



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Biotecnologia
Bacharelado em Biotecnologia

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E
CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A
PARTIR DO BAGAÇO DE CAJÁ**

João Pessoa/PB

2016

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E
CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A
PARTIR DO BAGAÇO DE CAJÁ**

Trabalho de conclusão de curso
como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia na Universidade
Federal da Paraíba.

Orientadora:

Profª Drª Andréa Farias de Almeida

João Pessoa/PB

2016

A553e Andrade, Adrielly Silva Albuquerque de.
Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e
celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do
bagaço de cajá / Adrielly Silva Albuquerque de Andrade.- João
Pessoa, 2016.
48f. : il.
Orientadora: Andréa Farias de Almeida
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) -
UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Fermentação - estado sólido.
3. *Bacillus* sp. 4. Pectinases. 5. Celulases. 6. Proteases.
7. Resíduo de cajá.

UFPB/BC

CDU: 60(043.2)

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS E
CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A
PARTIR DO BAGAÇO DE CAJÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: ___ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª Dr^ª Andréa Farias de Almeida
(Orientadora)

Prof^ª Dr^ª Adna Cristina Barbosa de Sousa
(Examinadora)

Prof^ª Dr^ª Sharline Florentino de Melo Santos
(Examinadora)

Dedico este trabalho à minha família por todo amor, carinho e apoio de sempre.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho e demonstrado o quão gigante é o seu amor por mim.

Também agradeço aos meus pais, Amilton e Joseane, que sempre estiveram ao meu lado e me educaram com muita sabedoria.

Aos meus irmãos, Auryéllen e Arthur, que tanto amo.

Aos meus queridos amigos, por todos os momentos que compartilhamos.

Aos meus professores do Centro de Biotecnologia, que foram de fundamental importância para minha formação profissional.

Pela realização deste trabalho, agradeço imensamente:

À minha orientadora, professora Andréa pela oportunidade e por todo carinho em que dedicou seu tempo a me orientar e me apoiar em quase todos os períodos da minha graduação.

À professora Sharline, por ter aberto as portas do Laboratório de Bioengenharia para realização de algumas atividades e por todo apoio que me ofereceu.

Ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular por ter cedido a cepa utilizada neste trabalho.

Ao professor Ian Amaral, por ter dado suporte para realização de algumas análises.

Aos meus amigos do LEBp, em especial a Napoleão, por toda ajuda na realização dos experimentos.

À minha banca avaliadora, Adna e Sharline, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

“Meu refúgio, minha fortaleza, meu Deus, eu confio em Ti!”
Salmo 91

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. (A) Frutos da cajazeira (cajá); (B) Apresenta os detalhes do fruto: formato ovoide, cor variando do amarelo ao alaranjado, succulenta, apresentando uma única semente, grande, branca súbero-lignificada e enrugada..... | 20 |
| Figura 2. Estrutura molecular da pectina..... | 21 |
| Figura 3. Estrutura molecular da celulose..... | 23 |
| Figura 4. Estrutura da parede celular vegetal representando o arranjo das moléculas de pectina e celulose..... | 24 |
| Figura 5. Bagaço do cajá (cascas e fibras)..... | 26 |
| Figura 6. Fermentação em estado sólido do bagaço do cajá como substrato pelo <i>Bacillus</i> sp. | 35 |
| Figura 7. Valores de pH no decorrer de 120 horas do cultivo..... | 35 |
| Figura 8. Quantidade das proteínas totais (mg/mL) no decorrer do processo fermentativo até 120 horas..... | 36 |
| Figura 9. Estabilidade da atividade pectinolítica sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado durante 30 minutos sob as temperaturas de 35°, 45° e 55°C..... | 37 |
| Figura 10. Estabilidade da atividade da exoglucanase sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C..... | 38 |
| Figura 11. Estabilidade da atividade da endoglucanase sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C..... | 39 |
| Figura 12. Estabilidade da atividade proteolítica sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C..... | 40 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação taxonômica do <i>Bacillus</i> sp. | 18 |
| Tabela 2. Classificação taxonômica da <i>Spondias mombin</i> L. | 19 |
| Tabela 3. Composição físico-química da polpa do cajá. | 20 |
| Tabela 4. Composição do meio Luria-Bertani. | 29 |
| Tabela 5. Composição do meio do pré-inóculo. | 29 |
| Tabela 6. Composição do meio nutriente utilizado no cultivo. | 30 |
| Tabela 7. Caracterização do bagaço do cajá. | 34 |
| Tabela 8. Quantificação específica das enzimas produzidas durante o processo. | 40 |

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|---|--|
| ART | Açúcares redutores totais |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | Cloreto de cálcio dihidratado |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CMCase | Atividade da endoglucanase |
| <i>CSH protocols</i> | <i>Cold Spring Harbor Protocols</i> |
| D.O. | Densidade óptica |
| DNS | Ácido dinitro-salicílico |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| FES | Fermentação em estado sólido |
| FPase | Atividade de celulase |
| FSS | Fermentação em estado semi-sólido |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de ferro II heptahidratado |
| g | Gramas |
| GalA | Ácido Galacturônico |
| HCl | Ácido clorídrico |
| ITIS | <i>Integrated Taxonomic Information System</i> |
| KH_2PO_4 | Fosfato de potássio monobásico |
| K_2HPO_4 | Fosfato de potássio dibásico |
| M | Molar |

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| mg | Miligrama |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | Sulfato de magnésio heptahidratado |
| mL | Militro |
| MnSO ₄ .H ₂ O | Sulfato de manganês hidratado |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| nm | Nanômetro |
| PB | Paraíba |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| U | Unidade enzimática |
| rpm | Rotação por minuto |
| °C | Grau Celsius |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µmol | Micromol |

Glossário

Bagaço – resíduo de frutos, ervas ou de qualquer outra substância depois de extrair o suco.

Biomassa – quantidade de matéria viva, presente em determinado *habitat*, comumente expressa como peso de organismos por unidade de área do *habitat*, ou como volume ou peso de organismos por unidade de volume do *habitat*.

Bioproduto – qualquer produto derivado ou gerado a partir da biomassa.

Celulase – enzima que hidrolisa a celulose, transformando-a em celobiose.

Fermentação – reação espontânea de um corpo orgânico pela presença de um fermento que o decompõe.

Flavour – combinação de sabor e odor.

Habitat – lugar ou meio em que cresce ou vive normalmente qualquer ser vivo; ambiente natural.

Hidrólise – reação química de quebra de uma molécula mediada pela água.

In natura – produto no seu estado natural.

Pectinase – enzima que catalisa a degradação de substâncias pécticas.

Protease – enzima capaz de clivar peptídeos e por conduzir modificações seletivas e específicas em proteínas.

Resíduo – produtos remanescentes ou que restam ao fim de um processo.

Termoestabilidade – qualidade de estabilidade a variações de temperatura.

Sumário

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 15 |
| 2 | Fundamentação Teórica | 17 |
| 2.1 | Fermentação em estado sólido (FES) | 17 |
| 2.1.1 | Vantagens da FES | 17 |
| 2.1.2 | Limitações da FES | 17 |
| 2.2 | Micro-organismo utilizado na FES | 18 |
| 2.2.1 | <i>Bacillus</i> sp. | 18 |
| 2.3 | Substrato | 18 |
| 2.3.1 | Cajá | 19 |
| 2.4 | Pectina | 21 |
| 2.5 | Pectinases e suas aplicações | 21 |
| 2.6 | Celulose | 22 |
| 2.7 | Celulasas e suas aplicações | 23 |
| 2.8 | Enriquecimento protéico | 24 |
| 2.9 | Enzimas proteolíticas e suas aplicações | 25 |
| 3 | Metodologia | 26 |
| 3.1 | Preparo do resíduo | 26 |
| 3.1.1 | Caracterização dos resíduos | 26 |
| 3.1.1.1 | Teor de sólidos solúveis (°brix) | 27 |
| 3.1.1.2 | Densidade aparente | 27 |
| 3.1.1.3 | pH | 27 |
| 3.1.1.4 | Teor percentual de umidade | 27 |
| 3.1.1.5 | Teor percentual de cinzas | 27 |
| 3.1.1.6 | Teor de açúcares redutores totais (ART) | 28 |
| 3.2 | Micro-organismo | 29 |
| 3.3 | Inóculo | 29 |
| 3.4 | Meio e condições de produção enzimática | 30 |
| 3.5 | Obtenção do extrato enzimático | 30 |
| 3.5.1 | Resíduo da fermentação | 30 |
| 3.5.2 | Análises do extrato enzimático bruto | 31 |
| 3.5.2.1 | pH | 31 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.5.2.2 | Proteínas totais..... | 31 |
| 3.5.2.3 | Ensaio quantitativo da atividade pectinolítica..... | 31 |
| 3.5.2.4 | Determinação da atividade da exoglucanase (FPase)..... | 32 |
| 3.5.2.5 | Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase)..... | 32 |
| 3.5.2.6 | Atividade proteolítica..... | 33 |
| 4 | <i>Resultados e Discussão</i> | 34 |
| 4.1 | Caracterização do resíduo de cajá | 34 |
| 4.2 | Fermentação em estado sólido | 35 |
| 4.3 | pH | 35 |
| 4.4 | Proteínas totais | 36 |
| 4.5 | Atividade pectinolítica | 36 |
| 4.6 | Atividade da exoglucanase (FPase) | 37 |
| 4.7 | Atividade da endoglucanase (CMCase) | 38 |
| 4.8 | Atividade proteolítica | 39 |
| 4.9 | Quantificação específica das enzimas | 40 |
| 5 | <i>Conclusão</i> | 42 |
| 6 | <i>Referências</i> | 43 |

Resumo

As indústrias alimentícias brasileiras, envolvidas no processamento de frutas, produzem grande variedade de resíduos sólidos que podem ser utilizados no processo de fermentação em estado sólido para produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas. Essas enzimas são produzidas naturalmente por diversos organismos, como bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas. São amplamente empregadas na indústria alimentícia, têxtil, indústria de papel e celulose, de detergentes, entre outras. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção enzimática através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cajá *in natura* a partir do *Bacillus* sp., para demonstrar a potencialidade nos processos biotecnológicos deste resíduo gerado do processamento do fruto da cajazeira. Para isto foi realizada a caracterização físico-química do bagaço de cajá, utilizado como fonte de carbono, estabelecer o método de extração do conteúdo enzimático, verificar a produção e a termoestabilidade das enzimas pectinolíticas, celulolíticas (endoglucanases e exoglucanases) e proteolíticas produzidas no processo fermentativo ao longo do cultivo de 240 horas, na temperatura de 30°C. Nesta condição, a melhor atividade pectinolítica foi observada às 72 horas, quando o extrato enzimático bruto foi incubado a temperatura de 35°C; já as melhores atividades celulolíticas foram observadas às 48 e 120 horas e nas temperaturas de incubação a 40° e 30°C para as exoglucanases e endoglucanases, respectivamente. Também foi verificada a melhor atividade proteolítica, na qual foi observado um comportamento equivalente da atividade quando incubada nas diferentes temperaturas. Os resultados comprovaram que o *Bacillus* sp. é capaz de utilizar o bagaço de cajá como fonte de carbono e produzir as enzimas com atividade enzimática ótima a 30°C para as pectinases e endoglucanases e 40°C para as exoglucanases e proteases.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. *Bacillus* sp. Pectinases. Celulases. Proteases. Resíduo de cajá.

Abstract

Brazilian food industries involved in processing fruit, produce wide range of solid residue which may be used in the process of solid state fermentation for the production of cellulolytic and pectinolytic enzymes. These enzymes are naturally produced by many organisms such as bacteria, fungi, yeast, insects, nematodes, protozoa and plants. Are widely used in the food industry, textile, cellulose and paper industry, detergents, among others. Thus, the objective of this study was to evaluate the enzyme production capacity by solid state fermentation using as substrate caja bagasse (*Spondias mombin* L.) *in natura* from *Bacillus* sp. To demonstrate the potential in biotechnological processes of this solid residue generated fruit processing the mombin. The methodology sought to accomplish the physicochemical characterization of caja bagasse used in the fermentation process, establish the method of extraction of the enzyme content, analyses the production and thermostability of pectinolytic enzymes, cellulases (endoglucanases and exoglucanases) and proteolytic produced in the fermentation process to over 240 hours cultivation, temperature of 30°C. In this condition, the best pectinolytic activity was observed at 72 hours when the crude enzyme extract was incubated at 35°C; We have the best cellulolytic activities were observed at 48 and 120 hours and the incubation temperature at 40° to 30°C for exoglucanases and endoglucanases, respectively. It was also verified the best proteolytic activity, which was observed a similar behavior of activity when incubated at different temperatures. The results showed that the *Bacillus* sp. you are able to use the caja residue as carbon source and produce the enzymes with optimal enzymatic activity at 30°C for pectinases and endoglucanases and 40°C for exoglucanases and proteases.

Key words: Solid state fermentation. *Bacillus* sp. Pectinases. Cellulases. Proteases. Caja bagasse.

1 Introdução

A introdução mostra de forma geral os conceitos sobre os temas que serão abordados no decorrer deste trabalho, o porquê da utilização de resíduos industriais alimentícios e os objetivos.

As indústrias alimentícias brasileiras envolvidas no processamento de frutas comestíveis para fabricação de produtos como: sucos naturais e concentrados, polpas, extratos, frutos e doces em conserva, geleias, néctares e sorvetes, produzem uma gama de resíduos sólidos - cascas, fibras, sementes, entre outros - que podem ser utilizados como fonte de matéria-prima para produção, por via microbiana, de bioprodutos com alto valor agregado e, conseqüentemente, diminuir a eliminação de resíduos industriais no meio ambiente.

Os processos biotecnológicos, especialmente a fermentação em estado sólido (FES), buscam utilizar esses resíduos como fonte de carbono para produção de enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aromas (UENOJO & PASTORE, 2007; SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

A fermentação em estado sólido ou em estado semissólido caracteriza-se por ser um processo fermentativo realizado em uma matriz sólida, configurada pela ausência ou pela baixa quantidade de água livre. Entretanto, o substrato utilizado deve ter quantidade de água suficiente, através a umidade da matriz, necessária ao desenvolvimento microbiano (PANDEY, 2003 *apud* SINGHANIA et al., 2009).

Os substratos para a FES, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria (PANDEY, 2003), são recursos naturais renováveis e produzidos em grande escala que os tornam um problema ambiental. Além disso, a estrutura desses materiais tem a presença de celulose, hemicelulose, amido, pectina e proteínas que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PINTO et al., 2005). Portanto, a FES se apresenta como uma tecnologia capaz de propor estratégias alternativas ao aproveitamento de resíduos gerados em processos agroindustriais para obtenção de produtos de maior valor agregado, diminuindo os possíveis problemas oriundos da deposição desses resíduos no ambiente.

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) é uma árvore bastante encontrada na região Nordeste. Seu fruto, o cajá, bastante apreciado na região, possui aproveitamento industrial de

aproximadamente 50% do total, porém esse rendimento pode variar conforme as condições ambientais e genotípicas, estado de maturação, tamanho do fruto, entre outros fatores (BORA et al., 1991 *apud* MATTIETTO et al., 2010). Uma das alternativas para o aproveitamento dos outros 50%, considerado como resíduo de processamento, é sua utilização em processos fermentativos para produção enzimática, entre elas estão as amilases, proteases, xilanases, celulases e pectinases (MONTEIRO & SILVA, 2009).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo de enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécicas. No mercado mundial, as pectinases correspondem a 10% da produção enzimática total e são produzidas por muitos organismos como bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas (MUKESH KUMAR, 2012). Já as enzimas celulolíticas ou celulases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise da celulose. No mercado mundial, as celulases correspondem a 8% da produção enzimática global, são produzidas por vários micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016; SHARMA, 2016).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção enzimática através da fermentação em estado sólido utilizando como substrato o bagaço de cajá *in natura* a partir do *Bacillus* sp., para demonstrar a potencialidade nos processos biotecnológicos deste resíduo gerado do processamento do fruto da cajazeira. Buscou-se realizar a caracterização físico-química do bagaço do cajá, estudar a produção e a termoestabilidade das enzimas pectinolíticas, celulolíticas e proteolíticas produzidas durante o processo.

2 Fundamentação Teórica

O presente tópico apresenta os aspectos teóricos dos temas abordados no decorrer do trabalho: o processo de fermentação em estado sólido, características do micro-organismo utilizado na fermentação e do substrato empregado, definições e aplicações das enzimas pectinolíticas, celulolíticas e proteolíticas produzidas durante o processo.

2.1 Fermentação em estado sólido (FES)

Segundo Pandey (2003 *apud* Singhanian et al., 2009), a fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação semissólida (FSS), pode ser definida como um processo fermentativo realizado em uma matriz sólida, cuja característica é a ausência ou quase ausência de água livre. No entanto, o substrato deve ter umidade suficiente para o desenvolvimento microbiano e formação do produto de interesse. Inúmeros produtos de origem microbiana podem ser obtidos a partir da FES, as enzimas representam amplamente esses produtos, entre elas estão às amilases, proteases, xilanases, celulasas e pectinases (MONTEIRO & SILVA, 2009).

A matriz sólida utilizada na FES pode ser dividida em duas categorias, dependendo da natureza da fase sólida utilizada: matriz sólida natural (como fonte de nutrientes) ou suporte inerte (impregnado de nutrientes que permite o desenvolvimento de micro-organismos) (BARRIOS-GONZÁLES, 2012; SINGHANIAN et al., 2009).

2.1.1 Vantagens da FES

A FES apresenta algumas vantagens quando comparada com a fermentação submersa. Entretanto, essas vantagens também estão diretamente relacionadas com o tipo de micro-organismo utilizado no processo. De maneira geral, a FES apresenta menor risco de contaminação, devido à baixa umidade do meio; é de fácil preparo, pois, normalmente, necessita apenas do substrato principal e de água para umedecer; há uma ampla possibilidade de emprego de resíduos de baixo valor agregado; não é necessário muito espaço para desenvolver o cultivo de FES; o crescimento microbiano ocorre em condições próximas ao *habitat* natural proporcionando baixo consumo de água; volume reduzido de meio e as etapas de purificação do bioproduto são facilitadas (SANTOS, 2007; MONTEIRO & SILVA, 2009; SINGHANIAN et al., 2009).

2.1.2 Limitações da FES

A FES apresenta algumas limitações, uma vez que há uma restrição dos micro-organismos que são capazes de crescer em sistemas com baixa umidade; é difícil controlar os

parâmetros da fermentação; a homogeneização do meio reacional é dificultada; o meio apresenta alta heterogeneidade; e os substratos não estão completamente acessíveis ao micro-organismo (SANTOS, 2007; MONTEIRO & SILVA, 2009).

2.2 Micro-organismo utilizado na FES

Várias bactérias são conhecidas por produzir proteases e outras enzimas hidrolíticas a depender do tipo de substrato utilizado em sua produção. A maior parte das enzimas disponíveis comercialmente é obtida a partir do metabolismo de células microbianas do gênero *Bacillus*, devido sua capacidade de produzir grandes quantidades de proteases alcalinas e neutras com alta atividade e estabilidade a altas temperaturas e variações de pH, quando comparadas com as proteases fúngicas. (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016).

2.2.1 *Bacillus* sp.

As espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes, com extremidades retas ou arredondadas, de tamanhos variados, esporulados, Gram positivos ou Gram variáveis. Geralmente são saprófitos e não patogênicos aos animais. Seu *habitat* principal é o solo. Esse gênero de bactéria possui resistência a altas temperaturas e crescimento rápido (DE MARCO, 2012). A classificação taxonômica do *Bacillus* sp. está representada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonômica do *Bacillus* sp.

| Classificação taxonômica | |
|--------------------------|---------------------|
| Reino | <i>Bacteria</i> |
| Sub – reino | <i>Posibacteria</i> |
| Filo | <i>Firmicutes</i> |
| Classe | <i>Bacilli</i> |
| Ordem | <i>Bacillales</i> |
| Família | <i>Bacillaceae</i> |
| Gênero | <i>Bacillus</i> |
| Espécie | <i>Bacillus</i> sp. |

Fonte: *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS)

2.3 Substrato

Os substratos são compostos naturais ou sintéticos que podem ser usados na fermentação em estado sólido e, normalmente, são insolúveis em água, contudo, tem a capacidade de absorver água, a qual pode ser aproveitada pelo micro-organismo para

crescimento e atividade metabólica (SANTOS, 2007). Vários exemplos podem classificar esses substratos, principalmente os resíduos do processamento de frutas, como nesse caso, o resíduo proveniente do processamento do cajá.

2.3.1 Cajá

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) é uma árvore nativa e comum das florestas úmidas do Sul do México até o Peru e Brasil. No Brasil, a cajazeira é encontrada, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste (ASSIS et al., 2006; SANTOS-SEREJO et al., 2009). A Tabela 2 mostra a classificação taxonômica da cajazeira.

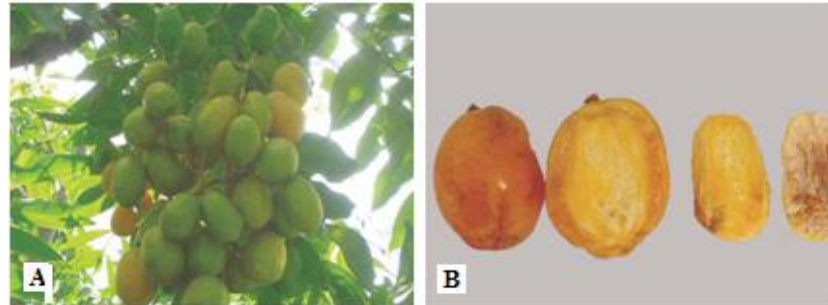
Tabela 2. Classificação taxonômica da *Spondias mombin* L.

| Classificação taxonômica | |
|---------------------------------|---------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Sub – reino | <i>Viridiplantae</i> |
| Super Divisão | <i>Embryophyta</i> |
| Sub Divisão | <i>Spermatophytina</i> |
| Classe | <i>Magnoliopsida</i> |
| Super Ordem | <i>Rosanae</i> |
| Ordem | <i>Sapindales</i> |
| Família | <i>Anacardiaceae</i> |
| Gênero | <i>Spondias</i> L. |
| Espécie | <i>Spondias mombin</i> L. |

Fonte: *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)*

O cajá, fruto da cajazeira, apresenta tamanho pequeno, de formato ovoide ou oblongo, com 3-4cm de comprimento, cor variando do amarelo ao alaranjado, casca fina, lisa, polpa pouco espessa que também varia do amarelo ao alaranjado, suculenta e sabor ácido-adocicado. Possui uma única semente, grande, branca, súbero-lignificada e enrugada (Figura 1). O cajá possui composição média de 32,81% semente, 15,66% casca e 51,53% polpa, porém essa composição pode variar conforme as condições ambientais e genotípicas, estado de maturação, tamanho, entre outros fatores. A composição físico-química da polpa do cajá está apresentada na Tabela 3 (ASSIS et al., 2006; SANTOS-SEREJO et al., 2009; Bora et al., 1991 *apud* MATTIETTO et al., 2010).

Figura 1. (A) Frutos da cajazeira (cajá); (B) Apresenta os detalhes do fruto: formato ovoide, cor variando do amarelo ao alaranjado, succulenta, apresentando uma única semente, grande, branca súbero-lignificada e enrugada.



Fonte: EMBRAPA (2009).

Tabela 3. Composição físico-química da polpa do cajá.

| Discriminação | Polpa do Cajá |
|---|---------------|
| pH | 2,53 ± 0,01 |
| Acidez titulável total (% ácido cítrico) | 1,86 ± 0,01 |
| Sólidos solúveis (expressos em °Brix a 28°C) | 10,09 ± 0,00 |
| Umidade (%) | 89,42 ± 0,18 |
| Proteína (%) | 0,82 ± 0,01 |
| Lipídios totais (%) | 0,26 ± 0,09 |
| Cinzas (%) | 0,58 ± 0,02 |
| Fibra dietética (%) | 1,18 ± 0,10 |
| Fibra insolúvel (%) | 0,43 ± 0,12 |
| Fibra solúvel (%) | 0,75 ± 0,12 |
| Açúcares totais (g.100g ⁻¹) | 4,54 ± 0,25 |
| Açúcares redutores (g.100g ⁻¹) | 4,25 ± 0,34 |
| Açúcares não redutores (g.100g ⁻¹) | 0,29 ± 0,27 |
| Carotenoides totais (µg.g ⁻¹) | 28,30 ± 0,18 |
| Taninos (MG.100g ⁻¹) | 299,81 ± 0,48 |
| Vitamina C (mg ácido ascórbico.100g ⁻¹) | 23,72 ± 0,08 |

Fonte: MATTIETTO (2010)

O cajá pode ser consumido na forma *in natura* ou processada. Bastante utilizado na produção de polpas, sucos, geleias, néctares, picolés, sorvetes e apreciado devido ao seu

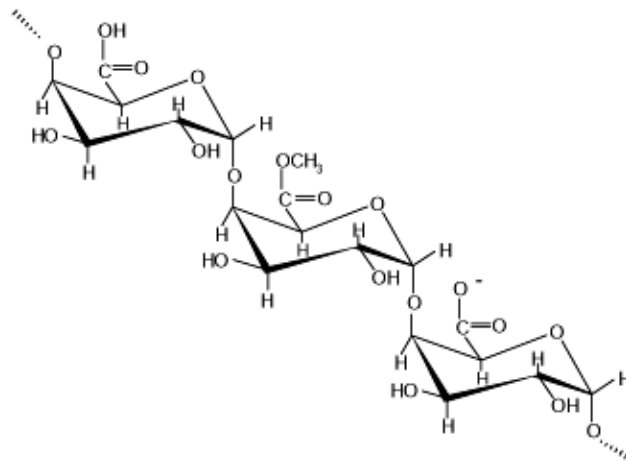
aroma e sabor característicos (*flavour*), o que vem aumentando cada vez mais o seu consumo (SACRAMENTO & SOUZA, 2000 *apud* SOUZA, 2005).

A industrialização desse fruto remete a grande geração de resíduos, uma vez que apenas a polpa é de interesse em seu processamento. Dessa forma, cerca de 50% de todo material processado é desperdiçado, sendo descartado no lixo urbano.

2.4 Pectina

A pectina ou substâncias pécticas refere-se a família de oligossacarídeos e polissacarídeos que contêm, predominantemente, resíduos de ácido galacturônico (GalA) ligados em α (1 \rightarrow 4) (Figura 2) (CANTERI et al., 2012; VORAGEN et al., 2009). As pectinas são macromoléculas de alto peso molecular que compõem a lamela média, uma fina camada de material que possui função adesiva entre as paredes celulares dos vegetais superiores (UENOJO & PASTORE, 2007).

Figura 2. Estrutura molecular da pectina.



Fonte: HOURDET & MULLER (1991).

O teor de substâncias pécticas varia de acordo com o vegetal e com sua origem. Como exemplo de fonte dessas substâncias tem-se o bagaço de maçã, albedo cítrico (maracujá, laranja, entre outras), polpa de beterraba, sementes de girassol e muitos outros frutos (CANTERI et al., 2012). Essas fontes de pectinas podem ser utilizadas como substrato para a produção de pectinases.

2.5 Pectinases e suas aplicações

As pectinases são um grupo de enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécticas, presentes nas plantas. As enzimas pectinolíticas podem ser produzidas por diversos

organismos, como bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas (MUKESH KUMAR et al., 2012). As pectinases são divididas em três grandes grupos, essa divisão se baseia nos modos de ataque à molécula dos polímeros pécticos, o grupo das protopectinases diz respeito a enzimas que degradam protopectina insolúvel e dá origem a pectina polimerizada altamente solúvel; as esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico; já as despolimerases catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ entre os monômeros do ácido D-galacturônico de substâncias pécticas (JAYANI et al., 2005).

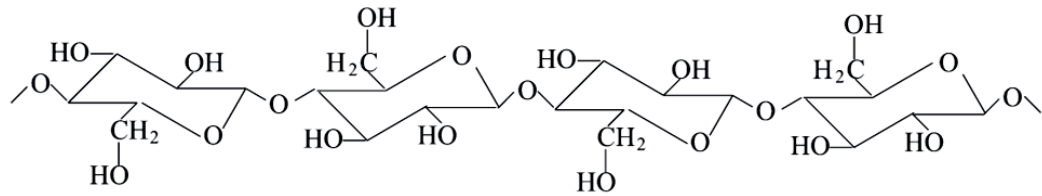
As enzimas pectinolíticas têm diversas aplicações industriais, sendo uma das primeiras enzimas a serem empregadas comercialmente. No mercado mundial, correspondem a 10% da produção total de enzimas (MUKESH KUMAR et al., 2012). Segundo Uenojo & Pastore (2007) e Santi et al. (2014) são bastante empregadas nas indústrias de sucos de frutas, onde as pectinases são adicionadas nos purês de frutas e vegetais para degradar a pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando os rendimentos dos sucos, além de ocasionar uma aparência cristalina ao produto final e reduzir o tempo de filtração.

Na indústria de vinhos, as pectinases são utilizadas durante o esmagamento das uvas, com o objetivo de melhorar a extração do suco e reduzir o tempo de clarificação. Também são bastante empregadas na indústria têxtil para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento de resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais; e por fim na ração animal, as pectinases, em conjunto com outras enzimas, tem a finalidade de reduzir a viscosidade do produto, propiciando o aumento da absorção e a liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras (UENOJO & PASTORE, 2007).

2.6 Celulose

A celulose é o componente de todas as plantas, algas e algumas criaturas marinhas. A celulose é um polímero que contém feixes de microfibrilas. Cada microfibrila pode ser constituída por 36-1200 cadeias de celulose que são mantidas por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando uma estrutura cristalina altamente ordenada. A unidade repetitiva da base da celulose é a celobiose, um dissacarídeo de glicose (Figura 3) (SHARMA et al., 2016).

Figura 3. Estrutura molecular da celulose.



Fonte: FRANCHETTI & MARCONATO (2006).

2.7 Celulases e suas aplicações

As celulases são enzimas que catalisam a hidrólise da celulose e são produzidas por vários micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários (VIJAYARAGHAVAN et al., 2016).

Esse grupo de enzimas está dividido de acordo com seu mecanismo de ação. As endoglucanases ou glucanohidrolases atacam a cadeia de celulose aleatoriamente nos locais internos da cadeia amorfa, gerando novas extremidades da cadeia e de oligossacarídeos com comprimentos variados, são ativas contra as formas solúveis de celulose, como carboximetilcelulose (CMC) e celulose amorfa (SHARMA et al., 2016).

As exoglucanases ou celobiohidrolases atuam sobre a redução das extremidades da cadeia de celulose, sua classificação é dada de acordo com o produto liberado após sua ação, quando há liberação de glicose, é nomeada como glucanohidrolase, e quando há liberação de celobiose, recebe o nome de celobiohidrolase; as exoglucanases ou celodextrinases atuam removendo celobiose de celo-oligossacarídeos, geralmente são inativas contra a celulose amorfa ou formas solúveis, como o CMC (SHARMA et al., 2016).

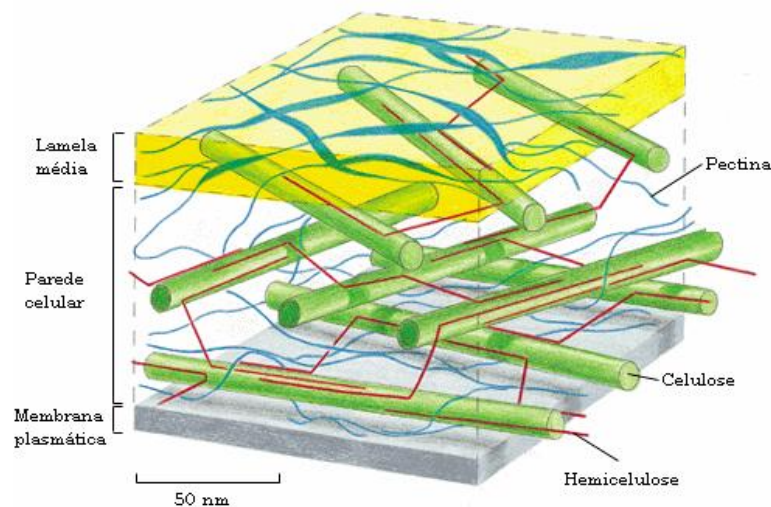
As β -glucosidases atuam sobre as extremidades não redutoras e hidrolisa celo-oligossacarídeos e celobiose em glicose, são inativas contra a celulose amorfa e cristalina; as celobioses fosforilases ou celobiasas também conhecidas como ortofosfatase α -D-glicosil transferase, catalisam a clivagem reversível da celobiose em glicose; as celodextrinas fosforilases catalisam a clivagem reversível de celodextrina em glicose e não possui ação sobre a celobiose; as celobioses epimerases catalisam a epimerização de dissacarídeos como celobiose em 4-O- β -D-glucosilmanose (SHARMA et al., 2016).

As celulases possuem diversas aplicações industriais, entre elas estão a utilização na indústria têxtil, as quais estão envolvidas na lavagem do tecido, dando a roupa um efeito envelhecido/desbotado e evitando a utilização de outros produtos que são bastante agressivos ao meio ambiente, também possuem a função de suavizar a superfície do tecido; na indústria de papel de celulose, são empregadas na eliminação de tintas e remoção de partículas

poluentes do papel, sem afetar seu brilho e resistência, além de serem usadas na biorremediação dos poluentes industriais; na indústria de lavanderia e detergentes para limpeza de tecidos, uma vez que melhoram o brilho, a cor e a sensação de maciez das peças do vestuário, principalmente as peças de algodão (SHARMA et al., 2016).

Na indústria de processamento de alimentos e sucos, as celulases propiciam a clarificação e redução da viscosidade de néctares, sucos, vinhos, na alteração das propriedades sensoriais de frutos, extração do azeite e no melhoramento da qualidade de produtos da padaria; na extração de pigmentos vegetais, como o carotenoide amplamente utilizado como corante alimentar devido sua propriedade biológica; na indústria farmacêutica, as celulases desempenham um papel muito importante na extração de compostos produzidos pelas plantas (SHARMA et al., 2016).

Figura 4. Estrutura da parede celular vegetal representando o arranjo das moléculas de pectina e celulose.



Fonte: Martins (2006).

2.8 Enriquecimento protéico

O desempenho da pecuária brasileira, principalmente na região Nordeste, é limitado pela baixa disponibilidade de água e de forragens, manejo inadequado dos animais, má utilização dos recursos forrageiros disponíveis e o alto custo das rações comerciais (MACEDO et al., 2015).

Na tentativa de superar estas limitações, os criadores recorrem a suplementação proteica na dieta dos animais, o que aumenta os custos de produção. Em busca de reduzir os

custos, a melhor alternativa é a utilização dos resíduos alimentícios em processos fermentativos através da ação de bactérias, fungos filamentosos ou leveduras que se destacam por ter a capacidade de aumentar o conteúdo proteico da biomassa inerente ao processo e ter a possibilidade de cultivo em vários tipos de substratos (ARAÚJO et al., 2008).

Os substratos mais comumente utilizados no Brasil para o enriquecimento proteico são: resíduos de frutas, espiga de milho, cana de açúcar, bagaço da cana, melaço, vinhaça, farelo da palha de trigo, grãos, polpa de café e, também, cactáceas mandacaru sem espinhos e palma forrageira. Todos estes exemplos representam matéria-prima abundante e de baixo custo (ARAÚJO et al., 2008).

2.9 Enzimas proteolíticas e suas aplicações

As enzimas proteolíticas ou proteases são responsáveis pela clivagem de peptídeos e por conduzir modificações seletivas e específicas em proteínas, estão classificadas em seis famílias de acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e especificidade ao substrato, são elas: serina protease I (ex. tripsina e elastase), serina protease II (ex. subtilisina), cisteína protease (ex. papaína), aspartil protease (ex. pepsina, quimosina), metalo protease I (ex. carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (ex. termolisina). Podem ser produzidas por plantas, animais e micro-organismos. Constituem uma classe muito importante na indústria e correspondem a 60% da produção enzimática global (GIONGO, 2006; NASCIMENTO & MARTINS, 2004).

As proteases são amplamente empregadas em processos biotecnológicos de digestão de penas não aproveitadas em aviários, para redução de resíduos de pena provenientes de aviários, sendo convertidas em alimentos industriais, fertilizantes, colas, filmes ou na produção de aminoácidos raros como a serina, cisteína e a prolina (GIONGO, 2006); em fármacos; no processamento de alimentos; produção de extratos de leveduras, em bebidas, como na produção de cervejas resistentes ao congelamento; panificação; no amaciamento de carne; na produção de queijo, promovendo a coagulação do leite, fabricação de detergentes, entre outras aplicações (WISEMAN, 1991 *apud* GIONGO, 2006).

3 Metodologia

O terceiro tópico apresenta os métodos empregados no decorrer do trabalho. Neste espaço é descrito a obtenção do resíduo empregado no processo de fermentação em estado sólido para obtenção das enzimas pectinolíticas, celulolíticas e proteolíticas, além de sua caracterização físico-química; o micro-organismo utilizado na fermentação, o modo de manutenção e cultivo; obtenção do extrato enzimático e os métodos utilizados para determinação da atividade pectinolítica, celulolítica e proteolítica.

3.1 Preparo do resíduo

Como substrato da fermentação em estado sólido para produção de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e proteolíticas foi utilizado o bagaço do cajá resultante do processamento do fruto na produção de polpa. Esse substrato foi obtido na Indústria Polpas de Frutas Ideal na cidade de João Pessoa – PB e cedido para realização desse trabalho.

O bagaço do cajá é uma mistura de cascas, fibras e sementes (Figura 5). Porém, teve-se o cuidado de selecionar apenas as cascas e fibras para serem utilizadas no processo fermentativo. Após a seleção, o bagaço foi armazenado a -18°C para posterior utilização.

Figura 5. Bagaço do cajá (cascas e fibras).



Fonte: Autor (2016).

3.1.1 Caracterização dos resíduos

A caracterização físico-química dos resíduos quanto ao teor de sólidos solúveis, densidade aparente, pH, umidade, cinzas, açúcares redutores totais, foi realizada com base nas metodologias descritas a seguir.

3.1.1.1 Teor de sólidos solúveis (°brix)

Para determinação do teor de açúcares presente no bagaço do cajá foram adicionados 9mL de água destilada a 1g do bagaço em frasco erlenmeyer de 125mL. A suspensão permaneceu em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) por uma hora sob agitação de 200rpm. Seguida de filtração com bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil de Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o bagaço do sobrenadante. A leitura foi realizada em refratômetro (NOVA - ABBE REFRACTOMETER), o resultado multiplicado por dez, devido à diluição. Esse procedimento foi adaptado da metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.1.1.2 Densidade aparente

Para determinação da densidade aparente pesou-se 100g do bagaço, em balança (MARTE - AW220). O bagaço foi colocado em proveta, sem compactá-lo, para verificar o volume ocupado e espaços vazios (CORREIA, 2004). A densidade aparente é expressa conforme a Equação 1.

$$Densidade\ aparente = \frac{massa\ (g)}{volume\ ocupado\ (mL)} \quad Eq.\ (1)$$

3.1.1.3 pH

Preparou-se uma suspensão com 100mL de água e 10g do bagaço. Após homogeneização e precipitação dos sólidos, determinou-se o pH com potenciômetro digital (AKSO – AK 90) previamente calibrado com soluções padrões (Instituto Adolf Lutz, 2005).

3.1.1.4 Teor percentual de umidade

A umidade é representada pelo teor de água presente na amostra e determinada conforme Equação 2. Para análise da umidade, pesou-se aproximadamente 2,0g da amostra em placa de petri previamente seca e tarada. Em seguida, o conjunto amostra-recipientes foi colocado em estufa (OLIDEF - CZ) a 105±2°C durante 24 horas. O procedimento foi realizado em triplicata (MORAIS et al., 2010).

$$Umidade\ (\%) = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad Eq.\ (2)$$

3.1.1.5 Teor percentual de cinzas

Para determinação do teor de cinzas pesou-se 2,0g do resíduo de cajá úmido em cadinho previamente calcinado a 600°C por 30 minutos, resfriado em dessecador. O conjunto

resíduo-cadinho foi colocado em forno mufla (ASTEMEP - ICD 04A) a temperatura ambiente e iniciou uma rampa de temperatura de aquecimento de aproximadamente 9,6°C/minuto até a temperatura de 600°C, a qual foi atingida em 60 minutos de aquecimento. Essa temperatura foi mantida por 3 horas. Ao fim desse tempo, a temperatura foi reduzida a 200°C em no mínimo uma hora. O conjunto resíduo-cadinho levado ao dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado novamente (MORAIS et al., 2010). O procedimento foi realizado em triplicata. O teor de cinzas foi calculado pela Equação 3.

$$Cinzas(\%) = \frac{\text{massa final da amostra}}{\text{massa inicial da amostra}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

3.1.1.6 Teor de açúcares redutores totais (ART)

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540nm.

A curva padrão foi obtida realizando o teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de glicose a 1g/L. Com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração.

3.1.1.6.1 Análise do substrato

Foram pesados 10g do bagaço em frasco erlenmeyer de 125mL, adicionado 20mL de água destilada e 5mL de HCl 1N. A mistura permaneceu em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) a 200rpm durante uma hora. Posteriormente, foi adicionado 2mL de NaOH 1N. A mistura foi filtrada com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o bagaço da solução contendo os açúcares. Tomou-se 0,5mL da solução e adicionou 2,5mL do reagente DNS (em triplicata). Os tubos foram aquecidos a 100°C por dez minutos e resfriados em banho de gelo por cinco minutos. A cada tubo foram adicionados 3mL de água destilada, homogeneizados e feita a leitura em espectrofotômetro (SPECTRO VISION) a 540nm. A curva padrão foi usada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcares redutores por mililitro de

solução e, conseqüentemente, supor a concentração de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg ART/ g amostra).

3.2 Micro-organismo

O micro-organismo empregado foi o *Bacillus* sp., linhagem isolada do solo canavieiro, cedido gentilmente pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da UFPB.

A cultura de *Bacillus* sp. foi mantida em meio sólido ágar Luria-Bertani (Tabela 4) em tubos inclinados com 3mL de meio (pH 6,8). A renovação das células foi feita periodicamente e realizada por repique em meio e incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida, armazenadas a 4°C.

Tabela 4. Composição do meio Luria-Bertani.

| Composição | g/L |
|-------------------------|-----|
| Triptona | 10 |
| Extrato de levedura | 5 |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 5 |
| Ágar | 20 |

Fonte: *Cold Spring Harbor Protocols* (CSH protocols).

3.3 Inóculo

A cepa de *Bacillus* sp. foi inicialmente cultivada em frasco erlenmeyers de 125mL contendo 50mL de meio conforme a Tabela 5 e o pH ajustado para 6,8. Os inóculos foram preparados através da transferência, com alça de platina, de colônias isoladas a partir de tubos inclinados com meio sólido ágar Luria-Bertani, e incubados a 37°C sob agitação de 150rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da densidade óptica do meio de cultivo a 600nm (D.O. 600nm). Este cultivo foi utilizado como inóculo quando a D.O.600nm atingiu absorvância entre 0,6 e 0,8 (DAS & MUKHERJEE, 2007).

Tabela 5. Composição do meio do inóculo.

| Componentes | Concentração (g/L) |
|---|--------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,390 |
| KH ₂ PO ₄ | 4,080 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,001 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,197 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0,002 |

| | |
|--------------------------------------|--------|
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,015 |
| Extrato de levedura | 1,000 |
| Sacarose | 20,000 |

Fonte: BUGAY (2009, modificado).

3.4 Meio e condições de produção enzimática

O cultivo para produção enzimática foi realizado em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 10g de bagaço de cajá suplementado com 9mL de solução nutriente conforme a Tabela 6 e o pH ajustado para 6,8. Cada frasco foi inoculado com 1mL do inóculo e incubados a 30°C. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo regulares (0, 20, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216h) durante o processo para realização das análises do cultivo.

Tabela 6. Composição do meio nutriente utilizado no cultivo.

| Componentes | Concentração (g/L) |
|---|--------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,100 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,300 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,700 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,020 |
| Sacarose | 5,000 |
| Extrato de levedura | 1,000 |

Fonte: BUGAY (2009, modificado).

3.5 Obtenção do extrato enzimático

A cada amostra retirada do cultivo foi adicionado 20mL do tampão acetato 0,1M, pH 5,0. O meio fermentado em suspensão foi colocado em mesa agitadora (SOLAB – SL 223) a 200rpm por uma hora. Em seguida, procedeu-se a filtração com auxílio da bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), em funil Buchner, usando papel de filtro qualitativo (14µm) para separar o resíduo da fermentação do sobrenadante contendo o extrato enzimático. O filtrado foi submetido à centrifugação a 2600rpm por 10 minutos para retirada dos particulados residuais. A amostra foi armazenada a 4°C para análises posteriores.

3.5.1 Resíduo da fermentação

O resíduo da fermentação retido em papel filtro de massa conhecida foi pesado. Levado a estufa (OLIDEF - CZ) por 24 horas a 85°C para eliminar a umidade. Ao fim das 24 horas, o conjunto papel filtro – resíduo seguiu para o dessecador, até atingir a temperatura

ambiente. Em seguida, o conjunto foi pesado novamente. A biomassa foi determinada pela diferença de peso entre o conjunto papel filtro – resíduo e a massa do papel filtro.

3.5.2 Análises do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto foi analisado quanto ao pH, proteínas totais, atividade pectinolítica, celulolítica e proteolítica.

3.5.2.1 pH

O pH do extrato enzimático bruto foi determinado com o auxílio de um potenciômetro digital (AKSO - AK 90) previamente calibrado com soluções padrões.

3.5.2.2 Proteínas totais

O branco foi preparado em um microtubo com 800µL de água Milli-Q e 200µL do reagente de Bradford.

Para a análise do cultivo, adicionou-se em um microtubo 10µL da amostra, 790µL de água Milli-Q e 200µL do reagente de Bradford. As reações foram incubadas a temperatura ambiente durante 5 minutos e a absorbância foi quantificada no comprimento de onda igual a 595nm. Empregou-se a albumina sérica bovina como padrão (BRADFORD, 1976). Cada amostra do filtrado foi analisada em triplicata.

3.5.2.3 Ensaio quantitativo da atividade pectinolítica

Para quantificação da atividade pectinolítica, utilizou-se a casca do maracujá como substrato, porém foi necessário submetê-las ao processo de branqueamento para inativação de enzimas que provocariam seu escurecimento.

3.5.2.3.1 Preparo da casca do maracujá

Os maracujás foram lavados e higienizados. O flavedo e a polpa foram removidos. O albedo foi colocado em banho termostático (SOLAB – SL 150) a 90°C por 5 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente. O albedo foi cortado em cubinhos com volume igual a 0,5cm³ (1cm × 1cm × 0,5cm). Em seguida, armazenados a temperatura de -18°C. Esse procedimento foi adaptado da metodologia descrita em Pinheiro (2007).

3.5.2.3.2 Extração e hidrólise da pectina

Cada tubo de ensaio contendo 4mL de tampão acetato 0,1M, pH 5,0, previamente aclimatado a 35°C, recebeu um cubinho da casca do maracujá. Adicionou-se 0,5mL de extrato

enzimático, prosseguindo a reação enzimática a 35°C por 30 minutos. Terminada a reação, transferiu-se 0,5mL da mistura reacional para tubos de ensaio e a eles foram adicionados 2,5mL do reagente DNS. Os tubos seguiram para o banho termostatizado (SOLAB – SL 150) a 100°C por 10 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. A cada tubo, foram adicionados 3mL de água destilada e, posterior, homogeneização. O branco foi feito com a adição de 0,5mL de tampão acetato no lugar do extrato enzimático ao tubo contendo a casca do maracujá. A absorbância foi determinada no comprimento de onda igual a 540nm. A solução de glicose em diferentes concentrações foi utilizada para determinar a curva padrão. Uma unidade da atividade da pectinase é definida pela quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose por minuto (RODRIGUES & FERMANDES, 2007 *apud* OLIVEIRA JÚNIOR, 2014).

3.5.2.4 Determinação da atividade da exoglucanase (FPase)

Para determinação da atividade da exoglucanase (FPase), foi utilizada a metodologia recomendada por Ghose (1987 *apud* Oliveira Júnior, 2014), empregando-se como substrato o papel de filtro Whatman nº1 cortado em tiras de 1 x 6cm. Cada tubo de ensaio recebeu uma tira de papel. Em seguida, adicionou-se 1mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8, e 0,5mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C durante 60 minutos em banho termostatizado (SOLAB – SL 150).

Por fim, transferiu-se 0,5mL da mistura reacional para tubos de ensaio e 2,5mL do reagente DNS. Os tubos seguiram para o banho termostatizado a 100°C por 10 minutos. O resfriamento ocorreu em banho de gelo durante 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 20mL de água destilada e homogeneizadas. A leitura foi realizada no comprimento de onda igual a 540nm. Uma unidade da atividade da celulase é definida pela quantidade de enzima que libera 1µmol de glicose por minuto (equivalente a 0,18mg de glicose por minuto) (ALVA et al., 2007).

3.5.2.5 Determinação da atividade da endoglucanase (CMCase)

Para determinação da atividade da endoglucanase (CMCase), fez-se uso do protocolo de Ghose (1987 *apud* Oliveira Júnior, 2014). Em que foi utilizada como substrato uma solução de carboximetilcelulose sódica a 2% em tampão citrato 0,05M, pH 4,8. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5mL do substrato e 0,5mL do extrato enzimático. A reação de hidrólise foi incubada a 50°C durante 30 minutos. A glicose liberada foi estimada pela reação com ácido dinitrosalicílico. Uma unidade da atividade da endoglucanase equivale a 1µmol de glicose liberada por minuto (ALVA et al., 2007).

3.5.2.6 Atividade proteolítica

A atividade das proteases foi analisada utilizando como substrato a azocaseína. Dessa forma, misturou-se 100µL do extrato do sobrenadante a 100µL do tampão tris 0,1M, pH 9. Em seguida, foi adicionado 100µL do substrato (azocaseína 10mg/mL). A mistura reacional foi incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 500µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a centrifugação a 10.000g por 5 minutos em centrífuga (MINISPIN - EPPENDORF), foi adicionado 200µL de NaOH 1,8N ao sobrenadante. A leitura da amostra foi realizada no comprimento de onda igual a 420nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 420nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. O branco foi feito adicionando-se água destilada no lugar do sobrenadante (GIONGO, 2006).

4 Resultados e Discussão

O quarto tópico apresenta os resultados obtidos nos experimentos e a discussão sobre os mesmos.

4.1 Caracterização do resíduo de cajá

A caracterização do resíduo do cajá, coletado logo após o processamento da fruta, utilizado como substrato no processo de produção de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e proteolíticas, na fermentação em estado sólido, está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Caracterização do bagaço do cajá.

| Parâmetros Analisados | Unidade | Resultados |
|-----------------------|---------|------------|
| Sólidos solúveis | °brix | 7,8 |
| Densidade aparente | g/mL | 0,2857 |
| pH | - | 2,64 |
| Umidade | % | 80,38 |
| Cinzas | % | 1,38 |
| Açúcares redutores | g/L | 8,29 |

Fonte: Autor (2016).

O resíduo do cajá apresentou uma concentração de sólidos solúveis (7,8°brix) bem próxima a concentração encontrada na polpa (10,09°brix) descrita por Mattietto (2010), uma vez que foi utilizado *in natura*, não passando por nenhum tipo de tratamento. Também é caracterizado por possuir alta umidade, teor de açúcares redutores igual a 8,29mg de ART/g de amostra, ter uma acidez bastante acentuada, sendo necessário corrigir o pH para o mais próximo da neutralidade (6,5 – 7,0) durante o preparo do meio de cultivo, porém a correção foi dificultada devido a característica heterogênea da biomassa, como granulometria não definida, a própria composição do substrato (fibras e cascas).

A densidade aparente (0,2857g/mL) mostra que os resíduos tendem a não se compactarem, o que propicia uma melhor aeração do meio de cultivo, devido a porosidade e os espaços vazios da matéria, permitindo um melhor desenvolvimento do micro-organismo.

4.2 Fermentação em estado sólido

Durante o cultivo de 240 horas (Figura 6), as características do substrato sofreram algumas alterações visuais. O meio, antes de ser inoculado, apresentava uma coloração marrom devido ao processo de esterilização, mas no decorrer do processo fermentativo, o cultivo foi adquirindo uma cor um pouco mais clara, consequência do crescimento do *Bacillus* sp. na matriz sólida. O aroma do bagaço de cajá, também foi alterado para o cheiro característico do processo fermentativo.

Ao comparar o cultivo com 0 hora e após 20 horas, observou-se o aumento da turbidez e viscosidade do extrato enzimático durante a filtração.

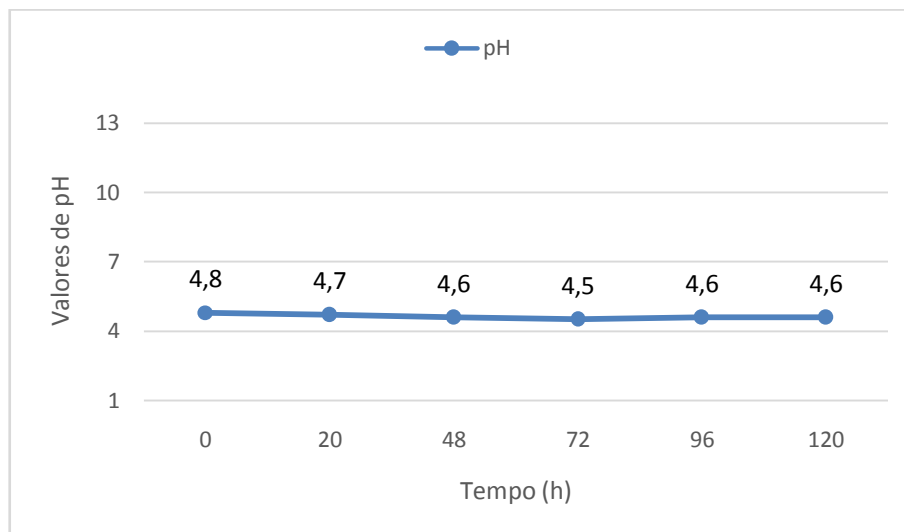
Figura 6. Fermentação em estado sólido do bagaço do cajá como substrato pelo *Bacillus* sp.



Fonte: Autor (2016).

4.3 pH

Figura 7. Valores de pH no decorrer de 120 horas do cultivo.



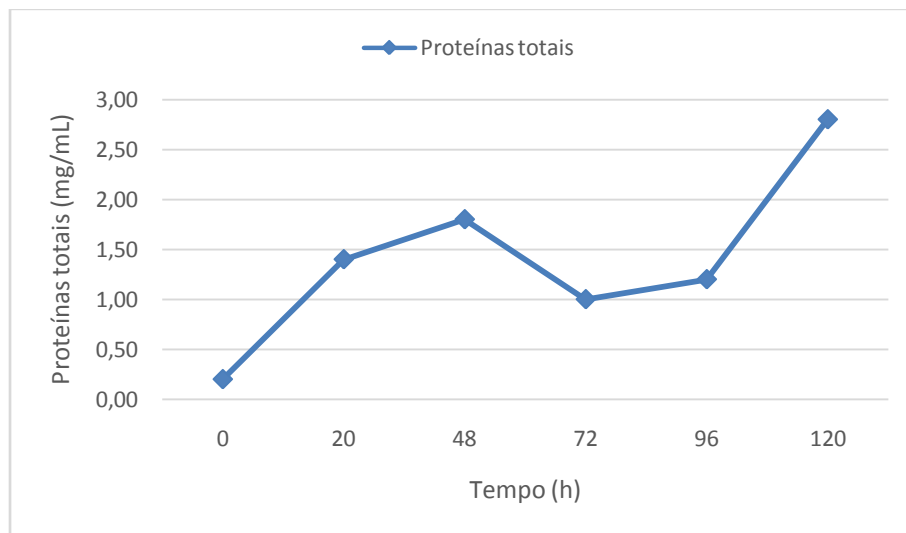
Fonte: Autor (2016).

O pH apresentou-se constante durante o processo fermentativo, devido as características tamponantes dos reagentes adicionados ao meio nutriente e ao próprio tampão utilizado para arrastar as enzimas da matriz sólida (Figura 7).

4.4 Proteínas totais

Durante o processo, a quantidade de proteínas totais se modificou, mostrando um perfil satisfatório no aumento da produção de proteína total, indicativo significativo da produção enzimática. Os resultados podem ser observados na Figura 8.

Figura 8. Quantidade das proteínas totais (mg/mL) no decorrer do processo fermentativo até 120 horas.



Fonte: Autor (2016).

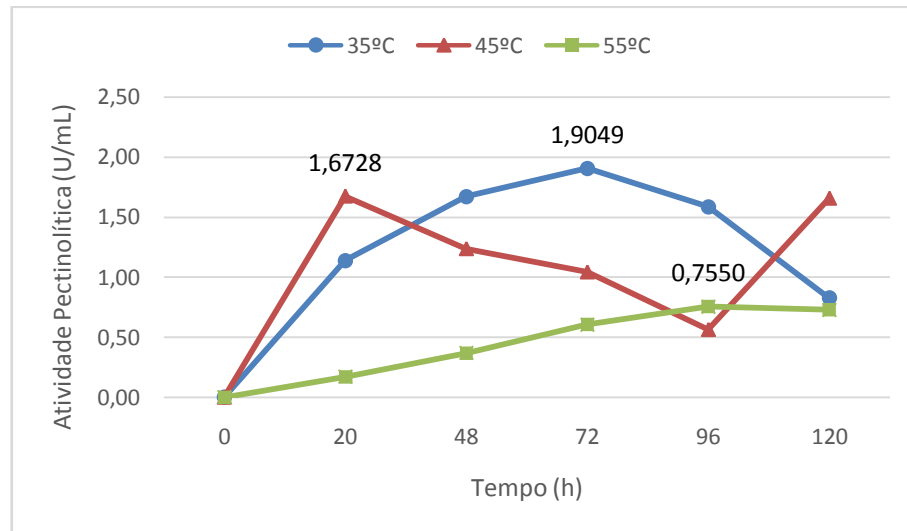
4.5 Atividade pectinolítica

Para determinação do efeito da temperatura sobre a estabilidade da pectinase, o extrato enzimático bruto foi incubado durante 30 minutos nas temperaturas 35°, 45° e 55°C e a atividade pectinolítica verificada de acordo com a metodologia descrita na seção 3.5.2.3.

A incubação do extrato enzimático bruto a temperatura igual a 35°C, propiciou um aumento gradual da atividade da pectinase, atingindo a atividade máxima (1,90 U/mL) no tempo de 72 horas. Entretanto, quando houve um aumento da temperatura para 45°C, a atividade enzimática (1,67 U/mL) foi acentuada no tempo de cultivo de 20 horas, após isso houve um declínio até o tempo de 96 horas. A temperatura de incubação igual a 55°C permitiu o aumento da atividade durante o processo, porém a enzima atingiu menos da metade de sua atividade máxima (0,75 U/mL) (Figura 9). Com base nessa análise, pode-se inferir que

o aumento da temperatura resulta na diminuição da atividade pectinolítica, por não ser uma enzima termoestável.

Figura 9. Estabilidade da atividade pectinolítica sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado durante 30 minutos sob as temperaturas de 35°, 45° e 55°C.



Fonte: Autor (2016).

Resultados similares foram obtidos no estudo realizado por Mukesh Kumar et al. (2012), no processo de fermentação submersa utilizando uma estirpe de *Bacillus* sp., onde a máxima atividade enzimática (1,5 U/mL) foi encontrada na temperatura de incubação igual a 35°C, ao passo que temperaturas maiores proporcionaram a redução da atividade pectinolítica.

Já no estudo desenvolvido por Rekha et al. (2013), a produção de enzimas pectinolíticas pela *Thalassospira frigidiphilosprofundus* no processo de fermentação submersa, apresentou melhor atividade enzimática até 25°C, o aumento da temperatura provocou redução da atividade enzimática.

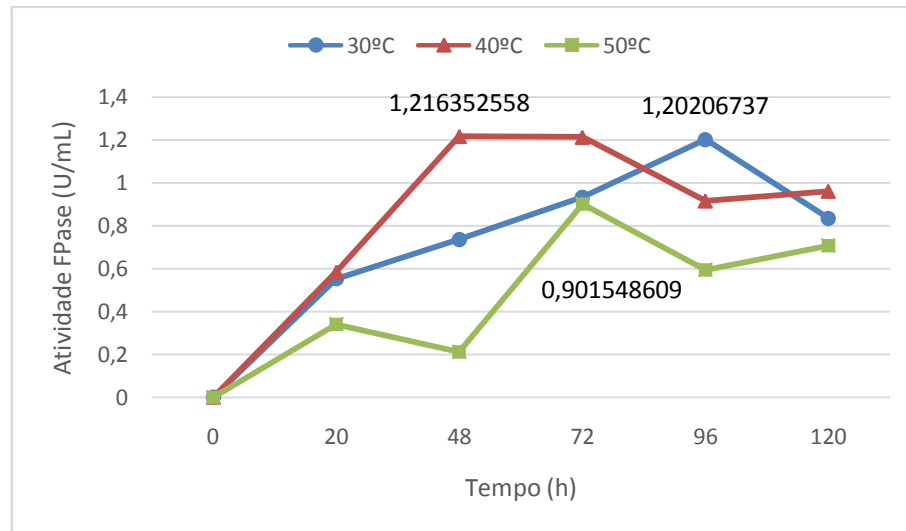
4.6 Atividade da exoglucanase (FPase)

O extrato enzimático bruto foi incubado nas temperaturas de 30°, 40° e 50°C para posterior análise da atividade da exoglucanase.

Na própria temperatura de cultivo, 30°C, a atividade enzimática atingiu 1,2U/mL às 96 horas, porém essa mesma atividade foi atingida às 48h quando a temperatura de incubação foi aumentada para 40°C, o que implica dizer que a elevação da temperatura até 40°C resultou em uma melhor atividade enzimática. Mas, em temperaturas extremas, como 50°C, a

atividade enzimática diminuiu para 0,9U/mL devido provavelmente a inativação da enzima (Figura 10).

Figura 10. Estabilidade da atividade da exoglucanase sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C.



Fonte: Autor (2016).

No estudo desenvolvido por Mahmood et al. (2013), em que se avaliou a produção, purificação e caracterização da exoglucanase produzida pelo *Aspergillus fumigatus*, a melhor produção foi observada depois de 72 horas de fermentação, apresentando uma ótima atividade a 55°C.

4.7 Atividade da endoglucanase (CMCase)

O extrato enzimático bruto foi incubado nas temperaturas de 30°, 40° e 50°C para posterior análise da atividade da endoglucanase.

A atividade enzimática apresentou comportamentos semelhantes até 48 horas, nas temperaturas de 30° e 40°C. Porém, analisando até 120 horas, a melhor atividade apresentada foi na temperatura de incubação de 30°C. Quando a temperatura foi elevada para 40°C e 50°C, a partir das 72 horas e 48 horas, respectivamente, foi observado que a atividade enzimática demonstrou instabilidade, o que permite dizer que a endoglucanase produzida nesse processo não é uma enzima termoestável (Figura 11).

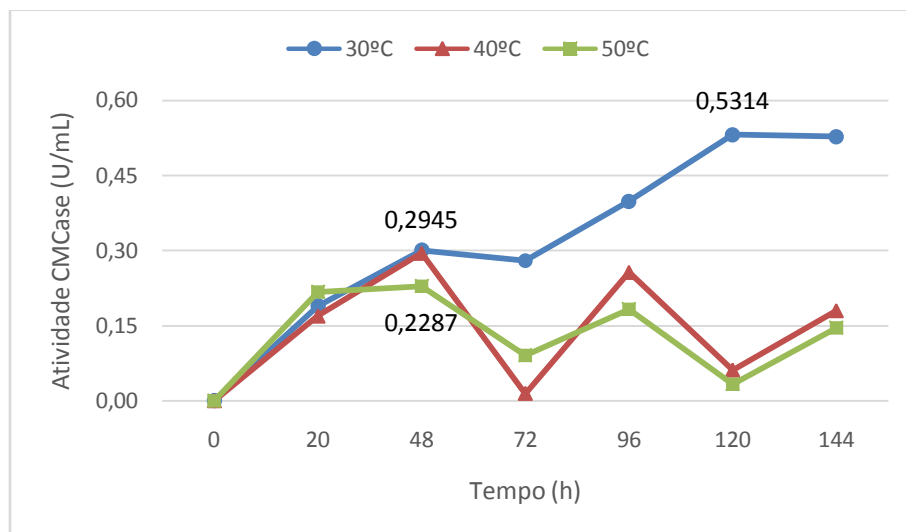
Padilha et al. (2015) estudou a produção e caracterização da CMCase termófila produzida pela *Bacillus* sp. utilizando como substrato o bagaço da cana de açúcar em fermentação submersa, sendo observada a melhor atividade enzimática (0,38U/mL) às 72h, na

temperatura de incubação de 50°C. Estes resultados apresentaram-se menor 71% do que a melhor atividade enzimática (0,53U/mL) encontrada na fermentação em estado sólido, no tempo de 120 horas, utilizando o bagaço do cajá como fonte de carbono (Figura 11).

O estudo desenvolvido por Azizi et al. (2015), avaliou a atividade da endoglucanase termoestável produzida por *Isoptericola variabilis* sp., e puderam observar a melhor atividade enzimática foi obtida a partir de 144 horas de cultivo. Também demonstraram que o tempo de exposição da endoglucanase a temperaturas elevadas (55° e 65°C) reduz a estabilidade da enzima.

Premalatha et al. (2015), buscou otimizar a produção de celulase por *Enhydrobacter* sp. ACCA2, e notou que a maior produção e melhor atividade da enzima foi observada na temperatura de incubação de 30°C às 72 horas.

Figura 11. Estabilidade da atividade da endoglucanase sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C.



Fonte: Autor (2016).

4.8 Atividade proteolítica

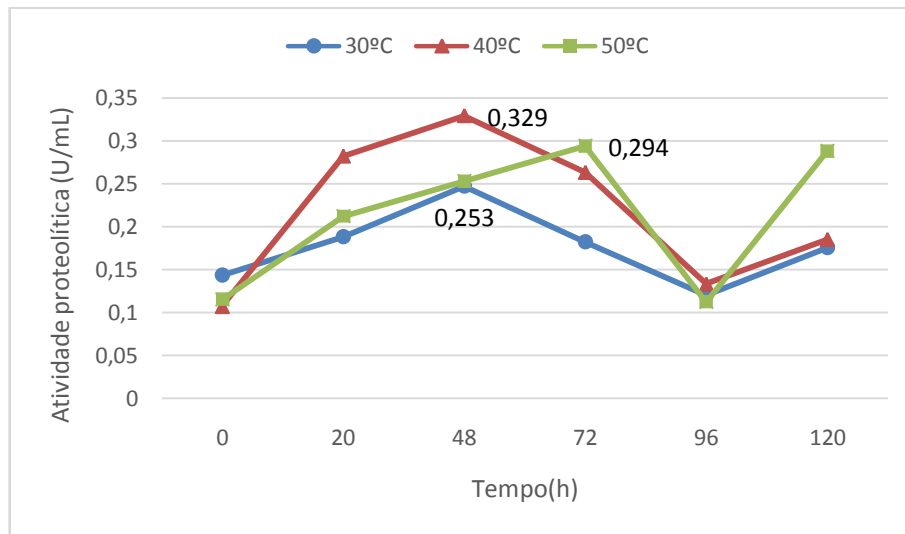
A atividade proteolítica foi analisada para ser comparada com as atividades pectinolíticas e celulolíticas, uma vez que as proteases são produzidas normalmente pelo *Bacillus* sp. e a sua produção está estritamente relacionada com o metabolismo do micro-organismo, sendo necessário quantificá-la.

Os resultados da atividade proteolítica demonstraram um comportamento semelhante quando comparada a atividade do extrato enzimático bruto incubado nas diferentes temperaturas (30°, 40° e 50°C), podendo inferir que as proteases produzidas durante o processo fermentativo possuem uma maior resistência ao calor. Entretanto, a melhor atividade

enzimática foi observada na temperatura de incubação de 40°C, no tempo de 48 horas, sendo maior (78%) do que a melhor atividade enzimática obtida na temperatura de 30°C, implicando dizer que a melhor estabilidade enzimática se encontra a 40°C (Figura 12).

No estudo realizado por Ladeira et al. (2010), a melhor atividade proteolítica foi alcançada após as 30 horas de fermentação de *Bacillus* sp. à temperatura de 50°C, referente à condição máxima de produção de protease.

Figura 12. Estabilidade da atividade proteolítica sob a variação da temperatura. O extrato enzimático incubado sob as temperaturas de 30°, 40° e 50°C.



Fonte: Autor (2016).

4.9 Quantificação específica das enzimas

As pectinases apresentaram a maior atividade enzimática sobre as proteínas totais (1,905U/mL) na temperatura de incubação de 35°C, havendo uma redução desse valor à medida que houve o aumento da temperatura (Tabela 8).

Tabela 8. Quantificação específica das enzimas produzidas durante o processo.

| Enzimas produzidas na FES | Enzima produzida/ proteínas totais (U/mg) | | |
|------------------------------|---|----------|----------|
| | 30°/35°C | 40°/45°C | 50°/55°C |
| Pectinases | 1,905 | 1,195 | 0,629 |
| Exoglucanases | 1,002 | 0,676 | 0,901 |
| Endoglucanases | 0,189 | 0,164 | 0,127 |
| Proteases | 0,140 | 0,182 | 0,294 |

Fonte: Autor (2016).

As exoglucanases apresentaram uma maior atividade enzimática sobre as proteínas totais do que as endoglucanases na incubação do extrato enzimático bruto nas três temperaturas.

Já as proteases apresentaram um comportamento diferente, a atividade enzimática sobre as proteínas totais aumentaram ao passo que houve o aumento da temperatura de incubação. Porém sua produção foi baixa, uma vez que o metabolismo microbiano estava voltado para produção de pectinases e celulases, em especial as exoglucanases, devido ao substrato ofertado no processo fermentativo.

5 Conclusão

A utilização do resíduo do cajá *in natura* no processo de fermentação em estado sólido pelo *Bacillus* sp. se demonstrou favorável à produção das enzimas pectinolíticas e celulolíticas.

As pectinases produzidas no processo fermentativo não são termoestáveis, apresentaram atividade ótima a 35°C e com aumento da temperatura houve redução da atividade enzimática. As pectinases foram as enzimas mais produzidas durante o processo.

As exoglucanases apresentaram melhor atividade enzimática a 40°C e foram as segundas mais produzidas.

Já as endoglucanases demonstraram atividade ótima a 30°C, porém o aumento da temperatura de incubação do extrato enzimático bruto afetou significativamente a estabilidade enzimática e não foram muito produzidas durante o processo.

As proteases apresentaram termoestabilidade com o aumento da temperatura, porém sua produção foi baixa.

6 Referências

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SALVA, J.; CHIU, Y.Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B.S.; BHAVYA, D.; PURVI, J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B.S.; VARALAKSHMI, K.N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. *Afr. J. Biotechnol.* v.6, n.5. p. 576-581. 2007.

ARAÚJO, L.F.; SILVA, F.L.H; BRITO, E.A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S.; SANTOS, E.S. Enriquecimento protéico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 60, n. 2, 2008.

ASSIS, M.M.M.; LANNES, S.C.S.; TADINI, C.C.; TELIS, V.R.N.; TELIS-ROMERO, J. Influence of temperature and concentration on thermophysical properties of yellow mombin (*Spondias mombin*, L.). *Eur Food Res Technol*, v. 223, ed. 5, p. 585-593, 2006.

AZIZI, M.; HEMMAT, J.; SEIFATI, S. M.; TORKTAZ, I.; KARIMI, S. Characterization of a thermostable endoglucanase produced by *Isophtericola variabilis* sp.IDAH9. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 1225-1234, 2015.

BARRIOS-GONZÁLES, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry.* v. 47, p. 175-185, 2012.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* New York, v. 72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BUGAY, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização. 2009. 82f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química. Curitiba/PR.

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

COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS. Banco de Dados. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/>>. Acesso em: 01 junho 2016.

CORREIA, R.T.P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source and industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, v. 42, ed. 8, p. 1191-1199, 2007.

DE MARCO, E.G. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. 2012. 97f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

FRANCHETTI, S.M.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

GIONGO, J.L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 2006. 95f. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

HOURDET, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides—III: Molecular size of heterogeneous pectin chains. Calibration and application of SEC to pectin analysis *Carbohydr. Polym.*, 16, p. 409, 1991.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3d. São Paulo, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4d. São Paulo, 2005.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. Banco de Dados. Disponível em: <<http://www.itis.gov/>>. Acesso em: 01 junho 2016.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

LADEIRA, S.A.; ANDRADE, M.V.V.; DELATORRE, A.B.; PEREZ, V.H.; MARTINS, M.L.L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Quim. Nova*, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

MACEDO, A.D.B.; SOUSA, A.P.M.; OLIVEIRA, J.A.M.; MATTOS, M.A.; SANTANA, R.A.C.; CAMPOS, A.R.N. Bioconversão da palma forrageira e do sisal como alternativa para a alimentação animal. *Blucher Chemistry Proceedings*. v. 3, n. 1, 2015.

MAHMOOD, R.T.; ASAD, M.J.; MEHBOOD, N.; MUSHTAQ, M.; GULFRAZ, M.; ASGHER, M.; MINHAS, N.M.; HADRI, S.H. Production, purification, and characterization of exoglucanase by *Aspergillus fumigates*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 170, p. 895-908, 2013.

MARTINS, E. Purificação e caracterização bioquímica de poligalcturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido. 2006. 108f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.

MATTIETTO, R.A.; LOPES, A.S.; MENEZES, H.C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. *Brazilian Journal of food technology*, v. 13, n. 3, p. 156-164, 2010.

MORAIS, J.P.S.; ROSA, M.F.; MARCONCINI, J.M. Procedimentos para análise lignocelulósica. *Embrapa algodão*. 54p, 2010.

MONTEIRO, V.N.; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MUKESH KUMAR, D.J.; SARANYA, G.M.; SURESH, K.; ANDAL PRIYADHARSHINI, D.; RAJAKUMAR, R.; KALAICHELVAN, P.T. Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*, v. 2, p. 369-375, 2012.

NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, p. 91-96, 2004.

OLIVEIRA JÚNIOR, S.D. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

PADILHA, I.Q.M.; CARVALHO, L.C.T.; DIAS, P.V.S.; GRISI, T.C.S.L.; HONORATO DA SILVA, F.L.; SANTOS, S.F.M.; ARAÚJO, D.A.M. Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulose synthesized by *Bacillus* sp. Growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 32, n. 01, p. 35-42, 2015.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PINHEIRO, E.R. Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*): Otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química. 2007. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

PINTO, G.A.S.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A.M.R.; FRAGA, S.L.P.; TEIXEIRA, R.B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. *Embrapa Agroindústria Tropical*, p. 1-5, 2005.

PREMALATHA, N.; GOPAL, N.O.; JOSE, P.A.; ANANDHAM, R.; KWON, S-W. Optimization of cellulase production by *Enhydrobacter* sp. ACCA2 and its application in biomass saccharification. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. 1046, p. 1-11, 2015.

REKHA, V.P.B.; MRINMOY GHOSH; VIJAYANAND ADAPA; SUNG-JONG OH; PULICHERLA, K.K.; SAMBASIVA RAO, K.R.S. Optimization of Polygalacturonase Production from a Newly Isolated *Thalassospira frigidophilosprofundus* to Use in Pectin Hydrolysis: Statistical Approach. *Biomed Res Int*. v. 2013, p. 1-12, 2013.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W.O.B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Caderno pedagógico*, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SANTOS-SEREJO, J.A.; DANTAS, J.L.L.; SAMPAIO, C.V.; COELHO, Y.S. Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. *Embrapa Informação Tecnológica*. p. 85-105, 2009.

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S.S.; SONI, R.; SONI, S.K. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13- 18, 2009.

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

SOUZA, F.X.; LIMA, R.N. Enraizamento de estacas de diferentes matrizes de cajazeira tratadas com ácido indolbutírico. *Revista Ciência Agronômica*, v. 36, n. 2, p. 189-194, 2005.

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

VIJAYARAGHAVAN, P.; ARUN, A.; AL-DHABI, N.A.; VICENT, S.G.P.; ARASU, M.V.; CHOI, K.C. Novel *Bacillus subtilis* IND19 cell factory for the simultaneous production of carboxy methyl cellulose and protease using cow dung substrate in solid-substrate fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, v. 9, n.73, p. 1-13, 2016.

VORAGEN, A.G.J.; COENEN, G.-J.; VERHOEF, R.P.; SCHOLS, H.A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem*, 20, p. 263-275, 2009.