalacturonase são enzimas de grande relevância para a despolimerização da pectina, atuando na clivagem da cadeia  $\alpha$ -1,4-glicosídicas dos ácidos poligalacturônicos e pécticos, respectivamente (VRIES; VISSER, 2001; GUMMADI; KUMAR, 2005) e também das enzimas que agem na cadeia principal e na cadeia lateral (VRIES et al., 2002). As principais enzimas pectinolíticas sintetizadas pelos fungos são poligalacturonase, pectina metilesterase e pectina liase, sendo subdivididas, com base na ação sobre substâncias pécticas, em dois grupos: pectinases despolimerizantes e pectinases desesterificantes (CAMARGO et al., 2005).

A adição de enzimas pectinolíticas resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos, ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (SANTOS, 2007).

## **2.6 Pectinases**

As enzimas pectinolíticas são de grande significância e são as mais importantes enzimas no setor comercial (SHARMA et al., 2013). Constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes no material vegetal e são produzidas por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (ROMBOUTS; PILNIK, 1980).

O termo enzimas pectinolíticas ou pectinases refere-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico. Devido à presença de várias formas de pectina na parede celular das plantas, são necessárias pectinases com diferentes formas de ação para sua degradação (GUMMANDI; PANDA, 2003). Tais enzimas podem ser induzidas por substratos pécticos ou

produzidas constitutivamente, dependendo do organismo estudado (MALDONATO; SAAD, 1998).

O potencial biotecnológico das enzimas pectinolíticas obtidas de microrganismos tem atraído a atenção de vários pesquisadores, em todo o mundo, como prováveis catalisadores biológicos numa variedade de processos industriais (HOONDAL et al., 2002).

A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de microrganismos, mas os fungos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (BLANDINO et al., 2001).

Pectinases microbianas são importantes no processo fitopatológico, em simbiose planta-microrganismos e na decomposição de material vegetal, contribuindo para o ciclo natural do carbono. Pectinases são abundantemente produzidas por fungos saprófitas e tecido vegetal em decomposição representa o substrato mais comum para os microrganismos produtores de pectinases (GUMMANDI; PANDA, 2003).

De todas as enzimas comercializadas, as pectinases de origem microbiana correspondem a 25% das vendas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). As pectinases comerciais, destinadas ao uso na indústria de alimentos, são uma mistura de enzimas composta, principalmente, de poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e pectina metilesterase (PME), além de outras enzimas celulolíticas e proteolíticas (DEL CAÑIZO et al., 1994).

Em alguns processos alimentares, é conveniente usar apenas um tipo de enzima pectinolítica. Por exemplo, a preparação de flocos de batata instantânea e suco de cenoura para a alimentação infantil exige a maceração, em que vitaminas, cor e aroma têm que ser preservados e, para estas preparações, a atividade da PG são as preferidas (LANG; DÖRNENBURG, 2000).

As pectinases estão entre as enzimas mais importantes na indústria e na área da biotecnologia, com abrangentes aplicações como processamento têxtil, na degomagem de fibras de planta, no tratamento de águas residuais pecticas, na fabricação de papel e na fermentação de café e de chá (HOONDAL et al., 2002).

### **2.6.1 Classificação das pectinases**

Enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são classificadas de acordo com a sua atividade na cadeia principal de poligalacturonana (SAKAI et al., 1993). Segundo Alkorta et al. (1998), a classificação das pectinases pode ocorrer de acordo com o substrato preferencial, o mecanismo de ação e os sítios de clivagem, resultando em dois grupos principais de pectinases, as enzimas desmetoxilantes, que agem removendo os grupos metil da cadeia principal e as enzimas despolimerizantes, que rompem as ligações  $\alpha$ -1,4 entre monômeros de ácido galacturônico, tanto por hidrólise (hidrolases) quanto por transeliminção (liases), como se observa no Quadro 1.

Quadro 1 Classificação das enzimas pectinolíticas

<b>PECTINASES DESPOLIMERAZANTES</b>		
Enzimas	Modo de ação	Substrato preferencial
Poligalacturonase (PG)	Hidrólise de ligação $\alpha$ -1,4 endo-PG ou Exo-PG 1 (monômeros) e Exo-PG 2 (dímeros)	Ácido pécico
Polimetilgalacturo-nase (PMG)	Hidrólise endo-PMG ou exo-PMG	Pectina
Pectina liase (PL)	Transeliminção endo-PL ou exo-PL	Pectina
Pectato liase (PAL)	Transeliminção endo-PL ou exo-PL	Ácido pécico
<b>PECTINASES DESMETOXILANTES</b>		
Pectinametilsterase (PME)	Desesterificação de grupos metil	Pectina

Fonte: ALKORTA et al. (1998); KASHYAP (2001)

A classificação ainda pode ser baseada na preferência pelo substrato (pectina ou pectato) e na região em que atua na molécula, podendo, neste caso, atuar de forma randômica (atividade endo) ou a partir da extremidade não redutora da molécula (atividade exo) (FOGARTY; WARD, 1972; ROMBOUTS; PILNIK, 1980; KASHYAP et al., 2001).

### **Protopectinases**

As protopectinases catalisam a hidrólise da protopectina, originando ácido pécico e pectina, diminuindo a rigidez da parede celular durante o amolecimento e o amadurecimento (KASHYAP et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Não são muito abundantes e são de pouco interesse industrial na degradação da pectina (ALKORTA et al., 1998).

Elas são classificadas em dois tipos: um que reage com a região do ácido poligalacturônico da protopectina (tipo A) e o outro com cadeias de polissacarídeo, que podem conectar o ácido poligalacturônico com os constituintes da parede celular (tipo B) (SAKAI et al., 1993).

### **Enzimas desmetoxilantes ou desesterificantes**

Pectina esterase (EC 3.1.1.11) é conhecida também como pectina metilesterase (PME), pectase, pectina metoxilase ou pectina-metilhidrolase (KYRIAKIDIS, 1999). Essa enzima catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato ou ácido péctico, polímero não esterificado (GUMMADI; PANDA, 2003; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Durante a reação ocorrem a quebra da molécula da água e a adição de um hidrogênio a um carbono da ligação e a adição do grupo hidroxila a outro carbono, produzindo metanol e pectina com baixo grau de metoxilação (KASHYAP et al., 2001).

A pectina esterase é a primeira enzima a atuar na degradação da pectina (SAKAI et al., 1993), permitindo que poligalacturonases (HUBER, 1983) e liases atuem no produto (SAKAI et al., 1993). Biologicamente, são de grande importância, pois permitem a ação posterior de pectinases que só atuam sobre compostos pécticos com menor grau de esterificação. São produzidas por fungos filamentosos, leveduras, bactérias e vegetais superiores (SAKAI et al., 1993), os quais ocorrem em diversos tecidos, especialmente nos frutos (BARON; THIBAUT, 1985).

### **Enzimas despolimerizantes**

As poligalacturonases (PGs) são enzimas despolimerizantes que catalisam a hidrólise da cadeia de ácido poligalacturônico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). As PGs podem ser classificadas como endo-poligalacturonases (Endo-PGs) ou exo-poligalacturonases (Exo-PGs), de acordo com o seu modo de ataque ao substrato. Endo-PGs (E.C. 3.2.1.15) hidrolisam, de forma randômica, as ligações glicosídicas internas entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização da molécula, liberando oligogalacturonatos como produtos.

Exo-PGs são subdivididas em Exo-PG-1 (E.C. 3.2.1.67), que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e Exo-PG-2 (E.C. 3.2.1.82), que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres (PILNIK; ROMBOUTS, 1981; DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Podem-se observar os diferentes tipos de pectinases e seu mecanismo de ação nas substâncias pécticas na Figura 4.

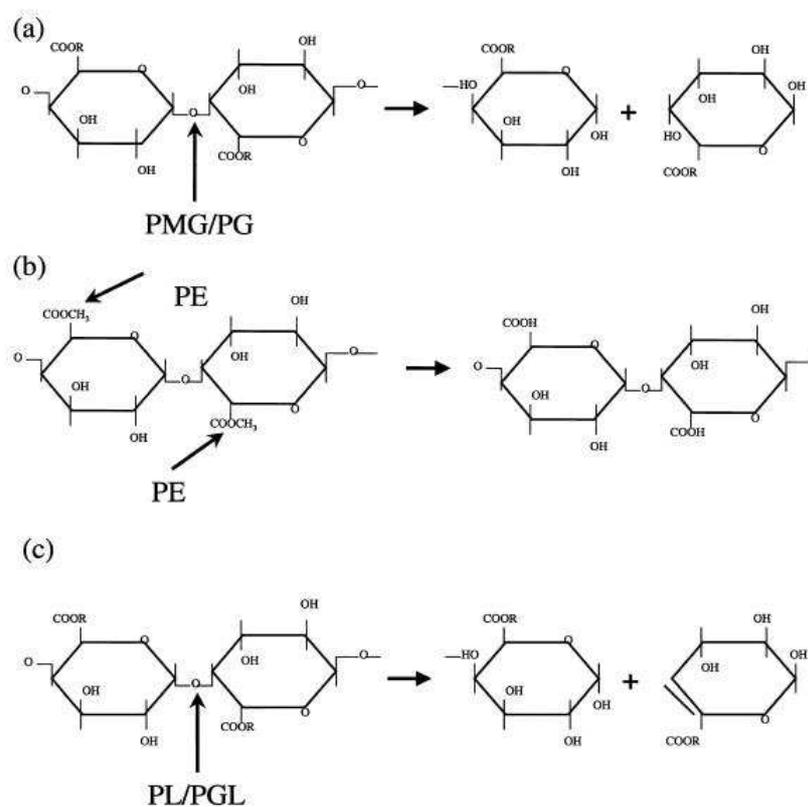


Figura 4 Diferentes tipos de pectinases e seu mecanismo de ação nas substâncias pectícas. (A) R = H para poligalacturonases (PG) e CH<sub>3</sub> para polimetilgalacturonase (PMG), (b) para pectina esterase (PE) e (c) R = H para PGL e CH<sub>3</sub> para pectina liase (PL). A seta indica o local onde as pectinases agem nas substâncias pectícas

Fonte: GUMMADI; KUMAR, 2003

### Pectina metilesterase (PME)

Pectina metilesterase, ou pectinesterase (EC. 3.1.1.11), remove os grupos metoxílicos das substâncias pectícas e, por isso, é classificada como desmetoxilante e atua sobre a pectina liberando metanol e H<sup>+</sup> (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997). Ela age antes das poligalacturonases e das pectato

liases que necessitam de substratos não esterificados (KASHYAP et al., 2001). Pode-se observar o modo de ação da pectina metilesterase na Figura 5.

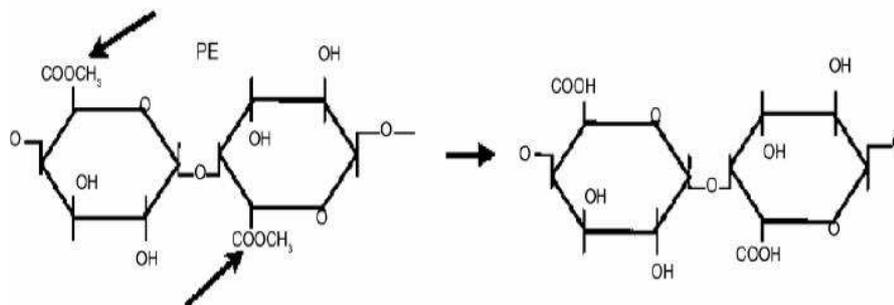


Figura 5 Modo de ação da pectina metilesterase  
Fonte: GUMMANDI; KUMAR, 2003

A ação da pectina metilesterase tem pouco efeito sobre a viscosidade das soluções. Esta enzima atua sobre a pectina de alta metoxilação, transformando-a em pectina de baixa metoxilação, sendo, entretanto, imprescindível a ação de outras enzimas pectinolíticas, como a poligalactorunase, uma vez que esta atua sobre a pectina de baixa metoxilação (SANTI, 2005), pois, de acordo com Braverman (1963), a atuação da pectina metilesterase desmetilando as pectinas faz-se necessária, uma vez que a poligalactorunase torna-se inativa na presença de grupos metílicos.

A atividade da pectina metilesterase está relacionada ao metabolismo da parede celular, incluindo o crescimento celular, o amadurecimento dos frutos, a abscisão, a senescência e a patogênese (GAFFE; TIZANDO; HANDA, 1997). Comercialmente, pode ser utilizada para proteger e melhorar a textura e a firmeza de várias frutas e vegetais processados, bem como a extração e a clarificação de sucos de frutas (FAYYAZ et al., 1993).

### Pectina liase (PL)

A pectina liase (EC.4.2.10) catalisa a clivagem aleatória da pectina, preferencialmente pectina com elevada esterificação, produzindo metil insaturado galacturonase por meio da transeliminação de ligações glicosídicas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

O uso de pectina liase (PL) em processos industriais voltados para a produção de suco de frutas traz vantagens em relação ao uso de outras enzimas pectinolíticas, como pectina metilesterase e poligalacturonase. Estas têm ação combinada e podem ser substituídas por PL, que realiza o trabalho das duas enzimas. A imobilização de pectina liase oferece possibilidades interessantes para aplicação em processos contínuos de tratamento do suco de fruta (SPAGNA et al., 1994).

De acordo com Valle et al. (2001), entre as pectinases, a pectina liase é de particular interesse porque age diretamente sobre a pectina, sem a necessidade de uma ação anterior por outras enzimas do complexo pectinólítico. Na Figura 6 pode-se observar o modo de ação da pectina liase:

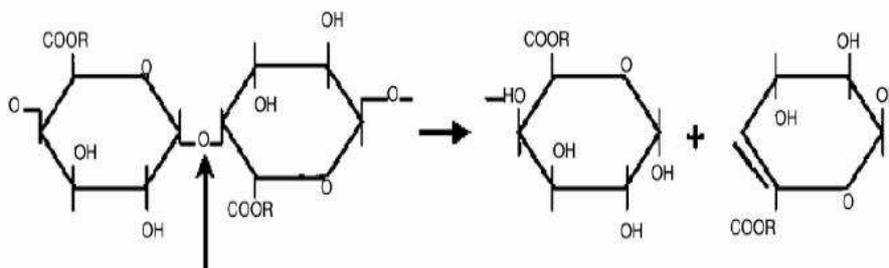


Figura 6 Modo de ação da pectina liase  
Fonte: GUMMANDI; KUMAR, 2003

### Poligacturonases (PG)

As poligacturonases catalizam a hidrólise de  $\alpha$ -1,4 glicosídica em ligações de ácido poligalacturônico, produzindo ácido D-galacturônico. Ambos os grupos de enzimas hidrolases (polimetilgalacturonase - PMG e PG) podem atuar de modo exo ou endo. Endo-PG (EC. 3.2.1.15) catalisa a clivagem aleatória do substrato e Exo-PG (EC 3.2.1.67) catalisa a clivagem hidrolítica no substrato (ROMBOUTS; PILNIK 1980; KASHYAP et al., 2001). Poligacturonases são as mais abundantes e as mais estudadas entre todas as enzimas pectinólíticas. As Endo-PG são de maior frequência, quando comparadas com a Exo-PG, que ocorrem com menos frequência (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Segundo Zheng e Shetty (2000), a poligacturonase é a enzima com função hidrolítica principal. Para a maioria dos usos industriais, as poligacturonases produzidas por fungos, como *Aspergillus*, provam ser útil pela alta atividade e atividade ótima em faixa de pH baixo, servindo para grande parte das aplicações em processos com frutas e vegetais (SANTOS, 2007). Pode-se observar o modo de ação das poligacturonases na Figura 7.

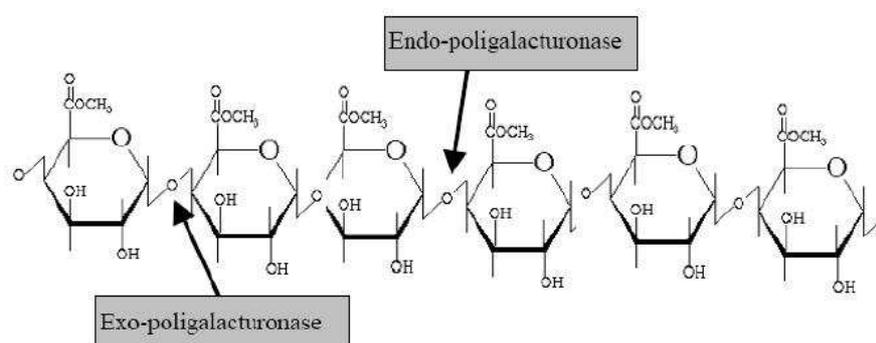


Figura 7 Modo de ação das poligacturonases. Fonte: GUMMANDI; KUMAR, 2003

Na indústria de alimentos, além da clarificação de sucos, a poligalacturonase (PG) é também utilizada para o aceleração do tempo de fermentação do grão de café, com a finalidade de promover o despreendimento de seu pericarpo. É requisitada, ainda, para a obtenção de aromas extraídos de vegetais previamente triturados (EVANGELISTA, 2005).

## **2.7 Aplicação das enzimas pectinolíticas na indústria de alimentos**

Na década de 1930, quando foi intensificada a produção industrial de sucos de frutas, o rendimento do processo era baixo e muitas dificuldades eram encontradas para filtrar os sucos e atingir uma clarificação estável. A partir de então, pesquisas utilizando pectinases, celulases e hemicelulases de microrganismos, juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas, diminuíram essas dificuldades (KASHYAP et al., 2001). São inúmeras as aplicações das pectinases e seu mecanismo de ação baseia-se na decomposição do heteropolissacarídeo pectina, presente na lamela média e na parede celular primária de plantas superiores (WILLATS et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

O interesse no estudo do complexo pectinolítico está relacionado ao seu emprego nos diversos processos biotecnológicos. A eliminação de substâncias pécticas é um passo essencial na indústria de alimentos e na indústria de vinhos. O objetivo principal é reduzir a viscosidade da solução, de modo que ela possa ser facilmente manuseada e processada. As substâncias pécticas são degradadas por enzimas pectinolíticas que são múltiplas e várias, devido à natureza complexa de seus substratos (NAIDU; PANDA, 1998).

Enzimas pectinolíticas são de importância significativa na atual era da biotecnologia. Aplicações destas enzimas na indústria de alimentos incluem amadurecimento de frutas, clarificação em sucos de frutas, tratamento preliminar

do suco de uva para a indústria vinícola, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, enriquecimento proteico de alimentos infantis e extração de óleos. Ainda pode ser utilizado na nutrição animal, no tratamento de resíduos vegetais e na degomagem de fibras na indústria têxtil e na de papel (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; UENOJO; PASTORE, 2007).

Dentre as aplicações das enzimas pécnicas destaca-se o seu uso no processamento do suco de uva e vinho, para melhorar a maceração da casca e aumentar a extração de pigmentos da uva, além de facilitar a clarificação e a filtração do mosto, aumentando, assim, a qualidade e a estabilidade do vinho (UENOJO; PASTORE, 2007).

Quando as pectinases são adicionadas antes da maceração das uvas para a produção de vinho tinto, tem-se um melhoramento das características visuais (cor e turbidez), quando comparado com vinhos não tratados, apresentando características cromáticas consideradas melhores que as dos vinhos controle (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

No processo de extração do suco de laranjas, pectinases também podem ser utilizadas em diferentes estágios, permitindo uma melhor extração de açúcares e sólidos solúveis, resultando em maior rendimento e viscosidade mais baixa. Com o tratamento enzimático ocorre a degradação parcial da pectina insolúvel e, com isso, o produto torna-se estável. As preparações enzimáticas devem apresentar pequenas concentrações de pectina metilesterase (PME), para evitar a clarificação do suco. Em sucos não clarificados, como o de laranja, o tratamento térmico é uma etapa para a inativação da PME, a qual mantém a turbidez estável, porém, ocorre a perda do suco. O congelamento do produto também faz com que a enzima permaneça na sua forma inativa, sendo o tratamento ideal para este caso (KASHYAP et al., 2001).

As pectinases podem ser divididas em dois tipos: ácidas e alcalinas. Para a extração e a clarificação de sucos e vinhos têm sido utilizadas pectinases

ácidas, enquanto, para o tratamento de vegetais, em outros ramos da indústria alimentícia e para o processamento de fibras, como a juta, utilizam-se pectinases alcalinas (HOONDAL et al., 2002).

Em geral, as pectinases podem ser enzimas induzidas, o que torna necessária a suplementação do meio de cultura com pectina, ou matérias ricas em pectina, tais como bagaço de cana-de-açúcar, maçã ou casca de frutas cítricas. Diferentes fontes de carbono podem influenciar o crescimento de microrganismos, como também na sua produção enzimática (MALDONADO, NAVARRO; CALLIERI, 1986; SOLIS-PEREIRA et al., 1996; MALVESSI; SILVEIRA, 2004).

Para a disponibilização dessas enzimas à indústria é necessária a obtenção de isolados com alta produção enzimática, sendo necessário, além de estudos fisiológicos, o desenvolvimento de estudos genéticos que possibilitem o melhoramento de linhagens selecionadas (FINCHAM, 1989). Vários recursos são utilizados para a identificação e a caracterização de fungos. Todos os aspectos devem ser levados em consideração, incluindo os morfológicos, os fisiológicos e os comportamentais, como virulência, taxa de crescimento e produção de conídios, permitindo, assim, uma melhor discriminação de isolados (LEAL, 1996; ALVES, 1996). Um pré-requisito para qualquer enzima ser utilizada em alimentos é que a sua preparação deve ser "segura" para o consumo humano. Entre as fontes microbianas, os microrganismos *GRAS* são recomendados para a preparação dos alimentos (CHEETHAM, 1995).

## **2.8 Microrganismos**

Os microrganismos são muito explorados nas áreas de medicina, alimentos, agricultura, indústria e ambiente, tanto para a produção de medicamentos, de alimentos com novos sabores e aromas, como para controle

biológico de pragas (PELCZAR et al., 1996). Os fungos são importantes nos processos biotecnológicos antigos e modernos. Os processos e os produtos que utilizam fungos incluem fermento, cerveja, vinhos, bebidas destiladas, queijos, picles e outros materiais fermentados (DEMAIN, 2000), e a produção de antibióticos, álcoois, enzimas, ácidos orgânicos e inúmeros produtos farmacêuticos (BENNET, 1998).

Cinco características dos microrganismos que são importantes na fermentação industrial (DEMAIN, 2000) são:

- a) alta taxa da área de superfície por volume, o que facilita a rápida absorção de nutrientes necessários para suportar altas taxas de metabolismo e biossíntese;
- b) grande variedade de reações que os microrganismos são capazes de realizar;
- c) facilidade para adaptar a ambientes diferentes, permitindo que a cultura seja transportada da natureza para frascos de laboratório ou para fermentadores, nos quais são capazes de crescer em fontes baratas de carbono e nitrogênio, produzindo compostos de valor agregado;
- d) fácil manipulação genética, tanto *in vivo* como *in vitro*, com a finalidade de aumentar a produção, modificar estruturas e atividades, e obter novos produtos;
- e) capacidade de formar enantiômeros específicos, geralmente ativos, nos casos em que a síntese química normal produz um mistura de enantiômeros ativos e inativos.

As principais razões para o uso de microrganismos para a produção de compostos são o fácil aumento da produção no ambiente e a fácil manipulação genética (DEMAIN, 2000).

O modo de crescimento dos fungos, sua boa tolerância à baixa atividade de água ( $a_w$ ) e altas pressões osmóticas os tornam eficientes e competitivos com a microflora natural para bioconversão de substratos sólidos. O crescimento por hifas dá aos fungos uma maior vantagem sobre os microrganismos unicelulares na colonização do substrato sólido e a utilização dos nutrientes disponíveis, dando aos fungos filamentosos o poder de penetrar no substrato sólido. A ligação da parede celular aos filamentos e o micélio proporcionam uma estrutura firme e sólida. As enzimas hidrolíticas são excretadas nas hifas sem grande diluição, como ocorre na fermentação submersa, o que faz com que sua ação seja muito mais eficiente, permitindo a penetração no substrato e aumentando a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis nas partículas (RAIMBAULT, 1998).

## **2.9 Fungos produtores de pectinases**

Quase todas as preparações comerciais de pectinases são produzidas a partir de fontes fúngicas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). A procura por cepas fúngicas é maior pela facilidade de extração da enzima, do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular (HALTRICH et al., 1996) e, também, pela estabilidade e a atividade em pH e em temperaturas extremas (KULKARNI; SHENDYE; RAO 1999).

A produção industrial pelos gêneros de *Aspergillus* e *Trichoderma* pode produzir quantidades extremamente elevadas de enzimas extracelulares, vários gramas por litro (DURAND; CLANET; TIRABY, 1988; BERKA et al., 1991).

Estes fungos são de fácil cultivo, por crescerem em biorreatores grandes e têm boa capacidade de secreção. Como exemplo, quimosina de vitelo, utilizada na indústria de laticínios, é produzida, em níveis comerciais, por *A. niger* (DUNN-COLEMANN et al., 1991).

Além disso, fungos do gênero *Aspergillus* têm sido empregados amplamente na indústria para a produção de enzimas extracelulares e de ácido cítrico, e no tratamento de resíduos. As espécies de *A. niger*, *A. sojae* e *A. oryzae* têm obtido o status de geralmente reconhecidos como seguros, ou GRAS, que possibilita seu emprego na indústria de alimentos (SCHUSTER et al., 2002; NAIDU; PANDA, 1998; KASHYAP et al., 2001; GUMMADI; PANDA, 2003).

A capacidade de sintetizar pectinases é amplamente utilizada pelos grupos de microrganismos, mas os fungos das espécies *T. harzianum*, *A. niger* e do gênero *Rhizopus* são os preferidos porque 90% das enzimas podem ser extraídos do meio de cultura (BLANDINO et al., 2001). Outros microrganismos, como *Bacillus*, *Erwinia*, *Kluyveromyces*, *Pseudomonas*, *Penicillium* e *Fusarium*, também são conhecidos como bons produtores de pectinases (KASHYAP et al., 2001; GREGORIO et al., 2002).

Normalmente, microrganismos pectinolíticos produzem uma multiplicidade de enzimas pectinolíticas. A produção dessas enzimas pode ser feita por fermentação em estado sólido ou fermentação submersa (HEERD et al., 2012).

O potencial biotecnológico de fontes alternativas de carbono para a produção de pectinases por *R. microsporus* var. *rhizopodiiformis* foi avaliada por Damásio et al. (2011). Os autores avaliaram 28 fontes de carbono, porém, os mais altos níveis foram alcançados com o substrato casca de limão. A atividade de poligalacturonase correspondeu a 57 U/mg e, para pectina liase, a 88,57 U/mg.

Pectina esterase, poligalacturonase e pectina liase têm sido utilizadas na extração de suco de frutas, na despectinização e na clarificação, ao passo que pectinases em combinação com hemicelulases e celulases são utilizadas para a destruição da parede celular e a extração do suco de frutas (VORAGEN et al., 1986).

Antier et al. (1993), utilizando a polpa de café como substrato para a produção de pectinases no processo de fermentação em estado sólido, selecionaram quatro isolados de *A. niger*, sendo uma espécie de *A. niger* como padrão e um isolado de *Penicillium* sp. Alto nível de atividade foi constatado em três dias de cultivo e se manteve constante por cinco dias. A alta atividade correspondeu a 135 U.g, pelo isolado mutante de *A. niger* C28B25, quando comparada com a do isolado padrão, que correspondeu a 35 U.g.

Em geral, as pectinases são enzimas induzidas, o que torna necessária a suplementação do meio de cultura com pectina ou matérias ricas em pectina, tais como bagaço de cana-de-açúcar, maçã ou cascas de frutos cítricos. Diferentes fontes de carbono podem influenciar o crescimento de microrganismos, como também a sua produção enzimática (MALVESSI; SILVEIRA, 2004).

Segundo Gregorio et al. (2002) e Maller (2008), os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* são frequentemente utilizados, devido à alta atividade pectinolítica exibida nos extratos produzidos. A produção de pectina liase e poligalacturonase por *P. griseoroseum* T20 foi constatada por Gonçalves et al. (2012).

A caracterização bioquímica de poligalacturonases extracelulares produzida por *T. harzianum* foi estudada por Mohamed et al. (2006). A enzima foi induzida pela adição de pectina cítrica, em que a atividade PG atingiu o seu nível máximo em cerca de 4 dias de incubação a 30 °C.

***Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**

*Cladosporium cladosporioides* pertence ao Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Classe: Dothideomycetes, Ordem: Capnodiales, Família: Davidiellaceae, Gênero: *Cladosporium* (KIRK, 2013). É uma das espécies mais comuns, com ocorrência registrada em todas as partes do mundo, sendo encontrada como saprófita, contaminante do ar e de alimentos e endofítico com função biológica importante na decomposição de matéria orgânica. Atua também como forte competidor com outros microrganismos (SAMSON; PITT, 2000).

As colônias em meio de cultura malte 2% (MA2%) crescem radialmente com coloração verde-oliva até marrom-esverdeado, textura aveludada, reverso em meio MA2 e ágar dicloran-glicerol (DG18) preto. O tamanho das colônias, após 10 dias a 25 °C, em ágar extrato de malte (MEA), nunca ultrapassa 30 mm. É facilmente isolado de solo, fruto, folhas e grãos do cafeeiro (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

O fungo *Cladosporium* sp. tem sido relatado associado a cafés de boa qualidade (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005; CHALFOUN et al., 2007). Um provável mecanismo de ação seria o consumo muito rápido da mucilagem presente no fruto, impedindo ou amenizando o estabelecimento de outros fungos (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005). A espécie de *C. cladosporioides* não é relatada como produtora de metabólitos tóxicos (PITT; HOCKING, 1999).

As características distintivas que mais auxiliam na identificação dessa espécie são cicatriz proeminente nos conídios, conidióforos sem nódulos, conídios sem septos ou com apenas um septo e, principalmente, o formato do conídio elipsoidal ou limoniforme (PEREIRA; PFENNING; CASTRO, 2005).

Estudos têm sido realizados utilizando *C. cladosporioides* para a produção enzimática. Como exemplos podem-se citar a produção e as propriedades da invertase a partir de *C. cladosporioides* em fermentação

submersa e fermentação em estado sólido, utilizando resíduos de casca de romã como substrato, que foram estudadas por Uma et al. (2012). A purificação e a caracterização de lacases por *C. cladosporioides* e suas aplicações foram estudadas por Halaburgi et al. (2011).

### ***Aspergillus niger***

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem ao Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Classe: Eurotiomycetes, Ordem: Eurotiales, Família: Trichocomaceae (KIRK, 2013). Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados. As espécies que compõem este gênero têm ampla distribuição mundial, estando presentes na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais, como em animais, além de estarem associadas à deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical.

Estando entre os fungos mais comumente relatados em alimentos, *A. niger* prevalece em locais de clima quente, em ambas as situações, no campo e nos produtos estocados (PITT; HOCKING, 1999). Os fungos pertencentes à Seção *Nigri* têm ocupado importante papel na indústria de biotecnologia, sendo utilizados na produção de enzimas como glucoamilase, lactase, catalase e muitas outras (SANSOM, 1994). A espécie *A. niger* é comumente isolada de solos, plantas, sementes frutos secos e nozes (KLICH; PITT, 1988).

Distingue-se por apresentar conídios esféricos e pretos; crescimento em temperaturas mínimas de 6 °C -8 °C e máximas de 45 °C -47 °C e ótimo crescimento em 35 °C -37 °C. A espécie *A. niger*, considerada um fungo benigno e tem sido largamente utilizada no processamento de alimentos, está na categoria *GRAS*. Entretanto, alguns isolados foram relatados como produtores de ocratoxina A (PITT; HOCKING, 1999).

### ***Trichoderma viride***

*Trichoderma viride* pertence ao Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Classe: Sordariomycetes, Ordem: Hypocreales, Família: Hypocreaceae (KIRK, 2013). É de vida livre, reprodução assexuada, fácil isolamento e cultivo, e multiplica-se rapidamente em diversos substratos (KUBICEK et al., 2002). *Trichoderma* está presente em quase todos os tipos de clima temperado ou tropical, sendo comumente encontrado em uma variedade de tipos de solo, tais como a agricultura, floresta, pradarias, pântanos, desertos e solos em todas as zonas climáticas. Além disso, é também encontrado em raízes, serapilheira, madeira e cascas em decomposição e vários materiais vegetais (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980).

Em geral, as espécies de *Trichoderma* são muito úteis para a produção de detergentes para tecidos, ração animal, combustível, alternativa ao branqueamento convencional, tratamento de efluentes, degradação de pesticidas organoclorados e biocontrole de doenças das culturas. Muitas espécies de *Trichoderma* são de grande importância econômica, produzindo enzimas hidrolíticas, celulases, quitinases e xilanases, antibióticos que têm sido aplicados em processamento de alimentos e no branqueamento de celulose (WILSON, 1996).

O gênero *Trichoderma* inclui algumas espécies que produzem enzimas e/ou atacam ou inibem fungos, fazendo o controle biológico (SAMUELS, 1996). Entre estas espécies, *T. viride* é bem conhecido pela sua produção de várias enzimas líticas, antibióticos ou no controle biológico de fungos fitopatogênicos de plantas que habitam o solo (PAPAVIZAS, 1985).

Espécies de *Trichoderma* não são, em geral, conhecidos por afetar a saúde humana, mas há relatos dispersos indicando patogenicidade para os humanos e também não estão envolvidas no parasitismo de plantas ou na perda pós-colheita das culturas (SAMUELS, 1996).

***Penicillium roqueforti* Thom**

*Penicillium roqueforti* pertence ao Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Classe: Eurotiomycetes, Ordem: Eurotiales, Família: Trichocomaceae, Gênero: *Penicillium* (KIRK, 2013). Juntamente com o gênero *Aspergillus*, é um dos gêneros que albergam maior número de espécies, sendo estes capazes de crescer nos mais diversos tipos de habitats. A maioria das espécies de *Penicillium* é saprófita oportunista, não é muito exigente nutricionalmente e tolera uma grande gama de condições físico-químicas (exemplo atividade da água, temperatura, pH), o que lhes confere a capacidade de crescer em qualquer meio ambiente, onde exista um mínimo de sais minerais ou as mais diversas e complexas formas de carbono orgânico (PITT; HOCKING, 1999).

As espécies de *P. roqueforti*, embora sejam mais conhecidas na produção de queijos, são largamente distribuídas como fungos que causam deterioração. Tem a habilidade de crescimento relativamente rápido em temperatura de refrigeração; isso faz com que seja a causa comum de deterioração de alimentos armazenados, seja de uso doméstico ou comercial e é menos frequentemente isolado de cereais e produtos de cereais (PITT; HOCKING, 1999).

*P. roqueforti* tem crescimento muito rápido e colônias verde-escuras, baixas e velutinosas, estipes de paredes rugosas, conídios grandes, esféricos e parede rugosa. Podem produzir toxinas em culturas puras, mas em níveis baixos em queijos (PITT; HOCKING, 1999).

***Rhizopus stolonifer***

Os fungos do gênero *Rhizopus* sp. são classificados segundo o Reino Fungi, Filo: Zygomycota, Classe: Zygomycetes, Ordem: Mucolales, Família: Rhizopodaceae, Gênero: *Rhizopus* (KIRK, 2013).

A espécie *R. stolonifer* causa a destruição de raízes e de frutas. Entre as mais importantes estão cerejas frescas e, principalmente, morangos, tomates, beringelas e pimentão também são seriamente afetados em alguns países. Enzimas pectinolíticas de *R. stolonifer* sobrevivem ao processo de conservas aplicadas normalmente de frutas. Se, mesmo um pequeno número de frutos, for processado infectado, estas enzimas podem causar a deterioração e o amaciamento de damascos enlatados (PITT; HOCKING, 1999).

## **2.10 Fermentação em estado sólido**

Os processos fermentativos constituem um dos métodos mais antigos e extremamente utilizados para a produção de enzimas pelos quais os microrganismos, geralmente bactérias, fungos e leveduras, retiram do meio em que está acondicionado o material necessário para a sua subsistência, ao mesmo tempo em que as enzimas catalisam substâncias que serão empregadas em processos industriais. Dentre os processos fermentativos utilizados, têm-se a fermentação submersa, em que o meio no qual se desenvolve o microrganismo é líquido e a fermentação em estado sólido, na qual o meio utilizado é sólido (FEITOSA, 2009).

A fermentação em estado sólido tornou-se uma alternativa muito atraente em comparação com a fermentação submersa para aplicações específicas e devido à recente melhora nos modelos dos reatores (COUTO; SANROMÁN, 2006). Fermentação em estado sólido (FES) é definida como a fermentação envolvendo sólidos em ausência ou quase ausência de água entre as partículas de substrato. Contudo, o substrato deve reter umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo do microrganismo (PANDEY et al., 2000).

Outra definição de fermentação no estado sólido (FES) consiste no crescimento de um microrganismo sobre um substrato sólido e úmido com aeração contínua e sem a presença de água livre entre as partículas. A FES é semelhante ao hábitat natural de fungos, permitindo o seu crescimento e a excreção de grandes quantidades de enzimas (CASTILHO; ALVES; MEDRONHO, 2000; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). O processo de fermentação em estado sólido é empregado por algumas indústrias para a produção de enzimas, molhos, ácidos e bebidas (RAIMBAULT, 1998). Empregam-se substratos sólidos provenientes de grãos de cereais ou outros vegetais ou resíduos agroindustriais, com ou sem suplementação de nutrientes.

O baixo teor de umidade significa que a fermentação pode ser efetuada apenas por um número limitado de microrganismos, principalmente leveduras e fungos, embora algumas bactérias também possam ser utilizadas (COUTO; SANROMÁN, 2006).

É comum a aplicação de FES para o cultivo de fungos e a produção de metabólitos primários e secundários, podendo algumas leveduras e bactérias também ser cultivadas por esta técnica de fermentação. Como exemplo, pode-se citar o *Bacillus atrophaeus*, que foi um grande desafio da FES para a produção de esporos com alto rendimento utilizado para bioindicadores e biocontroladores de contaminação ambiental (SELLA et al., 2009).

Embora a FES tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação tem se estendido às indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos, como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, toxinas, agentes de biorremediação, cogumelos comestíveis, polissacarídeos microbianos, biopesticidas, enriquecimento proteico de alimentos fermentados, pré-digestão de rações animais, enzimas e variações dos tradicionais alimentos fermentados (PÉREZ-GUERRA et al.,

2003). De forma geral, a aplicação comercial dos processos de FES pode ser dividida em dois tipos, que são:

- a) aplicações sócio-econômicas, como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustrias;
- b) aplicações lucrativas, economicamente, como produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados (PALMA, 2003).

Há um significativo interesse pelo uso de técnicas de fermentação em estado sólido (FES) para produzir uma ampla variedade de enzimas, especialmente por fungos. Isso ocorre porque o uso da FES acarreta diversas vantagens sobre a fermentação submersa (FSm), destacando-se a da obtenção de maiores volumes de enzimas (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003). É crescente o interesse na utilização de resíduos vegetais como fonte de energia e carbono para a produção de enzimas microbianas, dentre elas as pectinases (KAUR; KUMAR; SATYANARAYANA, 2004).

A fermentação no estado sólido utiliza substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição, os quais devem atuar tanto como suporte fisiológico quanto como fonte de nutrientes na ausência de água livre (PANDEY, 2003).

A fermentação em estado sólido (FES), geralmente, é preferida quando comparada à fermentação submersa (FS), por permitir a produção de enzimas brutas, mais concentradas e, constantemente, com menores custos de extração e purificação. Além disso, o processo de FES simula as condições de crescimento de vários fungos filamentosos, já que o meio se aproxima do hábitat natural desses microrganismos (SILVA et al., 2002; HÖLKER; HÖLFER; LENZ, 2004). Nesse processo de fermentação em estado sólido devem-se observar alguns aspectos importantes, como seleção do microrganismo, escolha do

substrato, otimização dos produtos, isolamento e purificação do produto (PANDEY, 2003).

Há várias vantagens em se utilizar a técnica de fermentação em estado sólido. Como exemplos, podem-se citar produtividade elevada, estabilidade prolongada do produto e baixo custo de produção (HÖLKER; HÖLFER; LENZ, 2004). Outra vantagem seria a de constituir uma técnica simples e de baixo custo (COUTO; SANROMÁN, 2006). Estudos de produção de enzimas por fungos por fermentação em estado sólido, quando comparada com a fermentação submersa, têm demonstrado que a fermentação em estado sólido proporciona maiores produtividades volumétricas e é menos propensa a problemas com a inibição do substrato e rendimentos enzimáticos com uma temperatura mais alta ou estabilidade do pH (HÖLKER; HÖLFER; LENZ, 2004).

São considerados como vantagens os seguintes aspectos (DOELLE; MITCHELL; ROLZ, 1992):

- a) os meios de cultivo são simples, geralmente subprodutos agrícolas que apresentam um alto teor dos nutrientes necessários;
- b) a baixa atividade de água impede as contaminações, especialmente por bactérias e leveduras;
- c) a concentração natural do substrato permite utilizar reatores menores, quando comparadas com as fermentações submersas;
- d) a aeração forçada é facilitada pela porosidade do suporte, o que permite uma alta transferência de ar e, por conseguinte, de oxigênio;
- e) podem-se empregar, frequentemente, esporos como inóculo nos processos de crescimentos de fungos, o que diminui os custos e as manipulações de propagação do inóculo;
- f) os esporos dos fungos que são produzidos são mais resistentes e têm melhor adaptabilidade nas condições de aplicação agrícola.

- g) Entre as principais desvantagens encontram-se (DOELLE; MITCHELL; ROLZ, 1992):
- h) as aplicações, geralmente, estão limitadas a microrganismos que crescem a baixos teores de umidade;
- i) a dissipação do calor gerado pode ser um problema, principalmente quando se trabalha em grande escala e não se controla o processo;
- j) a natureza sólida do substrato dificulta a medição de parâmetros da fermentação, tais como pH, temperatura, umidade e concentrações de substratos e produtos;
- k) os processos de transferência de massa são limitados pela difusão;
- l) muitos aspectos de engenharia, como o desenho e o escalonamento de processos, são pouco caracterizados;
- m) o tempo de fermentação é maior, pois, geralmente, são utilizados microrganismos que apresentam baixas velocidades específicas de crescimento.

É importante ressaltar que o processo de FES é menos agressivo ao ambiente do que o processo de fermentação submersa e os custos são muito menores devido à eficiente utilização e ao valor agregado dos resíduos (ROBINSON; NIGAM, 2003).

De acordo com Silveira et al. (1999), as vantagens do uso da fermentação no estado sólido com relação à fermentação submersa são baixo custo, melhoria da estabilidade, imitar o hábitat natural do fungo, produzir enzima com atividades específicas mais altas, gerar um produto enriquecido e facilitar o controle de produção da enzima processada.

Para Couto e Saromán (2006), a fermentação em estado sólido reproduz processos microbiológicos naturais, como, por exemplo, a compostagem e a ensilagem. No caso de aplicações industriais, esses processos naturais, quando

monitorados, produzem o produto desejado. Assim, vários produtos de valor agregado têm sido produzidos por essa técnica, utilizando-se matérias-primas provenientes da natureza (PANDEY et al., 2000).

Nesse tipo de fermentação, várias fontes de carbono (substrato principal) podem ser utilizadas. Entre elas citam-se farelo de trigo (ISIL; NILUFER, 2005), bagaço de cevada (KRONBAUER et al., 2007), bagaço de cana-de-açúcar (SOUZA; ROBERTO; MILAGRES, 1999; MILAGRES et al., 2004; KRONBAUER et al., 2007) e torta de soja (PINHEIRO, 2006). Neste processo de fermentação devem-se observar alguns aspectos importantes, como a seleção do microrganismo, a escolha do substrato, a otimização dos produtos, o isolamento e a purificação do produto (PANDEY, 2003).

A principal diferença entre a fermentação líquida e sólida deve-se ao fato de que, na primeira, a mistura entre os componentes do processo (microrganismos, nutrientes e metabólitos) é homogênea e uniformemente distribuída por todo o fermentador. Esta mistura imperfeita ocorrente na FES promove a formação de diferentes camadas em torno da célula microbiana, a qual limita a difusão de nutrientes e metabólitos e também a troca gasosa, afetando o crescimento microbiano (GRAMINHA et al., 2008).

Independentemente do processo utilizado para a produção de pectinases fúngicas, vários aspectos devem ser cuidadosamente considerados, como, por exemplo, formulação de um meio de cultura contendo equilibrados hidratos de carbono, fonte de nitrogênio, vitaminas e sais minerais (PILNIK; ROMBOUTS, 1981).

Os fungos são potenciais candidatos para produzir enzimas mediante processos de fermentação em estado sólido. Uma importante variedade de produtos enzimáticos comerciais, compostos de fitases, pectinases, xilanases, proteases, alfa e glicoamilases, é produzida a partir de fungos. Nos últimos anos, os estudos das fermentações em estado sólido estão focados no desenvolvimento

de meios de cultivo a partir de resíduos agroindustriais e o desenvolvimento e o monitoramento desses processos fermentativos (PANDEY, 2001).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de realização do trabalho**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da EPAMIG, situado no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG e no Laboratório Central de Análise de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

#### **3.2 Preparo do resíduo**

Foi utilizada a casca de café em coco, resultante do processamento via seca e casca melosa de café, resultante do processamento via úmida proveniente de café arábica. A casca de café melosa foi pré-secada na propriedade rural. A casca seca e a casca melosa foram obtidas de uma propriedade rural localizada no município de Santo Antônio do Amparo, MG. A casca seca e a casca melosa podem ser observadas na Figura 8.



Figura 8 Casca de café melosa, à direita (A) e casca seca de café (B), à esquerda, antes e após a trituração

### 3.2.1 Pré-tratamento do substrato

Com a finalidade de adequar o substrato às condições necessárias ao crescimento e ao metabolismo dos microrganismos, foram realizados os seguintes processos, de acordo com Santos (2007), com adaptações:

- a) moagem - visando adequar os fragmentos à granulometria mais adequada ao processo. As cascas foram trituradas em moinho TE-631/2 multiuso, da marca Tecnal e, em seguida, as amostras foram peneiradas a uma granulometria média de 0,8 mm. Utilizou-se a peneira ABNT 20, abertura de 0,84 mm;
- b) embebição - as amostras foram colocadas em frascos e, em seguida, foi adicionada solução de Manachini (2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1 g de

extrato de levedura e 1.000 mL de água destilada), para regular o teor de umidade inicial do processo;

- c) processo de esterilização - que visa à diminuição ou à eliminação de possíveis contaminação. Os frascos foram esterilizados, a 121 ° C, por 15 minutos.

### 3.3 Microrganismos

Foram utilizados 34 isolados de fungos (3 isolados de *C. cladosporioides*, 1 isolado de *T. viride*, 1 isolado de *P. roqueforti*, 1 isolado de *R. stolonifer* e 28 isolados de *A. niger*) pertencentes à Coleção Micológica EcoCentro da EPAMIG. As colônias puras dos fungos foram cultivadas em placas de Petri (10 x 10 cm) contendo, aproximadamente, 20 mL de meio de cultura MA2% (20 g de extrato de malte, 20 g de ágar e 1.000 mL de água destilada), durante cinco dias, em BOD, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

### 3.4 Determinação do índice enzimático

Após este período, discos (6 mm de diâmetro) de MA2% contendo micélio dos isolados fúngicos foram transferidos para placas de Petri contendo meio mineral tamponado (MMT), de acordo com metodologia proposta por Marchi et al. (2009). As placas foram armazenadas em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, por cinco dias. Em seguida, foi transferido disco (6 mm de diâmetro) de MMT com micélio para placa de Petri contendo 25 mL de meio Mac Ilvaine (7,74 g de ácido cítrico; 17,93 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,5 g de pectina cítrica; 13 g de ágar; 1 L de H<sub>2</sub>O destilada; pH = 6,0). Este processo foi realizado em triplicata para cada isolado, o qual permitiu a difusão das pectinases para o meio circundante. Essas placas foram mantidas a 26 °C, por

cinco dias. Decorrido o tempo, foram vertidos 3 mL de solução de lugol sobre as placas. Após 10 minutos de repouso, essa solução foi descartada. Posteriormente, a área do halo de degradação da pectina foi visualizada.

Após este período, foram feitas medições do diâmetro da colônia. A determinação enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). O índice de atividade enzimática (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais utilizados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido.

### **3.5 Caracterização dos resíduos**

A caracterização físico-química dos resíduos deu-se conforme procedimentos descritos a seguir, tendo sido realizadas três repetições para cada análise.

#### **3.5.1 Análise de atividade de água do substrato**

A atividade de água foi determinada utilizando-se equipamento Aqualab (Decagon modelo 4 TE). As amostras, aproximadamente 5 g, foram dispostas em recipientes plásticos e as leituras foram realizadas em temperatura controlada de 25 °C.

#### **3.5.2 Determinação de umidade do substrato**

A determinação da umidade do substrato foi realizada em um determinador de umidade marca Shimadzu, modelo MOC 63u.

### **3.5.3 pH**

Preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1,0 g da amostra sólida. Após homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso, por um período de 30 minutos e, depois, o pH foi mensurado em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

### **3.5.4 Determinação do teor de umidade**

Determinou-se o teor de umidade pela perda de peso em estufa regulada a 105 °C até peso constante, de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1990).

### **3.5.5 Determinação do teor de cinzas**

Segundo as normas analíticas da Association of Official Analytical Chemistry (2000), o teor de cinzas foi obtido por incineração em temperaturas de 550-570 °C.

### **3.5.6 Determinação do teor de sólidos solúveis**

A concentração de sólidos solúveis, medida em °Brix, é uma medida relacionada com a quantidade de açúcares presentes na amostra. Foram adicionados 9 mL de água destilada a 1 g do resíduo e, após homogeneização, deixou-se a suspensão em repouso, por 30 minutos, com agitação intermitente. Após este período, a suspensão foi filtrada com algodão e realizada a leitura em

refratômetro digital da marca Reichert AR200. O resultado foi multiplicado por 10, devido à diluição, a fim de determinar o teor de sólidos solúveis do resíduo.

### **3.5.7 Determinação de lipídios totais ou extrato etéreo**

A determinação de lipídios totais foi feita por meio de extração contínua em aparelho tipo Soxhlet, segundo a metodologia proposta pela Association of Official Analytical Chemistry (2000). Processo gravimétrico, baseado na perda de peso do material submetido à extração com éter etílico, ou na quantidade de material dissolvido pelo solvente.

### **3.5.8 Determinação do teor de proteína bruta**

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de microkjeldahl, descrito pela Association of Official Analytical Chemistry (2000), em que os nitrogênios totais da amostra são fracionados em nitrogênio proteico, por meio de cálculos, considerando-se que cada 100 g de proteína contêm, em média, 16 g de nitrogênio, fator de 6,25.

### **3.5.9 Determinação do teor de fibra bruta**

O teor de fibra bruta foi determinado por meio da hidrólise ácida, segundo a Association of Official Analytical Chemistry (2000).

### **3.5.10 Determinação do teor de acidez titulável**

A acidez titulável foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, de acordo com a técnica descrita pela Association of Official Analytical Chemistry (1990) e expressa por 100 g de amostra.

### **3.5.11 Determinação de açúcares totais**

Utilizou-se o método de Antrona para a determinação de açúcares totais, de acordo com a metodologia descrita por Dische (1962), sendo os resultados expressos em g/100 g.

### **3.5.12 Determinação do teor de taninos totais**

Os teores de taninos totais foram extraídos e dosados segundo a técnica de Goldstein e Swain (1963), com algumas modificações. Foram feitas três extrações sucessivas com metanol 80%. Na determinação, foi utilizado o método colorimétrico Folin-Dennis, de acordo com metodologia proposta pela Association of Official Analytical Chemistry (1990). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 760 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido tânico/100 g da amostra.

### **3.5.13 Determinação do teor de pectina solúvel e total**

As pectinas totais e solúveis foram extraídas segundo a técnica padronizada por McCready e McComb (1952) e o doseamento, utilizando-se a técnica de Bitter e Muir (1962). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a

530 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido poligalacturônico/100 g/polpa.

### **3.6 Processo fermentativo**

#### **3.6.1 Fermentação em estado sólido**

Os microrganismos que apresentaram índice enzimático (IE)  $\geq$  de 2,00 foram utilizados para cultivo em fermentação em estado sólido e, em seguida, foram realizadas análises da atividade enzimática do extrato enzimático bruto.

Os fungos foram cultivados em meio de cultura malte 2%, por cinco dias, em BOD a 25 °C e, após este período, uma suspensão de esporos contendo cerca de  $10^6$  esporos/mL foi transferida para frascos de vidro contendo solução de Manachini pH 2,5, para a indução de pectinases. Com base no teor de pectina determinado para os diferentes substratos e a recomendação da adição de 5% da mesma à solução padrão de Manachini, foram utilizados, na fermentação em estado sólido, 12,8 g de casca seca para 20 mL de solução de Manachini e 8,7 g de casca melosa para 15,9 mL de solução de Manachini.

Os frascos foram incubados por 48, 96 e 168 horas, em BOD a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Pode-se observar o processo de fermentação em estado sólido na Figura 9.



Figura 9 Processo de fermentação em estado sólido em BOD a 28 °C

### 3.6.2 Obtenção do extrato enzimático bruto

Após 48, 96 e 168 horas de cultivo, foram adicionados aos frascos 100 mL de água destilada estéril e, em seguida, as amostras foram colocadas no shaker, por 15 minutos, a 100 rpm, a 25 °C. As amostras foram submetidas ao processo de filtração a vácuo, com auxílio de membrana Millipore® 0,45  $\mu\text{m}$ , sendo a atividade enzimática determinada na fração líquida da cultura.

### **3.7 Determinação da atividade de pectinases**

#### **3.7.1 Pectina metilesterase (PME)**

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma solução de pectina cítrica a 1% foi preparada em NaCl 0,1 M, ajustando-se o pH da solução para 7,5 com NaOH 0,5 M. Três mL da solução de enzimas e 20 mL da solução de pectina cítrica foram adicionados em erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura incubada durante 30 minutos, mantendo-se o pH em 7,5 pela adição de NaOH 0,02 M. A atividade de PME foi proporcional ao volume de NaOH gasto na titulação e foi expressa em microequivalentes de ácido péctico liberado por mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Para medir a atividade enzimática, foram realizadas três leituras de cada frasco e, em seguida, foram feitas médias, obtendo-se, assim, dois resultados.

#### **3.7.2 Pectina liase (PL)**

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kashyap et al. (2000), tendo 1 mL da solução de enzimas sido adicionado a 5 mL de solução de pectina 1%, sendo o volume ajustado para 10 mL, com água destilada. As amostras foram incubadas, a 40 °C, por 2 horas, seguindo-se com a adição de 0,6 mL de sulfato de zinco 9% e 0,6 mL de hidróxido de sódio 0,5 M. As amostras foram centrifugadas (3.000 rpm/10 min) e 5 mL do sobrenadante foram adicionados a uma mistura de ácido tiobarbitúrico (3 mL, 0,04 M), HCl (2,5 mL 0,1 M) e água destilada (0,5 mL). A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição, por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente e a absorbância da solução medida a 550 nm. Foram realizadas três leituras de cada amostra e, em seguida, obtida a média dos

resultados. Uma unidade de atividade foi dada como a quantidade de enzima que provocou uma alteração na absorbância de 0,01 na condição do ensaio. A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade enzimática encontrada pelo valor de proteínas totais na amostra.

### **3.7.3 Exo-poligalacturonase (Exo-PG)**

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma reta padrão de ácido poligalacturônico foi construída, utilizando-se o método de Miller (DNS). Foram adicionados 1,5 mL da solução de enzimas mais 1,0 mL de solução de sal de sódico de ácido poligalacturônico a 0,1% em tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0, em tubo de ensaio. A mistura foi incubada a banho-maria, a 40 °C, por 1 hora e, após este período, a reação foi paralisada, adicionando-se 1,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), sendo os tubos mantidos em banho fervente, por cinco minutos e, em seguida, resfriados a banho de gelo. A absorbância da solução foi lida a 575 nm. Foram realizadas três leituras de cada amostra e, em seguida, obtida a média dos resultados. A atividade (U) de Exo-PG foi expressa na forma de  $\mu\text{mol}$  de equivalente de ácido galacturônico liberado por mL por minuto, nas condições do teste. A atividade enzimática específica foi determinada dividindo-se o valor de U/mL pelo valor de proteínas totais da mesma amostra, segundo metodologia de Bradford, sendo expressa na forma de  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de ácido galacturônico liberados por massa (mg ou  $\mu\text{g}$ ) de proteínas por minuto, nas condições do teste.

### 3.7.4 Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Lima (2006). A mistura da reação conteve 5,5 mL de solução de pectina, 0,2% em tampão acetato de sódio 0,025 M pH 5,0 contendo 1 mM de EDTA (ácido di-amino tetra-acético) e 250 µL do extrato enzimático. Após a homogeneização das misturas em agitador de tubo, elas foram incubadas em banho-maria, a 50 °C, por 10 minutos e, em seguida, a reação foi interrompida colocando-se as amostras em banho de gelo. A leitura foi realizada em viscosímetro de Ostwald tamanho 200, medindo-se o tempo (t) de escoamento das amostras, do branco e da água deionizada, calculando-se a atividade segundo Mill e Tuttobelho (1961) e Teixeira (1994), de acordo com a fórmula abaixo. Foram realizadas três leituras de cada amostra e, em seguida, obtida a média dos resultados.

$$\% \text{ da redução de viscosidade} = \frac{t \text{ branco} - t \text{ amostra}}{t \text{ branco} - t \text{ água}} \times 100$$

$$\text{Unidade Viscosimétrica: UV/mL} = \frac{(\% \text{ da redução de viscosidade}) \times 4}{10}$$

### 3.7.5 Determinação de proteínas totais na amostra

O método de Bradford (1976) é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de *coomassie brilliant blue* BG-250.

Para a quantificação de proteínas totais na amostra, foram adicionados em tubo de ensaio 0,1 mL da amostra + 1 mL do reagente de *coomassie blue* G-250 reagente de Bradford. O branco foi preparado pela adição de 0,1 mL de água

+ 1 mL do reagente de *comassie blue* G-250. Em seguida, estes foram homogeneizados em vórtex e, passados 5 minutos da agitação, a absorbância foi lida a 595 nm. Foram realizadas três leituras de cada amostra e, em seguida, obtida a média dos resultados.

### **3.7.6 Determinação da atividade enzimática específica**

Para obter maior confiabilidade nos resultados e eliminar proteínas indesejáveis, procedeu-se ao cálculo da atividade enzimática específica, dividindo-se o número de unidades de enzima (U) pelo número de proteínas totais da amostra (mg), conforme a fórmula a seguir. Os resultados foram expressos em U/g.

$$\frac{\text{Número de unidades de enzima (U)}}{\text{gramas de proteínas (g)}}$$

Para a comparação dos dados encontrados, foram realizadas análises da atividade enzimática quanto à produção de pectina metilesterase (PME), pectina liase (PL), exo-poligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG), frente à enzima comercial Pectinases de *Aspergillus niger* marca Sigma®.

### **3.8 Quantificação dos resíduos**

Após o processo de fermentação e de filtração para a obtenção do extrato bruto, os resíduos de casca e de casca melosa foram secos em estufa, a 50 °C, por, aproximadamente, 8 horas. Transcorrido este período, os resíduos foram pesados em balança analítica e calculadas as reduções de peso dos mesmos.

### **3.9 Delineamento experimental e análise estatística**

#### **3.9.1 Determinação do índice enzimático**

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), tendo os testes sido realizados com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias dos tratamentos foram comparadas, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### **3.9.2 Determinação da atividade enzimática**

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) e a análise de variância em esquema fatorial na parcela, sendo 2 substratos (casca seca e casca melosa) x 6 isolados constituídos de *C. cladosporioides* (CMEC 00128), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *T. viride* (CMEC 00125), *P. roqueforti* (CMEC 00033) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), com duas repetições. A variável analisada foi a atividade enzimática específica, sendo os demais dados interpretados por meio de análise de variância (ANAVA) e as médias analisadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software Sisvar®.

Utilizou-se também o Teste de Dunnett pelo software *Statistical Analysis System*® (SAS), que é utilizado para a comparação entre os tratamentos e o tratamento adicional, o qual, na presente pesquisa, tratou-se da enzima comercial Pectinases obtida de *A. niger*, Sigma®.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Resultado da seleção dos fungos quanto à produção de pectinases em meio sólido (teste semiquantitativo)**

Para a avaliação do potencial de produção de pectinases foram testados 34 isolados fúngicos. Os resultados referentes aos potenciais quanto à produção da enzima são apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 10 e 11.

Tabela 1 Produção de pectinases por fungos filamentosos, avaliada pelo índice enzimático (IE)

<b>Isolados</b>	<b>Espécies</b>	<b>Fonte</b>	<b>IE</b>
CMEC 00128	<i>C. cladosporioides</i>	Café	<b>5.08 a*</b>
CMEC 00127	<i>C. cladosporioides</i>	Café	<b>4.85 a</b>
CMEC 00126	<i>C. cladosporioides</i>	Café	<b>4.52 a</b>
CMEC 00125	<i>T. viride</i>	Casca de café	<b>2.84 b</b>
CMEC 00033	<i>P. roqueforti</i>	Café	<b>2.42 b</b>
CMEC 00130	<i>R. stolonifer</i>	Café	<b>2.10 c</b>
CMEC 00124	<i>Aspergillus niger</i>	Café	1.94 c
CMEC 00121	<i>A. niger</i>	Café	1.43 d
CMEC 00112	<i>A. niger</i>	Solo	1.41 d
CMEC 00122	<i>A. niger</i>	Solo	1,14 d
CMEC 00103	<i>A. niger</i>	Pão integral	1.00 d
CMEC 00102	<i>A. niger</i>	Pão integral	1.00 d
CMEC 00104	<i>A. niger</i>	Uva	1.00 d
CMEC 00106	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d
CMEC 00105	<i>A. niger</i>	Uva	1.00 d
CMEC 00101	<i>A. niger</i>	Pão	1.00 d
CMEC 00097	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00124	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00098	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00100	<i>A. niger</i>	Rosca	1.00 d
CMEC 00099	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00107	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d
CMEC 00116	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00115	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00122	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d
CMEC 00120	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d
CMEC 00118	<i>A. niger</i>	Amendoim	1.00 d
CMEC 00111	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00110	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d
CMEC 00108	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d
CMEC 00114	<i>A. niger</i>	Café	1.00 d
CMEC 00113	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d
CMEC 00123	<i>A. niger</i>	Solo	1.00 d

\*\*CV (%) = 17,71

\* Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

\*\* CV = coeficiente de variação, mede a dispersão dos dados em relação à média aritmética; quanto menor for, melhor é a precisão dos dados

Nas Figuras 10 e 11 estão ilustrados os resultados dos testes semiquantitativos positivos para pectinases, após a revelação com solução de lugol, referentes aos isolados *C. cladosporioides* e *T. viride* (Figura 10) e *P. roqueforti* e *R. stolonifer* (Figura 11).



Figura 10 Teste semiquantitativo da produção de pectinases após revelação com solução de lugol por *C. cladosporioides* (CMEC 00128), à direita e à esquerda por *T. viride* (CMEC 00125).



Figura 11 Teste semiquantitativo da produção de pectinases após revelação com solução de lugol por *P. roqueforti* (CMEC 00033), à direita e à esquerda por *R. stolonifer* (CMEC 00130)

Conforme os resultados da Tabela 1, pode-se observar que os isolados testados apresentaram uma variação quanto ao potencial de produção da enzima, tendo se destacado os isolados *C. cladosporioides* (CMEC 001280) IE = 5,08; *C.*

*cladosporioides* (CMEC 00127) IE = 4,85; *C. cladosporioides* (CMEC 00126) IE = 4,52; *T. viride* (CMEC 00125) IE = 2,84; *P. roqueforti* (CMEC 00033) IE = 2,42 e *R. sotolonifer* (CMEC 00130) IE = 2,10. Esses fungos apresentaram os melhores potenciais enzimáticos quanto à produção de pectinases, pois apresentam índices enzimáticos (IE)  $\geq 2,00$ .

Nenhum dos 28 isolados de *A. niger* alcançou o índice enzimático satisfatório ( $\geq 2,00$ ) quanto à produção de pectinases. Os isolados de *A. niger* foram selecionados para o presente trabalho por serem relatados como a espécie comumente utilizada para a produção industrial de enzimas pectinólíticas (NAIDU; PANDA, 1998). De acordo com Zhong-Tao et al. (2009), Taskin et al. (2008) e Patil e Dayand (2006), os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicilium*, principalmente *A. niger*, são produtores de pectinases. Este fungo sintetiza a poligalacturonase (PG), a polimetilgalacturonase (PMG), a pectina liase (PL) e a pectinesterase (PE) (PANDA; NAIDU; SINHA, 1999).

Houve uma variabilidade na produção da enzima pelos isolados de *C. cladosporioides*. Esta variabilidade também foi verificada por Fernandes (2009), estudando a avaliação do potencial enzimático das enzimas amilases, celulasas e proteases de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes. Sugere-se que, talvez, esta variabilidade esteja relacionada às condições de cultivo e de processamento de grãos de café, pois esses isolados foram obtidos de diferentes regiões de Minas Gerais.

Os isolados de *C. cladosporioides* e *P. roqueforti* apresentaram os maiores índices enzimáticos, espécies que também foram relatadas por Rezende et al. (2013). Neste estudo, foram analisados 182 fungos quanto à produção de pectato liase e poligalacturonase, dos quais 42 fungos apresentaram atividade pectinólítica  $\geq 2,00$ . Os índices enzimáticos corresponderam a 3,40 para poligalacturonase e 1,80 para pectato liase, por *C. cladosporioides* (DCA10),

1,10 para pectato liase e 3,20 para poligalacturonases, por *P. roqueforti* (DCA14).

As espécies de *C. cladosporioides* apresentaram índices enzimáticos satisfatórios para a produção de pectinases. Sugere-se que estas espécies possam ter um potencial enzimático para a produção de diversas enzimas. Este resultado foi comprovado por Fernandes (2009), também quanto à produção de amilases. Os índices enzimáticos corresponderam a 2,78 e 2,11; lipases, 3,39; 3,30; 2,72; 2,64 e 2,36 e protease, 2,61 e 2,02. Neste mesmo trabalho, ainda foi relatada a produção de celulases por *P. roqueforti*, que também apresentou potencial enzimático de 2,41.

*R. stolonifer* apresentou índice enzimático de 2,10 para a produção de pectinases. Resultados semelhantes foram obtidos também por Guimarães et al. (2006), que constataram a produção de pectinases por esta espécie, classificando-a como a melhor espécie produtora de pectinases. Outra espécie de *Rhizopus* também citada foi *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* (DAMÁSIO et al., 2011). Outras espécies também são citadas como produtoras de pectinases, como *Colletotrichum gloeosporioides* (MARCHI et al., 2009) e *Alternaria solani* (MARCHI; BORGES; MIZUBUTI, 2006).

#### **4.2 Caracterização dos resíduos**

A atividade de água no substrato casca seca foi de 0,98 e, no substrato casca melosa, foi de 0,97. A umidade no substrato casca seca foi de 64,00 e, no substrato casca melosa, foi de 66,00, após embebição com a solução de Manachini.

A caracterização dos resíduos casca seca e casca melosa pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 Caracterização da casca seca e da casca melosa de café

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Casca seca</b>	<b>Casca melosa</b>
pH	4,8	4,3
Umidade (%) na casca	11,74	16,37
Resíduo mineral fixo - cinzas (%)	5,40	6,27
Extrato etéreo (%)	1,90	1,37
Sólidos solúveis (°BRIX)	25,00	42,50
Proteína bruta (%)	8,35	8,08
Fibra bruta (%)	25,35	15,80
Ácidez	0,60	0,60
Taninos (mg/100 g)	1,50	1,70
Açúcares totais (g/100 g)	2,40	7,60
Pectina solúvel (mg/100 g)	2,20	3,10
Pectina total (mg/100 g)	3,90	5,70
Solubilidade	56,00	54,00

De acordo com os resultados, pode-se observar que a atividade de água foi de 0,97 e 0,98, para casca seca e casca melosa, respectivamente, o que confere uma alternativa para utilização do resíduo para o cultivo de microrganismos. Alguns autores (ANTIER et al., 1993; CASTILHO, 1997; TARAGANO; PILOSOFF, 1999) citam a utilização de diversos substratos para a produção de pectinases pelo *A. niger* com atividade de água acima de 0,93. Garcia (2004) relata que os substratos com teor de atividade de água inferior a 0,6 não são propícios ao crescimento microbiano e, a partir de 0,65, inicia-se a proliferação de microrganismos específicos, sendo que até 0,75, somente algumas bactérias halófitas, leveduras e fungos xerofílicos podem se desenvolver. Singhania, Soccol e Pandey (2008) relatam que os fungos necessitam de baixa umidade; 40%-60% pode ser suficiente, mas a seleção do substrato depende de vários fatores relacionados, principalmente, ao custo e à

disponibilidade e, portanto, envolve a seleção de vários resíduos agroindustriais (PANDEY et al., 2000).

É importante salientar que baixos níveis de atividade de água significam baixa disponibilidade de moléculas de água nas proximidades das células, dificultando a troca de solutos na fase sólida, diminuindo o metabolismo e gerando menores taxas de crescimento ou de síntese de metabólitos. Em contrapartida, elevados índices de atividade de água dificultam a difusão de ar pelas partículas sólidas, levando à redução no crescimento microbiano (ABUD; SILVA; NARAIN, 2007; ALCÂNTRA, 2008). A atividade de água afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PINTO et al., 2006).

Na fermentação em estado sólido (FES), o microrganismo tem um limite de água para suas atividades metabólicas e seu crescimento. A atividade de água ótima para fungos é por volta de 0,7; para leveduras, de 0,8 e, para bactérias, de 0,9. Uma pequena flutuação nestes valores ótimos causa um grande distúrbio no crescimento e no metabolismo dos microrganismos (ANDRADE, 1999).

A umidade nos substratos correspondeu a 64% na casca seca e 68% na casca melosa, estando de acordo com a literatura. Nos processos de FES, geralmente, varia entre 30% e 85%. A umidade ótima para o cultivo do microrganismo em FES é dependente da capacidade do substrato em reter água. Por exemplo, o nível de umidade ótimo para o cultivo de *A. niger* em arroz é de 40%, entretanto, para a polpa de café é de 80%. O requerimento de água pelo microrganismo deve ser definido em termos de atividade de água ( $A_w$ ) do meio em lugar da umidade do substrato sólido (SANTOS, 2007). A produtividade da fermentação em estado sólido, de acordo com Nigam e Singh (1994), é afetada significativamente pelo nível de umidade do meio. Os valores mais baixos podem induzir a esporulação do microrganismo, enquanto os níveis mais elevados podem reduzir a porosidade do sistema, o que pode produzir limitação

de transferência de oxigênio e aumento do risco de contaminação por bactérias (PÉREZ-GUERRA et al., 2003).

Castilho, Alves e Medronho (2000), utilizando o farelo de trigo e o farelo de soja como substrato para a produção de pectinases em fermentação em estado sólido por *A. niger*, relataram que altas atividades pectinolíticas foram obtidas com a umidade de 40%, durante 22 horas de cultivo.

O pH do substrato da casca seca foi de 4,8 e de 4,3 para casca melosa, estando de acordo com dados da literatura. O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores mínimos, ótimos e máximos para o desenvolvimento de cada microrganismo. Geralmente, os fungos preferem pH baixo (4,5-5,0), afetando o metabolismo dos microrganismos por alterar seu conjunto enzimático. O pH de um cultivo varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do microrganismo (SANTOS, 2007).

De maneira geral, os resultados das características físico-químicas da casca seca e da casca melosa estão de acordo com os relatados por outros autores, como por Parra et al. (2008), para as análises de proteínas bruta (7,61%), para casca seca (8,76%) e para casca melosa, e extrato etéreo (0,91%) para casca seca e (1,21%) casca melosa. Já para fibra bruta para casca seca, o autor encontrou resultados superiores, 43,43% para casca seca e 18,16% para casca melosa, comparados aos do presente trabalho. Parra et al. (2008) não constatou a presença de taninos na casca seca e na casca melosa, porém, no presente trabalho, foram encontrados valores de 1,5% e 1,7%, para casca seca e casca melosa, respectivamente. Oliveira (2001) encontrou valor de fibra bruta de 17,76% na casca seca, o qual se aproximou mais do resultado encontrado no presente trabalho. Oliveira (2011), analisando a casca de café melosa, relatou umidade de 11,23%; resíduo mineral fixo – cinzas, 7,11%; extrato etéreo, 1,52%; fibra bruta, 24,92% e proteínas, 11,48%.

O teor de proteínas foi de 8,35% na casca seca e de 8,80% na casca melosa, sugerindo que o resíduo de café é viável como meio fermentativo, por ser uma ótima fonte de nitrogênio, nutriente imprescindível ao metabolismo microbiano.

Os resultados de açúcares totais corresponderam a 2,4% na casca seca e 7,6% na casca melosa; para pectina total foram de 3,9% na casca seca e de 5,7% na casca melosa; para pectina solúvel, 2,2% na casca seca e 3,10% na casca melosa e solubilidade de 56% na casca seca e de 54% para casca melosa. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2011), estudando a casca seca de café como substrato para a produção de pectinases: 7,57% de açúcares, 6,26% de pectina total, 2,41% de pectina solúvel e 41,56% de solubilidade.

Quantitativamente, na literatura, há indícios de que altas concentrações de açúcares no meio suprem a necessidade dos microrganismos para seu crescimento e a pectina no meio é pouco utilizada. Porém, quando a concentração de açúcares é menor que a concentração de pectina, ocorre facilmente a quebra das moléculas pécicas, pois, devido à abundância, são mais consumidas, levando a altas atividades enzimáticas (SOUZA et al., 2007).

Neste trabalho, utilizaram-se os valores de pectina total como fonte de pectina ou substrato indutor para o processo de fermentação em estado sólido, estando de acordo com outras pesquisas como por exemplo a produção de poligalacturonase por *A. niger* é induzida pela presença de pectina no meio de cultura. A maior parte das pectinases comerciais é de enzimas indutíveis e substratos com alto teor de pectina estimulam a produção da enzima. A caracterização do resíduo de manga seco mostrou que este substrato pode ser considerado viável para a produção de poligalacturonase, apresentando bons níveis de pectina, 9,62% e de proteína, 6,73% (OLIVEIRA, 2013).

É importante lembrar que, de forma geral, a caracterização deve ser feita para cada substrato e pode variar drasticamente, dependendo da época de colheita e das práticas agrícolas relacionadas com o plantio. Segundo Albino e Silva (1996), as condições de processamento dos subprodutos também podem conduzir a grandes variações na composição dos alimentos, sendo, então, de extrema importância a caracterização do substrato para o processo de fermentação em estado sólido e, conseqüentemente, o ajuste de determinados parâmetros (ALCÂNTARA; ALMEIDA; SILVA, 2007).

#### **4.3 Resultado das atividades enzimáticas pectinolíticas avaliadas quanto à produção de pectina metilesterase (PME), pectina liase (PL), exopoligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG)**

Nas Tabelas 3 a 10, podem ser observados os resultados das análises das atividades enzimáticas específicas das enzimas estudadas. Com relação à produção das enzimas pectina metilesterase (PME), pectina liase (PL), exopoligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG), observou-se interação tripla significativa entre os fatores substrato, tempo e isolados.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, pode-se observar que houve diferença significativa entre os isolados analisados. No período de 48 horas, o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00126) apresentou uma atividade enzimática de 94,50 U/g. No período de 96 horas, os isolados *C. cladosporioides* (CMEC 00126) e *C. cladosporioides* (CMEC 00128) apresentaram atividade enzimática de 58,00 e 54,00 U/g e, no período de 168 horas, o isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130) apresentou atividade enzimática de 99,00 U/g, que foi a maior entre todos os isolados analisados. Para os três tempos de fermentação observou-se que houve diferença significativa entre eles, com exceção dos

isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033) e *C. cladosporioides* (CMEC 00127), nos quais o tempo de fermentação não diferiu na produção enzimática.

Tabela 3 Valores médios da atividade enzimática específica de pectina metilesterase (PME) (U/g) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos: 48, 96 e 168 horas

Isolados	Tempo (horas)		
	48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033)	32,17 d A	27,17c A	36,67c A
<i>T. viride</i> (CMEC 00125)	52,67 b A	43,50 b B	41,17c B
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC00126)	94,50 a A *	58,00 a B	44,00 c C
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC00127)	43,17 c A	34,83 c A	39,67 c A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC00128)	44,83 c B	54,00 a A	54,50 b A
<i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130)	36,83 d B	35,00 c B	99,00 a A*
<b>E. comercial</b>		58,17	
CV (%) = 12,30			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott ( $P < 0,05$ )

\* Significativo, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

Pelo teste de Dunnett, de modo geral, a enzima comercial apresentou maior atividade enzimática (58,17 U/g), quando comparada com os isolados analisados, com exceção do isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00126), que apresentou atividade enzimática superior (94,50 U/g) no período de 48 horas e do isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130), que apresentou atividade máxima (99,00 U/g) no tempo de 168 horas, em relação à enzima comercial. Houve uma diferença positiva significativa entre esses dois isolados.

Para algumas aplicações, de acordo com Jayani, Saxena e Gupta (2005), as preparações enzimáticas devem apresentar pequenas concentrações de PME, para evitar a clarificação do suco. Em sucos não clarificados, como o de laranja,

o congelamento do produto faz com que a enzima permaneça na sua forma inativa.

Para a indústria de alimentos são desejáveis microrganismos capazes de sintetizar altos níveis de PL, Exo-PG e Endo-PG e baixos níveis de PME (TARAGANO; PILOSO, 1999). De acordo com Martos et al. (2009), um extrato enzimático com alta atividade de PL e/ou PG é interessante por acelerar a despolimerização da molécula de pectina. Por outro lado, uma baixa atividade de PME é vantajosa para o processamento de sucos, pois o metanol liberado pela ação da PME pode prejudicar o teor de ésteres voláteis responsáveis pelo cheiro específico de frutas. O metanol também tem efeito tóxico ao organismo humano, principalmente sobre o sistema nervoso, incluindo nervos ópticos e retina (PEREIRA; ANDRADE, 1998). Além disso, segundo Lang e Dornenburg (2000), para o processamento de alguns alimentos instantâneos para bebês, é conveniente usar preparações comerciais com altos níveis de PG e teores reduzidos de PME, pois a enzima possibilita a maceração do produto sem alterar a cor, o aroma e as vitaminas.

Na Tabela 4, pode-se observar, estatisticamente, que houve diferença significativa nos tempos de 48, 96 e 168 horas, entre os isolados e o tempo de fermentação quanto à atividade enzimática na produção de pectina metilesterase, no substrato casca melosa. O isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130) diferiu dos demais isolados analisados, apresentando atividade enzimática de 90,67; 116,00 e 138,00 U/g, nos tempos de 48, 96 e 168 horas.

Tabela 4 Valores médios da atividade enzimática específica de pectina metilesterase (PME) (U/g) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas

Isolados	Tempo (horas)		
	48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033)	50,17 d A	38,83 d B	32,33 d B
<i>T. viride</i> (CMEC 00125)	74,17 b A*	58,00 c B	39,33 d C
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126)	56,33 d B	61,00 c B*	85,50 b A*
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127)	63,33 c B*	76,67 b A*	54,83 c B
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128)	77,50 b B*	83,67 b B*	91,67 b A*
<i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130)	90,67 a C*	116,00 a B*	138,00 a A*
<b>E. Comercial</b>	58,17		
CV (%) = 12,30			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott (P< 0,05)

\* Significativo, pelo teste de Dunnett (P<0,05), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

De acordo com o teste de Dunnett, a enzima comercial produziu uma atividade enzimática de 58,17 U/g, porém, a atividade enzimática dos isolados, de maneira geral, foi superior à da enzima comercial, no substrato casca melosa, com exceção dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033) e *C. cladosporioides* (CMEC 00126), no período de 48 horas; dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033) e *T. viride* (CMEC 00125), no período de 96 horas e dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125) e *C. cladosporioides* (CMEC 00127), no período de 168 horas.

O isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130) apresentou a maior atividade, tanto no substrato casca seca quanto no substrato casca melosa, correspondendo a 99,00 e 138,00 U/g, respectivamente.

De acordo com os dados da Tabela 5, pode-se observar que houve diferença significativa, entre os isolados, quanto à atividade enzimática de pectina liase (PL) e o tempo de fermentação. Observa-se que, entre os isolados, no período de 48 horas uma maior atividade enzimática foi obtida pelo isolado *P. roqueforti* (CMEC 00033), correspondendo a uma atividade enzimática de 270 U/g e pelo isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130), correspondendo a uma atividade enzimática de 205,50 U/g. No período de 96 horas, uma maior atividade foi produzida também pelo isolado *P. roqueforti* (CMEC 00033), correspondendo a uma atividade enzimática de 623,67 U/g e, no período de 168 horas, pelo isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128), correspondendo a uma atividade enzimática de 898,67 U/g. Embora esses isolados tenham apresentado os maiores valores de atividade enzimática, quando comparados com a atividade enzimática da enzima comercial (2.169,35 U/g), pode observar-se que o valor da enzima comercial foi significativamente maior do que a atividade enzimática dos isolados analisados. Pelo teste de Dunnett, não se observou diferença significativa positiva entre os isolados e a enzima comercial.

A produção e a purificação parcial de pectina metilesterase e poligalacturonase de *C. cladosporioides* isolados de grãos de café foram analisadas por Bastos et al. (2013).

Tabela 5 Valores médios da atividade enzimática específica de pectina liase – PL (U/g) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos: 48, 96 e 168 horas

Isolados	Tempo (horas)		
	48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033)	270,00 a B	623,67 a A	286,50 d B
<i>T. viride</i> (CMEC 00125)	166,83 b A	174,50 c A	142,67 e A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126)	129,33 b B	395,17 b A	365,33 c A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127)	121,50 b B	116,83 c B	263,00 d A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128)	66,33 b C	370,00 b B	898,67 a A
<i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130)	205,50 a C	320,67 b B	658,50 b A
<b>E. Comercial</b>	2.169,35		
CV (%) = 26,63			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott (P< 0,05)

\* Significativo, pelo teste de Dunnett (P<0,05), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

Pode-se observar, na Tabela 6, que não houve diferenças significativas entre os isolados, quanto à atividade enzimática de pectina liase (PL), no período de 48 horas. Diferença significativa foi encontrada pelos isolados quanto à atividade enzimática no período de 96 horas, tendo *P. roqueforti* (CMEC 00033) se destacado entre os demais isolados, com a maior atividade enzimática (418,67 U/g). No período de 168 horas, observa-se que houve diferença significativa entre o isolado *P. roqueforti* (CMEC 00033), correspondendo a uma atividade enzimática de 385,00 U/g e o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128), correspondendo a uma atividade enzimática de 370,17 U/g.

Tabela 6 Valores médios da atividade enzimática específica de Pectina liase – PL ( $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ ) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas

Isolados	Tempo (horas)		
	48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033)	167,67 a B	418,67 a A	385,00 a A
<i>T. viride</i> (CMEC 00125)	238,83 a A	199,00 c A	291,83 b A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126)	156,33 a A	238,50 b A	154,00 c A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127)	169,50 a B	134,67 c B	294,67 b A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128)	128,83 a B	286,00 b A	370,17 a A
<i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130)	188,67 a B	272,17 b A	289,83 b A
<b>E. Comercial</b>	2.169,35		
CV (%) = 26,63			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott ( $P < 0,05$ )

\* Significativo, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

Quanto ao melhor tempo de fermentação, observa-se que houve diferença significativa para o isolado *P. roqueforti* (CMEC 00033) nos tempos de 96 e 168 horas, observando-se produção da atividade enzimática de 481,67 e 385,00 U/g, respectivamente. Para os isolados *T. viride* (CMEC 00125) e *C. cladosporioides* (CMEC 00126), não houve diferença significativa quanto ao tempo de fermentação. Para o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00127), o melhor tempo de fermentação ocorreu no período de 168 horas, correspondendo a 294,67 U/g e, para os isolados *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), o melhor tempo de fermentação foi de 96 e 168 horas, respectivamente, porém, no tempo de 168 horas houve maior atividade enzimática quando comparado com o período de 96 horas.

Utilizando-se o substrato casca melosa, a atividade enzimática dos isolados analisados foram de forma semelhante à casca seca, constatou-se que os resultados foram inferiores aos obtidos pela enzima comercial, que correspondeu a 2.169,35 U/g. Não houve diferença significativa positiva pelo Teste de Dunnett.

O isolado *P. roqueforti* (CMEC 00033), no substrato casca melosa, obteve atividade enzimática de 418,67 U/g, resultado inferior ao obtido por Silva et al. (2002), que avaliaram a produção de pectinases por *P. viridicatum*, verificando que a atividade máxima da enzima pectina liase foi de 2.000 U.g<sup>-1</sup>, utilizando meio sólido contendo bagaço de laranja, quando avaliado isoladamente. Entretanto, uma mistura de substratos, sendo bagaço de laranja e farelo de trigo, elevou a atividade enzimática para 3.540 U.g<sup>-1</sup>.

A máxima atividade enzimática de pectina liase obtida por Maciel et al. (2011) foi de 40.615,62 U/g, utilizando a palma forrageira como substrato e o isolado *A. niger* URM4645, no período de 72 horas de fermentação em estado sólido, o que está de acordo com os resultados encontrados por Martins et al. (2002), na produção de pectinases termoestáveis em fermentação em estado sólido por *Thermoascus aurantiacus*. Os autores analisaram a produção de pectina liase (PL) usando bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono. A produção pectina liase foi observada após quatro dias de cultivo e o ponto máximo (40.180 U/g<sup>-1</sup>) ocorreu entre o 8º e o 10º dia, no meio composto de 10% de bagaço de cana-de-açúcar e 90% de bagaço de laranja. A máxima atividade enzimática das enzimas foi determinada em 65 °C, por 5 horas.

Estes resultados foram inferiores, quando comparados com os obtidos no presente trabalho, pois, utilizando o substrato casca seca, a maior atividade foi obtida pelo isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128), no período de fermentação de 168 horas, correspondendo a 898,67 U/g e, utilizando o substrato

casca melosa, o isolado *P. roqueforti* (CMEC 00033) apresentou atividade enzimática correspondendo a 418,67 U/g, no período de fermentação de 96 horas.

Pode-se observar, na Tabela 7, que, entre os isolados analisados quanto à atividade enzimática de exo-poligalacturonase, houve uma diferença significativa, nos períodos de 48, 96 e 168 horas. No período de 48 horas, o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00126) apresentou maior atividade, correspondendo a 0,71 U/g e, em seguida, pelo isolado *T. viride* (CMEC 00125) -0,69 U/g e o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00127), -0,65 U/g. No período de 96 horas também ocorreu diferença significativa entre os isolados analisados, tendo o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128) apresentado maior atividade enzimática, correspondendo a 0,98 U/g. No período de 168 horas também houve diferença significativa; o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00127) se destacou entre os demais (0,49 U/g) e, em seguida, o isolado *T. viride* (CMEC 00125), correspondendo ao valor de 0,32 U/g e o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128), correspondendo a 0,28 U/g. Pode-se também observar que houve um decréscimo da atividade enzimática no período de 168 horas, quando comparado com os demais resultados encontrados para a atividade de Exo-PG. Observa-se que houve diferença significativa, entre os três tempos analisados, para os isolados *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126) e *C. cladosporioides* (CMEC 00128).

Tabela 7 Valores médios da atividade enzimática específica de exopoligalacturonase (Exo-PG) (U/g) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos: 48, 96 e 168 horas

Isolados		Tempo (horas)		
		48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i>	(CMEC 00033)	0,25 b A	0,22 c A	0,12 b A
<i>T. viride</i>	(CMEC 00125)	0,69 a A*	0,55 b A*	0,32 a B
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00126)	0,71 a A*	0,69 b A*	0,04 b B
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00127)	0,65 a A*	0,28 c A	0,49 a A
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00128)	0,37 b B	0,98 a A*	0,28 a B
<i>R. stolonifer</i>	(CMEC 00130)	0,35 b A	0,20 c A	0,08 b A
<b>E. Comercial</b>			0,16	
CV (%) = 30,17				

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott (P< 0,05)

\* Significativo, pelo teste de Dunnett (P<0,05), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

Comparando-se a atividade enzimática dos isolados analisados com a enzima comercial pelo teste de Dunnett, pode-se observar que os resultados encontrados pelos isolados, de maneira geral, foram superiores ao da enzima comercial, com exceção de *P. roqueforti* (CMEC 00033), *C. cladosporioides* (CMEC 00126) e *R. stolonifer* CMEC 00130, correspondendo aos valores inferiores ao da enzima comercialm sendo 0,12; 0,04 e 0,08 U/g, respectivamente, no período de 168 horas. Também se pode constatar que houve diferença significativa positiva para o teste de Dunnett no substrato casca seca, nos períodos de 48 e 96 horas.

Resultados superiores da atividade enzimática para exopoligalacturonase foram encontrados por Díaz et al. (2012), quando utilizaram

*A. awamori* no substrato bagaço de laranja em processo estado sólido. Estes autores constataram máxima atividade correspondendo a 16,9 U/g, no período de 14 dias a 30 °C.

De acordo com os dados da Tabela 8, pode-se observar que houve diferença significativa entre os isolados e o tempo de fermentação. O isolado *T. viride* (CMEC 00125) obteve maior atividade enzimática, correspondendo a 1,68 U/g. Em seguida, *C. cladosporioides* (CMEC 00126), correspondendo a 1,54 U/g e *C. cladosporioides* (CMEC 00127) -1,50 U/g. No período de tempo de 96 horas, o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128) apresentou maior atividade enzimática entre todos os isolados e entre os três tempos analisados, correspondendo a 3,10 U/g. No período de 168 horas ocorreu diferença significativa entre *C. cladosporioides* (CMEC 00127) e *C. cladosporioides* (CMEC 00128), correspondendo às atividades enzimáticas de 2,64 e 2,36 U/g, respectivamente.

Tabela 8 Valores médios da atividade enzimática específica de Exopoligalacturonase (Exo-PG) (U/g) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas

Isolados	Tempo (horas)		
	48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033)	1,18 b A*	0,59 d B*	0,16 d C
<i>T. viride</i> (CMEC 00125)	1,68 a A*	1,21 c B*	0,69 b C*
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126)	1,54 a B*	2,08 b A*	0,57 b C*
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127)	1,50 a B*	0,93 c C*	2,64 a A*
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128)	0,99 b C*	3,10 a A*	2,36 a B*
<i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130)	1,40 a A*	0,57 d B*	0,50 c B
<b>E. Comercial</b>	0,16		
CV (%) = 30,17			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott (P< 0,05)

\* Significativo, pelo teste de Dunnett (P<0,05), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

Pelo teste de Dunnett, pode-se observar que houve diferença significativa positiva, entre os isolados analisados e a enzima comercial, pois vários isolados alcançaram resultados superiores ao da enzima comercial.

Um estudo sobre a produção de enzimas pectinolíticas em fermentação em estado sólido por quatro espécies de *Aspergillus* spp. foi realizado por Heerd et al. (2012), que observaram alta atividade enzimática do isolado *A. sojae* ATCC 20235, quando comparada com a das demais espécies analisadas. A atividade enzimática para Exo-PG correspondeu a 28,3 U/g em cinco dias de cultivo. Estes resultados, comparados com os obtidos no presente trabalho, foram superiores.

Resultados de atividade enzimática de exo-poligalacturonase (Exo-PG) ainda maiores foram encontrados por Martin, Silva e Gomes (2005), quando utilizaram o fungo *Moniella* sp. Estes autores obtiveram atividade enzimática de 84,8 U/g, utilizando a mistura de bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo na fermentação semissólida. Tais valores podem ser considerados superiores aos obtidos no presente trabalho, porém, existem variáveis a serem consideradas, como o tipo de fermentação, o substrato e o isolado. De acordo com Viswanathan e Jagadeesbadu (2008), a produção de pectinases por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, as quais podem estimular ou inibir a liberação de enzimas.

A atividade máxima de exo-poligalacturonase encontrada por Maciel et al. (2011), utilizando a palma forrageira como substrato e o isolado *A. niger* URM4645 em fermentação em estado sólido, correspondeu a 3.590 U/g, no período de 24 horas. Resultados aproximados foram encontrados neste trabalho com o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128) no substrato casca melosa, correspondendo a 3,10 U/g, porém, no período de 96 horas.

Pode-se observar, pelos dados da Tabela 9, que houve diferença significativa na atividade enzimática de endo-poligalacturonase (Endo-PG) entre os isolados e no tempo de fermentação. No período de tempo de 48 horas, uma maior atividade pode ser observada entre os isolados *R. stolonifer* (CMEC 00130), *P. roqueforti* (CMEC 00033) e *T. viride* (CMEC 00125), correspondendo aos valores 7.195,83; 7.095,83 e 6.777 U/g, respectivamente. No período de 96 horas, diferença significativa foi constatada para os isolados *T. viride* (CMEC 00125) e *P. roqueforti* (CMEC 00033), correspondendo aos valores 13.697,50 e 11.388 U/g, respectivamente. No período de 168 horas foram constatadas as maiores atividades de endo-poligalacturonase, mais uma vez pelos isolados *T. viride* (CMEC 00125) e *P. roqueforti* (CMEC 00033), correspondendo aos valores de 29.632,00 e 27.278,67 U/g, respectivamente.

Tabela 9 Valores médios de atividade enzimática específica de endopoligalacturonase (Endo-PG) (U/g) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca seca, em três tempos 48, 96 e 168 horas

Isolados	Tempo (horas)		
	48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033)	7.095,83 a C	11.388,00 a B	27.278,67 a A*
<i>T. viride</i> (CMEC 00125)	6.777,00 a C	13.697,50 a B	29.632,00 a A*
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126)	2.903,67 b B	7.367,17 b A	1.367,00 e B
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127)	3.212,50 b B	1.949,67 c B	9.918,83 c A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128)	1.693,00 b B	3.831,50 c B	15.424,17 b A
<i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130)	7.195,83 a A	2.791,50 c B	6.353,67 d A
<b>E. Comercial</b>	21.730,50		
CV (%) = 26,48			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott ( $P < 0,05$ )

\* Significativo, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

Houve diferença significativa entre os tempos de fermentação, tendo o tempo de 168 horas sido o melhor para todos os isolados, pois as maiores atividades enzimáticas foram constatadas, com exceção do isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00126), que foi no período de 96 horas e do isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130), para o qual o melhor tempo de fermentação ocorreu no período de 48 horas. Em geral, observa-se um tempo ótimo de cultivo específico para cada microrganismo, no qual se tem uma maior produção de pectinases. Após este intervalo de tempo, nota-se uma estabilização e/ou diminuição na atividade pectinolítica. Este declínio na atividade enzimática pode estar relacionado ao consumo de algum composto essencial, ao aparecimento de

um metabólito inibidor ou à própria desnaturação das enzimas já sintetizadas (BARNBY; MORPETH; PYLE, 1990).

Pelo teste de Dunnett, pode-se observar que houve diferença significativa positiva entre os isolados e a enzima comercial, tendo a atividade enzimática dos isolados analisados sido altamente superior à da enzima comercial, correspondendo aos isolados *T. viride* (CMEC 00125) e *P. roqueforti* (CMEC 00033), no período de 168 horas.

Na Tabela 10 pode-se observar que, no período de 48 horas, ocorreram diferenças significativa entre os isolados *T. viride* (CMEC 00125), *R. stolonifer* (CMEC 00130), *P. roqueforti* (CMEC 00033) e *C. cladosporium* (CMEC 00126), correspondendo aos valores de 7.261,67; 6.623,33; 5.975,83 e 5.660,17 U/g, respectivamente. No período de tempo de 96 horas, houve diferença significativa entre os isolados. O isolado *T. viride* (CMEC 00125) teve uma atividade enzimática de 18.591,50 U/g. No período de 168 horas houve diferença significativa entre o isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130) e o isolado *P. roqueforti* (CMEC 00033), que apresentaram atividades enzimáticas de 29.282,50 e 26.989,83 U/g, respectivamente. Houve diferença significativa entre os tempos de fermentação utilizados, com exceção do isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00126).

Tabela 10 Valores médios da atividade enzimática específica de endo-poligalacturonase (Endo-PG) (U/g) dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033), *T. viride* (CMEC 00125), *C. cladosporioides* (CMEC 00126), *C. cladosporioides* (CMEC 00127), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no substrato casca melosa, em três tempos: 48, 96 e 168 horas

Isolados	Tempo (horas)		
	48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i> (CMEC 00033)	5.975,83 a C	13.407,67 b B	26.989,83 a A*
<i>T. viride</i> (CMEC 00125)	7.261,67 a C	18.591,50 a B	21.891,17 b A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00126)	5.660,17 a A	3.900,17 c A	3.040,00 d A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00127)	2.578,67 b B	1.227,17 d B	14.955,17 c A
<i>C. cladosporioides</i> (CMEC 00128)	1.988,67 b B	389,00 d B	15.610,17 c A
<i>R. stolonifer</i> (CMEC 00130)	6.623,33 a B	5.213,17 c B	29.282,50 a A*
<b>E. Comercial</b>	21.730,50		
CV(%) = 26,48			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Scott- Knott ( $P < 0,05$ )

\* Significativo, pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ), quando comparado com a enzima comercial (tratamento adicional)

Pelo teste de Dunnett, pode-se observar que houve diferença significativa positiva entre os isolados *R. stolonifer* (CMEC 00130) e *P. roqueforti* (CMEC 00033). Pode-se relatar também que estes isolados obtiveram resultados superiores ao da enzima comercial.

O tempo de cultivo influencia o nível de produção das enzimas pectinolíticas, pois a produção enzimática está diretamente associada ao estado fisiológico em que o fungo se encontra e a quantidade de microrganismos presentes (THILAKAVATHI; BASAK; PANDA, 2007).

Os isolados *T. viride* (CMEC 00125) e *R. stolonifer* (CMEC 00130) obtiveram maiores atividades enzimáticas de endo-poligalacturonase, correspondendo a 29.632,00 e 29.282,50 U/g, nos substratos casca seca e casca

melosa, respectivamente. Estes resultados corroboram os de Heerd et al. (2012), pois valores próximos de atividade enzimática de endo-poligalacturonase foram encontrados (30,1 U/g), pelo isolado *A. sojae* ATCC 20235, em cinco dias de cultivo. Resultados superiores foram encontrados por Martins et al. (2002), na produção de pectinases termoestáveis em fermentação em estado sólido por *Thermoascus aurantiacus*. Estes autores avaliaram a produção de poligalacturonase (PG) usando bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono. A produção de poligalacturonase foi alcançada entre 2 e 4 dias de cultivo, por todos os meios testados, com máxima atividade (43 U/g<sup>-1</sup>), utilizando farelo de trigo e bagaço de laranja. Resultados ainda mais superiores foram encontrados por Maciel et al. (2011), correspondendo a 66,19 U/g, produzidos por *A. niger* URM4645 em 96 horas, utilizando como substrato palma forrageira em fermentação em estado sólido.

Porém, resultados inferiores de atividade enzimática, quando comparados com os do presente trabalho em relação à produção de poligalacturonase, foram relatados por Oliveira (2013), utilizando o resíduo agroindustrial de manga. A máxima atividade de produção (processo otimizado) foi de 7,66 U/g, obtida em 43 horas de fermentação na temperatura de 28,78 °C. Santos (2007) encontrou atividade enzimática de 16 U/g, utilizando pedúnculo de caju em 30 horas de fermentação e Alcântara (2008) encontrou atividade de 8,5 U/g, em 23 horas de fermentação, mas ambos usaram suplementação de nitrogênio.

As endo-poligalacturonases (Endo-PG) são de maior frequência, quando comparadas com a exo-poligalacturonases (Exo-PG), que ocorrem com menor frequência (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Esta informação pode ser observada nos dados obtidos do presente trabalho, pois a atividade de Exo-PG foi menor, em comparação com a atividade de Endo-PG.

#### 4.4 Quantificação dos resíduos após o processo fermentativo

Para o processo de fermentação em estado sólido, utilizaram-se 12,8 g de casca seca e 8,7 g de casca melosa. Após o período de fermentação, houve uma redução do resíduo. Podem-se observar estes valores nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 Quantificação do resíduo após o processo de fermentação em estado sólido no resíduo casca seca de café

Isolados		Tempo de fermentação – casca seca (%)		
		48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i>	(CMEC 00033)	19,14	15,86	21,02
<i>T. viride</i>	(CMEC 00125)	15,55	18,28	22,11
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00126)	18,75	15,31	18,91
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00127)	24,14	18,91	17,97
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00128)	21,88	16,41	18,67
<i>R. stolonifer</i>	(CMEC 00130)	16,56	15,78	15,00

No período de 48 horas, o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00127) reduziu em 24,14% o resíduo de café, em comparação com os demais isolados analisados. No período de 96 horas, o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00127) reduziu o resíduo de café seca em 18,91%. No período de 168 horas, o isolado *T. viride* (CMEC 00125) reduziu o resíduo de café em 22,11%.

Tabela 12 Quantificação do resíduo após o processo de fermentação em estado sólido no resíduo casca melosa de café

Isolados		Tempo de fermentação – casca melosa (%)		
		48h	96h	168h
<i>P. roqueforti</i>	(CMEC 00033)	46,21	38,28	41,61
<i>T. viride</i>	(CMEC 00125)	42,99	36,32	44,14
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00126)	45,52	34,94	33,91
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00127)	48,39	37,13	35,98
<i>C. cladosporioides</i>	(CMEC 00128)	47,13	33,10	34,49
<i>R. stolonifer</i>	(CMEC 00130)	48,05	43,56	45,17

Pode-se observar que houve uma redução significativa no resíduo do café casca melosa, quando comparado com o resíduo casca seca. No período de 48 horas, o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00127) apresentou maior redução 48,39%, quando comprado com os demais isolados analisados. No período de 96 e 168 horas, uma maior redução foi observada pelo isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130), correspondendo a 43,56% e 45,17%, respectivamente.

Sugere-se que as diferenças observadas quanto às porcentagens de redução dos resíduos podem ser atribuídas à composição química da casca melosa, sendo mais favorável como substrato para o desenvolvimento fúngico.

## 5 CONCLUSÕES

A partir da metodologia executada neste trabalho conclui-se que:

- a) as cascas de café seca e melosa, substratos abundantes nas regiões brasileiras, podem ser consideradas bons substratos e fontes para a produção de enzimas pectinolíticas;
- b) dos microrganismos testados quanto ao potencial para a produção de pectinases, os que apresentaram índices satisfatórios foram os isolados *C. cladosporioides* (CMEC 00128), 5,08; *C. cladosporioides* (CMEC 00127), 4,85; *C. cladosporioides* (CMEC 00126), 4,52; *T. viride* (CMEC 00125), 2,84; *P. roqueforti* (CMEC 00033), 2,42 e *R. stolonifer* (CMEC 00130), 2,10;
- c) os resultados obtidos na produção de enzimas pectinolíticas foram afetados pelas variáveis substrato, casca seca ou casca melosa do café, isolado e tempo de fermentação;
- d) o isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130) apresentou maior atividade enzimática de pectina metilesterase (138,00 U/g, 99,00 U/g) no substrato casca melosa e no substrato casca seca, no período de 168 horas, nas condições testadas;
- e) o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128) apresentou maior atividade enzimática de pectina liase (898,67 U/g) no substrato casca seca, no período de 168 horas, nas condições testadas;
- f) o isolado *P. roqueforti* (CMEC) 00033 apresentou maior atividade enzimática de pectina liase (418,67 U/g) no substrato casca melosa, no período de 96 horas, nas condições testadas;
- g) o isolado *C. cladosporioides* (CMEC 00128) apresentou maior atividade enzimática de exo-poligalacturonase (3,10 e 0,98 U/g) no

substrato casca melosa e no substrato casca seca, no período de 96 horas, nas condições testadas;

- h) o isolado *T. viride* (CMEC 00125) apresentou maior atividade enzimática de endo-poligalacturonase (29.632,00 U/g) no substrato casca seca, no período de 169 horas, nas condições testadas;
- i) o isolado *R. stolonifer* (CMEC 00130) apresentou maior atividade enzimática de endo-poligalacturonase (29.282,50 U/g) no substrato casca melosa, no período de 168 horas, nas condições testadas.

Quanto às atividades enzimáticas dos fungos analisados, quando comparadas com a atividade enzimática da enzima comercial, observaram-se:

- a) a atividade enzimática de pectina metilesterase (PME) para os isolados *R. stolonifer* (CMEC 00130), no período de 168 horas, foi de 99,00 U/g e, para *C. cladosporioides* (CMEC 126), no período de 48 horas, foi de 94,50 U/g e ambas foram maiores em relação à enzima comercial (58,17 U/g) no substrato casca seca nas condições testadas;
- b) a atividade enzimática de pectina metilesterase (PME) para os isolados *R. stolonifer* (CMEC 00130), *C. cladosporioides* (CMEC 00128), *T. viride* (CMEC 00125) e *C. cladosporioides* (CMEC 00127), no período de 48 horas; *R. stolonifer* (CMEC 00130), *C. cladosporioides* (CMEC 00128), *C. cladosporioides* (CMEC 00127) e *C. cladosporioides* (CMEC 00126), no período de 96 horas e os isolados *R. stolonifer* (CMEC 00130), *C. cladosporioides* (CMEC 00128) e *C. cladosporioides* (CMEC 00126) apresentaram maiores índices enzimáticos, frente à enzima comercial, no substrato casca melosa, nas condições testadas;

- c) a atividade enzimática de pectina liase (PL) da enzima comercial foi maior que a dos fungos analisados, tanto no substrato casca seca quanto no substrato casca melosa;
- d) a atividade enzimática de exo-poligalacturonase (Exo-PG) dos isolados analisados *C. cladosporioides* (CMEC 126 e CMEC 00127) e *T. viride* (CMEC 125), no período de 48 horas, dos isolados *C. cladosporioides* (CMEC 128 e CMEC 00126) e do isolado *T. viride* (CMEC 125), no período de 96 horas, foi maior quando comparada com a enzima comercial no substrato casca seca, nas condições testadas;
- e) a atividade enzimática específica de exo-poligalacturonase (Exo-PG) dos isolados analisados, com exceção dos isolados *P. roqueforti* (CMEC 00033) e *R. stolonifer* (CMEC 00130), no período de 168 horas, foi superior à da enzima comercial no substrato casca melosa, nas condições testadas;
- f) a atividade enzimática específica de endo-poligalacturonase (Endo-PG) dos isolados *T. viride* (CMEC 00125) e *P. roqueforti* (CMEC 00033) foi maior, quando comparada à da enzima comercial no substrato casca seca, nas condições testadas;
- g) - a atividade enzimática específica de endo-poligalacturonase (Endo-PG) dos isolados *R. stolonifer* (CMEC 00130) e *P. roqueforti* (CMEC 00033) foi superior à da enzima comercial no substrato casca melosa, nas condições testadas;
- h) a redução na quantidade do resíduo utilizado para o processo de fermentação em estado sólido variou de 15,00% a 24,14%, na casca seca e de 33,10% a 48,39%, na casca melosa.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. S.; SILVA, G. F.; NARAIN, N. Caracterização de resíduos de indústria de processamento de frutas visando a produção de pectinases por fermentação semi-sólida. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2007. 1 CD Rom.
- ALBINO, L. F. T.; SILVA, M. A. Valores nutritivos de alimentos para aves e suínos determinados no Brasil. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE AVES E SUÍNOS, 1996, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. p. 303-318.
- ALCÂNTARA, S. R. **Produção de pectinases por fermentação semi-sólida com bagaço do pedúnculo do caju:** influência da atividade de água e fonte de nitrogênio. 2008. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.
- ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 9, n. 2, p. 137-142, 2007.
- ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e às fases pré e pós-colheita:** relação com a bebida e local de cultivo. 1996. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ANDRADE, A. T. **Estudo da atividade de água na produção de amiloglicosidase fúngica utilizando resíduo do beneficiamento de arroz.** 1999. 62 f. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

ANTIER, P. et al. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, p. 254-260, Mar. 1993.

ANTRANIKIAN, G. Microbial degradation of starch. In: WINKELMANN, G. (Ed.). **Microbial degradation of natural products**. Weinheim: VCH, 1992. p. 27-51.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, N. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sept. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 11. ed. Arlington: AOAC, 2000.

BARNBY, F. M.; MORPETH, F. F.; PYLE, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. isolation, purification and partial characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 12, n. 11, p. 891-897, Nov. 1990.

BARON, A.; THIBAUT, J. F. Les enzymes pectolytiques. In: MOURANCHE, A.; COSTES, C. (Ed.). **Hydrolases et dépolimérases**. Paris: Gauthier-Villars, 1985. p. 143-164.

BARROS, S. T. D.; MENDES, E.; PERES, L. Influence of despectinization in the ultrafiltration of west indian cherry (*Malpighia glabra* L.) and pineapple (*Ananas comosus* (L. Meier) juices. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 194-200, abr./jun. 2004.

BASTOS, S. C. et al. Pectinases from a new strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres) de Vries isolated from Coffee bean. **World Journal of Agricultural Sciences**, Washington, v. 9, n. 2, p. 167-172, 2013.

BENEDETTI, A. C. E. P. **Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: produção e caracterização de xilanase**. 2009. 108 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BERKA, R. M. et al. The development of *Aspergillus niger* var. awamori as a host for the expression and secretion of heterologous gene products. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 19, p. 681–685, 1991.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 4, p. 330-334, Oct. 1962.

BLANDINO, A. et al. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellularpectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, London, v. 37, n. 5, p. 497-503, 2001.

BON, E. P. S. et al. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERREIRA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 463-488.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 7, n. 72, p. 248-254, May 1976.

BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. Composición de la pulpa de café y otros subproductos. In: ELIAS, L. G. **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP, 1978. p. 19-29.

BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 1-2, p. 27-133, 2000.

BRAND, D. et al. R Packed bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid state fermentation. **Biotechnology Progress**, New York, v. 17, n. 6, p. 1065-1070, 2001.

BRAND, D. et al. Relationship between coffee husk caffeine degradation and respiration of *Aspergillus sp.* In solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 102, n. 103, p. 169-178, 2002.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: ciência e tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p. 38-44, jul./set. 1999.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Aliceweb**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2013. Disponível em: <[www.mdic.gov.br](http://www.mdic.gov.br)>. Acesso: 16 maio 2013.

BRAVERMAN, J. B. S. **Introduction to the biochemistry of foods**. Amsterdam: Elsevier, 1963.

CAMARGO, L. A. et al. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus sp.* **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 153-156, abr./jun. 2005.

CARVALHO, E. A. et al. Extração e caracterização de pectinametilsterase (PME) de resíduos agroindustriais de abacaxi 'Pérola'. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2257-2266, nov./dez. 2012.

CASTILHO, L. R. **Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida**. 1997. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 71, n. 1, p. 45–50, Jan. 2000.

CHALFOUN, S. M. et al. Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 93-95, 2007.

CHEETHAM, P. S. J. The applications of enzymes in industry. In: WISEMAN, A. (Ed.). **Handbook of enzyme biotechnology**. 3. edn. Chichester: Prentice Hall, 1995. p. 419-541.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira Café Safra 2013: primeira estimativa. Brasília: CONAB, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 73, p. 190-197, 2006.

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 90-103, June 2006.

DAMÁSIO, A. R. de L. et al. Biotechnological potential of alternative carbon sources for production of pectinases by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 1, p. 141-148, jan./feb. 2011.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DEL CAÑIZO, A. N. et al. Fractionation of fungal pectic enzymes by immobilized metal ion affinity chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 64, n. 4, p. 527-531, 1994.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 6, p. 499-514, Oct. 2000.

DIAS, D. R. et al. Management and utilization of wastes from coffee processing. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Org.). **Cocoa and coffee fermentations**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis. Chap. 15.

DÍAZ, A. B. et al. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. **Food and Bioproducts Processing**. Rugby, v. 90, n. 1, p. 72-78, Jan. 2012.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAN, M. L. (Ed.). **Carbohydrates chemistry**: volume 1. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. Essex: Elsevier Science Publishers, 1992.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. p. 794-809.

DUNN-COLEMAN, N. S. et al. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 9, n. 10, p. 976-981, Oct. 1991.

DURAND, H.; CLANET, H.; TIRABY, G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 10, n. 6, p. 341–346, June 1988.

ELIAS, L. G. Chemical composition of coffee- Berry By- Productts. In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **Coffee pulp**: composition, technology and utilization. Ottawa: International Development Research Centre, 1979. p. 17–24.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

FAYYAZ, A. et al. Pectinesterase extraction from papaya. **Food Chemistry**, London, v. 47, n. 2, p. 183–195, 1993.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FERNÁNDEZ, D. E. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial**. 2009. 125 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Paraná.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para a análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Universidade de São Carlos, 2000. p. 255-258.

FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 53, n. 1, p. 148-170, Mar. 1989.

FOGARTY, W. M.; WARD, O. P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. **Process Biochemistry**, London, v. 6, n. 7, p. 13-17, 1972.

GAFFE, J.; TIZANDO, M. E.; HANDA, A. K. Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 114, n. 4, p. 1547-1556, Aug. 1997.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, p. 371-383, Oct. 1963.

GARCIA, D. M. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola**. 2004. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GONÇALVES, D. B. et al. Use of response surface methodology to optimize production of pectinases by recombinant *Penicillium griseoroseum* T20. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, London, v. 1, n. 2, p. 140-146, Apr. 2012.

GRAMINHA, E. B. N. et al. Review Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 1-22, 2008.

GREGORIO, A. de et al. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUMMADI, S. N.; KUMAR, S. Microbial pectin transeliminases. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 7, p. 451–458, Apr. 2005.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 7, p. 987-96, Feb. 2003.

HALABURGI, V. M. et al. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 5, p. 1146–1152, May 2011.

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, Essex, v. 58, p. 137-161, 1996.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. In: **BIOQUÍMICA das Fermentações**. [S.l: s.n], 1982.

HEERD, D. et al. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. In solid-state fermentation: a comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 90, n. 2, p. 102-110, Apr. 2012.

HÖLKER, U.; HÖLFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? **Current Opinion Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 301-306, June 2005.

HOONDAL, G. S. et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 4-5, p. 409-418, 2002.

HUBER, D. J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Reviews**, New York, v. 5, p. 169-219, 1983.

INDEX of /alimentos/bioquímica. Disponível em: <<http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**: volume 1. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

ISIL, S.; NILUFER, A. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 187-193, 2005.

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

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, p. 215-227, 2001.

KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, p. 239-243, 2004.

KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; UMESH-KUMAR, S. Potential application of pectinase in developing functional foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, Oxford, v. 4, p. 21-34, 2013.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JÚNIOR, A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial**: volume 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 493-522.

KIRK, P. **Index fungorum**. New York: CABI Bioscience, 2013. Disponível em: <[www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)>. Acesso em: 06 dez. 2013.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs**. Australia: CSIRO Division of Food Processing, 1988.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimento**: teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KRONBAUER, E.A.W. et al. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **CEPPA**, Paraná, v. 25, n. 2, p. 207-216, 2007.

KUBICEK, C. P. et al. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* : a case study on southeast Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 3, p. 310-319, Apr. 2002.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xilanases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 411-456, 1999.

KYRIAKIDIS, N. B. Use of pectinesterase for detection of hidrocolloids addition in natural orange juice. **Food Hydrocolloids**, New York, v. 19, n. 6, p. 497-500, 1999.

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

LEAL, S. C. M. **Detection and characterisation of *Metarhizium anisopliae* using molecular markers**. Nottingham: Universty of Nottingham, 1996.

LIMA, A. R. de S. **Produção de pectinases por *Aspergillus* e clarificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinesterases**. 2006. 57 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos: volume 3**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnology Tecchnics**, Washington, v. 13, n. 2, p. 149-154, Jan. 1999.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanas por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.

MACIEL, M. de H. C. et al. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, n. 13, p. 2469-2475, Mar. 2011.

MALDONADO, M. C.; NAVARRO, A.; CALLIERI, D. A. S. Production of pectinases by *Aspergillus* sp using differently pretreated lemon peel as carbon source. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 8, p. 501-504, 1986.

MALDONADO, M. C.; SAAD, A. M. S. de. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 20, p. 34-38, 1998.

MALLER, A. **Produção, purificação e caracterização do complexo pectinolítico do fungo *Aspergillus niveus***. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. da. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 693–702, 2004.

MARCHI, C. E. et al. Atividade pectinolítica de *Colletotrichum gloeosporioides* e a relação com a agressividade ao *Stylosanthes* spp. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 2, p. 423-433, 2009.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. de F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 345-352, 2006.

MARTIN, N.; SILVA, R. da; GOMES, E. **Estudo do tempo de cultivo na produção de pectinases por *Penicilium* sp. EGC5 e *Moniella* sp. 9SB em fermentação semi-sólida (FSS) de resíduos agrícolas**. São José do rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2005.

MARTÍNEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Essex, v. 8, p. 195-204, 2005.

MARTINS, E. S. et al. E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 949–954, 2002.

MARTINS, E. S. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através da fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MARTOS, M. A. et al. Production of pectinases by *A. niger*: influence of fermentation conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 3, p. 567-572, May/June 2009.

**MARTOS, M. A. et al. Production of pectinolytic enzymes by the yeast *Wickerhamomyces anomalus* isolated from citrus fruits peels.** Biotechnology Research International, **Argentina**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

MATIELLO, J. B. **O café: do cultivo ao consumo.** São Paulo: Globo, 1991.

MATOS, A. T. de. Tratamento de resíduos na Pós-Colheita do café. In: BORÉM, F. M. (Ed.). **Pós-colheita do café.** Lavras: UFLA, 2008. Cap. 6, p. 159- 201.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry: chemistry, biochemistry, molecular biology**, New York, v. 60, p. 551–565, 2002.

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, 1952.

MILAGRES, A. M. F. et al. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 11, p. 1387-1391, 2004.

MILL, P. J.; TUTTOBELLO, R. The pectic enzymes of *Aspergillus niger* 2 endopolygalacturonase. **Biochemistry Journal**, Columbus, v. 79, p. 57-64, 1961.

MOHAMED, S. A. et al. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 54–64, 2006.

MORANA, A. et al. Immobilization and characterization of a thermostable  $\beta$ -xylosidase to generate a reusable biocatalyst. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, p. 1205-1213. 2006.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes: a review. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 19, p. 355–361. 1998.

NIGAM, P. S. Production of bioactive secondary metabolites. In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilization. first ed.** Netherlands: Springer, 2009. p. 129–45.

NIGAM, P. S.; GUPTA, N.; ANTHWAL, A. Pre-treatment of agro-industrial residues. In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilization. first ed.** Netherlands: Springer, 2009. p. 13–33.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 6, p. 405-423, 1994.

NINAWA, S.; KUHAD, R. C. Use of xylan-rich cost effective agro-residues in the production of xylanase by *Streptomyces cyaneus* SN32. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 1141-1148, 2005.

OLIVEIRA S. L. **Avaliação da casca de café em rações para suínos em terminação.** 2001. 74 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, A. C. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera indica L.*).** 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

OLIVEIRA, T. O. de. **Identificação molecular e produção de pectinases por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres) de Vries**. 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, V. **Casca de café em rações isoenergéticas para suínos em crescimento e terminação (Digestibilidade e Desempenho)**. 1999. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, V. D. et al. Substituição do milho por casca de café em rações isoenergéticas para suínos em crescimento e terminação. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 424-436, mar./abr. 2001.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PANDA, T.; NAIDU, G. S. N.; SINHA, J. Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 1, p. 187–195, Oct. 1999.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 26, p. 355-361, 1991.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 69–80, 2000a.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, p. 153–162, 2000b.

PANDEY, A. et al. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.

PANDEY, A. et al. **Solid state fermentation in biotechnology**: fundamentals and applications. New Delhi: Asistech Publishers, 2001.

PANDEY, A. et al. **Solid state fermentation in biotechnology**: fundamentals and applications. New Delhi: Asistech Publishers, 2001.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, nesp., p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosic bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, New York, v. 41, p. 379-390, 1998.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New Delhi: Springer, 2008. p. 412-442.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I. Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1153–1169. 2000.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23–54, 1985.

PARRA, Â. R. P. et al. Utilização da casca de café na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 433-442, 2008.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 2054–2058, 2006.

PAULA, E. M. de. **Crescimento e caracterização de pectina liase de *Paenibacillus amylolyticus* isolado de frutos de café (*Coffea arabica* L.).** 2001. 58 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PELCZAR, M. J. et al. **Microbiologia, conceitos e aplicações:** volume 1. 2. ed. São Paulo: Makron books, 1996.

PELIZER, L. H.; PONTIELI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos com perspectiva de redução de impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, Santiago, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 744-754, nov./dez. 1998.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. de Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 112-1116, Nov./Dec. 2005.

PÉREZ-GUERRA, N. et al. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. **Electronic Journal Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, Vigo, v. 2, n. 3, p. 343-50, 2003.

PILNIK, W.; ROMBOOTS, F. M. Pectic enzymes. In: BIRCH, G. C.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K. J. (Ed.). **Enzymes and food processing**. London: Applied Science, 1981. p. 105-128.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo.** 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

PINTO, G. A. S. et al. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, n. 724, p. 17-20, 2006.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. Maryland: Aspen Publishers, 1999.

PSZCZOLA, D. E. From soybean to spaghetti: the broadening use of enzymes. **Food Technology**, Chicago, v. 55, n. 2, p. 54-64, 2001.

QUEIROZ, A. J. M.; VIDAL, J. R. M.; GASPARETTO, C. A. Armazenamento e processamento de produtos agrícolas: influência de diferentes teores de sólidos insolúveis suspensos nas características reológicas de sucos de abacaxi naturais e despectinizados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 75-79, jan./abr. 2000.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid-substrate fermentation. **Electronic Journal Biotechnology**, Chile, v. 1, n. 3, p. 1-15, Dec. 1998.

RAMOS, E. **Empresa desenvolve enzimas**. Jornal do Comércio, Pernambuco, jun. 2009. Disponível em: <[http://www.bioenzima.com.br/page\\_4.html](http://www.bioenzima.com.br/page_4.html)>. Acesso em: 16 maio 2012.

RESENDE, J. M. et al. Atividade de enzimas pectinametilsterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multiocular. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 206-212, 2004.

REZENDE, E. de F. et al. Potencial enzimático e toxigênico de fungos isolados de grãos de café. **Coffe Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 69-77, jan./mar. 2013.

ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 197-203, Mar. 2003.

ROJAS, J. B. U. et al. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1-4, p. 195-204, Aug. 2002.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Microbial enzymes and bioconversions**. London: Academic Press, 1980. Cap. 5, p. 227-72.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, p. 213-294, 1993.

SAMSON, R. A. List of names of trichocomaceae published between 1992 and 1999. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus***. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 73-79.

SAMSON, R. A. Taxonomy: current concepts of *Aspergillus* systematic. In: SMITH, J. E. (Ed.). **Biotechnology handbook 7 – *Aspergillus***. New York: Plenum Publishing Corporation, 1994. p. 1-18.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.

SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**: volume 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 351-362.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalium* utilizando resíduos agroindustriais**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pendúculo de caju como substrato**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 4-5, p. 426–435, Aug. 2002.

SCHWAN, R.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Feb. 1994.

SCUELLAR. File: parede celular.png. **Wikimedia Commons**, Svenska, June 2006. Disponível em: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pared\\_celular.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pared_celular.png)>. Acesso em: 15 abr. 2013.

SELLA S. R. et al. Bioindicator production with *Bacillus atrophaeus*' thermal-resistant spores cultivated by solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1019-1026, Apr. 2009.

SHARMA, A. et al. Microbial pectinases and their applications. In: KUHAD, R. C.; SINGH, A. (Ed.). **Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery**. New York: Springer, 2013. Cap. 7, p. 107-124.

SILVA, D. et al. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p.318-324, Oct./Dec. 2002.

SILVEIRA, F.Q.P. et al. Hydrolysis of xylans by enzyme systems from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 8, p. 947-952, 1999.

SINGHANIA, R. R.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid state fermentation process. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New Delhi: Springer, 2008. p. 412-442.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, Mar. 2003.

SOLIS-PEREYRA, S. et al. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 257-260, 1996.

SOUZA, M. C. O.; ROBERTO, I. C.; MILAGRES, A. M. F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 52, p. 768-772, 1999.

SOUZA, R. L. A. de et al. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo de maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 9, p. 987-992, set. 2010.

SOUZA, R. L. A. et al. Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba, **Anais...** Curitiba: UFPR, 2007. 1 CD Rom.

SPAGNA, G. et al. Pectinase immobilization on polyamides for application in the food processing industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 59, n. 4, p. 341-348, 1994.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 155 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 382-385, out./dez. 1998.

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 3-5, p. 411-419, Aug. 1999.

TASKIN, E. et al. Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 6, n. 3-4, p. 412-414, Sept. 2008.

TEIXEIRA, M. F. S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicos e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos**. 1994. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) –Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

TEN HAVE, A. et al. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. **Agricultural Applications the Mycota**, Berlin, v. 11, p. 341–358, 2002.

THAKUR, B. R.; SING, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin: a review. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 37, n. 1, p. 47-73, Feb. 1997.

THILAKAVATHI, M.; BASAK, T.; PANDA, T. Modeling of enzyme production kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, n. 5, p. 991-1007, Jan. 2007.

UMA, C. et al. Production and properties of invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SmF using pomegranate peel waste as substrate. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. S605-S611. Feb. 2012.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 388-394, jan. 2007.

VALLE, R. H. P. et al. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 135-140, abr./jun. 2001.

VILELA, F. G. et al. Uso da casca de café melosa em diferentes níveis na alimentação de novilhos confinados. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 198-205, jan./fev. 2001.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. et al. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 157-167, Mar. 2003.

VISWANATHAN, R.; JAGADEESHBABU, P. E. Studies on the production of pectinase from tamarind kernel powder by submerged fermentation using *Aspergillus* species and optimization of medium using design expert. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Lausanne, v. 22, n. 4, p. 481-489, Aug. 2008.

VORAGEN, A. et al. Effect of juice-releasing enzymes on juice quality. In: INTERNATIONAL FRUIT JUICE SYMPOSIUM JURIS DURCK VERLAG, 1986, Zurich. **Annals...** Zurich: Food Chemistry and Microbiology, 1986. p. 453-462.

VRIES, R. P. et al. Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 530, n. 1-3, p. 41-47, Oct. 2002.

VRIES, R. P. de; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 65, n. 4, p. 497-522, Dec. 2001.

WAITES, M. J. et al. **Industrial Microbiology: an Introduction**. Ayrington: Marston Book, 2001.

WEINGARTNER, V. **Produção, purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *Aspergillus niger***. Dissertação. 2010. 161 f. Dissertação (Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Paraná.

WILLATS, W. G. T. et al. Pectin: cell biology for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1-2, p. 9-27, Sept. 2001.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, p. 97-104, 2006.

WILSON, L. S. **Biochemical and molecular characterization of *Trichoderma spp.*** 1996. 67 f. Thesis (PhD) - University of Auckland, Auckland.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 8, p. 825-830, Mar. 2000.

ZHONG-TAO, S. et al. Bioconversion of apple pomace into a multienzyme bio-feed by two mixed strains of *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 12, n. 1, p. 1-13, Jan. 2009.