

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ELINE DE SOUZA PONTES ANDRADE

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E CELULASES FÚNGICAS A PARTIR
DO ENGAÇO DE UVA**

JOÃO PESSOA – PB – 2022

ELINE DE SOUZA PONTES ANDRADE

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E CELULASES FÚNGICAS A PARTIR DO ENGAÇO
DE UVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do Título de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Dr^a. Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA - PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A553p Andrade, Eline de Souza Pontes.

Produção de proteases e celulasas fúngicas a partir do engaço de uva / Eline de Souza Pontes Andrade. - João Pessoa, 2022.
49 f. : il.

Orientação: Andréa Farias de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Engaço de uva - Aproveitamento. 2. Resíduo agroindustrial. 3. Processo sólido. 4. Enzimas fúngicas. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 663.26(043)

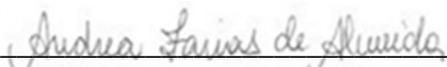
ELINE DE SOUZA PONTES ANDRADE

**PRODUÇÃO DE PROTEASES E CELULASES FÚNGICAS A PARTIR DO ENGAÇO
DE UVA**

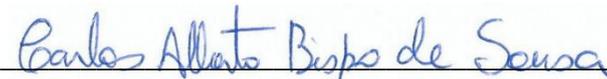
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 30 de março de 2022.

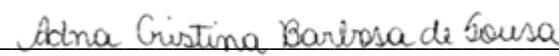
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida – DB/CBiotec/UFPB
(Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa – DEQ/CT/UFPB
(Examinador Interno)



Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa – DBCM/CBiotec/UFPB
(Examinadora Externa)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por existir e fazer com que esse sonho se concretizasse.

A minha mãe Eliane no qual eu sou imensamente grata pelos dias cuidando dos meus filhos para eu cumprir as atividades do mestrado, meu esposo Josenildo pela compreensão e meus filhos Ana, Djorge e Esther, por serem a minha fonte de inspiração.

A Profa. Dra. Andrea Farias de Almeida, por sempre me ajudar e me incentivar a não desistir.

Aos colegas de laboratório que sempre estavam disponíveis a me ajudar e ensinar tudo sobre o laboratório, Daniel e Lucas.

A turma do mestrado do ano de 2020.1 de Engenharia Química que sempre ajudaram nas dúvidas das disciplinas no qual devemos cumprir.

A todos que fazem parte da coordenação da Pós-Graduação em Engenharia Química da UFPB.

Aos ex-colegas de trabalho que sempre me incentivaram nesse sonho, Lincon e Edson.

A todos que acreditaram que eu conseguiria, muito obrigada!

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

RESUMO

O processamento de uva para produção de vinhos gera resíduos, como: engaço, casca, semente e bagaço, que são geralmente descartados de forma inadequada. Esses resíduos podem ser utilizados pelas vinícolas como adubo orgânico ou destinados para ração animal. Contudo, nos últimos anos, têm sido considerados uma fonte barata e rica em bioativos. Dentre esses resíduos do processamento de uva, o engaço pode ser considerado uma matéria-prima interessante para processos de bioconversão industrial, uma vez que possui um alto teor de lignina, celulose e hemicelulose. Tal composição permite ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos, principalmente, na produção de enzimas microbianas. Desse modo, esse trabalho buscou empregar o engaço de uva (*Vitis labrusca*) cedido pela Empresa Sabores de Frutas Santa Maria, localizada no distrito Chã do Esquecido do município São Vicente Férrer – PE, no processo em estado sólido pela ação dos fungos *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp. NA01 para a produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas. O engaço foi preparado e caracterizado quanto à sua umidade (70%), pH (4), porosidade (0,39g/cm³), açúcares redutores (0,44g/L) e açúcares redutores totais (1,00g/L). Para produção enzimática, foi utilizado frascos erlenmeyers (125mL) com 5g de engaço de uva inoculados com uma suspensão de conídios de 1×10^7 conídios por grama de substrato sólido. A umidade foi ajustada a 70% e temperatura ambiente a $\pm 30^\circ\text{C}$. Após 10 dias de processo, do substrato cultivado foi extraído o complexo enzimático para determinação da atividade enzimática. Atividade celulolítica obtida foi de 2,11U/g para FPase, 7,48U/g para CMCase e proteolítica de 26,39 U/g a partir do isolado *Paecilomyces* sp. TP08, e para o isolado *Aspergillus* sp. NA01 foi de 11,41U/g para CMCases, 1,73 U/g para FPases e 8,17 U/g para proteases. Diante dos resultados, foi verificado o potencial da utilização do engaço de uva para produção de enzimas microbianas, principalmente enzimas celulolíticas e proteolíticas fúngicas.

Palavras-chave: Engaço de uva; Resíduo agroindustrial; Processo sólido; Enzimas fúngicas.

ABSTRACT

The processing of grapes for wine production generates residues, such as: stalk, skin, seeds and pomace, which are usually discarded improperly. These residues can be used by wineries as organic fertilizer or destined for animal feed. However, in recent years, they have been considered a cheap and rich source of bioactives. Among these residues from grape processing, stalk can be considered an interesting raw material for industrial bioconversion processes, since it has a high content of lignin, cellulose and hemicellulose. Such a composition allows it to be used as a substrate in biotechnological processes, mainly in the production of microbial enzymes. Thus, this work sought to use grape stalks (*Vitis labrusca*) provided by Empresa Sabores de Frutas Santa Maria, located in the Chã do Esquecido district of the municipality of São Vicente Férrer - PE, in the solid state process by the action of *Paecilomyces sp.* TP08 and *Aspergillus sp.* NA01 for the production of cellulolytic and proteolytic enzymes. The stalk was prepared and characterized in terms of moisture (70%), pH (4), porosity (0.39g/cm³), reducing sugars (0.44g/L) and total reducing sugars (1.00g/L). For enzymatic production, erlenmeyer flasks (125mL) with 5g of grape stalks inoculated with a conidia suspension of 1x10⁷ conidia per gram of solid substrate were used. Humidity was adjusted to 70% and room temperature to ±30°C. After 10 days of process, the enzymatic complex was extracted from the cultivated substrate to determine the enzymatic activity. Cellulolytic activity obtained was 2.11U/g for FPase, 7.48U/g for CMCase and proteolytic activity of 26.39 U/g from the isolate *Paecilomyces sp.* TP08, and for the isolate *Aspergillus sp.* NA01 was 11.41U/g for CMCases, 1.73 U/g for FPases and 8.17 U/g for proteases. In view of the results, the potential of using grape stalks for the production of microbial enzymes, mainly cellulolytic and fungal proteolytic enzymes, was verified.

Keywords: Grape stalk; Agro-industrial waste; Solid process; Fungal enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na hidrólise da celulose	20
Figura 3.2	Mecanismo de ação das endoglicanases e exoglicanases	21
Figura 3.3	Estrutura química da Protease	22
Figura 3.4	Engaço de uva <i>in natura</i>	24
Figura 3.5	Apresentação da estrutura das hifas fúngicas	26
Figura 3.6	Micrografia do fungo <i>Paecilomyces</i> sp	26
Figura 3.7	Micrografia do fungo <i>Aspergillus</i> sp	27
Figura 4.1	Engaço de uva seco	28
Figura 4.2	Preparo para extração dos conídios do <i>Paecilomyces</i> sp. TP08	32
Figura 4.3	Frasco controle do processo de produção enzimática	34
Figura 4.4	Sistema de filtração a vácuo para obtenção de extrato bruto enzimático	35
Figura 5.1	Aspecto macroscópico do substrato após 15 dias de cultivo	40
Figura 5.2	Atividade enzimática (FPase) com substrato a 3% e 70% de umidade	40
Figura 5.3	Atividade enzimática (CMCase) com substrato a 3% e 70% de umidade	41
Figura 5.4	Atividade proteolítica (proteases) com substrato a 3% e 70% de umidade	42
Figura 5.5	Aspectos macroscópicos do início do cultivo para produção enzimática a partir de <i>Paecilomyces</i> sp TP08	43
Figura 5.6	Aspectos macroscópicos após 10 dias de produção enzimática a partir de <i>Paecilomyces</i> sp TP08	44
Figura 5.7	Atividade das enzimas CMCases, FPases e proteases após 10 dias de produção enzimática a partir de <i>Paecilomyces</i> sp TP08	45
Figura 5.8	Aspectos macroscópicos do engaçó de uva do primeiro dia de cultivo com <i>Aspergillus</i> sp. NA01	46
Figura 5.9	Aspectos macroscópicos do engaçó de uva após 10 dias de cultivo <i>Aspergillus</i> sp. NA01	47
Figura 5.10	Atividade das enzimas CMCases, FPases e proteases após 10 dias de produção enzimática a partir de <i>Aspergillus</i> sp NA01	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL:.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1. ENZIMAS.....	16
3.1.1. Tecnologias utilizadas para a produção de enzimas.....	17
3.1.2 Enzimas de interesse industrial.....	19
3.1.3 Celulases.....	19
3.1.4 Proteases.....	22
3.2. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	23
3.2.1. Engaço de uva.....	24
3.3. FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	25
3.3.1. <i>Paecilomyces</i> sp.....	26
3.3.2. <i>Aspergillus</i> sp.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 COLETA E PREPARO DO SUBSTRATO.....	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ENGAÇO DE UVA.....	28
4.2.1 Percentual de umidade (%).....	29
4.2.2 Potencial hidrogeniônico (pH).....	29
4.2.3 Densidade aparente.....	29
4.2.4 Densidade real.....	29
4.2.5 Porosidade do leito.....	30
4.2.6 Teor de açúcares redutores totais.....	30
4.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	31
4.3.1. Microrganismos e inóculo.....	31
4.3.2. Cultivo para produção enzimática.....	33
4.4 Extração e caracterização do complexo enzimático.....	34
4.4.1 Obtenção do extrato enzimático bruto.....	34
4.4.2 Análises do extrato enzimático bruto.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO ENGAÇO DE UVA.....	38
5.2 - PROCESSOS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DE PAECILOMYCES SP. TP08 E ASPERGILLUS SP. NA01.....	39
5.2.1 – Experimentos iniciais com <i>Paecilomyces</i> sp. TP08.....	39

5.2.1.1 - Atividades de celulases totais (FPase) para o estudo inicial com <i>Paecilomyces</i> sp TP08	40
5.2.2 Experimentos com <i>Paecilomyces</i> sp. TP08.....	43
5.2.3 – Experimentos com <i>Aspergillus</i> sp. NA01	46
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A vitivinicultura no Brasil está em plena expansão, a produção de uvas viníferas em 2020 foi considerada a maior dos últimos anos. No Nordeste, a produção se concentra no Vale do São Francisco (Pernambuco e Bahia) que representa 13,94% da área nacional (IBGE, 2020; DE MELLO e MACHADO, 2021). O aumento de produção em áreas cultivadas dentro das regiões não tradicionais permite novas oportunidades para o mercado nacional, possibilitando também a ampliação da quantidade de vinícolas artesanais. Entretanto, existe a preocupação com a destinação dos resíduos gerados no processamento das uvas, cerca de 25% da quantidade processada se transforma em resíduos, principalmente cascas, sementes e engaço.

O processamento da uva em vinho, suco e/ou espumantes produz diversos resíduos sólidos como bagaço, sementes e engaço, além de efluentes vinícolas (os líquidos resultantes de lavagens no processo de produção). Assim, anualmente, estes resíduos contabilizam cerca de 3.000 toneladas de bagaço, 1.000 toneladas de engaço e 500 toneladas de terra filtrante (RIGHI *et al.*, 2020). A produção exclusiva de vinhos, por exemplo, gera grande volume de resíduos que ainda apresentam em sua composição fibras e compostos fenólicos (TONON *et al.*, 2018). Portanto, torna-se importante utilizá-los de maneira adequada, podendo agregando valor e/ou oferecendo-lhes uma destinação sustentável.

Dentre os resíduos do processamento da uva, o engaço da uva pode ser considerado um substrato interessante para os processos de bioconversão industrial, devido ao seu alto teor de lignina (17-18%), celulose (30-31%) e hemicelulose (21%) (CUNHA, 2018; PING *et al.*, 2011). Substratos constituídos por celulose e hemicelulose têm potencial de aplicação em processos biotecnológicos para obtenção de produtos de maior valor agregado, destacando-se produção de biocombustíveis, ácidos orgânicos, bioenergia e, principalmente, enzimas microbianas (PROZIL *et al.*, 2013).

As enzimas representam um dos produtos microbianos mais explorados na indústria biotecnológica, sendo largamente utilizadas no processamento de alimentos até a produção de produtos de limpeza, assim como na indústria têxtil até farmacêutica (MANGE, 2009). Dentre os bioprocessos empregados na produção de enzimas e no reaproveitamento de resíduos agroindustriais, a fermentação em estado sólido (FES) tem destaque, envolve o emprego de substrato sólido com umidade favorável para ao crescimento superficial de microrganismos. Assim, microrganismos terão possibilidade de produzirem enzimas capazes de hidrolisarem os constituintes destes substratos utilizados como agentes indutores (SANTOS, 2018).

Deste modo, ao considerar que a indústria do processamento de uva gera resíduos com potencial de reaproveitamento, para este trabalho foi escolhido o engaço de uva. O engaço de uva é o primeiro resíduo obtido do processamento e o que menos é reaproveitado, sendo mais amplamente descartado de maneira inadequada. Com essa motivação e poucos relatos na literatura de sua utilização e/ou reaproveitamento, e mais ainda com verificação do potencial de utilização em processos biotecnológicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas celulolíticas e proteolíticas a partir de (*Aspergillus sp* NA01 e *Paecilomyces sp*.TP08) utilizando o engaço de uva como substrato em fermentação em estado sólido.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar o potencial de produção de enzimas fúngicas (proteases e celulasas) a partir do engaçó de uva.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar o engaçó de uva quanto ao pH, umidade, porosidade, açúcares redutores totais e açúcares redutores;
- Determinar as atividades enzimáticas (CMCase, FPase e Proteolíticas) a partir do engaçó de uva utilizando *Aspergillus* sp. NA01 e a *Paecilomyces* sp. TP08.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ENZIMAS

As enzimas são moléculas que, em sua maioria de origem proteica, catalisam grande parte das reações em organismos vivos. Podendo ser de origem microbiana, vegetal ou animal são usadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES 2007). Do ponto de vista do processo biotecnológico é o segundo bioproduto mais demandado, perdendo apenas para produção de antibióticos. Microrganismos com interesse industrial relevantes, como *Bacillus licheniformis*, *Candida cylindracea*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* são potencialmente produtores de proteases, lipases e celulases, respectivamente, muito empregadas em diversos setores industriais (WEISS, 2020).

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por via biotecnológica) e às vantagens em relação aos seus similares químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, a redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades (MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007).

As enzimas microbianas são mais utilizadas por várias razões como, por exemplo: produção independente de fatores sazonais, possibilidade da utilização de substratos baratos como os resíduos agrícolas e o fato de o rendimento na produção poder ser elevado a partir da otimização das condições nos processos fermentativos por mutações ou a partir da tecnologia do DNA recombinante. Com o avanço da tecnologia, enzimas microbianas com ampla aplicação e especificidade foram desenvolvidas e novas áreas de aplicação ainda estão sendo exploradas. Microrganismos como bactérias, leveduras e fungos são amplamente utilizados em processos biotecnológicos para obtenção de enzimas de interesse industrial como, por exemplo, em diversas preparações alimentícias para melhorar o sabor e a textura e oferecem benefícios econômicos para as indústrias (MONTEIRO e SILVA, 2009)

3.1.1. Tecnologias utilizadas para a produção de enzimas

O processo fermentativo industrial consiste em três etapas principais, que são chamadas de: *upstream* (pré-tratamento da matéria-prima), que antecede as transformações bioquímicas do substrato em produto, ou seja, a fermentação propriamente dita, cuja finalidade é ter condições previamente escolhidas, para que essas transformações se desenvolvam em condições controladas; e operações de *downstream* (recuperação e purificação do produto) que ocorrem após a fermentação e englobam a separação e purificação dos produtos e subprodutos obtidos, bem como o tratamento dos efluentes e resíduos formados (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Para produção de enzimas microbianas, dois processos podem ser usados: a fermentação submersa (FSbm) e a fermentação em estado sólido (FES). A FES pode ser definida como aquela que ocorre em substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água. Entretanto, os substratos devem conter umidade e conteúdo nutricional favoráveis para que possa ocorrer o crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do microrganismo. A partir da FES vários bioprodutos podem ser gerados: biofármacos, aditivos alimentares, biocombustíveis, e as enzimas. Sendo enzimas as principais representantes devido à alta demanda industrial (RAIMBAULT, 1998; PINTO, 2005; SANTOS, 2018). Do ponto de vista de produção, a FES tem maior visibilidade por utilizar em cultivo substratos baratos, geralmente resíduos de outros processamentos, adequando-se melhor as condições naturais para o desenvolvimento de microrganismos. Ademais, assemelha-se ao habitat natural de microrganismo, podendo favorecer a produção de bioprodutos (SINGHANIA *et al.*, 2009).

A FES possui grandes desafios quanto ao controle de processo, pois o crescimento dos microrganismos é diretamente afetado por parâmetros como: pH e temperatura; que são os mais difíceis de se manterem estabilizados devido à heterogeneidade inerente ao cultivo. Para alcançar o nível de pH desejável, ao utilizar como substrato resíduos agroindustriais ou matéria-prima de biomassa, soluções-tampão podem ser empregadas usualmente durante o processo de umidificação, permitindo que o substrato atinja o nível ótimo de pH e melhor controle durante o processo (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Assim como pH, a temperatura é considerada um fator crucial para o sucesso do controle do processo. Ainda de acordo com Schmidell *et al.* (2001), a temperatura afeta diretamente a germinação de esporos, a formação de produtos, o crescimento microbiano e a esporulação. Portanto, o calor gerado pelo metabolismo microbiano precisa ser dissipado para evitar problemas no cultivo, em alguns casos, podendo provocar à desnaturação e perda de atividade enzimática devido ao excesso de

calor liberado (PANDEY, 2003). Apesar dos desafios relatados para o controle do processo, a FES pode ser mais vantajosa para obtenção de bioprodutos, pois são gerados com alta concentração quando comparados à FSbm (PANDEY *et al.*, 2000)

Na FES, o substrato utilizado deve ter algumas características peculiares para permitir um melhor rendimento do processo, tais como: porosidade, forma e tamanho da partícula. Em relação ao tamanho de partícula, quanto menor a partícula, maior a sua área superficial e, assumindo que as reações ocorrem na superfície, obtendo-se maiores taxas de conversão. Mas, é sabido que partículas menores tendem a compactar quando se utiliza biorreatores estáticos, levando promovendo dificuldades na aeração, gás e na dissipação de calor e dos gases oriundos do metabolismo microbiano, o que pode causar diminuição no rendimento do processo. Outra característica importante do substrato é a sua porosidade, que pode afetar a forma como os nutrientes são transferidos do meio para células e das células para o microrganismo meio) e o modo como as enzimas hidrolíticas podem atuar sobre a biomassa. Assim, um meio poroso pode absorver água e facilitar o transporte de enzimas e nutrientes entre substrato e microrganismos. Esta qualidade é altamente desejável em substratos, como a biomassa, que serve não apenas como suporte, mas como fonte de nutrientes que os microrganismos podem produzir enzimas necessárias para os processos de hidrólise do substrato (SCHMIDELL, 2001; PANDEY *et al.*, 2003).

Diferentes enzimas microbianas como: amilases, proteases, xilanases, celulasas e pectinases podem ser produzidas por FES. Os microrganismos que mais se adaptam a esse tipo de processo são os fungos filamentosos por apresentarem hifas e boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica. A FES apresenta vantagens como: a utilização de substratos com baixo valor agregado, adição de nutrientes suplementares ao substrato, volume do meio reduzido, menor investimento em biorreatores, os esporos dos fungos podem ser usados diretamente na inoculação, não necessitando de etapas prévias de pré-cultivo como a confecção de inóculo, o crescimento dos fungos ocorre em condições semelhantes ao seu habitat natural, a baixa atividade de água reduz problemas de contaminação, aeração por ser facilitada devido ao maior espaço entre as partículas e pela difusão do oxigênio na água para umidificar o meio, altos rendimentos na formação de metabólitos e facilidade nas etapas de purificação (ZHANG *et al.*, 2006; RODRIGUEZ e ZÚNIGA *et al.*, 2011).

3.1.2 Enzimas de interesse industrial

A demanda mundial aumentou o consumo de enzimas industriais. O Brasil, ainda hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, apesar de apresentar um uso reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado a outros países. O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). Hoje, as enzimas de uso industrial representam 60% do mercado mundial. Dentre elas se destacam o grande uso de amilases, com uma projeção de 25,4%, celulases (17,1%) e lipases (7,2%) (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Diversas enzimas podem ser utilizadas em processos industriais, ressaltando as áreas de maior uso e demanda são as indústrias: têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose, de bioenergia, representando as enzimas do tipo amilases, pectinases, celulases e proteases de modo geral. Sendo as celulases e proteases com grande aplicação em diversos setores.

3.1.3 Celulases

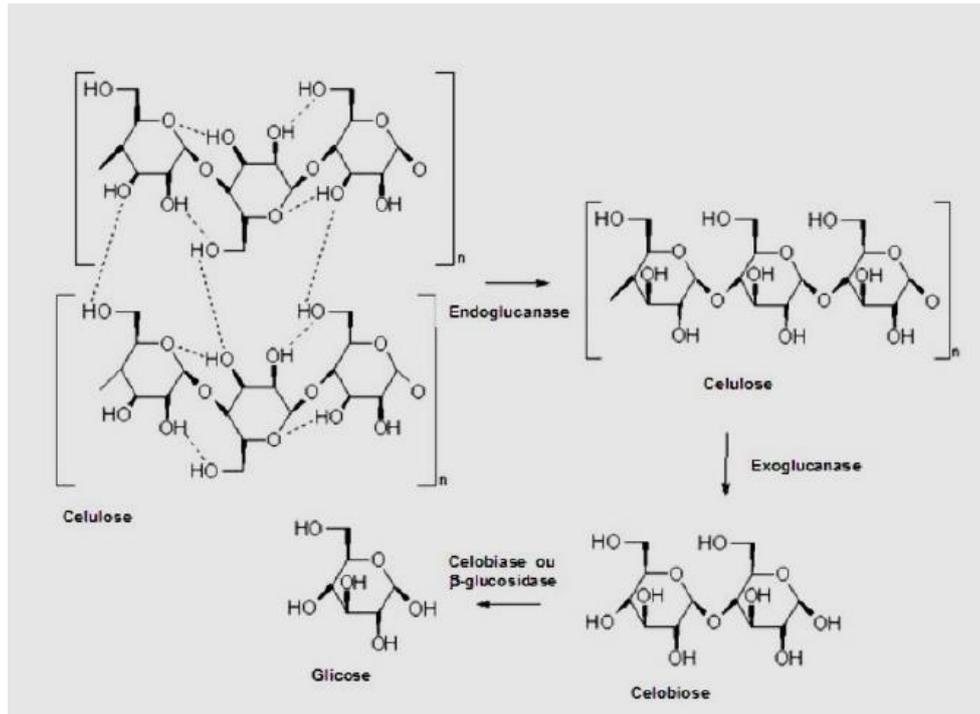
As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de promover a hidrólise de materiais celulósicos, sendo biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de glicose, que por sua vez, apresenta enorme interesse industrial (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

A hidrólise completa da celulose exige a ação de um complexo enzimático composto pelas celulases. Essas enzimas são hidrolíticas que clivam ligações glicosídicas do tipo β -1,4 entre os resíduos de glicose (LYND *et al.*, 2002). Todas as enzimas celulolíticas reconhecem as ligações, mostrando, entretanto, a seletividade em relação a diferentes sítios do substrato.

Os componentes do sistema de enzimas celulolíticas, de uma forma geral, foram classificados com base no modo de ação catalítica e nas propriedades estruturais. Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente, conforme mostra a Figura 1, e normalmente possui três grandes grupos de enzimas que têm locais específicos de atuação no substrato celulósico: endoglicanases (EnGases), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglicanases (ExGases), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (β Gases), que hidrolisam a celobiose em glicose (CASTRO e PEREIRA JR.,

2010). As endoglicanases, (1,4- β -D-glicano-4-glicanoidrolase, EC 3.2.1.4), também chamadas de carboximetilcelulases (por causa do substrato específico – carboximetilcelulose de sódio - utilizado para a sua detecção) são responsáveis por iniciarem a hidrólise, atuando nas regiões internas (estrutura amorfa) da fibra de celulose (LYND *et al.*, 2002).

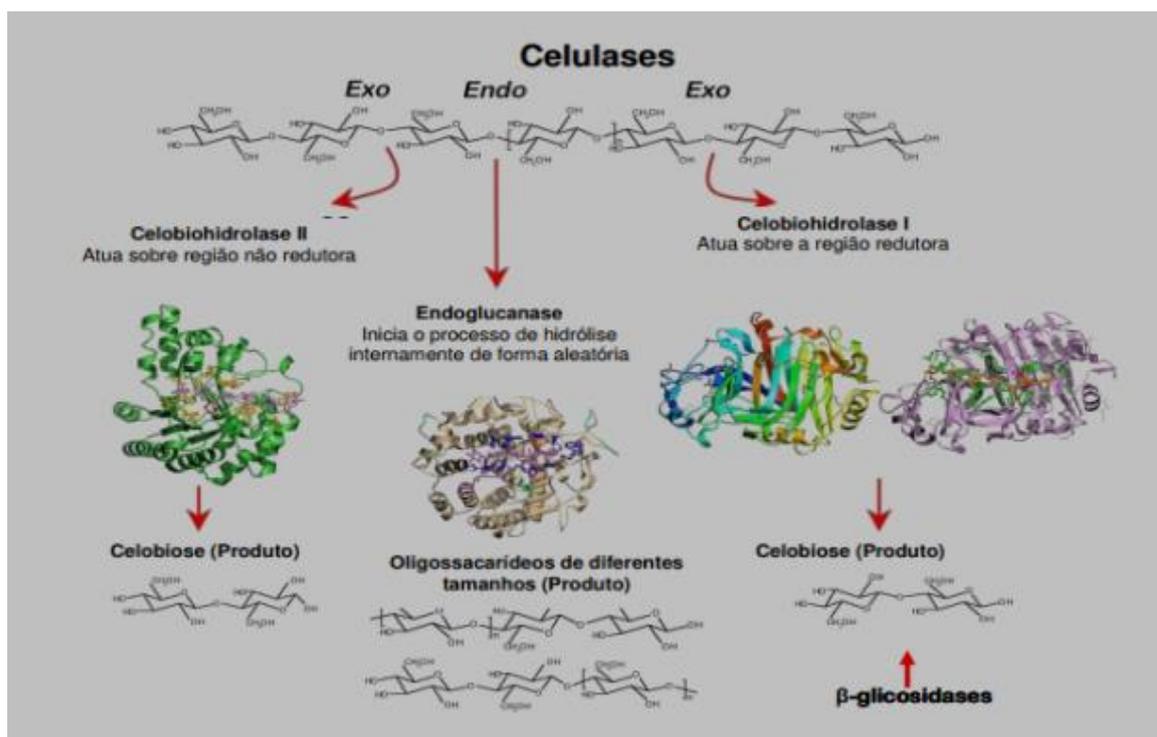
Figura 3.1 - Mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na hidrólise da celulose



Fonte: Farinas (2011)

As enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor quando atuam em conjunto, do que isoladas. Tal efeito é conhecido como sinergia. Sipos *et al.* (2010) afirmaram que três formas de sinergia são conhecidas: sinergia EnGases-ExGases, em que a endoglicanase atua nas regiões amorfas disponibilizando os terminais redutores e não redutores, onde agem as CBH I e II, respectivamente, participando de outro tipo de sinergia, a ExGases-ExGases. A celobio-hidrolase e a endoglicanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são os substratos utilizados pela β -glicosidase, formando as sinergias ExGases- β Gases e EnGases- β Gases (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Mecanismo de ação das endoglicanases e exoglicanases



Fonte: Santana (2010)

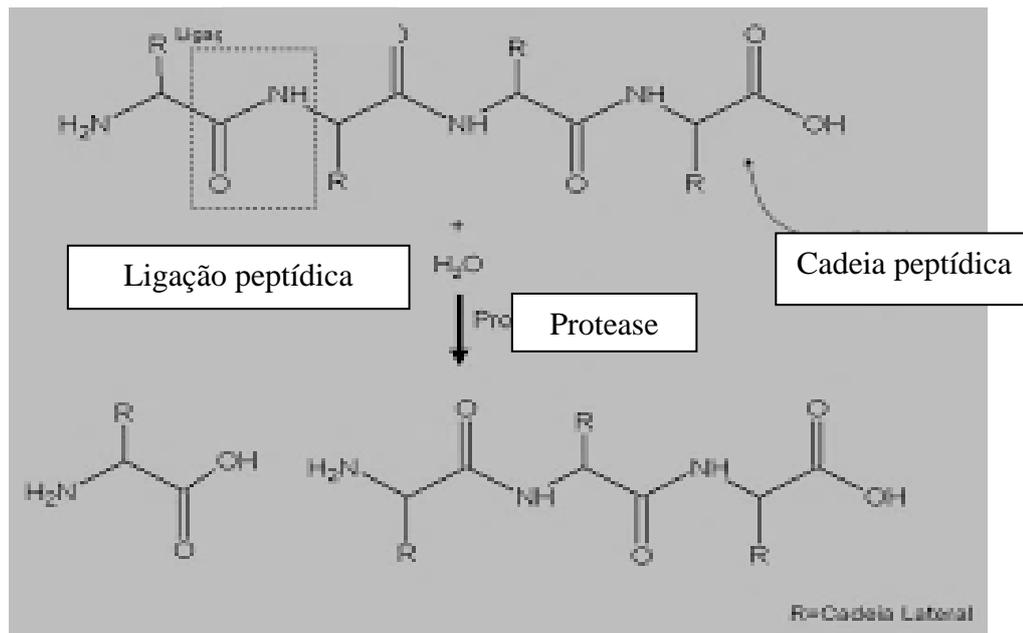
Uma diversidade de microrganismos é relatada por produzir celulasas durante o seu crescimento em substratos celulósicos. A obtenção industrial de celulasas é principalmente oriunda de fontes microbianas, em geral de bactérias e fungos. Celulasas microbianas são potencialmente utilizadas na produção de alimentos, como também em várias indústrias, como têxtil, papel e celulose, e confecção de detergentes enzimáticos. Na indústria de sucos e vinhos, por exemplo, as celulasas são aplicadas associadas a outras enzimas para aumentar desempenho e rendimento do processo, melhorando os métodos de extração, clarificação e estabilização de sucos e vinhos (RAVEENDRAN *et al.*, 2018).

Apesar de existirem várias espécies fungos que crescem e degradam a celulose, nem todos são capazes de sintetizar um sistema enzimático completo que efetivamente hidrolise materiais e que produzem enzimas em quantidade e características desejáveis, o que inclui a atividade estável em alta temperatura com atuação em ampla faixa de pH e que não sejam susceptíveis à inibição pelo produto (QIN *et al.*, 2010). Entretanto, os fungos filamentosos são os mais utilizados no processo industrial. Suas propriedades fisiológicas e bioquímicas permitem seu crescimento em substratos sólidos, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes microrganismos. Os melhores produtores encontram-se em espécies pertencentes aos gêneros: *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (SOCCOL *et al.*, 1994).

3.1.4 Proteases

As proteases representam 60% das enzimas industriais do mercado. São enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas presentes em proteínas e polipeptídeos (Figura 3.3). Podem ser classificadas com base em sua origem, atividade catalítica e natureza do grupo reativo no sítio catalítico. As principais fontes de enzimas proteases são animais, plantas e microrganismos (bacterianos e fúngicos). Estão divididas em dois grandes grupos: as exo e as endopeptidases. As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas e podem ser denominadas de aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, e as proximidades dos grupos N ou C terminais têm um efeito negativo na atividade enzimática (SILVA, 2014).

Figura 3.3 Estrutura química da Protease



Fonte: Adaptada de LIMA (2007)

Em termos de aplicação biotecnológica, as proteases microbianas possuem características mais desejadas em relação às outras fontes. As proteases são amplamente utilizadas na indústria como exemplo na fabricação de detergentes enzimáticos. Na indústria têxtil, as proteases são utilizadas no tratamento da lã, na seda crua e no couro. Na indústria alimentícia, as proteases podem ser utilizadas no cozimento industrial de biscoitos, na conversão de leite em queijo, acelerando a maturação do queijo, na modificação das proteínas do leite para reduzir as propriedades alergênicas de alguns produtos lácteos. Além disso, as

proteases auxiliam no rendimento de gordura e amaciamento de carnes (RAO *et al.*, 1998; SIM *et al.*, 2000; DAMHUS; KAASGAARD; OLSEN, 2013)

3.2. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O melhor entendimento da estrutura da biomassa e de seus constituintes é de fundamental importância para a determinação dos parâmetros dos processos para a máxima obtenção de produtos de alto valor agregado dos resíduos agroindustriais. Os principais componentes químicos dos resíduos agroindustriais são a celulose, hemicelulose e lignina, além de pequena quantidade de cinzas e extrativos. A concentração de cada um desses componentes depende do tipo de biomassa, tipo de tecido, da idade da planta, das condições de crescimento e dos processos industriais que a biomassa foi submetida (EICHLER *et al.*, 2015).

A grande dificuldade encontrada hoje na conversão dos resíduos agroindustriais em bioprodutos é devido à natureza recalcitrante dos compostos químicos da biomassa, onde as fibras de celulose são envolvidas na matriz amorfa de hemicelulose e lignina. Naturalmente, essa matriz serve contra-ataques de microrganismos, enzimas, reagentes químicos e estresses mecânicos, protegendo as plantas. Devido a essas características, o pré-tratamento da biomassa é imprescindível para os processos de biorrefinaria posteriores. Os tipos de pré-tratamentos se dividem em: físicos, com moagem, trituração e aquecimento; químicos, onde são utilizados agentes como: solventes, ácidos e bases e; biológicos, que consistem no uso de enzimas ou microrganismos que degradam os substratos lignocelulósicos pela hidrólise de ligações glicosídicas (SANTOS *et al.*, 2018).

A celulose é um dos polímeros mais abundantes no planeta, sendo observado em todas as plantas e algas como estrutura de suporte. Apesar de ser quimicamente simples, sendo composta apenas por glicoses unidas por ligações glicosídicas β -1,4, sua estrutura morfológica em plantas superiores é complexa e heterogênea. A celulose também é intimamente associada, através de ligações de hidrogênio e ligações covalente, com outros polímeros como lignina, pectina e hemiceluloses, tornando a sua morfologia ainda mais complexa (SIRÓ e PLACKETT, 2010).

3.2.1. Engaço de uva

O engaço (Figura 3.4), material lignocelulósico que compõe o cacho da uva, é obtido após o processo de desengace, etapa que ocorre logo no início do processo de beneficiamento (POSTINGHER, 2015). Tem caráter renovável e não competitivo para produtos alimentícios, devido seu baixo valor nutritivo. Podendo ser utilizado como substrato para processos biotecnológicos devido às características que lhe conferem como elevado teor de fibras, tais como lignina, celulose e hemicelulose (DEIANA *et al.*, 2009; ZANELLA, 2015). Prozil, Evtuguin e Lopes (2012) e Prozil *et al.* (2013) realizaram estudos para determinação da composição química do engaço da uva *Vitis vinifera* L., tal composição apresenta 30,3% de celulose, 21% de hemicelulose e 17,4% de lignina, além de outros componentes, como proteínas (6,1%) e taninos (15,9%).

Dentre os resíduos do processamento da uva, o engaço é o resíduo de maior quantidade em termos volumétricos, representa 30% do total, o que o torna um material de difícil armazenamento e descarte (SCHUMACHER, 2007). Além disso, é relatado por Deiana *et al.* (2009) que o acúmulo do engaço pode atrair insetos e roedores, sendo que, para evitar este problema, usualmente espalha-se este material sobre o solo da plantação. Assim, uma proporção significativa é descartada no meio ambiente, o acúmulo destes materiais no solo pode prejudicar a germinação de plantas graças à grande concentração de compostos fenólicos e taninos (POSTINGHER, 2015).

Figura 3.4 Engaço de uva *in natura*



Fonte: Jornal dos sabores (2019)

Alguns estudos sobre seu aproveitamento têm sido realizados de modo a agregar valor, mas, basicamente o engaço quando não descartado no ambiente, é utilizado como fertilizante devido à presença de potássio e alguns outros minerais, tais como sódio, cálcio e magnésio. Todavia, sua lenta biodegradabilidade e a possibilidade de alteração da composição

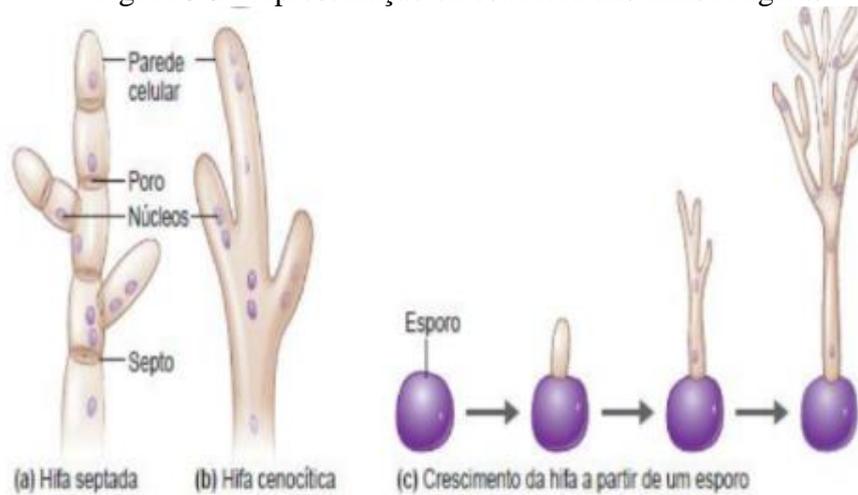
química do solo o tornam um fertilizante de baixa qualidade. Além disso, seu baixo valor nutritivo impossibilita sua utilização como alimento complementar para a indústria pecuária e seu elevado teor de umidade dificulta o emprego como combustível (DEIANA *et al.*, 2009; PROZIL, 2015).

3.3. FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Segundo Tortora *et al.* (2012), a estrutura vegetativa dos fungos é composta de células envolvidas no catabolismo e no crescimento. Nos fungos filamentosos, o talo ou o corpo consiste em filamentos (hifas) longos de células conectadas, as hifas, que por sua vez, podem crescer em imensas proporções, e na maioria dos fungos filamentosos elas contem paredes cruzadas denominados septos que fazem a divisão das hifas em unidades celulares uninucleadas que ganham o nome de hifas septadas e quando essas hifas não apresentam septos mas apresentam células longas e contínuas multinucleadas são chamadas hifas cenocíticas, conforme demonstra a Figura 3.5.

Fungos filamentosos têm sido utilizados para a produção de medicamentos e alimentos, processos fermentativos e degradação natural de resíduos ambientais há tempos. Os processos químicos associados a este uso são bem conhecidos e a importância industrial e ecológica dos fungos é inegável. Da produção de antibióticos, medicamentos que revolucionaram o estilo e a expectativa de vida humana, até a fabricação de queijos como Camembert e Roqueforti, a química e a microbiologia andaram juntas para o entendimento dos processos químicos e bioquímicos e para o aperfeiçoamento das tecnologias envolvidas. No entanto os fungos filamentosos utilizados em bioprocessos há participação de um agente biológico que esteja definido um conjunto de operações onde a matéria prima ou resíduo será tratada como meio esterilizado, e ocorra a transformação do substrato em produto em rota bioquímica. (TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Figura 3.5 - Apresentação da estrutura das hifas fúngicas



Fonte: Tortora *et al.* (2012)

3.3.1. *Paecilomyces* sp.

É um fungo filamentosso saprófita comum (Figura 3.6). Tem sido isolado numa grande variedade de habitats incluindo solos cultivados e não cultivados, florestas, pradarias, desertos, sedimentos estuarinos e em lamas de esgoto. Foi também encontrado em ovos de nematoides, e ocasionalmente em fêmeas de nematoides das galhas e quistos das raízes. Adicionalmente, é frequentemente detectado na rizosfera de muitas culturas. A espécie pode desenvolver-se num amplo intervalo de temperatura – dos 8°C aos 38°C para alguns isolados, tendo crescimento óptimo no intervalo entre os 26°C e os 30°C. Tem também uma grande tolerância ao pH e pode crescer sobre uma grande variedade de substratos.

Figura 3.6 - Micrografia do fungo *Paecilomyces* sp



Fonte: Adaptada de University Adelaide (2022)

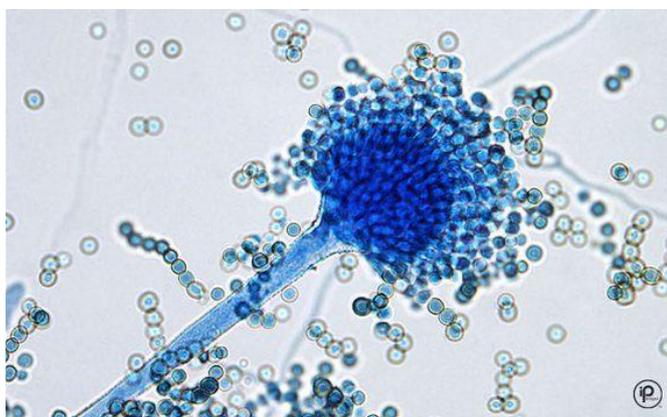
Paecilomyces é um gênero de fungos que apresentam hifas hialinas a amareladas, septadas ou lisas, conidióforos irregulares ramificados, capazes de produzir conídios hialinos unicelulares. Tais características morfológicas, bem como técnicas de identificação molecular são essenciais e importantes para a identificação das espécies fúngicas. As espécies mais isoladas em diferentes ambientes são *P. variotii*, *P. formosus* e *P. dactylethromorphus* e são potencialmente utilizadas como agentes transformadores de substratos complexos para síntese de enzimas extracelulares (HOUBRAKEN, FRISVAD e SAMSON, 2010 revisado por CABESTRÉ *et al.*, 2021).

3.3.2. *Aspergillus* sp.

Aspergillus é um gênero de fungos que apresenta coloração branca ou amarelada com formação de pedúnculos e uma ponta colorida (Figura 3.7). São importantes agentes decompositores de alimentos. As espécies descritas com base em anamorfos que anteriormente se encontravam incluídas no gênero *Eurotium* foram transferidas para este gênero. São utilizados na produção de alimentos e produção comercial de ácido cítrico, glucônico e gálico. Existem mais de 200 espécies encontradas na natureza.

As espécies de *Aspergillus* são aeróbicas e encontradas em ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem na superfície onde vivem. Contaminam restos de comidas (como pães e batatas) e crescem em muitas plantas e árvores. e fungo muito desenvolvido em pães mofados.

Figura 3.7 - Micrografia do fungo *Aspergillus* sp



Fonte: Adaptada de Azevedo e Barata (2018)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e preparo do substrato

Como substrato para o cultivo sólido, foi utilizado o engaço de uva (*Vitis labrusca*) cedido pela Empresa Sabores de Frutas Santa Maria, localizada no distrito Chã do Esquecido do município São Vicente Férrer – PE, e armazenado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos do Centro de Biotecnologia da UFPB.

Após a coleta, ocorreu a separação de qualquer casca ou polpa de uva residual. O engaço (Figura 4.1), livre dos resíduos de casca e polpa, foi higienizado com solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) e lavado em água corrente. Em seguida, após a lavagem e esterilização (121°C, 1 atm, 15 min), o engaço foi seco em estufa a 60°C durante 42h, e triturado em moinho de facas tipo Willey (SOLAB, SL-31) numa granulometria de 10mesh. O triturado obtido foi armazenado a temperatura ambiente, protegido de umidade em sacos plásticos de fechamento hermético, para utilização (CABRAL, 2020).

Figura 4.1 - Engaço de uva seco



Fonte: CABRAL (2020)

4.2 Caracterização do engaço de uva

O resíduo foi caracterizado físico-quimicamente quanto ao percentual de umidade, pH, a densidade aparente, a densidade real, a porosidade do leito e o teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais, conforme descrito a seguir:

4.2.1 Percentual de umidade (%)

Para análise do percentual de umidade, uma amostra de engaço lavado e esterilizado foi colocada em um recipiente apropriado. Então, o conjunto amostra-recipiente foi colocado em estufa a 60°C por 42h, e posteriormente pesado novamente. Sendo o percentual de umidade representado pelo teor de água livre presente na amostra, determinado conforme a Equação 4.1.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final da amostra})}{\text{peso inicial da amostra}} \times 100 \quad (4.1)$$

4.2.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

Para determinação do pH do substrato, uma suspensão com 50 mL de água e 5 g de engaço seco e triturado foi preparado, posteriormente, homogeneizada e colocada em repouso por 30 minutos para precipitação. Depois, o sobrenadante formado utilizou-se para determinar o pH o em um potenciômetro (TECNOPON – LUCA 210) previamente calibrado com soluções padrão (ADOLF LUTZ, 2008).

4.2.3 Densidade aparente

A densidade aparente foi determinada conforme a Equação 4.2. Para a análise, 1g do engaço foi pesado e posteriormente colocado em uma proveta, sem compactá-lo, onde se verificará o volume ocupado e os espaços vazios (CORREIA, 2004).

$$\text{Densidade aparente } \left(\frac{g}{mL}\right) = \frac{\text{massa (g)}}{\text{volume ocupado (mL)}} \quad (4.2)$$

4.2.4 Densidade real

A determinação da densidade real foi dada pela relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra, através do deslocamento de um fluido de volume conhecido, sendo esse fluido o óleo de soja comercial. Para isso, o óleo foi colocado em uma proveta e mediu-se o seu volume. Em seguida, foi adicionado o engaço com uma massa conhecida e aguardou-se que fosse depositado totalmente no fundo da proveta. Por fim, foi medido novamente o volume indicado na proveta. Assim, o volume real ocupado pelo engaço foi determinado pela

diferença entre o volume final e inicial, sendo a densidade real deste resíduo dada pela Equação 4.3.

$$\text{Densidade real} \left(\frac{g}{cm^3} \right) = \frac{m_A}{(V_2 - V_1)} \quad (4.3)$$

Em que:

m_A é massa do substrato;

V_1 é volume do fluido;

V_2 é volume do fluido deslocado.

4.2.5 Porosidade do leito

Um meio poroso pode ser definido como uma matriz sólida que contém vazios ou poros, por onde ocorre o fluxo de um fluido. Sendo então, porosidade, dada como a razão entre o volume de vazios e o volume total do meio (COUTO, 2017). Assim, a porosidade do leito foi calculada por meio da relação entre a densidade real e a densidade aparente da amostra de engaço, Equação 4.4.

$$\text{Porosidade} = 1 - \frac{\text{Densidade aparente}}{\text{Densidade real}} \quad (4.4)$$

4.2.6 Teor de açúcares redutores totais

Na determinação do teor de açúcares redutores totais (ART), foi utilizado o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) que é descrito por Santos (2018). Para análise, em um frasco Erlenmeyer foi pesado 1g do engaço e adicionados 9 mL de água destilada e 5 mL de HCL 1N. Esta mistura foi colocada em uma mesa agitadora (SOLAB – SL 223) durante uma hora a 200rpm. Em seguida, foram adicionados 2 mL de NaOH 1N. Esta última mistura foi então filtrada em um funil de *Buchner* utilizando um papel de filtro qualitativo, com o auxílio de uma bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581). Em um tubo de ensaio, adicionou-se a 0,5 mL desta solução filtrada, 2,5 mL do reagente DNS. A mistura foi aquecida a 100°C durante 5 minutos e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 4mL de água destilada, e realizadas a homogeneização e leitura em espectrofotômetro (EVEN) a 540 nm.

Tabela 4.1 - Especificações técnicas do papel filtro qualitativo

Propriedade	Quantificação	Unidade
Gramatura	80	g.m^{-2}
Espessura	205	μm
Cinza	0,5	%
Maioria dos Poros	14	μm

Fonte: JProLab (2022)

4.3 Processo de produção enzimática

4.3.1. Microrganismos e inóculo

Para manutenção dos isolados fúngicos, foi realizado o repique das culturas dos fungos *Paecilomyces* sp. TP08 (isolado de óleo diesel/Posto de gasolina/João Pessoa/ Paraíba – 2014) e *Aspergillus* sp. NA01 (isolado de formiga cortadeira/Reserva florestal da Universidade Federal da Paraíba, *Campus* I, João Pessoa/PB – 2017) cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

Os isolados fúngicos foram mantidos em meio sólido Ágar-Sabouraud-Dextrose 2,0% (p/v) (5 g/L de peptona de carne, 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona de caseína e 15 g/L de ágar bacteriológico) em placas de Petri e incubados a 30°C por 15 dias, para seu desenvolvimento micelial, após crescimento foi armazenado a 4°C.

Para o preparo do inóculo, foi preparada uma suspensão de conídios dos fungos adicionando-se 4 mL de uma solução Tween 80 a 0,3% (v/v) na placa de Petri e, com o auxílio de uma alça de platina, foi realizada a raspagem de conídios da superfície do meio após 15 dias de crescimento para ambos os isolados fúngicos (Figura 4.2). Após homogeneização, a solução foi transferida para um tubo de centrifuga esterilizado para a quantificação de conídios e posterior inoculação.

Figura 4.2 - Preparo para extração dos conídios do *Paecilomyces* sp. TP08.



Legenda: (A) Placa de Petri com a suspensão de conídios; (B) Frasco Erlenmeyer com a solução de Tween 80 a 0,3% (v/v); (C) Alça de auxílio para retirada de conídios.

A determinação da concentração de conídios na suspensão foi feita por meio de contagem em Câmara de Neubauer, e calculada de acordo com a Equação 4.5. E o volume de suspensão a ser inoculado ao meio de fermentação foi calculado conforme a Equação 4.6, ajustado de modo a ter-se uma concentração do inóculo de 1×10^7 conídios por grama de substrato sólido.

$$C_{conídios} \left(\frac{\text{conídios}}{\text{mL}} \right) = \bar{E} \times 5 \times 10^4 \times F_D \quad (4.5)$$

$$V_{suspensão} \left(\frac{\text{m}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Concentração de inóculo} \left(\frac{\text{conídios}}{\text{g}} \right) \times m(\text{g})}{C_{conídios} \left(\frac{\text{conídios}}{\text{mL}} \right)} \quad (4.6)$$

Em que:

\bar{E} é a média de conídios contados na Câmara de Neubauer;

$C_{conídios}$ é a concentração de conídios na suspensão;

F_D é o fator de diluição para a contagem na Câmara de Neubauer;

m , a massa de substrato utilizada.

4.3.2. Cultivo para produção enzimática

Foram realizados cultivos para verificação da atividade enzimática com os isolados fúngicos propostos (*Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp. NA01).

4.3.2.1 Cultivo inicial para produção enzimática a partir do isolado *Paecilomyces* sp. TP08

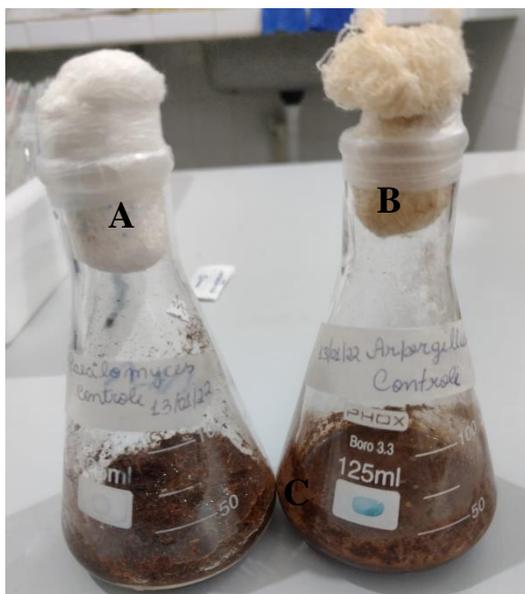
A partir de estudo realizado por Cabral (2020), foram realizados ensaios iniciais da produção enzimática em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g de substrato (engajo de uva). Assim, foi realizado a inoculação em cada frasco com 1×10^7 conídios por grama de substrato e umidade a 70%. Para o controle da produção, em um frasco ao invés de adicionar uma concentração de inóculo, foi adicionado uma quantidade equivalente de água destilada esterilizada. Todos os frascos foram colocados em temperatura ambiente ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) e analisados após 15 dias de cultivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.2.2 Produção enzimática a partir de *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp. NA01

O processo para cada isolado fúngico foi realizado em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g do engajo de uva com umidade a 70%, e posteriormente, os frascos contendo o substrato foram esterilizados em autoclave (121°C , 1 atm por 15 minutos). Em seguida, foi realizado a inoculação em cada frasco com concentração final de 1×10^7 conídios por grama, em ambos os processos com *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp. NA01.

Para o controle da produção (Figura 4.3), em um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g do substrato na mesma umidade do processo foi adicionado uma quantidade de água destilada esterilizada equivalente ao conteúdo de inóculo. Todos os frascos foram colocados em temperatura ambiente ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 10 dias de cultivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 4.3 -Ensaio controle do processo de produção enzimática



Legenda: (A) Controle para o processo com isolado fúngico *Paecilomyces* sp TP08; (B) Controle para o processo com isolado fúngico *Aspergillus* sp NA01; (C) Engaço de uva com 70% de umidade.

4.4 Extração e caracterização do complexo enzimático

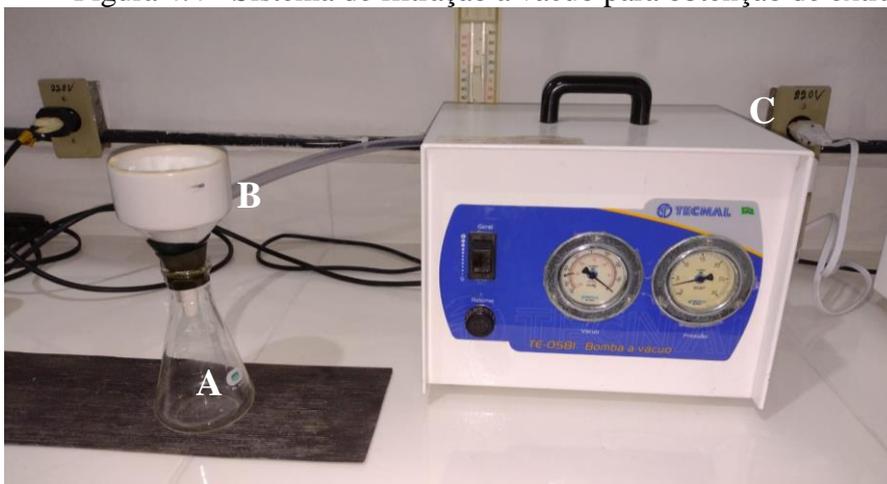
4.4.1 Obtenção do extrato enzimático bruto

Para extração do complexo enzimático obtido do estudo inicial com *Paecilomyces* sp. TP08, foi adicionado em cada frasco Erlenmeyer tampão citrato a 0,05 M (pH 5,0) na proporção de 10 mL de tampão para cada grama de substrato (10 mL:1 g), seguindo metodologia descrita por Cabral (2020). A mistura foi homogeneizada em mesa agitadora orbital (SOLAB– SL 223) a 200 rpm por 30 minutos.

Para extração do complexo enzimático obtido da produção com *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp NA01, separadamente, foi adicionado em cada frasco de produção tampão acetato a 0,2M (pH 7,0) de acordo com Freitas, Castro e Pinto (2010), na proporção de 10mL de tampão para cada grama de substrato (10 mL:1 g). A mistura foi homogeneizada em mesa agitadora orbital (SOLAB– SL 223) a 200 rpm por 30 minutos.

Em seguida, a suspensão foi filtrada em funil de Buchner e papel de filtro qualitativo de 14µm com auxílio de bomba a vácuo (TECNAL – TE 0581), conforme ilustrado na Figura 4.4, para separar o resíduo de engaço processado da fração líquida contendo o complexo enzimático produzido. As amostras filtradas foram adicionadas em tubos de centrífuga de 50 mL (Falcon) e armazenadas em congelador a -20°C para posteriores análises.

Figura 4.4 - Sistema de filtração a vácuo para obtenção de extrato bruto enzimático.



Legenda: (A) Frasco Kitassato de 125mL; (B) Funil de Buchner e papel filtro qualitativo; (C) Bomba a vácuo.

4.4.2 Análises do extrato enzimático bruto

4.4.2.1 Determinação da atividade celulasas totais (FPase)

A quantificação da atividade de celulasas totais foi realizada de acordo com adaptação da metodologia proposta por Oliveira Júnior (2014), onde o substrato empregado foi o papel de filtro qualitativo, conforme especificações técnicas descritas na Tabela 4.1, cortado em tiras medindo 1x6 cm. As tiras foram colocadas em tubos de ensaio, e adicionado 0,5 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 5,0) e 0,5 mL de extrato enzimático.

A mistura foi incubada a 50°C durante 60 minutos, para promover a reação enzimática. Em seguida, foi retirada 0,5 mL da mistura reacional e adicionada a tubos de ensaio contendo 0,5 mL do reagente DNS. Estes seguiram para o banho termostatizado a 100°C durante 5 minutos. Após o resfriamento, foram acrescidos 4mL de água destilada aos tubos e as amostras homogeneizadas.

A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro (EVEN) no comprimento de onda de 540 nm para determinação dos açúcares redutores produzidos, de acordo com o método DNS. O branco da reação foi feito para realizar a determinação da concentração inicial de açúcares redutores no extrato enzimático, para isso, utilizou-se 0,5 mL do tampão citrato 0,05 M (pH 5,0) e 0,5 mL do extrato enzimático obtidos em 0h de processo. Posteriormente, todos os procedimentos foram realizados da mesma forma com as demais amostras, conforme descrito anteriormente.

Os ensaios foram realizados em triplicata, e comparados os valores obtidos nas leituras com uma curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade de celulase é definida pela produção de 1 μ mol de glicose por minuto (0,18 mg de glicose por minuto), nas condições de processo, e é expressa por U/g como diz a Equação 4.7.

$$FPase \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times V \times R}{(0,18 \times t \times V_e)} \quad (4.7)$$

Em que:

A é a absorbância da amostra;

B é absorbância do branco da amostra;

f é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d é a diluição da amostra;

V é o volume total da mistura reacional (mL);

R é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g);

0,18 é o fator de conversão de miligramas para μ mol de glicose;

t é o tempo de reação (minutos);

Ve é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL).

4.4.2.2 Determinação da atividade de endoglucanases (CMCase)

A determinação da atividade de endoglucanases foi realizada de acordo com adaptação do protocolo proposto por Oliveira Júnior (2014), em que uma solução de carboximetilcelulose sódica a 2% foi utilizada como substrato específico. Em tubos de ensaio contendo 0,5mL de extrato enzimático, foram adicionados 0,5mL do substrato, e incubado a mistura a 50°C por 30 minutos. Após isso, foram adicionados 0,5mL de reagente DNS e os tubos foram levados a um banho termostatizado a 100°C por 5 minutos e, por fim, foram adicionados aos tubos 4mL de água destilada e promovida a homogeneização.

Para determinar a glicose liberada pela reação com o DNS, foi realizada a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro (EVEN) no comprimento de onda de 540nm. Para o branco da reação foram adicionados 0,5mL do reagente DNS a uma mistura de 0,5mL de substrato com 0,5mL do extrato enzimático obtido em 0h do processo. Em seguida, seguirão todos os procedimentos realizados às outras amostras, como descrito anteriormente.

Os ensaios foram feitos em triplicata, e comparados os valores obtidos nas leituras com uma curva padrão de glicose. Expressa por U/g, e calculada de acordo com a Equação 4.8, uma unidade de atividade de endoglucanase equivale a 1µmol de glicose liberada por minuto, nas condições do processo (ALVA et al., 2007).

$$CMCase \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times V \times R}{(0,18 \times t \times V_e)} \quad (4.8)$$

Em que:

A é a absorbância da amostra;

B é absorbância do branco da amostra;

f é o fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d é a diluição da amostra;

V é o volume total da mistura reacional (mL);

R é a razão do volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g);

0,18 é o fator de conversão de miligramas para µmol de glicose;

t é o tempo de reação (minutos);

Ve é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL).

4.4.2.3. Determinação da atividade proteolítica

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização do resíduo engaço de uva

Para utilização do engaço de uva como potencial substrato indutor de produção de celulases e proteases microbianas, foi realizada uma caracterização físico-química do engaço de uva triturado em 10mesh. Os resultados da caracterização podem ser observados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Caracterização físico-química do engaço de uva

Parâmetro analisado	Resultado
Umidade (%)	70
pH	4,06 ($\pm 0,08$)
Densidade Aparente (g/mL)	0,39
Densidade real (g/mL)	1,19
Porosidade do leito	0,66
Açúcares redutores totais (g/L)	1,00
Açúcares redutores (g/L)	0,434

Fonte: A autora (2022)

O engaço de uva utilizado, neste trabalho, apresentou um teor de umidade maior que os valores de 20%, 13,9%, 15,5% obtidos por Prozil (2013), Costa (2010) e Yahya (2015) respectivamente. Esta diferença pode ser atribuída à variedade dos cultivares de uva utilizada em cada trabalho.

A densidade aparente de 0,39 g/mL mostra certa tendência a não compactação do substrato, uma vez que influencia diretamente no aumento da porosidade do leito, consequentemente aumentando a areação do meio de cultivo, proporcionando uma melhor difusividade de gases durante o processo. O pH 4 observado, está de acordo com o esperado desse substrato pela presença de compostos fenólicos em sua composição, conforme citado por Prozil (2013).

Este substrato apresentou também, um teor de açúcares redutores totais de 1 g/L, similar ao teor de 0,9g/L encontrado por Rocha (2018) em resíduos agroindustriais de acerola

e cajá. Prozil *et al.* (2013) realizou uma análise da composição média de monossacarídeos no engaço da uva, observando em seus resultados um teor de 62,7% de glicose na massa total de monossacarídeos presentes no resíduo, através da glicose enzimática. Este mesmo autor atribuiu a origem desse teor de glicose à composição dos 30,3% de celulose e 21% de hemicelulose que encontrou em suas análises químicas do engaço de uva. Esse teor de glicose presente no substrato corrobora então a composição lignocelulósica e pode favorecer a fermentação em estado sólido.

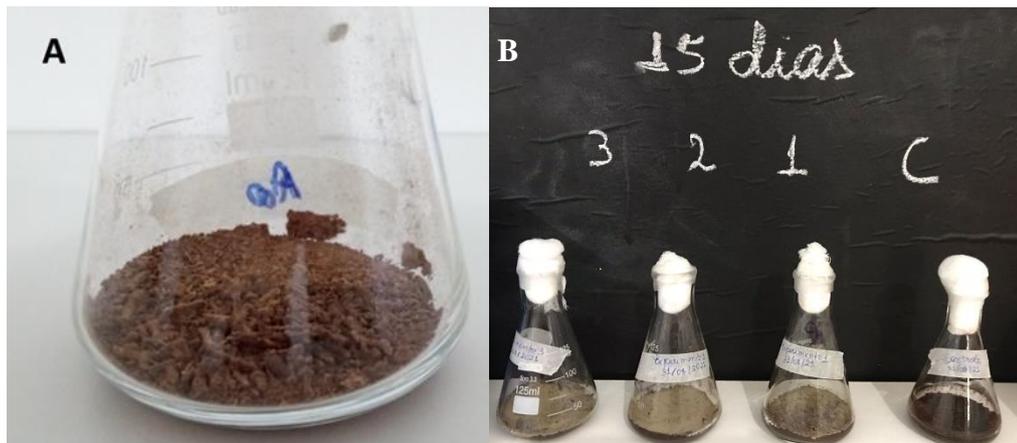
5.2 - Processos para produção enzimática a partir de *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp. NA01

5.2.1 – Experimentos iniciais com *Paecilomyces* sp. TP08.

Os resultados aqui apresentados foram referentes aos cultivos iniciais utilizando *Paecilomyces* sp. TP08. Estudos primários foram realizados sem ajuste de umidade, utilizando o engaço a 3% de umidade (CABRAL, 2020) e com o mesmo isolado fúngico. Os resultados foram comparados aos experimentos iniciais com umidade ajustada a 70%.

A Figura 5.1 pode-se observar o aspecto visual do engaço de uva utilizado nos experimentos e o acompanhamento qualitativo do desenvolvimento do *Paecilomyces* sp. TP08. Durante 15 dias de cultivo, o substrato sofreu alterações macroscópicas em relação ao controle do processo (Figura 5.1 C). A camada pulverulenta com a coloração característica da esporulação do fungo foi verificada visualmente também, na Figura 5.1, Ainda, percebeu-se uma alteração visual na umidade do substrato, ligeiramente mais úmido do que percebido no início do processo. Condição que pode ter sido promovida pela habilidade do isolado *Paecilomyces* sp TP08 de sintetizar enzimas capazes de hidrolisar a matriz lignocelulósica do engaço de uva e liberar moléculas de água. Por conseguinte, foi possível atestar por meio das análises de atividade enzimática celulolítica e proteolítica a produção de enzimas microbianas.

Figura 5.1. Aspecto macroscópico do substrato após 15 dias de cultivo.

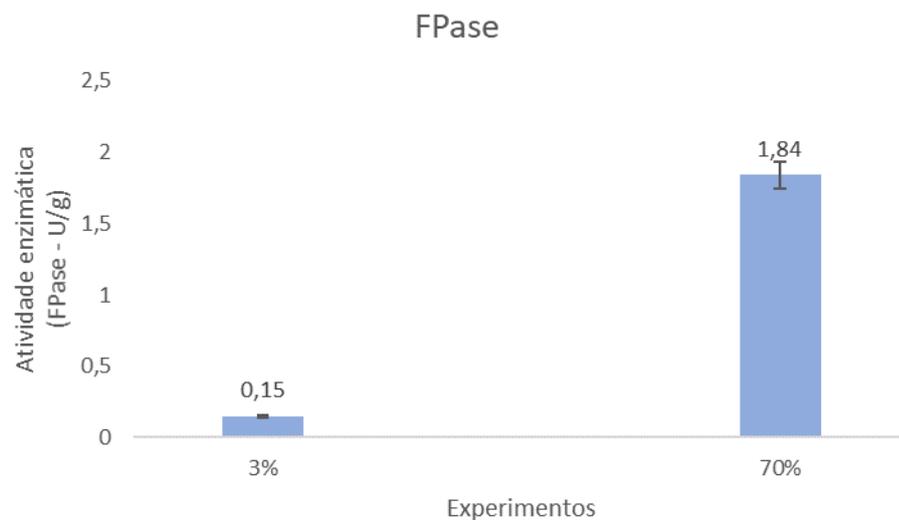


Legenda: A – Substrato antes do processo de produção; B – Alterações macroscópicas após 15 dias de cultivos. *1, 2 e 3 – experimento em triplicata e C – Controle.

5.2.1.1 - Atividades de celulases totais (FPase) para o estudo inicial com *Paecilomyces* sp TP08

A atividade da celulase total foi determinada após 15 dias de cultivo. A Figura 5.2 apresenta os valores da análise de FPase do processo com *Paecilomyces* sp TP08, com umidade a 3% (Cabral 2020) e com ajuste de umidade para 70%.

Figura 5.2 – Atividade enzimática (FPase) com substrato a 3% e 70% de umidade



Fonte: A autora (2022)

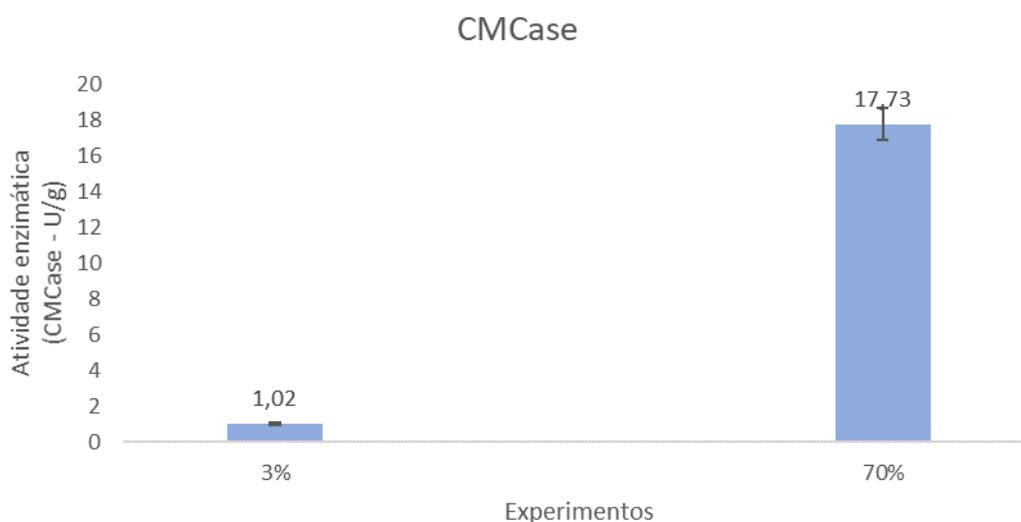
Conforme observado na Figura 5.2, a produção de FPase para o substrato a 3% de umidade foi de 0,15 U/g, a baixa atividade enzimática pode estar relacionada com a pouca umidade disponível no substrato. Cabral (2020) realizou seus experimentos com umidade a 3%, observou-se que estresse hídrico submetido ao microrganismo foi inibidor para seu desenvolvimento e, como consequência atividade enzimática foi reduzida.

A partir dos resultados obtidos por Cabral (2020), os experimentos foram conduzidos com ajuste da umidade para 70%. Assim, pode-se observar um aumento substancial da produção de FPase, após 15 dias de cultivo, atingiu-se uma produção de 1,84 U/g de celulases totais, expressando um aumento de cerca de 12,3 vezes o valor obtido inicialmente (0,15 U/g).

5.2.1.2 - Atividades de endoglicanases (CMCase) para o estudo inicial com *Paecilomyces* sp TP08

A atividade da CMCase foi determinada também após 15 dias de cultivo. A Figura 5.3 apresenta os valores da análise de CMCase do processo com *Paecilomyces* sp TP08, com umidade a 3% e com ajuste de umidade para 70%. Pode-se observar que a produção de CMCase foi de 1,02U/g no processo com engaço de uva com umidade a 3%, e 17,73 U/g no processo com 70% de umidade. O aumento da umidade proporcionou melhor acesso do microrganismo a matriz do substrato, permitindo que o fungo produzisse as celulases necessárias para hidrolisar o engaço de uva, conseqüentemente, a atividade enzimática foi maior devido a biodisponibilidade da matriz.

Figura 5.3 – Atividade enzimática (CMCase) com substrato a 3% e 70% de umidade.



5.2.1.3- Atividades de proteases para o estudo inicial com *Paecilomyces* sp TP08

A atividade proteolítica foi analisada para caracterizar o complexo enzimático produzido por *Paecilomyces* sp. TP08. com umidade a 3% e com ajuste de umidade para 70%. Os resultados foram apresentados na Figura 5.4. Observou-se que a atividade proteolítica no meio com umidade de 3% apresentou uma atividade muito baixa (0,5 U/g) quando comparada a atividade determinada no meio com ajuste de umidade para 70%, 26,17 U/g de atividade proteolítica. Portanto, a ação do *Paecilomyces* sp TP08 promoveu produção de proteases fúngicas após 15 dias nas condições estabelecidas no cultivo.

Figura 5.4 – Atividade proteolítica (proteases) com substrato a 3% e 70% de umidade



Fonte: A autora (2022)

Orlandelli *et al.* (2012) afirmaram que a produção enzimática pode ser diferenciada dependendo das espécies de *Paecilomyces* sp., por exemplo, a espécie *P. variotii* não é considerada um bom produtor de proteases, lipases e amilases. Entretanto, neste estudo utilizando a espécie de *Paecilomyces* sp. TP08 produziu uma boa quantidade de enzima protease quando foi ajustada a umidade para 70%. Então, pode inferir que as condições ambientais também influenciam na produtividade enzimática. Ademais, esse fungo foi isolado de óleo diesel, tem uma boa ação entomopatogênica (ação das proteases está envolvida), portanto, possui habilidade na produção de proteases.

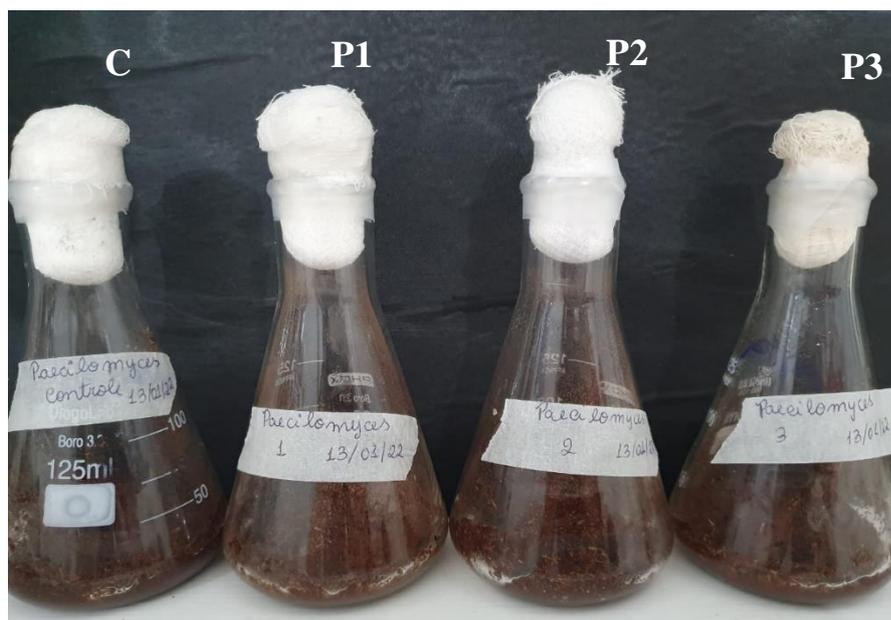
Após a constatação que o isolado fúngico teve habilidade de produzir um complexo enzimático contendo celulasas e proteases a partir o engaço de uva, experimentos com a

mesma condição de controle e parâmetros foram realizados para verificar o potencial desse substrato utilizando *Paecilomyces* sp TP08 e *Aspergillus* sp. NA01.

5.2.2 Experimentos com *Paecilomyces* sp. TP08

A Figura 5.5 ilustra o processo de produção enzimática com *Paecilomyces* sp. TP08. O frasco controle (C) possui as mesmas condições dos frascos de processos (P1, P2 e P3), quantidade de substrato e umidade do sistema, excetuando a inoculação com o isolado fúngico. As características macroscópicas do processo no momento da inoculação com o isolado fúngico *Paecilomyces* sp. TP08 para produção enzimática são as mesmas, pois observou-se uma similaridade quanto à umidade aparente e a distribuição do substrato no biorreator, constatando assim as mesmas condições para o processo.

Figura 5.5 – Aspectos macroscópicos do início do cultivo para produção enzimática a partir do isolado fúngico *Paecilomyces* sp TP08.

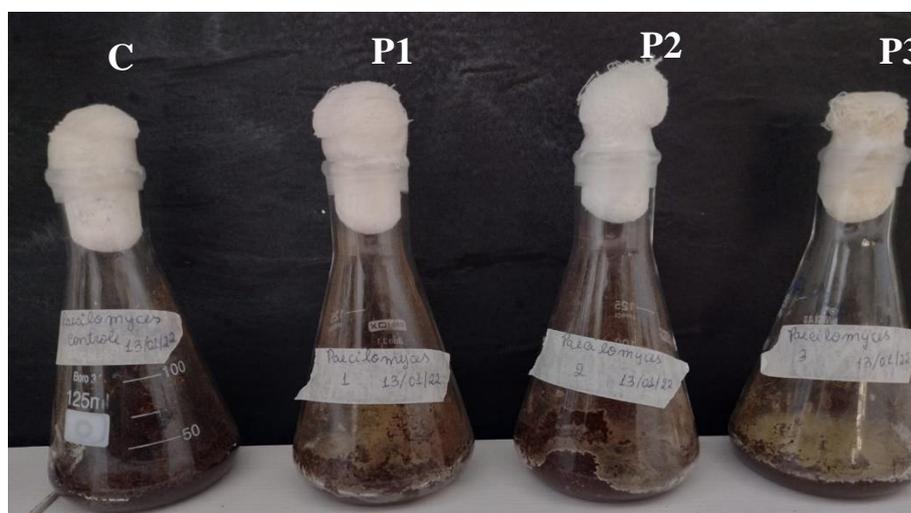


Legenda: (C) – Controle do processo; (P1) - Processo 1; (P2) - Processo 2; (P3) - Processo 3 - *1,2 e 3 foram as repetições do cultivo

Na Figura 5.6 pode-se perceber os aspectos macroscópicos após 10 dias de cultivo, alterações visuais foram verificadas nos experimentos (P1, P2 e P3) e o acompanhamento qualitativo do desenvolvimento do *Paecilomyces* sp. TP08 foi visualizado. O substrato sofreu alterações macroscópicas em relação ao controle do processo (Figura 5.6 C).

O crescimento superficial sobre o engaço de uva e a formação de uma camada pulverulenta com a coloração característica da colônia do fungo (cor na tonalidade marrom) foram verificados visualmente também, na Figura 5.6. Ainda, em conformidade ao experimento anterior (Figura 5.1) também se percebeu uma alteração na umidade do substrato, ligeiramente mais úmido do que observado no início do processo. Constatou-se, assim, que o substrato foi metabolizado pelo fungo e, conseqüentemente, enzimas extracelulares foram sintetizadas para que o complexo lignocelulolítico presente no engaço fosse hidrolisado e liberados monômeros mais facilmente assimiláveis pelo *Paecilomyces* sp. TP08, promovendo a esporulação durante o cultivo, que pode ser observada na Figura 5.6.

Figura 5.6 – Aspectos macroscópicos após 10 dias de produção enzimática a partir do *Paecilomyces* sp TP08.



Legenda: (C) – Controle do processo; (P1) - Processo 1; (P2) - Processo 2; (P3) - Processo 3 - *1,2 e 3 foram as repetições do cultivo

Para identificar e verificar a presença do coquetel enzimático produzido durante o cultivo, análises de atividade enzimática foram realizadas no caldo enzimático bruto obtido a partir da extração do engaço de uva processado.

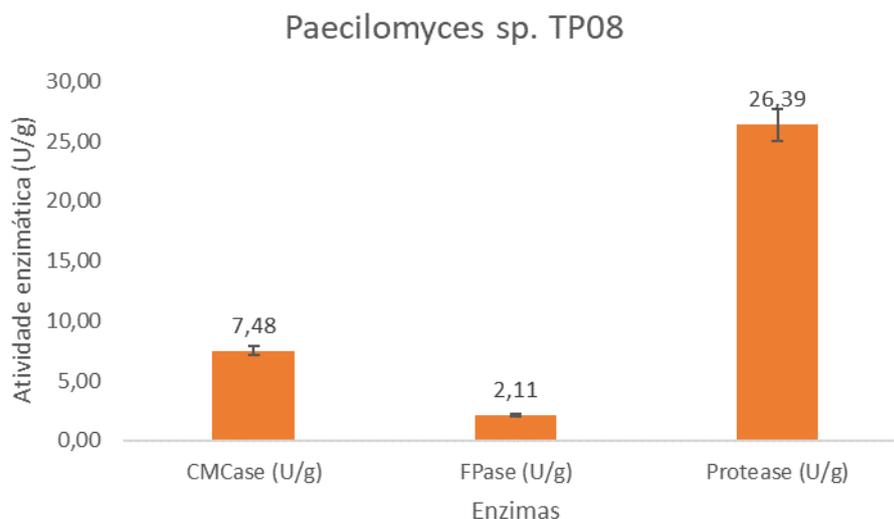
5.2.2.1 Determinação da atividade enzimática das enzimas CMCases, FPases e proteases por *Paecilomyces* sp. TP08

As análises da atividade das enzimas celulolíticas (CMCases e FPases) e proteolíticas foram realizadas após 10 dias de cultivo. A Figura 5.7 apresenta os valores da análise de CMCCase, FPase e proteases de *Paecilomyces* sp TP08. A atividade celulolítica, tipo

endoglucanases representada pela CMCase foi de 7,48 U/g. Apesar da utilização das mesmas condições de processo observadas no estudo inicial, a produção de CMCases de 17,73 U/g foi maior do que atingida nesta etapa (7,48 U/g). Tal diferença pode ser atribuída ao sistema de extração utilizado, no estudo inicial foi utilizado como solvente extrator solução tampão citrato a 0,05M (pH5,0) e para esta etapa foi utilizado o tampão acetato a 0,2M (pH7,0), pois proporcionaria maior extração também das enzimas proteolíticas sintetizadas no processo, que também foi o objetivo do trabalho quantificar as proteases obtidas nesse sistema.

Ao comparar a atividade CMCase obtida quando foi utilizado o mesmo isolado fúngico *Paecilomyces* sp TP08, empregando a fibra de coco verde como substrato e as mesmas condições de processo (umidade 70% e 1×10^7 conídios/g de substrato e 30°C), obteve-se valores máximos de 32,2U/g durante 7 dias de cultivo (SANTOS, 2018). Demonstrando que a fibra de coco verde teve maior biodisponibilidade das fibras de celulose do que o engaço de uva utilizado nesse trabalho devido a hidrólise enzimática.

Figura 5.7 – Atividade das enzimas CMCases, FPases e proteases após 10 dias de produção enzimática a partir de *Paecilomyces* sp TP08.



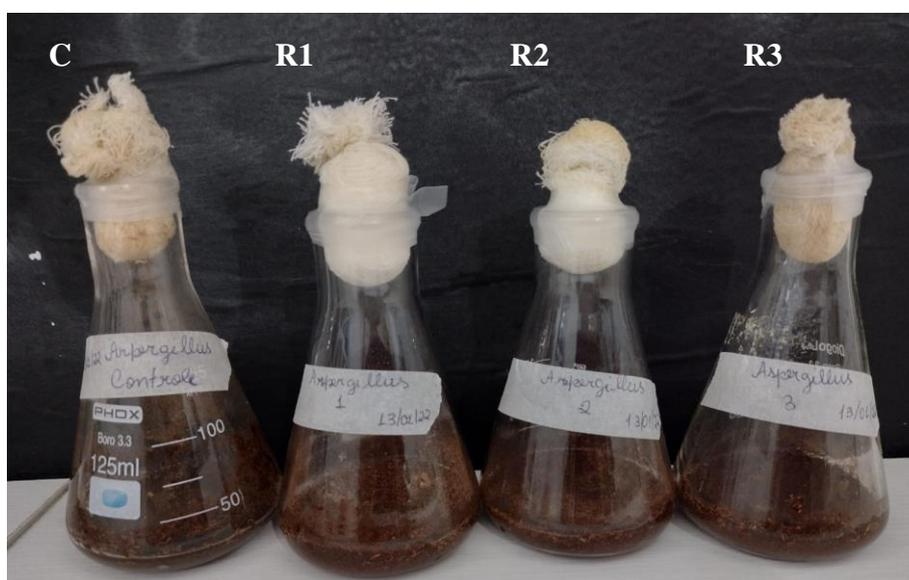
Fonte: A autora (2022)

A Figura 5.7 apresenta também a determinação da atividade das celulases totais, do tipo FPase, 2,11 U/g e as proteases (26,39 U/g) obtida após 10 dias de cultivo. Com a utilização com extrator acetato a 0,2M (pH 7,0) não houve alteração na quantificação da FPase quando comparada ao estudo inicial (1,84 U/g), ou seja, dentro da margem de erro que foi de $\pm 0,31$, e nem alteração na quantificação de proteases do sistema inicial (26,17 U/g) Portanto, não houve influência do tipo de solvente extrator utilizado no processo.

5.2.3 – Experimentos com *Aspergillus* sp. NA01

Experimentos com *Aspergillus* sp. NA01 foram realizados após os resultados iniciais obtidos com *Paecilomyces* sp. TP08 com relação ao substrato a 70%. Os experimentos com *Aspergillus* sp. NA01 foram realizados em triplicata, representada pelos símbolos P1, P2 e P3 (Figuras 5.8 e 5.9). A Figura 5.8 representa o processo de fermentação em estado sólido em seu primeiro dia. Pode-se observar que todos os frascos estão com o mesmo aspecto macroscópico. Não tendo diferenciação na umidade e espalhamento do substrato dentro do biorreator.

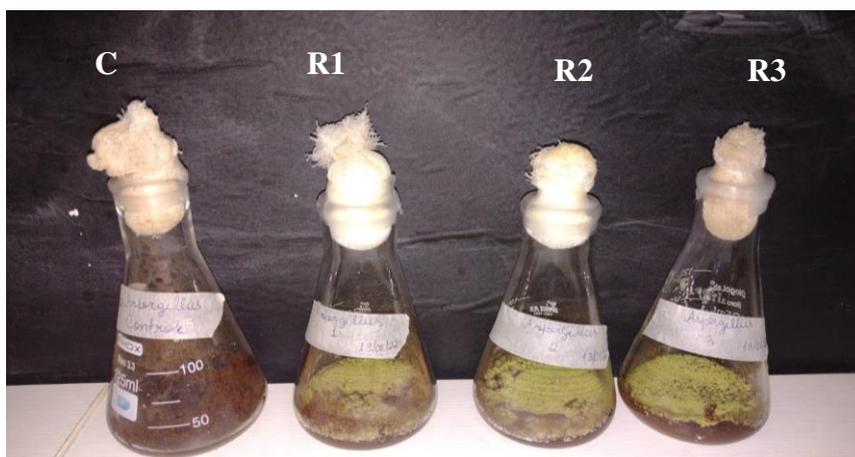
Figura 5.8 - Aspectos macroscópicos do engaço de uva do primeiro dia de cultivo com *Aspergillus* sp. NA01



Legenda: (C) - Controle; (R1) - Repetição 1; (R2) - Repetição 2; (R3) - Repetição 3

A Figura 5.9 apresenta os aspectos macroscópicos do processo de produção enzimática com *Aspergillus* sp. NA01. De acordo com a Figura 5.9 houve crescimento considerável do isolado em 10 dias de cultivo, o substrato sofreu alterações macroscópicas em relação ao controle no processo, como por exemplo, uma esporulação bem aparente e visualmente perceptível no biorreator. Assim, constatou-se que o isolado fúngico teve habilidade de se propagar sobre a superfície do engaço de uva nas condições de processos estabelecidas.

Figura 5.9 - Aspectos macroscópicos do engaço de uva após 10 dias de cultivo com *Aspergillus* sp. NA01



Legenda: (C) – Controle do processo; (R1) – Repetição 1; (R2) – Repetição 2; (R3) – Repetição 3

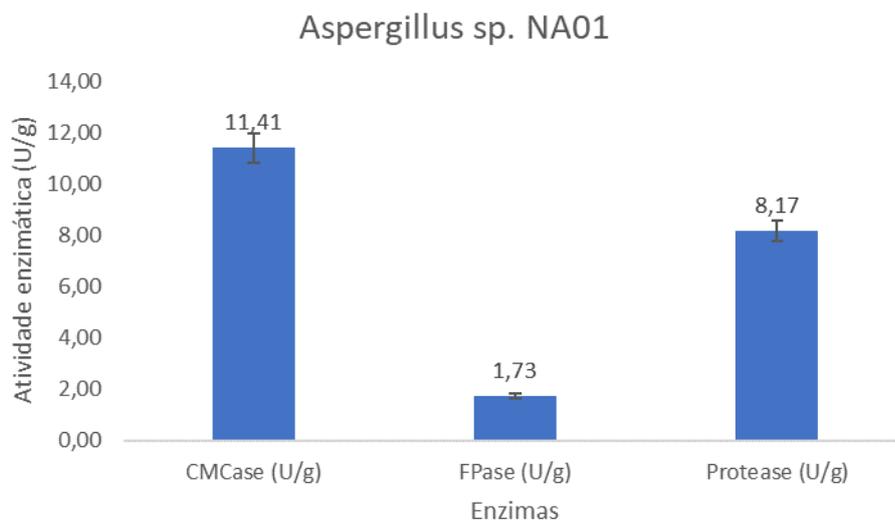
5.2.3.1 – Produção enzimática das CMCases, FPases e proteases por *Aspergillus* sp NA01

As análises da atividade das enzimas celulolíticas (CMCases e FPases) e proteolíticas foram realizadas após 10 dias de cultivo. A Figura 5.10 apresenta os valores da análise de CMCCase, FPase e proteases do processo com *Aspergillus* sp. NA01.

A atividade celulolítica, tipo endoglucanases representada pela CMCCase foi de 11,41 U/g. Gervásio (2017) utilizando resíduo de coco seco, assim como Santos (2018), mas utilizando um isolado de *Aspergillus* sp. também observou uma melhor atividade no final da fermentação, porém com um valor inferior, de 15,7U/g. Portanto, a produção celulolítica foi similar ao observado na literatura quando utilizado o mesmo microrganismo, embora o substrato tenha sido diferenciado.

Já a atividade de celulase total, FPase, foi de 1,73 U/g, resultado compatível com as atividades celulolíticas totais observadas na literatura, por exemplo, Zuñiga (2009), utilizando o bagaço de cana de açúcar e nutrientes diversos no cultivo sólido de *A. niger*, obteve atividade de 0,59U/g em 72h de processo.

Figura 5.10 – Atividade das enzimas CMCase, FPase e proteases após 10 dias de produção enzimática a partir do *Aspergillus* sp NA01.



Fonte: A autora (2022)

Com relação as proteases, *Aspergillus* sp NA01 teve habilidade de promover a síntese de 8,17 U/g a partir do engaço nas condições de processos estudadas. Quando comparado com *Paecilomyces* sp, TP08 percebeu-se uma menor quantidade de proteases disponíveis. Pode-se inferir que nos sistemas analisados o isolado *Paecilomyces* sp. TP08 tem maior habilidade de produzir proteases do que o isolado *Aspergillus* sp NA01 quando se utiliza o engaço de uva como substrato, observa-se na Figura 5.11 essa superioridade. Tal observação pode ser explicada pela boa atividade entomopatogênica que o *Paecilomyces* sp. TP 08 possui, portanto, há uma habilidade maior de sintetizar proteases durante o seu desenvolvimento durante o cultivo.

6. CONCLUSÕES

- O engaço de uva apresentou características físico-químicas satisfatórias para a utilização de processos de cultivo em estado sólido.
- Nas condições de processo propostas, o engaço de uva demonstrou ser um substrato potencial para produção de celulases e proteases utilizando os dois isolados fúngicos analisados (*Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp. NA01). Sendo *Paecilomyces* sp. TP08 com potencial maior na síntese de proteases e o *Aspergillus* sp NA01 para síntese de celulases.
- O complexo enzimático bruto produzido possui conteúdo rico em celulases e proteases que podem ser aplicadas em diversos setores industriais como na produção têxtil e na fabricação de detergentes enzimáticos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.S.A. **Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá.** Trabalho de Conclusão de Curso. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB. 2016.

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 fung alamyase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, 2007.

AZEVEDO, E; BARATA, M. Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 4, 2018.

CABRESTRE, R.; LOSNAK, D. O.; YAMAUCHI, D. H.; GARCES, H. G.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RUIZ, L. S.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M. Production of enzymes of biotechnological interest by a new strain of *Paecilomyces dactylethromorphus*. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v.10, n.1, 2021.

CABRAL, E. V. S. **Utilização do engaço de uva para produção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas por *Paecilomyces* sp. TP08.** 54f. Trabalho de Conclusão de Curso. Biotecnologia. Universidade Federal da Paraíba. 2020.

CASTRO, A. M.; PEREIRA-JUNIOR, N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

COSTA, V.L.F. **Propriedades papelieras das fibras engaço da uva.** Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal. 2010.

COUTO, H.J.B.; BARBOSA, F.L.L.; LIMA, O.A. **Permeabilidade de meios porosos minerais: efeito da esfericidade, granulometria e tipo de mineral.** XXVII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa. Belém, PA. 23 a 27 de Outubro 2017.

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

CUNHA, N. **Projeto de uma planta de tratamento anaeróbio de resíduos vínicos com aproveitamento energético do biogás gerado.** Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia ambiental, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS. 2018.

DE MELLO, L. M. R.; MACHADO, C. A E. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2020.** Comunicado Técnico 223. Bento Gonçalves-RS, 18p., 2021.

EICHLER P. **Cultivo em estado sólido de *Aspergillus brasiliensis* em bagaço de malte para produção de lipases.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2018.

FLORENCIO, C. Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma* spp. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.

FREITAS, A.C; CASTRO, R.J.S.; PINTO, G.A.S. **Estudo das condições de extração de protease em processo fermentativo semi-sólido.** Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - ISSN 2178-3659. p. 6569-6574. 2010. Acesso em: 20 de janeiro de 2022. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/34079/1/AT10115.pdf>

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Sex in *Penicillium* series Roqueforti. **IMA FUNGUS**, vol. 01, n.02., 171-180. 2010.

IBGE. **Cenário da vitivinicultura nacional.** 2020. Disponível em: <https://agroinsight.com.br/12275-2/> Acesso em 10.03.2022.

MARTINS, R. E. Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2007.

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.M., 2007. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**. São Paulo. 41(242), 28-33.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n. 2/3, p.81-84, 2003.

PING, L.; BROSSE, N.; SANNIGRAHI, P. & RAGAUSKAS, A. (2011). Evaluation of grape stalks as a bioresource. **Industrial Crops and Products**, 33(1): 200-204.

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.** Comunicado Técnico Online, EMPRAPA. Fortaleza, CE. 2005

POSTINGHER, B.M. **Utilização dos resíduos da elaboração de suco de uva orgânico na produção de farinhas e cogumelos comestíveis.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 79F. 2015.

PROZIL, S.O.; EVTUGUIN, D.V.; LOPES, L.P.C. Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. **Ind Crop Prod** 35:178–84. 2012.

PROZIL, S.; MENDES, J.; EVTUGUIN, D. & CRUZ-LOPES, L. Caracterização Química e Estrutural do Engaço da Uva e Avaliação do seu Potencial Como Matéria-Prima Lenhocelulósica. **Millenium**. 44. 23-40. 2013.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**. Vol.1 No.3, 174-189. 1998.

RIGHI, E.; VARIANI, C.; MAGALHÃES, B. Análise da produção industrial e dos resíduos em uma vinícola na Serra Gaúcha. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, 2020: 7(15): 319-340. ISSN 2359-1412 [https://doi.org/10.21438/rbgas\(2020\)071523](https://doi.org/10.21438/rbgas(2020)071523)

ROCHA, J.C. **Produção, avaliação da estabilidade e aplicação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando resíduos de frutas tropicais como substrato.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande no Norte. Natal, RN. 2018.

SANTANA, M. S. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa*.** Dissertação. Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2010.

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**, vol. 04, n° 02, 2018.

SILVA, M. J. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* rut c-30 em meios com diferentes capacidades de indução.** Dissertação Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Universidade Federal de Pernambuco, 93f., 2014.

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.

TONON, R. V. et al. Tecnologias para o aproveitamento integral dos resíduos da indústria vitivinícola. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018, 41 p.

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

YAHYA, MOHD ADIB; AL-QODAH, Z.; NGAH, C. W. ZANARIAH. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 218-235, 2015.

ZUÑIGA, U.F R.; FARINAS, C.S.; GONÇALVES, F.M N.; NETO, V.B.; COURI, S.; CRESTANA, S. **Influência do Meio Nutricional na Produção de Celulases em Fermentação Semi-Sólida do Bagaço de Cana-de-açúcar por *Aspergillus niger*.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal, RN. 2009.