

PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PELO *Aspergillus niger* van Tieghem, 1867 ISOLADO DE CASCAS DE CEBOLA EM ÁGAR.

PRODUCTION OF PECTINOLYTIC ENZYMES BY Aspergillus niger van Tieghem, 1867 ISOLATED FROM ONION PEELS ON AGAR.

¹Érica Lima Xavier, ¹Ruan Vítor Santos Silva, ¹Mirla Borghi, ¹Grazielle de Jesus Mendes*

¹Unesulbahia, Faculdades Integradas (UNECE). Rod. 367, 3º andar, Eunápolis/BA, CEP 45820-000. ericalima.xavier14@gmail.com

RESUMO

Este estudo explorou a viabilidade de utilizar cebolas contaminadas como fonte para isolar o microrganismo *Aspergillus niger* e, cascas de maçã trituradas como substrato para a produção de enzimas pectinolíticas, por meio de fermentação semi-sólida. Após a coleta e identificação do microrganismo, foram realizados sucessivos repiques para isolar exclusivamente *Aspergillus niger*, confirmado por análise microscópica. A fermentação em cascas de maçã resultou na produção eficiente de pectinases ao longo de três semanas, evidenciada pela transformação gradual das cascas e pela formação de um líquido fermentado. A separação do substrato por centrifugação permitiu a concentração das enzimas produzidas. A atividade pectinolítica foi avaliada pela formação de halos claros em placas de ágar pectina, demonstrando a capacidade do *Aspergillus niger* de produzir pectinases eficazes na degradação da pectina. A análise revelou uma relação significativa entre os diâmetros da placa, do aglomerado e do halo, indicando uma alta eficácia das pectinases produzidas. Além disso, a utilização de resíduos agroindustriais, como cascas de maçã, como substratos promoveu a valorização desses subprodutos e contribuiu para uma produção mais sustentável de enzimas pectinolíticas. Este estudo contribuiu ao demonstrar a viabilidade do uso de *Aspergillus niger* e resíduos agroindustriais para a produção de pectinases, destacando sua relevância para aplicações biotecnológicas e processos industriais.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação semi-sólida, Substratos naturais, Biotecnologia agrícola.

ABSTRACT

This study explored the feasibility of using contaminated onions as a source to isolate the microorganism *Aspergillus niger* and, crushed apple peels as a substrate for the production of pectinolytic enzymes, by semi-solid fermentation. After collection and identification of the microorganism, successive subcultures were performed to isolate exclusively *Aspergillus niger*, confirmed by microscopic

analysis. Fermentation in apple peels resulted in efficient production of pectinases over three weeks, evidenced by the gradual transformation of the peels and the formation of a fermented liquid. Separation of the substrate by centrifugation allowed the concentration of the enzymes produced. Pectinolytic activity was assessed by the formation of clear halos on pectin agar plates, demonstrating the ability of *Aspergillus niger* to produce pectinases effective in degrading pectin. The analysis revealed a significant relationship between the diameters of the plate, cluster and halo, indicating a high efficacy of the pectinases produced. Furthermore, the use of agro-industrial waste, such as apple peels, as substrates promoted the valorization of these by-products and contributed to a more sustainable production of pectinolytic enzymes. This study contributed by demonstrating the feasibility of using *Aspergillus niger* and agro-industrial waste for the production of pectinases, highlighting their relevance for biotechnological applications and industrial processes.

KEYWORD: Semi-solid fermentation, Natural substrates, Agricultural biotechnology.

INTRODUÇÃO

As pectinases constituem um conjunto de enzimas que desempenham a função de degradar as substâncias pécticas, catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas presentes ao longo da cadeia carbônica dessas moléculas¹. Este grupo de enzimas compreende tanto aquelas com atividade despolimerizante quanto desesterificante, sendo produzidas por uma variedade de organismos, tais como plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras².

As aplicações industriais das pectinases são vastas e abrangem diversos setores, com destaque significativo na indústria de alimentos³. Essas enzimas desempenham papéis cruciais em processos como o amadurecimento de frutas, a clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, o tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, a extração de polpa de tomate, a fermentação de chá e chocolate, bem como no tratamento de resíduos vegetais⁴.

Além disso, as pectinases são empregadas na degomagem de fibras, desempenhando um papel fundamental nas indústrias têxtil e de papel, onde são essenciais para remover impurezas e melhorar as propriedades físicas dos materiais¹. Também são utilizadas na nutrição animal, contribuindo para a digestão eficiente de alimentos e no enriquecimento de alimentos infantis⁵.

Outra aplicação relevante das pectinases reside na extração de óleos, onde são empregadas para facilitar a liberação de lipídios de fontes vegetais, tornando os processos de extração mais eficientes e sustentáveis⁶.

A exploração biotecnológica das pectinases requer fontes eficientes e sustentáveis de produção dessas enzimas. Nesse contexto, a contaminação natural das cebolas por *Aspergillus niger*, um fungo amplamente conhecido por sua capacidade de produzir pectinases, pode ser estrategicamente aproveitada⁷. A interação entre as cebolas e o *Aspergillus niger*, geralmente vista como prejudicial devido à depreciação comercial dos bulbos, pode ser reavaliada para fins de cultivo e isolamento do fungo, visando à produção industrial de enzimas pectinases⁴.

A cebola é uma das culturas olerícolas mais relevantes economicamente no Brasil, ocupando o terceiro lugar em volume de produção e em geração de renda, superada apenas pela batata e pelo tomate. Seu cultivo se estende por diversas regiões do país, incluindo Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, representando a principal atividade econômica para aproximadamente 60,5 mil famílias. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a safra de cebola de 2015 alcançou a impressionante marca de 1.422.117 toneladas⁸.

Entretanto, a produção de cebolas enfrenta diversos desafios, entre os quais se destaca a ameaça representada por doenças, sendo uma das mais significativas o Mofo-Preto, também conhecido como Carvão do Bulbo ou Falso-Carvão, cujo agente causal é o fungo *Aspergillus niger*⁹. Este patógeno, responsável por danos pós-colheita, é uma das principais causas da depreciação comercial dos bulbos de cebola no Brasil, muitas vezes resultando na comercialização dos mesmos sem película de proteção, devido ao escurecimento provocado pelo fungo⁹.

O gênero *Aspergillus*, descrito pela primeira vez no ano de 729 pelo Padre Florentino e pelo micologista Pietro Antonio Micheli, compreende uma variedade de fungos que se reproduzem exclusivamente de forma assexuada. Tais fungos, de relevância econômica significativa, encontram-se amplamente distribuídos e são utilizados em diversos processos industriais, principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica¹⁰.

As características peculiares do *Aspergillus niger*, em particular, incluem sua preferência por ambientes de baixa umidade, sendo capaz de crescer em condições de baixo potencial hídrico, o que o torna um dos primeiros colonizadores em grãos e sementes com teor reduzido de água⁹.

Em síntese, a compreensão das interações entre a cebola e o fungo *Aspergillus niger* reveste-se de importância fundamental para explorar estrategicamente a contaminação natural da cebola por esse fungo¹¹. Tal abordagem visa não apenas mitigar potenciais perdas econômicas decorrentes da infestação, mas também explorar ativamente essa interação para fins benéficos, especificamente no cultivo e isolamento controlado do *Aspergillus niger* visando à produção de enzimas pectinases¹².

Ao compreendermos melhor os mecanismos subjacentes à relação entre a cebola e o *Aspergillus niger*, podemos direcionar esforços para otimizar condições de cultivo que favoreçam a proliferação controlada desse fungo e, conseqüentemente, a produção das enzimas pectinases¹³.

Portanto, ao invés de simplesmente combatê-lo como um patógeno, podemos explorar o potencial do *Aspergillus niger* presente na cebola como uma fonte viável para a obtenção de enzimas pectinases, agregando valor à cadeia produtiva da cebola e contribuindo para a oferta de produtos enzimáticos de alta qualidade e aplicabilidade em diversos setores industriais, incluindo alimentos, têxtil, papel e outros¹⁴.

Este estudo investigou a produção de pectinases pelo *Aspergillus niger* isolado de cascas de cebolas, empregando o método de teste em ágar pectina para avaliar a capacidade do fungo em degradar substâncias pecticas presentes no meio de cultivo. Através da observação da formação de halos de degradação em placas de ágar pectina, buscamos confirmar a atividade pectinolítica do *Aspergillus niger* isolado, demonstrando a viabilidade do uso de cebolas como substrato para o cultivo e produção dessas enzimas.

METODOLOGIA

As amostras de fungos foram coletadas a partir de cascas de cebolas adquiridas em um supermercado local. Essas amostras foram inoculadas em meio de cultura de ágar sangue por 4 dias a 35,7 °C. Após o período de incubação, as colônias formadas foram examinadas, sendo selecionadas aquelas com características morfológicas compatíveis com *Aspergillus niger* para posterior isolamento.

As colônias selecionadas foram transferidas para novas placas de ágar sangue em quatro repiques sucessivos, visando isolar exclusivamente *Aspergillus niger*. A confirmação do gênero e a identificação do isolado fúngico ao nível de espécie foram realizadas por meio da análise de características macroscópicas, como o diâmetro, cor e textura da colônia, bem como a presença ou ausência de rebordo, zonação e rugosidade, juntamente com características microscópicas, como hifas, conídios e esporos. Essa identificação foi comparada com literaturas especializadas, conforme descrito por Martins et al. (2013) em estudos anteriores sobre fungos em materiais de bibliotecas e acervos¹⁵.

Finalmente, as colônias isoladas foram submetidas à análise microscópica para confirmar a presença das características morfológicas típicas de *Aspergillus niger*, assegurando a correta identificação do fungo desejado.

Para a realização da fermentação em meio semi-sólido, conforme a metodologia adaptada descrita por Costa et al. (2021) foram empregadas cascas de maçã trituradas como substrato em um recipiente Erlenmeyer⁴. Amostras do fungo *Aspergillus niger*, previamente cultivado em meio de ágar sangue, foram inoculadas nas cascas de maçã. Este procedimento foi conduzido com o objetivo de promover o crescimento do fungo e induzir a produção de pectinase por meio de uma fermentação natural. Os recipientes Erlenmeyer contendo as cascas de maçã e as amostras de *Aspergillus niger* foram mantidos em condições ambientais apropriadas para o crescimento por um período de três semanas. Durante este intervalo, a fermentação ocorreu de maneira controlada, favorecendo a

multiplicação do fungo e a subsequente produção da enzima pectinase, essencial para a degradação da pectina presente nas cascas de maçã.

Após o intervalo de fermentação o sobrenadante, que continha as enzimas produzidas durante a fermentação, foi separado por meio de centrifugação, resultando na concentração das atividades enzimáticas associadas aos fungos¹⁶.

Foi realizada a partir da metodologia usada por Uenojo e Pastore (2007), a preparação do meio de cultivo ágar pectina, a partir do ágar Sabouraud Dextrose suplementado com 2% de pectina cítrica, para conduzir testes de avaliação da produção de pectinases¹⁷.

A detecção da atividade pectinolítica foi realizada pela observação da formação de halos ao redor das colônias, indicativos do consumo de pectina presente no meio de cultura. Para facilitar a visualização dos halos, foi utilizada uma solução de Iodo 2%, proporcionando uma identificação mais precisa das áreas onde ocorreu a degradação da pectina¹⁸.

RESULTADOS

O microrganismo foi selecionado a partir de cebolas contaminadas pelo fungo, adquiridas em um mercado local. A Figura 1 ilustra o crescimento dos microrganismos inoculados em placa de Petri.



Figura 1. Microrganismos isolados de cascas de cebola, cultivados em meio de ágar sangue por 4 dias a 35,7 °C. Imagem com resolução de 220 DPI.

Utilizando o método de estriamento em placa para captação dos esporos do microrganismo, foram realizados sucessivos repiques, como mostrado na Figura 2 e 3 permitindo isolar exclusivamente o *Aspergillus niger*. Dentre as 4 placas ilustradas, foi selecionada apenas a Figura 3 para ser analisada através de microscópios com corante de azul de metileno.

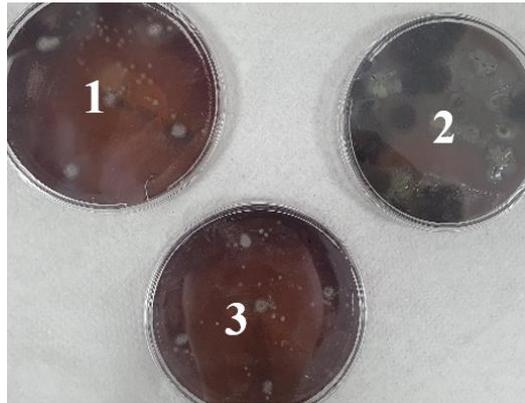


Figura 2. Microrganismos isolados de amostras da cultura apresentada na Figura 1, cultivados em meio de ágar sangue por 4 dias a 35,7 °C, visando o isolamento de colônias de *Aspergillus niger*. Imagem com resolução de 220 DPI.

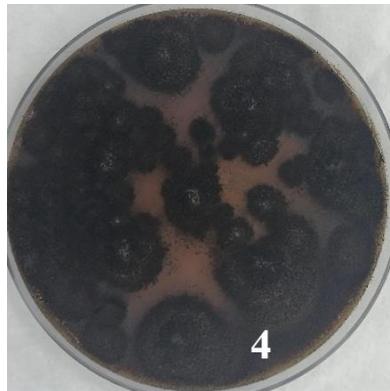


Figura 3. Isolamento do *Aspergillus niger* a partir da colônia 2 da Figura 2, com características macroscópicas típicas, selecionada para análise microscópica de aumento após cultivo em ágar sangue por 4 dias a 35,7 °C. Imagem com resolução de 220 DPI.

Os resultados observados nas análises das lâminas, apresentados na Figura 4 e 5, revelam características típicas do *Aspergillus niger*, incluindo células conidiogênicas, hifas, conídios e conidióforos, conforme descrito na literatura especializada para a identificação deste fungo. Após a identificação dos

microrganismos, estes foram transferidos para Erlenmeyers contendo cascas de maçãs, dando início ao processo de fermentação em estado semi-sólido.

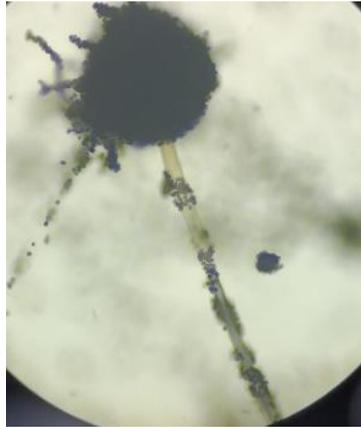


Figura 4. *Aspergillus niger* visualizado com objetiva de 40x, apresentando características microscópicas típicas, como conídios esféricos ou elipsoidais dispostos em cadeias e hifas septadas. Imagem com resolução de 220 DPI.

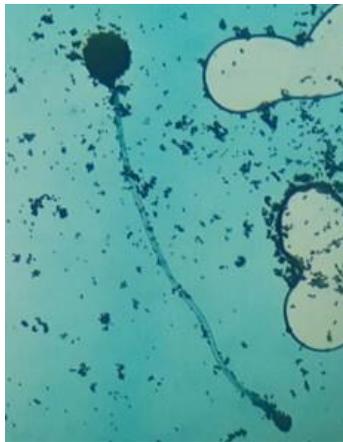


Figura 5. *Aspergillus niger* corado com azul de metileno visualizado com objetiva de 10x. Imagem com resolução de 200 DPI.

A fermentação em estado semi-sólido foi conduzida utilizando 68,5 g de cascas de maçã trituradas. As cascas trituradas, combinadas ao inóculo de *Aspergillus niger* correspondente a aproximadamente 11,8 cm² da área da placa, foram acondicionadas em um erlenmeyer e mantidas em capela, em temperatura ambiente, em local isolado com baixa iluminação durante três semanas para estimular o processo fermentativo. Ao longo desse período, foi possível observar a degradação progressiva das cascas de maçã, evidenciada pela mudança na textura e

cor do substrato. No final das três semanas, foi obtido um líquido resultante da fermentação, indicando a eficiente degradação do material sólido pelas enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger*. Este líquido foi então coletado para análises subsequentes, com o objetivo de avaliar a concentração das enzimas pectinases e a eficiência do processo fermentativo.

O substrato obtido após a fermentação foi submetido a um processo de centrifugação inicial a 4000 rpm durante 30 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido resultante foi centrifugado novamente por mais 10 minutos. O aglomerado que permaneceu após a segunda centrifugação foi então aplicado em placas contendo ágar pectina para a realização de testes de avaliação da produção de pectinases.

Inicialmente, utilizamos o meio de cultivo ágar Sabouraud Dextrose como base e o suplementamos com pectina cítrica. Essa abordagem foi selecionada visando realizar testes direcionados à avaliação da produção de pectinases. A Figura 6 proporciona uma visualização da placa de ágar pectina preparada, destacando as características essenciais deste meio de cultivo específico.



Figura 6. Meio de cultura ágar pectina preparado. Imagem com resolução de 220 DPI.

A atividade pectinolítica foi determinada pela formação de halos em placas de ágar pectina. Após a aplicação da mistura contendo cascas de maçã trituradas, *Aspergillus niger* e enzimas na placa, halos claros foram observados ao redor da área de aplicação, indicando a degradação da pectina presente no meio de cultivo.

Para análise os diâmetros das placas, dos aglomerados e dos halos foram medidos com auxílio de uma régua. As três placas de ágar pectina possuíam diâmetros de 55 mm, o aglomerado de cascas de maçã com *Aspergillus niger* e enzimas apresentaram um diâmetro de 7 mm nas três amostras, enquanto os halos de degradação ao redor do aglomerado atingiram diâmetros de 25 mm após 48h, 38 mm após um período de 72h e 47 mm após 96h. Esses halos são evidenciados nas Figuras 7, 8 e 9, corroborando os resultados obtidos.



Figura 7. Formação de halo devido à degradação da pectina cultivada em ágar pectina por 96h a 35,7 °C. Imagem com resolução de 220 DPI.



Figura 8. Diâmetro do halo medido após a aplicação de solução de iodo a 2%, conforme descrito por Silva et al. (2020)¹⁸.

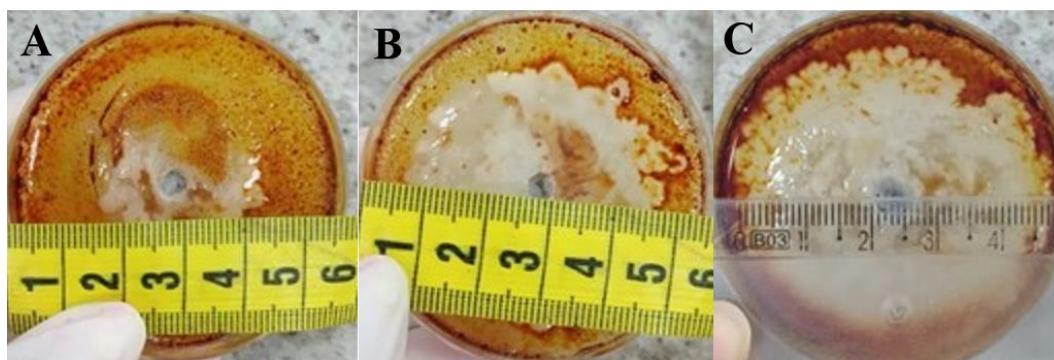


Figura 9. Presença de halos de A: 25 mm, B: 38 mm e C: 47 mm. Imagem com resolução de 220 DPI.

DISCUSSÃO

O uso de cebolas como substrato para o isolamento e cultivo de *Aspergillus niger* visando a produção de enzimas pectinolíticas apresentou resultados promissores, destacando a viabilidade dessa abordagem para aplicações biotecnológicas¹⁹. A seleção direta a partir de alimentos contaminados, como cebolas, é vantajosa por diversos motivos: a facilidade de acesso, o baixo custo e a alta probabilidade de encontrar fungos já adaptados a decompor material vegetal²⁰. As etapas de cultivo e isolamento, seguidas de análises microscópicas, garantiram a obtenção de uma cultura pura de *Aspergillus niger*, confirmada pelas características morfológicas típicas observadas nas lâminas coradas¹⁵.

A fermentação em meio semi-sólido utilizando cascas de maçã trituradas foi eficaz para a produção de pectinases. A escolha das cascas de maçã como substrato baseou-se na sua composição rica em pectina, que serve de indutor para a produção dessas enzimas pelo *Aspergillus niger*¹. O processo fermentativo, conduzido ao longo de três semanas, resultou em uma degradação significativa do substrato, evidenciada pela alteração na textura e na cor das cascas e pela formação de um líquido fermentado, indicando a atividade enzimática²¹.

O processo de centrifugação permitiu a separação eficiente do sobrenadante e a concentração do material enzimático. A formação de halos claros ao redor do aglomerado nas placas de ágar pectina foi um indicador visual direto da atividade

enzimática, demonstrando a capacidade do *Aspergillus niger* de produzir pectinases eficazes na degradação da pectina²².

A preparação do meio de cultivo ágar pectina, a partir do ágar Sabouraud Dextrose suplementado com pectina cítrica, foi essencial para os testes de atividade enzimática. Essa preparação permitiu uma avaliação precisa da atividade pectinolítica das enzimas produzidas, com as placas de ágar pectina mostrando halos de degradação ao redor do aglomerado de cascas de maçã e *Aspergillus niger*¹⁷.

A comparação dos resultados obtidos neste estudo com os de Anisa e colaboradores (2024) revela variações na formação de halos de pectina ao redor dos aglomerados de *Aspergillus niger*²³. Enquanto este estudo mostrou halos significativos após 72 horas, com diâmetros de 38 mm, Anisa e colaboradores observaram halos de 3 a 4 mm no mesmo período²³. Essas diferenças sugerem variações na atividade pectinolítica do *Aspergillus niger*, possivelmente influenciadas por diferentes condições de cultivo, composição do meio de cultura e características genéticas das linhagens utilizadas²⁴.

Os resultados obtidos neste estudo têm importantes implicações para a produção industrial de enzimas. A utilização de substratos acessíveis e de baixo custo, como cascas de maçã e cebolas contaminadas, pode reduzir significativamente os custos de produção de pectinases¹. Além disso, a eficiência da produção enzimática por *Aspergillus niger* demonstrada aqui sugere que esse método pode ser viável para aplicações industriais. As pectinases produzidas podem ser aplicadas em diversos processos industriais, como a clarificação de sucos, a extração de óleos vegetais e a melhoria da qualidade de vinhos, entre outros²⁵.

A utilização de resíduos agroindustriais, como cascas de maçã e cebolas, promove a redução de resíduos e a valorização de subprodutos, contribuindo para uma produção mais sustentável e economicamente viável²⁶. Portanto, o estudo destaca o potencial de substratos naturais na biotecnologia, incentivando futuras pesquisas e a aplicação industrial em larga escala.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam a possibilidade de que cebolas contaminadas possam servir como uma fonte para o isolamento de *Aspergillus niger* e que cascas de maçã trituradas sejam um substrato potencialmente adequado para a produção de enzimas pectinolíticas por fermentação em estado semi-sólido. As metodologias empregadas, incluindo a adaptação de técnicas para a preparação de ágar pectina e a avaliação da atividade enzimática, forneceram dados que sugerem a viabilidade do processo, embora dentro das limitações do estudo. A atividade pectinolítica observada aponta para o potencial industrial dessas enzimas, destacando a relevância de explorar substratos naturais como alternativa para a bioprospecção e produção de biocatalisadores, contribuindo para avanços sustentáveis na biotecnologia.

REFERÊNCIAS

1. Andrade ASA, Neto NJO, Dias E C, Gervásio DKL, Lima, MKL, Santos SFM, Souza ACB, Almeida AF. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. Revista saúde & ciência. 2018; 7(2). <https://doi.org/10.35572/rsc.v7i2.129>
2. Soares SS. Produção de amilases e pectinases por bactérias marinhas usando resíduos agroindustriais. Universidade federal da paraíba centro de biotecnologia departamento de biologia molecular e celular. 2021; [https://www.cbitec.ufpb.br/ccbiotec/contents/tccs/2021-1-suplementar/samuel de souza soares tcc.pdf](https://www.cbitec.ufpb.br/ccbiotec/contents/tccs/2021-1-suplementar/samuel%20de%20souza%20soares%20tcc.pdf)
3. Shrestha S, Rahman MdS, Qin, W. New insights in pectinase production development and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 2021; 105(24), 9069–9087. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
4. Costa LFF, Santos MG, Maffessoni, D. Avaliação do potencial de produção de pectinase a partir do resíduo da casca da maçã por fermentação de estado sólido / Evaluation of pectinase production potential from apple hand residue by solid state fermentation. Brazilian Journal of Development. 2021; 7(3), 27797–27811. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-472>

5. Gomes MRF, Marriel IE. Bioprospecção de actinobactérias produtoras de enzimas de interesse da biotecnologia agroindustrial. Portal Embrapa. 2019; <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212306/1/Bioprospeccao-actinobacterias.pdf>
6. Melo NET, Duarte GC, Melo DFT. Pectinases: desenvolvimento e aplicações como ferramentas biotecnológicas. Observatório de la economía latino-americana. 2023; 21(12), 25276–25297. <https://doi.org/10.55905/oelv21n12-099>
7. Trentini MMS. Purificação de Pectinases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em sistemas aquosos bifásicos e precipitação por solventes orgânicos. Doctoral dissertation, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. 2014; https://www.uricer.edu.br/site/informacao?pagina=publicacoes&id_sec=125&cod=701
8. Farias, G. (2021, June 21). Resumo Cebola - Importância econômica e social, valor nutricional, botânica - Olericultura. Passei Direto. <https://www.passeidireto.com/arquivo/94209205/resumo-cebola-importancia-economica-e-social-valor-nutricional-botanica>
9. Marcuzzo LL, Ignaczuk JT. Influência de temperaturas e de fotoperíodos na germinação in vitro de conídios de *Aspergillus niger*, agente etiológico do mofo preto da cebola. Summa phytopathol. 2019; 45(4):434–5. Available from: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/16941>
10. Abdel-Azeem AM, Abdel-Azeem MA, Abdul-Hadi SY, Darwish AG. *Aspergillus*: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. 2029; https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_4
11. Da Silva, A., Da, R., Bonfim, S., Luiz, Nascimento, A., Petrucia, & Santos De Brito Bezerra, K. (n.d.). ESTUDOS PRELIMINARES DO CULTIVO DE ASPERGILLUS NIGER COLETADO EM CEBOLAS. https://editorarealize.com.br/editora/anais/conapesc/2018/TRABALHO_EV107_MD4_SA28_ID442_27052018090716.pdf
12. Takahashi JA, Lima GS, dos Santos GF, Lyra FH, da Silva-Hughes AF, Gonçalves FAG. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. 2017; <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170141>
13. Marcuzzo LL, Ignaczuk, JT. Influência de temperaturas e de fotoperíodos na germinação in vitro de conídios de *Aspergillus niger*, agente etiológico do mofo preto da cebola. Summa Phytopathologica. 2019; 45(4), 434–435. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/169410>

14. Ishii HA. Aplicações da Pectinase na Indústria de Sucos. Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena. 2014; <https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2014/MBI14020.pdf>
15. Martins SC, Martins C. Isolamento e controle químico de fungos filamentosos de documentos e obras de arte do estado do Ceará. Enciclopedia biosfera. 2013; 9(17). Recuperado de <https://www.conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3251>
16. Campos AO. Produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* CCT2768 por fermentação em estado sólido usando fibra de coco verde (*Cocos nucifera*) pré-tratada por explosão a vapor como substrato. Repositorio.UFRN. 2022; <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/49712>
17. Uenojo M, Pastore GM. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. Quím Nova. 2007;30(2):388–94. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200028>
18. Silva LF, Oliveira LA, Souza JV, Santos J C. Produção de pectinases por *Aspergillus niger* em resíduos agroindustriais. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 2020; 24(6), 418-423.
19. Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. 3 Biotech. 2016; 6(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>
20. Sala A, Barrena, R, Artola A, Sánchez A. Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 2019; 49. 1-40. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2018.1557497>.
21. Abud AKS, Oliveira AM, Santos AG. Produção de enzimas por fermentação semi-sólida a partir de fungos isolados de resíduos da agroindústria. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Química 2016. 2016; <https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/trabalhos/producao-de-enzimas-por-fermentacao-semi-solida-a-partir-de-fungos-isolados-de-r?lang=pt-br>
22. Adedayo MR, Mohammed MT, Ajiboye AE, Abdulmumini SA. Pectinolytic activity of *aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* grown on grapefruit (*Citrus Paradisid*) peel in solid state fermentation. Global Journal of Pure and Applied Sciences. 2021 27(2), 93–105. <https://doi.org/10.4314/gjpas.v27i2.2>

23. Anisa SK, Ashwini S, Girish K. Isolation and Screening of *Aspergillus* spp. for Pectinolytic Activity. *Electronic Journal of Biology*. 2024; 9(2). <https://ejbio.imedpub.com/isolation-and-screening-of-aspergillusppfor-pectinolytic-activity.php?aid=5973#10>
24. Soares IA, Flores AC, Zanettin L, Pin HK, Mendonça MM, Barcelos RP, Trevisol LR, Carvalho RD, Schauren D, Rocha CLMSC, Baroni S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Food Sci Technol*. 2010; 30(3):700–5. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000300021>
25. Mat Jalil MT, Zakaria N A, Salikin NH, Ibrahim D. Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation. *Journal, genetic engineering & biotechnology*. 2023; 21(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00510-z>
26. Silva LAT. Reaproveitamento de resíduos agroindustriais e seu potencial benéfico à saúde. *Repositorio ifgoiano*. 2022; <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/2685>