

PRODUÇÃO DE CELULASES FÚNGICAS A PARTIR DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSA DO BAGAÇO DE UVA

PRODUCCIÓN DE CELULASAS FÚNGICAS A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO Y SUMERGIDO DEL BAGAZO DE UVA

PRODUCTION OF FUNGAL CELLULASES FROM SOLID-STATE AND SUBMERGED FERMENTATION OF GRAPE POMACE

Apresentação: Comunicação Oral

Maria Eduarda de Sousa Silva Donato¹; Guilherme Gomes de Sousa Magalhães²; André Felipe de Melo Sales Santos³
Liliana Andréa dos Santos⁴; Tatiana Souza Porto⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/VCIAGRO.0087>

RESUMO

A biomassa lignocelulósica é uma fonte renovável abundante e subutilizada, com potencial para a produção de energia, alimentos, produtos químicos e biotecnológicos. A produção agrícola gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de uva, que podem ser aproveitados para a produção de enzimas. O bagaço de uva contém celulose, hemicelulose e lignina, sendo uma boa fonte de carbono para microrganismos. No entanto, a celulose e a lignina são de difícil degradação, e a produção enzimática de celulases é atualmente não viável economicamente devido ao alto custo das enzimas comerciais, para algumas aplicações. A busca por cepas fúngicas de alto rendimento e a otimização das condições de hidrólise são abordagens para superar essa deficiência. A celulose é o polímero natural mais abundante, usado em várias indústrias. As celulases têm amplas aplicações industriais. Dessa forma, a produção enzimática utilizando resíduos agrícolas como fonte de carbono é uma opção viável e sustentável. Fungos, especialmente os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*, são bons produtores de celulases. A fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS) são métodos para a produção de enzimas, cada um com suas vantagens. A FES é simples e de baixo impacto ambiental, enquanto a FS permite melhor controle dos parâmetros de fermentação. Neste estudo, foi investigada a produção de celulases fúngicas a partir do bagaço de uva por meio de FES e FS, utilizando *Aspergillus niger* e *Aspergillus tamaritii*. O substrato foi padronizado, seco e triturado, sendo caracterizado quanto à umidade, sólidos totais voláteis e pH. A capacidade de absorção de água foi determinada para ajustar a umidade durante a fermentação. Os fungos foram cultivados e esporulados, com as suspensões de esporos preparadas e ajustadas para a concentração desejada. A atividade celulolítica foi medida através da atividade de CMC_{case}, com a quantidade de glicose liberada determinada por reação com DNS. Os resultados mostraram que a maior atividade celulolítica foi obtida com *Aspergillus niger* em FS, com atividade de CMC_{case} de 0,194 U/ml. Conclui-se que o bagaço de uva é um substrato potencial para a produção de celulases fúngicas.

Palavras-Chave: Bagaço de frutas, biomassa lignocelulósica, resíduos agroindustriais, fermentação, enzimas.

¹Bacharelada em Engenharia Ambiental, Universidade Federal Rural de Pernambuco, eduarda.donato@ufrpe.br

²Bacharelado em Engenharia Ambiental, Universidade Federal Rural de Pernambuco, guilherme.gsmagalhaes@ufrpe.br

³Doutor em Engenharia Civil, Universidade Federal Rural de Pernambuco, andre.felipesantos@ufrpe.br

⁴Doutora em Engenharia Civil, Universidade Federal Rural de Pernambuco, liliana.andrea.santos@gmail.com

⁵Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, tatiana.porto@ufrpe.br

RESUMEN

La biomasa lignocelulósica es una fuente renovable abundante y subutilizada, con potencial para la producción de energía, alimentos y productos químicos. La producción agrícola genera grandes cantidades de residuos lignocelulósicos, como el bagazo de uva, que pueden ser aprovechados para la producción de enzimas. El bagazo de uva contiene celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo una buena fuente de carbono para microorganismos. Sin embargo, la celulosa y la lignina son de difícil degradación, y la producción enzimática de celulasas es actualmente no rentable debido al alto costo de las enzimas comerciales. La búsqueda de cepas fúngicas de alto rendimiento y la optimización de las condiciones de hidrólisis son enfoques para superar esta deficiencia. La celulosa es el polímero natural más abundante, usado en varias industrias. Las celulasas tienen amplias aplicaciones industriales. De esta forma, la producción enzimática utilizando residuos agrícolas como fuente de carbono es una opción viable y sostenible. Hongos, especialmente los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium*, son buenos productores de celulasas. La fermentación en estado sólido (FES) y la fermentación sumergida (FS) son métodos para la producción de enzimas, cada uno con sus ventajas. La FES es simple y de bajo impacto ambiental, mientras que la FS permite mejor control de los parámetros de fermentación. En este estudio, se investigó la producción de celulasas fúngicas a partir del bagazo de uva mediante FES y FS, utilizando *Aspergillus niger* y *Aspergillus tamarii*. El sustrato fue estandarizado, secado y triturado, siendo caracterizado en cuanto a humedad, sólidos volátiles y pH. La capacidad de absorción de agua fue determinada para ajustar la humedad durante la fermentación. Los hongos fueron cultivados y esporulados, con las suspensiones de esporas preparadas y ajustadas para la concentración deseada. La actividad celulolítica fue medida a través de la actividad de CMC_{ase}, con la cantidad de glucosa liberada determinada por reacción con DNS. Los resultados mostraron que la mayor actividad celulolítica fue obtenida con *Aspergillus niger* en FS, con actividad de CMC_{ase} de 0,194 U/ml. Se concluye que el bagazo de uva es un sustrato potencial para la producción de celulasas fúngicas.

Palabras Clave: Bagazo de frutas, biomasa lignocelulósica, residuos agroindustriales, fermentación, enzimas.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is an abundant and underutilized renewable source with potential for the production of energy, food, and chemicals. Agricultural production generates large amounts of lignocellulosic residues, such as grape pomace, which can be utilized for enzyme production. Grape pomace contains cellulose, hemicellulose, and lignin, making it a good carbon source for microorganisms. However, cellulose and lignin are difficult to degrade, and enzymatic production of cellulases is currently unprofitable due to the high cost of commercial enzymes. The search for high-yield fungal strains and the optimization of hydrolysis conditions are approaches to overcome this deficiency. Cellulose is the most abundant natural polymer, used in various industries. Cellulases have broad industrial applications. Thus, enzymatic production using agricultural residues as a carbon source is a viable and sustainable option. Fungi, especially the genera *Aspergillus*, *Trichoderma*, and *Penicillium*, are good producers of cellulases. Solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) are methods for enzyme production, each with its advantages. SSF is simple and has a low environmental impact, while SmF allows better control of fermentation parameters. In this study, the producing of fungal cellulases from grape pomace via SSF and SmF, using *Aspergillus niger* and *Aspergillus tamarii*, was investigated. The substrate was standardized, dried, and ground, being characterized for moisture, volatile solids, and pH. Water absorption capacity was determined to adjust moisture during fermentation. The fungi were cultured and sporulated, with spore suspensions prepared and adjusted to the desired concentration. Cellulolytic activity was measured through CMC_{ase} activity, with the amount of glucose released determined by reaction with DNSA. The results showed that the highest cellulolytic activity was obtained with *Aspergillus niger* in SmF, with CMC_{ase} activity of 0.194 U/ml. It is concluded that grape pomace is a potential substrate for the production of fungal cellulases.

Keywords: Fruit bagasse, lignocellulosic biomass, agro-industrial residues, fermentation, enzymes.

INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é uma fonte renovável subutilizada e presente em abundância de forma natural ou originária de subprodutos de processos agroindustriais, podendo ser utilizada como matéria-prima promissora para a obtenção de produtos biotecnológicos de alto valor agregado. Também tem perspectiva de produzir energia, alimentos, produtos químicos e seu uso pode facilitar o desenvolvimento de variados processos e produtos (Kumar *et al.*, 2015). A produção agrícola gera grandes quantidades de resíduos anualmente, dessa forma, há um grande interesse para encontrar outras utilizações finais mais nobres e com maiores valores agregados para os resíduos lignocelulósicos agrícolas, valorizando e agregando valor aos seus ciclos produtivos. Uma dessas utilizações mais nobres estuda a possibilidade do uso dos resíduos agroindustriais quanto à sua adequação como suporte sólido, bem como fonte de carbono para o crescimento microbiano (Al Kamzari, 2023).

Dentre esses, resíduos o bagaço de uva tem se destacado, devido sua grande geração pela indústria de sucos e de vinho e o crescimento dessas indústrias em todo mundo. O bagaço de uva é gerado no processo industrial na etapa de extração do suco, sendo geralmente utilizado para ração animal ou extração de compostos com interesse para indústria de cosméticos devido sua elevada composição de compostos antioxidantes e fenólicos (Amaya-Chantaca *et al.*, 2022). Há também a possibilidade dos resíduos serem compostados ou incorporados diretamente no solo agrícola.

O bagaço de uva apresenta características típicas esperadas de um resíduo lignocelulósico, como a elevada concentração de celulose, hemicelulose e lignina na sua composição. A hemicelulose, presente na composição do bagaço, é comumente degradável e representa a principal fonte de carbono para os microrganismos. Já a celulose e a lignina apresentam diferentes padrões de degradação, sendo a lignina recalcitrante, insolúvel em água e resistente à degradação e oxidação microbiana, bem como a celulose, que é mais resistente a degradação devido a sua formação cristalina que impede a penetração de microrganismos (El Achkar *et al.*, 2016).

A sacarificação enzimática da massa lignocelulósica não é atualmente rentável, devido ao alto custo de produção de enzimas comerciais, incluindo as celulasas, por métodos de fermentação. Para superar esta deficiência, diferentes abordagens têm sido estudadas, como a busca de cepas produtoras de celulase de alto rendimento e a otimização das condições de hidrólise para a produção enzimática (Oksanen *et al.*, 2000; Kotchoni; Shonukan, 2002). O uso de enzimas para valorização de resíduos orgânicos e agroindustriais é um campo da biotecnologia que vem crescendo devido aos benefícios econômicos e ambientais que agregam aos ciclos produtivos. A hidrólise enzimática se mostra como o método de pré-tratamento mais vantajoso, tendo em vista que outros métodos de pré-tratamento, como o uso de altas concentrações de ácidos corrosivos, tóxicos e perigosos (hidrólise ácida), apresentam

desvantagens quando em comparação à mesma (Silva, 2019).

A celulose é o polímero natural mais onipresente e abundante no planeta, dada a sua presença nas plantas e seu uso generalizado em cordas, velas, papel, madeira para habitação e muitas outras aplicações. De longe, o recurso natural que contém celulose mais explorado comercialmente é a madeira (Eichhorn *et al.*, 2010). As celulases têm atraído considerável atenção da comunidade científica devido às suas amplas aplicações industriais e à natureza complexa dos sistemas enzimáticos nos quais está envolvida (Boondaeng *et al.*, 2024).

O potencial fúngico para produzir enzimas depende da espécie do fungo, do substrato de crescimento (biomassa lignocelulósica) e do método e condições de cultivo. O custo da celulase, seu rendimento e estabilidade são fatores importantes a serem considerados para sua produção comercial, dado que é uma enzima de alto valor de mercado. O custo pode ser reduzido usando biomassa naturalmente disponível como fonte de carbono. A disponibilidade, baixo custo e abundância da biomassa lignocelulósica são qualidades importantes de um substrato versátil para produção de enzimas (Singh, 2021). Além disso, é necessário um bom agente microbiano para aumentar a produção enzimática celulolítica. Vários microrganismos como bactérias, fungos, actinomicetos produzem celulase, porém, a maioria dos microrganismos explorados são fungos, devido à sua maior produção (Shruthi *et al.*, 2018; Naher *et al.*, 2021). Os fungos geralmente utilizados na produção de enzimas incluem os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* e *Phanerochaete* (Ramos-Ibarra *et al.*, 2017). Com destaque para o fungo filamentoso, *Aspergillus*, excelente produtor de exo e endoglicosidases e elevadas concentrações de β -glicosidases (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2011).

A fermentação no estado sólido (FES) é um processo para a produção *in situ* de enzimas. É vantajoso por ser simples, consumir pouca energia, ter baixo impacto ambiental e por ter um alto potencial para a produção de enzimas em grande escala (Mansour *et al.*, 2016; Chang; Webb, 2017). Por outro lado, a fermentação submersa (FS) é utilizada para a produção em larga escala de celulases, sendo mais fácil de manusear e permitindo melhor controle dos parâmetros como pH, temperatura e concentração de substrato (Sirohi *et al.*, 2019).

Dessa forma, o presente estudo visou analisar a produção de celulases fúngicas a partir de fermentação em estado sólido e fermentação submersa, utilizando o bagaço de uva obtido de um processo industrial como substrato lignocelulósico e por dois fungos, o *Aspergillus niger* URM 5741 e o *Aspergillus tamaritii* URM 4634.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A produção enzimática tem despertado grande interesse devido ao papel das enzimas na bioconversão das biomassas lignocelulósicas em bioprodutos e fontes de energia (Devi *et al.*, 2022). A celulose é um polissacarídeo natural, sendo o principal componente das paredes celulares das plantas. É um polímero linear e não ramificado de subunidades de celobiose, as quais são formadas por subunidades de glicose. As subunidades de glicose podem ser obtidas despolimerizando a celulose vegetal em seus blocos básicos menores com a ajuda de celulases, um grupo de enzimas que inclui β -glicosidases, celobiohidrolases e endoglucanases (Singhania *et al.*, 2010).

A conversão da biomassa lignocelulósica é um processo que em função das características de baixa biodegradabilidade, envolve geralmente a necessidade de três etapas: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. A primeira etapa, o pré-tratamento ajuda a quebrar o complexo lignina-hemicelulose-celulose de qualquer biomassa e o torna mais suscetível à hidrólise enzimática durante a qual as enzimas celulase e xilanase atuam nos componentes celulósicos e hemicelulósicos, convertendo-os em seus respectivos açúcares (Romero-Martínez *et al.*, 2021) e disponibilizando-os para a etapa fermentativa.

O custo das enzimas celulase é o principal contribuinte para o custo operacional de uma biorrefinaria que produz etanol a partir de material lignocelulósico, por exemplo. Portanto, a produção local de enzimas utilizando substratos de baixo valor se mostra como uma opção atrativa, contribuindo simultaneamente à sustentabilidade ambiental (Gordillo-Fuenzalida, 2019). O bagaço de uva, sendo o principal resíduo da indústria vinícola, e gerado em quantidades elevadas, representa um custo de produção elevado para o seu descarte adequado. Esse resíduo, tem demonstrado ser um substrato potencial para bioprodutos como enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases e pectinases) e biocombustíveis (Botella *et al.*, 2005; Meini *et al.*, 2021; Kurt; Cekmecelioglu, 2021).

As vantagens da fermentação em estado sólido (FES) em comparação com a fermentação submersa (FS) tradicional são melhores rendimentos, recuperação mais fácil dos produtos, ausência de formação de espuma e menores volumes de reator (Raimbault, 1998). Já a fermentação submersa (FS), apresenta vantagens dado que a agitação durante o processo desempenha um papel duplo na produção de enzimas, promovendo a distribuição uniforme de nutrientes no meio de cultura e proporcionando aeração, o que aumenta o crescimento das células fúngicas e o rendimento da enzima. (Matkar *et al.*, 2013).

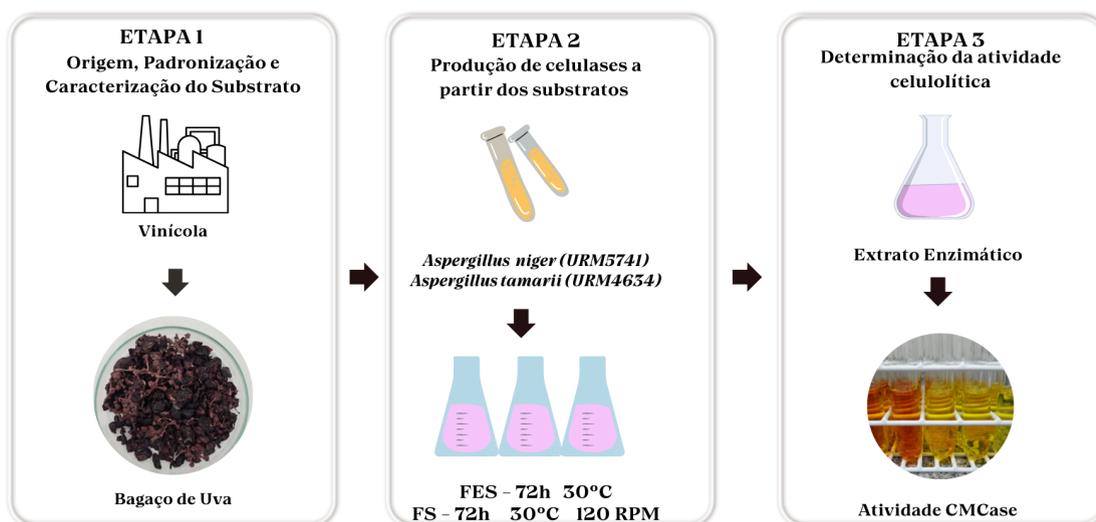
O pré-tratamento é a etapa crucial para romper a estrutura complexa da biomassa lignocelulósica. Os métodos de pré-tratamento físico e químico são de alto custo, além de poder causar contaminação secundária, gastar energia e insumos. Dessa forma, o pré-tratamento biológico,

particularmente o pré-tratamento fúngico, se torna vantajoso, tendo impacto significativo na degradação lignocelulósica devido à maior produção de enzimas lignocelulolíticas e sendo um processo economicamente viável e ambientalmente amigável (Guo *et al.*, 2022;; Sajid *et al.*, 2022; Talwar, 2023). Além do desempenho dos fungos filamentosos na produção de enzimas hidrolíticas, em relação a outros métodos, o pré-tratamento biológico também demanda menor necessidade de energia e não há acúmulo de compostos tóxicos, proporcionando aumento da produção de enzimas e oferecendo menores prejuízos (Yuan, 2014; Meini *et al.*, 2021).

METODOLOGIA

A metodologia desenvolvida para o estudo se dividiu em três etapas, sendo a primeira delas a padronização adequada do substrato, seguida da produção de celulases a partir de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). As fermentações foram realizadas utilizando o bagaço de uva Cabernet Sauvignon como substrato e fungos do gênero *Aspergillus*, sendo estes *A. niger* URM 5741 e *A. tamarii* URM 4634 como tratamento biológico. A etapa final consistiu na determinação da atividade celulolítica, estimando a produção de endoglucanase. Na Figura 01 apresenta-se a sequência metodológica proposta neste trabalho.

Figura 01. Sequência metodológica proposta neste trabalho



Fonte: Própria (2024)

Etapa 1: Origem, Padronização e Caracterização do Substrato

O substrato lignocelulósico utilizado para análise de desempenho foi o bagaço de uva (Cabernet Sauvignon). O bagaço de uva utilizado foi obtido da vinícola Vale das Colinas, localizado

na cidade de Garanhuns, agreste do estado de Pernambuco. O bagaço foi obtido diretamente da etapa de extração do suco, após a etapa de pré-fermentação do mosto.

O bagaço foi coletado e congelado a -5 ± 1 °C, transportado nesta temperatura até o Laboratório NUBIOTEC/UFRPE, onde ficou armazenado, nesta temperatura, até sua utilização. O procedimento de padronização, teve início com a remoção da umidade do substrato em estufa (Tecnal, modelo TE - 393) com temperatura estabelecida em 65 ± 1 °C, seguindo com medições em balança analítica a cada 24 horas, até o peso ser estabilizado. Após a secagem, o substrato foi triturado em moinho de facas (Tyler, TE-625/1) e padronizado em peneiras granulométricas de Mesh 10 e Mesh 32, sendo armazenado em ambas as granulometrias. Após a padronização, o substrato seco foi caracterizado através de parâmetros de umidade (%), Sólidos Totais Voláteis e pH, conforme WHO (1978). O teor de fibras (celulose, hemicelulose e lignina) seguiu a metodologia de Senger et al. (2008).

Para a análise de pH, foi utilizado o extrato solubilizado, contendo 12,5 gramas de substrato diluído em 75 ml de água destilada (NBR 10006, 2004). Na Figura 02 apresenta-se o aspecto do bagaço de uva bruto, seco.

Figura 02. Amostra do bagaço de uva seco em estufa .



Fonte: Própria (2024)

Etapa 2: Produção de celulases a partir do substrato

Determinação das Características de Absorção de Água do Substrato

Foi adicionado um grama de substrato, pesado em balança analítica, em béqueres previamente tarados. A partir disso, foi adicionado 0,5 ml de água destilada, em frações, com a utilização de um pipetador automático. Após cada adição de 0,5 ml, foi realizada a homogeneização do substrato até que houvesse formação de água livre no fundo do béquer. O volume adicionado até a formação de

água livre é o equivalente à capacidade de absorção de água do substrato, representando também o estado de 100% de umidade presente. Este parâmetro permite o controle de umidade durante a fermentação.

O cálculo da umidade do substrato para a FES e para a FS foi feito através de uma regra de três simples, em que o ponto de 100% de umidade para um grama de substrato é colocado como padrão comparativo para quaisquer outros valores de umidade requeridos.

Obtenção dos Microrganismos

Foram escolhidos dois fungos do gênero *Aspergillus* para comparação do índice de atividade celulolítica: *Aspergillus niger* URM 5741 e *Aspergillus tamarii* URM 4634. Os microrganismos utilizados foram oriundos da coleção de culturas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O meio de cultura utilizado para a manutenção das linhagens de microrganismos foi o Ágar Extrato de Malte, havendo o replique dos mesmos a cada trinta dias. O meio de cultura utilizado para esporulação das culturas foi o Czapek (contendo 2,0 g/L de NaNO₃, 0,5 g/L MgSO₄, 0,5 g/L KCl, 0,01 FeSO₄, 1,0 g/L K₂HPO₄, 30 g/L de sacarose, 30g/L de ágar) (Klich, 2002). A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 121°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos. O crescimento fúngico ocorreu em incubadora (Tecnal, modelo TE – 371) a 30°C, durante sete dias. Durante o período de seleção do microrganismo, as espécies *A.niger* e *A. tamarii* foram repicadas em frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultura Czapek e incubadas a 30°C por sete dias, como descrito anteriormente.

Extração e Contagem de Esporos

As suspensões de esporos foram obtidas a partir da adição de 15 ml de solução de NaCl (0,9% p/v) e Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizada. A solução salina estéril foi adicionada em frascos Erlenmeyer contendo os fungos esporulados. Cada suspensão foi transferida para um tubo de ensaio vazio, sendo identificado com o nome do fungo presente na solução. Após a coleta dos esporos, foi realizada a contagem microscópica em câmara de Neubauer.

Houve a contagem dos esporos de cinco quadrantes da malha da câmara e em seguida foram somados os valores de cada quadrante e multiplicado por 5, seguido pela multiplicação do fator de diluição da câmara (10⁴). Foi calculada uma quantidade suficiente para alcançar a concentração final de 10⁷ esporos/mL a partir da utilização da Equação 1.

$$C1.V1 = C2.V2 \quad (\text{Eq.1})$$

Fermentação em Estado Sólido (FES)

Na etapa de cultivo da FES, o teor de umidade foi ajustado para 70% através da adição do meio nutriente (2 g/L de KH_2PO_4 , 1,4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,30 g/ CaCl_2 , 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0 g/L, 2 g/L extrato de levedura, 0,30 g/L ureia, 0,10% de Tween 80 e 0,10% de solução salina (5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e CoCl_2 2,0 mg/L)) enriquecido com 30 g/L de glicose, em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 3g do substrato. Foi adicionado um volume de suspensão de esporos resultando em uma concentração de 10^7 esporos por grama de substrato seco, com o cultivo sendo mantido com FES sob condições estáticas por 72 horas, a 30°C .

Fermentação Submersa (FS)

Para a FS, um volume de solução nutriente com a mesma composição descrita anteriormente foi adicionado, seguindo 40 ml de meio nutriente por grama de fermentado sólido, com o cultivo, sendo continuado em incubadora orbital (Shaker Tecnal, modelo TE – 424) por 72 horas, à 30°C , com agitação contínua a 120 rpm.

Etapa 3. Determinação da atividade celulolítica

A atividade celulolítica foi determinada através da atividade de endoglucanase (CMCase), segundo Ghose (1987). Para determinação da atividade de endoglucanase (CMCase) foi utilizada como substrato a carboximetilcelulose sódica a 1%, em tampão citrato 0,05 M (pH 4,8). O substrato (0,5 mL) foi colocado em tubos de ensaio, com posterior adição de 0,5 mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C , durante 30 min. Em seguida, a quantidade de glicose liberada foi dosada pela reação com DNSA. Em ambas as atividades foram utilizados controles da reação colorimétrica (branco da enzima) e do substrato (branco da reação). As absorbâncias foram convertidas em glicose, mediante reta padrão previamente estabelecida. Uma unidade internacional (UI) foi considerada equivalente a 1 μmol de glicose liberada por minuto. A quantificação da atividade foi realizada através da leitura em espectrofotômetro a 540 nm de absorbância. A quantidade de glicose liberada foi identificada através da reação com ácido dinitrosalicílico (DNSA), seguindo os parâmetros de Miller (1959). Para o cálculo da atividade de endoglucanase (CMCase) foi utilizada a Equação 2.

$$A \text{ (U/ml)} = ((\text{AR}/180) \times 1000) / t / v \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

A (U/ml) = Atividade de CMCase ou FPase (U/ml)

AR = Concentração de Açúcares Redutores (U/ml)

t = Tempo de Reação (min)

v = Volume de extrato enzimático utilizado (ml)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização e composição do substrato

Foi realizada a caracterização do substratos utilizado para a FS e FS, tendo em vista que suas características físico-químicas podem influenciar na eficiência tanto da FES quanto da FS e nos resultados de produção enzimática (Tabela 1).

Tabela 01: Caracterização do bagaço de uva (substrato)

Parâmetro	Bagaço uva	
pH	3,61±0,00	
Umidade (%)	46,59±0,77	
Sólidos Totais Voláteis (%)	88±0,47	
Fibras (%)	Celulose	10,71±2,65
	Hemicelulose	8,07±2,13
	Lignina	36,79±9,62

Fonte: Própria (2024)

O bagaço de uva obteve pH ácido (em média, 3,61±0,00) característico para resíduos de frutas. Achmon *et al.* (2019) e Castro *et al.* (2024) ao estudarem a caracterização do bagaço de uva encontraram valor próximo de pH (4,25 e 3,54, respectivamente).

Quanto à umidade, o bagaço de uva apresentou um resultado relativamente alto (em média, 46,59%±0,77). Negro *et al.* (2021), encontraram valor de umidade inferior (em média, 9,2%±0,5) para bagaço de uva em seus estudos. Em contraste, Castro *et al.* (2024) relatam valor superior de umidade (66,20%) para bagaço de uva. A diferença entre os resultados pode ter sido ocasionada por diferentes fatores, como o local de crescimento das uvas (San Pietro Vernotico, Itália) e os processos pelos quais o substrato passou antes de ser analisado (tendo em vista que o resíduo estudado não passou por processos físico-químicos prévios, diferente da utilizada para a produção de vinhos).

Em relação aos sólidos totais voláteis, os resultados mostraram que o bagaço de uva apresentou valor elevado (88%±0,47) valor similar foi obtido por Almeida *et al.* (2022) que obteve valor de 90,1%. Entretanto, valor inferior de sólidos totais voláteis (71,19% e 70,30%) foram reportados por outros autores para o bagaço de uva (Farru *et al.*, 2022; Ruiz *et al.*, 2023).

É importante enfatizar que o sólidos totais voláteis é um parâmetro importante pois, mede de forma indireta a matéria orgânica passível de degradação por microrganismos em processos

biotecnológicos. O valor obtido esteve dentro das faixas reportadas na literatura, que variam em relação a cultura e variedade além das condições de cultivo e processo de extração.

Os valores encontrados em relação a composição de fibras foram de 36,79%±9,62 de lignina, 10,71%±2,65 de celulose e 8,07±2,13 de hemicelulose, sendo caracterizado como um resíduo lignocelulósico de difícil degradação (recalcitrante). Os resultados do estudo foram inferiores aos relatados por Almeida *et al.* (2022) para os teores de lignina (50,6%), celulose (19,0%) e hemicelulose (9,8%) do bagaço de uva.

A variação na composição de fibras no bagaço de uva pode ser influenciada tanto pelo tipo da uva utilizada como substrato, condições de manejo do campo, condições ambientais locais, bem como quanto através das condições às quais o substrato foi submetido (processo de extração industrial).

Produção de enzimas celulolíticas

Os resultados da atividade enzimática para a produção de celulases fúngicas através da FES e FS, utilizando como o substrato do bagaço de uva Cabernet Sauvignon e duas espécies diferentes do gênero *Aspergillus* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 02. Atividade enzimática celulolítica

Microrganismo	Fermentação	Atividade de CMC _{Case} (UI/g)
<i>Aspergillus niger</i>	FES	0,039
	FS	0,194
<i>Aspergillus tamarisii</i>	FES	0,055
	FS	0,061

Legenda: FES: Fermentação em estado sólido; FS: Fermentação submersa

Fonte: Própria (2024)

Pode-se observar que *A. niger* apresentou produção de celulase mais eficiente em condições de FS, enquanto *A. tamarisii* mostrou uma produção maior de celulase em FES utilizando bagaço de uva como substrato. Isso sugere que as duas espécies de fungos respondem de maneiras diferentes às condições de cultivo e ao substrato utilizado. A maior atividade celulolítica foi obtida utilizando o bagaço de uva como substrato: 0,194 UI/ml de CMC_{Case} com *Aspergillus niger* em FS e 0,061 UI/ml de CMC_{Case} com *A. tamarisii* em FES. Kurt (2023), encontrou resultados semelhantes em sua atividade de CMC_{Case}, obtendo 0,178 IU/mL como resultado máximo na FS utilizando o bagaço de uva como substrato, a qual teve duração de 7 dias. No entanto, seu estudo foi conduzido com células bacterianas, e não fúngicas.

Em contraste, resultados superiores de produção de celulase (2,0 UI/ml) por *Aspergillus* sp. foram reportados por Sosa-Martínez et al. (2022) ao utilizarem o bagaço de uva como substrato na FES

durante 4 dias sob temperatura de 30°C. Meini, Ricardi e Romanini (2020) obtiveram valor menor de produção de celulase (0,00038 UI/ml) por *A. niger* com bagaço de uva através de FS sob agitação orbital de 120 rpm, 30°C.

A comparação entre os métodos de fermentação mostrou que, embora a FS ofereça melhores condições para o controle de parâmetros operacionais e distribuição de nutrientes, a FES pode ser uma alternativa mais sustentável e de menor custo, especialmente para aplicações em escalas industriais. Dessa forma, a escolha do método de fermentação deve considerar tanto a eficiência de produção enzimática quanto os aspectos operacionais, econômicos e ambientais.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou o potencial promissor do bagaço de uva como substrato lignocelulósico para a produção de enzimas celulolíticas, utilizando dois processos distintos de fermentação: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). Através da análise comparativa, observou-se que o *Aspergillus niger*, quando cultivado em FS, apresentou a maior atividade celulolítica (CMCase de 0,194 U/ml).

A caracterização do substrato revelou importantes variáveis físico-químicas que influenciam diretamente a eficiência dos processos fermentativos. A alta umidade e a presença significativa de sólidos voláteis no bagaço de uva, juntamente com a composição de celulose e hemicelulose, destacam a viabilidade do uso deste resíduo agroindustrial como fonte de carbono e como suporte sólido para o crescimento microbiano. Além disso, a elevada concentração de lignina identificada pode ser um fator limitante na degradação total da biomassa, sugerindo a necessidade de otimizações específicas no pré-tratamento biológico para melhorar a eficiência da hidrólise enzimática.

Foi possível concluir que utilização de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de uva, em processos de fermentação para a produção de celulases é uma abordagem promissora e mais sustentável. Destaca-se a necessidade da continuidade do desenvolvimento de processos biotecnológicos mais eficientes e de maior viabilidade ambiental, promovendo a valorização de resíduos agroindustriais, agregando valor aos ciclos produtivos e a redução da dependência de recursos não-renováveis.

REFERÊNCIAS

ACHMON, Y.; CLAYPOOL, J. T.; PACE, S.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W.; SIMMONS, C. W. Assessment of biogas production and microbial ecology in a high solid anaerobic digestion of major California food processing residues. **Bioresource technology reports**, v. 5, p. 1-11, 2019.

AL KAMZARI, S. M. A.; NAGESWARA RAO, L.; LAKAVAT, M.; GANDI, S.; REDDY, P. S.; KAVITHA SRI, G. Extraction and characterization of cellulose from agricultural waste materials. **Materials Today: Proceedings**, v. 80, n. 3, p. 2740-2743, 2023.

AMAYA-CHANTACA, D. et al. Comparative extraction study of grape pomace bioactive compounds by submerged and solid-state fermentation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 1494-1505, 2022.

ALMEIDA, P. V.; RODRIGUES, R. P.; SLEZAK, R.; QUINA, M. J. Effect of phenolic compound recovery from agro-industrial residues on the performance of pyrolysis process. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 10, p. 4257-4269, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10.006. Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro. 2004.

BOONDAENG, Antika; KEABPAI, Jureeporn; TRAKUNJAE, Chanaporn; VAITHANOMSAT, Pilanee; SRICHOLA, Preeyanuch; NIYOMVONG, Nanthavut. Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus* sp. IN5: Parameter optimization and application. **Heliyon**, v. 10, n. 5, p. 1-9, 2024.

BOTELLA, C.; ORY, I. de; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 100-106, 2005.

CASTRO, L. E. N.; BARROSO, T. L. C. T.; SGANZERLA, W. G.; COSTA, J. M., SAIA, F. T.; COLPINI, L. M. S.; FORSTER-CARNEIRO, T. Subcritical water hydrolysis of grape pomace as a sustainable pretreatment for anaerobic digestion in a biorefinery concept. **Fuel**, v. 363, p. 130899, 2024.

CHANG, C. W.; WEBB, C. Production of a generic microbial feedstock for lignocellulose biorefineries through sequential bioprocessing. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 35-43, 2017.

DEVI, R.; KAPOOR, S.; THAKUR, R.; SHARMA, E.; TIWARI, R. K.; JOSHI, S. J. (2022). Lignocellulolytic enzymes and bioethanol production from spent biomass of edible mushrooms using *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-15.

EICHHORN, S. J.; DUFRESNE, E. A.; ARAGUREN, E. M.; MARCOVICH, E. N. E.; CAPADONA, E. J. R.; ROWAN, E. S. J. Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 45, p. 1-33, 2016.

EL ACHKAR, J. H.; LENDORMIA, T.; SALAMEH, D.; LOUKA, N.; MAROUN, R. G.; LANOISELLÉ, J. L.; HOBAlKA, Z. Influence of pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 881-889, 2018.

FARRU, G.; CAPPAL, G.; CARUCCI, A.; DE GIOANNIS, G.; ASUNIS, F.; MILIA, S.; SERPE, A. A. Cascade biorefinery for grape marc: Recovery of materials and energy through thermochemical and biochemical processes. **Science of The Total Environment**, v. 846, p. 157464, 2022.

GORDILLO-FUENZALIDA, Felipe; ECHEVERRIA-VEGA, Alex; CUADROS-ORELLANA, Sara;

FAUNDEZ, Claudia; KAHNE, Thilo; MORALES-VERA, Rodrigo. Cellulases production by *Trichoderma sp.* using food manufacturing wastes. **Applied Sciences**, v. 9, p. 1-12, 2019.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GUO, Z.; YANG, Q.; ZHOU, W.; XIAO, N.; CAI, J. Effect of three kinds of biological pretreatments on substrate characteristics and sugar yield by enzymatic hydrolysis of *Eichhornia crassipes* biomass. **Bioresource Technology**, v. 17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100983>.

KLICH, M. A. Identification of Common *Aspergillus* Species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures**, The Netherlands, p. 116-116, 2002.

KOTCHONI, O. S.; SHONUKAN, O. O. Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in *B. pumilis*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 18, p. 487-491, 2002.

KUMAR, A.; KUMAR, N.; BAREDAR, P.; SHUKLA, A. A review on biomass energy resources, potencial, conversion and policy in India. **Renewables and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 530-539, 2015.

KURT, A. S.; CEKMECELIOGLU, D. Bacterial cellulase production using grape pomace hydrolysate by shake-flask submerged fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, p. 6981-6998, 2023.

MANSOUR, A. A.; ARNAUD, T.; LU-CHAU, T.A.; FDZ-POLANCO, M.; MOREIRA, M. T.; RIVERO, J. A. C. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 15, p. 31-46, 2016.

MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 24-33, 2013.

MEINI, M.R.; RICARDI, L. L.; ROMANINI, D. Novel routes for valorisation of grape pomace through the production of bioactives by *Aspergillus niger*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 6047-6055, 2020.

MEINI, M.R.; CABEZUDO, I.; GALETTO, C. S.; ROMANINI, D. Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Food bioscience**, v. 42, p. 1-11, 2021.

NAHER, L.; FATIN, S. N.; SHEIKH, M. A. H.; AZEEZ, L. A.; SIDDIQUEE, S.; ZAIN, N. M.; KARIM, S. M. R. Cellulase enzyme production from filamentous fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in submerged fermentation with rice straw. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 868-878, 2021.

NEGRO, C.; APRILE, A.; LUVISI, A.; BELLIS, L.; MICELI, A. Antioxidant activity and polyphenols characterization of four monovarietal grape pomaces from Salento (Apulia, Italy).

Antioxidants, v. 10, p. 1-14, 2021.

OKSANEN, T.; PERE, J.; PAAVILAINEN, L.; BUCHERT, J.; VIIKARI, L. Treatment of recycled kraft pulps with *T. reesei* hemicellulases and cellulases. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 39–48, 2000.

RAMOS-IBARRA, J. R.; MIRAMONTES, C.; ARIAS, A.; ARRIOLA, E.; GUATEMALA, G.; CORONA-GONZÁLEZ, R. I. Production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation with new fungal strains using orange by-products. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 19-31, 2017.

RAIMBAULT, Maurice. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 1-15, 1998.

RODRIGUEZ- ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; COURI, V. B. N. S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROMERO-MARTÍNEZ, N; RAMOS-ZAMBRANO, E.; OSORIO-RUIZ A.; MARTÍNEZ-AYALA, A. L. Main Mechanisms of Action of Policosanol in Animal and Plant Cells. **International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences**, v. 10, p. 10-20, 2021.

RUIZ, L. M.; FERNÁNDEZ, M. GENARO, A.; MARTÍN-PASCUAL, J.; ZAMORANO, M. Multi-Parametric Analysis Based on Physico-Chemical Characterization and Biochemical Methane Potential Estimation for the Selection of Industrial Wastes as Co-Substrates in Anaerobic Digestion. **Energies**, v. 16, n. 14, p. 5444, 2023.

SAJID, S.; KUDAKWASHE, Z.O.; RESCO DE DIOS, V.; NABI, F.; LEE, Y. K.; KALERI, A.R.; MA, L.; ZHOU, L.; ZHANG,W.; WONG, F.; HAN, Y. Pretreatment of rice straw by newly isolated fungal consortium enhanced lignocellulose degradation and humification during composting. **Bioresource Technology**, v. 354, 2022.

SHRUTHI, K.; YADAV, P. S.; PRASAD, B. V. S.; CHANDRA, M. S. Cellulase production by *Aspergillus unguis* in solid state fermentation. **Journal of Forestry Research**, v. 30, p. 205-212, 2018.

SILVA, A. F. V.; SANTOS, L. A.; VALENÇA, R. B.; PORTO, T. S.; DA MOTTA SOBRINHO, M. A.; GOMES, G. J. C.; JUCÁ, J. F. T.; SANTOS, A. F. M. S. Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 6, p. 1-8, 2019.

SINGH, Anita; BAJAR, Somvir; DEVI, Arti; BISHNOI, Narsi R. Evaluation of cellulase production from *Aspergillus niger* and *Aspergillus heteromorphus* under submerged and solid-state fermentation. **Environmental Sustainability**, v. 4, p. 437-442, 2021.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SIROHI, R.; SINGH, A.; TARAFDAR, A.; SHAHI, N. C.; VERMA, A. K.; KUSHWAHA, A. Cellulase production from pre-treated pea hulls using *Trichoderma reesei* under submerged

fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 9, p. 2651-2659, 2019.

SOSA-MARTÍNEZ, J. D. et al. Agroindustrial and food processing residues valorization for solid-state fermentation processes: A case for optimizing the co-production of hydrolytic enzymes. **Journal of Environmental Management**, v. 347, p. 119067, 2023.

TALWAR, Prakhar; UPADHYAY, Apoorva; VERMA, Nikita; SINGH, Rickwinder; LINDENBERGER, Cristoph; PAREEK, Nidhi; KOVALEV, Andrey A.; ZHURAVLEVA, Elena A.; LITTI, Yuriy V.; MASAKAPALLI, Shyam Kumar; VIVEKANAND, V. Utilization of agricultural residues for energy and resource recovery towards a sustainable environment. **Environmental Science Pollution Research**, 2023.

YUAN, Xufeng; WEN, Boting; MA, Xuguang; ZHU, Wanbin; WANG, Xiaofen; CHEN, Shaojiang; CUI, Zongjun. Enhancing the anaerobic digestion of lignocellulose of municipal solid waste using a microbial pretreatment method. **Bioresourse Technology**, v, 154, p. 1-9, 2014.