



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS-UFGD  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIODIVERSIDADE E  
MEIO AMBIENTE - PPGBMA**

**THAYNÁ CARDOSO VIDEIRA**

**PRODUÇÃO DE PECTINASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO  
*Pycnoporus sanguineus* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E MEIO AMBIENTE**

**DOURADOS-MS  
2021**

**THAYNÁ CARDOSO VIDEIRA**

**PRODUÇÃO DE PECTINASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO  
*Pycnopus sanguineus* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**ORIENTADOR: DR. RODRIGO SIMÕES  
RIBEIRO LEITE.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD, para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Meio Ambiente, junto ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biodiversidade e Meio Ambiente, área de concentração “*Conservação dos Recursos Naturais*”.**

**DOURADOS – MS  
2021**

*“Os sonhos não determinam o lugar onde iremos chegar, mas produzem a força necessária para tirar-nos do lugar em que estamos.”*

Augusto Cury

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil**

V652p Videira, Thayná Cardoso.  
Produção de pectinases por cultivo em estado sólido do fungo *Pycnoporus sanguineus* em resíduos agroindustriais – Dourados-MS : UFGD, 2021.

Orientador: Prof. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.  
Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Fungos. 2. *Pycnoporus sanguineus*. 3. Resíduos agroindustriais. I. Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. II. Título.

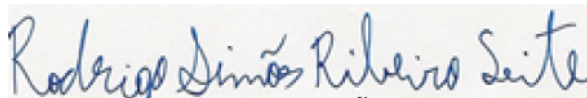
CDD: 589.2

“PRODUÇÃO DE PECTINASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO  
*Pycnoporus sanguineus* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS”

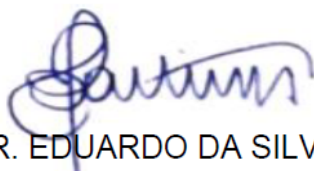
POR

**THAYNÁ CARDOSO VIDEIRA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIODIVERSIDADE E MEIO AMBIENTE -  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: “CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS NATURAIS”.



PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE  
ORIENTADOR – UFGD



PROF. DR. EDUARDO DA SILVA MARTINS  
MEMBRO TITULAR – UEMG



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> GABRIELA FINOTO CAVALHEIRO  
MEMBRO TITULAR – UEMS

Aprovada em 16 de setembro de 2021.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, que não foram poucas, mas agradeço por ter conseguido lutar até alcançar esta grande meta na minha vida.

Agradeço a minha mãe, Shirley, que me deu todo apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo, cansaço e sempre acreditou que eu seria capaz de alcançar os meus sonhos. E também por entender o motivo de estar longe neste momento. E ao meu padrasto por ter me incentivado a nunca desistir do que eu quero e também não deixar ninguém me desaminar.

Agradeço a minha amada, Nayara, por compreender os momentos em que me estressei demais ou que dei atenção de menos, por não me deixar desistir dos meus sonhos, por me ajudar em todos os momentos.

Aos meus irmãos, as minhas cunhadas e aos meus sobrinhos por entenderem as minhas razões de não estar presente em alguns momentos importantes, por me animarem todos os dias em que conversamos por demonstrarem amor e admiração por mim e com isso me dando energia para continuar seguindo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, pela paciência, dedicação e pelo tempo que ofertou a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. Dedico aqui a minha admiração e gratidão pelo seu tempo dedicado à minha formação.

Aos meus colegas de laboratório em especial a Gabriela e Geisa pelo apoio prestado durante todo o meu mestrado, tornando o a pesquisa mais agradável e me ajudando nas dificuldades.

Aos membros da banca examinadora Dr. Marcelo Fossa Paz e a Dr. Gabriela Finoto Cavalheiro pela disponibilidade e sugestões apresentadas ao trabalho.

A UFGD pelo ambiente propício à evolução e crescimento, bem como a todas as pessoas que a tornam assim tão especial para quem a conhece.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente pela oportunidade e aos docentes por compartilhar seus conhecimentos e experiências.

Ao Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos pelos momentos de trabalho, ensinamentos, companheirismo e descontração proporcionados.

À CAPES, pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha vida até este momento.

**RESUMO:** As pectinases são amplamente aplicadas nas indústrias de polpas, sucos e bebidas. A pectina é um polissacarídeo vegetal capaz de gelificar e contribuir para o aumento da viscosidade de soluções aquosas. Esse polissacarídeo é abundante em frutas, como: maçã, laranja, maracujá, uva, mamão, entre outras. As enzimas pectinolíticas reduzem o grau de polimerização da pectina, dessa forma, favorecem a redução da viscosidade e conseqüentemente contribuem nos processos industriais de clarificação, filtração e no bombeamento de sucos e bebidas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes parâmetros de cultivo em estado sólido, para produção de pectinases pelo fungo filamentosso *Pycnoporus sanguineus*. A espécie fúngica selecionada para o trabalho foi cultivada em diferentes resíduos agroindustriais (bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, casca de arroz e palha de milho). Outros parâmetros que influenciam a produção enzimática foram avaliados, como: unidade inicial, temperatura e tempo de cultivo. A maior produção de pectinase, 715,5 U/g de substrato seco, foi obtida nos cultivos em farelo de trigo, contendo inicialmente 65% de umidade, mantidos a 35°C por 96 horas. O extrato enzimático obtido em condições de cultivo otimizadas apresentou atividade de xilanase (16,44 U/g de substrato), endoglucanase (115,82 U/g de substrato) e  $\beta$ -glicosidase (33,6 U/g de substrato). A considerável produção de pectinases e celulases pelo fungo *P. sanguineus* estimula o emprego desse microrganismo e seus biocatalisadores em processos de conversão de biomassa vegetal.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pycnoporus sanguineus*, cultivo em estado sólido, basidiomicetos.

**ABSTRACT:** Pectinases are widely applied in the pulp, juice, and beverage industries. Pectin is a vegetable polysaccharide, which is capable of gelling and contributing to increasing the viscosity of aqueous solutions. This polysaccharide is abundant in fruits, such as apple, orange, passion fruit, grape, papaya, among others. Pectinolytic enzymes reduce the degree of polymerization of pectin, consequently favoring a reduction in viscosity and consequently contributing to industrial processes of clarification, filtration, and pumping of juices and beverages. This study aimed to evaluate different solid-state cultivation parameters for pectinase production by the filamentous fungus *Pycnoporus sanguineus*. The fungal species selected for this study were cultivated in different agro-industrial residues (sugarcane bagasse, wheat bran, rice husk, and corn straw). Other parameters such as initial unit, temperature, and cultivation time, which influence enzyme production, were also evaluated. The highest pectinase production (715.5 U/g) of the dry substrate was obtained in wheat bran cultures, initially containing 65% moisture and kept at 35°C for 96 hours. The enzyme extract obtained under optimized cultivation conditions showed xylanase (16.44 U/g substrate), endoglucanase (115.82 U/g substrate), and  $\beta$ -

glucosidase (33.6 U/g substrate) activity. The significant production of pectinases and cellulases by the fungus *P. sanguineus* encourages the use of this microorganism and its biocatalyst roles in plant biomass conversion processes.

**KEYWORDS:** *Pycnoporus sanguineus*, solid state culture, basidiomycetes.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Estrutura química da cadeia de pectina. (BRANDÃO; ANDRADE, 1999).<br>.....   | 9  |
| <b>Figura 2</b> - Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina. (DIANO <i>et al.</i> 2008). .....   | 10 |
| <b>Figura 3</b> – Fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> . (RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE).<br>.....  | 14 |
| <b>Figura 4</b> – Cultivo do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes substratos.....  | 23 |
| <b>Figura 5</b> – Cultivo do fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> com variações de umidade inicial de 50% a 80%. .....   | 24 |
| <b>Figura 6</b> – Produção de pectinase pelo fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em diferentes temperaturas. ....   | 25 |
| <b>Figura 7</b> – Produção de pectinase pelo fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i> em função do tempo de cultivo. ....  | 26 |
| <b>TABELA 1</b> – Comparativo da produção de pectinase por <i>Pycnoporus sanguineus</i> com trabalhos previamente publicados. ....   | 27 |
| <b>TABELA 2</b> – Potencial catalítico do extrato enzimático produzido por <i>Pycnoporus sanguineus</i> sob cultivo em condições otimizadas para produção de pectinase. .... | 28 |

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....        | 10 |
| 2. OBJETIVOS.....                | 10 |
| 2.1. Objetivo geral .....        | 10 |
| 2.2. Objetivos específicos ..... | 11 |

### CAPÍTULO II

|  |    |
|--|----|
| 1. REVISÃO DE LITERATURA .....                                 | 12 |
| 1.1. Estrutura da pectina. ....                                | 12 |
| 1.2. Enzimas pectinolíticas. ....                              | 13 |
| 1.3. Mercado e aplicações. ....                                | 14 |
| 1.4. Resíduos agroindustriais e cultivo em estado sólido. .... | 14 |
| 1.5. <i>Pycnoporus sanguineus</i> . ....                       | 17 |
| 2. REFERÊNCIAS .....   | 18 |

### CAPÍTULO II

#### PRODUÇÃO DE PECTINASE POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO EM *Pycnoporus sanguineus* RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....  | 22 |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 22 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 24 |
| 2.1. Microrganismo. ....  | 24 |
| 2.2. Inóculo. ....  | 25 |
| 2.3. Produção de pectinase por cultivo em estado sólido (CES). ....     | 25 |
| 2.4. Extração das enzimas. ....   | 25 |
| 2.5. Determinação da atividade de pectinase. ....                       | 25 |
| 2.6. Potencial catalítico do extrato enzimático. ....                   | 26 |
| 2.7. Análise estatística. ....  | 26 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 26 |
| 3.1. Avaliação dos parâmetros de cultivo para produção de enzimas. .... | 26 |
| 3.2. Potencial catalítico do extrato enzimático. ....                   | 31 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 32 |
| 6. REFERÊNCIAS. ....  | 32 |

## **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

A pectina é um tipo de fibra que pode ser encontrada entre a lamela média e primária da parede celular vegetal, tendo como sua principal função conferir adesão, retenção de sabor e aroma. Além disso, a pectina possui a capacidade de gelificar, e essa é uma das características de grande importância para indústria de processamento de alimentos, podendo ser aplicada como geleificante, espessantes, emulsificante ou estabilizante. No entanto, essa propriedade muitas vezes dificulta o processamento industrial de sucos e bebidas, ocasionando o aumento da viscosidade desses produtos, o que dificulta os processos de clarificação e filtração.

As enzimas pectinolíticas reduzem drasticamente o grau de polimerização da pectina e consequentemente contribuem para redução da viscosidade de sucos, polpas e bebidas, o que favorece o processamento industrial desses produtos.

Apesar das potencialidades dessas enzimas, alguns problemas como a baixa estabilidade enzimática estrutural e o elevado custo de produção, dificultam o emprego desses biocatalisadores em ampla escala, estimulando a busca por microrganismos com potencial para produção enzimática em meios de cultivo de baixo valor agregado.

O cultivo em estado sólido de fungos filamentosos utilizando resíduos agroindustriais como substratos, tem sido uma alternativa funcional para transpor os problemas mencionados.

Cultivos preliminares realizados pela equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos – LEPFER/FCBA/UFGD, demonstraram considerável potencial para produção de pectinases pelo fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus*, utilizando resíduos agroindustriais como substratos. Esses resultados estimularam o desenvolvimento do presente trabalho, tendo como principal objetivo otimizar o cultivo desse microrganismo para produção de enzimas pectinolíticas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Produzir pectinases a partir do cultivo em estado sólido do fungo *Pycnoporus sanguineus* em resíduos agroindustriais.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de pectinases por *P. sanguineus* em diferentes resíduos agroindustriais;

- Avaliar o efeito da umidade na produção de pectinases por *P. sanguineus*;
- Avaliar o efeito da temperatura de cultivo na produção de pectinases por *P. sanguineus*;
- Avaliar o efeito do tempo de cultivo na produção de pectinases por *P. sanguineus*;
- Avaliar o potencial catalítico do extrato enzimático produzido por *P. sanguineus*.

## **CAPÍTULO II**

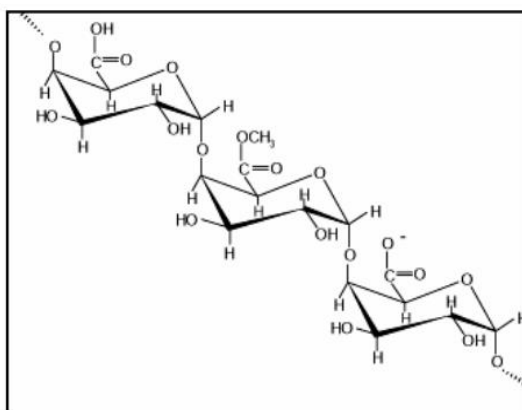
# 1. REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1. Estrutura da pectina

A pectina é um carboidrato solúvel que se encontra nas paredes celulares e nos tecidos intercelulares das plantas. A pectina é muito conhecida pela sua presença nas frutas (CANTERI, *et al.*, 2012) e nas mesmas ela possui função de manter as paredes celulares juntas (UENOJO; PASTORE, 2007).

A estrutura química da pectina consiste em uma cadeia principal linear com unidades repetidas de ácido D-galacturônico covalentemente unidas por ligações  $\alpha$ -(1,4), onde os grupos carboxila podem ser esterificados com metil em extensões diferentes (Figura 1) (BRANDÃO; ANDRADE, 1999). Esta cadeia principal pode ser ramificada por unidades de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. (YAPO *et al.*, 2007).

**Figura 1-** Estrutura química da cadeia de pectina.



Fonte: BRANDÃO; ANDRADE, 1999.

As substâncias pécicas podem ser classificadas de acordo com o seu grau de metoxilação, podendo ter alto grau de metoxilação ( $> 50\%$ ) ou baixo grau de metoxilação ( $< 50\%$ ). Comercialmente, os níveis de pectina com alto grau de metoxilação estão no teor de 55 a 75%, enquanto na pectina com baixo grau de metoxilação, variam na faixa de 15 a 45% (UENOJO; PASTORE, 2007).

As pectinas com alto teor de metoxilação possuem considerável capacidade de gelificação e são amplamente utilizadas na extração de sucos de frutas para obtenção de geleias (VORAGEN *et al.*, 1995). A presença de cadeias laterais, principalmente unidades de arabinose e galactose, além de propiciar agregação em soluções concentradas, também afeta

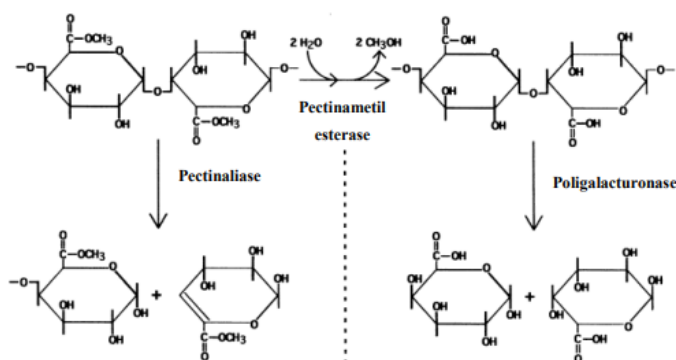
significativamente as propriedades funcionais da pectina, como solubilidade, gelificação e propriedades filmogênicas (BRAVERMAN; BERK, 1976).

A combinação de pectina com a celulose e hemicelulose por ligações covalentes dá origem a protopectina, que é encontrada em frutas verdes, uma substância insolúvel que se transforma em pectina à medida que amadurece e se torna solúvel em água (PENNA, 2002). Durante o amadurecimento da fruta a pectina contribui com a manutenção de sua firmeza e forma (MESBAHI; JAMALIAN e FARAHNAKY, 2005). Quando a fruta fica muito madura, a pectina contida nela é quebrada em açúcares simples, que são completamente solúveis em água. Como resultado, a fruta fica macia e começa a perder sua forma (CANTERI, 2012).

## 1.2. Enzimas pectinolíticas

As pectinases são classificadas conforme o seu mecanismo de ação e reação que catalisam (UENOJO; PASTORE, 2007). Os mecanismos de ação das pectinases sobre as moléculas de pectina estão representados na figura 2.

**Figura 2-** Modo de ação enzimática das pectinases em uma molécula de pectina.



Fonte: DIANO *et al.*, (2008).

As enzimas pectinolíticas são divididas basicamente em três tipos: pectina liases (ou transeliminases); as poligalacturonases e as pectinaesterases (DIANO *et al.*, 2008). As pectinas liases são enzimas que rompem as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácidos D-galacturônicos por meio da trans-eliminação de hidrogênio dos carbonos 4 e 5 do ácido D-galacturônico (Figura 2), obtendo um produto insaturado de 4 e 5 – ácido galacturônico (JAYANI; SAXENA e GUPTA, 2005; BUSTO *et al.*, 2006).

A poligalacturonase estimula a clivagem hidrolítica da cadeia de ácido poligalacturônico com a incorporação de uma molécula de água por meio das pontes de hidrogênio (Figura 2)



(DIANO *et al.*, 2008). A pectinesterase é responsável pela desesterificação da pectina (Figura 2), produzindo um polissacarídeo que posteriormente pode ser hidrolisado pela poligalacturonase (KASHYAP *et al.*, 2001; UENOJO; PASTORE, 2007). A síntese das enzimas pectinolíticas é influenciada por componentes do meio de cultura, em particular a fonte de carbono (presença de indutores: pectinas e derivados) e as condições de cultivo como pH, temperatura, umidade, aeração, agitação e tempo de incubação (UENOJO; PASTORE, 2007).

### **1.3. Mercado e aplicação das pectinases**

A pectina é responsável pela consistência, turbidez e aparência dos sucos de frutas assim, sua presença pode causar um aumento significativo na viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, *et al.*, 2004).

Desta forma, a utilização de enzima pectinolítica é extremamente importante em processos industriais que envolvem a produção de sucos e bebidas, pois é responsável pela hidrólise enzimática da pectina, contribuindo com o processamento de sucos e polpas de frutas (CHAICOUSKI; SILVA e CANTERI, 2016).

A adição de enzimas pectinolíticas nos purês de frutas e vegetais causa a degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular (GREGORIO, *et al.*, 2002), o que resulta na redução da viscosidade e no aumento do rendimento do suco, contribuindo para a aparência cristalina no produto final e na redução do tempo filtração (JAYANI; SAXENA e GUPTA, 2005, FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, *et al.*, 2004; SOUZA, *et al.*, 2003).

### **1.4. Resíduos agroindustriais e cultivo em estado sólido**

O aumento na produção de alimentos tem influenciado diretamente a produção de resíduos agroindustriais. Ainda que no passado esses resíduos fossem vistos principalmente como um grande problema, no cenário atual estes resíduos vêm sendo uma saída para o desenvolvimento de processos industriais sustentáveis (FREITAS *et al.*, 2021).

Os resíduos agroindustriais contêm materiais lignocelulósicos que podem ser utilizados como substratos em cultivo em estado sólido (CES) de diversos microrganismos, como fungos e bactérias (SÁNCHEZ, 2009), podendo ser utilizados como meios alternativos para o crescimento e produção de enzimas industriais (SIQUEIRA, *et al.*, 2010). Os resíduos agroindustriais possuem alta disponibilidade, são biodegradáveis e ricos em nutrientes para cultivo microbiano (GASSARA, *et al.*, 2010). Consequentemente, a utilização destes materiais além proporcionar a

redução dos custos da produção enzimática, também favorece a redução dos impactos ambientais ocasionados pelo descarte e/ou manejo inadequados (SADH; DUHAN e DUHAN, 2018).

Segundo Pandey (2003) o CES é um processo que ocorre próximo à ausência água livre entre as partículas do substrato, utilizando um meio de cultivo sólido. A quantidade de água que está presente no meio se encontra-se complexada ou incorporada na matriz sólida (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO, 2001). Neste processo a água se torna fator limitante, o que não ocorre no cultivo submerso, onde existe a abundância de meio aquoso (PANDEY, 2003).

Os CES são caracterizados por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de solutos, uma vez que para alcançar a homogeneidade seria necessária agitação excessiva, o que pode acarretar na ruptura celular (GERVAIS; MOLIN, 2003).

Generalizar vantagens entre aos processos submersos, ou em estado sólido, é algo singular, pois se sabe que os microrganismos podem se adaptar a ambos os processos, assim como resultar em complexos enzimáticos distintos. Para Pandey, Soccol, Leon (2001) a tecnologia do cultivo em estado sólido não deveria ser vista como uma técnica que substitua o cultivo submerso, pois cada uma delas possui suas potencialidades e singularidades.

A seguir são citadas algumas características do CES, quando comparado ao cultivo submerso (SANTOS, 2007).

- Baixo risco de contaminação bacteriana, devido à umidade reduzida do meio.
- Preparo do meio de cultivo é simples, pois se necessita geralmente apenas do substrato e água para umidificar.
- Viabilidade do uso de resíduos abundantes e de baixo custo como matéria-prima, especialmente no Brasil.
- O crescimento celular ocorre normalmente em condições próximas aos dos habitats naturais de fungos filamentosos.
- O meio possui alta heterogeneidade e os microrganismos não possuem acesso total ao substrato.
- Maior concentração e rendimento do produto desejado.
- Baixo consumo de água.

Por outro lado, este tipo de cultivo apresenta algumas limitações a serem consideradas, como por exemplo:

- A dificuldade de dispersão do calor gerado pelo metabolismo microbiano.

- A dificuldade no controle do crescimento celular e dos parâmetros de cultivo (temperatura, pH, agitação, aeração, concentração de nutrientes e produtos), tornando complexo o controle e a automação do processo devido a heterogeneidade.

As condições de cultivo como temperatura, pH, atividade da água, concentração de oxigênio, nutrientes e produtos podem afetar consideravelmente o desenvolvimento celular e a produção enzimática. Favela-Torres *et al.*, (1998) relataram que todos os processos de cultivo em estado sólido, possuem necessariamente as seguintes etapas:

- Seleção cuidadosa do substrato;
- Escolha do microrganismo específico;
- Controle dos parâmetros do cultivo;
- Purificação dos produtos.

Os meios de cultura devem conter nutrientes primordiais ao crescimento do organismo em questão, de maneira assimilável e em concentração ideal para não inibir o crescimento (SANTOS, 2007).

Com relação aos nutrientes importantes para o CES, é possível considerar o carbono e nitrogênio como elementos dominantes, visto que estão intimamente ligados à produção de biomassa e metabólitos. A relação carbono e nitrogênio é um fator importante para a maioria dos fungos. A limitação do nitrogênio pode minimizar o crescimento, porém favorece a produção das substâncias bioativas (CASAS LÓPEZ *et al.*, 2003).

A umidade indica a concentração de água em um determinado material, geralmente expressa em porcentagem. A umidade nos processos do CES geralmente é variável (entre 30 e 85%) e a porcentagem ótima para o cultivo de determinado microrganismo depende da capacidade do substrato em reter água. Sendo assim, este parâmetro determina a quantidade de água que está livre no meio e que pode ser facilmente usufruída pelos microrganismos, afetando o crescimento, processos bioquímicos e enzimáticos (DEL BIANCHI; MORAES e CAPALBO, 2001).

A temperatura é outro fator que afeta o crescimento e a formação do produto. Em processos de CES, devido ao acúmulo de calor metabólico gerado, a temperatura é um fator crítico, pois a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que acarreta em um gradiente de temperatura (PINTO, 2006).

O tempo de incubação é outro parâmetro a ser considerado, sendo diretamente influenciado pelas condições de cultivo e particularidades do crescimento do fungo (JONATHAN; FASIDI e AJAYI, 2004). Dessa forma, as diferenças existentes na diversidade microbiana, refletem nas

particularidades do processo de cultivo de cada espécie e o conhecimento desses aspectos pode potencializar a produção da molécula de interesse (KIM, *et al.*, 2002).

### 1.5. *Pycnoporus sanguineus*

O fungo *P. sanguineus* pertence ao grupo dos basidiomicetos do gênero *Pycnoporus* (gênero de fungos conhecido por serem decompositores de madeira), e da ordem Polyporales (PUTZKE; PUTZKE, 2004). O grupo dos basidiomicetos compreende os fungos produtores de esporos, os basidiósporos, de origem sexuada com estrutura de basidioma (corpo de frutificação) e são popularmente chamados de cogumelos ou orelhas de pau (QUEVEDO, *et al.*, 2012).

O fungo *P. sanguineus* possui o seu basidioma semicircular e se distribui horizontalmente nos caules das árvores, sua superfície é lisa e levemente zonada de modo concêntrico com dimensões variáveis (NOBLES; FREW, 1962). O *P. sanguineus* é distinguido das demais espécies de fungos encontradas por meio de seu basidioma de coloração avermelhada (figura 3) (NOBLES; FREW, 1962).

**Figura 3:** Fungo *P. sanguineus*.



Fonte: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

Esse microrganismo pode ser encontrado em locais degradados, sobre troncos caídos ou queimados e em clareiras de florestas, propondo uma possível adaptação a ambientes menos úmidos ou com temperaturas altas (HERRERA; ULLOA, 1998).

Este fungo vem sendo objeto de várias pesquisas com diferentes finalidades além da produção enzimática, como por exemplo: produção de anti-inflamatório (JOURDA, *et al.*, 2018), uso como biorremediador (FENG, *et al.*, 2021), produção de etanol de segunda geração

(GONZÁLEZ-BAUTISTA, *et al.*, 2019) e na biossorção de metais pesados (YAHAYA; MASHITAH; BHATIA, 2008).

## 2. REFERÊNCIAS

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*, v.9(3), p.40-44, 1999.

BRAVERMAN, J.B.S., BERK, Z. Braverman's Introduction to the Biochemistry of Foods, *Elsevier*, 1976.

BUSTO, M.D., García-Tramontín, K.E., Ortega, N., Perez-Mateos, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. *Bioresource Technology*, v.97, p.1477-1483, 2006.

CANTERI, M.H.G., MORENO, L., WOSIACKI, G., SCHEER, A.P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros*, v.22(2), p.149-157, 2012.

CASAS LÓPEZ, J.L., SÁNCHEZ PÉREZ, J.A., FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M., ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G., MOLINA GRIMA, E., CHISTI, Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: Effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p. 270–277, 2003.

CHAICOUSKI, A., SILVA, M., CANTERI, M. H. G.; Estudo da atividade da enzima pectinametilesterase obtida a partir do albedo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), fresco e liofilizado, em diferentes graus de maturação. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v.10, n.1; p.2026- 2038, 2016.

DIANO, N., GRIMALDI, T., BIANCO, M., ROSSI, S. Apple juice clarification by immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56), 11471-11477, 2008.

DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. Biotecnologia industrial: Fermentação em estado sólido. São Paulo: Ed. *Edgard Blücher*, v.2, 2001

FENG, M., ZHOU, J., YU, X., WANG, H., GUO, Y., MAO, W. Bioremediation of triphenyl phosphate by *Pycnoporus sanguineus*: Metabolic pathway, proteomic mechanism and biotoxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, v.417, 2021.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., ÚBEDA, J.F., VASUDEVAN, T.G., CORDERO OTERO, R.R., BRIONES, A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiology Letters*, v.237, p.261-266, 2004.

FREITAS, L.C., BARBOSA, J.R., DA COSTA, A.L.C., BEZERRA, F.W.F., PINTO, R.H. H., JUNIOR, R.N.C. From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products?. *Resources, Conservation and Recycling*, v.169, 2021.

- GASSARA, F., BRAR, S.K., TYAGI, R.D., VERMA, M., SURAMPALLI, R.Y. Screening of agroindustrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, v.49, p.388–394, 2010.
- GERVAIS, P., MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13(2-3), p.85-101, 2003.
- GONZÁLEZ-BAUTISTA, E., ALARCÓN-GUTIERREZ, E., DUPUY, N., GAIME-PERRAUD, I., ZIARELLI, F., FARNET-DA-SILVA, A.M. Influence of yeast extract enrichment and *Pycnoporus sanguineus* inoculum on the dephenolisation of sugar-cane bagasse for production of second-generation ethanol. *Fuel*, v.260, 2019.
- GREGORIO, A., MANDALARI, G., ARENA, N., NUCITA, F., TRIPODO, M.M., LO CURTO, R.B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology*. v.83, p.89-94, 2002.
- FAVELA-TORRES, E., CORDOVA-LÓPEZ, J., GARCÍA-RIVERO, M., GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*, v.33(2), p.103-107, 1998.
- HERRERA, T., ULLOA, M. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. *Universidad nacional autónoma de México: Fondo de Cultura Económica*. Ed. 2, p.552,1998.
- JAYANI, R.S., SAXENA, S., GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v.40, p.2931-2944, 2005.
- JONATHAN, S.G., FASIDI, I.O., AJAYI, E.J. Physico-chemical studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer, a Nigerian edible fungus. *Food Chemistry*, v.85, p.339-342, 2004.
- JOUDA, J.B., MFOTIE NJOYA, E., MBAZOA, C.D., ZHOU, Z., MELI LANNANG, A., WANDJI, J., SHIONO, Y., WANG, F. Lambertellin from *Pycnoporus sanguineus* MUCL 51321 and its anti-inflammatory effect via modulation of MAPK and NF-κB signaling pathways. *Bioorganic Chemistry*, v.80, p.216-222, 2018.
- KASHYAP, D.R., VOHRA, P.K., CHOPRA, A.S., TEWARI, A.R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, v.77(3),p.215-27, 2001.
- KIM, S. W., HWANG, H.J., XU, C.P., NA, Y.S., SONG, S.K., YUN, J.W. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*. v.34(6), p.389-393, 2002.
- MESBAHI, G., JAMALIAN, J., FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in foods systems. *Food Hydrocolloids*, v.19, p.731-738, 2005.
- NOBLES, M.K., FREW, B.P. Studies in wood-inhabiting hymenomycetes. The genus *Pycnoporus karst*. *Canadian Journal of Botany*. v.40, p.987-1016, 1962.

- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*.v.13(2-3) p.81-84, 2003.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEON, J.A. Solid-State fermentation in Biotechnology—Fundamentals and Applications. *Asiatech Publishers*, New Delhi, p.221, 2001.
- PENNA, A.L.B. Hidrocolóides: usos em alimentos. *Food Ingredients*, v.17, p.58-64, 2002.
- PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; SILVA, F.L.H.; SANTOS, S.F.M.; MACEDO, G.R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. *Revista de Química Industrial*, v.74 p.17-20, 2006.
- PUTZKE, J., PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos. *Edunisc*. 2ª edição, v.1, 2004.
- QUEVEDO, J. R., LÚCIA, V., BONONI, R. Agaricomycetes ( Basidiomycota ) em um fragmento florestal urbano na cidade de Campo Grande , Mato Grosso do Sul , Brasil. *Brazilian Journal of Biosciences*,v.10, p. 430–438, 2012.
- SADH, P.K., DUHAN, S., DUHAN, J.S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, v.5, p.1–15, 2018.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v.27, p.185–194, 2009.
- SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. (*Tese de doutorado em Engenharia Química – área de concentração: Alimentos e biotecnologia – UFRN*). p.148. 2007.
- SIQUEIRA, F.G., SIQUEIRA, E.G. DUQUEJARAMILLO, P.M., SILVEIRA, M.H.L, ANDREAUS, J., COUTO, F.A, BATISTA, L.R., FILHO, E.X.F. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.64 (1), p.20-26, 2010.
- SOUZA, J.V.B., SILVA, É.S., MAIA, M.L.S., TEIXEIRA, M. F.S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A. UMIDA. 1. *Process Biochemistry*, v.39, p.455-458, 2003.
- UENOJO, M., PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*. v.30(2), p.388-394, 2007.
- VORAGEN, G.J., PILNIK, W., THIBAUT, J.F., AXELOS, M.A.V., RENARD, C.M.G.C. Pectins, Food Polysaccharides and Their Applications (A.M. Stephen, ed.), *Marcel Dekker*, New York, p. 287–339, 1995.
- YAHAYA, Y.A., MASHITAH, M.D., BHATIA, S. Biosorption of copper (II) onto immobilized cells of *Pycnoporus sanguineus* from aqueous solution: Equilibrium and kinetic studies. *Journal of Hazardous Materials*, V. 161, p.189-195, 2008.
- YAPO B. M., LEROUGE, P., THIBAUT, J., RALET, M. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, v.69, p.426-435, 2007.

## **CAPÍTULO III**



# PRODUÇÃO DE PECTINASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DO FUNGO *Pycnoporus sanguineus* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

## RESUMO

As pectinases possuem propriedades importantes para a utilização em processos biotecnológicos. O fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus* apresenta aplicabilidade descrita na área farmacêutica e agrícola. No entanto, não há nenhum estudo para otimização da produção de enzimas pectinolíticas por essa espécie descrita na literatura. Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes parâmetros de cultivo para produção de pectinases por *P. sanguineus* em cultivo em estado sólido, dentre eles, diferentes substratos (resíduos agroindustriais), umidade inicial, temperatura e tempo de cultivo. A maior produção de pectinase, 715,5 U/g de substrato seco, foi obtida nos cultivos em farelo de trigo, contendo inicialmente 65% de umidade, mantidos a 35°C por 96 horas. O extrato enzimático obtido em condições de cultivo otimizadas apresentou atividade de xilanase (16,44 U/g de substrato), endoglucanase (115,82 U/g de substrato) e  $\beta$ -glicosidase (33,6 U/g de substrato). A considerável produção de pectinases e celulases pelo fungo *P. sanguineus* estimula o emprego desse microrganismo e seus biocatalisadores em processos de conversão de biomassa vegetal.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pycnoporus sanguineus*, cultivo em estado sólido, basidiomicetos.

## 1-INTRODUÇÃO

A biodiversidade brasileira de microrganismos desperta interesse mundial para as indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica e de rações, devido a quantidade de espécies com potencial industrial para a produção de enzimas (SILVA; FONSECA, 2016). A biomassa vegetal, por exemplo, proporciona matéria orgânica em grande quantidade que pode ser utilizada para diferentes fins como ração animal, meios de cultivos microbiológicos e até mesmo para a produção de biocombustíveis. A parede celular vegetal é constituída de uma rica fonte de biomassa, sendo composta principalmente por lignina, celulose, hemicelulose e pectina (PEDROLI *et al.*, 2009).

As pectinases são amplamente utilizadas pelas indústrias de alimentos, sendo aplicadas como agente emulsificante, estabilizante, espessantes ou geleificante. O potencial de uso das pectinases é diverso, podem ser aplicadas na produção de geleias, sorvetes de frutas, sucos concentrados, bebidas lácteas acidificadas, polpas de frutas, iogurte, entre outros (SEMENOVA *et al.*, 2006). Algumas dessas funções industriais podem ser justificadas devido a sua função no vegetal.

As pectinases são categorizadas conforme o seu mecanismo de ação, substrato preferido e reação que catalisam. Basicamente são três tipos de pectinases: pectina liases (ou transeliminases); as poligalacturonases e as pectinaesterases (DIANO *et al.*, 2008). As pectina liases são as que rompem as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácidos D-galacturônicos por meio da trans-eliminação de hidrogênio dos carbonos 4,5 do ácido D-galacturônico, obtendo um produto insaturado de 4,5 do ácido galacturônico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; BUSTO *et al.*, 2006). A poligalacturonase estimula a clivagem hidrolítica da cadeia de ácido poligalacturônico com a incorporação de uma molécula de água por meio das pontes de hidrogênio (DIANO *et al.*, 2008). A pectinesterase é responsável pela desesterificação da pectina, onde produz um polissacarídeo que posteriormente pode ser hidrolisado pela poligalacturonase (KAYSHAP *et al.*, 2001; UENOJO; PASTORE, 2007).

A pectina é geralmente encontrada em conjunto com a celulose e hemicelulose, dando adesão entre as células, funcionando como um agente cimentante da parede celular, e essa característica auxilia na rigidez, resistência mecânica e coesividade do tecido, sendo determinante para a estrutura celular vegetal (ZHONGDONG, 2006), e também tem contribuição importante para a textura de frutas e vegetais no período de crescimento e o amadurecimento.

Por outro lado, as propriedades da pectina não são desejáveis para a indústria de sucos e bebidas, uma vez que as frutas são ricas em pectina, e sua presença é responsável por grandes perdas na indústria devido a influencia direta na viscosidade durante o processo de prensagem, filtração e concentração. A turbidez em sucos de frutas também é um ponto negativo e ocorre quando as partículas de pectina ficam suspensas depois da extração ocasionando um aspecto indesejável (PINELO; ZEUNER; MEYER, 2010).

Para solucionar os problemas de turbidez e viscosidade, por exemplo, são utilizadas enzimas pectinolíticas para reduzir a viscosidade, potencializar a eficiência de filtração e clarificação (UENOJO; PASTORE, 2007). As pectinases são enzimas com capacidade de decompor a pectina e são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (GRACHEVA; KRIVOVA, 2000). Kashyap *et al.*, (2001) reportaram que a hidrólise enzimática de frutos contendo pectinase durante o processo de extração e purificação, foi capaz de reduzir a turbidez e viscosidade. Quanto menos viscosidade, menor será a perda de carga durante o escoamento, o que diminui os custos de bombeamento de sucos e polpas (VIDAL *et al.*, 2006). A hidrólise enzimática da pectina além de reduzir a turbidez, aumenta o valor nutricional das bebidas contribuindo para a extração de compostos das frutas, solubilizando compostos e agregando/enriquecendo a solubilização de fibras e polifenóis (ARSAD *et al.*, 2015, SHARMA; HIRAL; SHARMA, 2014).

Uma alternativa para baratear a produção das pectinases é a utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultivo para fungos filamentosos produtores destas enzimas. O cultivo em estado sólido (CES) é caracterizado pelo crescimento microbiano em uma matriz sólida, na ausência de água livre entre as partículas do substrato (PINTO *et al.*, 2006). Este tipo de cultivo apresenta vantagens sobre outros tipos devido as condições de cultivo serem mais próximas ao habitat natural do fungo filamentoso, pois este tipo de cultivo não traz limitações de oxigênio, favorecendo o crescimento microbiano e a produção enzimática devido aos fungos filamentosos serem essencialmente aeróbicos (PANDEY, 2003). Esta característica se destaca porque insuflar oxigênio em meios de cultivo submerso gera custos operacionais.

Esse trabalho visa avaliar a produção de pectinases a partir do cultivo em estado sólido do fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus* utilizando CES, avaliar diferentes parâmetros de cultivo para a produção de pectinases por *P. sanguineus* em cultivo em estado sólido, dentre eles, diferentes substratos (resíduos agroindustriais), umidade inicial, temperatura e tempo de cultivo e avaliar o potencial catalítico do extrato enzimático produzido. Este fungo foi selecionado devido à elevada atividade dessa enzima observada em ensaios preliminares. As características dos fungos deste gênero permitem ser facilmente cultiváveis em meios laboratoriais. Além disso, o gênero *Pycnoporus* possui uma resistência à variação de pH e temperatura, por ser euritérmico (CASTILHO; DEMOULIN, 1997) e possui a capacidade de produzir biomassa rapidamente (LOMASCOLO *et al.*, 2011). As pectinases produzidas podem ser utilizadas em diferentes processos industriais. Portanto, o conhecimento sobre as melhores condições de cultivo, e suas características físico-químicas são de extrema relevância (KIRK *et al.*, 2002).

## **2-MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1-Microrganismo**

No presente trabalho foi utilizado o fungo filamentoso mesófilo *Pycnoporus sanguineus*. O microrganismo foi isolado de troncos de árvores situadas em vegetação de Cerrado da região de Dourados – MS (22°10'49.2"S - 54°56'57.4"W), e identificado pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. A linhagem foi mantida no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos (LEPFER) da Universidade Federal da Grande Dourados, sendo armazenada em meio ágar *Sabouraud Dextrose*, seguido ao crescimento a 28°C por 96 horas e posteriormente armazenada a 4°C.

## **2.2-Inóculo**

O fungo *P. sanguineus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar *Sabouraud Dextrose* inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de amônio m/v). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão, perfazendo 5 mg de massa micelial seca/grama de substrato seco (Adaptado de: MARTINS *et al.*, 2019).

## **2.3- Produção de pectinase por Cultivo em Estado Sólido (CES)**

Para produção de pectinase utilizou-se como substrato resíduos agroindustriais, bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, casca de arroz e palha de milho. O melhor substrato para produção da enzima foi utilizado para avaliação de outros parâmetros, tais como: umidade inicial, temperatura e tempo de cultivo. O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos umedecidos com solução nutriente descrita no item anterior. Inicialmente, o teor de umidade foi ajustado para 60%, o tempo de cultivo foi fixado em 120 h, e a temperatura foi mantida a 30° C. O material passou por processo de esterilização a 120°C durante 20 minutos (GARCIA *et al.*, 2015).

## **2.4- Extração das enzimas**

A extração das enzimas a partir dos resíduos miceliados foi realizada pela adição de 50 mL de água destilada, mantidos em agitação de 100 rpm por 1 hora. As amostras foram filtradas em tecido de nylon e centrifugadas a 1.500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático e utilizado nas etapas seguintes (SANTOS *et al.*, 2016).

## **2.5- Determinação da atividade de pectinase**

A atividade de pectinase foi determinada com 0,2 mL de extrato enzimático, 0,8 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,5, contendo 1% pectina cítrica, reagindo por 10 minutos a temperatura de 50°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 540 nm pelo método de DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto de reação.

## **2.6- Potencial catalítico do extrato enzimático**

As atividades de endoglucanase (CMCase) e xilanase foram quantificadas usando 3% de carboximetilcelulose (Sigma, C5678) e 1% xilana (Sigma, Beechwood), respectivamente, como substratos. O açúcar redutor liberado (glicose e xilose, respectivamente) foi quantificado pelo método de DNS descrito por Miller (1959). A atividade da  $\beta$ -glicosidase foi medida com o substrato sintético p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mM, Sigma). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de produto por minuto de reação (Garcia et al. 2015).

## 2.7-Análise estatística

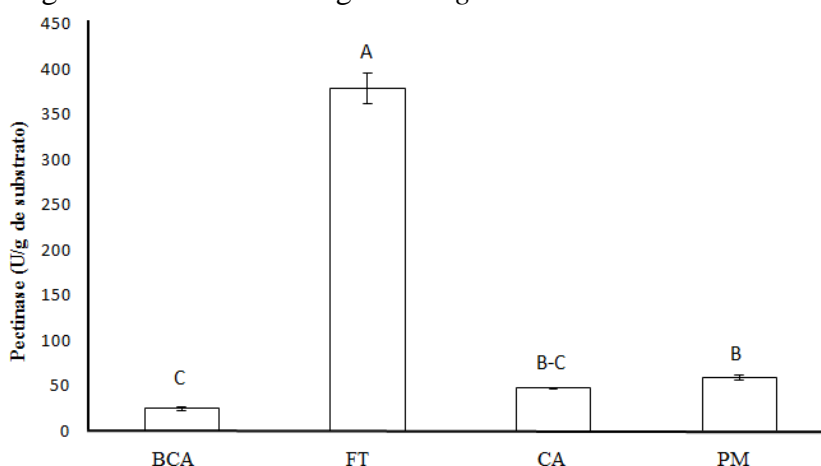
As análises estatísticas foram realizadas com os resultados das triplicatas e os resultados foram apresentados como a média de três ensaios independentes. A análise estatística dos dados incluiu ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%, com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism 8.

## 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação dos parâmetros de cultivo para produção de enzimas

Dentre os substratos utilizados para o cultivo do fungo *P. sanguineus*, a maior produção de pectinase foi observada nos ensaios realizados com farelo de trigo como substrato, 378,5 U/g de substrato seco (ou 37,85 U/mL; Figura 4).

Figura 4 - Cultivo do fungo *P. sanguineus* em diferentes substratos.



\*Bagaço de cana de açúcar - BCA, Farelo de trigo – FT, Casca de arroz – CA, Palha de milho – PM). Parâmetros de cultivo fixados: 30°C, 60% de umidade e 120 horas de cultivo. Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

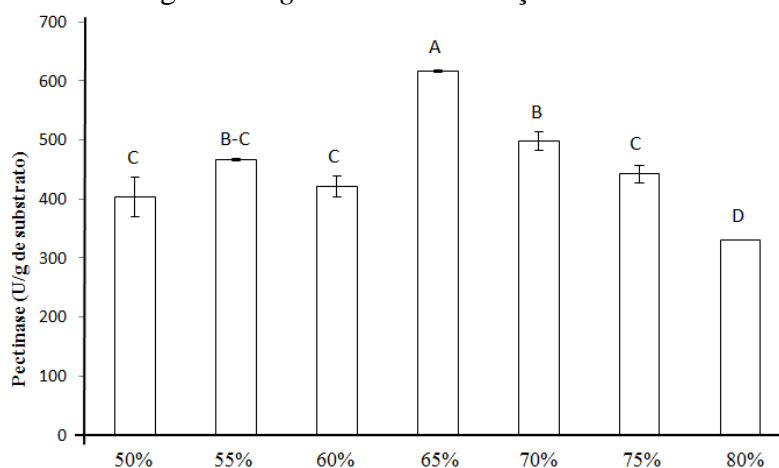
O farelo de trigo é um substrato rico em carboidratos, lipídios, minerais, proteínas e vitaminas, que são facilmente absorvidos pelos microrganismos (HAQUE; SHAMS-UD-DIM.; HAQUE, 2002) o que favorece o crescimento microbiano e a produção de enzimas.

Trabalhos anteriores confirmam o farelo de trigo como excelente substrato para produção de enzimas, por cultivo em estado sólido de fungo filamentosos (GARCIA *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019; GARBIN *et al.*, 2021).

O uso de subprodutos agroindustriais como farelo de trigo, em cultivos em estado sólido para produzir enzimas industriais, pode representar uma opção para redução dos custos de produção (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Considerando os resultados descritos anteriormente, o farelo de trigo foi o substrato adotado para realização dos ensaios subsequentes.

Dentre os valores de umidade inicial avaliados no presente trabalho, a maior produção de pectinase foi obtida nos cultivos com 65% de umidade, alcançando 615,7 U/g de substrato seco (ou 61,57 U/mL; Figura 5).

Figura 5 – Cultivo do fungo *P. sanguineus* com variações de umidade inicial de 50% a 80%.



\*Parâmetros de cultivo fixados: farelo de trigo, 30°C e 120 horas. Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

O teor de umidade do substrato é um dos fatores que mais afetam o processo e variar de acordo o tipo de substrato, o produto final e as necessidades dos microrganismos (COSTA *et al.*, 2019).

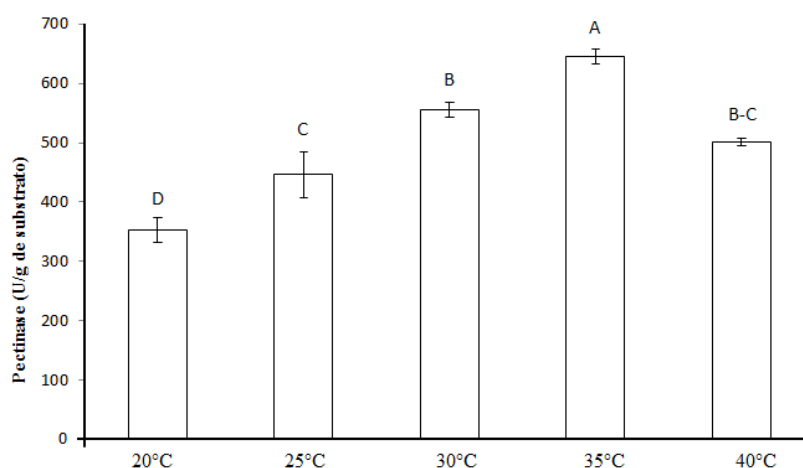
O controle da umidade é fundamental em cultivos sólidos, isto porque, elevado teor de umidade afeta o crescimento fúngico, devido à compactação do substrato e a redução da difusão do oxigênio. Por outro lado, baixa disponibilidade hídrica limita o transporte de membrana, afetando a absorção de nutrientes, o que resulta na redução da atividade metabólica do microrganismo (GARCIA *et al.*, 2018).

Botella *et al.* (2007), estudaram a influência da umidade na produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo filamentososo *Aspergillus awamori*, utilizando resíduo da indústria de vinho (bagaço de uva). A umidade inicial variou de 45-80% com as maiores atividades obtidas em cultivos com 65% de umidade.

Silva *et al.* (2005), descreveram a produção de pectinase pelo cultivo em estado sólido do fungo *Penicillium viridicatum* em farelo de trigo. Os autores relataram a maior produção dessa enzima em cultivos com 70% de umidade inicial, valores muito próximos aos obtidos no presente trabalho.

Em relação às temperaturas de cultivo, a maior produção de pectinase foi obtida em cultivos mantidos a 35°C; 644,9 U/g de substrato (ou 64,49 U/mL; Figura 6).

Figura 6 – Produção de pectinase pelo fungo *P. sanguineus* em diferentes temperaturas.



\*Parâmetros de cultivo fixados: farelo de trigo, 65% de umidade inicial e 120 horas de cultivo. Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

A variação de temperatura influencia diretamente no metabolismo celular dos microrganismos, resultando em alterações no crescimento (estimulando ou inibindo), na viabilidade de células e na produção de biomoléculas (REHMAN *et al.*, 2006), bem como na produção de metabólitos primários e secundários (COSTA; BADINO, 2015).

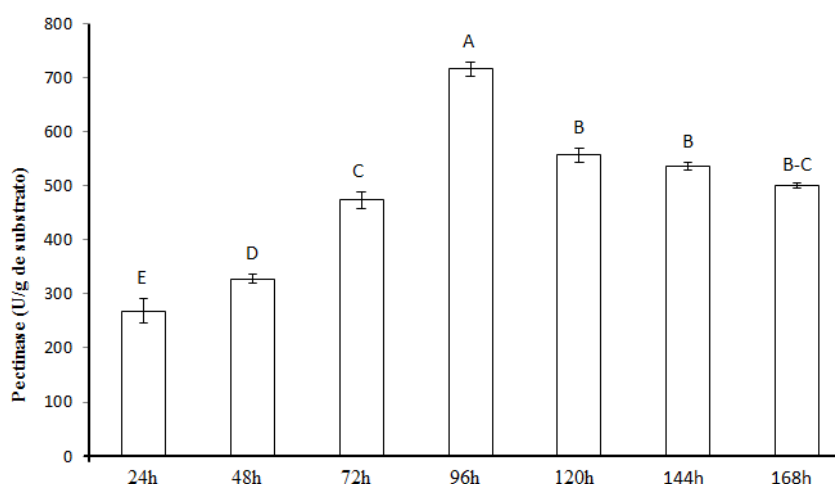
A temperatura obtida como ótima no presente trabalho é próxima das descritas na literatura para produção de pectinases por fungos mesófilos. Banu *et al.* (2010), realizaram um estudo com o fungo *Penicillium chrysogenum*, obtiveram maior produção de pectinase (27,21 U/mL) em cultivos mantidos a 35°C.

Ahmed; Sohail (2020) realizaram o cultivo do fungo filamentososo *Geotrichum candidum* para produção de pectinases, a maior atividade enzimática foi observada em cultivos a 35°C. Botella *et al.* (2007), cultivaram o fungo *Aspergillus niger* e a melhor produção de pectinase ocorreu em 30°C.

Silva *et al.* (2019), avaliaram diferentes temperaturas para produção de pectinases pelo fungo *Aspergillus aculeatus*, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas a 30°C. Silva *et al.* (2005), relataram a maior produção de poligalacturonase (2,5 U/mL) pelo fungo *Penicillium viridicatum* em cultivos mantidos a 35°C.

O tempo de cultivo foi o último parâmetro avaliado nesta fase do trabalho. A maior produção de pectinase, 715,5 U/g de substrato (ou 71,55 U/mL), foi obtida com 96 horas de cultivo (Figura 7).

Figura 7 – Produção de pectinase pelo fungo *P. sanguineus* em função do tempo de cultivo.



\*Parâmetros fixados: farelo de trigo, 65% de umidade e 35°C. Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

O tempo de cultivo para produção da enzima foi relativamente baixo, principalmente se considerado que o fungo *P. sanguineus* é um basidiomiceto e em 96 horas produziu uma alta quantidade de enzimas, podendo ser comparada até mesmo com cultivo submerso que geralmente tem produção mais rápida por se tratar de um cultivo homogêneo. Silva *et al.* (2019), cultivaram o fungo *Aspergillus aculeatus* por meio da fermentação submersa em meio composto por 10% de casca de maracujá, e as maiores produções de pectinases foram obtidas com 96 horas de cultivo, cerca de  $(2,92 \pm 0,12 \text{ U/mL})$  de poligalacturonase total.

De forma geral, os basidiomicetos apresentam crescimento lento, o que resulta na produção de enzimas com maior tempo de cultivo. Heidarizadeh; Rezaei; Shahabivand (2018) relataram a maior produção de pectinase pelo fungo basidiomiceto *Piriformospora indica* em 144 horas de cultivo em fermentação submersa em meio Kafer modificado (glicose substituída por pectina). Bonomini; Wisbeck; Gern (2017) relataram a maior produção de pectinase (0,29 U/mL) pelo



fungo basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* com 264 horas de cultivo em placas de Petri contendo meio de cultivo composto por ágar e pectina cítrica (Sigma).

O reduzido tempo de produção de pectinase pelo fungo *P. sanguineos* pode ser comparado até mesmo com linhagens fúngicas pertencentes a outros filios.

Silva *et al.* (2005), cultivaram o fungo *Penicillium viridicatum* em cultivo em estado sólido usando bagaço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo e cascas de manga e banana como fontes de carbono para produção de enzimas pectinolíticas e obtiveram a maior produção de endo-Poligalacturonase (5,6 U/g) com 96 horas e 144 horas de crescimento, para exo-Poligalacturonase a maior produção (71,2 U/g) foi obtida em 336 horas.

A otimização dos processos de cultivo resulta no aumento da produção de enzimas, permite que ocorra redução significativa no tempo de cultivo, o que é extremamente desejável para produção industrial (ANAND *et al.*, 2020).

Após a otimização do processo de cultivo foi observada elevada produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo *P. sanguineus*, principalmente quando comparada com trabalhos previamente publicados na literatura científica (Tabela 1).

Tabela 1. Comparativo da produção de pectinase por *P. sanguineus* com trabalhos previamente publicados.

| Fungo                          | Substrato                                    | U/g de substrato | U/mL                             | Autor                                       |
|--------------------------------|--|------------------|----------------------------------|---|
| <i>P. sanguineus</i>           | Farelo de trigo                              | 715,7            | 71,5                             | Este estudo                                 |
|                                | Casca de maracujá                            | _____            | 2,92 (PG)                        | Silva <i>et al.</i> , 2019                  |
| <i>Aspergillus oryzae</i>      | Casca de maracujá                            | _____            | 0,601                            | Duque-Jaramillo <i>et al.</i> , 2013        |
| <i>Aspergillus sojae</i>       | Farelo de trigo e pellets de beterraba moída | 151,9            | _____                            | Heerd; Diercks Horn; Fernández Lahore, 2014 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i>   | Resíduo de laranja                           | _____            | 9,4                              | Inácio <i>et al.</i> , 2015                 |
| <i>Pleurotus sajorcaju</i>     | Resíduo de cebola                            | _____            | 7,62                             | Pereira <i>et al.</i> , 2017                |
| <i>Penicillium viridicatum</i> | Farelo de trigo e bagaço de laranja          | _____            | 8,90 (endo-PG)<br>41,30 (exo-PG) | Silva <i>et al.</i> , 2005                  |
| <i>Penicillium viridicatum</i> | Farelo de trigo e bagaço de laranja          | 55,0             | _____                            | Silva <i>et al.</i> , 2002                  |
| <i>Streptomyces lydicus</i>    | Farelo de trigo e fibras de bananeira        | 425,0            | _____                            | Jacob; Prema, 2008                          |

\*PG: poligalacturonase. Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

### 3.2-Potencial catalítico do extrato enzimático

O extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo *P. sanguíneus* em condições otimizadas para produção de pectinase, apresentou atividade de outras enzimas de interesse industrial, dentre elas: endoglucanase (115,8 U/g de substrato ou 11,5 U/mL),  $\beta$ -glicosidade (33,6 U/g de substrato ou 3,3 U/mL) e xilanase (16,4 U/g ou 1,6 U/mL) (Tabela 2).

Tabela 2 - Potencial catalítico do extrato enzimático produzido por *P. sanguineus* sob cultivo em condições otimizadas para produção de pectinase (Substrato: farelo de trigo, umidade: 65%, temperatura: 35°C e tempo de cultivo: 96 horas).

| Enzima               | U/g de substrato | U/mL |
|----------------------|------------------|------|
| Pectinase            | 715,7            | 71,5 |
| Xilanase             | 16,4             | 1,6  |
| Endoglucanase        | 115,8            | 11,5 |
| $\beta$ -glicosidade | 33,6             | 3,3  |

Fonte: elaborado pelo autor, 2021.

Dentre as enzimas avaliadas no presente trabalho, foi possível destacar a produção de pectinase e endoglucanase pelo fungo *P. sanguíneus*, principalmente quando comparada com a literatura. Garbin *et al.*, (2021), relataram a produção de 36 U/g de substrato para endoglucanase pelo cultivo em estado sólido do fungo *Thermoascus crustaceus* em farelo de trigo. Costa *et al.*, (2019) obtiveram 36,4 e 53,0 U/g de substrato para endoglucanase, por cultivo em estado sólido dos fungos *Trichoderma piluliferum* e *Trichoderma viride*, respectivamente.

Sob outra perspectiva, outros autores relataram produções de endoglucanase semelhantes a descrita no presente trabalho. Garcia *et al.*, (2015) relataram a produção 152,1 U/g de substrato para endoglucanase pelo cultivo em estado sólido do fungo *Lichtheimia ramosa* em farelo de trigo. Delabona *et al.*, (2012) obtiveram 122,8 U/g de substrato para endoglucanase pelo cultivo do fungo *Aspergillus fumigatus* em farelo de trigo.

A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase obtida no presente trabalho (33,6 U/g de substrato) foi relativamente baixa comparada com a literatura. Garbin *et al.*, (2021) relataram maior produção dessa enzima (415,1 U/g de substrato) pelo cultivo em estado sólido do fungo *Thermoascus crustaceus* em farelo de trigo. Garcia *et al.*, (2015) relataram a produção 274 U/g de substrato para  $\beta$ -glicosidase pelo fungo *Lichtheimia ramosa*, utilizando farelo de trigo como substrato.

A produção de xilanase obtida nas condições de cultivo descritas no presente trabalho foi consideravelmente baixa comparada com registros anteriores na literatura. Costa *et al.*, (2016) relataram a produção de 1700 U/g de substrato para xilanase pelo cultivo do fungo *Thermoascus aurantiacus* em farelo de trigo.

Apesar da reduzida atividade de xilanase observada no extrato enzimático produzido por *P. sanguineus*, a elevada atividade de pectinase e endoglucanase sugerem o emprego desse microrganismo e seus biocatalisadores em processos de bioconversão de biomassa vegetal, seja para produção de ração animal, ou ainda, para obtenção de etanol de segunda geração.

Trabalhos anteriores confirmam essas possibilidades. Scarpa *et al.*, (2019) relataram a hidrólise de bagaço de cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração, utilizando o extrato enzimático proveniente do cultivo em estado sólido de *P. sanguineus* em meio composto por farelo de trigo e soja. Fungos pertencentes a classe dos basidiomicetos são comumente empregados na biotransformação de biomassa vegetal, visando o enriquecimento nutricional de diversos resíduos agroindustriais (ARAUJO *et al.*, 2020; GIUNCO *et al.*, 2021).

## 5-CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *P. sanguineus* apresentou considerável potencial para produção de pectinase em meios de baixo valor agregado, principalmente quando cultivado em farelo de trigo. Os ajustes dos parâmetros de cultivo resultaram no aumento da produção enzimática em 89,08% e com a redução do tempo de cultivo, o que é desejável para produção industrial.

## 6-REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; SOHAIL, M. Characterization of pectinase from *Geotrichum candidum* AA15 and its potential application in orange juice clarification. *Journal of King Saud University-Science*, v.32, n.1, p.955-961. 2020.
- ANAND, G.; YADAV, S.; GUPTA, R.; YADAV, D. Pectinases: dos micróbios às indústrias. In: CHOWDHARY, Pankaj; RAJ, Abhay; VERMA, Digvijay; AKHTER, Yusuf. *Microrganisms for Sustainable Environment and Health*, p.287-313, 2020.
- ARAUJO, P.S.; SILVA, P.G.P.; ARAÚJO, S.S.; LEITE, R.S.R.; SILVA, C.AA.; FONSECA, G.G. Changes in biochemical composition of cassava and beet residues during solid state bioprocess with *Pleurotus ostreatus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 26, p. 101641, 2020.

ARSAD, P.; SUKOR, R.; WAN, I.W.Z.; MUSTAPHA, N.A; MEOR, A.S. Effect of Enzymatic Treatment on Physicochemical Properties of Sugar Palm Fruit Juice. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, v.5, p.308- 312, 2015.

BANU A.R.; DEVI, M.K.; GNANAPRABHAL, G.R.; PRADEEP, B.V.; MUTHUSAMY, P. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, v.3, n.4, p. 641-651, 2010.

BONOMINI, F.M.; WISBECK, E.; GERN, R.M.M. Produção de enzimas por *Pleurotus Sajorcaju* e *Pleurotus djamor*. *Revista NBC*. v. 7, n. 14, p. 109-126, 2017.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v.42, n.1, p.98-101, 2007.

BUSTO, M.D., García-Tramontín, K.E., Ortega, N., Perez-Mateos, M . Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. *Bioresource Technology*, v.97, p.1477-1483, 2006.

CASTILHO, G.; DEMOULIN, V. NaCl salinity and temperature effects on growth of three wood-rotting basidiomycetes from a Papua New Guinea coastal forest. *Mycologicae Research*, v.101, p.341-344, 1997.

COSTA C.L. L.; BADINO A. C. Overproduction of clavulanic acid by extractive fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.18 n.3, p.154-160, 2015.

COSTA, A.C.; CAVALHEIRO, G.F.; VIEIRA, E.R.Q.; GANDRA, J.R.; GOES, R.H.T.B.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G. ; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.19, n.4, p. 101161, 2019.

COSTA, A.C.; SCALABRINI,R.P.; SILVESTRE, M.A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Production of xylanase by a new strain of *Thermoascus aurantiacus*: obtainment of enzymatic extract with reduced cellulolytic activity for application in pulp and paper industries. *Bioscience Journal*, v. 32, n.4, p. 1040-1048, 2016.

DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, A.C.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, v.37, 243-250, 2012.

DIANO, N., GRIMALDI, T., BIANCO, M., ROSSI, S. Apple juice clarification by immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56), 11471-11477, 2008.

DUQUE-JARAMILLO, P.M.; GOMES, H.A.R.; SIQUEIRA, F.G.; HOMEM-DE-MELLO, M.; FILHO, E.X.F.; MAGALHÃES, P.O. Liquid-liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system. *Separation and Purification Technology*, v.120, p.452-457, 2013.

GARBIN, A.P.; GARCIA, N.F.L.; CAVALHEIRO, G.F.; SILVESTRE, M.A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, RODRIGO S.R.  $\beta$ -glucosidase from thermophilic

- fungus *thermoascus crustaceus*: production and industrial potential. *Anais da academia brasileira de ciencias*, 2021.
- GARCIA, N.F.L.; SANTOS, F.R.S.; GONÇALVES, F.A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.18, 314-319, 2015.
- GARCIA, N.F.L.; SANTOS, F.R.S.; BOCCHINI, D.A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R. S.R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products*, v. 122, p. 49-56, 2018.
- GIUNCO, A.J.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G. Development and evaluation of low-carb cakes produced from green bocaiuva pulp enriched with *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Culinary Science & Technology*, v. 19, p. 1-10, 2021.
- GRACHEVA, I.M.; KRIVOVA, A.Y. Engineering of enzymes preparations [in Russian], Elevar, Moscow, pp 227-255. In: Semenova, M.V., Grishutin, A. V.; Okunev, O. N.; Sinitsyn, A. P. (2003). *Biochemistry*, v.68, p.559-569, 2000.
- HAQUE, M.A.; SHAMS-UD-DIM.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. *International Journal of Food Science and Technology*, v.37, p.453-468. 2002.
- HEIDARIZADEH, M.; REZAEI, P.F.; SHAHABIVAND, S. *Piriformospora indica*'dan Yeni Pektinaz, Büyüme Parametrelerinin ve Enzim Üretiminin Batırılmış Kültür Koşulunda Optimizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*, v.43, p. 289–295, 2018.
- HEERD, D.; DIERCKS- HORN, S.; FERNÁNDEZ-LAHOURE, M. Efficient polygalacturonase production from agricultural and agro-industrial residues by solid-state culture of *Aspergillus sojae* under optimized conditions. *Springer Plus*, v.1, n.3, p.742, 2014.
- INÁCIO, F.D.; FERREIRA, R.O.; ARAÚJO, C.A.V.; PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M. Production of enzymes and biotransformation of orange waste by Oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* ( Fr.) Quél. *Advances in Microbiology*, v. 5, p. 1–8, 2015.
- REHMAN, H.U.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S.A.U.; MILINARO, A.; ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry*, v.139, p.10811086, 2013.
- JACOB, N.; PREMA, P. Novel process for the simultaneous extraction and degumming of banana fibers under solid-state cultivation Novo processo para a extração e simultânea degomagem de fibras de banana. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, n.1, p.115-121, 2008.
- JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, p.2931-2944, 2005.
- KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*, v.77, p.215-27, 2001.

- KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 345-351, 2002.
- LOMASCOLO, A., UZAN-BOUKHRIS, E., HERPOËL-GIMBERT, I., SIGOILLOT, J-C., LESAGE-MEESSEN, L. Peculiarities of *Pycnoporus* species for application in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.92, p.1129-1149, 2011.
- MARTINS, E.D.S.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; JUNIOR, R.B. Production of cellulases by *Thermomucor indicae-seudaticae*: characterization of a thermophilic  $\beta$ -glucosidase. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 49, n. 8, p. 830-836, 2019.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, p.81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: Ibioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v.35, n.10, p.1153–1169, 2000.
- PEDROLI, D.B.; MONTEIRO, A.C.; GOMES, E.; CARMONA, E.C. Pectin and pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, v.3, p.9-18, 2009.
- PEREIRA, G.S.; CIPRIANI, M.; WISBECK, E.; SOUZA, O.; STRAPAZZON, J.O.; GERN, R.M.M. Resíduos de suco de cebola para produção de *Pleurotus sajor-caju* e pectinases. *Food and Bioproducts Processing*, v.106, p.11-18. 2017.
- PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A.S. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, v.88, p.259–265, 2010.
- PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; SILVA, F.L.H.; SANTOS, S.F.M.; MACEDO, G.R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. *Revista de Química Industrial*, v.74 p.17-20, 2006.
- SANTOS, F.R.S. ; GARCIA, N.F.L. ; PAZ, M. F. ; FONSECA, G.G. ; LEITE, R. S. R. . Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, v.15, p.633-641, 2016.
- SCARPA, J.C.P.; MARQUES, N.P.; MONTEIRO, D.A.; MARTINS, G.M. PAULA, A.V.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI, D.A. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. *Industrial Crops and Products*, v.141, 2019.
- SEMENOVA, M.V.; SINITSYNA, O.A.; MOROZOVA, V.V.; FEDOROVA, E.A.; GUSAKOV, A.V.; OKUNEV, O.N.; SOKOLOVA, L.M.; KOSHELEV, A.V.; BUBNOVA, T.V.; VINETSKII, YU. P.; SINITSYN, A.P. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, p. 598-602, 2006.

- SHARMA, H.P.; HIRAL, P.; SHARMA, S. Enzymatic Extraction and Clarification of Juice from Various Fruits-A Review. *Trend in Post Harvest Technology*, v.2, n.1, p.01-14, 2014.
- SILVA, C.A.A., FONSECA, G.G. Brazilian savannah fruits: characteristics, properties and potential applications. *Food Science and Biotechnology*, v.25, p.1225-1232, 2016.
- SILVA, D.; TOKUIOSHI, K. da SILVA MARTINS, E.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*, v.40, n.8, p.2885–2889. 2005.
- SILVA, D.; MARTINS, E.S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial byproducts. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, n.4, p.318-324. 2002.
- SILVA, J.C.; FRANÇA, P.R.L.; MELO, A.H.F.; NEVES-PETERSEN, M.T.; CONVERTI, A.; PORTO, T.S. Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochemistry*, v.79, p.18-27, 2019.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v.30, n.2, p.388-394, 2007.
- VIDAL, J.R.M.B.; SIERAKOWISKI, M.R.; HAMINIUK, C.W.I.; MASSON, M.L. Propriedades reológicas da polpa de manga (*Mangifera indica* L. cv Keitt) centrifugada. *Ciência e Agrotecnologia Lavras*, v.30, p.955-960, 2006.
- ZHONGDONG, L.; GUOHUA, W.; YUNCHANG, G.; KENNEDY, J.F. Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate polymers*, v.64, n.4, p.548-552, 2006.