



ANA LUIZA DA ROCHA FORTES SARAIVA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES
FÚNGICAS VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

LAVRAS-MG

2020

ANA LUIZA DA ROCHA FORTES SARAIVA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES FÚNGICAS VIA
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
Pesquisadora da EPAMIG

LAVRAS – MG

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Saraiva, Ana Luiza da Rocha Fortes.

Otimização da produção de pectinases fúngicas via
fermentação submersa / Ana Luiza da Rocha Fortes Saraiva. - 2020.
142 p.

Orientador(a): Sara Maria Chalfoun de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Fermentação submersa. 2. Pectina liase. 3. Otimização de
bioprocessos. I. de Souza, Sara Maria Chalfoun. II. Título.

ANA LUIZA DA ROCHA FORTES SARAIVA

**OTIMIZAÇÃO DE PECTINASES FÚNGICAS VIA FERMENTAÇÃO
SUBMERSA**

**OPTIMIZATION OF THE PECTINASES PRODUCTION BY FUNGAL VIA
SUBMERSE FERMENTATION**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de mestre.

APROVADA em 3 de agosto de 2020

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Dr. Daniel Bonoto Gonçalves	UFSJ
Dr. Marcelo Ângelo Cirillo	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
Orientadora

LAVRAS-MG

2020

Dedico

*À Deus, autor do meu destino, minha fortaleza, meu guia e meu socorro,
Aos meus pais, Maria Luiza e Paulo, pelo amor incondicional, direcionamento,
incentivo constante e as essências para eu nunca desistir.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me direcionar a este caminho, único capaz de cuidar do meu coração e da minha saúde mental para me manter firme em meus propósitos.

À toda minha família, em especial meus pais Maria Luiza e Paulo Acácio, que sempre se dedicaram para que eu tivesse uma boa formação, pelos conselhos e instruções, pelas palavras de carinho e encorajamento.

A minha orientadora, Sara, pela paciência, por todo conhecimento e experiências compartilhadas. Me sinto privilegiada pela oportunidade de lhe conhecer melhor e ter sua orientação.

A Vicentina, técnica do laboratório de microbiologia da EPAMIG, pela paciência e incansável orientação técnica, principalmente, pelas conversas descontraídas nos intervalos do trabalho e ensinamentos de vida. Se tornou uma grande amiga, obrigada!

Às colegas da EPAMIG, Carol, Grazi e Gisele por toda ajuda, conhecimentos compartilhados e pela agradável convivência. E toda equipe da EPAMIG pela receptividade, simpatia e profissionalismo, em especial, a Claudinha que está sempre feliz e emanando boas energias para todos que passam pela recepção.

Aos amigos da pós-graduação Luciano, Tais, Fernandes, Miriam, Mariana, Santiago, Rubia, Clara, pelo companheirismo, solidariedade nos momentos difíceis, palavras de apoio, momentos de descontração dentro e fora da UFLA. Também às meninas do laboratório de micotoxinas e micologia de alimentos pelo acolhimento e sempre me incluem nas confraternizações do grupo.

Aos tios Bani e Biti, pela presença, não poupando esforços para ajudar no que fosse necessário no tempo que estive em Lavras. Também, aos amigos de Lavras, Imaculada e Fred, por nos acolher em sua casa (eu e amigos da UFLA) nos finais de semana e em suas confraternizações proporcionando a convivência em um ambiente familiar.

A minha mentora professora Irene, mesmo não participando dos projetos relacionado ao meu mestrado na UFLA, está sempre disposta a ajudar e a dar conselhos profissionais e pessoais.

Aos professores Cristina e Marcelo Cirillo sempre disponíveis e interessados a ajudar no desenvolvimento do projeto, obrigada por todo conhecimento compartilhado.

A Rose, sempre prestativa, dedicando seu tempo para tornar nossa trajetória na pós-graduação mais leve e produtiva.

Aos técnicos, Alexandre (laboratório de análises químicas do INCT café) e Paulo (laboratório de Microbiologia dos solos), pela boa vontade, sempre prestativos, me permitiram utilizar os equipamentos do laboratório para realizar parte das análises deste trabalho.

A Universidade Federal de Lavras e a Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela a oportunidade concedida para realização deste trabalho.

A FAPEMIG pelo fomento da bolsa de pesquisa.

GRATIDÃO!

RESUMO GERAL

Enzimas microbianas são catalisadores biológicos muito requeridas para acelerar a velocidade de reação de vários processos industriais. O mercado de enzimas biológicas está em ascensão, portanto, para acompanhar esse progresso o desenvolvimento de novas enzimas e seu estudo para novas áreas de aplicação biotecnológica é indispensável. Pectina liases são capazes de degradar a molécula de pectina sem gerar metanol tóxico e sem alterar o grupo éster responsável pelo aroma específico do produto, logo, são alvo de estudos para aplicações no setor de alimentos e bebidas. Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar o potencial de produção de pectinases por *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Trichoderma viride* via fermentação submersa, com o objetivo de produzir um concentrado enzimático com atividade pectina liase para ser estudado no processamento de alimentos e bebidas. Para otimização da produção de pectinases pelos três fungos foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR). A partir da metodologia da superfície de resposta foi observado que as condições de fermentação ideais para máxima produção de pectina liase (PL) e poligalacturonases (PG) são diferentes entre os fungos avaliados. A temperatura foi o fator preponderante para diferenciar a atividade PL e PG, sendo observado atividades PL (superior a 56,2 U/g) associada a temperaturas entre 25 e 30 °C, enquanto atividades exopoligalacturonase (Exo-PG) associadas a temperaturas próximas de 35 °C. As condições de fermentação otimizadas para *C. cladosporioides* produzir altos níveis de atividade PL (76 U/g) no extrato fermentado foram a 120 horas de fermentação, pH inicial 4,5 e a 25 °C com 5 g/L de pectina cítrica. Aqui foi mostrado que *C. cladosporioides* tem potencial na produção de pectinases, sendo o primeiro relato de alta atividade de PL produzida por ele em fermentação submersa. Dessa forma, sugerimos *C. cladosporioides* C196 como fonte de novas enzimas de PL, as quais podem ser estudadas no processamento de alimentos e bebidas.

Palavras-chave: Delineamento composto central rotacional (DCCR), Fermentação submersa, *Cladosporium cladosporioides*, Pectina liase, Processos industriais

ABSTRACT

Microbial enzymes are biological catalysts used to accelerate the reaction velocity of several industrial processes. The biological enzymes market has grown a lot, therefore, to keep up this progress the development of new enzymes and its study for new fields of biotechnological application is indispensable. Pectin liases are able to catalyze the pectin molecule without changing the specific aroma of the product and producing toxic methano. Thus, they are the target of studies for applications in the sector of the food and beverage. In this context, the present study aims to evaluate the potential of pectinase production by three filamentous fungi: *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* and *Trichoderma viride* via submerged fermentation, aiming producing an enzyme concentrate with pectin lyase activity to be studied in food and beverage processing. The rotational central composite design (RCCD) was used to optimize the production of pectinases by the three fungi. From the response surface methodology it was observed that the ideal fermentation conditions for maximum production of pectin lyase (PL) and polygalacturonases (PG) are different among the evaluated fungi. The differences in PL and PG activity due to the influence of temperature were observed. High PL activity is associated with temperatures between 25 and 30 °C and high exo-polygalacturonase (Exo-PG) activity associated with temperatures close to 35 °C. Here it was shown that *C. cladosporioides* has the potential to produce pectinases, being the first report about the high pectin lyase activity produced by it in submerged fermentation. The fermentation conditions optimized for *C. cladosporioides* to produce high levels of pectin lyase activity (76 U/g) in the fermented extract were at 120 hours of fermentation, initial pH 4.5 and at 25 °C with 5 g/L of citrus pectin. Thus, we suggest *C. cladosporioides* C196 as a source of new PL enzymes, which may be studied in food and beverage processing.

Keywords: Central composite design (CCD), Submerged fermentation, *Cladosporium cladosporioides*, Pectin lyase, Industrial processes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura da parede celular de plantas.....	21
Figura 2. Estrutura da pectina.....	22
Figura 3. Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas.....	26
Figura 4. Extrato fermentado antes da filtração com presença de biomassa suspensa Legenda: AN: <i>Aspergillus niger</i> , CC: <i>Cladosporium cladosporioides</i> , TV: <i>Trichoderma viride</i>	64
Figura 5. Filtração do meio em papel filtro (Whatman nº 1)	64
Figura 6. Produção da enzima pectina liase (PL) pelos fungos <i>C. cladosporioides</i> (A) e <i>A. niger</i> (B)	71
Figura 7. Produção de Exo-PG por <i>C. cladosporioides</i>	78
Figura 8. Produção de Exo-PG por <i>T. viride</i> (A) e <i>A. niger</i> (B)	80
Figura 9. Análise de regressão das médias observadas e previstas no crescimento de <i>C. Cladosporioides</i> em SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29 °C) e em SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25 °C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica	91
Figura 10. Análise de regressão das médias observadas e previstas para atividade de pectina liase no SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29 °C) e no SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25 °C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica	93
Figura 11. Análise de regressão das médias observadas e previstas para atividade de Exo-poligalacturonase no SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29 °C) e no SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25 °C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica	95
Figura 12. Análise de regressão das médias observadas e previstas para atividade de Endo-poligalacturonase no SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29°C) e SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25°C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de pectinases comerciais.	28
Tabela 2. Valores das variáveis em níveis codificados (níveis -1, ponto central, +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central. Onde: X1 é o tempo de fermentação, X2 é o pH do meio e X3 a temperatura.	61
Tabela 3. Matriz do primeiro planejamento experimental e valores reais utilizados nos experimentos.	63
Tabela 4. Modelos preditos da atividade PL, sendo os valores X1, X2 e X3 codificados como período de fermentação (h), pH e temperatura (°C), respectivamente.....	69
Tabela 5. Modelos preditos da atividade Exo-PG, sendo os valores X1, X2 e X3 codificados como período de fermentação (h), pH e temperatura (°C), respectivamente.....	76
Tabela 6. Modelos preditos da atividade Endo-PG, sendo os valores X1, X2 e X3 codificados como período de fermentação (h), pH e temperatura (°C), respectivamente.....	81
Tabela 7. Atividade enzimática (U/mL) e Atividade enzimática específica (U/g) das pectinases: Pectina liase (PL), Exo-poligalacturonases (Exo-PG), Endo-poligalacturonases (Endo-PG) dos três fungos avaliados.....	87
Tabela 8. Médias observadas da atividade de pectinases (U/g) e biomassa (g/L) produzida em diferentes concentrações de pectina (g/L) nas duas condições otimizadas. Legenda: SmF 1: fermentação submersa a 120h, em pH 4.2 e a 28°C. SmF 2: fermentação submersa a 120h, em pH 4.5 e a 25°C.....	90

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAGR	Taxa de crescimento anual composta
EMEA	Europa, Oriente Médio e África
Exo-PG	Exo-Poligalacturonases
Endo-PG	Endo-Poligalacturonases
FDA	Food and Drugs Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
HGA	Homogalacturonana
XGA	Xilogalacturonana
OTA	Ocratoxina A
PG	Poligalacturonases
PGL	Pectato liases
PL	Pectina liase
PME	Pectinametilesterases
PMG	Polimetilgalacturonases
PPases	Protopectinases
RGI	Ramnogalacturonana I
RGII	Ramnogalacturonana II
SSF	Solid-state fermentation
SmF	Submerged fermentation

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SIGLAS.....	xi

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1. Mercado de enzimas microbianas.....	15
2.2. Aplicações industriais das pectinases.....	17
2.3. Substâncias pécticas.....	20
2.4. Pectinases: Classificação e mecanismo de ação.....	23
2.5. Microrganismos produtores de pectinases.....	26
2.5.1. <i>A. niger</i>	29
2.5.2. <i>C. cladosporioides</i>	31
2.5.3. <i>T. viride</i>	33
2.6. Processos de obtenção de pectinases microbianas.....	34
2.7. Fatores físico-químicos que influenciam a produção de pectinases.....	37
REFERÊNCIAS.....	43

CAPÍTULO II – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINA LIASES E POLIGALACTURONASES FÚNGICAS

1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1. Local de realização do trabalho.....	60
2.2. Microrganismos.....	60
2.3. Processo fermentativo.....	60
2.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	61
2.5. Obtenção do extrato enzimático bruto.....	63
2.6. Determinação de biomassa.....	65
2.7. Determinação da atividade de pectinases.....	65
2.7.1. Pectina liase (PL)	65
2.7.2. Exo-poligalacturonase (Exo-PG)	65
2.7.3. Endo-poligalacturonase (Exo-PG)	66
2.8. Proteínas totais e atividade enzimática específica	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.1. Pectina Liase (PL)	69
3.2. Poligalacturonases (PG)	76
3.2.1. Exo-poligalacturonases (Exo-PG)	76
3.2.2. Endo-poligalacturonases (Endo-PG)	81
3.3. Otimização e validação experimental.....	86

3.4. Seleção de potenciais produtores pectinases.....	86
3.5. Efeito da concentração de pectina na atividade de pectinases por <i>C. cladosporioides</i>	89
4. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
CAPÍTULO III: (ARTIGO) – Optimization of pectin lyase production by <i>Cladosporium cladosporioides</i> C196 via submerge fermentation	
1. INTRODUCTION.....	109
2. MATERIALS AND METHODS	110
2.1. Microorganism	110
2.2. Enzyme production	110
2.2.1. Submerged Fermentation (SmF)	110
2.2.2. Obtaining crude enzyme extract	111
2.3. Enzymatic Assay	111
2.3.1. Pectin lyase (PL)	111
2.3.2. Polygalacturonase (PG)	111
2.3.3. Protein measurement	112
2.4. Experimental design for production of pectinases fractions and statistical analysis	112
3. RESULTS	113
4. DISCUSSION	115
4.1. Pectin lyase activity	115
4.2. Polygalacturonase activity	117
4.3. Effect of pectin concentration on pectin lyase activity	119
5. CONCLUSION	119
ACKNOWLEDGMENTS	120
REFERENCES	120

CAPÍTULO I – Introdução Geral

1. Introdução

A demanda por bioprodutos é crescente, principalmente enzimas, que são aplicadas para bioconversão de substâncias em produtos de interesse na agricultura e indústria. Além disso, com o avanço da tecnologia, novas enzimas com ampla gama de aplicações e especificidades vem sendo estudadas e desenvolvidas, também, novas áreas de aplicações ainda estão sendo exploradas (FERREIRA et al. 2009, RAVEENDRAN et al. 2018).

Dentre as enzimas comercialmente produzidas destacam-se as pectinolíticas, que são extensivamente utilizadas nos vários setores da biotecnologia industrial como a indústria de vinhos; alimentícia; bioetanol; de papel para clarificação de polpa e reciclagem de papel usado; no processamento de frutas e vegetais, chá e café, ração animal; extração de óleo vegetal e lavagem de fibras vegetais e, também, no tratamento de águas residuárias provenientes dos processos agroindustriais contendo material rico em pectina (GARG et al., 2016; AMIN et al., 2018; PATIDAR et al., 2018; VERMA et al., 2018).

Pectinases comerciais ainda enfrentam restrição quanto as características físico-químicas relacionadas a tolerância térmica e estabilidade ao pH para determinados processos. Diante disso, a busca por novas fontes microbianas para secreção de pectinases mais estáveis e eficientes na catalise enzimática de diferentes processos é frequente. Também, o estudo das condições de fermentação que promovam maior produção enzimática se faz necessário (SANTIAGO et al. 2016, REBELLO et al. 2017, RAVEENDRAN et al. 2018).

Neste capítulo serão abordados conceitos sobre as pectinases fúngicas, tais como, classificação e modo de ação, as principais fontes microbianas de pectinases, os processos de obtenção e as condições que afetam síntese de pectinases extracelulares. Também será mostrada a importância do uso de enzimas microbianas nos setores agrários e industriais, bem como, a situação atual do mercado de enzimas e suas perspectivas. Todas essas informações abordadas no capítulo 1 serão úteis para entendimento e discussão do capítulo 2, em que buscou-se avaliar o potencial de produção de pectinases por três fungos filamentosos: *A. niger*, *C. cladosporioides* e *T. viride* via fermentação submersa. E, dessa forma, objetivou-se produzir um concentrado enzimático com elevada atividade pectinase para ser estudado no processamento de alimentos e bebidas.

2. Referencial Teórico

2.1. Mercado de enzimas microbianas

O mercado de enzimas vem apresentando um crescimento significativo nos últimos anos devido a demanda por tecnologias eficiente associadas a ampla aplicabilidade nos mais diversos setores da agroindústria a nível internacional. Enzimas microbianas têm sido alvo predominante nas indústrias devido sua estabilidade, atividade catalítica e facilidade de produção e otimização, sendo capazes de reduzir o tempo de processamento, consumindo pouca energia, com menor custo e ecologicamente amigável, sem gerar substâncias tóxicas. (SANTIAGO et al. 2016; SINGH et al. 2016).

O mercado global de enzimas industriais atingiu cerca de US \$ 4,2 bilhões em 2014 e com estimativas de desenvolvimento e crescimento anual (CAGR) de aproximadamente 7% no período de 2015 a 2020, atingindo quase US \$ 6,2 bilhões (GLOBAL INDUSTRY REPORT, 2016). Em 2019 foi avaliado em US \$ 9,9 bilhões mostrando uma taxa de crescimento acima da prevista. Estimativas recentes indicam que o mercado global de enzimas industriais deve atingir a cifra de US \$ 17,2 bilhões até 2027 e a cada ano consecutivo é observado um aumento significativo das taxas de crescimento de 7,1%, (CAGR) (GLOBAL INDUSTRY REPORT, 2020).

Os países da Europa, Oriente Médio e África (EMEA) representaram 35% da participação global no mercado de enzimas registrado em 2016. Pesquisas recentes revelam um forte crescimento de mercado projetado para a América do Norte e Ásia-Pacífico até 2021, com expectativa de ultrapassar os países da região EMEA (CHAPMAN et al. 2018).

Os setores de alimentos e bebidas, biocombustível, a alimentação animal e a limpeza doméstica foram os responsáveis por impulsionar esse crescimento no mercado de enzimas industriais (PANDA et al., 2016). Além disso, segundo o relatório da Grand View Research em 2020, está previsto que a região Ásia-Pacífico registre uma notável taxa de crescimento anual de 8,1% nos próximos anos, devido ao aumento do consumo de alimentos e bebidas, detergentes e ração animal na região (GLOBAL INDUSTRY REPORT, 2020)

As hidrolases, oxidoredutases, transferases e liases são as enzimas relevantes do mercado. Hidrolases são responsáveis por dois terços da participação total do mercado,

com predomínio nas indústrias de alimentos, bebidas e detergentes. Dentre as hidrolases, proteases e carboidrases apresentaram maior participação no mercado em 2017, segundo Allied Market Research, 2018. Oxidoredutases são os segundos maiores geradores de receita do mercado e transferases e liases estão em acessão, com previsão de crescimento de aproximadamente 7,3% na CAGR entre 2018 e 2024 para o segmento de liase (ALLIED MARKET RESEARCH, 2018).

O mercado de enzimas microbianas é liderado globalmente pelas empresas Novozymes (Dinamarca), seguido da Dupont (EUA), BASF (Alemanha) e DSM (Holanda) (GRAND VIEW RESEARCH, 2016), as quais possuem filiais em vários países, incluindo Brasil. Países europeus e os EUA se destacam como maiores produtores e consumidores de enzimas, sendo essas destinadas aos seguintes segmentos da indústria: 34% detergentes, 28% alimentos e bebidas, 18% bioenergia, 15% agricultura e ração animal e 7% enzimas técnicas e farmacêuticas (NOVOZYMES, 2017). Atualmente, o segmento de alimentos e bebidas dominam o mercado de enzimas industriais com previsão de crescimento contínuo uma vez que a população mundial deverá crescer de 6,9 bilhões para 9,1 bilhões e a demanda por alimentos deverá aumentar em 70% até 2050 (UNDESA, 2014).

O mercado brasileiro é essencialmente importador de enzimas, apesar disso, o Brasil é o país de maior destaque na produção de enzimas entre os países da América Latina (MDIC, 2012). Aliás, por possuir maior abundância de matéria orgânica e diversidade biológica (MUSSATTO et al., 2007, VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018) o Brasil tem potencial para ser maior produtor e competir no mercado internacional.

No Brasil o mercado de enzimas é caracterizado principalmente por carboidrases, proteases, lipases, pectinases com aplicações nos processos de panificação, laticínios e alimentos processados, tais como sobremesas congeladas, carnes de aves e frutos do mar, suco da fruta ou bebidas fermentadas como vinho, café e outras (MORDOR INTELLIGENCE, 2019). Entretanto, nos próximos anos espera-se uma demanda por enzimas agrícolas, devido a tendência pelo consumo de alimentos naturais e orgânicos, juntamente com a crescente conscientização sobre o uso de agroquímicos (MORDOR INTELLIGENCE, 2020).

Vários fatores têm impulsionado o mercado de enzimas microbianas dentre eles a demanda de bens de consumo, necessidade de redução de custos, esgotamento de recursos

naturais e segurança ambiental predominam (CHOI et al. 2015). Visto o rápido crescimento da população global associado à exaustão dos recursos naturais, as perspectivas para o mercado de enzimas microbianas são de crescimento contínuo no setor de alimentos para atender a demanda global de forma ecologicamente sustentável. Assim, a tendência é a priorização do uso de produtos químicos de base biológica no lugar dos produtos químicos convencionais com flexibilidade de aplicação no mais diversos setores, principalmente no agroindustrial que é responsável por alimentar o mundo, mas que pode gerar grandes quantidades de resíduos no ambiente.

2.2. Aplicações industriais das pectinases

Enzimas microbianas são biocatalizadores com elevada eficiência nos processos de bioconversão de substratos, possuem propriedades catalíticas não tóxicas, oferecendo segurança, economia e um processo de produção ecologicamente adequado, o que os tornam alvo para aplicações no setor agroindustrial, substituindo métodos químicos (GARG et al 2016, SINGH et al. 2016).

Pectinases são amplamente utilizadas no setor industrial como no processamento do suco da fruta, do vinho, chá, café, na extração de óleos vegetais, na fabricação de tecidos, branqueamento de papel e celulose, dentre outros (GARG et al. 2016). Nos últimos anos tem se observado uma crescente demanda global para uso dessas enzimas, especialmente, na indústria de alimentos devido a necessidade de aumentar a eficiência de filtração e extração de produtos ricos em pectina (REBELLO et al. 2017).

No processo de extração de sucos, durante a etapa de prensagem das frutas é comum observar um aumento da viscosidade com a presença de partículas suspensas. Esse material suspenso, rico em pectina, dificulta os processos de extração e filtração do suco por métodos mecânicos, dessa forma, para aumentar a eficiência do processamento de suco da fruta as pectinases são adicionadas. Essas enzimas atuam diminuindo a viscosidade e turbidez, aumentando extração, a pigmentação e a clarificação do suco, podendo reduzir em até 50% o tempo de filtração do produto final (KASHYAP et al., 2001, SOUZA et al., 2003; UENOJO; PASTORE 2007, SAADOUN et al. 2013, SANTI; BERGER; DA SILVA 2014).

No processamento do vinho, o tratamento enzimático de clarificação é realizado no mosto antes do início da fermentação alcoólica para melhorar as características sensoriais e visuais do vinho branco (REDDY; REDDY 2009). Um conjunto de pectinases com β -glucanases e hemicelulases, têm sido utilizadas na produção de vinho para melhorar maceração da casca e aumentar a extração de pigmentos facilitando a clarificação e a filtração do mosto e aumentando a qualidade e a estabilidade do vinho (UENOJO; PASTORE 2007). Pectinases comerciais com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectinametilesterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (GARG et al. 2016).

Pectinases, celulasas e hemicelulasas têm sido utilizadas em biorrefinarias para degradar polissacarídeos presentes na parede celular de resíduos agroindustriais. Esses resíduos são processados até a redução em açúcares simples para que possam ser convertidos em bioetanol ou usado como açúcares fermentáveis (COLLARES et al. 2012; HOSSAIN et al. 2011, BIZ et al. 2014). Para substituir o uso de solventes orgânicos com potencial cancerígeno na extração de óleos vegetais, a combinação dessas três enzimas tem sido utilizada. Em um processo aquoso elas atuam por degradação dos componentes da parede celular, permitindo a extração máxima de óleos (KASHYAP et al. 2001).

Na indústria têxtil a combinação de pectinases com amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas substituindo a soda cáustica é utilizada na biodegradação do algodão e resultam em tecidos com propriedades superiores e excelente desempenho na etapa de tingimento (WANG et al. 2007, KALANTZI et al. 2010). As pectinases atuam na degradação da camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais (GARG et al. 2016).

No processamento de chá as pectinases atuam sobre a pectina presente nas paredes celulares das folhas de chá, resultando em uma fermentação mais rápida com presença de aromas característicos e em uma mínima formação de espumas no conteúdo em pó usado para fazer chás instantâneos (PRAVEEN; SUNEETHA 2014).

No processo de despulpamento do café (via úmida) pectinases são adicionadas nos tanques para remoção de mucilagem (GARG et al. 2016). O tratamento enzimático de desmucilagem é uma alternativa interessante para produtores que processam grandes quantidades de café despulpado. A partir dele o produtor consegue desmucilar grandes

quantidades de café em menos tempo, comparado aos métodos mecânicos tradicionais, além de manter a preservação das qualidades intrínsecas dos grãos, os lotes mais homogêneos e economizar água e energia (LIN et al. 2010).

A enzima comercial *Pectinex Ultra SP-L*, produzida pela Novozymes, é a mais utilizada no processamento do café despulpado. Após o processo de descascamento os grãos seguem para um tanque com água onde o tratamento enzimático é realizado. Dentro do tanque as enzimas catalisam a quebra da molécula de pectina removendo toda a camada de mucilagem do grão e ao final de 6 horas de tratamento é possível obter o café despulpado (NOVOZYMES, 2019). Esse processo ocorre em tanques de fermentação a temperatura ambiente, normalmente entre 20 a 35 °C em condições ácidas. Quando não se adota o tratamento enzimático a remoção da mucilagem ocorre por fermentação com 20 horas ou mais (24 a 36 horas) de duração (BORÉM et al. 2012).

O café é um dos produtos primários mais comercializados no mundo e é uma das bebidas populares mais consumidas, por isso, vêm ganhando status de "speciality" no mercado internacional, em razão das exigências cada vez maiores dos consumidores (SINDICAFÉ-MG, 2019). Além de preços mais competitivos, os consumidores buscam produtos que possuam características da bebida e aroma específicos. O processamento do café pela via úmida é uma alternativa que permite reduzir os custos com a operação de secagem dos grãos e garantir uma bebida de melhor qualidade (CHALFOUN & PIMENTA, 2009, MESQUITA, 2016, DURÁN et al., 2017, OLIVEIRA et al., 2018), dessa forma, pectinases são alvo de estudos nestes processos.

Pectinases secretadas por fungos filamentosos apresentam estabilidade em determinadas faixas de pH e temperatura, sendo diferente entre as frações secretadas: Pectina metil esterases (PME), Pectina liases (PL) e Poligalacturonases (PG). PME e PL são estáveis em uma faixa de pH variando de 5 a 10 e 4 a 9, respectivamente. Enquanto, PG são mais estáveis em pH ácido de 2,5 a 5, podendo ser desnaturada em pH superior a 5. Apesar das diferenças relatadas quando ao pH, todas conseguem se manter ativas e estáveis em temperaturas máximas de até 40 a 60 °C, mas a ótima atividade catalítica ocorre na faixa de 20 a 30 °C (DELGADO et al. 1993, ACUNA-ARGUELLES et al. 1995, SILVA et al. 2002, REBELLO et al. 2017, PAGARRA et al. 2018, SANDRI; SILVEIRA, 2018).

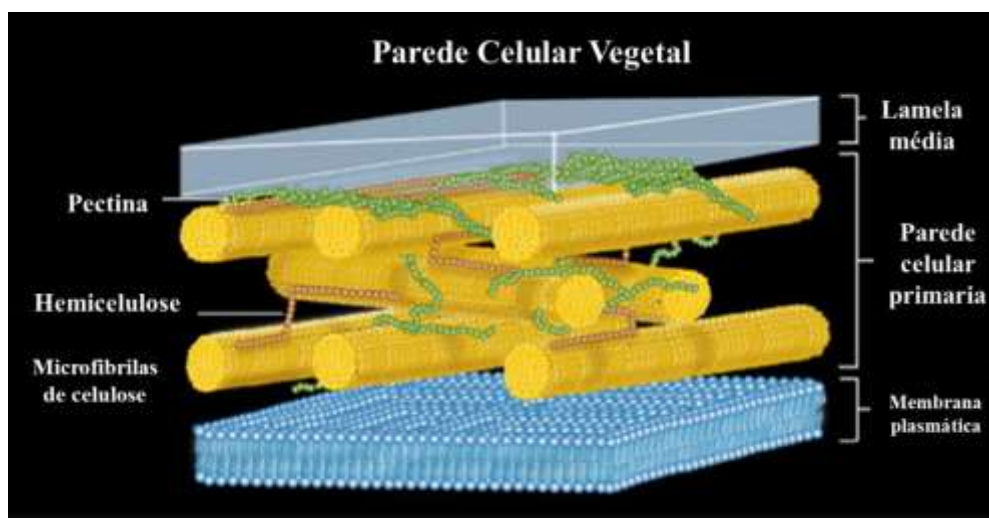
Bastos (2012), entretanto, mostrou que as três enzimas produzidas por *C. cladosporioides* apresentaram estabilidade máxima em pH ácido, entre 3,5 a 5 e temperaturas de 25 a 35 °C. Dessa forma, divergências na estabilidade das frações enzimáticas de pectinases são relatadas, o que pode ser problemático quando há necessidade da ação conjunta das frações no processo, por exemplo de PME e PG.

As aplicações das pectinases no setor agroindustrial são amplas e cada processo ocorre em condições específicas, portanto, há uma demanda por enzimas que trabalhem em uma ampla faixa de pH e temperatura para atender a variedade de processos industriais. Frequentemente, novas enzimas vêm sendo investigadas com a finalidade de melhorar as propriedades físico-químicas, no que diz respeito as características de estabilidade enzimática quando submetida às condições de processamento, tais como de temperatura, pH, presença de íons metálicos e outros componentes específicos do processo industrial (CARVALHO, 2016, REBELLO et al. 2017, AMIN et al. 2018). Assim, a busca por novas fontes microbianas, o conhecimento das condições de produção, bem como, o estudo das propriedades físico-químicas das enzimas secretadas por elas a fim de atender essas características vêm sendo incentivados.

2.3.Substâncias pécticas

As substâncias pécticas compõem um grupo complexo de polissacarídeos ácidos, heterogêneos, carregados negativamente e de alta massa molecular que estão presentes na matriz celular entre a parede primária e a lamela média de frutos e vegetais na forma de pectato de cálcio e de magnésio (Figura 1). Os polissacarídeos da parede são divididos em celulose, hemicelulose e pectina. Esta última, é composta por resíduos de ácido galacturônico ligados entre si por ligações α -1,4, em uma cadeia linear ou ramificada. A porção linear denominada homogalacturonana é parcialmente esterificada e a porção ramificada apresenta cadeias laterais formadas principalmente por açúcares como ramnose, galactose, arabinose e xilose (BE MILLER, 1986, GUMMADI & PANDA, 2003; JAYANI et al., 2005; YAPO, 2011; SHARMA et al., 2013).

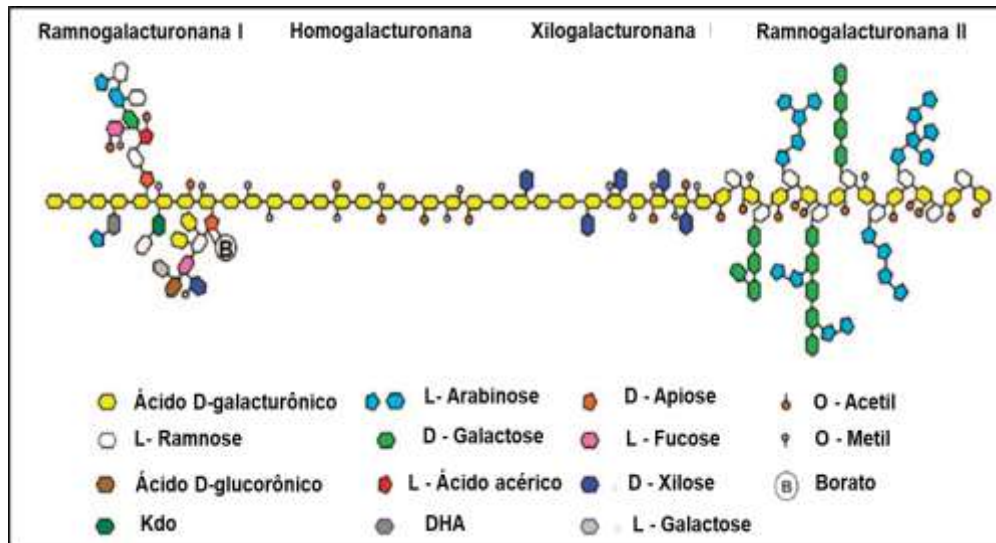
Figura 1 – Representação da estrutura da parede celular de plantas.



Fonte: Sigma, 2019

Os quatro principais polissacarídeos pécnicos que compõem a estrutura da pectina são, portanto, denominados homogalacturonana (HGA), ramnogalacturonana I (RGI), ramnogalacturonana II (RGII) e xilogalacturonana (XGA) (Figura 2). HGA é um homopolímero formado por resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4 e metilesterificados no carbono 6. O RGI é composto de uma cadeia principal, com formato de uma espinha dorsal, que apresenta unidades repetidas do dissacarídeo [α -1,4-GalA – α -1,2-Rha] e cadeias laterais nas quais os resíduos de ramnose são frequentemente substituídos por unidades de galactose e arabinose. Diferente de RGI, a cadeia principal de RGII, por sua vez, apresenta um pequeno trecho de HGA com quatro cadeias laterais compostas de monossacarídeos com ligações distintas. XGA, entretanto, é formado por resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4 e algumas cadeias substituídas por resíduos β -1,3-D-xilose únicos que podem ser substituídos por resíduos β -1,4-D-xilose adicionais (SCHOLS et al. 1995, MATSUNAGA et al. 2004, O'NEILL et al. 2004, SCHELLER et al. 2006, CAFFALL; MOHNEN, 2009, VENKATANAGARAJU; DIVAKAR, 2017).

Figura 2 – Estrutura da pectina. Legenda: Kdo: ácido 3 deoxi-mano-2-octulosônico, DHA: ácido 2-ceto-3-desoxi-lixo-2-heptulosárico.



Fonte: SCHELLER et al. 2006

As substâncias pécnicas podem ser encontradas de formas diferentes nas células vegetais. A American Chemical Society classificou em quatro tipos principais, de acordo com a modificação da cadeia central: protopectina, ácido pectínico, ácido pécnico e pectina, sendo estes três últimos, total ou parcialmente solúveis em água (JAYANI et al., 2005).

Além da solubilidade em água, essas substâncias se diferem também pelo grau de metoxilação da molécula. A protopectina é uma substância pécnica insolúvel em água e que representa a maior parte da pectina dos frutos imaturos. Os ácidos pécnicos são ácidos poligalacturônicos com quantidade desprezível de grupos metoxílicos e seus sais são os pectatos. Os ácidos pectínicos são também ácidos poligalacturônicos, porém com quantidades significativas de grupos metoxílicos, grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos, e sais de pectinatos. A pectina é um material solúvel com pelo menos 75% dos grupamentos carboxílicos metilados (KASHYAP et al., 2001, UENOJO; PASTORE 2007).

Algumas formas de pectina são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos vegetais pois conferem rigidez e produção à célula vegetal, entretanto, a estrutura química dessas moléculas podem sofrer modificações conforme o estágio de maturação do fruto. É comum observar no início do crescimento vegetal a presença da protopectina nos frutos, na forma de polímeros insolúveis associados às microfibrilas de celulose,

conferindo rigidez ao tecido. Processos bioquímicos relacionados ao amadurecimento do fruto alteram naturalmente a estrutura da pectina. Essas alterações envolvem reações de hidrólise parcial da protopectina em substâncias pécticas solúveis, tais como ácido pectínico, ácido péctico e pectina. Assim, com a pectina mais solúvel e menos aderida à parede, é possível observar modificações visuais e sensoriais no tecido, como amolecimento (KASHYAP et al., 2001, AHMED et al. 2016, GHOSH et al. 2016).

As substâncias pécticas podem ser degradadas pela ação simultânea de várias enzimas pectinolíticas: as pectinametilesterases, poligalacturonases, pectato liases e pectina liase, para liberar ácidos galacturônicos e seus oligômeros (COMBO et al. 2012). São necessárias pectinases com diferentes mecanismos de ação, uma vez que a estrutura da pectina na parede celular é complexa e heterogênea, podendo estar presente de diferentes formas (GUMMANDI; PANDA, 2003).

2.4. Pectinases: Classificação e mecanismo de ação das pectinases

As pectinases são um grupo de enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécticas presentes no material vegetal, ou seja, elas promovem a desconstrução desses polissacarídeos presentes na lamela média da parede celular primária dos frutos e vegetais, como por exemplo, do café (DARTORA et al., 2002, UENOJO & PASTORE, 2007). Essas enzimas são responsáveis por clivar tanto a pectina, como outros polissacarídeos pécticos, em resíduos de ácido galacturônico, portanto, cada pectinase vai atuar em um ponto dessa cadeia (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2011; SUHAIMI et al., 2016, ROCHA, 2018).

De maneira geral, as pectinases podem atuar por meio da despolimerização da pectina por reações de hidrólise e transeliminção, catalisando a quebra de ligações α -1,4 da cadeia principal. Podem agir como desmetoxilantes promovendo a remoção dos resíduos metoxilas, bem como, por reações de desesterificação da pectina e ácido péctico, isto é, hidrolisam a cadeia éster entre os grupos carboxila e metil da pectina (SAKAY et al., 1993; KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005).

As pectinases são classificadas de acordo com a preferência pelo tipo de substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), mecanismo de ação (desesterificação, transeliminção ou hidrólise) e pelo local de clivagem no esqueleto do ácido

galacturônico, que pode ser de forma aleatória no interior dos resíduos (endo) e sucessiva a partir da extremidade não redutora da pectina (exo) (ALKORTA et al. 1998). Existem, portanto, as protopectinases (PPases), pectinametilesterases (PMEs) e as despolimerases que incluem as liases, como pectina liase (PL) e pectato liases (PGL) e as hidrolases, como poligalacturonases (PG) e polimetilgalacturonases (PMG).

As protopectinases (PPases) são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise da protopectina, originando moléculas mais solúveis em água como ácido péctico e pectina, entretanto, não são produzidas em abundância e possuem pouco interesse para aplicações industriais (ALKORTA et al. 1998; COMBO et al. 2012). Elas são classificadas de acordo com o sítio de clivagem: PPases do tipo A atuam na parte interna da molécula de ácido poligalacturônico da protopectina e as PPases do tipo B atuam na parte externa sobre as cadeias de polissacarídeos conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico e constituintes da parede celular (JAYANI et al., 2005).

A pectinametilesterase (PME) é uma esterase de ácido carboxílico pertencente ao grupo das hidrolases que catalisam a desesterificação das ligações éster metílico da pectina para liberar pectinas ácidas e metanol (PATIDAR et al. 2018). A desesterificação da pectina ocorre linearmente ao longo da molécula e durante a reação ocorre a quebra da molécula da água e a adição de um hidrogênio a um carbono da ligação e adição do grupo hidroxila a outro carbono, produzindo metano e pectina com baixo grau de metoxilação. A reação cessa antes que todos os grupos carboxilas sejam removidos (KASHYAP et al., 2001, UENOJO; PASTORE 2007).

Elas são muito úteis em processos industriais devido sua capacidade de atuar em substratos com alto grau de metoxilação (SHEN et al. 1999). A pectina liberada em sua reação possui baixo grau de metoxilação e, portanto, pode ser degradada por ação de outras pectinases, como poligalacturonases e liases (GUMMADI & PANDA, 2003, JAYANI et al., 2005). Entretanto, para indústria de alimentos são pouco recomendadas por liberar metanol neste processo que além de ser tóxico afeta as propriedades sensoriais dos alimentos (MARTOS et al. 2009).

As pectinases despolimerases catalisam a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 entre os monômeros do ácido D-galacturônico (Figura 3). Elas podem ser classificadas em hidrolases e liases, ambas podem apresentar ação endo agindo dentro da molécula de pectina hidrolisando aleatoriamente as ligações e ação exo atuando por hidrólise

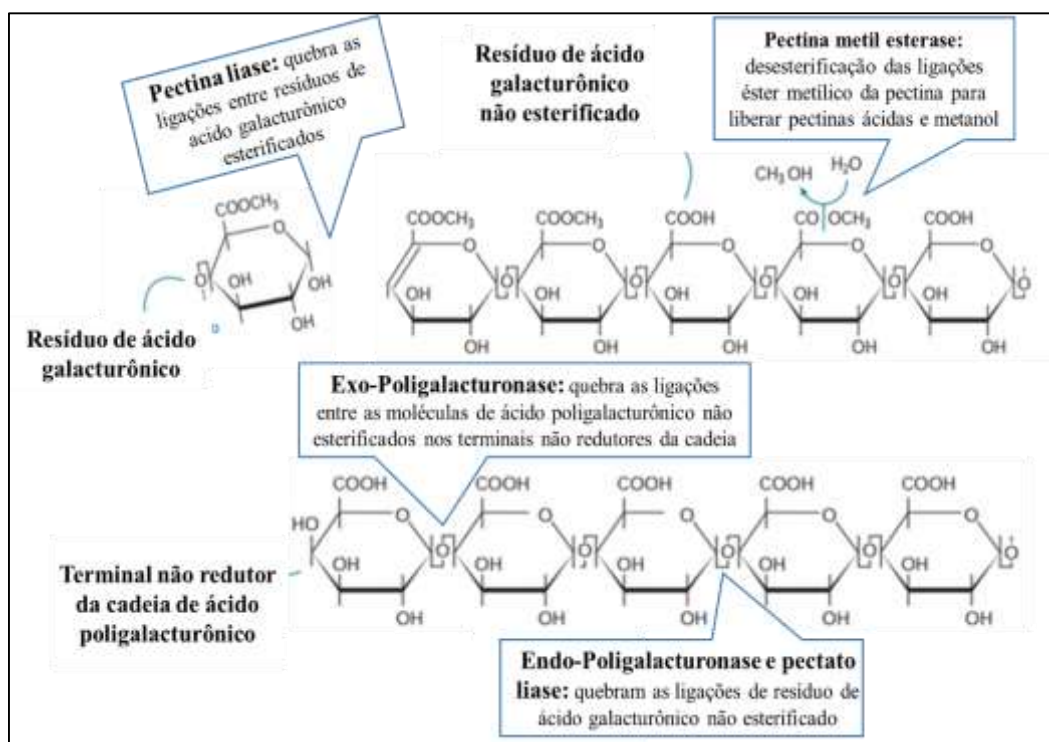
sequencial a partir da extremidade redutora ou não redutora da molécula de pectina. Entre as hidrolases destaca-se a poligalacturonase (PG) que catalisa a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas α -1,4 entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia da pectina e essa reação ocorre com a introdução de água pela ponte de hidrogênio (Figura 3). As poligalacturonases podem ser endo-poligalacturonase que hidrolisam aleatoriamente as ligações α -1,4 entre as unidades de ácido poligalacturônico ao longo da cadeia ou exo-poligalacturonase que hidrolisam sequencialmente as ligações do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora liberando ácidos galacturônicos livres. A ação de PG pode ser inibida na presença de substratos altamente metoxilados, uma vez que para realizar a hidrólise ela necessita da presença de grupos carboxílicos livres na molécula da pectina (JAYANI et al., 2005, SAADOUN et al. 2013, PATIDAR et al. 2018).

Existem ainda as polimetilgalacturonases (PMG) que são hidrolases que catalisam a remoção dos grupos metil, atuando nos finais redutores e no interior das cadeias pecticas com alto grau de esterificação, reduzindo seu peso (JAYANI et al., 2005).

As liases, denominadas transeliminases, atuam por um mecanismo de β -eliminação, no qual elas rompem as ligações glicosídicas e removem moléculas, como o hidrogênio, do substrato. Entre as liases destacam-se pectato liase (PGL) e pectina liase (PL) (UENOJO; PASTORE 2007).

A pectina liase catalisa a quebra da molécula de pectina por um mecanismo de β -eliminação de hidrogênio, clivando ligações glicosídicas no carbono 4 e simultaneamente eliminando hidrogênio do carbono 5. A pectato liase catalisa a β -eliminação das ligações glicosídicas α -1,4 internas entre os resíduos do ácido pectico. Ambas têm ação endo catalisando de forma aleatória no interior dos resíduos e ação exo catalisando de forma sucessiva a partir da extremidade não redutora da pectina (JAYANI et al., 2005, PATIDAR et al. 2018).

Figura 3 – Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas



Fonte: (NCBE, 2000) adaptada.

As pectinases comerciais são compostas por uma mistura das enzimas pectinametilesterase, poligalacturonase e pectina-liase (REBELLO et al. 2017), entretanto, as duas últimas são mais interessantes para biotecnologia industrial (HOONDAL et al., 2002).

A PL é capaz de catalisar a β -eliminação das ligações glicosídicas de pectinas com baixo e alto grau de esterificação e consegue fazer isso em condições ácidas, se mantendo estável em pH baixo e temperaturas elevadas (ALANA et al. 1990). Considerando que ela age diretamente sobre a pectina sem necessidade da ação prévia de PME, frequentemente, tem sido estudada como enzima de interesse comercial para aplicação na indústria de alimentos (PICCOLI-VALLE et al. 2001, MALLER et al. 2012, KAUR et al. 2017).

2.5. Microrganismos produtores de pectinases

As pectinases são produzidas por diferentes microrganismos, tais como, os fungos, leveduras e as bactérias que quando cultivados pelo processo de fermentação suas células

são fontes potenciais de enzimas (ADAPA et al. 2014; GARG et al. 2016; REBELLO et al. 2017). Microrganismos são considerados fontes interessantes de biocatalisadores devido à sua biodiversidade generalizada, crescimento rápido e menor vida útil e suscetibilidade às manipulações genéticas (AMIN et al. 2019).

As fontes fúngicas são as mais utilizadas no setor industrial já que esses microrganismos sintetizam enzimas extracelulares que são mais fáceis de serem recuperadas e extraídas ao final da fermentação (BLANDINO et al. 2001). Além disso, suas características de reprodução e crescimento permitem atuar em uma ampla variedade de substratos tornando-os excelentes decompositores de matéria orgânica (BIZ et al. 2016; ORTIZ et al. 2016).

Atualmente, mais de 30 gêneros diferentes de bactérias, fungos e leveduras são reconhecidos como produtores de pectinases com potencial de aplicação industrial (FAVELA-TORRES et al. 2006). Dentre os mais relatados na literatura como bons produtores de pectinases, estão os fungos do gênero *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, e as espécies *Trichoderma viride*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium asiaticum*, *Mucor*, *Thermoascus aurantiacus*, *Botrytis cinerea* (BANU et al. 2010; SEIFOLLAH; KHODAVERDI 2013; IRSHAD et al. 2014; AMIN et al. 2017; POLETTO et al. 2017, REBELLO et al. 2017, PATIDAR et al. 2018), os gêneros bacterianos *Bacillus spp.*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* (KASHYAP et al. 2000; GOMES et al. 2011; QURESHI et al. 2012; ROOSDIANA et al. 2013; KAUR et al. 2017; ZHOU et al. 2017), e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*, *Kluyveromyces wickerhamii* e *Kluyveromyces marxianus*, (SCHWAN et al. 2005).

Apesar disso, a maioria das preparações comerciais de biocatalisadores de pectinases é obtida de fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus niger* (Tabela 1), pois eles possuem genes que codificam e expressam poligalacturonases que se diferem em relação à especificidade do substrato, taxa de clivagem e valores ótimos de pH e temperatura para sua atividade (LANG; DORNENBURG, 2000; JACOB, 2009).

Além disso, essa espécie recebe a classificação GRAS (Generally Recognized As Safe) do FDA (Food and Drugs Administration), órgão responsável pelo controle de alimentos e medicamentos nos EUA que reconhece o uso seguro da espécie *Aspergillus niger* e garante a não toxicidade de seus metabólitos (AMIN et al. 2019). De acordo com a Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006 no Brasil, a ANVISA (Agência

Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta as enzimas e as preparações enzimáticas a partir dos microrganismos *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *P. simplicissium*, *R. oryzae* e *T. reesei*, para aplicação em alimentos destinados ao consumo humano.

Tabela 1 – Relação de pectinases comerciais. N/A: não avaliado.

Enzima	Fração	Fornecedor	Fonte	Condições de atuação	
EPG-M2	Endo-PG	Megazyme	<i>A. aculeatus</i>	40°C	pH 5.5
Pectinase	PG	Sigma	<i>A. niger</i>	20-60°C	pH 3.5
Viscosyme L	PG	Sigma	<i>A. aculeatus</i>	25-55°C	pH 3.3 - 5.5
Pectinex 3XL	PG	Sigma	<i>A. niger</i>	50°C	pH 4.7
Pectinex Ultra SP-L		Novozymes	<i>A. aculeatus</i>	< 45° C	pH 4.5 - 6
Novozym 33095	PL/PG	Novozymes	<i>A. aculeatus</i> e <i>A. niger</i>	35-45°C	N/A
Pectinex 100 L Plus	PME	Novozymes	<i>Aspergillus sp.</i>	45°C	pH 4 - 4.5
Pectinase	PME/PG/PL	Biocon	<i>A. aculeatus</i>	55°C	pH 4.5-9
Beisol HP	N/A	CHT	N/A	50°C	pH 1.5 - 5
Pectinase 62L	N/A	Biocatalysts	<i>A. sp</i>	10-55°C	pH 3 - 5
Macer8 FJ	N/A	Biocatalysts	<i>A. sp</i>	40-60°C	pH 3 - 5
Klersyme 150	N/A	DSM	<i>A. niger</i>	60°C	pH 2 - 6
Rapidase Extra fruit	N/A	DSM	<i>A. niger</i>	10-50°C	pH 2.8 - 4

Fonte: Combo et al 2012 modificada.

O tipo de fermentação (sólida ou submersa) e as condições de cultivo (pH, temperatura, fontes de C e N, sais e substâncias indutoras) vão influenciar o crescimento microbiano, bem como a secreção enzimática e as características físico-químicas das enzimas produzidas. Por exemplo, leveduras geralmente não secretam pectina metil esterase (PME), portanto, se tornaram interessantes para aplicação na indústria de alimentos e bebidas (POONDLA et al. 2016, CARVALHO, 2016). Por outro lado, altas atividades de PME são produzidas em fermentações por fungos filamentosos (JOSHI; PARMAR; RANA, 2006).

A produção de pectinases ácidas por fungos e leveduras dos gêneros *Penicillium sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Thermotoga sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*, *Pichia sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Kluyveromyces sp.*, são frequentemente relatadas, enquanto, pectinases alcalinas são mais documentadas

pelos gêneros *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Cryptococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. (JAYANI et al., 2005; ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011, AMIN et al. 2019).

Atualmente, o estudo de novas linhagens produtoras de enzimas com características específicas para aplicação nas áreas de alimentos, saúde humana e animal e bens como papel e indústria têxtil estão sendo incentivados (FERREIRA et al. 2009). Entretanto, vários fatores estão envolvidos na seleção de microrganismos com potencial para produção de pectinases, dentre eles, o tipo de técnica de fermentação, sólida (SSF) ou submersa (SmF), quantidade e tipo de pectinases produzidas, características de pH e termoestabilidade e composição genética da linhagem microbiana (FAVELA TORRES et al. 2006; JACOB, 2009, AMIN et al. 2019).

2.5.1. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é um fungo filamentosos, ascomiceto, saprófita com capacidade de crescimento rápido, tolerância às condições de pH e de secretar uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na decomposição de materiais lignocelulósicos. A espécie *A. niger* pode ser isolada dos solos, plantas, sementes, frutos secos e nozes. Assim, é o fungo cosmopolita mais importante associado à deterioração pós-colheita de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (GAUTAM et al. 2011; CAIRNS, NAI, MEYER, 2018).

Aspergillus niger é um dos mais importantes microrganismos utilizados na biotecnologia para produção de enzimas extracelulares e ácido cítrico. Devido à sua capacidade de produzir ácidos orgânicos extracelulares, alguns deles são comumente aplicados na indústria de alimentos (SCHUSTER et al. 2002). Além do ácido cítrico, ele é reconhecido como fonte rica das enzimas pectinase, lactase, invertase, protease e amiloglucosidase.

Na década de 60, as enzimas α -amilase, celulase, amiloglucosidase, catalase, oxidase, lipase e pectinase produzidas a partir *A. niger* foram consideradas de uso seguro (GRAS) pela FDA na condição de que cepas utilizadas sejam não patogênicas e não toxigênicas e que as boas práticas de fabricação sejam adotadas na produção (POWELL et al. 1994). Entretanto, muitas espécies de *Aspergillus* relatadas na fermentação do café estão relacionadas com a má qualidade da bebida, possivelmente pela produção de enzimas

extracelulares agindo sobre a mucilagem gerando produtos finais como álcool, ácidos acético, butírico, láctico e outros ácidos carboxílicos que podem comprometer as propriedades sensoriais da bebida (CARVALHO, CHALFOUN 1985; CARVALHO et al. 1999; FREITAS, 2000; PIMENTA, VILELA, 2002). Estudos recentes mostram que mais de 80% dos isolados de *Aspergillus* seção *circumdati* são produtores de ocratoxina A (OTA). No café, *A. niger* é o mais frequente da seção *nigri*, no entanto, apenas 10% dos isolados são considerados produtores de OTA (BATISTA; CHALFOUN, 2007, SOUZA et al. 2016, SOUSA et al. 2018). Nesse sentido a caracterização adequada dos isolados estudados ou industrialmente utilizados quanto aos metabólitos produzidos possibilita a exploração industrial desse importante fungo e possíveis efeitos adversos podem ser evitados (GAUTAM et al. 2011).

O farelo de trigo é um dos resíduos industriais mais populares utilizado por muitos pesquisadores para produção de enzimas no SSF, podendo ser misturado com outras fontes de pectina no sistema (PATIDAR et al. 2018). Altos rendimentos de pectinases produzidas por *A. niger* foram relatados em fermentação utilizando substrato composto de 90% de farinha de trigo e 10% de bagaço de cana (SURESH; VIRUTHAGIRI, 2010). A mistura de farelo de trigo com casca de laranja e de limão foi relatada como a melhor combinação de substrato para a produção de pectinase por espécies de *Aspergillus* (ORTIZ et al. 2017).

Muitos estudos relatam a otimização da produção de pectinases utilizando resíduos agroindustriais como substratos alternativos. Ahmed e colaboradores (2016) otimizou o bioprocesso de produção de pectinase, alcançando alta atividade enzimática, com 117 U/mL produzida por *A. niger* em fermentação submersa, utilizando resíduos de casca de laranja como fonte de carbono. Vinte e oito isolados de *A. niger* submetidos a fermentação sólida com resíduos de casca de café, pão, amendoim e uva apresentando índices de atividades pectinase em todos substratos (FERNANDES, 2014). Altas atividades pectinases foram relatadas por Maciel (2009) utilizando palma forrageira e cascas de maracujá como substrato da fermentação sólida. Rocha (2018), obteve boas atividades enzimáticas (38.22 U/g) de pectinases produzidas pela linhagem de *A. niger* IOC 4003 utilizando resíduos de acerola e cajá como substrato da fermentação em estado sólido.

Além de estar presente em vários ambientes facilitando seu isolamento, *Aspergillus niger* é capaz de atuar com sucesso em processos de bioconversão de uma gama de

substratos em produtos de interesse, portanto sua utilização na produção e expressão de proteínas tem sido alvo do setor biotecnológico (GAUTAM et al. 2011).

2.5.2. *Cladosporium cladosporioides*

O gênero *Cladosporium* spp., criado por Link, em 1816, é um dos maiores e mais heterogêneos hifomicetos, com aproximadamente 500 espécies, sendo 15 de ocorrência comum. *Cladosporium* é um ascomiceto que apresenta colônias efusas e ocasionalmente puntiformes, com micélios e conídios coloridos devido à presença de pigmentos escuros, frequentemente de coloração verde oliva, podendo também encontrar-se cores cinzas, amarelo-claro, marrom, negro ou parda, de textura aveludada ou floculosa (KIRK, et al. 2001, MENEZES; PEREZ; LIMA, 2017).

Sua ocorrência é registrada em vários lugares do mundo, estando entre os fungos mais comumente isolados no ambiente ou a partir de qualquer fonte ambiental. É um saprófita frequentemente encontrado nos materiais orgânicos em decomposição, sendo considerado contaminante do ar e dos alimentos e endofítico com funções biológicas na degradação da matéria orgânica dos solos (DIXON; POLAK-WYSS, 1991; DE HOOG et al. 2000; SAN-MARTIN et al. 2005). Uma vez capaz de utilizar diferentes substratos para seu crescimento, tais como madeira, plantas em decomposição, alimentos, solo, palha e têxteis e de secretar compostos bioativos e enzimas extracelulares, se tornou uma fonte de estudo cujo cultivo apresenta baixo custo para aplicações biotecnológicas (ALMATAR; MAKKY 2016).

Muitas espécies de *Cladosporium* são capazes de produzir metabólitos secundários, como antibióticos, ou podem atuar como inseticidas biológicos, particularmente contra insetos que desenvolveram resistência a inseticidas químicos (ABDEL-BAKY; ABDEL-SALAM, 2003). Também tem sido estudado como agente bioprotetor para controle de doenças em campo devido seu potencial antagonista a patógenos e por atuar como um forte competidor a outros organismos. Por exemplo, recentemente *C. cladosporioides* apresentou eficiência no controle de *Magnaporthe oryzae*, patógeno responsável pela doença brusone no arroz, quando inserido em um sistema agroecológico (CHAIBUB et al. 2020). No café, *C. cladosporioides* está associado a bebidas de boa qualidade e tem sido alvo de estudo para utilização como agente antagonista aos fungos toxigênicos associados a efeitos deletérios à qualidade da bebida (PEREIRA et al. 2001). A

pulverização de um produto formulado a base desse fungo, chamado “cladosporin”, reduziu consideravelmente a incidência de fungos toxigênicos no café quando aplicado 60 dias antes da colheita (ANGÉLICO, 2012).

Muitos trabalhos relatam o potencial de *C. cladosporioides* na secreção de compostos bioativos com propriedades antiansiedade, anticonvulsivas, antidepressivas, antiinflamatórias, anticancerígenas (TSOLERIDIS et al.2008; AASTH et al.2013), tais como ácido p-metilbenzóico (SAN-MARTIN et al. 2005), ginsenosídeos Rd, F2, CK e PPD (JIN et al. 2016), peróxido de ergosterol (HUONG et al. 2010), Calfostina (ROTENBERG et al. 1995).

C. cladosporioides também tem sido relatado como fonte enzimas extracelulares de interesse no setor industrial (ALMATAR; MAKKY 2016). A cepa *Cladosporium* sp. NCIM 901 foi eficaz na produção de CMCCase (Endoglucanases) utilizando substratos lignocelulósicos como bagaço (10%) e casca de citros em pó (4,5%) em fermentação submersa com pH inicial 5,5 a 35 °C por 5 dias (MOHAN; KUMAR; REDDY, 2013). *Cladosporium* sp. produziu atividade enzimática de L-asparaginase utilizando resíduos agroindustriais em fermentação em estado sólido (SSF) realizada a 30 °C com pH inicial 5,8 por 5 dias (MOHAN-KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013). Uma e colaboradores (2012) relataram a atividade de invertases produzidas por *C. cladosporioides* em 4 dias fermentação submersa a 30 °C, pH 4 utilizando casca de arroz como única fonte de carbono. *C. cladosporioides* isolado de uma amostra de carvão foi relatado na produção de lacases quando submetido a fermentação sólida a 37 °C e pH 5,6 (HALABURGI, et al. 2011). Recentemente, *C. tenuissimum* isolado do deserto frio indiano foi relatado na produção de lacase em condições psicotróficas, sendo as maiores atividades de lacase obtidas a 14 °C em pH 5,5 (DHAKAR; PANDEY, 2016).

Poucos são os relatos de *C. cladosporioides* na produção de pectinases. Bastos e colaboradores (2013) mostraram o potencial de *C. cladosporioides* na produção de pectina metilesterase (PME) e poligalacturonase (PG) com valores de PG (105,5 U/mL) e PME (1480 U/mL) após 10 dias de fermentação a 28 °C utilizando arroz como substrato. Fernandes, (2014) mostrou que *C. cladosporioides* foi capaz de produzir altas atividades de pectinases em fermentação sólida, utilizando como substrato a casca seca do café: 263-898 U/g de pectina liase após 168 horas de fermentação, 0,28-0,98 U/g de exopoligalacturonase após 96 horas. Também, pouco se sabe sobre as propriedades físico-químicas das pectinases secretadas por ele.

C. cladosporioides tem sido considerado um novo recurso para produção de bioativos naturais e enzimas para aplicações no campo da medicina, indústria de alimentos e agricultura. Por isso, pesquisas têm sido orientadas para investigar novos bioprodutos naturais derivados desse fungo.

2.5.3. *Trichoderma viride*

Trichoderma viride é um ascomiceto, da família Hypocreaceae, saprófita de vida livre que se multiplica rapidamente por reprodução assexuada em diversos substratos (KIRK, 2013). *T. viride* é predominante em todos os solos e em diversos ecossistemas, tais como na agricultura, solos de floresta, pradarias, pântanos e desertos. Também, pode estar presente nos materiais em decomposição, como na serapilheira, madeiras e cascas em decomposição, bem como nos resíduos orgânicos provenientes da agricultura que se encontram em decomposição no solo (HOWELL, 2003).

T. viride sobrevive em locais com diferentes condições climáticas, podendo ser encontrado em zonas de clima temperado ou tropical. Apesar disso, fatores ambientais como umidade, nutrientes, pH, tipo de solo, microbiota e teor de matéria orgânica influenciam a sobrevivência desse fungo no solo ou sua colonização em substratos (BRITO, 2009).

Este microrganismo tem atraído atenção por proporcionar benefícios às plantas, com potencial de biocontrole contra doenças, bioestimulação de compostos de defesa, promoção de crescimento de culturas agrícolas, bem como para a produção de enzimas, metabólitos secundários e medicamentos no setor industrial (KIDWAI; NEHRA, 2017).

As espécies de *Trichoderma* spp. são consideradas biofungicidas contra patógenos transmitidos pelo solo, sementes e área foliar de plantas, além de exibir ação contra uma ampla variedade de fitopatógenos e com potencial de serem desenvolvidos e comercializados como bionematicidas, bioherbicidas e bioinseticidas (SHARMA et al. 2014). A espécie *T. viride* foi relatada no controle biológico de *Rhizoctonia solani* (PANDEY; PUNDIR, 2013), *Alternaria* (KAPOOR, 2008), *Fusarium solani* (JADON, 2009), *Pythium arrhenomanes* (JOHN et al. 2010), *Colletotrichum falcatum* (REDDY; KRISHNAMMA; NARAYANA, 2009), *Sporisorium scitamineum* (SINHA et al 2009), *Botrytis* (MUKHERJEE et al 1997) e *Meloidogyne incógnita* (BHATT et al. 2002).

Diversas atividades biológicas, como micorremediação e micoparasitismo são promovidas por espécies de *Trichoderma* spp. que por meio destas proporcionam o aumento da fertilidade do solo e manutenção da saúde de plantas (AHUJA; BHATT, 2018).

T. viride foi considerado importante na gestão de resíduos agrícolas, com potencial na biodegradação de resíduos como bagaço da cana-de-açúcar, farelo de trigo, cascas e palha de arroz, casca de café, cascas de laranja e frutas cítricas, cobertura de sementes de ervilha, caroço de coco, resíduos florais, serapilheira, resíduos vegetais, folhas de palmeira e serragem (KIDWAI; NEHRA, 2017, AHUJA; BHATT, 2018). Assim, sua capacidade de colonizar diversos substratos é interessante para indústria, uma vez que permite aproveitar resíduos como fonte barata para produção de enzimas microbianas como amilases, celulases, xilanase, protease, lipases, pectinases e metabólitos secundários (JUWON; EMMANUEL, 2012, CORADI et al. 2013, IRSHAD et al. 2014, KANDPAL, 2014, EL BAZ et al. 2018), para produção de bioetanol a partir desses resíduos com a ajuda de β -glucosidases, celulase, celobio-hidrolases e endo- β -1,4-glucanases (PANDEY et al. 2015, BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016, SANTOS et al. 2016).

A bioprospecção de espécies de *Trichoderma* como fonte de bioprodutos, tais como enzimas e metabólitos secundários é, portanto, alternativa promissora que vem sendo frequentemente explorada. Entretanto, formulações comerciais devem ser aprimoradas, padronizadas e desenvolvidas visando novas aplicações agrícolas e industriais, especialmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

2.6. Processos de obtenção de pectinases microbianas

O processo fermentativo industrial para obtenção de enzimas microbianas consiste de etapas upstream (pré-fermentação) que antecedem a operação do reator com o objetivo de manter o sistema nas condições ideais para que as transformações desejáveis aconteçam no reator e etapas downstream (obtenção do produto) que ocorrem após a fermentação com a finalidade de recuperar o produto, passando por etapas de separação e purificação dos produtos obtidos (AQUARONE et al. 2001).

A produção de enzimas pode ocorrer por meio de fermentação sólida (SSF) ou submersa (SmF). Nos processos submersos a biomassa é completamente rodeada por um

meio de cultura líquido, utilizando normalmente substratos solúveis em água. Entretanto, na fermentação sólida ou semi-sólida o crescimento de microrganismos se dá em materiais sólidos úmidos em ausência de água livre abundante entre as partículas (BON et al. 2008, GARG et al. 2016).

A principal diferença entre SSF e SmF está na capacidade de mistura dos sistemas. A SmF é um sistema mais homogêneo, igualmente distribuído nos fermentadores onde espera-se conter a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos. Na SSF a alta viscosidade limita as condições de homogeneidade e difusão dos nutrientes e metabólitos, sendo necessária uma excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular (GERVAIS; MOLIN, 2003, PALMA, 2003, GRAMINHA et al. 2008).

A técnica de fermentação pode influenciar a composição das pectinases produzidas por fungos filamentosos (TARAGANO, PILOSOF 1999). A escolha do tipo de fermentação vai depender de qual microrganismo será utilizado e em qual processo ele se adequa melhor para produzir os complexos enzimáticos desejáveis.

O crescimento dos fungos filamentosos em substratos sólidos em baixa atividade de água é mais rápido: suas hifas podem crescer nas superfícies e penetrar nos espaços entre as partículas, colonizando os substratos sólidos que são ambientes similares ao habitat natural ao qual esses microrganismos estão adaptados. Na SmF, entretanto, os nutrientes e o inóculo fúngico estão submersos na água e, portanto, requerem um tempo maior de adaptação a esse novo ambiente (PANDEY, 2003; HOLKER et al. 2004; GRAMINHA et al. 2008; PATIDAR et al. 2018).

Apesar dos fungos filamentosos se desenvolverem melhor em substratos sólidos, quando se trata da produção de enzimas em escala industrial os processos submersos descontínuos (batelada) são mais adotados (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012, DOS SANTOS et al. 2018). Os processos descontínuos são interessantes quando a produção de metabólitos não está associada ao crescimento, além de oferecer algumas vantagens para produção em grande escala, como por exemplo, propiciar melhor controle microbiológico reduzindo os riscos de contaminação, melhor rendimento e garantem menor taxa de mutação genética (AQUARONE et al. 2000, FERREIRA et al. 2009).

Com avanço tecnológico e criação de biorreatores, recentemente, o uso da SSF tem sido incentivado, se tornando alvo de estudos no aproveitamento de substratos e resíduos orgânicos para produção de enzimas microbianas a nível industrial (PATIDAR

et al. 2018). Porém, o uso de SSF no âmbito industrial possui ainda alguns obstáculos, tais como limitações quanto à regulação do processo, visto que as condições de fermentação fortemente heterogêneas e, portanto, podem não satisfazer a reprodutibilidade dos resultados (HOLKER; LENZ, 2005, DOS SANTOS et al. 2018).

No SSF, a agitação é necessária para evitar a formação de aglomerados, remover o calor gerado na fermentação pelo metabolismo microbiano evitando o superaquecimento do meio e para misturar o oxigênio transferido para o meio sólido. No entanto, esse processo pode afetar a natureza da partícula e danificar o micélio fúngico. Considerando que uma das maiores limitações para ampliação da escala de produção de enzimas em processos industriais está diretamente relacionada às dificuldades de controlar e medir algumas das variáveis do processo, o sucesso da implementação do SSF tem sido grande desafio (VON MEIEN; MITCHELL, 2002 PANDEY, 2003, TEIXEIRA et al. 2019).

Os processos industriais de fermentação submersa para produção de enzimas são desenvolvidos em biorreatores agitados mecanicamente, os quais permitem um maior controle dos parâmetros operacionais, tais como aeração, pH, temperatura, umidade, além de permitir maior eficiência de absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pela célula (BON et al. 2008). Esse sistema é, portanto, mais utilizado uma vez permite maior homogeneidade, transferência de calor e massa mais eficientes. Além disso, permite maior facilidade do controle e monitoramento das condições de fermentação, as quais se fazem necessárias para se obter melhores rendimentos. Biorreatores com sensores de medidas e sistemas de refrigeração e aquecimento são utilizados e, para isso, adotam-se comumente eventos de agitação monitorando a velocidade de mistura do sistema no intuito de evitar problemas, tais como, formação de aglomerados e superaquecimento do meio (BIZ et al., 2016; COLLA et al., 2016; PITOL et al., 2016; FINKLER et al., 2017; POLETTO et al., 2017).

Vários fatores influenciam a biossíntese de pectinases por microrganismos, dentre eles o tipo de substrato, tempo de incubação, a concentração do inóculo, pH, temperatura presença de inibidores/ativadores e adição de fontes de carbono e nitrogênio são os mais estudados (AMIN et al. 2017, REBELLO et al. 2017). Quando um novo microrganismo é identificado com alta atividade pectinase extracelular esses fatores devem ser otimizados com foco na maximização da produção enzimática associada à relação custo-benefício da produção (GARG et al. 2016). É importante ressaltar que esses parâmetros

operacionais do bioprocesso são rigidamente controlados, não somente para assegurar a manutenção das condições ótimas de crescimento do microrganismo produtor, mas também para preservar a atividade biológica da enzima produzida (BON et al. 2008, CHAPMAN et al. 2018).

As etapas downstream (purificação) consistem em processos de separação para remover substâncias tóxicas e ou metabólitos indesejáveis, etapas de concentração para reduzir o volume da solução e facilitar o manuseio nas etapas de purificação, quando se quer obter uma preparação enzimática com maior grau de pureza e outras operações (AQUARONE et al. 2001).

A escolha de realização de etapas downstream deve ser considerada a depender da aplicação final do produto e da relação custo benefício da produção. Se possível deve ser evitada uma vez que podem elevar os custos do processo de produção em termos de equipamento, mão de obra e perda da atividade enzimática. Algumas enzimas comerciais, por exemplo, são constituídas apenas do extrato fermentado concentrado com adição de aditivos para estabilizar a atividade enzimática (BON et al. 2008). Dessa forma, o grande desafio da produção de enzimas em grande escala é simplificar as etapas do processo, para torná-lo mais econômico, e ao mesmo tempo manter o potencial de ação das enzimas produzidas.

2.7. Fatores físico-químicos que influenciam a produção de pectinases

O sucesso do bioprocesso enzimático é influenciado basicamente pelos seguintes parâmetros operacionais: o tipo e a concentração do substrato, tempo de incubação, a concentração do inóculo, pH, temperatura, umidade, agitação/aeração, presença de inibidores/ativadores e adição de fontes de carbono e nitrogênio; os quais devem ser compreendidos, controlados e monitorados efetivamente assegurando a ocorrência da fermentação desejável (BRAVO et al. 2000, AMIN et al. 2017, REBELLO et al. 2017, VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018).

O pico de produção de metabólitos desejáveis dependerá da capacidade de adaptação de cada microrganismo às condições de crescimento em que são submetidos. No processo de fermentação por batelada os metabólitos desejados são produzidos durante o crescimento celular até a fase estacionária. Quando o microrganismo é incubado

em um novo meio de cultura é necessário um tempo de adaptação para atingir o crescimento exponencial da população e iniciar as atividades metabólicas para liberar enzimas ou outros produtos através do metabolismo primário. Essa fase pode ser influenciada pelas condições ambientais mencionadas acima, bem como, pelas características genéticas do próprio organismo (ASGHER et al. 2016, AMIN et al. 2017).

Os carboidratos são fonte de energia indispensáveis para o bom funcionamento do metabolismo fúngico, atuando como precursores para síntese de todos os compostos orgânicos necessários para a viabilidade celular (MADIGAN et al. 2016). Em geral a síntese de pectinases por fungos é induzida pela suplementação de pectina ou materiais pectínicos no meio de fermentação, tais como bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, polpa de café, maçã ou cascas de frutos cítricos (FAVELA-TORRES et al. 2006). Recentemente, o uso de resíduos agroindustriais misturados com peptona, extrato de levedura e sulfato de amônio em meio de cultivo submerso para produção de pectinases tem sido relatado (AREVALO-VILLENA et al. 2011, POONDLA et al. 2016).

As fontes de carboidratos e açúcares adicionadas para o cultivo ativam o metabolismo energético do microrganismo e favorecem seu rápido crescimento. À medida que colonizam o substrato os micélios fúngicos secretam enzimas extracelulares que catalisam a degradação dos carboidratos disponíveis em moléculas menores, como os aminoácidos, açúcares e vitaminas, que serão absorvidos para sua nutrição pelo catabolismo (HOLKER, LENZ 2005). Estudos sobre o efeito indutor da pectina na produção de pectinase por *A. niger* revelam que a atividade enzimática aumenta significativamente com a adição de pectina (20 g/L) no meio de cultivo, por outro lado, baixas concentrações de pectina resultam em baixo rendimento enzimático uma vez que são induzidas pelo substrato rico em pectina (MALVESSI; SILVEIRA, 2004, VISWANATHAN; JAGADEESHBABU 2008, MARTOS et al. 2009, BASTOS, 2012).

Apesar dos fungos filamentosos serem capazes de colonizar uma ampla diversidade de substratos orgânicos para produção de metabólitos de interesse, o tipo e a quantidade adequada dos substratos utilizados, portanto, não devem ser negligenciados. Existem substratos com propriedades mecânicas interessantes para determinadas reações quando adicionados na quantidade adequada. Biz e colaboradores (2016) mostraram que a adição conjunta de 51,6% de polpa cítrica contendo amônio e 48,4% de bagaço de cana foi eficaz na indução da síntese de pectinase por *A. oryzae* e favoreceu alta porosidade e estabilidade

da biorreação, evitando problemas de formação de aglomerado e superaquecimento que podem afetar a síntese de enzimas.

Quantidades de substratos ricos em carbono adicionados no cultivo afetam o crescimento celular e a produção de pectinases por fungos filamentosos. Altas concentrações de glicose podem provocar repressão catabólica da produção de pectinases, dificultando a assimilação dos substratos disponíveis e a produção enzimática (CORDEIRO; MARTINS 2009, ROSSI et al. 2016). Porém, em fermentação sólida mesmo utilizando altas concentrações de substratos biodegradáveis como fonte de glicose, sacarose ou ácido galacturônico (até 15%), geralmente, não é observado repressão catabólica (RAMESH; LONSANE, 1991, SOLIS-PEREIRA et al. 1993).

A utilização de fontes de carbono facilmente fermentáveis, quando adicionadas em maiores concentrações, pode inibir a produção de enzimas extracelulares por alguns microrganismos em razão da repressão catabólica (KLEIN et al. 1998). Também é relatado o efeito negativo do aumento da concentração de pectina como indutor sobre a síntese enzimática, promovendo um decréscimo na atividade de pectinases (TARAGANO, PILOSOF, 1999, OUATTARA et al. 2008). O aumento da concentração da fonte de carbono no meio de cultivo estimula o crescimento de *A. niveus*, entretanto, concentrações superiores a 2 g/L provoca a queda de atividade enzimática por esse fungo (MALLER et al. 2012).

A pectina cítrica é a fonte de carbono indutora de pectinases mais utilizada em processos submersos, no entanto, deve ser adicionada em quantidades adequadas e otimizadas para o sistema. Segundo Rombouts e Pilnik (1980), meios de cultivo elaborados com concentrações balanceadas de pectina e carboidratos simples levam a melhores resultados na produção de enzimas pécicas em processo submerso.

A pectina é capaz de quelar íons metálicos e o acúmulo desses agentes quelantes podem induzir ou inibir a atividade enzimática no extrato, assim, o acúmulo de ácido galacturônico durante a fermentação pode limitar a síntese de pectinases (AGNIESZKA, 2005, OUATTARA et al. 2008). Santi (2005), mostrou que 98% da atividade PL e 60% e 70% da atividade PG foi inibida na presença de íons de Cu e Zn e Cu, respectivamente. Os íons metálicos estudados por Ouattara e colaboradores (2008), tiveram efeito benéfico no rendimento de PG, mas a síntese de PL foi severamente inibida pelo zinco. A atividade de PL pode ser fortemente inibida pela presença de zinco e bário (JIA et al. 2009). A

quantidade de pectina adicionada deve ser, portanto, otimizada de modo a favorecer a alta atividade da enzima desejada.

O potencial de produção de enzimas por fungos quando submetidos a fermentações com diferentes fontes de carbono e nitrogênio é frequentemente investigado. E observa-se que cada microrganismo terá uma resposta própria para produção de enzimas em função das condições nutricionais do meio de fermentação. Alguns fungos tem a secreção de enzimas aumentada pela adição das fontes nutricionais ao meio, enquanto outros serão capazes de manter a produção de enzimas extracelulares mesmo em baixas concentrações do indutor. Também, a mistura de substratos agroindustriais como fonte de nutriente pode favorecer a secreção de pectinases por alguns fungos enquanto para outros não (PEDROLLI et al. 2009, LIMA et al. 2017). Assim, a otimização da composição nutricional do meio fermentação se faz necessária para compreender o comportamento do fungo na secreção do metabólito de interesse.

A temperatura é um parâmetro importante que afeta a sobrevivência, reprodução e o crescimento fúngico, além de auxiliar na regulação da atividade metabólica para secreção de enzimas, bem como, na atividade das pectinases secretadas por eles no meio (NEDWELL et al. 1999, SANTIAGO et al. 2016). O cultivo de fungos filamentosos em altas temperaturas para produção de enzimas de interesse comercial oferece vantagens, como taxas de conversão mais rápidas, risco reduzido de contaminação e aumento da transferência de massa. No entanto, essas enzimas podem ser facilmente inativadas pelo aumento moderado da temperatura (KLUGE; TERFEHR; KUCK, 2018).

Além disso, temperaturas muito elevadas causam danos a membrana celular pela ruptura das pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos e desnaturação enzimática irreversível, conferindo perda de funções e estrutura da membrana, ruptura do DNA e perda de viabilidade celular. Ao contrário, baixas temperaturas causam danos por afetar a membrana de forma a reduzir os processos de regulação e conferir menor fluidez, refletindo em um transporte lento de nutrientes e criando uma membrana densa e bastante rígida. Esse processo reflete no metabolismo, provocando baixa atividade enzimática em detrimento do crescimento lento ou inexistente (NEDWELL et al. 1999; MADIGAN et al. 2016).

Outro parâmetro crucial para a atividade e estabilidade das enzimas é o pH. Ele pode afetar a permeabilidade da membrana dos microrganismos e a estabilidade das

enzimas (KAUR et al. 2017). Valores baixos de pH também induzem a desnaturação de proteínas e inibição de atividade enzimática em organismos basófilos e neutrófilos, entretanto, fungos filamentosos preferem condições ácidas (MADIGAN et al. 2016). Mudanças de pH afetam a ionização dos sítios ativos dos aminoácidos e provocam a desmontagem enzimática (PAGARRA et al. 2018). Dessa forma, seu monitoramento se faz necessário para padronizar o crescimento e a síntese de enzimas extracelulares por vários microrganismos.

Apesar de poucos trabalhos associarem a morfologia de fungos com a formação de metabólitos de interesse, tais como enzimas, acredita-se que ela afete a secreção de proteínas em fermentação submersa e que a morfologia ideal pode variar em função do produto desejável (WANG et al. 2005). Por exemplo, o crescimento na forma de filamentos livres (hifas dispersas) é necessário para a produção de penicilina a partir de *Penicillium chrysogenum*, enquanto pellets são necessárias para a produção de ácido cítrico de *A. niger* (VECHT-LIFSHITZ et al., 1990).

De acordo com Veiter; Rajamanickam; Herwig, (2018), o comportamento morfológico das espécies fúngicas pode ser influenciado pelas condições de cultivo durante a fermentação, como concentração do inóculo, pH inicial, agitação e composição do meio. A agitação favorece a morfologia de filamentos curtos, grossos e altamente ramificados, que podem favorecer à produção de bioprodutos, por exemplo, o ácido cítrico produzido por *A. niger*. Além disso, valores elevados de pH causam cargas negativas que, por sua vez, diminuem a agregação de esporos. Ao contrário, pH mais ácido favorece hidrofobicidade das proteínas refletindo na agregação dos esporos e germinação destes para formação de pellets (PAPAGIANNI 2007, TINOCO-VALENCIA et al. 2014, ZHANG; ZHANG 2016, VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018). Como a maioria dos fungos filamentosos tem preferência por valores de pH mais ácidos a formação de pellets é comumente observada em fermentação submersa sob agitação (VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018).

Em fermentação submersa o crescimento dos pellets com tamanhos irregulares e heterogêneos pode ser um problema, pois afeta a transferência de oxigênio. Pellets maiores provocam a queda da concentração de oxigênio disponível e consequente elevação dos níveis de oxigênio dissolvido, dificultando a transferência de oxigênio para o interior dos pellets. Condições de fermentações devem ser monitoradas para evitar a

redução da transferência de oxigênio, pois isso pode refletir no produto formado (ROSSI, 2006).

Dessa forma é importante otimizar as condições físico-químicas do cultivo para encontrar a condição ótima de cada fator que favoreça o metabolismo do fungo utilizado, de forma a acelerar a velocidade das reações enzimáticas sem afetar a integridade da célula e do produto formado.

REFERÊNCIAS

- AASTH, A. P. et al. 1,5 Benzodiazepines: overview of properties and synthetic aspects. **Journal of Chemical Sciences**, v. 3, p. 90–103, 2013.
- ABDEL-BAKY, N., ABDEL-SALAM, A. Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 228–235, 2003.
- ADAPA, V. et al. Cold Active Pectinases: Advancing the Food Industry to the Next Generation. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2324–37, 2014.
- AGNIESZKA, N. Binding of heavy metals to pomace fibers. **Food chemistry** 90(3):395–400, 2005.
- AHMED, I. et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 148–154, 2016.
- AHUJA, V.; BHATT, A. K. *Trichoderma viride* (MTCC 800): a potential candidate for agri-horti waste utilization by solid state fermentation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, p. 2679–2684, 2018.
- ALANA, A. et al. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3755–3759, 1990.
- ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 33, n.1, p. 21–28, 1998.
- ALMATAR, M.; MAKKY, E. A. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. **3 Biotech**, v. 6, p. 4, 2016.
- ALMEIDA, C. et al. Continuous Production of Pectinase by Immobilized Yeast Cells on Spent Grains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 513–518, 2005.
- AMIN, F. et al. Purification, Kinetic, and Thermodynamic Characteristics of an Exopolysaccharidase from *Penicillium notatum* with Industrial Perspective. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 183, p. 426–443, 2017.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinase – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1017-1026, 2018.

SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, M. Enzymes Market Overview. Allied market research, Reino Unido, p. 344, May 2018. Disponível em: <<https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>> Acesso em: 21 de maio de 2020.

AQUARONE, E. et al. Biotecnologia Industrial. **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 2001.

AREVALO-VILLENA, M. et al. Pectinases yeast production using grape skin as carbon source. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 89, 2011.

BANU, A. R. et al. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 377–381, 2010.

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**, v. 9, n. 2, p. 167-172, 2013.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M. Incidence of ochratoxin A in fraction diferentes coffee beans (*Coffea Arabica* L): boia, mixes and varrição”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 804-813, 2007.

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

BE MILLER, J.N. An introduction to pectins: Structure and properties. In: Chemistry and Functions of Pectins, ACS Symposium v. 310. **Anais...** American Chemical Society, Washington: DC, 1986.

BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulase and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesii*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p. 106, 2016.

BIZ, A. et al. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54–62, 2016.

BON, E. P. S. et al. Bioprocessos para produção de enzimas In: Elba P.S. Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado. **Anais...** Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.

BRAVO, C. E. C. et al. Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 137-152, 2000.

BRITO, F. S. **Detecção e avaliação in vitro do crescimento de Trichoderma spp. isolados de composto frente à fitopatógenos**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado em agroecossistemas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 13, 2018.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 2018.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Aplicações industriais da biocatálise enzimática: status atual e aspecto futuro. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443–1454, 2015.

COLLA, E. et al. Simultaneous Production of Amyloglucosidase and Exo-Polygalacturonase by *Aspergillus niger* in a Rotating Drum Reactor. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 181, p. 627–637, 2016.

COMBO, A. M. M. et al. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, n. 3, p. 588–596, 2012.

CORADI, G. V. et al. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 533–540, 2013.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the Enzyme. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, n. 1, p. 135-141, 2009.

- DARTORA, A. B. et al. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endo-polygalacturonase by solid state fermentation. **Zeitschrift für Naturforschung C.**, v. 57, p. 666–670, 2002.
- DE HOOG, G. S. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical Mycology**, v. 38, p. 243–250, 2000.
- DIXON, D., POLAK-WYSS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses**, v. 34, p. 1–18, 1991.
- DOS SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, 2018.
- DHAKAR, K.; PANDEY, A. Extracellular Laccase from a Newly Isolated Psychrotolerant Strain of *Cladosporium tenuissimum* (NFCCI 2608). **PNAS**, v. 86, n. 3, p. 685–690, 2015.
- EL BAZ, A. F. et al. Optimization of Cellulase Production by *Trichoderma viride* Using Response Surface Methodology. **Current Biotechnology**, v. 7, p. 19-25, 2018.
- FAVELA-TORRES, E; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 221-227, 2006.
- FERREIRA, P. A. et al. **Revista Processos Químicos**. Goiás: Gerência de Educação Profissional, Faculdade de Tecnologia SENAI v.3, n.5, 2009.
- FINKLER, A. T. J. et al. Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 1–12, 2017.
- FREITAS, C. et al. Hydrodynamics of a three-phase external-loop airlift bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 4961-4972, 2000.
- GAUTAM, S. P. et al. Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 8, 2011.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotech**, v. 6, p. 47, 2016.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The Role of Water in Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 85-101, 2003.

GOMES, J. et al. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Foods and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 281–287, 2011.

GHOSH, P.; PRADHAN, R. C.; MISHRA, S. Optimization of process parameters for enhanced production of Jamun juice using Pectinase (*Aspergillus aculeatus*) enzyme and its characterization. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 241, 2016.

GUMMADI, S.N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinase: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 987–996, 2003.

GLOBAL INDUSTRY REPORT. **Enzymes Market Size Worth \$17.2 Billion By 2027, CAGR: 7.1%**. Grand view research, March, 2020. Disponível em: < <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-enzymes-market> > Acesso em 21 de maio de 2020.

GLOBAL INDUSTRY REPORT. **Industrial Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By End Use (Food & Beverage, Textile), By Product (Carbohydrase, Proteases, Polymerases), By Application (Textile, Food Processing), And Segment Forecast, 2016 – 2024**. Grand view research, May 2016. Disponível em: < <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market> > Acesso em 21 de maio de 2020.

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

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

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

- HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.
- HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, v. 87 n.1, 2003.
- HUONG, L. M. et al. Cytotoxic and antibacterial compounds from fermented broth of *Phellinus adamantinus*. **Journal of Chemical**, v. 48, p. 544–548, 2010.
- IRSHAD, M. et al. Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 9–18, 2014.
- JADON, K.S. Eco-friendly management of brinjal collar rot caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Indian Phytopathology**, v. 62, n. 3, p. 345-347, 2009
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.
- JIA, Y. J. et al. Polygalacturonase, Pectate Lyase and Pectin Methylsterase Activity in Pathogenic Strains of *Phytophthora capsici* Incubated under Different Conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 10, p. 585–591, 2009.
- JOHN, R. P. et al. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop Protection**, v. 2, p. 1452-1459, 2010.
- JUWON, A. D.; EMMANUEL, O. F. Experimental Investigations on the Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Concomitant Amylase and Polygalacturonase Production by *Trichoderma viride* BITRS-1001 in Submerged Fermentation. **Biotechnology Research International**, v. 2012, p. 8, 2012.
- KANDPAL, V. Biopesticides. **International Journal of Environmental Research and Development**, v. 4, p. 191–196, 2014.
- KAPOOR, A.S. Biocontrol potential of *Trichoderma* spp. against important soilborne diseases of vegetable crops. **Indian Phytopathology**, v. 61, n. 4, p. 492-498, 2008.

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

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, 77: 215-227.

KAUR, S. J.; GUPTA, V. K. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 333–342, 2017.

KIDWAI, M. K.; NEHRA, M. Biotechnological Applications of *Trichoderma* Species for Environmental and Food Security. **Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments**. Haryana, India, p. 125-156, 2017.

KIRK, P. M. et al. **Stalpers Dictionary of the Fungi**. 9th ed., Wallingford: CAB International, 2001.

KLUGE, J.; TERFEHR, D.; KUCK, U. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 102, p. 6357–6372, 2018.

LONSANE, B. K., RAMESH, M.V. Production of bacterial thermostable enzymes by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production. **Advances in Applied Microbiology**, v. 15, p. 1–48, 1992.

LIMA, J. O. et al. Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 602–606, 2017.

MACIEL, M. de H. C. **Produção e caracterização parcial de pectinases de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido da palma forrageira e casca do maracujá**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em biologia de fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MALLER, A., DA SILVA, T. M., DAMÁSIO, A. R. L., REIS, V. R. A., JORGE, J. A., POLIZEL, M. L. T. M. Production of Pectin Lyase by *Aspergillus niveus* under Submerged and Solid State Fermentations Using Agro-Industrial Residues as Carbon Sources. **International Research Journal of Microbiology**,3(1): 029-035, 2012.

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

MATSUNAGA, T. et al. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. **Plant Physiology**, v. 134, p. 339–351, 2004.

MDIC - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **Diagnóstico de referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Bio-Rio, 2012. 50p.

MENEZES, C. P.; PEREZ, A. L. A. de L.; LIMA, E. de O. *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2017.

MOHAN, P. R.; KUMAR, P. V.; REDDY, O. V. S. Optimization of media and submerged fermentation conditions using central composite design for increased endoglucanase production by *Cladosporium* sp. NCIM 901. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 385–395, 2013.

MOHAN-KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150–158, 2013.

MORDOR INTELLIGENCE. **Brazil food enzymes market - growth, trends, and forecast (2020 - 2025)**, 2019. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/brazil-food-enzymes-market-industry>> Acesso em: 21 de maio de 2020.

MORDOR INTELLIGENCE. **Market Entry-Agricultural enzymes Industry in Brazil: Analysis of Growth, Trends and Progress (2020 - 2025)**, 2020. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/market-entry-agricultural-enzymes-industry-in-brazil>> Acesso em: 21 de maio de 2020.

MUKHERJEE, P.K. *Trichoderma* sp. as a microbial suppressive agent of *Sclerotium rolfsii* on vegetables. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 497-499, 1997.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, São Paulo, v. 41, n. 242, p.28-33, 2007.

NCBE, National Center of Biotechnology Education. **Enzymes in fruit juice production**, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbe.reading.ac.uk/materials/enzymes/pdf/jam01.pdf>> . Acesso em 26 de fevereiro de 2019.

NOVOZYMES. **Fatos de dados sobre a Novozymes**, 2017. Disponível em: <<https://www.novozymes.com>> Acesso em 15 de dezembro de 2018.

OUATTARA, H. G. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1753–1760, 2008.

O'NEILL, M. A. et al. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 109–139, 2004.

ORTIZ, G. E. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 197–211, 2016.

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

PANDEY, S.; PUNDIR, V.S. Mycoparasitism of potato black scurf pathogen (*Rhizoctonia solani* Kuhn) by biological control agents to sustain production. *Indian J. Hort.*, v. 70, n. 1, p. 71-75, 2013.

PANDEY, S. et al. *Trichoderma* species cellulase produced by solid state fermentation. **Journal of Data mining in Genomics and Proteomics**, v. 6, p. 2, 2015.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244–263, 2007.

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

PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. I. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**. 2ª Edição, São Paulo, SP: Makron Books, 1997.

PICCOLI-VALLE, R. H. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n.2, p.135-140, 2001.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Qualidade do café (*coffea arabica* l.) colhido em sete épocas diferentes na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p.1481-1491, 2002.

PITOL, L.O. et al. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor, **Chemical Engineering Journal**, v. 283 p. 1009–1018, 2016.

POLETO, P. et al. (2017) Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 92-101, 2017.

POONDLA, V. et al. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 70–76, 2016.

QURESHI, A. S. et al. Production of pectinase by *Bacillus subtilis* EFRL 01 in a date syrup medium. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 62, p. 12563–12570, 2012.

REBELLO, S. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 16, p. 381–394, 2017.

REDDY, K., KRISHNAMMA; NARAYANA, P. Efficacy of *Trichoderma viride* against *Colletotrichum falcatum* in Sugarcane. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 37, p. 111-115, 2009.

ROCHA, J. C. **Produção, avaliação da estabilidade e aplicação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando resíduos de frutas tropicais como substrato**. 2018. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN.

- RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; DE CARVALHO, J. C. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10657–10662, 2011.
- ROOSDIANA, A. et al. Production and characterization of *Bacillus firmus* pectinase. **Journal of Pure and Applied Chemistry Research**, v. 2, n. 1, p. 35–41, 2013.
- ROSSI, C. et al. Efeito da fonte de carbono sobre a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em meio líquido. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016. **Anais...** Caxias do Sul: ENZITEC, 2016.
- ROTENBERG, S. A. et al. Deletion analysis of protein kinase C inactivation by calphostin. **C. Molecular Carcinogenesis**, v. 12, p. 42–49, 1995.
- ROMBOUTS, E.M., PILNIK W. **Pectic Enzymes**. In: Rose. A. (Ed). Economic Microbiology, v. 5., p. 693, London: Academic, 1980.
- SAADOUN, I., et al. Influence of culture conditions on pectinase production by *Streptomyces* sp. (strain J9). **International Journal of Life-Sciences Scientific Research**, v. 3, p. 148, 2013.
- SAKAY, T. et al. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.
- SAN-MARTIN, A. et al. Metabolites from the marine fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 93, p. 247–251, 2005.
- SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SANTI, L.; BERGER, M.; DA SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico**, Lajeado, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.
- SANTIAGO, M., et al. Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1408, 2016.

- SANTOS, C. A. et al. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgl, a GH1 β -glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, p. 71, 2016.
- SCHELLER, H. V. et al. Biosynthesis of pectin. **Physiologia Plantarum**, v. 129, n. 2, p. 283–295, 2006.
- SCHOLS, H. A. et al. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. **Carbohydrate Research** v. 279, p. 265–279, 1995.
- SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger*-A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.
- SEIFOLLAH, F.; KHODAVERDI, G. Pectin esterase production by *Aspergillus niger*: optimization of fermentation condition. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v. 3, n. 2, p. 896–910, 2013.
- SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, p. 45-60, 2013.
- SHEN, Z. et al. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 209, 1999.
- SIGMA. **Enzymes for Alternative Energy Research**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/enzymes-for-aer.html>. Acesso em 26 de fevereiro de 2019.
- SILVA, E. G. et al. Pectinolytic enzymes secreted by tropical fruit yeasts. **FEMS Yeast Research**, Holanda, v. 5, n. 9, p. 859-865, 2005.
- SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174 (2016).
- SINHA, L. et al. Biological control of sugarcane smut (*Sporisorium scitamineum*) through botanicals and *Trichoderma viride*. **Sugar Tech**, v. 11, n. 4, p. 381-386, 2009.

- SOLIS-PEREIRA, S. et al. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 36–41, 1993.
- SOUSA, T. M. A. et al. Evaluation of the effects of temperature on processed coffee beans in the presence of fungi and ochratoxin A. **Journal of Food Safety**, v. 39, n. 1, p.12584, 2018.
- SOUZA, S. C. de. et al. Effects of temperature and incubation time on growth and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in grain-based media. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 32, p. 1306–1314, 2016.
- SOUZA, R. L. A. et al. Characterization of polygalacturonase produced by solid-state fermentation using the residue of passion fruit as substrate. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.9, 2010.
- SUHAIMI, N. et al. Optimization of pectinase production by *Aspergillus niger* using orange pectin based médium. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, p. 259-268, 2016.
- SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **I.J.S.N.**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.
- SURESH, B.; VIRUTHAGIRI, T. Optimization and kinetics of pectinase enzyme using *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, p. 8, 2010.
- TEIXEIRA, M. C. V. et al. Automation of solid state fermentation reactor for enzymes synthesis. **Revista Univap.**, São José dos Campos/SP, v. 25, n. 49, 2019.
- TINOCO-VALENCIA, R. et al. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 177, p. 67–73, 2014.
- TSOLERIDIS, C. A. et al. An experimental and theoretical study on the regioselectivity of successive bromination sites of 7,8- dimethyl-2,4-diphenyl-3H-1,5-benzodiazepine.

Efficient microwave assisted solventless synthesis of 4-phenyl-3H-1,5-benzodiazepines. **Arkivoc.**, v. 15, p. 193–209, 2008.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v.30, p. 388-394, 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**, v. 2, n. 2, p. S605–S611, 2012.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763–778, 2018.

VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 2997–3006, 2018.

VENKATANAGARAJU, E.; DIVAKAR, G. Purification Strategies for Microbial Pectinases. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy.**, v. 11, n. 2, p. 144-159, 2017.

VERMA, H.; NARNOLIYA, L. K.; JADAUN, J. S. Pectinase: A Useful Tool in Fruit Processing Industries. **Nutrition and Food Science International Journal**, v. 5, n. 5, p. 555673, 2018.

VON MEIEN, O. F.; MITCHELL, D. A. A. Two-Phase Model for Water and Heat Transfer Within an Intermittently-Mixed Solid-State Fermentation Bioreactor With Forced Aeration. **Biotechnology and Bioengineering.**, v. 79, p. 416, 2002.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins-A new hypothetical model. Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 373-385, 2011.

ZHANG, J.; ZHANG, J. The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1066–1077, 2016.

ZHOU, C.; XUE, Y.; MA, Y. Cloning, evaluation, and highlevel expression of a thermo-alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus clausii* with potential in ramie degumming. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 1–14, 2017.

CAPÍTULO II - Otimização da produção de pectina liases e poligalacturonases fúngicas

RESUMO

Esse trabalho propõe a produção de um concentrado enzimático com alta atividade pectinase (PL, Exo-PG e Endo-PG), via fermentação submersa, a partir de três fungos: *C. Cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*. As melhores condições de tempo de fermentação (horas), pH e temperatura (°C) para maior síntese de pectinases foram otimizadas. Foi observado que as condições de fermentação para produção de PL e PG pelos três fungos são diferentes. Pectina liase (PL) teve altas de atividades produzidas por *A. niger* e *C. cladosporioides* em fermentação superior a 120 horas em pH 4 a temperaturas entre 27,5 e 30 °C para o primeiro e 25 °C para o segundo. Exo-poligalacturonases (Exo-PG) mostraram-se mais ativas em fermentação superior a 84 horas, pH 4,0 e temperaturas a 35 °C para *A. niger* e 96 horas em pH 4,0 e 4,5 e temperaturas entre 30 e 35 °C para *C. cladosporioides*. A cepa *C. cladosporioides* C196 apresentou as maiores atividades de PL, com produção de 76 U/g em fermentação submersa a 120 horas, pH 4,5 e a 25 °C com 5 g/L de pectina cítrica. Visto que este estudo é o primeiro relato de pectinases produzidas por *C. cladosporioides* C196 e que as condições otimizadas acima favoreceram a máxima produção de PL em detrimento as demais (Exo e Endo-PG), é sugerido o estudo dessas novas enzimas para aplicações em bioprocessos que requerem o uso de PL.

Palavras-chave: Atividade pectina liase, *C. cladosporioides* C196, Metodologia da superfície de resposta, Otimização de bioprocessos.

ABSTRACT

This work proposes the production of an enzyme concentrate with high pectinase activity (PL, Exo-PG and Endo-PG) by submerged fermentation from three fungi: *A. niger*, *C. Cladosporioides* and *T. viride*. The best conditions of fermentation time (hours), pH and temperature (°C) for greater pectinase synthesis were optimized. It was observed that the fermentation conditions for the production of PL and PG by the three fungi are different. Pectin liases had activity high produced by *A. niger* and *C. cladosporioides* in fermentation greater than 120 hours (5 days), at pH 4 and temperatures between 27.5 and 30°C and 25°C, respectively. Exo-polygalacturonases are more active in fermentation greater than 84 hours (3.5 days), pH 4.0 and temperatures at 35 °C for *A. niger* and 96 hours (4 days), pH 4.0 and 4.5 and temperatures between 30 and 35 °C for *C. cladosporioides*. *C. cladosporioides* C196 had the best results of PL activity, with production of 76 U/g in submerged fermentation at 120 hours, pH 4.5 and at 25 °C with 5 g/L of citrus pectin. This study is the first report of pectinases produced by *C. cladosporioides* C196. The optimized conditions favor the maximum PL production to the detriment of the others (Exo and Endo-PG), therefore, it is suggested these new enzymes be studied for applications in bioprocesses that require the use of PL.

Key-words: Pectin lyase activity, *C. cladosporioides* C196, Response surface methodology, Bioprocess optimization.

1. Introdução

Alimentos e bens de consumo, como tecidos, papel e produtos de limpeza, comumente utilizados pelo homem passam por processos industriais para se tornarem aptos para o consumo. No setor industrial as enzimas microbianas vêm substituindo os métodos químicos pela sua capacidade catalizadora, mas principalmente por serem ecologicamente viáveis (REBELLO et al. 2017, RAVEENDRAN et al 2018).

Pectinases são um grupo de enzimas relacionadas que catalisam a hidrólise da pectina, quebrando estes polissacarídeos presentes na lamela média da parede celular de frutos e vegetais. No processamento do suco de frutas, pectinases comerciais são adicionadas para facilitar o processo de extração, clarificação e filtração do suco. Elas promovem a desgeleificação da polpa durante a maceração e extração do suco, garantindo a redução da viscosidade e favorecendo a precipitação das substâncias floculantes e clarificação do suco. No processamento do café, pectinases são adicionadas para remoção da mucilagem do grão e obtenção do café despulpado (GARG et al. 2016, PANDA et al. 2016, PATIDAR et al. 2018). As pectinases comerciais são compostas por uma mistura de pectina metilesterase (PME), poligalacturonase (PG) e pectina-liase (PL), entretanto, as duas últimas são mais interessantes na indústria de alimentos e bebidas (COMBO et al. 2012).

O grande desafio da indústria tem sido a busca por enzimas mais estáveis com capacidade de suportar a variação das condições de pH e temperatura dos processos industriais (SANTIAGO et al. 2016). Os fungos filamentosos são mais utilizados pois sintetizam enzimas extracelulares que são mais fáceis de serem recuperadas e extraídas ao final da fermentação (BLANDINO et al., 2001). A produção de enzimas microbianas é uma técnica simples, barata e eficiente para obtenção de altos rendimentos quando as condições de fermentação são otimizadas (UENOJO; PASTORE, 2007). Dessa forma, para estudar novas pectinases é importante fazer a otimização das condições ideais para máxima produção dessas enzimas.

Baseado nisso, este trabalho buscou a produção de um concentrado enzimático com alta atividade pectinase (PL, Exo-PG e Endo-PG), via fermentação submersa, pelos fungos *C. Cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*. Para desvendar melhor o potencial biotecnológico desses fungos, avaliou-se a massa celular e otimizou síntese enzimática por meio de uma abordagem estatística da metodologia da superfície de resposta. O

objetivo do presente estudo foi otimizar as condições de tempo de fermentação, pH e temperatura e ajustar a melhor concentração do indutor (pectina cítrica) nas condições otimizadas, visando obter um concentrado enzimático com alta atividade pectinolítica.

2. Material e Métodos

2.1. Local de realização do trabalho

O experimento foi executado no laboratório de Microbiologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e no laboratório de Análises Químicas do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT café), ambos situados no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG.

2.2. Microrganismos

Cladosporium cladosporioides C196, *Trichoderma viride* C125 e *Aspergillus niger* C194, pertencentes à coleção Micológica EcoCentro da EPAMIG, foram avaliados quanto a produção de pectinases. Os fungos foram isolados de colônias puras e cultivados em placas de Petri (10 x 10) com meio de cultura Malte 2% (20g de extrato de malte, 20g de ágar e 1000 mL de água destilada) contendo 20mL de volume final, durante 5 (cinco) dias, em BOD, à 25 °C.

2.3. Processo fermentativo

Após o crescimento das colônias fúngicas uma suspensão de esporos foi preparada, utilizando água destilada, a 10^7 esporos/mL conforme a contagem em câmara de Neubauer. Um volume de 10% da suspensão de esporos foi transferido para frascos de vidro (100 mL) contendo solução Manachini na proporção de (g/L): KH_2PO_4 (2), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,9), extrato de levedura (1), pectina cítrica (5) diluído em 1000 mL água destilada), cujo volume final foi de 50 mL para produção de pectinases (MANACHINI et al., 1987; SOUZA et al., 2003). A pectina cítrica (ÊXODO CIENTFICA) foi adicionada à solução Manachini como indutor para produção das pectinases fúngicas.

Os frascos foram incubados em uma incubadora shaker com agitação a 135 rpm (SOLAB- SL 223). A fermentação submersa foi realizada em processo batelada, sem alimentação, sob diferentes condições de tempo, pH e temperatura conforme especificado pelo delineamento composto central rotacional (DCCR) descrito na Tabela 2. Dessa forma, a combinação dos níveis de tempo de fermentação, pH inicial e temperatura para a maior atividade de pectinases foi otimizada seguindo a abordagem estatística da metodologia da superfície de resposta

Posteriormente, foram testadas diferentes concentrações de pectina cítrica no meio de cultura acima do valor otimizado (g/L): 16, 20 e 24. Após a fermentação, os extratos enzimáticos de PL, Exo-PG e Endo-PG foram coletados para avaliar a atividade pectinolítica.

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento composto central do tipo rotacional (DCCR) foi utilizado para determinar a combinação dos níveis ótimos das variáveis tempo de fermentação (h), pH inicial e temperatura (°C) que resultem na maior atividade pectinase. As três variáveis independentes foram estudadas em cinco níveis diferentes, codificados como $-\alpha$, -1, 0, +1 e $+\alpha$. A partir de um valor definido do ponto central (código 0), cada parâmetro foi examinado em um nível alto (código +1) e em um nível baixo (código -1), conforme descrito na Tabela 2. Os valores dos pontos axiais ($-\alpha / +\alpha$) com ortogonalidade α (alfa) igual a 1,68 foram determinados pelo delineamento experimental.

Tabela 2 – Valores das variáveis em níveis codificados (níveis -1, ponto central, +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central, onde a variável X1 é o tempo de fermentação, X2 é o pH inicial do meio e X3 a temperatura.

Variáveis	Níveis				
	- 1,68	-1	0	+1	+ 1,68
X1	56	72	96	120	136
X2	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
X3	22	25	30	35	38

De acordo com a matriz planejamento composto central, as três variáveis foram rastreadas em 17 projetos experimentais, incluindo 8 fatoriais, 6 axiais e 3 centrais, portanto, executados em triplicatas. Os resultados foram utilizados para ajustar o modelo polinomial pela equação (1):

$$y_i = \beta_0 + \beta(1)X_{1i} + \beta(2)X_{2i} + \beta(3)X_{3i} + \beta(11)X_{1i}^2 + \beta(22)X_{2i}^2 + \beta(33)X_{3i}^2 + \beta(12)X_{1i}X_{2i} + \beta(23)X_{2i}X_{3i} + \beta(13)X_{1i}X_{3i} + \xi_i \quad (1)$$

Em que, y_i refere-se a i -ésima resposta em uma amostra de n observações, os parâmetros $\beta(\cdot)$ indicam os coeficientes referentes aos termos lineares, quadráticos e interação, sendo β_0 o intercepto e ξ_i o erro aleatório.

A matriz de planejamento experimental utilizada no ajuste dos modelos encontra-se descrita na Tabela 3. A partir da análise de regressão, verificou-se quais variáveis ($p < 0,05$) apresentaram maior contribuição para obter os valores preditos.

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico “Design Expert 11” (Stat-Ease Inc.USA). Os gráficos de contornos ajustados pelos modelos de superfícies de respostas, com a estimativa dada na equação (1), foram utilizados para identificar o ponto estacionário que permite interpretar as condições ideais para a produção máxima de frações enzimáticas da pectinase, Pectina liase (PL) e Poligalacturonases (Exo-PG e Endo-PG).

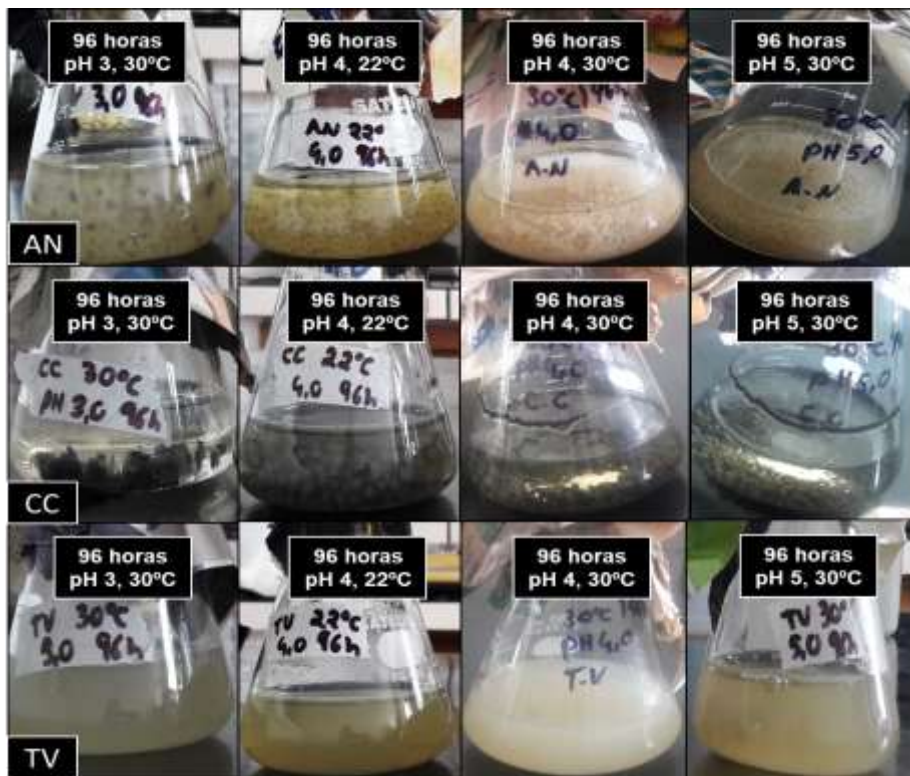
Tabela 3 – Matriz do primeiro planejamento experimental e valores reais utilizados nos experimentos.

Experimentos	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X1	X2	X3	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1	72	3,5	25
2	1	-1	-1	120	3,5	25
3	-1	1	-1	72	4,5	25
4	1	1	-1	120	4,5	25
5	-1	-1	1	72	3,5	35
6	1	-1	1	120	3,5	35
7	-1	1	1	72	4,5	35
8	1	1	1	120	4,5	35
9	- α	0	0	56	4,0	30
10	+ α	0	0	136	4,0	30
11	0	- α	0	96	3,0	30
12	0	+ α	0	96	5,0	30
13	0	0	- α	96	4,0	22
14	0	0	+ α	96	4,0	38
15	0	0	0	96	4,0	30
16	0	0	0	96	4,0	30
17	0	0	0	96	4,0	30

2.5. Obtenção do extrato enzimático bruto

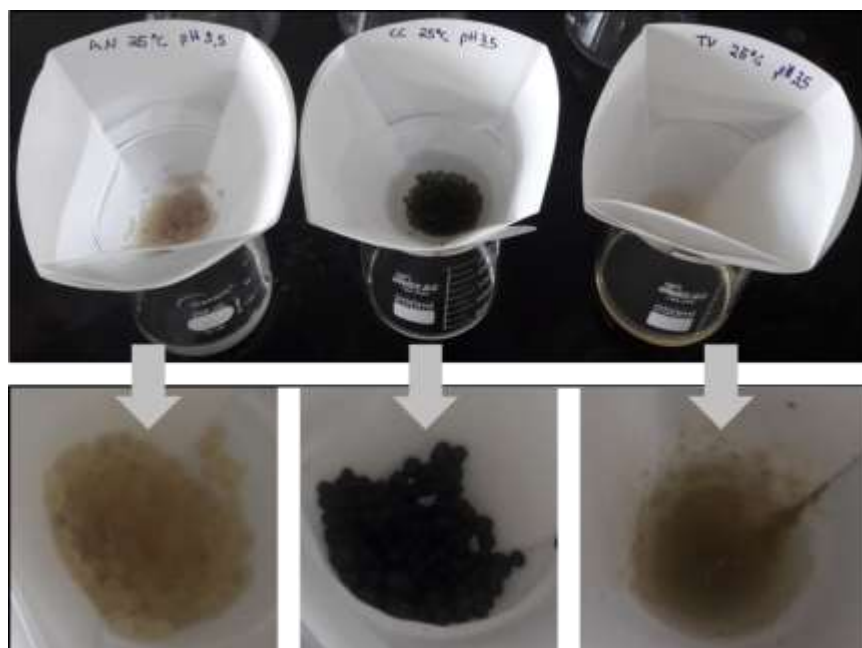
Após a fermentação, o extrato enzimático foi filtrado para separação da biomassa e avaliação da atividade pectinolítica (Figuras 4 e 5). O meio foi filtrado em papel filtro (Whatman nº 1) e, posteriormente, submetido a centrifugação (7840 xg) durante 10 minutos, a 5 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte de enzima e armazenado a 4 °C para futura análise enzimática.

Figura 4 – Extrato fermentado antes da filtração com presença de biomassa suspensa.



Legenda: AN: *Aspergillus niger*, CC: *Cladosporium cladosporioides*, TV: *Trichoderma viride*. Fonte: acervo pessoal

Figura 5 – Filtração do caldo fermentado com os fungos em papel filtro (Whatman n° 1) visando a obtenção do extrato bruto.



Fonte: acervo pessoal

2.6. Determinação de biomassa

A produção de massa micelial foi quantificada após a filtração pelo método do peso seco. A biomassa foi submetida a secagem em estufa a 60 °C e a cada 12 horas as amostras do papel filtro antes de filtrar e do papel filtro com a biomassa filtrada foram retiradas e pesadas em balança semi-analítica até a obtenção da massa constante. Quando retirada da estufa, as amostras foram encaminhadas a um desumidificador para resfriar não permitindo que a temperatura elevada da estufa alterasse o peso real. A diferença entre o peso inicial (peso do papel antes de filtrar) e o peso final (peso do papel após a filtração e posterior secagem) resultou no valor do peso seco da biomassa fúngica em g/L.

2.7. Determinação da atividade de pectinases

2.7.1. Pectina Liase (PL)

Segundo o método de Kashyap e colaboradores (2000), 1 mL da solução de enzimas foi adicionado em 5 mL da solução de pectina 1% e o volume ajustado para 10 mL com água destilada. As amostras foram incubadas a 40 °C por 2 (duas) horas, após isso, foi adicionado 0,6 mL de sulfato de zinco 9% e 0,6 mL de hidróxido de sódio 0,5M e feita uma centrifugação (3000 rpm/ 10 min). Foram retirados, aproximadamente, 5 mL do sobrenadante e adicionado a uma mistura de ácido tiobarbitúrico (3 mL, 0,04 M), HCl (2,5 mL, 0,1M) e água destilada (0,5 mL). A mistura foi aquecida no banho-maria em ebulição por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente e a absorbância da solução foi lida a 550 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que provocou alteração na absorbância de 0,01 na condição de ensaio.

2.7.2. Exo-poligalacturonase (Exo-PG)

A atividade foi determinada pela metodologia descrita por Schwan e Rose (1994); Bastos e colaboradores (2013) e uma curva de calibração para o ácido poligalacturônico foi construída segundo o método de Miller (1959). Foi adicionado em tubo de ensaio 1mL de solução de sal sódico de ácido poligalacturônico (NaPP) a 0,01% em tampão citrato fosfato 0,1M pH 5,0 e 1,5 mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada em banho-maria a 40 °C por 1 (uma) hora e após esse período a reação é paralisada adicionando 1,5

mL da solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). Os tubos foram mantidos em banho fervente por 5 minutos e, posteriormente, resfriados em banho de gelo. O ácido dinitrossalicílico reage com o açúcar redutor liberado da pectina, produzindo um complexo com absorvância máxima a 575 nm. A atividade pectinolítica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por mL/minuto, reduzindo os açúcares no meio fermentado. Dessa forma, a absorvância da solução foi lida a 575 nm e a atividade (U) de Exo-PG expressa na forma de µmol de equivalentes de ácido galacturônico liberados por mL por minuto nas condições de ensaio. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 umol de ácido galacturônico/mL/min liberados nas condições de ensaio.

2.7.3. Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

De acordo com a metodologia descrita por Barnby, Morpeth e Pyle (1990), Souza et al., (2003); Ma et al., (2017): a mistura da reação contendo 5,5 mL de solução de pectina 1% em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0 suplementado com 1mM de EDTA (ácido di-amino tetra-acético) e 250 µL do extrato enzimático foram homogeneizadas em agitador de tubo, posteriormente, foram incubadas em banho-maria, a 45 °C, por 30 minutos, e por fim, submetidas em banho de gelo para interromper a reação. A leitura foi feita 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), pelas equações (2), (3) e (4):

$$\% \text{ da redução de viscosidade} = \frac{t \text{ branco} - t \text{ amostras}}{t \text{ branco} - t \text{ água}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Unidade viscosimétrica} \left(\frac{\text{UV}}{\text{mL}} \right) = \frac{\% \text{ da redução de viscosidade} \times 4}{\frac{50}{10}} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} & \text{Atividade de ENDO(PG) específica (U/mg)} \\ & = \frac{\text{Unidade viscosimétrica}}{\text{Teor de proteína total da amostra}} \quad (4) \end{aligned}$$

A unidade de PG é expressa em unidades relativas viscométricas (URV) por mg (proteína)⁻¹ por mL⁻¹. URV é definida como 10³ x o tempo em minutos para o decréscimo de 50% da viscosidade relativa da solução. Uma unidade de Endo-pectinase (U) foi definida como a quantidade de enzima que reduziu a viscosidade inicial da solução em 50% por minuto, nas condições mencionadas acima.

2.7.4. Proteínas totais e atividade enzimática específica

Para determinação das proteínas totais foi utilizado o método proposto por Bradford (1976) adaptada de acordo com Rocha (2018) que utiliza um corante de *coomassie brilliant blue* BG-250 e curva padrão a partir de diferentes concentrações de albumina bovina sérica (BSA). Foi adicionado em tubos de ensaio 0,1 mL da amostra e 1 mL do reagente *coomassie brilliant blue* BG-250 de Bradford (0,01% (p / v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (p / v) de etanol e 8,5% (p / v) de ácido fosfórico). O branco é preparado pela adição de 0,1 mL de água com 1 mL do corante acima. Os tubos com essa mistura foram homogeneizados em vórtex, e após 5 minutos de agitação, a absorbância foi lida a 595 nm. Foi realizado três leituras de cada amostra, e em seguida obtida a média. O cálculo da quantidade de proteína nas amostras foi realizado seguindo a equação (5):

$$[\text{PT}]_{\text{amostras}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \text{diluição} * \text{Abs} * F \quad (5)$$

Onde, Abs – é a absorbância real das amostras; e F – o fator de conversão da curva de calibração.

A atividade enzimática específica foi determinada dividindo o valor de U/mL pelo valor de proteínas totais da mesma amostra. Este foi feito dividindo-se o número de unidades de enzima (U) pelo número de proteína totais da amostra (g), e os resultados são expressos em U/g pela equação (6):

$$U \text{ específico} = \frac{U \text{ enzimático (U/mL)}}{\text{proteínas totais (mg/mL)}} \quad (6)$$

3. Resultados e Discussão

O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para investigar o efeito das variáveis independentes X1(tempo de fermentação (h)), X2 (pH) e X3 (temperatura) sobre a produção de pectinases pelos três fungos: *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger*. A atividade enzimática das frações de pectinases (Pectina liase, Exo-poligalacturonase e Endo-poligalacturonase) foi quantificada e foram observadas diferenças na produção de pectinases quando submetida a diferentes condições de tempo, pH e temperatura (Anexo 1).

A partir dos resultados especificados no anexo 1, foi observada diferença na produção de pectina liase (PL) e poligalacturonases (PG) em função dos níveis das variáveis independentes otimizadas, de forma que cada fungo apresentou uma aptidão particular na produção das pectinases. Sobretudo, *A. niger* cresceu em todos os experimentos avaliados e quando submetido a diferentes condições de tempo, pH e temperatura conseguiu manter a atividade enzimática de PL e Endo-PG. *C. cladosporioides* e *T. viride*, por outro lado, quando submetidos a determinadas condições não foi observada atividade de algumas frações enzimáticas possivelmente devido ao baixo crescimento micelial observado.

Observou-se que os três fungos foram capazes de crescer na maioria das condições de fermentação em que foram submetidos. *C. cladosporioides* apresentou menor crescimento micelial de 0,2 a 1,2 g/L nos experimentos de fermentações entre 35 e 38 °C, nas condições de pH ácido (3,5 - 4,0). *T. viride* apresentou baixo crescimento micelial variando entre 1,0 a 1,6 g/L em todos experimentos a 35 °C, sugerindo que temperaturas superiores afetam a vitalidade desse fungo. Em contraste, *A. niger* apresentou melhor desenvolvimento micelial variando entre 2,0 a 6,0 g/L em todos os experimentos avaliados, sendo considerado o fungo que mais adaptado às condições de fermentações estudadas.

A atividade enzimática foi, então, analisada separadamente para cada fração de pectinase: pectina liase (PL) e poligalacturonases (Exo-PG e Endo-PG), produzida pelos três fungos.

3.1.Pectina liase (PL)

O modelo ajustado para a produção da fração de PL dos fungos *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger* proporcionou um coeficiente de determinação (R²) estimado respectivamente em 92,35; 86,53 e 91,96% (Anexo 2). As estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados são dadas a seguir (Tabela 4).

Tabela 4 – Modelos preditos da atividade PL, sendo os valores X1, X2 e X3 codificados como período de fermentação (h), pH e temperatura (°C), respectivamente.

Microrganismo	Equação
<i>C. cladosporioides</i>	$PL = 15,535 + 18,069X_1 + 1,724X_2 - 11,678X_3$ $+ 2,789X_1X_2 - 13,231X_1X_3 - 3,738X_2X_3$ $+ 17,536X_1^2 - 3,690X_2^2 - 4,120X_3^2$
<i>T. viride</i>	$PL = 2,610 + 3,030X_1 - 0,060X_2 - 1,441X_3$ $- 0,472X_1X_2 - 1,099X_1X_3 - 0,625X_2X_3$ $+ 1,576X_1^2 - 0,132X_2^2 - 0,354X_3^2$
<i>A. niger</i>	$PL = 44,416 + 8,529X_1 + 3,161X_2 - 12,946X_3$ $- 3,349 X_1X_2 - 6,550X_1X_3 - 1,008X_2X_3$ $- 2,247X_1^2 - 7,961X_2^2 - 9,570X_3^2$

Os coeficientes lineares das variáveis foram positivos para o tempo e negativos para a temperatura, isso sugere que aumentando os níveis de tempo e reduzindo os níveis de temperatura deve-se obter maior atividade de PL (Tabela 4).

O tempo de fermentação (X1) e temperatura (X3) exerceram efeitos significativos (p <0,05) sobre produção de PL para os três fungos. Foi observado que o tempo de fermentação foi uma variável importante para produção de PL pelos fungos *C. cladosporioides* e *T. viride* e a temperatura a variável que mais contribuiu para produção de PL por *A. niger*. Além disso, a interação negativa das variáveis X1X3 influenciou a produção de PL por *C. cladosporioides* e *A. niger* (Anexo 3).

O gráfico de contorno mostrou que a alta atividade de PL por *C. cladosporioides*, com valores acima de 60 U/g, pode ser obtida em condições de cultivo superiores a 120 horas, pH4 e a temperaturas a 25 °C (Figura 6A). Entretanto, em fermentações com pH inicial acima de 4,5 a 25 °C com 96 horas a produção enzimática reduz para 20 U/g em função da redução do tempo de fermentação que foi um fator importante para atividade dessa enzima. Também, se observou que a medida que aumenta o pH para próximo de

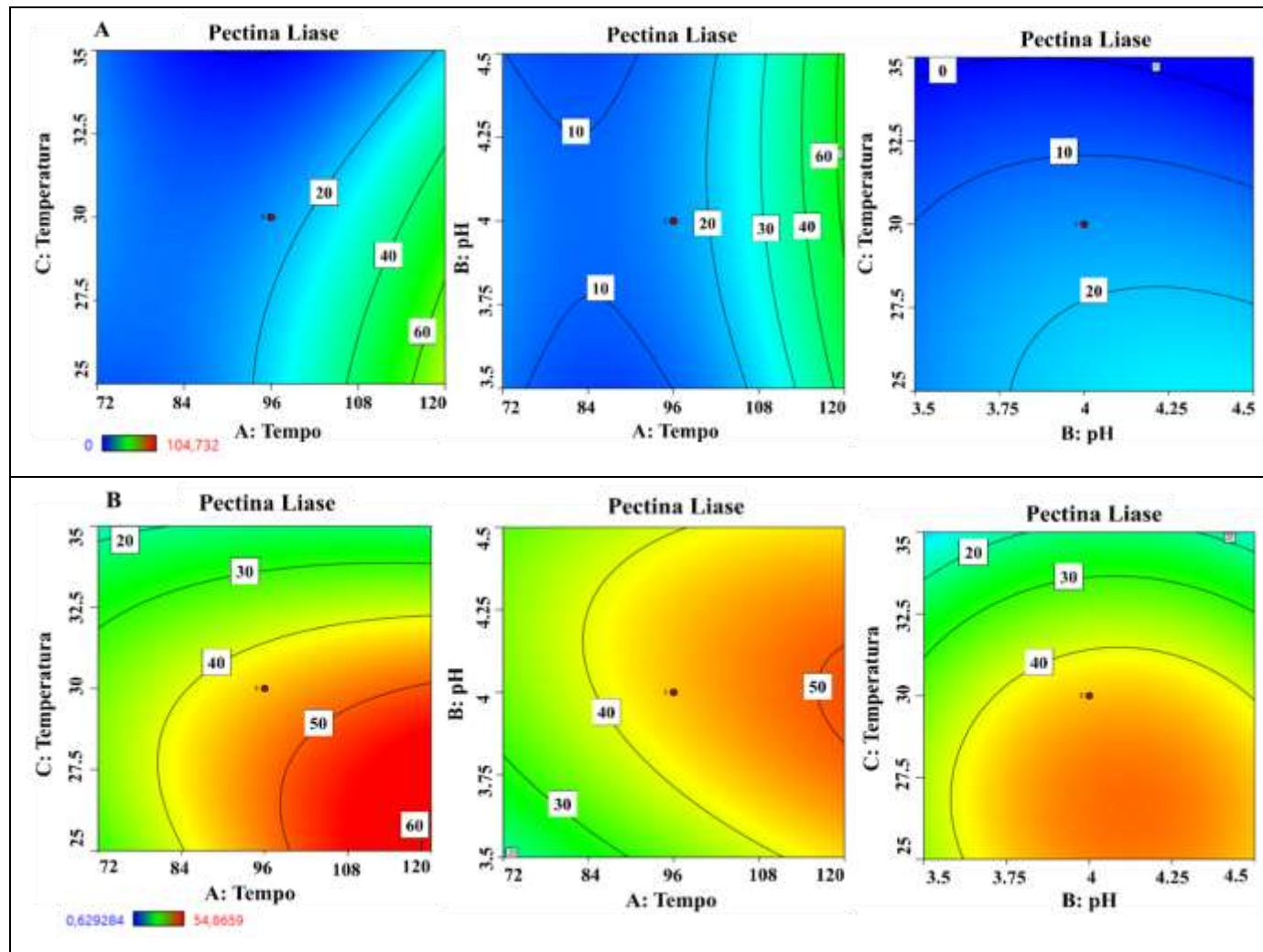
5,0 ocorre um aumento da atividade enzimática para valores próximos de 80 U/g, desde que a fermentação seja feita a 25 °C por 120 horas.

A atividade de PL produzida por *Aspergillus niger* foi acentuada para valores acima de 60U/g com tempo de fermentação superior a 120 horas, pH4,0 a 27,5 - 30 °C (Figura 6B). Em fermentações inferiores a 120 horas de cultivo, com pH inicial entre 4-4,25 a 30 °C ou menos, as atividades obtidas foram de aproximadamente 40 U/g.

A atividade de PL produzida por *T. viride* também foi influenciada pelas variáveis tempo de fermentação (X1) e temperatura (X3), entretanto, não houve interação entre elas. Assim, foi observado que altas produções de PL por *T. viride*, com valores acima de 8 U/g, pode ser obtida a 120 horas de fermentação, pH4 e temperaturas a 25 °C.

As maiores atividades de PL (104,7, 54,86 e 11,3 U/g) produzida por *C. cladosporioides*, *A. niger* e *T. viride* foi a 136 horas de fermentação em pH4 a 30 °C.

Figura 6 – Produção da enzima pectina liase (PL) pelos fungos *Cladosporium cladosporioides* (A) e *Aspergillus niger* (B)



O tempo de fermentação influenciou a produção de pectina liases, as quais tiveram maiores atividades acima de 120 horas de fermentação por *A. niger* e *C. cladosporioides* e *T. viride*, respectivamente.

O pico de produção de metabólitos desejáveis dependerá da capacidade de adaptação de cada microrganismo às condições de crescimento em que são submetidos e suas características genéticas (ASGHER et al. 2016, AMIN et al. 2017). Estudos mostraram que o pico de produção máxima de enzimas por fungos filamentosos em cultivo submerso requer mais tempo. Na sua maioria, o habitat de fungos são ambientes particulados sólidos os quais permitem maior facilidade de acesso das enzimas aos substratos comparado ao cultivo submerso, que requer um tempo maior de adaptação para iniciar o metabolismo de secreção de enzimas (SANDRI, 2014, REGINATTO, 2016). Um tempo reduzido de incubação pode ocasionar baixa produção enzimática devido ao crescimento reduzido refletindo na quantidade insuficiente de enzima produzida (PAGARRA et al. 2018). Acuna-Arguelles et al. (1995) relatou que a atividade de pectina liase produzida por *Aspergillus niger* em fermentação submersa (SmF) atingia o pico após 96 horas de fermentação com produção de aproximadamente 49 U/g de PL. Maldonado e Strasser de Saad (1998) mostraram que o tempo para produção de pectinases a partir de *Aspergillus niger* foi seis vezes maior em SmF. Apesar disso, o crescimento micelial reduzido não foi o motivo para baixa atividade de PL por *C. cladosporioides* (20 U/g) e *A. niger* (40 U/g) observadas neste estudo quando submetido a 96 horas de cultivo, uma vez que ambos apresentaram crescimento a partir de 56 horas de fermentação.

Na literatura é comumente relatado picos de atividades de PL produzida por fungos filamentosos após longos períodos de fermentação (superior a 96 horas), porém não existe uma faixa ideal uma vez que depende mais das características genéticas de cada indivíduo. Dessa forma, o perfil de crescimento e atividade metabólica para produção de enzimas extracelulares será variável para cada um deles. Piccoli-Valle e colaboradores (2001), obtiveram a atividade máxima de PL produzida por *Penicillium griseoroseum* após 65 h de fermentação em cultivo submerso em suco de cana de açúcar. Entretanto, *Penicillium griseoroseum* alcançam elevados níveis de PL com 120 horas de crescimento em meio líquido (LIMA et al. 2017).

Bastos (2012), relatou os níveis máximos de PL produzida por *Cladosporium cladosporioides* obtido em tempo de cultivo inferior a 40 horas com produção de

aproximadamente 7 U/g. Em contrapartida, Ramos-Ibarra et al. (2017), mostrou um aumento na produção de pectinase por *Cladosporium oxysporum* NIC1 após 48 horas de cultivo atingindo um máximo às 144 horas (8,0 U/g) e constante até 168 horas de fermentação. O efeito temporal na produção da pectinase por *Trichoderma viride* em cultivo submerso foi investigado por Irshad et al. (2014): o aumento gradual da atividade de pectinase é observado ao longo de 24 a 144 horas de fermentação, porém o valor máximo é obtido após 96 horas.

Fernandes, (2014) avaliou a atividade de PL de três isolados de *C. cladosporioides* e um isolado de *T. viride* submetida às mesmas condições de fermentação sólida em casca seca do café e em diferentes tempos de cultivo. Seu estudo mostrou que duas cepas *C. cladosporioides* (CMEC 00127 e CMEC 00128) tiveram picos atividades após 168 h de cultivo (263 e 898,67 U/g) enquanto uma das cepas de *C. cladosporioides* (CMEC 00126) e *T. viride* (CMEC 00125) tiveram seu pico com 96 horas de fermentação (395,17 e 174,5 U/g), havendo redução de atividade acima desse tempo. Esses resultados reforçam a influência das características genéticas da espécie uma vez que cepas da mesma espécie podem ter comportamentos diferentes quanto a produção de pectina liase. Além disso, são coerentes com as observações feitas aqui em relação às diferenças quanto a atividade de PL produzida por *C. cladosporioides* e *T. viride*, pois neste estudo foi também observado que a atividade de PL produzida por *C. cladosporioides* foi expressivamente superior.

O perfil de atividade de PL/tempo, produzida por *Aspergillus oryzae* em fermentação submersa, construído por Koser et al. (2014) mostrou que a produção máxima de PL é obtida após 96 horas de fermentação, porém, após 144 horas decresce. Arijit et al. (2013) observou a atividade máxima da pectinase produzida a partir de *Streptomyces spp.* em 144 horas de incubação, enquanto após 168 horas a atividade diminuiu gradualmente. *Aspergillus giganteus*, entretanto, atinge o pico de atividade PL após 156 horas de fermentação submersa (PEDROLLI et al. 2009). *Aspergillus niger* NCIM 548 em fermentação submersa apresentou pico de atividade máxima de pectinase (25 U/g) com 144 horas, porém a atividade mínima foi relatada após 240 horas de cultivo (KUMAR et al. 2011). *Thermoascus aurantiacus*, por outro lado, inicia atividade PL após o 4º dia (96h) de fermentação e atinge seu pico entre o 8º- 10º dia (192-240 h) (MARTINS et al. 2002). O pico da atividade PL produzida por *Phytophthora capsici* SD33 se dá com 7 dias de fermentação e decresce no 8º dia (JIA et al. 2009).

Após determinado tempo de fermentação o metabolismo fúngico tende a declinar refletindo na redução da atividade enzimática devido ao esgotamento de nutrientes no meio. Visto isso, é importante identificar o pico de atividade enzimática para retirada do produto fermentado visando a máxima atividade da enzima desejada. Em nosso estudo não identificamos o pico de produção de PL, mas observamos que este pode acontecer acima ou próximo de 136 horas de cultivo com produção de 104,7 U/g de PL por *C. cladosporioides* e 54,86 U/g de PL por *A. niger*, respectivamente, desde que a temperatura seja mantida abaixo de 30 °C. Além disso, é importante ressaltar que baixas atividade de PL observada nas fermentações após 120 horas de cultivo de ambos fungos são provenientes da influência negativa do aumento da temperatura na atividade dessa fração.

A temperatura também influenciou significativamente a produção de PL pelos três fungos. A temperatura é um parâmetro determinante para o sucesso da fermentação, pois ela influencia diretamente o crescimento microbiano e a atividade metabólica de enzimas e, portanto, deve ser controlada. (PELCZAR et al. 1997; MADIGAN et al. 2016). O efeito da temperatura sobre a produção de enzimas pectinolíticas foi estudado por Acuna-Arguelles et al. (1995) que observou diferenças na termotolerância de pectina liase produzidas por SSF e SmF ao encontrar atividade de PL a 60 °C para a técnica de SSF, mas praticamente nenhuma para SmF, confirmando que a produção de PL por cultivo submerso é dependente de temperatura mais baixa.

Muitos trabalhos relatam a redução da síntese de PL em fermentações submersas acima de 35 °C, refletindo em baixa atividade enzimática. Isso ocorre possivelmente porque a taxa metabólica de alguns microrganismos pode ser afetada em temperaturas acima de 35 °C (WONG et al. 2017). O crescimento de *Aspergillus giganteus* em SmF submetido a várias condições de temperatura mostrou que a maior quantidade de PL produzida por este fungo (400 U/mg) é obtida a 30 °C, acima desse valor houve redução da atividade de PL. Também, acima de 35 °C nenhuma atividade de PL foi encontrada, possivelmente, devido à baixa taxa de crescimento e pequena massa do micélio produzida nestas condições (PEDROLLI et al. 2009). A baixa atividade de PL observada neste estudo em fermentações acima 35 °C por *A. niger* não foi devido a inexistência de crescimento celular, porém, a atividade PL produzida por *C. cladosporioides* pode ter sofrido influência da baixa taxa de crescimento observada a 35 °C em pH 3,5, com 0,2 - 0,4 g/L de massa micelial.

C. cladosporioides quando submetido a 35 °C observou-se produção de PL baixa (8,76 e 8,11 U/g) ou inexistente, mas mudanças de pH nestas condições parecem interferir na atividade enzimática. Nesta temperatura em pH 3,5 ele também não produziu poligalacturonases, porém quando aumentou o pH para 4,5 a produção de PG (Exo e Endo) dentro dos padrões normais foi observada. No caso de *A. niger*, a produção de PL foi baixa, mas houve produção das outras enzimas a 35 °C em pH 3,5 e 4,5. Portanto, essas diferenças sugerem que *C. cladosporioides* tem baixa capacidade de crescer e secretar pectinases em condições de pH 3,5 a 35 °C. Mas a razão da baixa atividade PL produzida pelos dois fungos a 35 °C pode ter ocorrido possivelmente pela baixa estabilidade da enzima quando submetida a estas condições de temperatura podendo sofrer desnaturação enzimática e, conseqüentemente, reduzindo drasticamente a atividade de PL. No caso de *T. viride*, porém, a baixa atividade PL pode estar relacionada ao crescimento reduzido ou inexistente do fungo observado geralmente em condições de temperaturas acima de 35 °C.

Nguyen, Kaneko & kamio, 2002, em seu estudo mostrou que a atividade de PL por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* é dependente de temperatura e a ideal se encontra na faixa de 30 °C. O efeito da temperatura na produção de PL testado na faixa de 30 a 50 °C, mostrou que a produção de pectina liase chegou a 4,78 U/g quando submetida a 35 °C mas declinou em temperaturas mais altas (KAUR et al. 2017). A atividade máxima de PL por *Saccharomyces cerevisiae* foi relatada a 30 °C, sendo observado diminuição expressiva quando submetidas a temperaturas mais altas variando de 35-45 °C (POONDLA et al. 2016). Ahmed et al. (2016) registraram alta atividade pectinase por *A. niger* utilizando casca de resíduos de laranja em cultivo a 30 °C após 5 dias de fermentação submersa em processo batelada. A atividade de PL por *Aspergillus oryzae* é crescente em temperaturas de 20 a 32 °C, constante entre 33 a 35 °C refletindo em uma fase estacionária, porém, um decréscimo significativo é observado acima de 35°C (KOSER et alt. 2014). Siddiqa (2018), também mostra que a produção de PL, por *Penicillium digitatum*, é crescente em temperaturas entre 25 e 30 °C e decrescente acima de 35 °C.

Esses resultados mencionados convergem com os resultados obtidos em nosso estudo, pois em temperaturas a 35 °C ou superior a atividade de PL produzida pelos três fungos foi baixíssima ou zero, respectivamente. Dessa forma, a influência da temperatura

sobre a produção de PL pelos três fungos avaliados é evidente, sendo requerido por eles temperaturas entre 25 e 30 °C para se obter altas produções dessa fração.

3.2. Poligalacturonases (PG)

3.2.1. Exo-poligalacturonase (Exo-PG)

O modelo ajustado para a produção da fração de PL dos fungos *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger* proporcionou um coeficiente de determinação (R²) estimado respectivamente em 91,19; 95,21 e 85,57% (Anexo 4). As estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados são dadas a seguir (Tabela 5).

Tabela 5 – Modelos preditos da atividade Exo-PG, sendo os valores X1, X2 e X3 codificados como período de fermentação (h), pH e temperatura (°C), respectivamente.

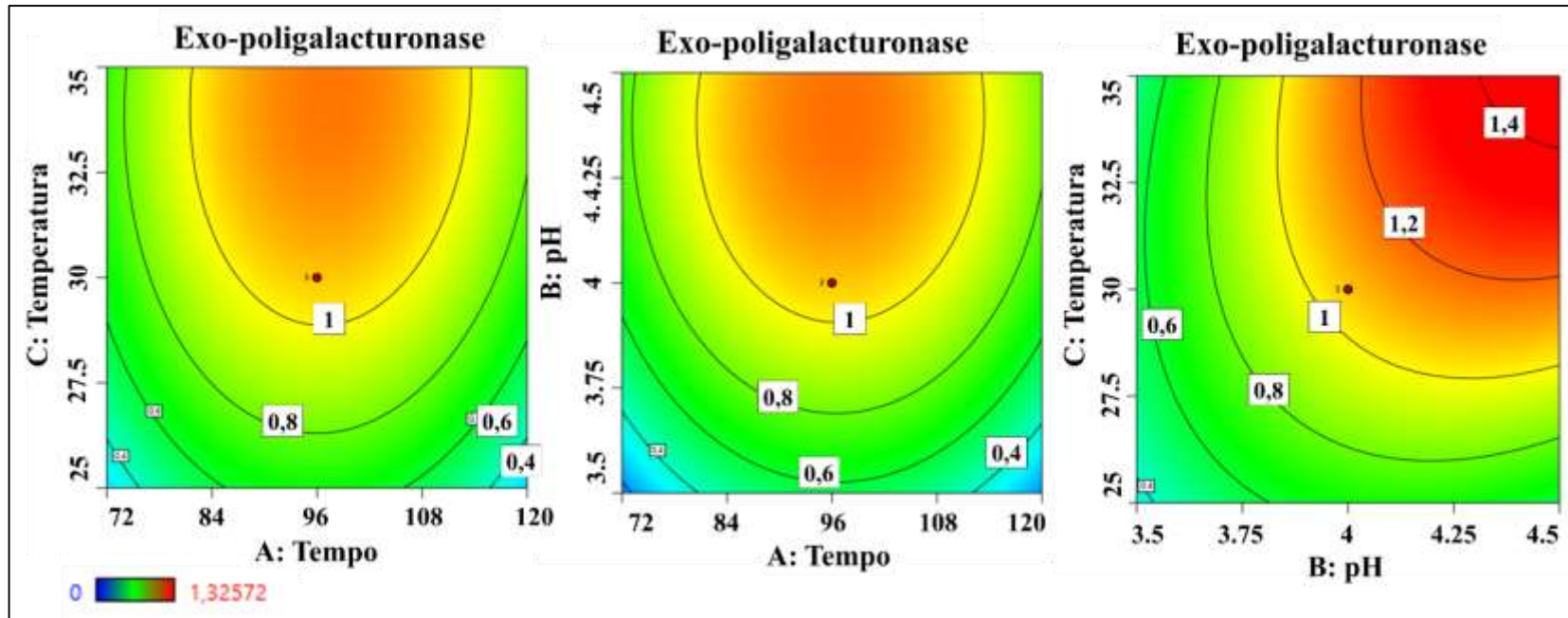
Microrganismo	Equação
<i>C. cladosporioides</i>	$Exo_PG = 1,063 + 0,022X1 + 0,303X2 + 0,249X3 + 0,010X1X2 + 0,031X1X3 + 0,188X2X3 - 0,3897X1^2 - 0,194X2^2 - 0,144X3^2$
<i>T. viride</i>	$Exo_PG = 0,163 - 0,012X1 + 0,205X2 + 0,0535X3 + 0,032X1X2 - 0,133X1X3 + 0,040X2X3 - 0,029X1^2 + 0,037X2^2 + 0,165X3^2$
<i>A. niger</i>	$Exo_PG = 0,144 - 0,025X1 + 0,066X2 + 0,015X3 - 0,029X1X2 - 0,052X1X3 + 0,028X2X3 - 0,012X1^2 - 0,025X2^2 + 0,001X3^2$

Os fatores pH (X2), temperatura (X3) e a interação deles (X2X3) interferiram significativamente na produção de Exo-PG por *C. cladosporioides* (p < 0,05). A produção dessa enzima pelos fungos *T. viride* e *A. niger* teve maior influência do pH (X2) e da interação do tempo e temperatura de fermentação (X1X3). Entretanto, a variável que mais contribuiu a produção de Exo-PG pelos três fungos foi o pH (Anexo 5).

Os gráficos de contorno, representados na Figura 7, mostraram comportamento regular e igualmente espaçado, o que sugere que a superfície apresente um ponto ótimo exato. Houve uma interação positiva (sinérgica) das variáveis significativas (X2X3) sobre a produção de Exo-PG por *C. cladosporioides*, onde o fator X1 foi mantido em seus níveis intermediários (zero). Foi observado um aumento da atividade de Exo-PG, com valores acima de 1,4 U/g, à medida em que se aumenta o pH e a temperatura. Altas atividades de

Exo-PG produzida por *C. cladosporioides* (0,6 - 0,8 U/g), foram obtidas em condições de pH 4 - 4,5 e temperaturas entre 30 e 35 °C em 96 horas de fermentação (Figura 7). Atividades Exo-PG acima de 0,8 U/g produzidas por *C. cladosporioides* são obtidas em fermentações com temperaturas superiores a 30 °C, sendo a maior atividade observada 1,33 U/g com 96 horas de fermentação em pH 4 a 38 °C. Aliás, foi observado que tempo de cultivo inferiores a 96 horas ou superiores a 120 horas mesmo mantendo a temperatura acima de 30 °C podem provocar um decréscimo de aproximadamente 1 U/g na produção de Exo-PG.

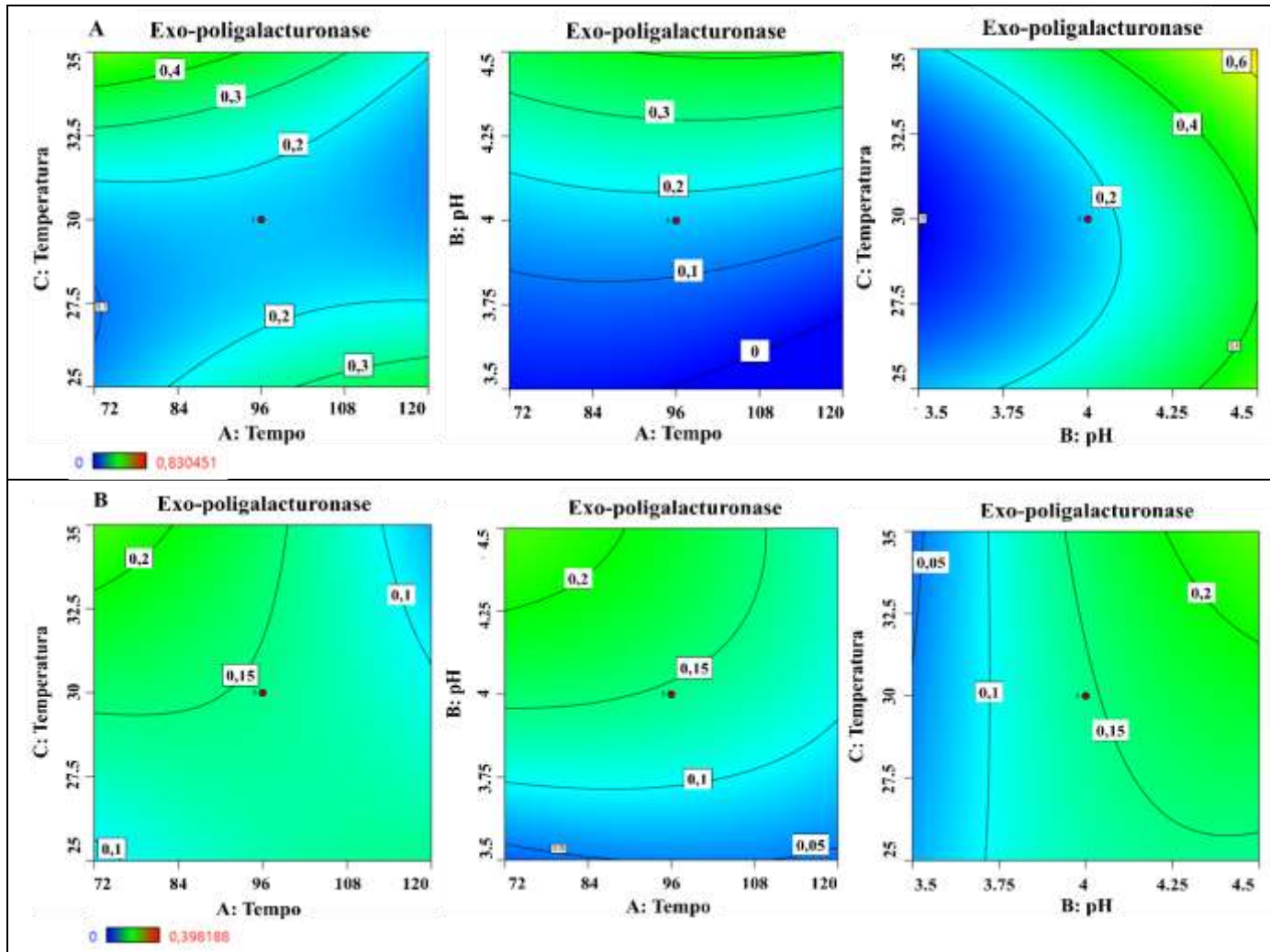
Figura 7 – Produção de Exo-PG por *C. cladosporioides*



A interação negativa de X1X3 na produção de Exo-PG por *T. viride* e *A. niger* é evidenciada (Figura 8A; B), à medida que aumenta a temperatura e mantém o tempo em um nível desejável a atividade Exo-PG é aumentada. Altas atividades são obtidas por *T. viride* nas condições de cultivo superior a 108 horas de fermentação e temperaturas a 35 °C, atingindo valores de até 0,4 U/g, quando o pH inicial é 4,0. Houve aumento da atividade de Exo-PG por *A. niger* para valores acima de 0,2 U/g em fermentação superior a 84 horas de cultivo, pH 4,0 e temperaturas a 35 °C. Mas a maior atividade Exo-PG pelos dois fungos (0,83 e 0,4 U/g) foi obtida com 72 horas de fermentação em pH 4,5 a 35 °C. Além disso, o aumento de pH para valores próximos de 5 pode beneficiar o aumento da produção de Exo-PG para valores acima de 0,5 U/g para *T. viride* e acima de 0,3 U/g para *A. niger*.

Neste estudo, foi observada a semelhança do efeito do pH na produção de Exo-PG pelos três fungos avaliados, sendo evidente que a produção dessa fração enzimática é beneficiada com o aumento do pH inicial para aproximadamente 5. Além disso, a temperatura ótima de cultivo para máxima atividade Exo-PG pelos três fungos ocorre na mesma faixa: superiores de 35 °C. A atividade Exo-PG produzida pelos três fungos foi relativamente baixa, entretanto, as maiores atividades observadas dessa fração (1,4 U/g) foram a partir de *C. cladosporioides*

Figura 8 – Produção de Exo-PG por *T. viride* (A) e *A. niger* (B)



3.2.2. Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

O modelo ajustado para a produção da fração de PL dos fungos *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger* proporcionou um coeficiente de determinação (R²) estimado respectivamente em 88,87; 84,48 e 51,70% (Anexo 6). As estimativas dos parâmetros dos modelos ajustados são dadas a seguir (Tabela 6).

Tabela 6 – Modelos preditos da atividade Endo-PG, sendo os valores X1, X2 e X3 codificados como período de fermentação (h), pH e temperatura (°C), respectivamente.

Microrganismo	Equação
<i>C. cladosporioides</i>	$Endo_PG = 0,438 - 0,006X_1 + 0,088X_2 - 0,134X_3 + 0,034X_1X_2 + 0,021X_1X_3 + 0,060X_2X_3 + 0,022X_1^2 - 0,084X_2^2 - 0,094X_3^2$
<i>T. viride</i>	$Endo_PG = 0,409 + 0,083X_1 + 0,037X_2 - 0,034X_3 + 0,013X_1X_2 + 0,002X_1X_3 + 0,002X_2X_3 + 0,045X_1^2 - 0,035X_2^2 - 0,095X_3^2$
<i>A. niger</i>	$Endo_PG = 0,311 - 0,077X_1 + 0,020X_2 - 0,047X_3$

O coeficiente linear da produção de Endo-PG por *C. cladosporioides* foi positivo para variável pH e negativo para temperatura, indicando que o aumento do pH e redução da temperatura reflete no aumento da atividade dessa enzima. Entretanto o coeficiente quadrático das duas variáveis foi negativo mostrando que o aumento do pH e redução da temperatura fora do nível considerado desejável pode refletir na redução da atividade de Endo-PG. O coeficiente linear do tempo de fermentação na produção de Endo-PG por *T. viride* e *A. niger* foi positivo e negativo, respectivamente. Demonstrando que altas atividades dessa enzima estão relacionadas com o aumento do tempo para *T. viride* e redução do tempo para *A. niger* (Tabela 6).

As variáveis pH (X2) e temperatura (X3) foram importantes para produção de Endo-PG por *C. cladosporioides*, sendo a temperatura a variável mais significativa, entretanto, não houve interação entre essas duas variáveis (Anexo 7). Apesar disso, foi observado maior produção de Endo-PG, com valores acima de 0,4 U/g, em 96 horas de fermentação, numa faixa de pH entre 3,75 e 5,0 a 25 até 27,5 °C. Em fermentações realizadas a 35 °C em pH 3,5 a atividade Endo-PG foi zero, porém quando se aumentou o pH para 4,5 nesta temperatura foi observado atividade enzimática (0,12 e 0,37 U/g). Observou-se também que nas fermentações que ocorreram dentro do tempo

recomendável (96 horas), a atividade Endo-PG foi zero nas condições de pH 3 ou de temperatura de 38 °C, reforçando a forte influencia dessas duas variáveis (X2 e X3) sobre a atividade dessa fração enzimática.

Apenas o tempo de fermentação (X1) afetou a produção de Endo-PG a partir de *T. viride* e *A. niger* ($p < 0,05$), sendo observado maior produção após 120 horas de fermentação em ambos (Anexo 7). Assim, a maior atividade de Endo-PG (0,65 U/g) produzida por *T. viride* foi após 136 horas de fermentação em pH inicial 4,0 a 30 °C. E as maiores atividades produzidas por *A. niger* foram em fermentações realizadas por 120 horas em pH 3,5 e 4,5 a 25 °C, com produção de 0,47 e 0,49 U/g. Na fermentação realizada a 38 °C em pH 4,0 por 96 horas não houve atividade Endo-PG produzida por *T. viride*, sendo muito baixa (0,038 U/g) produção de *A. niger*.

Estudos mostram que o pH ideal para produção de pectinase de *Aspergillus* sp. se encontra na faixa de 4,0 a 5,25, com produção de mais de 900 U/g de PG (PHUTELA et al. 2005, KAUR et al. 2017). Altas atividades de Exo-PG produzidas pelos fungos *Penicillium notatum*, *Coriolus versicolor* e *Ganoderma lucidum* foram relatadas por Amin et al (2017), que mostrou que a produção máxima de Exo-PG por *Penicillium notatum* foi alcançada em pH 3, porém, acima desse valor a produção decresce. Entretanto, observou que o fungo *Coriolus versicolor* tem atividade crescente em pH variando de 4 a 5, com atividade máxima em pH 5, mas valores de pH acima de 5 para esse fungo tende a reduzir a atividade Exo-PG. *A. fumigatus* R6, no entanto, abrange uma ampla faixa de pH (3-8), sendo as maiores atividades encontradas em pH 4, com produção de 338 U/g (WONG et al. 2017).

Penicillium viridicatum mostrou produção máxima de poligalacturonase a um pH de 4,5 (SILVA et al., 2002). *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Mucor circinelloides* produzem altas atividade Exo-PG em pH na faixa de 4,0 a 5,0 (THAKUR et al. 2010; NIRMALADEVI, ANILKUMAR, SRINIVA, 2014; PAGARRA et al. 2018). O controle do pH a 5,5 durante o cultivo promove uma produção de pectinase cerca de 10% maior que culturas de pH não controlado (EL ENSHASY et al. 2018). Além disso, a atividade pectinase produzida por *Aspergillus niger* pode declinar em pH superior a 5,5 (AHMED et al. 2016). No presente trabalho foi observado que a maior atividade Exo-PG produzida pelos três fungos é obtida na faixa de pH entre 4 e 5. Também, diferente dos fungos mencionados acima, neste estudo *C. cladosporioides* não cresceu em pH 3,

portanto, não foi observado atividade de poligalacturonases (Exo e Endo), enquanto, em pH 5 altas atividades de Exo-PG (1,19 U/g) são obtidas desde que a temperatura não seja inferior 30 °C.

Wong et al. (2017) observou que a atividade Exo-PG produzida por *A. fumigatus* aumenta com o aumento da temperatura e atinge sua atividade máxima na temperatura de 33 °C após 5 dias de fermentação. O efeito da temperatura sobre a produção de Exo-PG é relatado por Banu et al. (2010), que observou atividade Exo-PG a partir de *Penicillium chrysogenum* crescente no intervalo de pH 4 a 6,5, em temperaturas entre 20 a 50 °C, mas o pico de produção máxima é obtido em pH 6,5 a 35 °C após 5 dias de fermentação submersa. No presente estudo, altas atividades Exo-PG produzidas por *C. cladosporioides* foram obtidas a 35 °C (0,81 a 1,33 U/g). Porém, em temperaturas inferiores a 30 °C onde *C. cladosporioides* apresentou bom crescimento e altas atividades de outras pectinases, a atividade Exo-PG reduziu. O mesmo foi observado para *T. viride* e *A. niger* que teve altas atividades acima de 35 °C desde que a fermentação seja realizada em pH 4 e um tempo superior a 108 horas para o primeiro e superior a 84 horas para o segundo.

Além de influenciar significativamente a produção de Exo-poligalacturonases pelos três fungos, neste estudo o pH também afetou a síntese de Endo-poligalacturonases por *C. cladosporioides*. O pH é um dos parâmetros que determinam o sucesso do processo de fermentação e preponderantes para atividade de poligalacturonases. Bastos (2013) otimizou as condições de pH para máxima atividade poligalacturonase produzida por *C. cladosporioides* e mostrou que altas atividades Exo e Endo PG são obtidas em pH inicial do meio próximo de 5 em temperaturas a 28 °C. As maiores atividades de poligalacturonases (29,66 U/g) produzidas por *Aspergillus niger* IOC 4003 foram otimizadas nas condições de pH 5,4 a 30 °C após 90 horas de fermentação sólida (ROCHA, 2018).

Diversos trabalhos mostram que a produção de poligalacturonases por fungos filamentosos é mais ativa em pH ácido (entre 3 e 5) (ACUNA-ARGUELLES et al. 1995, MARTOS et al. 2009). Porém, cada microrganismo vai ter uma condição ótima específica que resultará em maiores atividades enzimáticas: *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus awamori* em pH 3 e 3,5 (BLANDINO et al 2001); *P. griseoroseum* em pH 4 a 4,5 (PICCOLI-VALLE et al 2001); *Aspergillus niger* em pH 4 (FONTANA et al 2005);

Penicillium notatum em pH 3, *Coriolus versicolor* em pH 5 (AMIN et al 2017); *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Mucor circinelloides* em pH 4,0 a 5,0 (PAGARRA et al. 2018).

As observações feitas aqui mostram que cada fungo também apresentou um comportamento particular na produção de pectinases quando submetido às diferentes condições de tempo, pH e temperatura. O crescimento micelial de *T. viride* foi afetado em fermentações a 35 °C por 72 horas, que refletiu em baixa atividade das pectinases. *C. cladosporioides*, por exemplo, não foi capaz de crescer em determinadas condições de pH e temperatura afetando negativamente a secreção de Endo-PG. Observou-se que o crescimento de *C. cladosporioides* foi afetado pelo pH abaixo de 3,5 associado a temperaturas a 35 °C ou superior, refletindo na baixa secreção de enzimas e, portanto, baixa atividade de todas pectinases. Apesar disso, nestas condições de temperatura o aumento do pH para 4,5 favorece o crescimento celular, logo, a atividade de Endo-PG foi observada. O crescimento de *C. cladosporioides*, entretanto, parece não ser afetado pelo pH (3,5) em fermentações realizadas a 25 °C. Além disso, essa temperatura favoreceu a atividade de Endo-PG, com produção de 0,4 a 0,45 U/g.

A temperatura influenciou significativamente a produção de poligalacturonases (Exo e Endo) por *C. cladosporioides*. Altas atividades poligalacturonase (Exo e Endo) foram obtidas em pH ácido, entretanto, diferenças na temperatura são observadas. A literatura relata essas diferenças mostrando que Exo-PG são mais ativas em pH ácido e temperaturas maiores em comparação a Endo-PG. Malvessi; Silveira (2004) estudou a relação do pH e a temperatura na atividade PG e mostrou que altas atividades Endo-PG eram obtidas em pH 4,7 e temperaturas entre 35 e 40 °C, enquanto que Exo-PG em pH 4,5 e temperaturas entre 55 e 60 °C. A produção de Endo-PG por fungos filamentosos se dá em temperaturas variando de 20 a 60 °C em pH ácido (SOUZA et al. 2003, FREITAS, 2009, COMBO et al. 2010). No presente estudo, foi observado que altas produções de Endo-PG estão associadas a pH ácido na faixa de 3,75 e 5,0, porém, em temperaturas mais baixas (25-27,5 °C). Assim como PL, as Endo-PG tem sua produção reduzida em temperaturas acima de 35 °C.

Rocha, (2018), ao avaliar o potencial de produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* IOC 4003 em fermentação sólida de acerola e cajá, notou que as maiores atividades foram obtidas após 96 a 120 horas de fermentação. Fernandes (2014),

relatou que a atividade de Endo-PG produzida por *T. viride* (CMEC 00125) quadruplicou após 168 horas de fermentação (29,632 U/g) em relação ao cultivo de 48 horas (6,777 U/g). Além disso, o mesmo não foi observado por ele para cepa *C. cladosporioides* (CMEC 00126) que apresentou maior atividade Endo-PG (7,367 U/g) com 96 horas de cultivo, com perda de atividade acima deste tempo. O relato acima foi semelhante ao presente estudo, onde o aumento do tempo favoreceu a alta atividade Endo-PG pelas cepas *T. viride* e *A. niger* após 120 horas de fermentação, enquanto *C. cladosporioides* produziu alta atividade com 96 horas.

Os resultados relatados aqui estão coerentes com aqueles na literatura, onde maiores atividades de poligalacturonases são obtidas em pH inicial ácido, porém neste estudo observou-se que as temperaturas podem ser diferentes. Além disso, a produção de pectina liase é regulada diferentemente das poligalacturonases, sendo a produção de PL dependente de temperatura e a faixa ideal é de 22 a 30 °C (NGUYEN, KANEKO & KAMIO, 2002, PEDROLLI et al. 2009, KOSER et al. 2014, POONDLA et al. 2016, AHMED et al. 2016). Santi (2005) mostrou que a temperatura ótima de produção de Exo-PG por *Penicillium oxalicum* foi de 32 °C, enquanto para PL foi 28 °C. Este estudo, porém, mostra que as condições de temperatura para máxima produção de PL e Endo-PG pelos fungos são similares e diferentes de Exo-PG: pectina liases e endo-poligalacturonases estavam mais ativas em fermentações submetidas a temperaturas abaixo de 30 °C, enquanto Exo-poligalacturonases tiveram maiores atividades em temperaturas mais elevadas, de aproximadamente 35 °C. Esses resultados são interessantes quando se deseja a formulação de um produto com atividade dessas duas frações (PL e Endo-PG).

Conclui-se que o tempo de fermentação (X1), o pH (X2) e a temperatura (X3) são fatores importantes para o sucesso da fermentação e suas interações parecem interferir diretamente na atividade de pectina liase e poligalacturonases (Exo-PG) dos fungos avaliados. No entanto, as condições ótimas de maior atividade de cada fração enzimática (PL, Exo e Endo-PG) será específica para cada microrganismo, podendo ser observado variações entre os diferentes fungos (SOUZA et al. 2003, HENDGES et al. 2011). Além disso, variações na atividade enzimática atribuídas à desconformidade do cultivo (composição do meio), bem como, pela alta variabilidade interlaboratorial não devem ser descartadas.

3.3. Otimização e validação experimental

Os fatores otimizados experimentalmente foram validados, a fim de cumprir o objetivo desse estudo: produção de um extrato enzimático fúngico com elevada atividade específica de três pectinases (PL, Exo-PG e Endo-PG).

- *C. cladosporioides* foi otimizado nas seguintes condições: 120 horas de fermentação, meio de cultura ajustado para pH 4,2 e temperatura a 29 °C. Nestas condições estima-se produzir aproximadamente 55,4 U/g de PL, 0,77 U/g de Exo-PG e 0,50 U/g de Endo-PG. No experimento validado nestas condições foi obtida a produção de 56,1 U/g de PL, 0,81U/g de Exo-PG e 0,51U/g de Endo-PG.
- *T. viride* foi otimizado a 120 horas de fermentação, meio de cultura ajustado para pH 4,5 e temperatura a 25 °C e nestas condições estima-se produzir aproximadamente 9,36 U/g de PL, 0,60U/g de Exo-PG e 0,48U/g de Endo-PG. Na validação foi obtida a produção de 15,06 U/g de PL, 0,94U/g de Exo-PG e 0,38U/g de Endo-PG.
- *A. niger* otimizado a 120 horas de fermentação, meio de cultura ajustado para pH 4,18 e temperatura a 25 °C estima-se produzir aproximadamente 60 U/g de PL, 0,14 U/g de Exo-PG e 0,44 U/g de Endo-PG. No experimento validado se obteve a produção de 75,76 U/g de PL, 1,11 U/g de Exo-PG e 0,45 U/g de Endo-PG.

Os resultados obtidos na validação experimental detalhada acima foram muito semelhantes ao rendimento previsto confirmando assim a validade das equações dispostas nas Tabelas 5, 6 e 7.

3.4. Seleção de potenciais produtores pectinases

Para facilitar a comparação do rendimento enzimático no extrato produzido, a Tabela 7 mostra os valores de atividade enzimática em U/mL e a atividade enzimática específica em U/g de cada pectinase:

Tabela 7 – Atividade enzimática (U/mL) e Atividade enzimática específica (U/g) das pectinases: Pectina liase (PL), Exo-poligalacturonases (Exo-PG), Endo-poligalacturonases (Endo-PG) dos três fungos avaliados.

Microrganismo	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade enzimática específica (U/g)
<i>C. cladosporioides</i>	89 (PL)	56,1 (PL)
	1,3 (Exo-PG)	0,81 (Exo-PG)
	514,3 (Endo-PG)	0,51 (Endo-PG)
<i>T. viride</i>	24 (PL)	15,06 (PL)
	1,5 (Exo-PG)	0,94 (Exo-PG)
	388,7 (Endo-PG)	0,38 (Endo-PG)
<i>A. niger</i>	120 (PL)	75,7 (PL)
	1,76 (Exo-PG)	1,11 (Exo-PG)
	451,5 (Endo-PG)	0,45 (Endo-PG)

Diferenças na produção de PL e PG pelos três fungos foram observadas. A atividade de PL produzida por *T. viride* foi relativamente baixa comparado aos fungos *C. cladosporioides* e *A. niger* que mantiveram valores acima de 60 U/g de atividade PL. Assim, *C. cladosporioides* e *A. niger* foram considerados os maiores produtores de pectinases (Tabela 8).

Neste estudo *C. cladosporioides* se mostrou um bom produtor de PL, com níveis de atividades específicas próximos da cepa de *A. niger*, o que é positivamente interessante uma vez que a espécie *Aspergillus niger* é considerada uma excelente produtora de pectinases. A maioria dos relatos de produção de pectinases na literatura são a partir de espécies do fungo *Aspergillus*, os quais são considerados ótimos produtores e compõem a maioria das enzimas comerciais extensivamente utilizadas nos setores da biotecnologia industrial. Na literatura existem apenas dois relatos mencionados acima sobre a produção de pectinases por *C. cladosporioides*, porém, nenhum deles relata alta atividade PL em cultivo submerso.

Nossos resultados foram coerentes com esperado segundo estudos previamente realizado por nosso grupo de pesquisa. Fernandes (2014), por exemplo, mostrou que a produção de PL por cepas de *C. cladosporioides* (263 a 898 U/g) em fermentação sólida utilizando casca seca de café apresentou produções enzimáticas superiores à cepa de *T. viride* (142 a 174 U/g). É importante ressaltar que as produções de PL relatados aqui foram inferiores ao encontrado por Fernandes (2014) possivelmente devido tipo de fermentação, visto que em fermentação sólida de fungos filamentosos a produção enzimática geralmente é maior. Porém, ao compararmos com os resultados relatado por

Bastos (2012) em fermentação submersa por *C. cladosporioides* em que produziu 7 U/g de PL, 0,001 U/g de Exo-PG e 0,04 U/g de Endo-PG, notamos que a cepa *C. cladosporioides* C196 utilizada neste estudo obteve maior produção das enzimas avaliadas, demonstrando elevado potencial para atividade PL em detrimento a PG para atingir atividades superiores a 56 U/g.

De forma geral, a produção de nossas pectinases (PL, Exo e Endo-PG) por *C. cladosporioides* e *A. niger* foi inferior quando comparada ao relatado na literatura: 9,42 U/g de Endo-PG produzida por *P. clavispurus* em cultivo submerso (SmF) (SOUZA et al. 2003), 18,8 U/mL de PL por *A. niger* CF4 em SmF utilizando suco de maçã (MANTOVANI et al. 2005), 0,4 U/mL de PL e 0,98 U/mL de PG produzido por *Streptomyces lydicus* em SmF (JACOB; PREMA 2006), 27,21 U/mL PG em SmF a partir de *P. chrysogenum* (BANU et al. 2010), 45 U/g de Endo-PG produzida por *A. niger* T0005/007-2 (HENDGES et al. 2011), 150 U/mL de PL em SmF produzida por *A. niveus* (MALLER et al. 2012), 2,61 U/g de PG produzida por *Streptomyces* sp. GHBA10 em SmF (ARIJIT et al. 2013), 51 U/mL de PG pela levedura *Wickerhamomyces anomalus* em SmF (MARTOS et al. 2013), 83,46 U/g Exo-PG por *Penicillium notatum*, 73,21 U/g Exo-PG por *Coriolus versicolor* e 62,29 U/g Exo-PG por *Ganoderma lucidum* em SmF (AMIN et al. 2017), 21,63 U/mL Exo-PG em SmF a partir de *Aspergillus* sp. CC1 (MA et al. 2017), 16,5 U/g de PG por *Fusarium* sp. N6C6 e 12,3 U/g de PG por *M. racemosus* N9C1 via SSF (RAMOS-IBARRA et al. 2017), 565 U/g de PG por *A. fumigatus* R6 em SSF (WONG et al. 2017). Apesar disso, neste estudo foi apresentado novas enzimas que podem ser estudadas para aplicações agroindustriais.

Considerando que as enzimas PL são capazes de metabolizar toda a molécula de pectina (de alta e baixa metoxilação) sem necessidade da ação prévia de outras enzimas do complexo pectinolítico, não liberando metanol tóxico, são alvo interessante para aplicação na indústria de alimentos.

A atividade de PL observada extrato enzimático produzido por de *Cladosporium cladosporioides* C196 pode ser maximizada em detrimento a PG pelo processo de otimização das condições de fermentação. Esses resultados são positivamente interessantes visto a relevância dessa enzima no processamento de alimentos. Baseado nisso, sugerimos o estudo da pectina liase produzida por *C. cladosporioides* C196 para aplicações nos processos industriais que envolvem a manipulação de alimentos.

A partir dessa perspectiva, procuramos esclarecer melhor a produção de PL por *C. cladosporioides* e otimizamos condições as condições ideais para produção de um extrato enzimático com alta atividade específica de PL em detrimento as demais: 120 horas de fermentação, meio de cultura ajustado para pH 4,5 e temperatura a 25 °C. Nestas condições estimou-se produzir aproximadamente 76,5 U/g de PL, 0,2 U/g de Exo-PG e 0,45 U/g de Endo-PG e a produção média dessas três frações obtida na validação do experimento foi de 76,6; 0,17 e 0,4 U/g, respectivamente.

3.5. Efeito da concentração de pectina na atividade de pectinases por *C. cladosporioides*

A produção de pectinases bem como as condições ideais para máxima produção dessas enzimas por *C. cladosporioides* ainda é pouco elucidada. Em estudos realizados anteriormente, Bastos, (2012) relatou que a produção de pectina liase por *C. cladosporioides* (Fres.) de Vries é dependente da concentração de pectina do meio, a qual pode ser maximizada em concentrações variando entre 4 e 16 g/L de pectina cítrica em pH ácido e superior a 16 em pH próximo da neutralidade. Estudos mostram que o incremento na concentração do indutor afeta a atividade pectinase (ZENI, 2011, RAMÍREZ-TAPIAS et al. 2015, EL ENSHASY et al. 2018).

Na tentativa de entender melhor o comportamento de *C. cladosporioides* C196 na produção de pectinases e aumentar ainda mais a produção dessas enzimas nas duas condições de tempo, pH e temperatura previamente otimizadas, as concentrações de 16, 20 e 24 g/L da pectina cítrica no meio de cultivo foram testadas.

A concentração de pectina cítrica no meio de cultivo para indução do crescimento fúngico e produção das pectinases foi avaliada em diferentes doses para cada fração de pectinase (PL, Exo-PG e Endo-PG) nos dois sistemas de fermentação (SmF1 e SmF2). Nas duas condições de fermentação otimizadas anteriormente, observamos diferenças nos valores médios de produção de pectinases quando submetidos aos tratamentos com diferentes doses do indutor (Tabela 8).

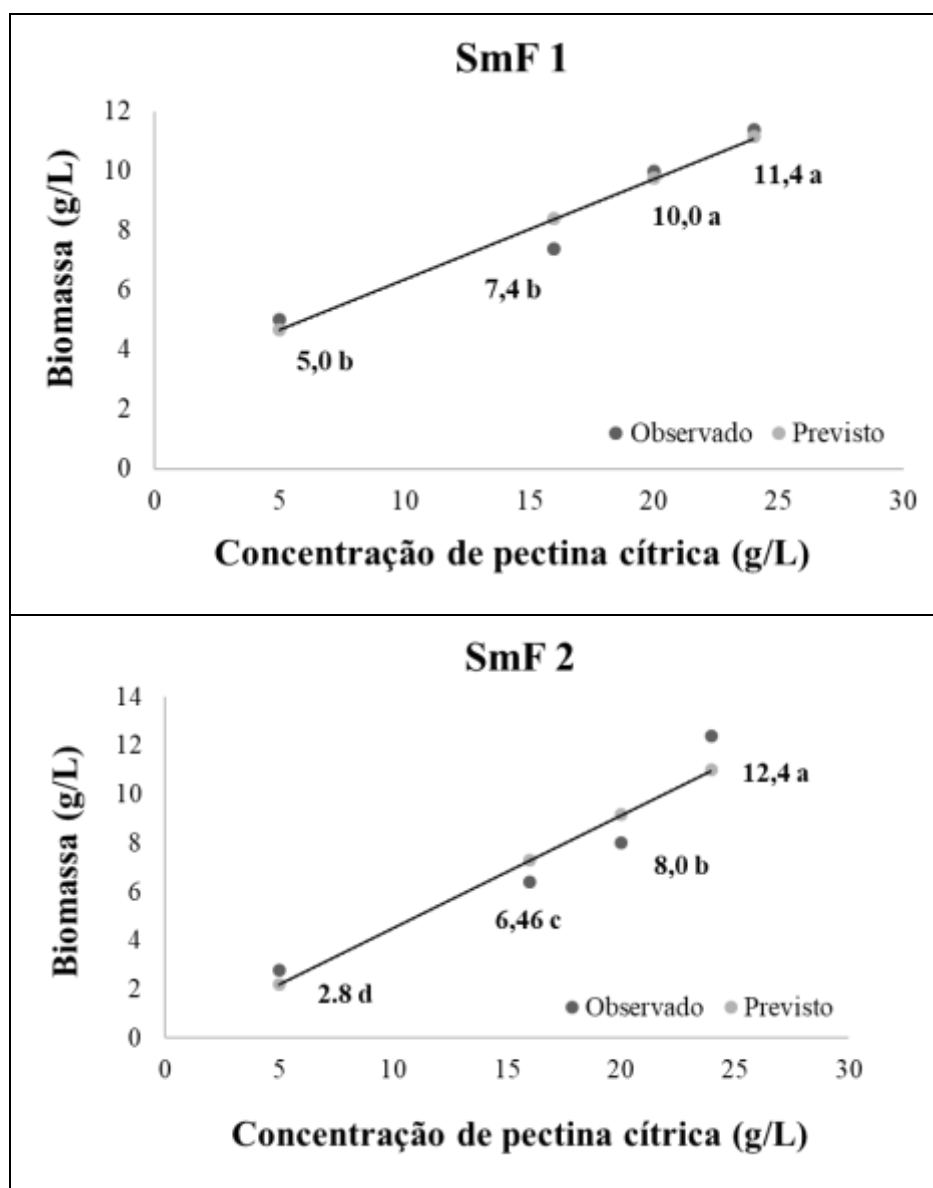
Tabela 8 – Médias observadas da atividade de pectinases (U/g) e biomassa (g/L) produzida em diferentes concentrações de pectina (g/L) nas duas condições otimizadas. Legenda: SmF 1: fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29 °C. SmF 2: fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25 °C.

	Pectina (g/L)	PL	EXO-PG	ENDO-PG	Biomassa
SmF 1	5	56,20333	0,813333	0,513333	5,0
	16	51,73333	3,483333	0,4	7,4
	20	71,80667	3,47	0,443333	10,0
	24	94,57333	3,323333	0,466667	11,4
SmF 2	5	76,64772	0,170933	0,405391	2,8
	16	75,80543	0,026661	0,55982	6,4
	20	52,22152	0	0,567432	8,0
	24	0	0,102386	0,168457	12,4

3.5.1. Crescimento do fungo *C. Cladosporioides*

A concentração de pectina cítrica no meio de cultivo influenciou significativamente ($p < 0,05$) o crescimento micelial do fungo nos dois sistemas de fermentação submersa (SmF1 e SmF2). Em ambas fermentações foi observado no gráfico uma reta crescente, indicando uma tendência ao aumento da produção de biomassa (g/L) à medida que há um aumento nas doses de pectina cítrica no meio, o que reflete um bom crescimento micelial do *C. Cladosporioides* nas condições observadas (Figura 9).

Figura 9 – Análise de regressão das médias observadas e previstas no crescimento de *C. Cladosporioides* em SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29 °C) e em SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25 °C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica.



As taxas de crescimento podem ser afetadas quando a temperatura se encontra abaixo da mínima desejável, afetando a absorção de substratos e, conseqüentemente, o crescimento microbiano. À medida que a temperatura cai abaixo da temperatura ideal de crescimento para uma espécie, a membrana é afetada, diminuindo a eficiência das proteínas de transporte incorporadas a ela e, portanto, reduzindo a capacidade do microrganismo sequestrar o substrato do ambiente pelos processos de transporte ativo (NEDWELL, 1999). A literatura mostra que a temperatura ideal para crescimento de *C. cladosporioides* é 28 °C (BASTOS, 2012, FERNANDES, 2014). Isso explica por que a

temperatura utilizada no SmF2 (25 °C) afetou o metabolismo de *C. cladosporioides* refletindo em um menor crescimento micelial comparado ao SmF1 (29 °C) que tem uma temperatura mais próxima da ideal.

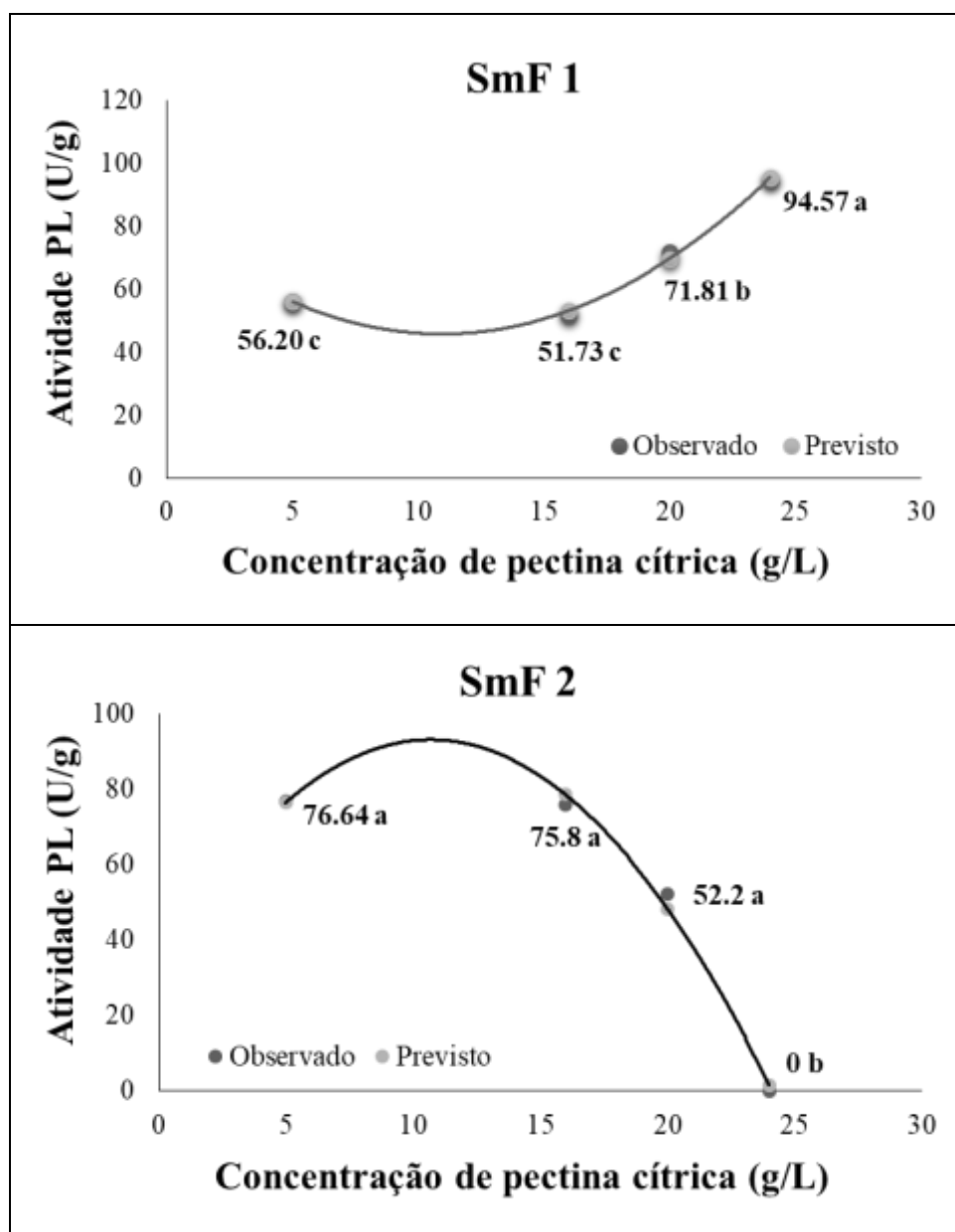
De forma geral, observamos o crescimento ascendente de *C. cladosporioides* nos dois sistemas de fermentação quando houve incremento nas doses de pectina cítrica, que foi a fonte de carboidrato polissacarídeo inserida no meio de fermentação para indução de pectinases. Assim, se espera durante o crescimento de *C. cladosporioides* a secreção de enzimas pectinolíticas no extrato para que haja o consumo completo da pectina.

Porém, embora a formação de enzimas extracelulares e o crescimento fúngico sejam processos associados, nem sempre o acúmulo de biomassa vai indicar elevadas atividades enzimáticas produzidas (Fontana et al. 2005). Dessa forma, propomos avaliar a produção das pectinases submetidas a diferentes doses de pectina cítrica comparando com a biomassa produzida por *C. cladosporioides*.

3.5.2. Pectina Liase (PL)

A análise de regressão mostrou que as doses de pectina cítrica adicionada no meio de cultivo das duas condições otimizadas influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a atividade de pectina liase (U/g). A Figura 10, confirma as diferenças observadas na atividade de pectina liase em razão da concentração de pectina cítrica adicionada no meio de cultivo.

Figura 10 – Análise de regressão das médias observadas e previstas para atividade de pectina liase no SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29 °C) e no SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25 °C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica.



Observamos em SmF 1 que a atividade de pectina liase (U/g) e a biomassa (g/L) era crescente com o aumento das doses de pectina cítrica no meio de cultivo. A dose influenciou significativamente a atividade PL e o maior valor médio obtido foi de 94,57 U/g no extrato que recebeu 24 g/L de pectina cítrica. Não houve diferença significativa na atividade PL quando se utilizou as doses de 5 e 16 g/L, apenas em doses acima de 16 foi observado aumento da atividade PL. A curva demonstra que à medida que aumenta a concentração de pectina cítrica no meio de cultivo, há uma tendência ao aumento da

atividade de pectina liase no extrato enzimático. Dessa forma, para obtenção de maior atividade PL nas condições de pH e temperatura utilizadas no SmF1 recomenda-se a adição de 24 g/L de pectina cítrica.

No SmF 2 não foi observado diferença estatística entre as doses 5, 16 e 20 g/L sobre a atividade de PL, apenas a dose 24 g/L se diferenciou delas por não ser encontrado atividade enzimática. Apesar disso, observamos que a atividade de PL foi maior quando se utilizou a concentração de 5 g/L e decresce consideravelmente com adição do indutor em concentrações superiores a 16 g/L. Assim, nas condições de pH e temperatura de SmF2 o crescimento de *C. cladosporioides* se manteve contínuo com o acréscimo da pectina cítrica no meio de cultivo, porém a atividade PL sofreu uma queda sutil em concentrações superiores a 5 g/L, e uma queda drástica acima de 16 g/L do indutor.

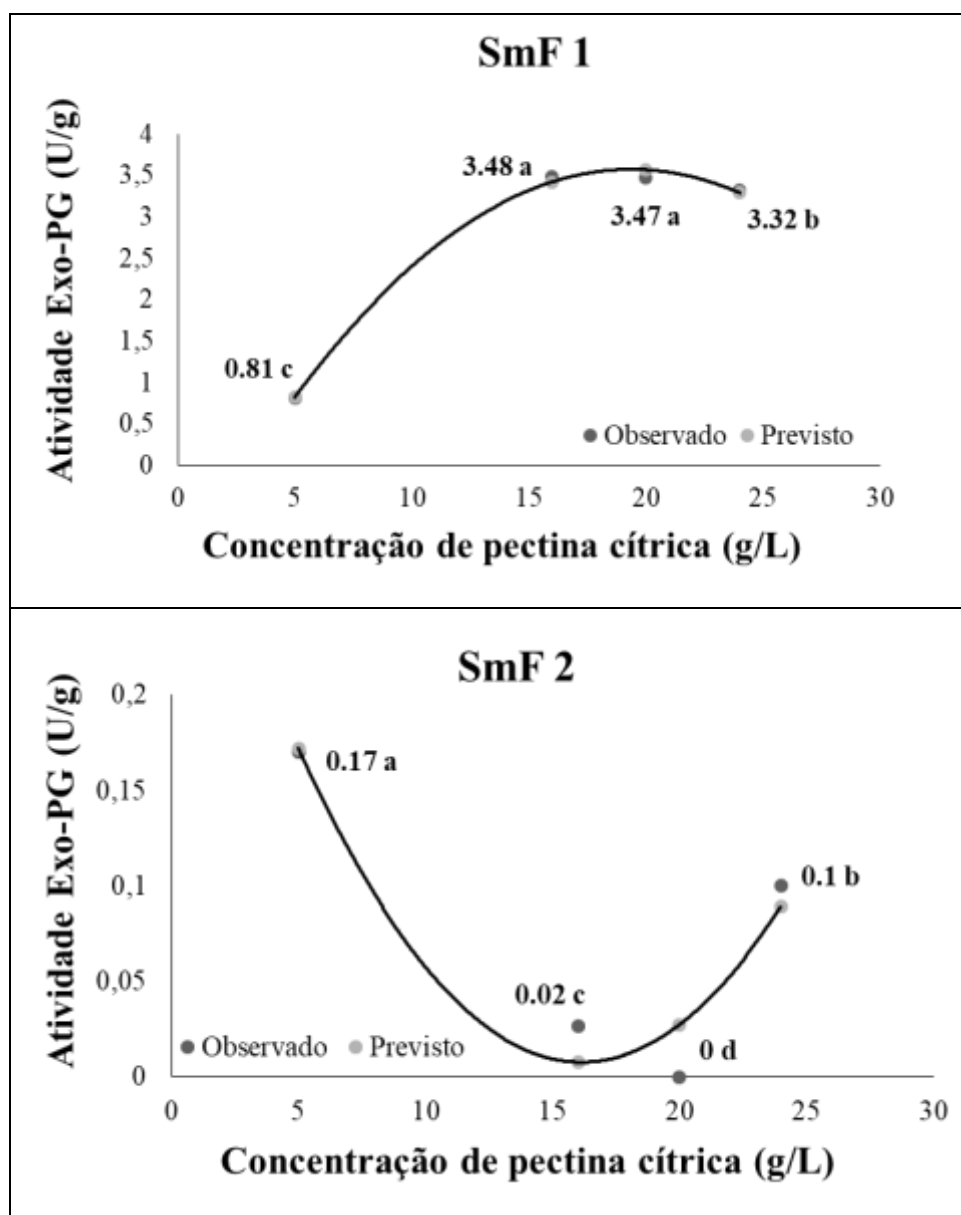
Os dois sistemas de fermentação mencionados acima possuem temperaturas diferentes e apresentaram respostas de crescimento e produção de PL distintas frente ao acréscimo das doses de pectina cítrica. Vimos no item 3.1. que a temperatura é um fator que afeta a atividade de PL por *C. cladosporioides*. Uma temperatura mais elevada no SmF1 (29 °C) pode ter favorecido o metabolismo de *C. cladosporioides* tornando-o capaz de crescer mais e consumir todas as doses de pectina, refletindo em altas atividades PL à medida que aumentou a pectina no meio. Em contraste, embora a atividade PL seja maior a 25 °C como visto em SmF2, o metabolismo de *C. cladosporioides* foi mais lento e em concentrações de pectina acima de 16 g/L provocou um decréscimo na atividade PL.

3.5.3. Exo-poligalacturonase (Exo-PG)

As doses de pectina cítrica adicionadas no meio de fermentação influenciaram significativamente a atividade de Exo-PG por *C. Cladosporioides* nas duas fermentações (SmF1 e SmF2) ($p < 0,05$). Na Figura 11, observamos que a curva da atividade de Exo-PG é crescente com o incremento das doses de pectina cítrica no SmF1. A análise de variância mostrou diferenças na atividade enzimática devido as doses do indutor adicionadas na fermentação e as maiores médias de atividade Exo-PG foram atingidas em concentrações de 16 e 20 g/L da pectina cítrica. A curva demonstra o pico de máxima atividade, com valor de 3,48 U/g, na concentração de 16 g/L e um decréscimo de atividade quando se aumenta a concentração para valores acima de 20 g/L. Dessa forma, para

maiores atividades dessa enzima, nas condições de SmF1, recomenda-se utilizar doses de 16g/L do indutor na fermentação.

Figura 11 – Análise de regressão das médias observadas e previstas para atividade de Exo-poligalacturonase no SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29 °C) e no SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25 °C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica.



Em contraste, no SmF2, a análise de variância mostrou que todas as concentrações da pectina cítrica adicionadas afetaram a atividade Exo-PG. Foi observado um efeito negativo das doses com um decréscimo da atividade a medida que há um aumento na concentração do indutor. A maior atividade Exo-PG, 0,17 U/g, foi obtida adicionando a

concentração 5 g/L de pectina cítrica ao meio de cultivo, porém, doses superiores a essa reduziram a atividade enzimática. Apesar da atividade Exo-PG no SmF2 ser reprimida com o aumento das doses, na Figura 1, observamos o efeito positivo do acréscimo da concentração da pectina cítrica sobre o crescimento de *C. Cladosporioides*.

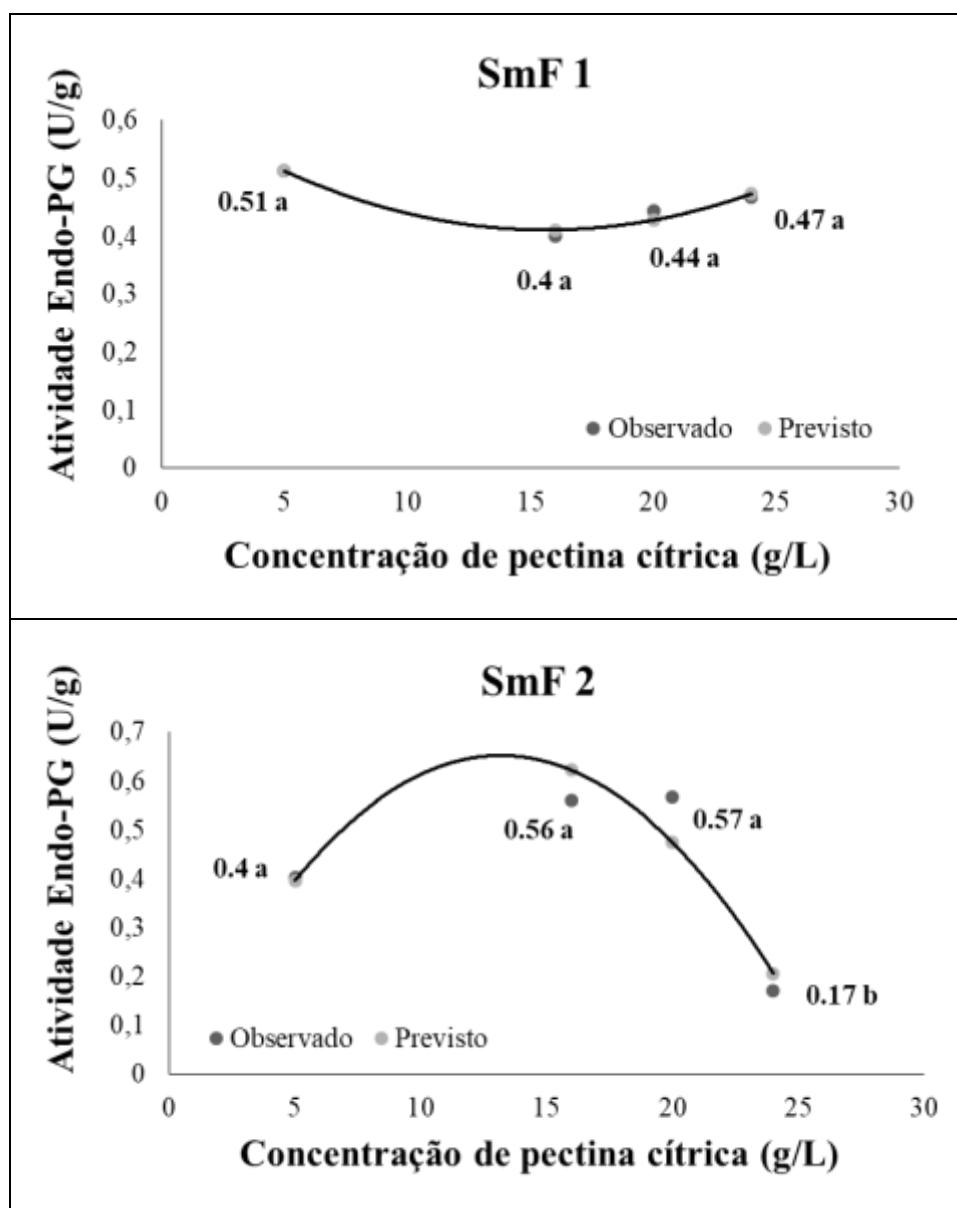
O que diferencia os SmF1 e o SmF2 são as condições de pH e temperatura em que são realizadas as fermentações. Assim como observado na atividade de PL, enquanto o acréscimo na concentração de pectina exerceu efeito positivo na atividade Exo-PG nas condições do SmF1, esse efeito é negativo em SmF2. Essa diferença pode estar relacionada as condições de pH e temperatura de fermentação que são fatores considerados preponderantes para atividade de Exo-PG por *C. Cladosporioides*, conforme discutido no item 3.2.1 deste capítulo.

3.5.4. Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

A análise de variância mostrou que as doses de pectina cítrica adicionadas no meio de cultivo influenciaram a produção da enzima Endo-poligalacturonase ($p < 0,05$) por *C. Cladosporioides* nas duas fermentações (SmF1 e SmF2).

Nas condições do SmF1, não foi observado diferenças significativas entre as doses avaliadas sobre a produção da enzima Endo-PG. Entretanto, a maior atividade dessa enzima, com valor de 0,51 U/g foi obtido quando se adicionou 5 g/L da pectina cítrica no meio de cultivo. A curva da atividade Endo-PG demonstra que doses superiores a 5 g/L provocam um decréscimo sutil na atividade dessa enzima (Figura 12).

Figura 12 – Análise de regressão das médias observadas e previstas para atividade de Endo-poligalacturonase no SmF1 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,2 e a 29°C) e SmF2 (fermentação submersa a 120h, em pH 4,5 e a 25°C), submetida as doses 5, 16, 20 e 24 g/L de pectina cítrica.



Nas condições do SmF2, não foi observado diferenças significativas entre as doses 5, 16 e 20 g/L, porém, a curva da atividade enzimática mostra o aumento da atividade Endo-PG com o incremento das doses. O pico de atividade (0,57 U/g) é atingido com adição de 20 g/L do indutor, valores de pectina acima desse provoca o decréscimo na atividade Endo-PG para até 0,17 U/g (Figura 12).

De maneira geral, observamos que o perfil de atividade de PL e Exo-PG na fermentação SmF1 foi similar, uma vez que a atividade dessas enzimas aumentou com o

acréscimo das doses de pectina cítrica. Fatores como temperatura e pH influenciaram diretamente a atividade dessas enzimas (itens 3.1 e 3.2.1), portanto, podem ter sido preponderantes no crescimento micelial e manutenção da atividade enzimática de PL e Exo-PG mesmo em altas doses de pectina no meio. A temperatura utilizada no SmF1 (29 °C) é considerada próxima da ideal de crescimento de *C. cladosporioides*, logo, favoreceu a absorção dos substratos do meio refletindo em um bom crescimento micelial e secreção de enzimas.

Estudos confirmam que a atividade enzimática aumenta de forma expressiva com adição da pectina cítrica no meio. Martos et al. 2009 relata a condição ótima para produção de pectinase por *A. niger* em meio de cultivo suplementando com 20 g/L de pectina. Entretanto, o pico de atividade PG (20,9 U/g) produzida por *A. niger*, relatado por Souza et al. 2010, foi obtido em concentrações de 13,1 g/L de pectina adicionada no meio de cultivo que fermentou a uma temperatura de 30°C. El Enshasy et al. (2018) mostra em seu estudo que a produção de pectinase é crescente com o aumento da concentração de pectina: acima de 10 g/L de concentração de pectina houve aumento da atividade pectinase, mas sua produção máxima é obtida a 32,22 g /L de pectina. Altas atividades de PL (7000 U/mg) e Exo-PG (1 U/mg) produzida por *C. cladosporioides* foram obtidas em doses elevadas da pectina cítrica na fermentação em pH ácido, sendo as doses ideais de 4 a 16 g/L para produção de PL e para Exo-PG superior a 18 g/L (BASTOS, 2012).

Observamos que a maior atividade Endo-PG foi obtida em concentrações entre 16 a 20 g/L de pectina em fermentação com pH ácido a 25 °C. Bastos (2012) mostra também resultados de atividade Endo-PG similares ao relatado no SmF2 deste estudo, onde as maiores atividades Endo-PG (40 U/mg) foram obtidas em concentrações de pectina variando entre 18 a 22 g/L numa fermentação submersa realizada em pH ácido, porém, a 28 °C. No presente estudo, entretanto, em fermentação submersa a 29 °C e pH ácido observamos decréscimo de atividade Endo-PG em concentrações acima de 5 até 16 g/L, mas um ligeiro aumento de atividade em concentrações acima de 16 até 24 g/L da pectina cítrica, mesmo assim a maior atividade foi a 5 g/L. A adição de pectina ao meio resulta em aproximadamente 100% aumento da atividade enzimática secretada por *K. marxianus*, entretanto, altas concentrações glicose causa repressão de catabólica nessa levedura (SCHWAN et al 1994).

Por outro lado, a atividade de PL e Exo-PG no SmF2 foi afetada negativamente pelo acréscimo de pectina cítrica no meio de cultivo. Muito semelhante ao relatado aqui, Maller et al. (2012) confirmou o efeito da fonte de carbono sobre o crescimento de *A. niveus* e produção de pectinases ao observar a produção de biomassa contínua em elevadas concentrações de pectina cítrica com queda acentuada na produção de PL em concentrações acima de 2 g/L. Em seu estudo o crescimento máximo ocorreu às 24 horas de fermentação, porém, a secreção máxima de PL ocorreu após 96 horas, totalizando 150 U/g. Ahmed et al. 2016 otimizou alta atividade pectinase, com 126 U/mL produzida por *A. niger* em fermentação submersa utilizando resíduos de casca de laranja como fonte de carbono na concentração de 4 g/L após o quinto dia de fermentação.

Concentrações reduzidas de açúcares direciona o metabolismo para a quebra da molécula de pectina, de modo que ela seja consumida, gerando altas atividades pectinolíticas (FAWOLE; ODUNFA, 2003). A síntese de pectinases pode ser afetada pelo acúmulo de ácido galacturônico, uma vez que em excesso pode favorecer quelação de íons metálicos, os quais podem inibir a atividade enzimática. Ouattara et al. (2008) relatou o crescimento celular na fermentação submersa do cacau quando se adicionou doses de 0,5 g/L de pectina cítrica, entretanto, não houve a atividade PL sugerindo repressão devido ao acúmulo de ácido galacturônico. Meneghel et al. 2016 estudou o efeito do substrato bagaço de maçã seco e triturado na indução da produção de pectinases por *A. oryzae* em processo submerso e constatou que baixas concentrações do substrato proporcionavam elevadas atividades da enzima. Essas variações na produção das pectinases são devidas a diferenças na concentração de pectina cítrica adicionadas à fermentação, uma vez que a produção de enzimas extracelulares pode ser influenciada pelo substrato da proteína e pela composição do meio (ROMBOUTS; PILNIK 1980, MALLER et al. 2012).

A partir dessa perspectiva, entendemos que para cada sistema de fermentação haverá uma condição ideal de concentração máxima de pectina capaz de ser completamente metabolizada pelo microrganismo e gerar um produto final com altos rendimentos enzimáticos. Considerando que nosso estudo mostrou ser mais interessante produzir maior atividade de PL em detrimento as demais, o SmF 2 foi o sistema de fermentação que teve melhores resultados. Nas condições de SmF2 a pectina cítrica adicionada em menores quantidades (5 g/L) foi melhor aproveitada por *C.*

cladosporioides, conferindo altas atividades da pectina liase no extrato fermentado (76 U/g).

Esses resultados mostram que *C. cladosporioides* pode ser uma fonte promissora de pectinases. Sua capacidade de produzir um extrato enzimático com atividade da enzima pectina liase utilizando técnicas simplificadas, de fácil aplicação e baixo custo o torna interessante para aplicações industriais. Entretanto, testes de campo e estudos adicionais de estabilidade enzimática serão necessários para se ter conhecimento sobre a eficiência do extrato enzimático produzido neste estudo.

4. Conclusão

A partir da metodologia de superfície resposta concluímos que a produção de PL por de *Cladosporium cladosporioides* C196 pode ser maximizada em detrimento a PG pelo processo de otimização das condições de fermentação. A atividade PL foi influenciada pelo tempo de fermentação e temperatura, sendo maximizada (60 U/g) em 120 horas de fermentação a 25°C. Enquanto a atividade PG foi influenciada pelo pH inicial do meio e a temperatura, com valores altos (1.4 U/g) em pH5 a 35°C.

A cepa *C. cladosporioides* C196 teve os melhores resultados na atividade de PL, com produção de 94,6 U/g em fermentação submersa (SmF1) a 120 horas, pH 4,2, a 29 °C com 24 g/L de pectina cítrica ou 76 U/g em fermentação submersa (SmF2) a 120 horas, pH 4,5 e a 25 °C com 5 g/L de pectina cítrica. A produção de PL foi maximizada em detrimento as demais (Exo e Endo-PG) nas condições de fermentação especificadas no SmF2, tornando o processo mais simples e barato.

Esses resultados são positivamente interessantes visto a relevância dessa enzima no processamento de alimentos, tornando atraente seu estudo para aplicações industriais. Baseado nisso, sugerimos que as novas enzimas (pectina liase) produzidas pela cepa *C. cladosporioides* C196 sejam estudadas para aplicações industriais que envolvem a manipulação de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ACUNA-ARGUELLES, M. E. et al. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 808-814, 1995.
- AHMED, I. et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 148–154, 2016.
- ALMATAR, M.; MAKKY, E. A. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. **3 Biotech.**, v. 6, p. 4, 2016.
- AMIN, F. et al. Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exopolysaccharonase enzyme and its application in fruit juice clarification. **International Journal of Food Engineering**, v. 13, n. 2, p. 2016-0256, 2017.
- ASGHER, M. et al. Optimization of Lignocellulolytic Enzyme Production by *Pleurotus eryngii* WC 888 utilizing Agro-Industrial Residues and Bio-ethanol Production. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 21, n. 1, p. 11133-11143, 2016.
- ARIJIT, D. et al. Improved Production and Purification of Pectinase from *Streptomyces* sp. GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat, Kerala, India. **International Research Journal of Biological Sciences**. v. 2, n. 3, p. 16-22, 2013.
- BANU, A. R. et al. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 377–381, 2010.
- BASTOS, S. C. **Pectinases from *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries: culture conditions, partial purification and characterization**. Theses (doctorate). Federal University of Lavras, 133 p. (2012).
- 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**, v. 9, n. 2, p. 167-172, 2013.
- BLANDINO, A. et al. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 497–503, 2001.

BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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**, v. 71, p. 45–50, 2000.

COMBO, A. M. M. et al. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, n. 3, p. 588–596, 2012.

EL ENSHASY, H. A. et al. Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 71, 2018.

FERNANDES, A.P. **Aproveitamento de resíduos de processamento via seca e via úmida do café para obtenção de pectinases**. 2014, 135 f. Tese (doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FONTANA, R. C., SALVADOR, S., & SILVEIRA, M. M. DA. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(8), 371–377.

FREITAS, P. M. **Produção de poligalacturonase termoestável pelo fungo *Rhizomucor pusillus* A 13.36 em fermentação em estado sólido, purificação e caracterização da enzima**. 2009. 95 f. Tese (Doutorado em ciências biológicas). Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. 3 **Biotech.**, v. 6, p. 47, 2016.

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

HENDGES, D. H. et al. Production and Characterization of Endo-Polygalacturonase from *Aspergillus niger* in Solid-state Fermentation in Double-Surface Bioreactor. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 253-258, 2011.

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

IRSHAD, M. et al. Bio-processing of agro-industrial waste orange peel for induced production of pectinase by *Trichoderma viridi*; its purification and characterization. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 9–18, 2014.

JACOB, N.; PREMA, P. Influence of Mode of Fermentation on Production of Polygalacturonase by a Novel Strain of *Streptomyces lydicus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 263–267, 2006.

JIA, Y. J. et al. Polygalacturonase, Pectate Lyase and Pectin Methylsterase Activity in Pathogenic Strains of *Phytophthora capsici* Incubated under Different Conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 10, p. 585–591, 2009.

KAUR, S. J.; GUPTA, V. K. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 333–342, 2017.

KOSER, S. et al. Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 327–332, 2014.

KUMAR, S.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1289–1298, 2011.

LIMA, J. O. et al. Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 602–606, 2017.

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

MALLER, A., DA SILVA, T. M., DAMÁSIO, A. R. L., REIS, V. R. A., JORGE, J. A., POLIZEL, M. L. T. M. Production of Pectin Lyase by *Aspergillus niveus* under

Submerged and Solid State Fermentations Using Agro-Industrial Residues as Carbon Sources. **International Research Journal of Microbiology**,3(1): 029-035, 2012.

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

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 219-24, 1987.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de BROCK**. 14. ed. Flávio Guimarães da Fonseca, Porto Alegre: Artmed, c.5, p. 158-163, 2016.

MARTINS, E. et al. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949–954, 2002.

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

NEDWELL, D. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 2, p. 101–111, 1999.

NIRMALADEVI, D.; ANILKUMAR, M. C.; SRINIVA, C. S. Production and Characterization of Exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. **International Journal of Pharma and Bio Sciences.**, v. 5, n. 1, p. 666-675, 2014.

NGUYEN, H. A.; KANEKO, J.; KAMIO, Y. Temperature-dependent Production of Carotovoricin Er and Pectin Lyase in Phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. carotovora Er. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 444–447, 2002.

OUATTARA, H. G. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1753–1760, 2008.

- PAGARRA, H. et al. Optimization and characterization of exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* cultured via solid state fermentation. **Jurnal Teknologi**, v. 81, n. 1, 2018.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.
- PATIDAR, M. K. et al. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, 2018.
- PEDROLI, B. D.; CARMONA, E. C. PL from *Aspergillus giganteus*: comparative study of productivity of submerged fermentation on citrus pectin and orange waste. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, v. 45, n. 6, p. 677-683, 2009.
- PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. I. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**. 2a Edição, São Paulo: Makron Books, vol. 1. 524 p, 1997.
- PICCOLI-VALLE, R. H. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n.2, p.135-140, 2001.
- POONDLA, V. et al. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 70–76, 2016.
- PHUTELA, U. et al. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, 2005.
- RAMÍREZ-TAPIAS, Y. A. et al. Alkaline and thermostable polygalacturonase from *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 with applications in waste waters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 221–228, 2015.
- RAMOS-IBARRA, J. R. et al. Production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation with new fungal strains using orange by-products. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2017.
- REBELLO, S. et al. Recent advancements in the production and application of microbial pectinase: an overview. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, n. 3, p. 381–394, 2017.

- REGINATTO, C. **Produção e caracterização parcial de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em processo submerso.** 2016, 78 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- ROMBOUTS, E.M., PILNIK W. **Pectic Enzymes.** In: Rose. A. (Ed). *Economic Microbiology*, v. 5., p. 693, London: Academic, 1980.
- ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift.** 2006, 188 f. Tese (doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SANDRI, I. G. **Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos.** 2014, 129 f. Tese (doutorado em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.** 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SIDDIQA, A. et al. Statistical optimization of Pectin Lyase from *Penicillium digitatum* in Solid State Fermentation. **International Journal of Applied Biology and Forensics**, v. 2, p. 157-170, 2018.
- 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**, v. 33, n. 4, 2002.
- SOUZA, J. V. et al. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 455–458, 2003.
- TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. 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**, v. 25, n. 3-5, p. 411–419, 1999.
- THAKUR, A. et al. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. **Enzyme Research**, p. 1-7, 2010.

VECHT-LIFSHITZ, S. E.; MAGDASSI, S.; BRAUN, S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. **Biotechnology and Bioengineering.**, v. 35, p. 890–6, 1990.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23., n. 2, p. 115–129, 2005.

WONG, L. Y. et al. Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 175–183, 2017.

ZENI, J. **Produção e caracterização parcial de pectinases obtidas por uma nova cepa de *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa.** 2011. 154 f. Tese (Doutorado em engenharia de alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Campus de Erechim. ERECHIM, RS.

CAPÍTULO III: (ARTIGO) – Optimization of pectin lyase production by *Cladosporium cladosporioides* C196 via submerge fermentation

ABSTRACT

Pectin lyases are attractive enzymes to food and beverage industry, as they can catalyze the pectin molecule without changing the specific aroma of the product and producing toxic methanol. Therefore, the discovery of new microbial sources of pectinases which can be used for bioproduct formulation that add value to industrial processes has been encouraged. This study focus on the production of pectin lyase (PL) by *Cladosporium cladosporioides* via submerged fermentation. Central composite design (CCD) is used to optimize the levels combination of the fermentation time, pH and temperature which reflect high activity pectinase. The production of PL and polygalacturonase (PG) differed due to fermentation conditions. The fermented product showed high PL activity (76 U g^{-1}) produced by *C. cladosporioides* C196, when optimized at 137.66 hours, initial pH 4.15, temperature at 30.7°C and adding 5 g L^{-1} of citrus pectin. These results suggest the *C. cladosporioides* C196 as a promising source of PL, also reveals unpublished information about the bioprocess of pectinase secretion by *C. cladosporioides*, which may contribute to future studies aimed at the bioproduct formulation for industrial applications.

Key-words: Beverage industry, Food industry, Pectinase activity, Bioprocess Optimization, Central composite design.

1. Introduction

The agro-industrial enzymes market has shown a significant growth in recent years due to the necessity of new technologies which enable a higher efficacy of the processes while maintaining low production costs [1,2]. Microbial pectinases are ecological tools with biotechnological potential for wide industrial applications as in the processing of fruits and vegetables, tea and coffee, animal feed, textile material, in stages of clarification of fruit juice, extraction of vegetable oil, scouring of plant fibers, bleaching of pulp and waste paper recycling [3,4]. Among pectinases, pectin lyases (PL) are more attractive in food and beverage processing as its action neither alters the specific aroma of the product nor generates toxic methanol after the degradation of pectin [5].

Pectinolytic enzymes are a group of related enzymes responsible for the hydrolysis of pectic substances. The process consists of breaking down polysaccharides present between in the middle lamella of the primary cell wall of fruits and vegetables, releasing galacturonic acids and their oligomers as products [6, 7]. Pectinases are classified according to the substrate preference (pectin, pectic acid or protopectin), mechanism of action (de-esterification, trans-elimination or hydrolysis) and by the cleavage site in the galacturonic acid molecule, which can be located randomly inside the residues (Endo-activity) or terminal of successive way from the reducing or non-reducing ends of the pectin (Exo- activity) [8, 9, 6].

The PL catalyses the glycosidic bonds in both ways (endo- and exo-) by a β -elimination mechanism forming 4,5 unsaturated oligogalacturonides. Thus, it acts directly on the pectin molecule with low and high degree of esterification, without previous or joint action with other pectinases. However, other pectinases such as pectin methyl esterase and polygalacturonases (PG) act by sequential degradation of pectin [10, 5, 4].

Microorganisms are the main sources of large-scale enzyme production. Filamentous fungi are commonly used as they synthesize extracellular enzymes that are easy to be recovered and extracted at the end of fermentation [11]. The main fungal sources of pectinases include the species of *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp. and *Trichoderma viride* [2, 4].

Cladosporium cladosporioides has been reported as a potential producer of bioactive compounds and extracellular enzymes [12] such as Endoglucanases [13], l-asparaginase [14], invertases [15], laccases [16, 17] and PG [18]. Despite of being known as a new

source of bioproducts, there is a knowledge gap regarding the secreted enzymes by *C. cladosporioides*, especially PL.

Fungal growth and pectinase synthesis depend on fermentation conditions, as nutritional composition, pectin concentration, initial pH of the medium, temperature, agitation, humidity and aeration [19, 20, 21]. Therefore, when identifying a new microorganism as enzyme producer, it is important to study and optimize the ideal conditions that allow its maximum enzymatic production.

Due to the ability of PL enzyme to catalyse the cleavage of α -1,4 pectic acid bonds by β -elimination in both ways (endo- or exo-) and its relevance to industrial processes, it was selected as of larger interest in this study. This study aims at providing the first report regarding pectin lyase production via submerged fermentation by *C. Cladosporioides* C196 strain isolated from dried coffee fruits. The fermentation time, pH and temperature levels was optimized by simultaneous response surface methodology. The concentration of pectin (citrus pectin) was adjusted for the optimized conditions to obtain an enzymatic concentrate with high PL activity.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

The mold *C. cladosporioides* C196 was obtained from Culture Collection of the Department of Food Science (CCDCA) (registration code CCDCA10733), Federal University of Lavras, Brazil. *C. cladosporioides* was cultivated in 2% malt culture medium (20 g of malt extract, 20 g agar and 1000 mL distilled water), at 25 °C for 5 (five) days.

2.2. Enzyme production

2.2.1. Submerged Fermentation (SmF)

The medium used in the submerge process was defined according to the composition (g L^{-1}): KH_2PO_4 (2); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,9); yeast extract (1) and citric pectin (5) for 1000 mL distilled water [22]. Erlenmeyer flask batch production (100 mL) with 50 mL of medium was used to obtain the enzymatic extract in the submerged-state process. For inoculation, 10% of the spore suspension was used and

the inoculum concentration from 10^7 spores/gram of culture medium were determined by counting the spores in a Neubauer chamber. The flasks were incubated in a shaker incubator with agitation at 135 rpm (SOLAB, SL-223).

The fermentation conditions specified below (item 2.4) were optimized and, thereafter, different citrus pectin concentrations in the culture medium above the optimized value were tested (g L^{-1}): 16, 20 and 24. After the fermentation, the enzymatic extracts of PL and PG were collected to access the pectinolytic activity.

2.2.2. *Obtaining crude enzyme extract*

The enzymatic extract was obtained by filtration in filter paper (Whatman n° 1), fermentation broth filtered was centrifuged at $7840 \times g$ for 10 min at 5°C (SL-701 - SOLAB Centrifuge) and stored at 4°C . The biomasses produced were submitted to a drying oven at 65°C . After drying, the samples were weighed in a semi-analytical balance until the constant masses were obtained (g L^{-1}).

2.3. *Enzymatic Assay*

2.3.1. *Pectin lyase (PL)*

PL activity (U mL^{-1}) was measured using an adaptation of the methodology described in Kashyap et al. [10]. In this method, the enzymatic extract was added to the mixture of pectin solution (1% w v) diluted in 0,05M TRIS buffer pH 6,8. Each unit of PL activity was defined as the amount of enzyme that caused a change in absorbance of 0.01 under assay conditions.

2.3.2. *Polygalacturonase (PG)*

PG activity (U mL^{-1}) was determined by the release of reducing groups from citric pectin according the methodology described by Schwan and Rose [23]. A calibration curve for polygalacturonic acid was obtained according to the method of Miller [24]. One PG unit (U) was defined as the amount of enzyme which catalysis the formation of 1 μmol of galacturonic acid $\text{mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ released from citric pectin under the assay conditions.

2.3.3. Protein measurement

Protein concentration (mg mL^{-1}) was measured according to Bradford [25] and adapted by Rocha [26] to determine the specific activities (U mL^{-1}) of pectinases enzymatic fractions.

2.4. Experimental design for production of pectinases fractions and statistical analysis

The submerged fermentation was performed in batch process, without feeding and in conditions specified by the central composite design (CCD) (table 1). The variables fermentation time (h), initial pH and temperature ($^{\circ}\text{C}$) were optimized using the methodology of simultaneous responses surface.

The quadratic regression model adjusted for the responses PL (1) and PG (2) were considered and the rotational central composite design was used with three repetitions in the central point. Thus, the model equation is provided by parametric values (represented by the coefficients β) to be estimated, as described in (1) and (2).

$\text{PL}_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 A_i + \beta_2 B_j + \beta_3 C_k + \beta_{11} A_i^2 + \beta_{22} B_j^2 + \beta_{33} C_k^2 + \xi_{ijk}$	(1)
$\text{PG}_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 A_i + \beta_2 B_j + \beta_3 C_k + \beta_{11} A_i^2 + \beta_{22} B_j^2 + \beta_{33} C_k^2 + \xi_{ijk}$	(2)

Where, i, j and k correspond respectively to the levels of factors (A) fermentation period, (B) initial pH and (C) temperature and y_{ijk} is the response obtained in each plot.

The maximum and minimum responses estimated by quadratic model of the response surface were identified in the contour graphics, which were generated by combining two factors while keeping a third one fixed. For each response variable, the graphs were obtained by combining the factors levels: $A \times B$; $A \times C$ and $B \times C$.

Based on the models (1) and (2) adjusted for each dependent variable, the simultaneous response optimization proposed by Derringer and Suich [27] was used. Therefore, we propose to determine the best combination among the factors that aim the maximum PL activity and the fixed value of PG activity of 0.1 U g^{-1} . This function is

represented by D as an estimate of the functions d_j ($j = 1, \dots, p$), which are obtained by the geometric mean (3) where p is the total number of variables:

$D = \left(\prod_{j=1}^p d_j \right)^{1/p} \text{ with } d_j$	(3)
$d_j = \begin{cases} 0 & ; \text{ if } \hat{y}_j < y_{jL} \\ \frac{\hat{y}_j - y_{jL}}{y_{jT} - y_{jL}} & ; \text{ if } y_{jL} < \hat{y}_j < y_{jT} \\ \frac{y_{jU} - \hat{y}_j}{y_{jU} - y_{jT}} & ; \text{ if } y_{jT} < \hat{y}_j < y_{jU} \\ 0 & ; \text{ if } \hat{y}_j > y_{jU}, \end{cases}$	(4)

Where: \hat{y} is the predicted value of the PL and PG responses; y_{jT} is the specific value for the j-th response of interest; y_{jL} is the lowest value that the desirability function will assume ($y_{jL} < y_{jT}$); and y_{jU} is the highest value that the desirability function will assume ($y_{jT} < y_{jU}$).

The experimental design and statistical data analysis were performed using the statistical software R (R Core Team 2020). Methodology of simultaneous responses surface were used to describe the interaction between the analyzed parameters and provide an estimation of optimal conditions for maximum production of PL and the specific value of PG.

3. Results

The enzymatic activity of fractions containing the pectinase produced by *C. cladosporioides* were quantified and differences in pectinase production were observed when subjected to different time of fermentation, initial pH and temperature conditions

(table 2). Also, PL activity was higher than PG in the enzymatic extract produced by *C. cladosporioides*.

According to the methodology of simultaneous responses surface, the specification limits were determined for each dependent variable (PL and PG). The maximum values and a minimum fixed value used as references are described in the table 3.

The fermentation time (h), temperature (°C) and the interaction between them were significant for PL production and the pH and temperature were significant for PG production ($p < 0.05$) In both enzymes the explanation percentage of the sample variance were greater than 80%, showing that the model is adequate (table 4). According to the regression coefficients listed in the equation (table 5), the empirical relationship between enzyme production and independent variables can be described by equations 5 and 6:

$PL = 15,53 + 18,07A + 1,72B - 11,67C + 2,78AB - 13,23AC - 3,73BC + 17,53AA - 3,69BB - 4,12CC$	(5)
$PG = 1,06 + 0,02A + 0,30B + 0,25C + 0,01AB + 0,03AC + 0,19BC - 0,39AA - 0,19BB - 0,14CC$	(6)

Where A, B and C are the coded values of the fermentation period (h), pH and temperature (°C), respectively.

The pectinases production by *C. cladosporioides* according to the specified standard (table 3) was optimized under the conditions of time, pH and temperature described in the experimental design (table 6). The optimization by simultaneous response was adequate to provide the ideal conditions for greater PL activity ($d = 1$). The “desirable” function was contextualized by the validity of the best combination among the levels of the factors that contemplates all the objectives. This function aims to convert a problem of multiple-response into a single-response by a normalization procedure. Thus, a scale from 0 to 1 was used, where the minimum value assumed by $d_j = 0$ shows that the optimal point studied is undesirable while $d_j = 1$ shows that the optimum point is considered desirable or satisfactory. Therefore, the experiments were validated in these conditions (table 6) and the PL and PG mean production was obtained: 76.6 and 0.17 U g^{-1} , respectively.

The validation results were similar to the predicted yield, thus confirming the validity of Equations 1 and 2. These results indicate that the model is suitable for optimization of the factors levels that simultaneously satisfy the objectives mentioned in table 3. Thus, contours graphs of the adjusted models were generated (figure 1).

The interaction between fermentation time and temperature influenced the PL production. The negative interaction (antagonistic) was observed between them, indicating that there was an increase in the PL activity when the time increased and temperature decreased (figure 1A). The high PL activity, above 60 U g^{-1} , can be obtained in a time greater than 108 hours, pH 4.0 and temperatures close to 30°C . In contrast, the pH and temperature influenced the PG production, thus, activities higher than 0.5 U g^{-1} can be obtained at 96 hours, initial pH 5 to 30°C or at initial pH 4 to 35°C (figure 1B).

The behavior of *C. cladosporioides* on PL production when subjected to high citrus pectin concentrations is unknown. To understand better the ideal conditions for maximum PL production by *C. cladosporioides*, different concentrations of citrus pectin above the optimized value (5) were tested (g L^{-1}): 16, 20 and 24. In the optimized fermentations conditions, differences in the mean values of mycelial growth and PL production when subjected to treatments with different doses of the citrus pectin were observed (table 7). The citrus pectin doses added in the culture medium as inducing agent influenced significantly the growth and PL activity ($p < 0.05$) (table 8).

In figure 2B, the growing line indicated an increase in biomass production (g L^{-1}) with the increase in the citrus pectin levels, reflecting a satisfactory mycelial growth of *C. cladosporioides* under the observed conditions (table 7). The PL activity, in turn, decreased considerably with the addition of citrus pectin concentrations greater than 16 g L^{-1} , but the greatest PL activity was with the dose 5 g L^{-1} (figure 2A).

4. Discussion

4.1. Pectin lyase activity

The growth profile and metabolic activity are processes associated to the production of extracellular enzymes. These processes can be influenced by environmental conditions as well as genetic characteristics of the organism itself. Therefore, the peak production of

desirable metabolites will be different for each microorganism and will depend on their ability to adapt to growing conditions [28].

Acuna-Arguelles et al. [29] showed that the peak PL activity produced by *Aspergillus niger* in submerged fermentation (SmF) was after 96 hours of fermentation with approximately 49 U g⁻¹ of PL. Jacob; Prema [30] showed maximum specific activity of pectinases produced by *Streptomyces lydicus*, 2.39 U mg⁻¹, obtained with 96 hours of fermentation in a submerged system. In this system, the nutrients and the fungal inoculum are submerged in the water, therefore requiring a longer adaptation period in new environment [31, 32, 4].

The peak in PL activity produced by filamentous fungi after long fermentation periods (greater than 96 hours) is reported, but there is no ideal range since it depends more on the genetic characteristics of each individual. Piccoli-Valle et al. [33], obtained the maximum PL activity produced by *Penicillium griseoroseum* after 65 h of fermentation in cultivation submerged of the sugar cane juice. *P. griseoroseum* produced high PL levels after 120 hours of growth in liquid medium [34]. The peak production by *A. oryzae* in submerged fermentation was 96 hours of fermentation, but after 144 hours a production decrease was observed [35]. However, the peak PL activity produced by *A. giganteus* and *Phytophthora capsici* SD33 is obtained after 156 and 168 hours of submerged fermentation, respectively [36, 37].

The PL activity produced by filamentous fungi is temperature dependent and the ideal range of the production peak varies between 22 to 32°C [38, 36, 35, 39, 40]. The metabolic rate of some microorganisms can be affected at temperatures above 35°C [41]. High PL activities produced by *Bacillus subtilis* SAV-21 were obtained at temperatures between 30 to 35°C (3.5 to 4.78 U g⁻¹), but declined at higher temperatures [42]. Siddiqua [43], showed that the PL production by *P. digitatum* is increasing at temperatures between 25 and 35°C, but decreases above this range.

These reports are compatible with the results obtained in this study. *C. cladosporioides* has PL production increased at temperatures close to 30°C. On the other hand, the PL activity produced was very low (8.7 U g⁻¹) or zero for 35°C or higher, respectively. It was observed that pH changes in these conditions could interfere in the enzyme activity. No PL and PG production was noticed in fermentations at 35°C and pH 3.5. However, a pH increase to 4.5 resulted in normal PG production. Therefore, these

differences suggest that *C. cladosporioides* has a low capacity to grow and secrete pectinases under conditions of pH 3.5 at 35°C.

The PL activity produced by filamentous fungi in submerged fermentation reported in other studies is low when compared to the one observed in this paper. *A. niveus*, in submerged fermentation, was able to produce PL activity of 83.3 U mg⁻¹ protein [44]. Bastos [45], reported the maximum PL levels produced by *C. cladosporioides* in less than 40 hours at 28°C (7 U g⁻¹). However, Ramos-Ibarra et al. [46], showed an increase in the pectinase production by *C. oxysporum* N1C1 after 48 hours of cultivation at 30°C, with maximum values at 144 hours (8.0 U g⁻¹) and constant up to 168 hours of fermentation.

PL produced by *F. oxysporum* MTCC 1755 in 168 hours of solid fermentation (7 days) at 25°C had 3.2 U mg⁻¹ of specific activity after purification [47]. *B. borstelensis* (P35) produced 4.04 U mg⁻¹ specific PL activity after solid fermentation for 3 days [48]. *A. flavus* MTCC 7589 in submerged fermentation for 144 hours (6 days) at 25°C produced 18.33 U mg⁻¹ of purified PL [49]. The extract fermented by *C. cladosporioides* obtained in this paper has yields of PL activity higher than the ones reported previously. However, there are species of *Aspergillus* and *Penicillium* capable of producing high PL activity values, which are sources of commercial enzymes [36]. There are no reports about the high PL activity produced by *C. cladosporioides*.

4.2. Polygalacturonase activity

The effect of initial pH and temperature on the PG biosynthesis by filamentous fungi is reported, where activity peak at high temperatures and initial pH slightly acidic is commonly observed [28, 42]. The maximum production of extracellular enzymes by *C. cladosporioides* is obtained at an initial pH 4 to 30°C [15,50]. PG production by *C. cladosporioides* was reported in submerged fermentation at pH 3.5 to 28°C (1 U mg⁻¹) [45] and pH 2.5 in solid fermentation (0.98 U g⁻¹) [51].

Most filamentous fungi grow well at 30°C, however, the optimum temperature of enzymatic synthesis can be different [52, 48]. *A. niger* is a thermo-tolerant fungus that grow up to 55°C, but the maximum production of PG by it in submerged fermentation is often reported at initial pH between 4 to 5.5 to 35°C (54 U g⁻¹) [40, 21]. *P. notatum*

produced 90 U g⁻¹ of PG in submerged fermentation under conditions of pH 3 at 35°C [28].

The results showed in this paper are consistent with those previously reported, where high PG activities are associated with initial acid pH and elevated temperatures. High production of PG by filamentous fungi are in the ideal ranges from 30 to 50 °C [53, 6, 54], but a decrease is observed above these values [21]. Also, the optimum pH between 3.0 to 5.25 was reported, with production of more than 900 U g⁻¹ of PG [55, 28, 42, 21]. However, each fungus will have a specific optimal condition that will result in high activity of enzymes secreted during growth.

The PL and PG production are regulated differently [38]. This study shows that the fermentation conditions for maximum production of PL and PG by *C. cladosporioides* differs. Thus, the high PL activity to the detriment of PG observed in this study may have been influenced by the cultivation factors evaluated, such as initial pH and fermentation temperature.

The PG enzyme acts only on low methoxylated pectin, therefore, it depends on a joint action with pectin methyl esterase (PME), which acts by de-esterification reactions that occur linearly along the pectin molecule. At the end of the reaction the methane and pectin with a low degree of methoxyl are released [8,9]. This reaction is not desirable in processes involving food handling, as methane is toxic. However, PL completely metabolizes the pectin molecule without requiring joint action with other enzymes of the pectinolytic complex [32, 43]. In the fruit juice clarification industry, PL are able to degrade pectin without changing the ester group responsible for the specific aroma in juice without generating toxic methanol during enzymatic catalysis [46].

The PL activity observed in this paper can be maximized to the detriment of PG by optimizing the fermentation conditions. These data are positively interesting given the relevance of this enzyme in food processing. However, the *C. cladosporioides* C196 is suggested in this study as a potential source in the PL production. Also, the data reported can contribute to the formulation of a bioproduct, from the strain *C. cladosporioides* C196, with high enzymatic activity to be studied in industrial processes.

4.3. Effect of pectin concentration on pectin lyase activity

The citrus pectin concentrations optimum for maximum PL production by *C. cladosporioides* are poor elucidated. Studies show that the increase in the citrus pectin concentration affects pectinase activity [56, 57, 58]. Although the formation of extracellular enzymes and fungal growth are associated processes, the accumulation of biomass will not always indicate high enzymatic activities produced [59]. This paper showed an increase in biomass with the addition of doses of the citrus pectin. These conditions were not favourable for the increase in PL activity, reducing considerably when doses above 16 g L⁻¹ were added. Concentrations of 5 g L⁻¹ of citrus pectin are required when high activities of this enzyme are desired.

Similar results have been reported by Maller et al. [44]. A continuous production of biomass by *A. niveus* in high citrus pectin concentrations and a decrease of PL in concentrations above 2 g L⁻¹ was observed. In submerged fermentation of the cocoa, Ouattara et al. [60] observed the cell growth of *Bacillus* sp when adding 0.5 g L⁻¹ of citrus pectin with an absence of PL activity suggesting catabolic repression due to the accumulation of galacturonic acid. Thus, it can be concluded that each microorganism will have an ideal condition of maximum citrus pectin concentration capable of being completely metabolized during growth to generate a product with high enzymatic yields. For *C. cladosporioides*, the concentration that provided the best enzyme yield was 5 g L⁻¹ under the optimized conditions.

5. Conclusion

This paper presents the first report regarding the production of pectin lyase by *C. cladosporioides* in submerged fermentation. *C. cladosporioides* was able to produce high levels of PL activity (76 U g⁻¹) in the fermented extract when submitted to 137.66 hours of fermentation, initial pH 4.15 and at 30.7°C with 5 g L⁻¹ of citrus pectin. This enzyme was considered relevant in this study for applications in the food sector. Therefore, the results suggest the *C. cladosporioides* C196 as a new source of PL that can be studied in the formulation of bioproducts for applications in the food and beverage industry.

Acknowledgments

The authors thank the “*Minas Gerais State Research Support Foundation*” (FAPEMIG), “*Minas Gerais Agricultural Research Corporation*” (EPAMIG) and “*Brazilian Institute of Coffee Science and Technology*” (INCTCAFÉ) for their financial support.

References

- [1] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, P. K. Mehta. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, (2016) 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0485-8.
- [2] S. Rebello, M. Anju, E. M. Aneesh, R. Sindhu, P. Binod, A. Pandey, Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Rev. Environ. Sci.*, (2017), 16(3), 381–394. doi:10.1007/s11157-017-9437-y.
- [3] G. Garg, A. Singh, A. Kaur, R. Singh, J. Kaur, R. Mahajan, Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *Biotech.* (2016) 6: 47. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>.
- [4] M. K. Patidar, S. Nighojkar, A. Kumar, A. Nighojkar, Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. *3 Biotech*, (2018), 8(4). doi:10.1007/s13205-018-1220-4.
- [5] S. Yadav, P. K. Yadav, A. K. Dubey, G. Anand, A. Tanveer, R. Dwivedi, D. Yadav, Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics Insights into Fungal Pectin Lyase: An overview. *Applications of Biotechnology for Sustainable Development*, (2017a), 51–64. doi:10.1007/978-981-10-5538-6_8.
- [6] R. S. Jayani, S. Saxena, R. Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.*, (2005), 40(9), 2931–2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026.
- [7] A. R. Shet, S. V. Desai, S. Achappa, Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. *RJLBPCS.*, (2018), 4(3) p.337. doi: 10.26479/2018.0403.30.
- [8] A. Alana, I. Alkorta, J.B. Dominguez, M.J. Llama, J.L. Serra, Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* (1990), 56 (12), 3755-3759.

- [9] T. Sakay, T. Sakamoto, J. Hallaert, E. J. Vandamme, Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, (1993), 213–294. doi:10.1016/s0065-2164(08)70597-5.
- [10] D.R. Kashyap, S. Chandra, A. Kaul, R. Tewari, Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J. Microb. Biot.*, (2000), 16: 277-282. <https://doi.org/10.1023/A:1008902107929>.
- [11] A. Blandino, K. Dravillas, D. Cantero, S. Pandiella, C. Webb, Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochem.*, (2001), 37(5), 497–503. doi:10.1016/s0032-9592(01)00241-2
- [12] M. AlMatar, E. A. Makky, *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. *3 Biotech*, (2015), 6(1). doi:10.1007/s13205-015-0323-4
- [13] P. R. Mohan, P. V. Kumar, O. V. S. Reddy, Optimization of media and submerged fermentation conditions using central composite design for increased endoglucanase production by *Cladosporium* sp. NCIM 901. *Turk J Biochem.* (2013), 38 (4) ; 385–395.
- [14] N. S. Mohan Kumar, R. Ramasamy, H. K. Manonmani, Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Ind. Crop. Prod.*, (2013), 43, 150–158. doi:10.1016/j.indcrop.2012.07.023.
- [15] C. Uma, D. Gomathi, G. Ravikumar, M. Kalaiselvi, M. Palaniswamy, Production and properties of invertase from a *Cladosporium cladosporioides* in SmF using pomegranate peel waste as substrate. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, (2012), 2(2), S605–S611. doi:10.1016/s2221-1691(12)60282-2.
- [16] V. M. Halaburgi, S. Sharma, M. Sinha, T. P. Singh, T. B. Karegoudar, Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochem.*, (2011), 46(5), 1146–1152. doi:10.1016/j.procbio.2011.02.002.
- [17] K. Dhakar, A. Pandey, Extracellular Laccase from a Newly Isolated Psychrotolerant Strain of *Cladosporium tenuissimum* (NFCCI 2608). *PNAS*, (2015), 86(3), 685–690.
- [18] S.C. Bastos, C.J. Pimenta, D.R. Dias, S.M. Chalfoun, C.L. Angélico, L.S. Tavares, Pectinases from a new strain of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries isolated

from coffee bean. *World J. Agric. Res.*, (2013), v. 9, n. 2, p. 167-172. doi: 10.5829/idosi.wjas.2013.9.2.1713.

[19] L. Huang, A. Hwang, J. Phillips, Effect of Temperature on Microbial Growth Rate-Mathematical Analysis: The Arrhenius and Eyring-Polanyi Connections. *J. Food Sci.* (2011), 76(8), E553–E560. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02377.x.

[20] S. Kumar, H. K. Sharma, B. C. Sarkar, Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Sci. Biotechnol.*, (2011), 20(5), 1289–1298. doi:10.1007/s10068-011-0178-3.

[21] H. Pagarra, R. A. Rahman, N. I. Wan azelee, R. Md illias, Optimization and characterization of exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* cultured via solid state fermentation. *Jurnal Teknologi*, (2018), 81(1). doi:10.11113/jt.v81.12222.

[22] Manachini, P.L, Fortina, M.G, Parini, C. (1987) Purification and properties of an endopolygalacturonase by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnol Lett*; 9:219-24. <https://doi.org/10.1007/BF01024570>.

[23] R.F. Schwan, A.H. Rose, Poligalacturonase production by *Kluveromyces marxianus*: effect of médium composition. *J. Appl. Microbiol.*, (1994), 76: 62-67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04416.x>.

[24] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Biochem.*, (1959), 31, 426- 428.

[25] M. M. Bradford, Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, (1976), v. 72, p. 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

[26] J. C. Rocha, Produção, avaliação da estabilidade e aplicação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando resíduos de frutas tropicais como substrato. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal do Rio Grande do Norte, (2018).

[27] G. Derringer, R. Suich, Simultaneous optimization of several response Variables. *J. Qual. Technol.*, Milwaukee, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

- [28] F. Amin, H. N. Bhatti, M. Bilal, M. Asgher, Multiple Parameter Optimizations for Enhanced Biosynthesis of Exo-polygalacturonase Enzyme and its Application in Fruit Juice Clarification. *Int. J. Food Eng.*, (2017), 13(2). doi:10.1515/ijfe-2016-0256.
- [29] M.E. Acuna-Arguelles, M. Gutiérrez-Rojas, G. Viniegra-González, E. Favela-Torres, Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1995), 43: 808-814.
- [30] N. Jacob, P. Prema, Influence of mode of fermentation on polygalacturonase production by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol.*, (2006), 44, 263-267.
- [31] A. Pandey, Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* (2003), 13, 81.
- [32] U. Holker, M. Hofer, J. Lenz, Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2004), 64 (2), 175–186. doi:10.1007/s00253-003-1504-3.
- [33] R. H. Piccoli-Valle, F. M. L. Passos, F. J. V. Passos, D. O. Silva, Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Braz. J. Microbiol.* (2001), 32(2). doi:10.1590/s1517-83822001000200013.
- [34] J. O. Lima, J. F. Pereira, E. F. Araújo de, M. V. Queiroz de, Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. *Braz. J. Microbiol.*, (2017), 48(3), 602–606. doi:10.1016/j.bjm.2016.12.009.
- [35] S. Koser, Z. Anwar, Z. Iqbal, A. Anjum, T. Aqil, S. Mehmood, M. Irshad, Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *J. Radiat Res. Appl. Sc.*, (2014), 7(3), 327–332. doi:10.1016/j.jrras.2014.05.001.
- [36] B.D. Pedrolli, E.C. Carmona, PL from *Aspergillus giganteus*: comparative study of productivity of submerged fermentation on citrus pectin and orange waste. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* (2009), 45(6): 677-683.
- [37] Y. J. Jia, B. Z. Feng, W. X. Sun, X. G. Zhang, Polygalacturonase, Pectate Lyase and Pectin Methylsterase Activity in Pathogenic Strains of *Phytophthora capsici* Incubated under Different Conditions. *Phytopathology*, (2009), 157(10), 585–591. doi:10.1111/j.1439-0434.2008.01533.x.

- [38] H. A. Nguyen, J. Kaneko, Y. Kamio, Temperature-dependent Production of Carotovoracin Er and Pectin Lyase in Phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *Biosci. Biotech Bioch.*, (2002), 66(2), 444–447. doi:10.1271/bbb.66.444.
- [39] V. Poondla, R. Bandikari, R. Subramanyam, V. S. Reddy Obulam, Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, (2015), 4(1), 70–76. doi:10.1016/j.bcab.2014.09.008.
- [40] I. Ahmed, M. A. Zia, M. A. Hussain, Z. Akram, M. T. Naveed, A. Nowrouzi, Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *J. Radiat. Res. Appl. Sc.*, (2016), 9(2), 148–154. doi:10.1016/j.jrras.2015.11.003.
- [41] L. Y. Wong, W. Z. Saad, R. Mohamad, P. M. Tahir, Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Ind. Crop Prod.*, (2017), 97, 175–183. doi:10.1016/j.indcrop.2016.12.019.
- [42] S. J. Kaur, V. K. Gupta, Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectin lyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. *Ann. Microbiol.*, (2017), 67(4), 333–342. doi:10.1007/s13213-017-1264-4
- [43] A. Siddiqa, S. Noreen, A.M. Khalid, A. Raza, Z. Anwar, M. Irshad, Statistical optimization of Pectin Lyase from *Penicillium digitatum* in Solid State Fermentation. *IJABF.*, (2018), 2: 157-170.
- [44] A. Maller, T. M. da Silva, A. R. L. Damásio, V. R. A. Reis, J. A. Jorge, M. L. T. M. Polizel, Production of Pectin Lyase by *Aspergillus niveus* under Submerged and Solid State Fermentations Using Agro-Industrial Residues as Carbon Sources. *Int.*, (2012), Vol. 3(1) pp. 029-035.
- [45] S. C. Bastos. Pectinases from *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries: culture conditions, partial purification and characterization. Theses (doctorate). Federal University of Lavras, 133 p. (2012).

- [46] J. R. Ramos-Ibarra, C. Miramontes, A. Arias, E. Arriola, G. Guatemala, R. I. Corona-Gonzalez, Production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation with new fungal strains using orange by-products. *Ver. Mex. de Ing. Qui.*, (2017), Vol. 16, No. 1 19-31.
- [47] S. Yadav, S. K. Maurya, G. Anand, R. Dwivedi, D. Yadav, Purification, characterization and retting of *Crotolaria juncea* fibres by an alkaline pectin lyase from *Fusarium oxysporum* MTCC 1755. *3 Biotech*, (2017b), 7(2). doi:10.1007/s13205-017-0750-5.
- [48] H. Demir, C. Tari, Bioconversion of wheat bran for polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in tray type solid-state fermentation. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, (2016), 106: 60-66.
- [49] S. Yadav, P. K. Yadav, D. Yadav, K. D. S. Yadav, Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochem.*, (2008), 43(5), 547–552. doi:10.1016/j.procbio.2008.01.015.
- [50] C. Thulluri, U. Addepally, B. R. Goluguri, Production of holocellulolytic enzymes by *cladosporium cladosporioides* under submerged and solid state conditions using vegetable waste as carbon source. *Chemical and Bioprocess Engineering: Trends and Developments*. (2015), 28: 299-308.
- [51] A.P. Fernandes. Use of processing residues via dry and wet coffee to obtain pectinases. Thesis (doctorate), Federal University of Lavras, 135p., (2014).
- [52] I. Darah, M. Nisha, S. H. Lim, Enhancement of Polygalacturonase Production from *Enterobacter Aerogenes* NBO2 by Submerged Fermentation. *Adv. Stud. Biol.*, (2013), Vol. 5, 2013, no. 5, 173 – 189.
- [53] D.R. Kashyap, P.K. Vohra, S. Chopra, R. Tewari, Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.*, (2001), 77: 215-227.
- [54] S. Mrudula, R. Anitharaj, Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Global J. Biotechnol. Biochem.* (2011). 6 (2): 64-71.
- [55] U. Phutela, V. Dhuna, S. Sandhu; B.S. Chadha, Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Braz. J. Microbiol.*, (2005), 36:63-69.

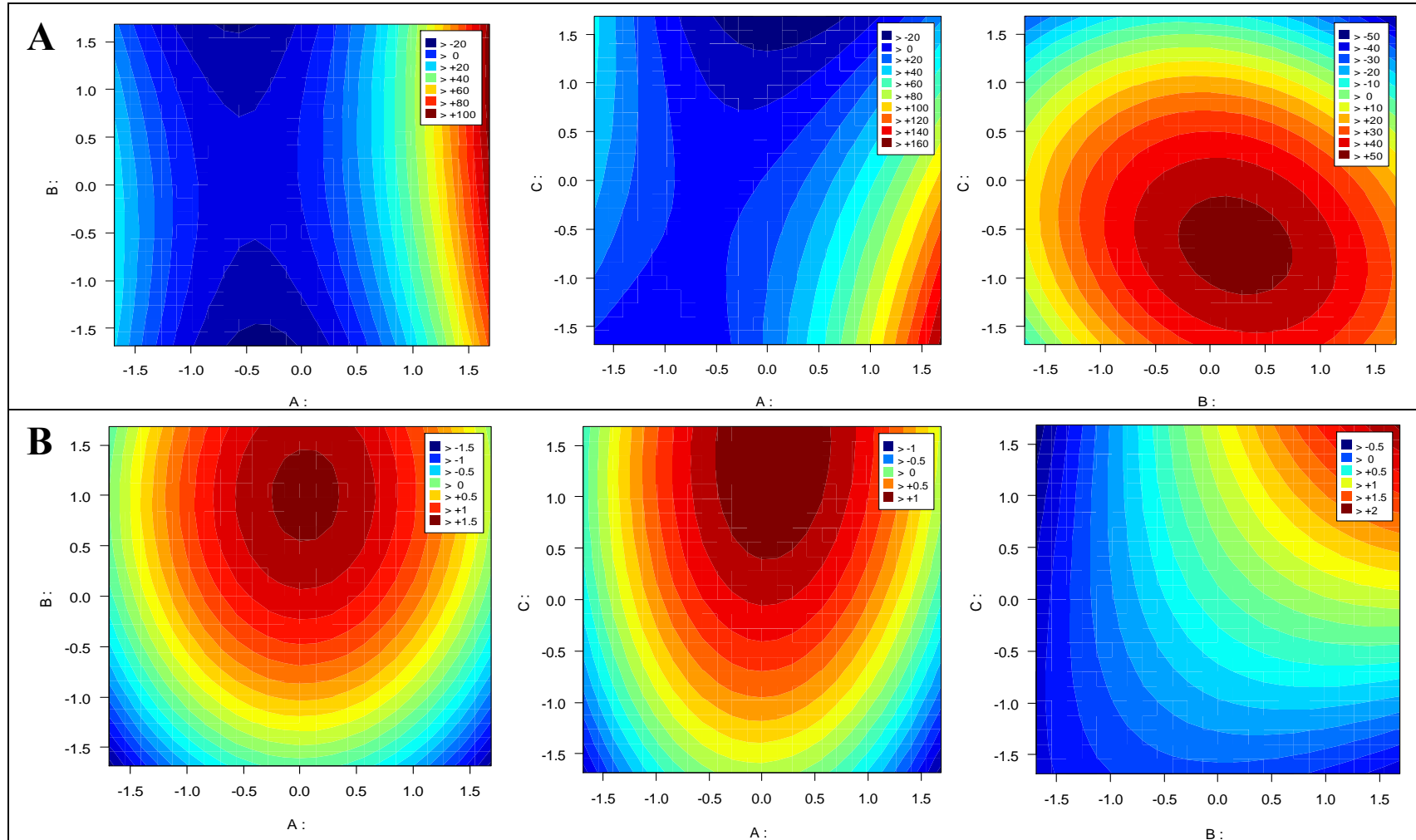
- [56] J. Gomes, J. Zeni, K. Cence, G. Toniazzo, Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Foods Bioprod Process*, (2011), 89(4):281–287.
- [57] Y. A. Ramírez-Tapias, C. W. Rivero, C. N. Britos, J. A. Trelles, Alkaline and thermostable polygalacturonase from *Streptomyces halstedii* ATCC 10897 with applications in waste waters. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, (2015), 4(2), 221–228. doi:10.1016/j.bcab.2014.12.004.
- [58] H. A. El Enshasy, E. A. Elsayed, N. Suhaimi, R. A. Malek, M. Esawy, Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC Biotechnol.*, (2018), 18(1). doi:10.1186/s12896.
- [59] R. C. Fontana, S. Salvador, M. M. da. Silveira, Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, (2005), 32(8), 371– 377.
- [60] H. G. Ouattara, B. L. Koffi, G. T. Karou, A. Sangaré, S. L. Niamke, J. K. Diopoh, Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World J. Microb. Biot.*, (2008), 24(9), 1753–1760. doi:10.1007/s11274-008-9683-9.

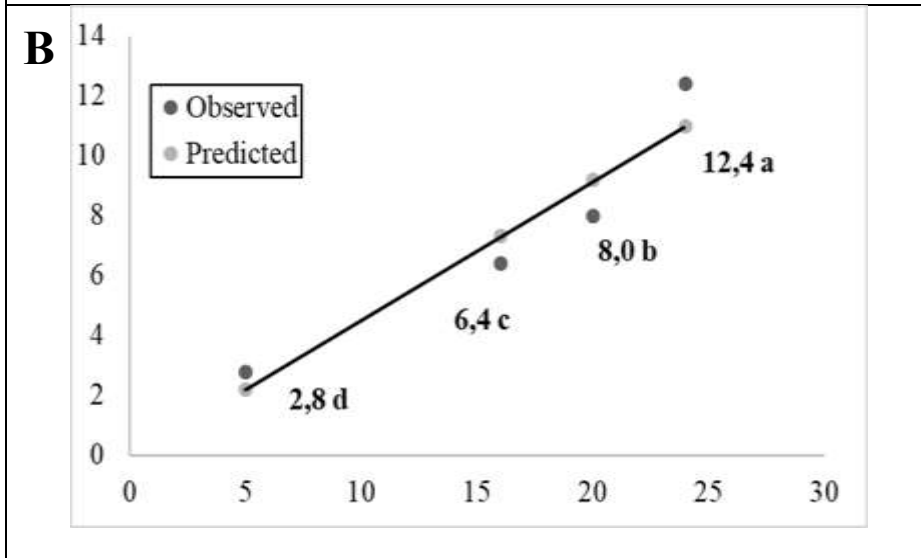
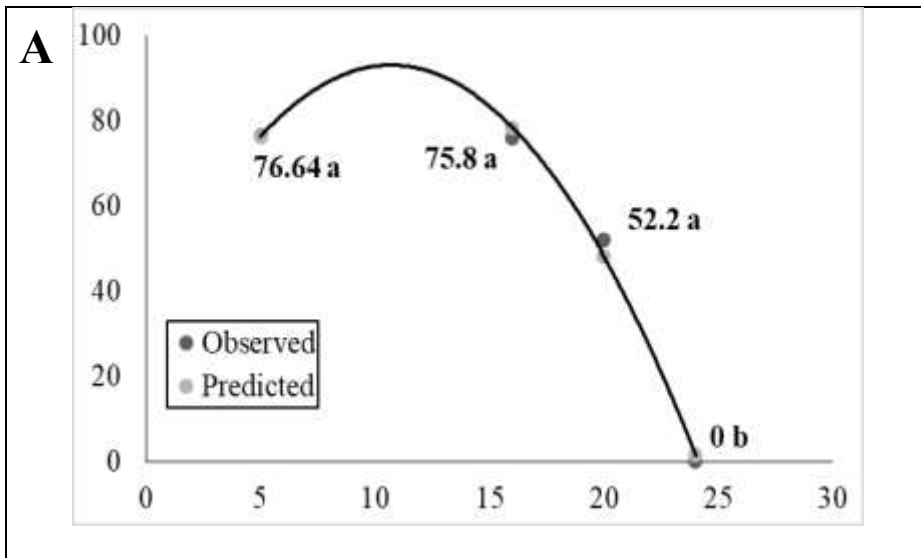
Figures

Figure 1. Three dimensional contour plots of the surfaces for the responses: (A) Time of Fermentation; (B) Initial pH and (C) Temperature and the predicted values for the response **A** - Pectin lyase (PL). **B** - Polygalacturonase (PG).

Figure 2. Regression analysis of the observed and predicted means of the PL activity (**A**) and growth of *C. Cladosporioides* (**B**) by submerged fermentation at optimized conditions and submitted to doses 5, 16, 20 and 24 g L⁻¹ of citrus pectin.

Figures





Tables

Table 1. Experimental range of three variables at five levels in Central-Composite design, where the values of the axial points ($-\alpha / +\alpha$) with orthogonality α (alpha) equal to 1.68.

Table 2. Central Composite design with observed (OB) and predicted (PD) values of Pectin lyase (PL) and Polygalacturonase (PG) production (U g^{-1}) and Biomass (BM) (g L^{-1}).

Table 3. Description of the objectives and specification limits used in the procedure of simultaneous optimization of variables.

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) of the quadratic model for the central composite design of pectin lyase and polygalacturonase production by *Cladosporium cladosporioides*. Legends: SS: sum of squares; DF: Degrees of freedom; MS: Mean square.

Table 5. Coefficients, standard deviation and significance analyzes for the variables screened in the central composite design of pectin lyase e polygalacturonase production by *Cladosporium cladosporioides*.

Table 6. Recommendation of factors levels that maximize PL activity and minimize PG.

Table 7. Observed mean of PL activity (U g^{-1}) and biomass (g L^{-1}) produced in different concentrations of citric pectin (g L^{-1}) in the optimized conditions.

Table 8. Regression analysis of citrus pectin doses added in the culture medium for growth of *C. Cladosporioides* following a quadratic model for PL secretion measured in specific activity (U g^{-1}) and the linear model for biomass (g L^{-1}).

Variables	Coded levels				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X1: Fermentation time (h)	56	72	96	120	136
X2: Initial pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
X3: Temperature (°C)	22	25	30	35	38

Trials	Variables			Pectinase production				BM
	X1	X2	X3	OB of PL	PD of PL	OB of PG	PD of PG	
1	-1	-1	-1	3.12	3.11	0	0.13	1.6
2	+1	-1	-1	53.68	60.4	0.04	0	2.8
3	-1	+1	-1	6.27	8.36	0.22	0.19	2.4
4	+1	+1	-1	79.10	76.46	0.13	0.20	4.0
5	-1	-1	+1	0	13.59	0	0.05	0.2
6	+1	-1	+1	8.76	17.61	0	0.05	0.4
7	-1	+1	+1	0	4.22	0.81	1.01	0.6
8	+1	+1	+1	8.11	19.07	1.02	1.14	2.2
9	-1,68	0	0	41.69	35.14	0	0.003	3.8
10	+1,68	0	0	104.73	95.8	0.09	2.90	5.2
11	0	-1,68	0	14.32	2.3	0	0	4.0
12	0	+1,68	0	11.32	7.90	1.19	1.02	1.8
13	0	0	-1,68	21.97	23.59	0.15	0.23	5.0
14	0	0	+1,68	1.25	0	1.33	1.07	1.2
15	0	0	0	10.68	15.76	1.23	1.06	4.0
16	0	0	0	14.46	15.76	0.69	1.06	3.6
17	0	0	0	19.49	15.76	1.24	1.06	4.0

Dependents variables	Goals	Limits	
		Minimum (y _{1L})	Maximum (y _{1U})
Pectin lyase (PL)	Maximum	50,00	90,0
Polygalacturonase (PG)	Specific	0,10	-

Pectin lyase (PL) (U g ⁻¹)						Polygalacturonase (U g ⁻¹)				
Source	SS	DF	MS	F-value	P-value	SS	DF	MS	F-value	P-value
Model	13065,7	9	1451,74	9,39	0,0037	4,20	9	0,4670	8,05	0,0059
Residual	1082	7	154,58			0,4060	7	0,0580		
Lack of Fit	1036,9	5	207,39	9,20	0,1010	0,2020	5	0,0404	0,3960	0,8254
Pure Error	45,10	2	22,55			0,2040	2	0,1020		
Total	16628,6	16				4,61	16			
R ² = 0,9235; adjusted R ² = 0,8252						R ² = 0,9119; adjusted R ² = 0,7987				

Pectin lyase (PL) (U g ⁻¹)					Polygalacturonase (PG) (U g ⁻¹)			
Factor	Coefficient (β)	DF	F-value	P-value	Coefficient (β)	DF	F-value	P-value
Intercept	15,54	7,16	-	-	1,06	0,1388	-	-
A	18,07	3,36	28,85	0,0010	0,0227	0,0652	0,1208	0,7383
B	1,72	3,36	0,2628	0,6240	0,3040	0,0652	21,76	0,0023
C	-11,68	3,36	12,05	0,0104	0,2496	0,0652	14,67	0,0065
AB	2,79	4,40	0,4026	0,5459	0,0108	0,0851	0,0162	0,9022
AC	-13,23	4,40	9,06	0,0197	0,0316	0,0851	0,1377	0,7216
BC	-3,74	4,40	0,7231	0,4232	0,1883	0,0851	4,89	0,0626
AA	17,54	3,70	22,43	0,0021	-0,3896	0,0717	29,50	0,0010
BB	-3,69	3,70	0,9930	0,3522	-0,1944	0,0717	7,34	0,0302
CC	-4,12	3,70	1,24	0,3026	-0,1442	0,0717	4,04	0,0843

Factors	Coded scale	Original scale
A: (Fermentation time)	1.68	137,66
B: (Initial pH)	0.28	4,15
C: (Temperature)	0.14	30,7
Statistics that validate the optimization of simultaneous responses		
Variable	d (individual)	D (Global)
PL	1.0	
PG	0.887	0.942

Treatments Citrus Pectin (g/L)	PL (U g ⁻¹)	Biomass (g L ⁻¹)
5	76.64772 a	2.8 d
16	75.80543 a	6.4 c
20	52.22152 a	8.0 b
24	0 b	12.4 a

Variables	Source	DF	SS	MS	F-value	P-value
PL	Treatment	3	11624.975767	3874.991922	23.587	0.0002
	Error	8	1314.256933	164.282117		
	Total	11	12939.232700			
CV = 25.05%		R ² = 0.9935	Equation: $y = -0.5164x^2 + 11.038x + 34.057$			
Biomass	Treatment	3	0.365492	0.121831	1044.262	0.0000
	Error	8	0.000933	0.000117		
	Total	11	0.366425			
CV (%) = 2.9 %		R ² = 0.9035	Equation: $y = 0.4632x - 0.1118$			

ANEXOS

Anexo 1 – Matriz do delineamento com os valores reais das variáveis independentes e as respectivas variáveis respostas referente aos três fungos: *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger*. Legenda: BM- biomassa (g/L), Endo-PG- Endo-poligalacturonase (U/g), Exo-PG- Exo-poligalacturonase (U/g), PL- pectina liase (U/g), T- tempo (h), TM- Temperatura (°C).

Experimentos	Variáveis reais			<i>C. cladosporioides</i>			<i>T. viride</i>			<i>A. niger</i>					
	T	pH	TM	PL	Exo-PG	Endo-PG	BM	PL	Exo-PG	Endo-PG	BM	PL	Exo-PG	Endo-PG	BM
1	72	3,5	25	3,12	0	0,41	1,6	2,51	0	0,24	3,8	11,93	0	0,27	2,0
2	120	3,5	25	53,68	0,037	0,43	2,8	10,68	0,08	0,41	2,4	54,03	0,038	0,47	3,2
3	72	4,5	25	6,27	0,22	0,40	2,4	2,5	0,22	0,22	5,0	26,83	0,11	0,25	3,0
4	120	4,5	25	79,10	0,13	0,45	4	10,66	0,6	0,41	4,0	49,68	0,14	0,49	5,0
5	72	3,5	35	0	0	0	0,2	0,63	0,28	0,25	1,0	0,62	0,06	0,24	4,2
6	120	3,5	35	8,76	0	0	0,4	6,28	0	0,40	5,0	10,67	0	0,46	4,2
7	72	4,5	35	0	0,81	0,12	0,6	0	0,83	0,21	1,0	5,65	0,40	0,17	4,6
8	120	4,5	35	8,11	1,02	0,37	2,2	1,88	0,51	0,44	1,6	8,15	0,11	0,41	4,2
9	56	4,0	30	41,69	0,13	0,64	3,8	0,88	0,13	0,42	3,2	31,68	0,13	0,28	3,6
10	136	4,0	30	104,7	0,088	0,39	5,2	11,3	0,10	0,65	3,6	54,86	0,085	0,39	4,6
11	96	3,0	30	14,32	0	0	4,0	0	0,004	0,15	3,0	18,15	0	0,18	4,4
12	96	5,0	30	11,32	1,19	0,42	1,8	2,5	0,60	0,46	2,4	36,06	0,14	0,42	4,0
13	96	4,0	22	21,97	0,15	0,37	5,0	1,25	0,66	0,27	4,0	40,24	0,17	0,30	6,0
14	96	4,0	38	1,25	1,33	0	1,2	0	0,66	0	2,8	4,89	0,13	0,038	4,0
15	96	4,0	30	10,68	1,23	0,39	4,0	3,14	0,15	0,40	4,4	41,54	0,14	0,30	6,0
16	96	4,0	30	14,46	0,69	0,44	3,6	1,25	0,16	0,40	3,4	40,86	0,14	0,30	5,0
17	96	4,0	30	19,49	1,24	0,48	4,0	3,77	0,16	0,43	5,0	49,05	0,14	0,29	5,4

Anexo 2 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático para o delineamento composto central da produção de PL por *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*.

<i>Cladosporium cladosporioides</i>						<i>Trichoderma viride</i>					<i>Aspergillus niger</i>				
Fonte	SQ	DP	QM	F-valor	P-valor	SQ	DP	QM	F-valor	P-valor	SQ	DP	QM	F-valor	P-valor
Modelo	13065,70	9	1451,74	9,39	0,0037	206,97	9	23,00	5,00	0,0227	5258,52	9	584,28	8,89	0,0044
Residual	1082,06	7	154,58			32,21	7	4,60			459,93	7	65,70		
Falta de ajuste	1036,96	5	207,39	9,20	0,1010	28,79	5	5,76	3,37	0,2447	418,65	5	83,73	4,06	0,2095
Erro puro	45,10	2	22,55			3,42	2	1,71			41,29	2	20,64		
Total	16628,65	16				239,19	16				5718,45	16			
	R² = 0,9235; R² ajustado = 0,8252					R² = 0,8653; R² ajustado = 0,6922					R² = 0,9196; R² ajustado = 0,8162				

Anexo 3 – Coeficientes estimados (CE), desvio padrão (DP) e análises de significância para as variáveis rastreadas no delineamento composto central da produção de PL por *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*.

<i>Cladosporium cladosporioides</i>					<i>Trichoderma viride</i>				<i>Aspergillus niger</i>			
Fonte	CE	DP	F-valor	P-valor	CE	DP	F-valor	P-valor	CE	DP	F-valor	P-valor
Intercept	15,54	7,16	-	-	2,61	1,24	-	-	44,42	4,67	-	-
X1	18,07	3,36	28,85	0,0010	3,03	0,5805	27,25	0,0012	8,53	2,19	15,12	0,0060
X2	1,72	3,36	0,2628	0,6240	-0,0608	0,5805	0,0110	0,9195	3,16	2,19	2,08	0,1927
X3	-11,68	3,36	12,05	0,0104	-1,44	0,5805	6,17	0,0420	-12,95	2,19	34,84	0,0006
X1X2	2,79	4,40	0,4026	0,5459	-0,4730	0,7584	0,3889	0,5527	-3,35	2,87	1,37	0,2807
X1X3	-13,23	4,40	9,06	0,0197	-1,10	0,7584	2,10	0,1905	-6,55	2,87	5,22	0,0562
X2X3	-3,74	4,40	0,7231	0,4232	-0,6252	0,7584	0,6795	0,4369	-1,01	2,87	0,1237	0,7354
X1²	17,54	3,70	22,43	0,0021	1,58	0,6389	6,09	0,0430	-2,25	2,41	0,8665	0,3829
X2²	-3,69	3,70	0,9930	0,3522	-0,1321	0,6389	0,0428	0,8420	-7,96	2,41	10,88	0,0132
X3²	-4,12	3,70	1,24	0,3026	-0,3543	0,6389	0,3075	0,5965	-9,57	2,41	15,71	0,0054

Anexo 4 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático para o delineamento composto central da produção de Exo-PG por *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*.

Fonte	<i>Cladosporium cladosporioides</i>					<i>Trichoderma viride</i>					<i>Aspergillus niger</i>				
	SQ	DP	QM	F-valor	P-valor	SQ	DP	QM	F-valor	P-valor	SQ	DP	QM	F-valor	P-valor
Modelo	4,20	9	0,4670	8,05	0,0059	1,17	9	0,1295	15,47	0,0008	0,1175	9	0,0131	4,61	0,0281
Residual	0,4060	7	0,0580			0,0586	7	0,0084			0,0198	7	0,0028		
Falta de ajuste	0,2020	5	0,0404	0,3960	0,8254	0,0585	5	0,0117	282,10	0,0035	0,0198	5	0,0040	493,1	0,0020
Erro puro	0,2040	2	0,1020			0,0001	2	0,0000			0,0000	2	8.03E-03		
Total	4,61	16				1,22	16				0,1373	16			
	R² = 0,9119; R² ajustado = 0,7987					R² = 0,9521; R² ajustado = 0,8906					R² = 0,8557; R² ajustado = 0,6701				

Anexo 5 – Coeficientes estimados (CE), desvio padrão (DP) e análises de significância para as variáveis rastreadas no delineamento composto central da produção de Exo-PG por *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*.

Fonte	<i>Cladosporium cladosporioides</i>				<i>Trichoderma viride</i>				<i>Aspergillus niger</i>			
	CE	DP	F-valor	P-valor	CE	DP	F-valor	P-valor	CE	DP	F-valor	P-valor
Intercept	1,06	0,1388	-	-	0,1640	0,0527	-	-	0,1449	0,0307	-	-
X1	0,0227	0,0652	0,1208	0,7383	-0,0127	0,0248	0,2643	0,6230	-0,0259	0,0144	3,25	0,1146
X2	0,3040	0,0652	21,76	0,0023	0,2052	0,0248	68,70	<0,0001	0,0666	0,0144	21,38	0,0024
X3	0,2496	0,0652	14,67	0,0065	0,0532	0,0248	4,62	0,0687	0,0155	0,0144	1,16	0,3165
X1X2	0,0108	0,0851	0,0162	0,9022	0,0330	0,0323	1,04	0,3422	-0,0294	0,0188	2,45	0,1616
X1X3	0,0316	0,0851	0,1377	0,7216	-0,1333	0,0323	16,98	0,0045	-0,0522	0,0188	7,70	0,0275
X2X3	0,1883	0,0851	4,89	0,0626	0,0409	0,0323	1,60	0,2467	0,0286	0,0188	2,31	0,1725
X1²	-0,3896	0,0717	29,50	0,0010	-0,0291	0,0272	1,14	0,3206	-0,0127	0,0158	0,6417	0,4494
X2²	-0,1944	0,0717	7,34	0,0302	0,0380	0,0272	1,94	0,2059	-0,0259	0,0158	2,67	0,1462
X3²	-0,1442	0,0717	4,04	0,0843	0,1657	0,0272	36,99	0,0005	0,0014	0,0158	0,0078	0,9320

Anexo 6 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático para o delineamento composto central da produção de Endo-PG por *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*.

<i>Cladosporium cladosporioides</i>						<i>Trichoderma viride</i>					<i>Aspergillus niger</i>				
Fonte	SQ	D P	QM	F- valor	P- valor	SQ	DP	QM	F- valor	P-valor	SQ	DP	QM	F- valor	P-valor
Modelo	0,5876	9	0,0653	6,21	0,0125	0,3085	9	0,0343	4,23	0,0351	0,1189	3	0,0396	4,64	0,0204
Residual	0,0736	7	0,0105			0,0567	7	0,0081			0,1111	13	0,0085		
Falta de ajuste	0,0699	5	0,0140	7,68	0,1193	0,0562	5	0,0112	51,58	0,0191	0,1110	11	0,0101	259,1 5	0,0038
Erro puro	0,0036	2	0,0018			0,0004	2	0,0002			0,0001	2	0,0000		
Total	0,6611	16				0,3651	16				0,2300	16			
	R² = 0,8887; R² ajustado = 0,7457					R² = 0,8448; R² ajustado = 0,6452					R² = 0,5170; R² ajustado = 0,4055				

Anexo 7 – Coeficientes estimados (CE), desvio padrão (DP) e análises de significância para as variáveis rastreadas no delineamento composto central da produção de Endo-PG por *C. cladosporioides*, *T. viride* e *A. niger*.

<i>Cladosporium cladosporioides</i>					<i>Trichoderma viride</i>				<i>Aspergillus niger</i>			
Fonte	CE	DP	F-valor	P-valor	CE	DP	F-valor	P-valor	CE	DP	F-valor	P-valor
Intercept	0,4386	0,0591	-	-	0,4097	0,0519	-	-	0,3115	0,0224	-	-
X1	-0,0067	0,0277	0,0591	0,8149	0,0834	0,0243	11,73	0,0111	-0,0259	0,0250	9,61	0,0085
X2	0,0883	0,0277	10,14	0,0154	0,0377	0,0243	2,40	0,1652	0,0666	0,0250	0,6637	0,4299
X3	-0,1341	0,0277	23,37	0,0019	-0,0342	0,0243	1,98	0,2025	0,0155	0,0250	3,64	0,0786
X1X2	0,0345	0,0362	0,9046	0,3732	0,0140	0,0318	0,1935	0,6733				
X1X3	0,0214	0,0362	0,3490	0,5732	0,0020	0,0318	0,0040	0,9514				
X2X3	0,0602	0,0362	2,75	0,1409	0,0022	0,0318	0,0047	0,9474				
X1²	0,0227	0,0305	0,5509	0,4821	0,0453	0,0268	2,85	0,1350				
X2²	-0,0845	0,0305	7,65	0,0279	-0,0351	0,0268	1,72	0,2314				
X3²	-0,0945	0,0305	9,58	0,0175	-0,0953	0,0268	12,66	0,0093				

Anexo 8 – Análise de regressão das doses de pectina cítrica adicionadas no meio de cultivo para crescimento de *C. Cladosporioides* medido em biomassa (g). Legenda: SmF 1: fermentação submersa a 120h, em pH 4.2 e a 28°C. SmF 2: fermentação submersa a 120h, em pH 4.5 e a 25°C.

	Fonte	DP	SQ	QM	F-valor	P-valor
SmF 1	Doses	3	0.184300	0.061433	6.467	0.0156
	Erro	8	0.076000	0.009500		
	Total	11	0.260300			
		CV= 22,93%	R² = 0.9483	y = 0.3375x + 2.9659		
SmF 2	Doses	3	0.365492	0.121831	1044.262	0.0000
	Erro	8	0.000933	0.000117		
	Total	11	0.366425			
		CV = 2,9 %	R² = 0.9086	y = 0.4632x - 0.1118		

Anexo 9 – Análise de regressão das doses de pectina cítrica adicionadas no meio de cultivo para produção da enzima pectina liase (U/g). Legenda: SmF 1: fermentação submersa a 120h, em pH 4.2 e a 28°C. SmF 2: fermentação submersa a 120h, em pH 4.5 e a 25°C.

	Fonte	DP	SQ	QM	F-valor	P-valor
SmF 1	Doses	3	3369.170425	1123.056808	14.816	0.0012
	Erro	8	606.416467	75.802058		
	Total	11	3975.586892			
		CV= 12,7%	R² = 0.9933	y = 0.2913x² - 6.376x + 80.635		
SmF 2	Doses	3	11624.975767	3874.991922	23.587	0.0002
	Erro	8	1314.256933	164.282117		
	Total	11	12939.232700			
		CV = 25,05%	R² = 0.9935	y = -0.5164x² + 11.038x + 34.057		

Anexo 10 – Análise de regressão das doses de pectina cítrica adicionadas no meio de cultivo para produção da enzima Exo-poligalacturonase. Legenda: SmF 1: fermentação submersa a 120h, em pH 4.2 e a 28°C. SmF 2: fermentação submersa a 120h, em pH 4.5.

	Fonte	DP	SQ	QM	F-valor	P-valor
SmF 1	Doses	3	15.400625	5.133542	9333.712	0.0000
	Erro	8	0.004400	0.000550		
	Total	11	15.405025			
	CV = 0.85 %			R² = 0.9971	y = -0.0133x² + 0.5155x - 1.4245	
SmF 2	Doses	3	0.052920	0.017640	52920.250	0.0000
	Erro	8	0.000003	3.33333333E-0007		
	Total	11	0.052923			
	CV = 0.78 %			R² = 0.9313	y = 0.0013x² - 0.0427x + 0.3526	

Anexo 11 – Análise de regressão das doses de pectina cítrica adicionadas no meio de cultivo para produção da enzima Endo-poligalacturonase. Legenda: SmF 1: fermentação submersa a 120h, em pH 4.2 e a 28°C. SmF 2: fermentação submersa a 120h, em pH 4.5 e a 25°C

	Fonte	DP	SQ	QM	F-valor	P-valor
SmF 1	Doses	3	0.020092	0.006697	5.581	0.0231
	Erro	8	0.009600	0.001200		
	Total	11	0.029692			
	CV = 7.6 %			R² = 0.9394	y = 0.0009x² - 0.028x + 0.6297	
SmF 2	Doses	3	0.311367	0.103789	13.808	0.0016
	Erro	8	0.060133	0.007517		
	Total	11	0.371500			
	CV = 20.4 %			R² = 0.8692	y = -0.0038x² + 0.1008x - 0.0119	