

## ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ

Elisângela de Fátima Rezende<sup>1</sup>, Fabiana Aparecida Couto<sup>2</sup>, Daiani Maria da Silva<sup>3</sup>, Luís Roberto Batista<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Estudante de pós-graduação – Mestrado em Ciências dos Alimentos – UFLA [rezende.e@gmail.com](mailto:rezende.e@gmail.com)

<sup>2</sup> Estudante de pós-graduação – Mestrado em Microbiologia Agrícola – UFLA [fapcouto@yahoo.com.br](mailto:fapcouto@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Estudante de pós-graduação – Doutorado em Microbiologia Agrícola – UFLA [daiani0905@yahoo.com.br](mailto:daiani0905@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Professor Adjunto Universidade Federal de Lavras (DCA/Microbiologia de Alimentos) [luisrb@ufla.br](mailto:luisrb@ufla.br)

**RESUMO:** Pectinases (E.C. 3.2.1.15) é um grupo complexo de enzimas, que podem ser sintetizadas por bactérias, fungos e leveduras. A utilização de pectinases de origem fúngica aumenta progressivamente, apresentando grande destaque no setor de indústria de alimentos, agroindústria e na fermentação do cacau e café, podendo assim ser uma alternativa que minimizam ou reaproveitam os resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. Este estudo teve como objetivo avaliar semi-quantitativamente, a atividade pectinolítica de diferentes espécies fungos filamentosos isolados de grãos café de 10 cidades do Sul de Minas Gerais, 2 cidades da Zona da Mata (MG) e um do estado do Espírito Santo. 158 fungos filamentosos foram isolados, identificados e testados. Para detectar a atividade pectinolítica foi utilizado o meio de cultura rico em pectina cítrica em pH 5,0 (detecta a produção de poligalacturonase) e pH 7,0 (detecta a produção de pectato liase) e adicionou-se bromide hexadeciltrimetilamonio 1% que auxiliou a observação do halo de degradação da pectina. Do total de fungos testados apenas 11,39% apresentaram atividade pectinolítica. A maioria dos fungos produtores de pectinases foram da espécie *Penicillium brevicompactum*, 22,22% produtores de pectatoliase, 50% produtores de poligalacturonase e 27,77% produziram os dois tipos enzimáticos. *Penicillium roquefortii* também apresentou-se potencial produtor de poligalacturonase assim como *Penicillium* sp. e *Aspergillus versicolor* e *Cladosporium cladosporioides*. Já as espécies *Penicillium funiculosum*, *Penicillium aurantiogriseum* e *Aspergillus sclerotiorum* foram produtores de pectato liase. *P. brevicompactum* foi o maior produtor de pectinases com potencial biotecnológico assim como *Aspergillus versicolor* e *C. cladosporioides*.

**Palavras-chave:** Pectinases, Poligalacturonase, Pectato Liase, *Penicillium brevicompactum*.

## PECTINOLITICA ACTIVITY OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM COFFEE BEANS

**ABSTRACT:** Pectinases (EC 3.2.1.15) is a complex group of enzymes that can be synthesized by bacteria, fungi and yeasts. The use of pectinases from fungal origin increases gradually, giving emphasis in the sector of the food industry, agribusiness and the fermentation of cocoa and coffee, may well be an alternative to minimize or reuse solid waste generated in various industrial processes. This study aimed to evaluate semi-quantitatively, the activity of different species pectinolítica filamentous fungi isolated from coffee beans to 10 cities in southern Minas Gerais, 2 cities in the Zona da Mata (MG) and one of the state of Espírito Santo. 158 fungi were isolated, identified and tested. To detect the activity was used pectinolítica the culture medium rich in citrus pectin at pH 5.0 (to detect production of polygalacturonase) and pH 7.0 (to detect production of pectates lyase) and added it hexadeciltrimetilamonio bromide 1% which helped the observation of the halo of degradation of pectin. Of total fungi tested showed only 11.39% pectinolítica activity. Most producers of pectinases fungi were species of *Penicillium brevicompactum*, 22.22% of pectatoliase producers, producers of 50% and 27.77% polygalacturonase produced both enzyme types. *Penicillium roquefortii* is also presented potential producer of polygalacturonase and *Penicillium* sp. and *Aspergillus versicolor*, and *Cladosporium cladosporioides*. Have the species *Penicillium funiculosum*, *Penicillium aurantiogriseum* and *Aspergillus sclerotiorum* were producers of pectates lyase. *P. brevicompactum* was the largest producer of pectinases with biotechnological potential as *Aspergillus versicolor* and *C. cladosporioides*.

**Key-words:** Pectinases, polygalacturonase, pectates lyase, *Penicillium brevicompactum*.

## INTRODUÇÃO

As enzimas são substâncias orgânicas específicas, compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos. As enzimas pectinolíticas são produzidas principalmente por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BRAVO et al., 2000, BON et al., 2008). A utilização de bactérias, leveduras ou fungos filamentosos despertam grande interesse de estudo em virtude de inúmeras vantagens apresentadas, tais como: não necessitam de amplo espaço para seu crescimento; conseguem degradar e crescer em amplos substratos,

inclusive em resíduos industriais, os quais podem ser aproveitados desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada; possuem um crescimento rápido quando as condições são favoráveis para o seu crescimento e podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de mutantes desejados (BRAVO et al.; 2000). Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma enorme variedade de substratos, sendo excelentes decompositores de material orgânico. Além disso, as pectinases produzidas por fungos apresentam características importantes para a aplicação em bioprocessos, como estabilidade ao pH e à temperatura e, deste modo, as enzimas de origem fúngica são preferíveis em utilizações industriais (MARTIN et al., 2004). Normalmente utiliza-se preparações comerciais de pectinases de espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, por exibirem alta atividade de endopoligalacturonase e de pectinase (CARVALHO, 2007). Os fungos da Seção *Nigri* estão relacionados com processos biotecnológicos, uma das espécies de maior produção de pectinase é *Aspergillus niger* (SAMSON et al., 2006; PERRONE et al., 2007; SAMSON et al., 2007).

As enzimas pectinolíticas são responsáveis pela degradação de uma molécula complexa de pectina, que são polissacarídeos estruturais, presentes em todos os tecidos vegetais jovens. Possuem variadas aplicações biotecnológicas e são consideradas um destaque no setor industrial. Estas enzimas são utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, extração de óleos essenciais, produção de alimentos para recém-nascido, fermentação do café e cacau, além do grande destaque na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho (MALVESSI e SILVEIRA, 2004).

As pectinases (E.C. 3.2.1.15) podem ser classificadas em dois grupos de acordo com seu modo de ação: enzimas desesterificantes e despolimerizantes. As enzimas desesterificantes são denominadas pectinametilesterase (PME – E.C. 3.1.1.11). Atuam na remoção de grupos metoxílicos presentes em algumas substâncias pecticas, hidrolisando somente os grupos adjacentes a grupamentos carboxílicos livres. Não alteram o tamanho da cadeia e convertem a pectina em pectato e liberam etanol (CELESTINO et al., 2006). As enzimas despolimerases quebram a cadeia da pectina por hidrólise ou clivagem transeliminativa. São classificadas conforme alguns aspectos, tais como: especificidade pelo substrato; posição da clivagem na cadeia pectica, atuação ao acaso (endo-enzima) ou a partir da extremidade redutora ou não redutora (exo-enzima) e mecanismo de reação de despolimerização (BAILEY e PESSA, 1990).

Os fungos capazes de produzir enzimas pectinolíticas são: *Fusarium moniliforme*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthium*, *Aspergillus japonicus* e outras espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (JAYANI et al., 2005). Apesar de existirem vários fungos produtores de pectinases, *Aspergillus niger* produz as enzimas pectinolíticas mais usadas na indústria de alimentos; pectinametilesterase, poligalacturonase e pectina liase. São classificadas como GRAS, sendo aceito na indústria de processamento de alimentos (JIA e WHEALS, 2000; GREGORIO et al., 2002).

A indústria brasileira é uma das mais importantes economias de base agrícola do mundo, onde destacam-se a produção de café, da cana-de-açúcar, da soja e a fruticultura (PANDEY et al., 2000). Nos últimos anos, maior atenção é dada à alternativas que conduzam a minimização ou ao reaproveitamento dos resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. O constante crescimento no setor agrícola, leva ao estudo de processos biotecnológicos que representam relevância social e econômica. A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos não somente proporcionam substratos alternativos, que serão convertidos em produtos de valor comercial agregado, como também ajuda a diminuir os problemas ambientais. (SOCCOL e VANDENBERRG, 2003).

As pectinases têm fundamental importância na fermentação do café. O uso de microrganismos pectinolíticos é feito para remover a camada de mucilagem dos grãos do café, das quais  $\frac{3}{4}$  consistem em substâncias pecticas. Celulases e hemicelulases presentes no preparo enzimático ajudam na digestão da mucilagem. O estágio de fermentação do processamento do café é acelerado e reduzido de 40 a 80 horas para 20 horas por tratamento enzimático (CARR, 1985).

O presente estudo teve como objetivo avaliar, semi-quantitativamente, a atividade pectinolítica de diferentes espécies fungos filamentosos isolados de grãos de café.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os 158 fungos filamentosos utilizados neste estudo foram isolados de grãos de café de 2 cidades da Zona da Mata, 10 cidades do Sul de Minas Gerais (*Coffea arabica* L.) e um do estado do Espírito Santo (*Coffea canephora*), as amostras de café foram cedidas pela Cooperativa Alto Rio Grande no município de Lavras MG.

De cada amostra, foram plaqueados em DRBC (Dicloram Rosa de Bengala Cloranfenicol), 100 grãos de café desinfetados e 100 grãos sem desinfecção conforme Samson et al (2000). Os fungos isolados foram purificados em meio de cultura padronizado MA 2% (Extrato de Malte) e mantidos em incubadora tipo BOD à 25°C durante cinco dias posteriormente, todos os isolados foram incubados em meios de cultura e temperaturas padronizados e identificados conforme Samson et al (2000), Klich (2002), Pitt e Hocking (1997) e Pitt 2000. A purificação e identificação dos fungos filamentosos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras.

Para detectar a atividade pectinolítica foi utilizado o meio de cultura descrito por Hankin et al. (1971) que contém pectina cítrica como substrato. O meio em pH 7,0 foi usado para detectar a produção de pectato liase e em pH 5,0 para avaliar a atividade de poligalacturonase. Para visualização da atividade pectinolítica adicionou-se sobre o meio de cultura uma solução de bromide hexadeciltrimetilamonio 1% (Cetrimida 1%). Este reagente precipita a pectina intacta no meio possibilitando a formação de zonas claras ao redor das colônias onde houve a degradação da pectina, dessa forma com a razão do halo para o tamanho da colônia foi possível quantificar (semi-quantitativamente) a atividade pectinolítica dos fungos analisados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A habilidade de degradar substâncias pécticas foi determinada pela produção das enzimas pectinolíticas: pectato liase e poligalacturonase em meios com pH ótimo para cada enzima, sendo pH 7 e pH 5 respectivamente. A atividade enzimática foi detectada pela formação de um halo claro em torno da colônia visualizado com a adição do reagente cetrimida 1%, como demonstrado nas Figuras 1 e 2 que mostram a degradação de substâncias pécticas presentes no meio de cultura por pectato liase e poligalacturonase.

O índice de atividade enzimática é um dos parâmetros semi-quantitativos mais usados para se avaliar a produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido. Os microrganismos considerados produtores de enzimas possuem uma correlação direta entre o diâmetro do halo de degradação e a habilidade degradativa dos microrganismos (LIN et al., 1991). Para um microrganismo ser considerado um produtor de enzimas em meio sólido, a atividade enzimática deve ser  $\geq 2,0$  (LEALEM e GASHE, 1994; STAMFORD et al., 1998).

Dos 158 fungos analisados, 18 apresentaram atividade pectinolítica  $\geq 2$ . Dos isolados de *Penicillium brevicompactum* testados, 55,55% apresentaram potencial pectinolítico para as duas enzimas testadas. Os isolados de *Aspergillus versicolor* 75% apresentaram potencial para poligalacturonase. *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium* sp. apresentaram boa atividade para poligalacturonase e *Penicillium funiculosum*, *Penicillium aurantiogriseum* e *Aspergillus sclerotiorum* apresentaram atividade pectato liase igual a dois (Tabela 1). 34,17% do total de fungos analisados não apresentaram atividades pectinolíticas estão representados pelas seguintes espécies: *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. sclerotiorum*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. ostianus*, *A. niger* Agregado, *Eurotium chevalieri*. 53,79% dos fungos foram produtores de enzimas pécticas, embora nenhum deles tenha apresentado atividade superior a 2, estão representados pelas seguintes espécies: *Aspergillus niger* Agregado, *A. ochraceus*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger*, *Aspergillus* sp., *A. flavus*, *A. wentii*, *A. tubingensis*, *A. sydowii*, *A. ostianus*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. westerdijkiae*, *A. versicolor*, *A. fumigatus*, *Eurotium chevalieri*, *Penicillium* sp., *Penicillium funiculosum*, *P. hirsutum*, *P. roquefortii*.

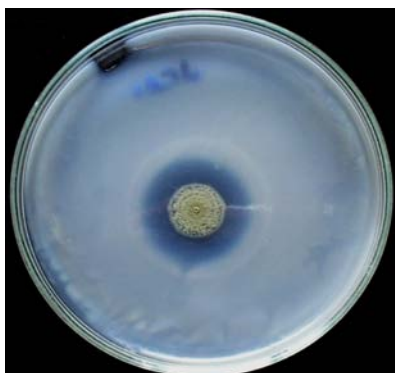


Figura 1 - *Penicillium brevicompactum* pH5



Figura 2 - *Penicillium brevicompactum* pH7

*Aspergillus niger* é um fungo filamentosos mais utilizado na indústria de alimentos, considerado um dos melhores produtores enzimáticos (TEIXEIRA et al., 2000; GREGORIO et al., 2002; SAMSON et al., 2007). No presente trabalho, foram analisados 17 isolados e nenhum deles foram produtores potenciais de pectinases, 47,05% apresentaram alguma atividade enzimática, porém não significativa e 52,94% não apresentaram atividade pectinolítica.

**Tabela 1** - Espécies de fungos produtores de Pectato liase e Poligalacturonase

Identificação	Espécie	Pectato liase	Poligalacturonase
DCA01	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2,10	3,20
DCA02	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2,20	2,90
DCA03	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2,80	2,40
DCA04	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2,00	2,50
DCA05	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2,00	2,40
DCA06	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1,50	3,60
DCA07	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1,90	2,70
DCA08	<i>Penicillium brevicompactum</i>	1,70	2,70
DCA09	<i>Penicillium brevicompactum</i>	2,60	1,80
DCA10	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,80	3,40
DCA11	<i>Aspergillus versicolor</i>	1,30	2,20
DCA12	<i>Aspergillus versicolor</i>	1,10	2,50
DCA13	<i>Aspergillus versicolor</i>	1,60	2,50
DCA14	<i>Penicillium roqueforti</i>	1,10	3,20
DCA15	<i>Penicillium</i> sp.	1,10	2,00
DCA16	<i>Penicillium funiculosum</i>	2,00	1,40
DCA17	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	2,00	1,60
DCA18	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	2,00	1,20

No atual estudo, todos os isolados de *P. brevicompactum* foram produtores de pectato liase e poligalacturonase. Pereira et al., (2002) também reportaram essa espécie de *Penicillium* como produtores de enzimas pécicas. De acordo com Varavallo et al., (2005), *Penicillium brevicompactum* apresenta um potencial para a aplicação industrial devido a sua eficiente produção de enzimas do complexo pectinólítico. *Cladosporium cladosporioides* mostrou-se grande potencial para produção de poligalacturonase (Tabela 1). A boa qualidade do café pode ter uma relação com a presença de *Cladosporium* nos frutos (PEREIRA et al., 2005; CHALFOUN et al., 2007). No trabalho realizado por Silva (2000) fungos do gênero *Cladosporium* foi registrado com maior frequência. *Cladosporium cladosporioides* caracteriza-se por ser um fungo saprófito encontrado em intensidade máxima quando os frutos estão nos estágios de cereja, mas também é possível encontrá-lo em outros estágios dos frutos (PEREIRA et al., 2005; CHALFOUN et al., 2007). Por ser um fungo de presença frequente em café, ele pode ter um grande papel biotecnológico para tratar resíduos da produção cafeeira. Sugere-se também que sejam realizadas outras pesquisas visando o uso de *P. brevicompactum* para processos biotecnológicos, principalmente para a degradação da pectina nos resíduos da agroindústria do café (despolpado e desmucilado), já que este é um microrganismo presente no ambiente em grande quantidade.

## CONCLUSÕES

A microbiota estudada apresentou várias espécies de fungos com atividade enzimática, sendo a maioria pertencente ao gênero *Penicillium*. O maior produtor de pectinases foi *Penicillium brevicompactum*. Este resultado confirma o potencial biotecnológico para futuros estudos visando utilização desse fungo filamentosos da indústria de alimentos e agroindústria, assim como o *Cladosporium cladosporioides* que são registrados com frequência em frutos de café.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo teve o apoio financeiro da FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, M. J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 12, n. 4, p. 266-271, 1990.
- BOM, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**. Editora Interciência. Rio de Janeiro RJ, 2008. 506p.
- BRAVO, C.E.C.; CARVALHO, E.P.; SCHWAN, R.F.; GÓMEZ, R.J.H.C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotecnológica**, v.24, p. 137-152, 2000.

- CARR, J.G. Tea, coffe and cocoa. **Microbiology of Fermentes Foods**. Editora Elsevier science ltd, London, v.2, p. 133-154, 1985.
- CARVALHO, S. **Pectinases produzidas pelo agente biológico "G088": extração e purificação**. 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CELESTINO, S. M. C. et al., Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 33-42, 2006.
- CHALFOUN, S.M.; CUNHA, R.L.; CARVALHO, V.L.; NOGUEIRA, D.A. Selectivity of cupric and systemic fungicides on *Cladosporium cladosporioides* in coffee plants. **Summa phytopathol.** v.33, n.1, 2007.
- FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O.; VRINES,R.; MEIJER,M.; HOUBRAKEN, J.; CABAÑES, F.J; EHRICH,K.; SAMSON, R.A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 31-37, 2007.
- GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA,N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; CURTO, R.B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresouce Technology**. V.83, p.89-94,2002.
- GUIMARÃES, L.H.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; ZANOELO, F.F.; AQUINO, A.C.M.M.; JUNIOR, A.B.; POLIZELI, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian J. Microbiol.** v.37, n.4, 2006.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1971.
- JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.40, p.2931-2944, 2005.
- KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus species**. Centraalbureau voor Schimmelculture. The Netherlands. 2002.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **J. Appl. Bacteriol.**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.
- JIA, J. H.; WHEALS, A. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. **Current Genetics**, v. 38, n. 5, p.264-270, 2000.
- LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechnol. tech.**, v. 5, n. 5, p. 275-280, 1991.
- MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition an pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v. 47, n. 5, p. 693-702, 2004.
- MARTIN, N. et al, Pectinase production by fungal strains in solid-state fermetation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n.5, p. 813-819, 2004.
- PANDEY, C.R.; SOCCOL,P.; NIGAM,V.T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. **Bioresource Technology**, v.74, p. 69-80, 2000.
- PEREIRA, J.F.; QUEIROZ, M.V.; GOMES, E.A.; MURO-ABAD, J.I.; ARAÚJO, E.F. Molecular characterization and evaluation of pectinase and cellulase production of *Penicillium* spp. **Biotechnol. Lett.**, 24, 831-838, 2002.
- PEREIRA, R.T.G.; PFENNING, L.H.; CASTRO, H.A. Characterization and dynamic of colonization of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries in coffee fruits (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**. v.29, n.6, 2005.
- PERRONE,G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRlich,J.; VARGA, J.C.; FRISVAD, M.; MEIJER, A.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Micology**, v 59, p. 53-66, 2007.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food Spoilage**. 2. ed. Cambridge: Chapman & Hall, 1997. 593 p
- PITT, J. I. **A laboratory guide to common Penicillium species**. North Ryde: CSIRO; 2000. 197p.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD., J. C. e FILTENBORG, O. **Introdution to food-borne Fungi**, 4a edição, Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft.2000.
- SAMSON, R.A.; HONG, S.B. FRISVAD, J.V. Old end new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, v 44, p. 133-148, 2006.
- SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. **Studies in Mycology**, v 59, p. 129-145, 2007.
- SILVA, F. S. **Diversidade microbiana em grãos de (Coffea arabica L.) processados por via seca nas pré e pós-colheita**. 2000. 105 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- SOCCOL,C.R.; VANDENBERGHE,L.P.S. Ocerview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.
- TEIXEIRA, M.F.S.; FILHO, J.L.L.; DURAN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, p. 286-290, 2000.

VARAVALLO, M. A.; QUEIROZ, M.V.; PEREIRA, J.F.; RIBEIRO, R.A.; SOARES, M.A.; RIBEIRO, J.B.; ARAÚJO, E.F. Development of a transformation system for *Penicillium brevicompactum* based on the *Fusarium oxysporum* nitrate reductase gene. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.36, n.2, 2005.