

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NICOLE FORLIN ZULIAN

**OBTENÇÃO DE PECTINASES EM CULTIVO SUBMERSO A PARTIR DE
EXTRATOS AQUOSOS DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE MAÇÃS**

CAXIAS DO SUL
2024

NICOLE FORLIN ZULIAN

**OBTENÇÃO DE PECTINASES EM CULTIVO SUBMERSO A PARTIR DE
EXTRATOS AQUOSOS DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE MAÇÃS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade de Caxias do
Sul, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Engenharia Química.
Orientadora Prof. Dra. Eloane Malvessi

CAXIAS DO SUL

2024

NICOLE FORLIN ZULIAN

**OBTENÇÃO DE PECTINASES EM CULTIVO SUBMERSO A PARTIR DE
EXTRATOS AQUOSOS DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DE MAÇÃS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade de Caxias do
Sul, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Engenharia Química.
Orientadora Prof. Dra. Eloane Malvessi

Banca Examinadora

Prof. Dra. Eloane Malvessi
Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Matheus Poletto
Universidade de Caxias do Sul

Larissa Fernanda Finazzi da Costa
Universidade de Caxias do Sul

*Dedico a minha prima Érica.
Sua luz e alegria nunca serão esquecidas!
Saudade dói, mas sigo na certeza de que um
dia a gente se encontra.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aquele que nunca me abandonou, que está presente no meu coração e em todas as minhas orações. Obrigada meu Deus, por me permitir viver tantos momentos incríveis e por colocar em meu caminho pessoas sensacionais durante a minha graduação.

À minha família, mas em especial a minha mãe por nunca me deixar desistir e sempre acreditar no meu potencial, mesmo quando nem eu mesma acreditei! Mãe, obrigada por cada palavra de apoio. Jamais esquecerei de todo o seu esforço e amor! Você foi a peça fundamental para que o nosso sonho se realizasse. Conseguimos, mãe!

Ao amor da minha vida e tão logo o melhor cirurgião dentista que esse mundo já viu, Matheus, que mesmo distante se faz presente em todos os momentos. Meu amor, você foi o meu alicerce nos dias mais difíceis, obrigada por me ouvir e nunca me deixar cair. É com você que encontro coragem para enfrentar os desafios de cabeça erguida, sempre visando o futuro maravilhoso que nos espera. Admiro muito o homem incrível, responsável e dedicado que você está se tornando e tenho absoluta certeza de que as nossas conquistas estão apenas começando. Te amo com todo o meu coração, e cada dia mais!

Às minhas amigas, os meus maiores presentes da graduação em engenharia química, Bianca, Eduarda, Ingrid e Vitória, sem vocês essa caminhada não teria sido tão especial quanto foi, vocês fizeram os últimos semestres se tornarem os melhores desses anos e a caminhada ser muito mais leve e boa de se viver. Sei que as quatro terão um futuro brilhante pela frente, espero compartilhar muitas conquistas com vocês! Estarei sempre aqui torcendo e aplaudindo vocês!

À minha querida orientadora, Prof. Dra Eloane Malvessi, que me ensinou muito durante esse ano juntas. Obrigada por aceitar esse desafio, por toda a troca de conhecimento e por dividir suas experiências profissionais e pessoais comigo. É perceptível o tanto que você ama o que faz!

Ao Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul (LBIO), em especial à Sabrina Carra por toda a ajuda no laboratório e pela amizade que levarei comigo para sempre. A todos os estagiários e bolsistas que sempre estiveram dispostos a me auxiliar durante as análises, vocês foram fundamentais em cada etapa! Todos os dias em que estive no laboratório eu me senti em casa!

À Döhler Antônio Prado, que gentilmente cedeu os subprodutos da produção do suco de maçã e em especial a minha supervisora, Ana Paula Marin, por todo apoio e pela amizade que construímos nesses últimos meses, também pela compreensão todas as vezes que precisei me ausentar para que a realização desse trabalho fosse possível. Muito obrigada!

RESUMO

O bagaço de maçã consiste em um dos subprodutos da extração industrial de suco das frutas. Estima-se que em 100 kg de maçãs processadas, em média, 35 kg resultem em resíduos, sendo compostos por sementes, cascas e o próprio bagaço. Na composição do bagaço são identificadas substâncias solúveis e insolúveis como, por exemplo, os sacarídeos e as substâncias pécticas, respectivamente. As pectinases são enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes nas plantas, resultando em moléculas menores, como oligossacarídeos e monossacarídeos. Essas enzimas são produzidas via rota fermentativa, principalmente por fungos do gênero *Aspergillus*, sendo induzidas pela presença de substâncias pécticas no meio. Devido ao alto valor das pectinases comercializadas, é necessária a busca por alternativas para a redução dos custos globais do processo. Dentre estes gargalos, destaca-se a utilização de indutores naturais, o que uniria baixo custo e agregação de valor aos resíduos agroindustriais, tornando o processamento da maçãs e a produção de pectinases mais sustentáveis. Neste sentido, a cinética do processo de obtenção de pectinases foi avaliada frente ao uso de diferentes resíduos do processamento de maçãs das variedades Gala e Fuji, em cultivos submersos de *Aspergillus oryzae* IPT-301. Na composição do meios, foram empregados extratos aquosos referentes aos dois tipos de resíduos (bagaço e sementes/cascas de maçãs), com a adição de glicose e sais nutrientes, e comparados com o uso de pectina comercial. Perfis de crescimento celular superiores foram observados em meios contendo os extratos naturais, com valores de biomassa de 17,2, 15,1 e 9,4 g/L para os meios contendo extratos de sementes/cascas, bagaço e pectina comercial, respectivamente. Com relação à produção de pectinases, o pico de atividade foi atingido em 96 horas, de 0,52 U/mL, com o uso de resíduo composto por sementes/cascas, enquanto para o extrato aquoso de bagaço de maçãs e pectina comercial, as atividades máximas foram de 0,46 e 0,38 U/mL, em 120 horas, respectivamente. Valores residuais correspondentes à açúcares não fermentescíveis foram quantificados em todos os meios, aspecto característico de meios de alta complexidade nutricional. De forma geral, destaca-se a aplicabilidade destes extratos aquosos no processo produtivo de pectinases como forma de promoção da energia circular e de destinação sustentável dos resíduos gerados no processamento de frutas no Brasil, o que vem ao encontro dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), Agenda 2030, da Organização das Nações Unidas (ONU).

Palavras-chave: pectinases; cultivo; *Aspergillus oryzae*; indução; resíduos do processamento de maçãs.

ABSTRACT

Apple pomace is one of the by-products of the industrial extraction of juice from fruits. It is estimated that in 100 kg of processed apples, on average, 35 kg result in residues, being composed of seeds, peels and the pomace itself. In the composition of the apple pomace, soluble and insoluble substances are identified, such as saccharides and pectic substances, respectively. Pectinases are enzymes that catalyze the degradation of pectic substances present in plants, resulting in smaller molecules such as oligosaccharides and monosaccharides. These enzymes are produced via the fermentation route, mainly by fungi of the genus *Aspergillus*, being induced by the presence of pectic substances in the medium. Due to the high value of commercialized pectinases, it is necessary to search for alternatives to reduce the overall costs of the process. Among these bottlenecks, the use of natural inducers stands out, which would combine low cost and added value to agro-industrial waste, making the processing of apples and the production of pectinases more sustainable. In this form, the kinetics of the pectinase production were evaluated against the use of different residues from the processing of Gala and Fuji apples in submerged cultures of *Aspergillus oryzae* IPT-301. In the composition of the media, aqueous extracts referring to the two types of residues (apple pomace and apple seeds/peels) were used, with the addition of glucose and nutrient salts, and compared with the use of commercial pectin. Superior cell growth profiles were observed in media containing natural extracts, with biomass values of 17.2, 15.1 and 9.4 g/L for media containing extracts of seeds/peels, apple pomace and commercial pectin, respectively. Regarding the production of pectinases, the peak activity was reached in 96 hours, of 0.52 U/mL, with the use of residue composed of seeds/peels, while for the aqueous extract of apple pomace and commercial pectin, the maximum activities were 0.46 and 0.38 U/mL, in 120 hours, respectively. Residual values corresponding to non-fermentable sugars were quantified in all media, a characteristic aspect of media of high nutritional complexity. In general, the applicability of these aqueous extracts in the pectinase production process is highlighted as a way to promote circular energy and sustainable disposal of waste generated in fruit processing in Brazil, which meets the Sustainable Development Goals (SDGs), 2030 Agenda of the United Nations (UN).

Keywords: pectinases; cultivation; *Aspergillus oryzae*; induction; residues from apple processing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).....	17
Figura 2 – Estrutura da parede celular vegetal representando o arranjo das moléculas de pectina e celulose.....	21
Figura 3 – Estrutura molecular da pectina.....	21
Figura 4 – Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas.....	23
Figura 5 – Maçãs <i>in natura</i> processadas no momento da coleta [A] e grau de maturação das maçãs <i>in natura</i> [B].....	30
Figura 6 – Fluxograma das coletas realizadas <i>in loco</i>	31
Figura 7 – Resíduo composto pelo bagaço [A] e resíduo composto pelas sementes e cascas [B].....	32
Figura 8 – Placa com a cultura crescida de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301.....	33
Figura 9 – Representação do cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em frascos Erlenmeyer, conduzidos em agitadores de bancada.....	35
Figura 10 - Separação da biomassa do meio fermentado por filtração a vácuo [A] e papel filtro com biomassa úmida antes da secagem [B].....	36
Figura 11 – Amostras de cultivos antes da centrifugação [A] e após a centrifugação [B].....	36
Figura 12 – Amostras prontas para leitura em espectrofotômetro a 545 nm.....	37
Figura 13 - Variação das concentrações de biomassa em função do tempo de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.....	40
Figura 14 - Perfil de pH em função do tempo de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.....	41
Figura 15 - Variação das concentrações de açúcares redutores (AR) [A] e açúcares redutores totais (ART) [B] em função do tempo de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.....	43
Figura 16 - Atividade de pectinases totais em função do tempo de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valor nutricional das variedades Gala e Fuji em 100 g da fruta.....	16
Tabela 2 – Composição do meio de cultivo para produção de pectinases.....	33
Tabela 3 – Parâmetros de avaliação do cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.....	45

LISTA DE FIGURAS

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	10
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 MAÇÃ.....	15
2.1.1 Variedades Gala e Fuji	16
2.1.2 Processamento da maçã na indústria e geração de resíduos.....	17
2.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.....	19
2.4 COMPLEXO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO	20
2.4.1 Substâncias pécticas.....	20
2.4.2 Classificação e mecanismo de ação das pectinases	22
2.5 APLICAÇÕES DE PECTINASES.....	23
2.6 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM CULTIVO SUBMERSO.....	25
2.6.1 Fatores que influenciam a produção de pectinases fungicas em cultivo submerso	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 COLETA, PREPARO E PROCESSAMENTO DE MAÇÃ	30
3.7.1 Conservação.....	32
3.7.2 Cultivos submersos	33
3.8.1 Preparo da suspensão de esporos.....	34

3.8.2	Cultivos em frascos sob agitação	34
3.9.1	Concentração celular e pH	35
3.9.2	Açúcares redutores livres (AR)	37
3.9.3	Açúcares redutores totais (ART).....	37
3.9.4	Atividade de pectinases.....	38
3.10	PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

O principal subproduto na agroindústria da maçãs, o bagaço, é gerado no processo de extração de sucos. Em geral, 35% da fruta prensada para a produção de suco se tornam resíduos, como bagaço, cascas e sementes. Com o emprego de tecnologias mais modernas resultam em uma relação de 84% de suco e 16% de bagaço (Cultivo, 2014). Esse resíduo abundante da indústria de sucos, possui em sua composição nutricional 85% de carboidratos - sendo de 10 a 15% de pectina - e 15% de proteínas (Reid *et al.*, 1999), com 12,3% de açúcares fermentescíveis (Hang; Woodams, 1986), nutrientes que proporcionam diversas aplicações.

Na literatura identificam-se diversas aplicações para o bagaço de maçã, que incluem alimentação animal, sua modificação e/ou incorporação em alimentos (Pezini, 2023), na obtenção de aromas (Pinto, 2017), produção de butanol (Tigunova *et al.*, 2023) gás natural, ácido cítrico, pectinas (Fertonani, 2006), enzimas, cogumelos, extração de álcool e fibras (Paganini, 2005), produção de carvão vegetal (Oliveira, 2021) e produção de etanol por cultivo em estado sólido (Ngadi; Correia, 1992). Além disso, por ser rico em pectina, o bagaço de maçã torna-se um substrato aplicável para a produção de pectinases.

Pectinases são enzimas utilizadas na indústria de sucos. Estas enzimas atuam na degradação de moléculas longas e complexas denominadas de pectina, que são polissacarídeos estruturais presentes na lamela média das paredes primárias das células vegetais, resultando em moléculas menores, como oligossacarídeos e monossacarídeos (Kashyap, 2001).

A produção de pectinases em cultivo submerso é a mais estudada tendo em vista a maior possibilidade de controles de parâmetros operacionais do processo. A síntese de pectinases envolve a utilização de substratos específicos que induzem a produção das enzimas por microrganismos (Reginatto, 2016). Esses indutores, podem ser provenientes de produtos comerciais purificados ou da reutilização de resíduos industriais ricos em pectina. Essa prática, por sua vez, não só contribui para a redução de custos de produção das enzimas, mas também promove a sustentabilidade ao destinar esses subprodutos (De Luca, 2024).

Este trabalho foi direcionado para uma empresa de bebidas que tem o suco de maçã como um dos principais produtos em seu portfólio. Atualmente, o bagaço é totalmente cedido a terceiros, destinado gratuitamente para compostagem.

Segundo dados cedidos pela empresa, no ano de 2024 foram destinadas aproximadamente 1,615 toneladas deste tipo de resíduo. Assim, considerando o modelo de economia circular e dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) – com foco no objetivo 12 (consumo e produção responsáveis) que é especialmente voltado à gestão de resíduos - considerou-se a possibilidade de destinar os resíduos do processamento de maçãs para a produção de pectinases, sendo necessário um estudo a respeito da produção da enzima pectinase. Atualmente, devido ao processo de clarificação dos sucos, a pectinase é uma das enzimas mais utilizadas na empresa, sendo adquirida comercialmente.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a cinética do processo de produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 a partir de resíduos industriais do processamento de maçãs.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil cinético de crescimento, de pH e de consumo de substratos em cultivo fúngico com o uso de pectina comercial e com extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.
- Avaliar comparativamente o efeito da substituição da fonte de indução comercial – pectina – por resíduos do processamento da maçã sobre a secreção de pectinases.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MAÇÃ

A maçã é a fruta de clima temperado mais amplamente distribuída, comercializada e consumida como fruta fresca no mundo. Segundo a Faostat (2021), a maçã é a terceira fruta mais produzida globalmente (93 milhões de toneladas), superada apenas por bananas (125 milhões de toneladas) e melancias (102 milhões de toneladas). Embora a maçã seja típica de climas temperados, a fruta se adapta a diversas condições climáticas. A fruta é originária da região entre o Cáucaso e o leste da China e pertence à família Rosaceae. A maçã inclui mais de 2.000 espécies e cerca de 100 gêneros, sendo *Malus domestica* a espécie explorada comercialmente, cujas variedades Gala e Fuji, são as mais produzidas no Brasil (IAC,2014).

Segundo dados do IBGE (2022), foram produzidas 1.047.217 toneladas de maçã no ano de 2022. As plantações de maçã estão concentradas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, cobrindo cerca de 33.311 hectares, porém a maior concentração de plantações está na região sul do Brasil. O estado de Santa Catarina é o maior produtor do país com 572.372 toneladas no ano de 2022, com destaque para o município de São Joaquim. No Rio Grande do Sul, segundo maior produtor da fruta no Brasil, foram produzidas 435.312 toneladas de maçã, sendo o município de Vacaria identificado como de maior produção. O terceiro estado de destaque seria o Paraná, com cerca de 29.005 toneladas da fruta, sendo Palmas o município com a maior plantação do estado.

De acordo com Boteon (2024), a safra de maçã 2023/2024, cuja colheita ocorreu nos primeiros meses do ano, foi impactada devido ao fenômeno El Niño. As chuvas volumosas em setembro de 2023 afetaram a floração e a polinização, impactando a formação dos frutos. As chuvas intensas entre setembro e novembro de 2023, assim como em janeiro de 2024, prejudicaram a coloração e a qualidade dos frutos colhidos, por este motivo, se fez necessário usar mais defensivos agrícolas para evitar a proliferação de doenças fúngicas.

2.1.1 Variedades Gala e Fuji

A variedade Gala é resultado do cruzamento entre 'Kidd's Orange Red' e 'Golden Delicious', realizado em 1934 por J.H. Kidd, na Nova Zelândia (Camilo; Denardi, 2006). Em 1962, a variedade foi nomeada Gala e, em 1965, seu plantio em escala comercial foi autorizado. Atualmente, é uma cultivar importante em países como Austrália, Nova Zelândia, China, Polônia, República Checa, França, Espanha, Chile, Argentina e Brasil (Hampson; Kemp, 2003; Iglesias *et al.*, 2009).

A maçã Fuji tem o formato mais arredondado e com rajadas de cores em vermelho e verde amarelado. Geralmente um pouco maior que a Gala, a Fuji destaca-se pela casca firme e polpa clara, além de seu sabor doce e de sua crocância característica (ABPM, 2023). Na Tabela 1, pode-se observar uma comparação do valor nutricional das variedades Gala e Fuji.

Tabela 1 - Valor nutricional das variedades Gala e Fuji em 100 g da fruta.

Quantidade/100 g		
Componente	Maçãs Fuji, com casca, cruas	Maçãs Gala, com casca, cruas
Água	83,6 g	84,6 g
Valor Energético	65 kcal	61 kcal
Carboidratos	15,6 g	14,8 g
Proteínas	0,15 g	0,13 g
Lipídios	0,16 g	0,15 g
Fibra Alimentar	2,1 g	2,1 g
Sódio	1 mg	0 mg
Cálcio	6 mg	7 mg
Ferro	0,02 mg	0,06 mg
Potássio	104 mg	106 mg
Sacarose	1,7 g	2,06 g
Glicose	3,04 g	2,01 g
Frutose	8,59 g	7,76 g

Fonte: USDA (2020).

A Fuji, cuja colheita ocorre em abril, é a mais resistente à frigoconservação, contribuindo com 45% da produção. Os 9% restantes são compostos por outras cultivares (Mello, 2004).

2.1.2 Processamento da maçã na indústria e geração de resíduos

A produção de maçãs no Brasil é voltada principalmente para o consumo *in natura*. No entanto, uma parcela das frutas que não atende aos padrões de qualidade para esse tipo de comercialização é destinada à indústria (Suco, 2022).

Para combater o desperdício e promover práticas mais sustentáveis, a Organização das Nações Unidas (ONU) implementou, em 2015, os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), um conjunto de 17 metas globais com um total de 169 metas, que devem ser atingidas não só por governos, como também por empresas e associações e que buscam eliminar a pobreza, proteger o meio ambiente e promover a paz e prosperidade em escala mundial, conforme Figura 1 (ONU, 2024).

Figura 1 - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).



Fonte: ONU, 2024.

Neste sentido, o ODS 12 (consumo e produção responsáveis) é especialmente voltada à gestão de resíduos, e seu item 12.5 estabelece que, até 2030, a geração de resíduos deverá ser drasticamente reduzida, incentivando a prevenção, reciclagem, e reuso de materiais, o que é fundamental para construir uma economia circular transformando subprodutos industriais em novos recursos úteis, reduzindo assim a necessidade de matéria-prima e as emissões de poluentes. Essas metas são essenciais para fomentar um equilíbrio entre o desenvolvimento econômico e a preservação ambiental (ONU, 2024).

Visando a redução de desperdício de resíduos, as maçãs imperfeitas que costumavam ser usadas para alimentação animal, despertaram o interesse das indústrias processadoras de suco, que viram uma oportunidade de agregar valor a essas frutas. Os principais destinos das maçãs são para o processamento de suco clarificado e concentrado. Frutas de qualidade inferior podem ser encaminhadas para fermentação, resultando em produtos como sidra, vinagre e destilados (Suco, 2022). Esse percentual tem crescido nos últimos anos, podendo chegar a 20%, devido às condições climáticas e à maior exigência dos consumidores em relação à qualidade e calibre das frutas (Agapomi, 2019). A ocorrência de granizo, que causa danos às frutas, também aumenta a destinação das maçãs para industrialização (Girardi, 2020). Com o aumento do consumo e do processamento de produtos agroindustriais, há um significativo crescimento no volume de resíduos gerados (Dhillon *et al.*, 2013).

No processamento em larga escala de maçãs, o suco é considerado o principal produto. Durante sua obtenção, são gerados dois tipos de resíduos: frutos inteiros com algum tipo de imperfeição que os tornam comercialmente inviáveis e o bagaço, um resíduo sólido resultante do processamento. Este bagaço é composto principalmente por uma mistura de polpa, casca e sementes (Shafiee, 2017).

Outros destinos para esses resíduos vêm sendo amplamente estudados, incluindo o desenvolvimento de substrato para a propagação de leveduras (Bravo *et al.*, 2019), bioconversão para produção de compostos de interesse, como etanol (Vashisht *et al.*, 2019), e aplicações em cosméticos como fonte de compostos bioativos (Barreira *et al.*, 2019). Além disso, de acordo com Rocha Parra *et al.* (2019) e Fernandes *et al.* (2019), os resíduos podem ser transformados em produtos alimentícios, como farinha ou extrato, para aumentar o teor de fibras e as propriedades antioxidantes. O bagaço de maçã também é uma das principais fontes

para a obtenção de pectina comercial, juntamente com frutas cítricas (Rocha Parra *et al.*, 2019).

2.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

A economia brasileira, destacando-se como uma das mais importantes do mundo na agricultura, é reconhecida pela produção e exportação de café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros. No entanto, essa vasta produção agrícola resulta em uma grande quantidade de resíduos (Soccol, 2003).

Esforços têm sido intensificados para tornar a utilização desses resíduos mais eficiente, uma vez que seu descarte inadequado no meio ambiente provoca sérios problemas de poluição. Com a inovação biotecnológica nas áreas de enzimas e tecnologia de fermentações, opções de aplicação e reaproveitamento têm sido avaliadas (Brand *et.al.*, 2000). De acordo com Uenojo (2003), entre as potenciais aplicações desses resíduos está seu uso como fonte de carbono em bioprocessos, possibilitando a obtenção de produtos químicos e produtos de maior valor agregado, como enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma.

O bagaço de maçã é um resíduo da indústria de transformação, resultado da extração do suco e constitui cerca de 25-35% da massa da fruta fresca. Os componentes solúveis em água do bagaço de maçã incluem monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos solúveis em água e componentes insolúveis em água, como substâncias pécticas. Apresenta pH variando entre 3,1 e 3,8 e quando seco, é rico em carboidratos, pectina e proteínas (Patidar *et al.*, 2018).

Devido ao alto custo comercial das enzimas, são estudadas formas de substituir a pectinase por resíduos agroindustriais. Isso se deve, também, ao fato de os meios utilizados para a produção de pectinases conterem pectina na sua composição.

A produção de pectinases por fungos é geralmente induzida pela adição de pectina ou materiais pécticos no meio de fermentação, como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, polpa de café, maçã ou cascas de frutas cítricas (Favela-Torres *et al.*, 2006). Ainda, tem sido relatado o uso de resíduos agroindustriais, combinados com peptona, extrato de levedura e sulfato de amônio, em meios de cultivo submerso para a produção de pectinases (Arevalo-Villena *et al.*, 2011; Poondla *et al.*, 2016).

2.4 COMPLEXO ENZIMÁTICO PECTINOLÍTICO

As enzimas são moléculas proteicas que são catalisadores biológicos, desempenhando um papel crucial na indústria. Elas são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, como alimentos, nutrição animal, cosméticos, medicamentos e na pesquisa e desenvolvimento de novos processos ou aprimoramento de produtos existentes. Atualmente, são conhecidas cerca de 4000 enzimas, das quais aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a maioria de origem microbiana (Li *et al.*, 2012).

Entre as enzimas produzidas, 75% são hidrolases. Um grupo de enzimas que é exemplo de hidrolases são as pectinases, que têm se destacado como uma das enzimas mais importantes industrialmente (Prakash *et al.*, 2013). As pectinases são amplamente utilizadas principalmente nos setores de alimentos e bebidas, representando um quarto da produção total de enzimas alimentares no mundo (Tari *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

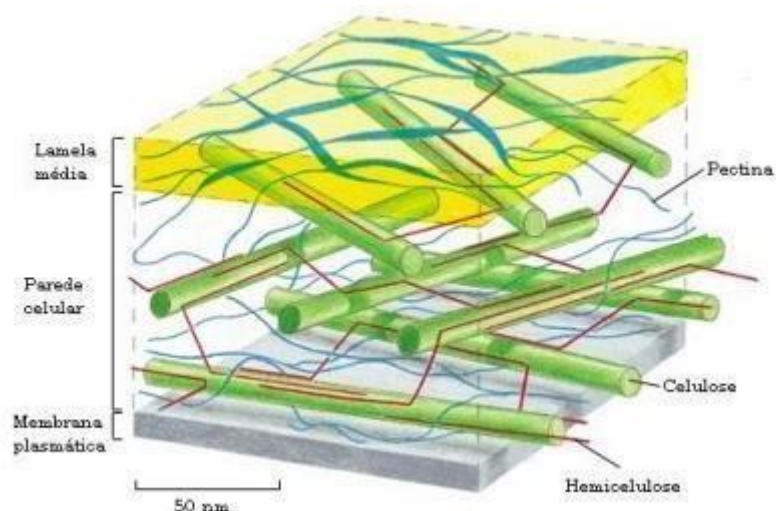
As pectinases são um grupo de enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécticas presentes nas plantas, resultando em moléculas menores, como oligossacarídeos e monossacarídeos. As enzimas pectinolíticas são produzidas por diversos organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas (Mukesh Kumar *et al.*, 2012). Correspondem a um grupo de enzimas que desintegram os polissacarídeos presentes nas substâncias pécticas (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005).

2.4.1 Substâncias pécticas

As substâncias pécticas referem-se a um conjunto de polissacarídeos heterogêneos, carregados negativamente, ácidos e de alta massa molecular encontrados nas paredes celulares das plantas (Jayani *et al.*, 2005; Uenojo e Pastore, 2007).

Estas substâncias representam entre 0,5% e 4,0% da massa fresca dos frutos e são macromoléculas de alta massa molecular que formam a lamela média, uma fina camada de material com a função de adesão entre as paredes celulares dos vegetais superiores (Jayani *et al.*, 2005; Uenojo e Pastore, 2007), conforme Figura 2.

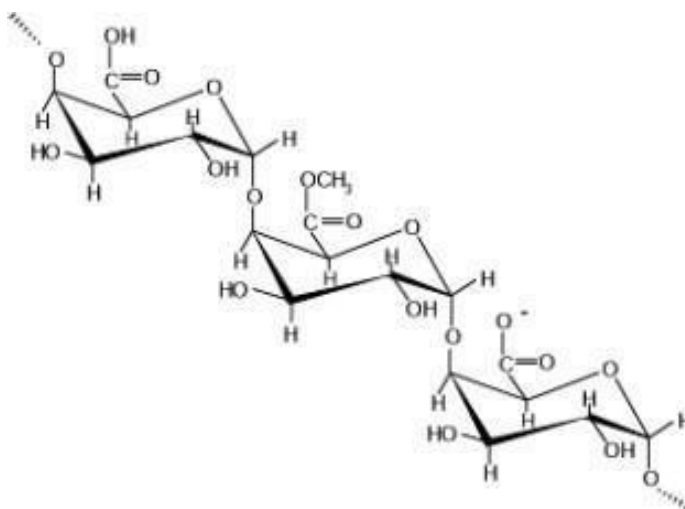
Figura 2 – Estrutura da parede celular vegetal representando o arranjo das moléculas de pectina e celulose.



Fonte: Martins (2006).

A pectina, cuja estrutura está representada na Figura 3, é solúvel em água e possui baixa solubilidade em solventes orgânicos, diferenciando-se dos ácidos pécticos pela presença de mais de 75% de seus grupos carboxila esterificados por grupos metoxila (Kashyap *et al.*, 2001). Quando mais de 50% de seus grupos carboxila estão esterificados por grupos metoxila, são consideradas de alto grau de metoxilação e possuem alto poder geleificante, sendo amplamente utilizadas na indústria de alimentos para a produção de geleias (Aspinall, 1970).

Figura 3 – Estrutura molecular da pectina.



Fonte: Hourdet e Muller (1991).

A concentração de substâncias pécticas varia conforme o tipo de vegetal e sua origem. Exemplos de fontes dessas substâncias incluem o bagaço de maçã, albedo cítrico (como maracujá e laranja), polpa de beterraba, sementes de girassol, e muitos outros frutos (Canteri *et al.*, 2012). Essas fontes de pectinas podem ser utilizadas como substrato para a produção de pectinases.

2.4.2 Classificação e mecanismo de ação das pectinases

As pectinases são um conjunto de enzimas que catalisam a degradação de substâncias pécticas encontradas no material vegetal, promovendo a desestruturação desses polissacarídeos presentes na lamela média da parede celular primária de frutos e vegetais, resultando em moléculas menores, como oligossacarídeos e monossacarídeos (Uenojo e Pastore, 2007). Estas enzimas clivam tanto a pectina quanto outros polissacarídeos pécticos em resíduos de ácido galacturônico, com cada pectinase atuando em um ponto específico dessa cadeia (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011; Suhaimi *et al.*, 2016; Rocha, 2018).

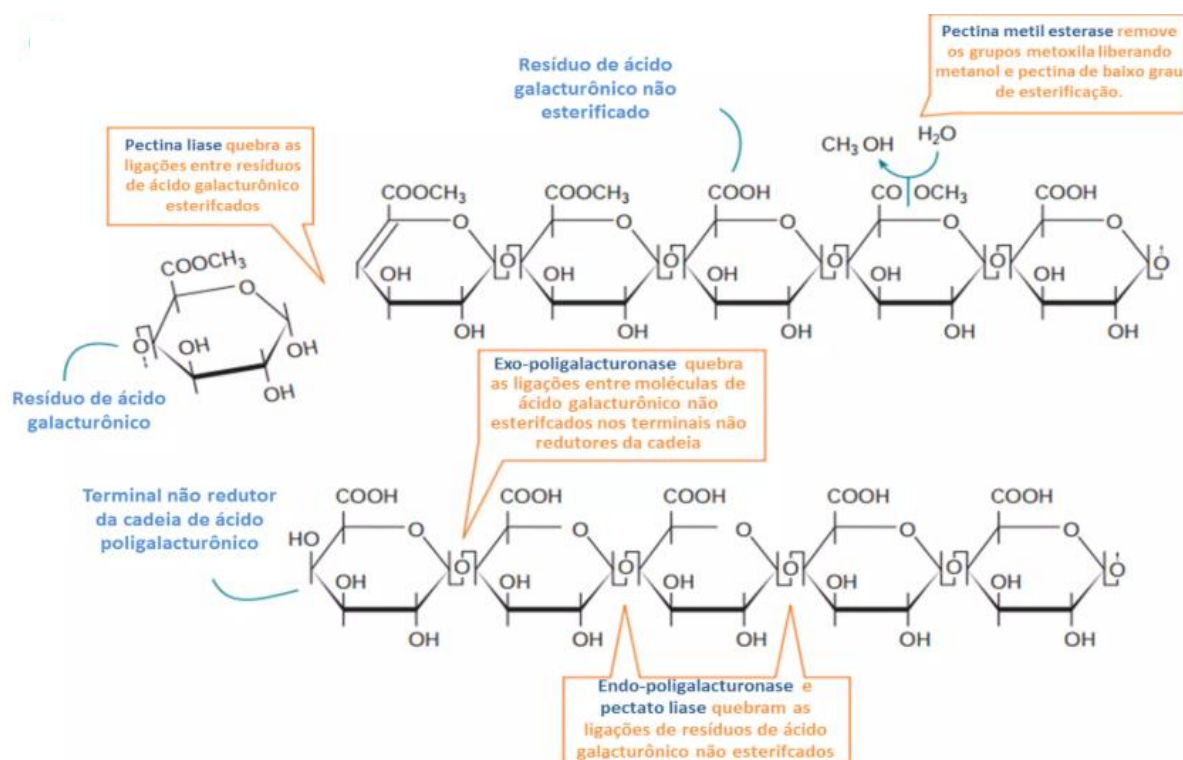
Em termos gerais, as pectinases podem atuar através da despolimerização da pectina por meio de reações de hidrólise e transeliminção, catalisando a quebra das ligações α -1,4 na cadeia principal. Elas também podem atuar como desmetoxilantes, removendo os resíduos metoxilas, além de realizarem reações de desesterificação da pectina e do ácido péctico, ou seja, hidrolisam a ligação éster entre os grupos carboxila e metil da pectina (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005). O mecanismo de ação de algumas das enzimas do complexo pectinolítico podese observado na Figura 4.

De acordo com Rebello *et al.* (2017), as pectinases comerciais contêm uma combinação das enzimas pectinametilesterase, poligalacturonase e pectina-liase. No entanto, as duas últimas, poligalacturonase e pectina-liase, são de maior interesse para a biotecnologia industrial.

Segundo a Mordor Intelligence (2024), o mercado de enzimas industriais deverá registrar um CAGR de mais de 6% até o ano de 2029 e está projetado para atingir US\$16,9 bilhões até 2027. Atualmente, o mercado é consolidado por natureza e dominado pelas cinco principais empresas, a saber, Novozymes (Dinamarca), DuPont (EUA), Royal DSM (Holanda) e BASF (Alemanha), as quais possuem filiais

em diversos países, incluindo Brasil. Além disso, os Estados Unidos lideram o ranking de maior comprador de enzimas industriais do mundo.

Figura 4 - Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas.



Fonte: Adaptada de NCBE, (2000).

O mercado brasileiro depende significativamente da importação de enzimas. No entanto, o Brasil é o principal produtor de enzimas na América Latina (MDIC, 2012). De fato, devido à sua vasta abundância de matéria orgânica e biodiversidade (Mussatto *et al.*, 2007; Valli *et al.*, 2018), o Brasil tem o potencial para se tornar um dos maiores produtores e competir no mercado internacional.

2.5 APLICAÇÕES DE PECTINASES

As pectinases microbianas podem ser aplicadas em diversos processos industriais. Os primeiros registros de sua utilização comercial datam da década de 1930, relacionados à preparação de sucos de frutas e vinhos. Contudo, a partir da década de 1960, avanços nos estudos sobre a natureza dos tecidos vegetais aumentaram a eficiência dessas enzimas em aplicações industriais (Kashyap *et al.*,

2001; Jayani *et al.*, 2005).

De acordo com Uenojo e Pastore (2007) e Santi *et al.* (2014), essas enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias de sucos de frutas. Nesses processos, as pectinases são adicionadas aos purês de frutas e vegetais para degradar a pectina e outros componentes de alta massa molar, reduzindo a viscosidade, aumentando os rendimentos dos sucos, proporcionando uma aparência cristalina ao produto final e diminuindo o tempo de filtração e concentração.

As pectinases podem ser empregadas na etapa de maceração da fruta, durante a prensagem da polpa, promovendo maior rendimento na extração do suco (Grassin; Fauquemberg, 1996). A extração de sucos é geralmente realizada pela prensagem mecânica, que rompe as paredes celulares do mesocarpo, liberando o suco. Frutas ricas em pectina, como a maçã, produzem sucos com alta viscosidade e turbidez, pois resíduos de pectina e outros polissacarídeos são arrastados da parede celular (Lea, 1998). Esses resíduos podem formar agregados com proteínas e polifenóis, aumentando a turbidez do produto.

Para minimizar esse problema, são utilizadas enzimas pectinolíticas para despectinização dos sucos de frutas. Os detalhes dessa operação foram descritos por Pinelo *et al.* (2010). Os sucos contêm muitas partículas insolúveis, constituídas por um núcleo proteico com carga superficial positiva, envolvido por moléculas de pectina carregadas negativamente. Essa carga negativa causa repulsão entre as moléculas de pectina. Quando pectinases são adicionadas ao suco, a pectina é degradada e parte do núcleo proteico carregado positivamente é exposto, reduzindo a repulsão eletrostática entre as partículas em suspensão. As partículas então se agregam, formando grandes aglomerados que tendem a precipitar, diminuindo a turbidez e facilitando as etapas subsequentes do processamento do suco.

Conforme Whitehurst e Oort (2010), a aplicação de pectinases na produção de sucos de frutas tem algumas vantagens, considerando diferentes aspectos. Uma das vantagens é a economia, visto que as enzimas aumentam a produtividade global do processo. Como resultado, o suco se mantém estável por mais tempo sem a necessidade de adição de aditivos. Outra importante vantagem é a qualidade do produto, pois o processamento rápido dos sucos com o uso de enzimas diminui o risco de contaminação por microrganismos e reduz a oxidação, aumentando a vida útil do produto. As pectinases facilitam a extração de componentes como antocianinas, aromas e polifenóis antioxidantes, conhecidos por seus efeitos positivos na saúde

humana, particularmente na prevenção de doenças cardíacas.

Embora o uso de enzimas aumente o rendimento dos sucos de frutas, diferentes tratamentos enzimáticos podem impactar significativamente o perfil sensorial do produto final. Portanto, é essencial ter cautela na seleção das enzimas e na definição dos parâmetros do tratamento (Laaksonen *et al.*, 2012).

Além da aplicação em indústrias de alimentos, essas enzimas também são amplamente empregadas na indústria têxtil para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento de resíduos líquidos e na degomagem das fibras naturais. Além disso, na produção de ração animal, as pectinases, em conjunto com outras enzimas, aumentam a absorção e a liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras (Uenojo e Pastore, 2007).

2.6 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM CULTIVO SUBMERSO

O processo industrial de fermentação para produção de enzimas microbianas compreende três fases principais: *upstream*, que envolve as preparações anteriores à fermentação para garantir as condições necessárias para que, ocorram as transformações desejadas; a segunda é a fermentação em si, por fim a etapa de *downstream*, que ocorre após a fermentação e se dedica à recuperação do produto, passando por etapas de separação e purificação dos produtos obtidos (Aquarone *et al.*, 2001).

A produção de enzimas pode ser realizada por dois processos principais: cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES). No cultivo submerso, a biomassa microbiana cresce completamente imersa em um meio de cultura líquido, geralmente utilizando substratos solúveis em água. Por outro lado, no cultivo em estado sólido ou semissólido, o crescimento dos microrganismos ocorre em materiais sólidos úmidos, onde não há água livre abundante entre as partículas (Garg *et al.*, 2016). A principal distinção entre o cultivo submerso (CS) e o cultivo em estado sólido (CES) reside na capacidade de mistura dos sistemas. No CS, o ambiente é mais homogêneo e uniformemente distribuído nos fermentadores, onde se espera que haja a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos. Por outro lado, no CES, a alta compactação limita a homogeneidade e a difusão de nutrientes e metabólitos, exigindo agitação intensa que pode resultar na ruptura celular (Graminha *et al.*, 2008).

Embora os fungos filamentosos se desenvolvam melhor em substratos sólidos, os processos submersos descontínuos (batelada) são mais comumente adotados para a produção industrial de enzimas (Subramaniyam; Vimala, 2012; Dos Santos *et al.*, 2018). Os processos descontínuos oferecem várias vantagens para a produção em larga escala. Por exemplo, proporcionam melhor controle microbiológico, reduzem os riscos de contaminação e minimizam a taxa de mutação genética (Ferreira *et al.*, 2009).

Os processos industriais de cultivo submerso para produção de enzimas são realizados em biorreatores agitados mecanicamente, que permitem um controle preciso dos parâmetros operacionais como aeração, pH e temperatura. Esses biorreatores oferecem maior eficiência na absorção de nutrientes pela célula e na excreção de metabólitos, promovendo condições mais homogêneas. Além disso, facilitam o controle e monitoramento das condições de fermentação essenciais para obter altos rendimentos. Equipados com sensores de medição e sistemas de refrigeração e aquecimento, os biorreatores são ajustados para evitar problemas como formação de aglomerados e superaquecimento do meio (Biz *et al.*, 2016; Colla *et al.*, 2016; Pitol *et al.*, 2016; Finkler *et al.*, 2017; Poletto *et al.*, 2017).

As etapas *downstream*, também conhecidas como purificação, envolvem processos de separação para remover substâncias tóxicas ou metabólitos indesejáveis, além de concentração para reduzir o volume da solução, facilitando o manuseio durante a purificação. Estas etapas visam obter uma preparação enzimática com maior pureza para diversas aplicações industriais (Aquarone *et al.*, 2001).

A decisão de realizar etapas *downstream* deve considerar a aplicação final do produto e a relação custo-benefício da produção. Idealmente, é preferível evitar essas etapas, pois podem aumentar os custos do processo de produção, incluindo equipamentos, mão de obra e perda de atividade enzimática. Alguns produtos comerciais de enzimas são simplesmente concentrados do extrato fermentado, adicionados de estabilizadores para manter a atividade enzimática (Bon *et al.*, 2008).

2.6.1 Fatores que influenciam a produção de pectinases fúngicas em cultivo submerso

O sucesso da fermentação para a produção de pectinase é influenciado por alguns parâmetros de processo, como o tipo e concentração do substrato, tempo de

fermentação, concentração do inóculo, pH, temperatura, agitação/aeração, presença de inibidores/indutores e adição de fontes de carbono e nitrogênio e de micronutrientes, como cobre, ferro, zinco, manganês e magnésio. Esses parâmetros devem ser controlados e monitorados para assegurar a produção enzimática desejada (Amin *et al.*, 2017; Rebello *et al.*, 2017).

Os carboidratos são essenciais para o metabolismo fúngico, fornecendo energia e servindo como precursores para a síntese de todos os compostos orgânicos necessários para a viabilidade celular (Madigan *et al.*, 2016). As fontes de carboidratos e açúcares adicionadas ao meio de cultivo estimulam o metabolismo energético do microrganismo, promovendo seu rápido crescimento. À medida que colonizam o substrato, os micélios dos fungos secretam enzimas extracelulares que catalisam a degradação dos carboidratos disponíveis em moléculas menores, como aminoácidos, açúcares e vitaminas, que são absorvidas para sua nutrição por meio do catabolismo (Holker; Lenz, 2005).

Meneghel *et al.* (2015) analisou o efeito do bagaço de maçã seco e triturado como substrato na indução da produção de pectinases por *A. oryzae* em processo submerso. O estudo constatou que baixas concentrações do substrato resultaram em elevadas atividades enzimáticas. Além do processo em estado submerso, também foi estudado, a partir da casca da maçã, a produção de pectinase em fermentação em estado sólido por Costa (2021), que comprovou a sua viabilidade. A adição de pectina ao meio de cultivo está relacionada com o fenômeno de indução à formação de enzimas, favorecendo a sua excreção, e, além disso, pode ser utilizada como fonte de carbono (Martínez-Trujillo, 2009). Pesquisas sobre o efeito indutor da pectina na produção de pectinase por *Aspergillus niger* mostram que a atividade enzimática aumenta significativamente com a adição de pectina (20 g/L) no meio de cultivo. Em contraste, baixas concentrações de pectina resultam em baixo rendimento enzimático, já que a produção de pectinases é induzida por substratos ricos em pectina (Martos *et al.*, 2009; Bastos, 2012).

A quantidade de substratos ricos em carbono adicionados ao meio de cultivo influencia tanto o crescimento celular quanto a produção de pectinases por fungos filamentosos. Concentrações elevadas de glicose podem causar repressão catabólica na produção de pectinases, dificultando a assimilação dos substratos disponíveis e reduzindo a produção enzimática (Cordeiro e Martins, 2009; Rossi *et al.*, 2016). Além disso, a combinação de substratos agroindustriais como fonte de nutrientes pode

promover a secreção de pectinases em alguns fungos, mas não em outros (Lima *et al.*, 2017). Portanto, é essencial otimizar a composição nutricional do meio de fermentação para entender o comportamento do fungo na secreção do metabólito desejado.

A temperatura é um parâmetro crucial que influencia a sobrevivência e reprodução dos fungos, além de regular a atividade metabólica responsável pela secreção de enzimas e pela atividade das pectinases liberadas no meio (Santiago *et al.*, 2016). Cultivar fungos filamentosos a altas temperaturas para a produção de enzimas de interesse comercial oferece vantagens como taxas de conversão mais rápidas, menor risco de contaminação e aumento da transferência de massa. No entanto, essas enzimas podem ser facilmente inativadas por um aumento moderado na temperatura (Kluge; Terfehr; Kuck, 2018).

Outro fator fundamental para a atividade e estabilidade das enzimas é o pH, que pode influenciar tanto a permeabilidade da membrana dos microrganismos quanto a estabilidade das enzimas (Kaur *et al.*, 2017). Valores baixos de pH (inferiores a 4,0) podem causar desnaturação de proteínas e inibição da atividade enzimática em alguns organismos, enquanto fungos filamentosos tendem a preferir condições ácidas (Madigan *et al.*, 2016). Alterações no pH podem afetar a ionização dos sítios ativos dos aminoácidos e provocar a desestruturação das enzimas (Pagarra *et al.*, 2018). Portanto, o monitoramento do pH é essencial para padronizar o crescimento e a produção de enzimas extracelulares por vários microrganismos. Segundo Sternberg e Dorval (1979), a diminuição do pH pode ser atribuída à liberação do íon amônio (NH_4^+) proveniente da fonte de nitrogênio utilizada. Quando o microrganismo utiliza esse nitrogênio, compostos iônicos são liberados no meio, podendo reagir com a água e formar ácidos. Também é dito que o aumento do pH após a fase de crescimento celular intenso pode ocorrer devido à liberação de amônia, que foi previamente consumida e armazenada nas células, sendo liberada por lise celular.

Na maioria dos processos biotecnológicos industriais, como na produção de antibióticos, enzimas, vitaminas e outros produtos, são utilizados microrganismos que podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Em processos aeróbios, os microrganismos dependem de uma quantidade adequada de oxigênio dissolvido no meio, essencial para a respiração celular e para a produção de metabólitos (Schmidell *et al.*, 2001; Najafpour, 2007; Bastos, 2010). Devido à baixa solubilidade do oxigênio em água, a transferência de oxigênio para microrganismos aeróbios, como no caso

de fungos, pode ser desafiadora. Essa dificuldade aumenta quando o meio de cultivo contém nutrientes altamente solúveis, que podem interferir na dissolução do oxigênio. Além disso, o aumento da viscosidade do meio também prejudica a solubilização do oxigênio (Schmidell *et al.*, 2001).

Apesar de possuir ampla aplicação na indústria de sucos(entre outras indústrias que utilizam enzimas), alguns desafios são encontrados para implementar a produção de pectinases em escala industrial visto que a pesquisa aplicada para a obtenção de produtos biológicos a partir de resíduos agroindustriais é um processo complexo e multidisciplinar, que demanda conhecimentos integrados de biotecnologia, microbiologia e engenharia de processos.

Além dos desafios técnicos encontrados em todas as etapas do processo e considerando um alto investimento inicial, se faz essencial a realização de uma análise econômica detalhada para garantir a viabilidade financeira do processo, aproveitando ao máximo os resíduos e minimizando os subprodutos indesejados. Os desafios incluem a escalabilidade do processo, a padronização da qualidade do produto final e o cumprimento de rigorosas exigências regulatórias.

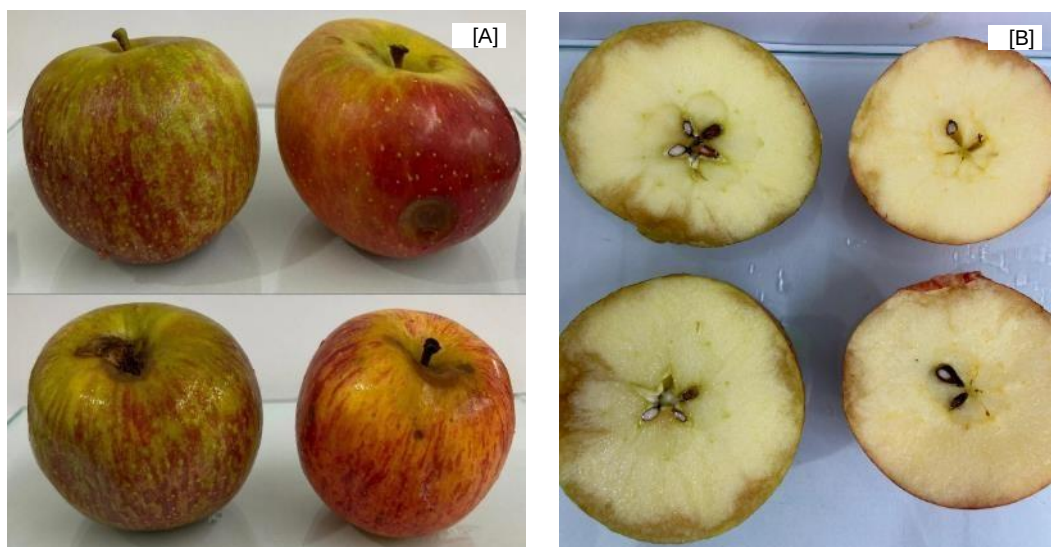
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA, PREPARO E PROCESSAMENTO DE MAÇÃ

Durante a safra da maçã, no mês de abril de 2024, foram realizadas coletas dos resíduos *in loco* durante o processamento de extração do suco de maçã de uma mistura de maçãs de variedades Gala e Fuji. Os resíduos foram cedidos por uma empresa de alimentos e bebidas localizada na região nordeste do estado do Rio Grande do Sul.

Registros das maçãs *in natura* processadas no momento da coleta e seu estado de maturação podem ser observados na Figura 5, demonstrando serem frutas com imperfeições e maduras - à esquerda, pode-se observar a variedade Fuji, enquanto à direita, pode-se observar a variedade Gala.

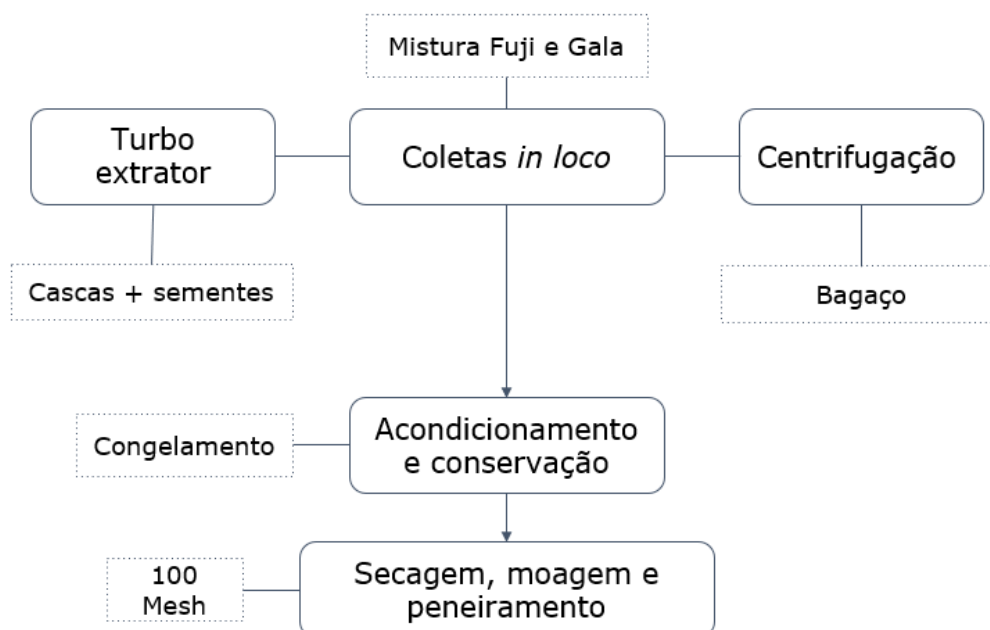
Figura 5 - Maçãs *in natura* processadas no momento da coleta [A] e grau de maturação das maçãs *in natura* [B].



Fonte: A autora (2024).

Conforme a Figura 6, a primeira coleta do resíduo foi realizada na saída do equipamento turbo extrator onde é realizada a extração do suco. Este resíduo é composto principalmente das cascas e das sementes da maçã. A segunda coleta foi realizada no equipamento de centrifugação (decanter), etapa responsável por separar a polpa do suco para posteriores etapas de filtração e clarificação. Este segundo resíduo é composto principalmente pela polpa da maçã.

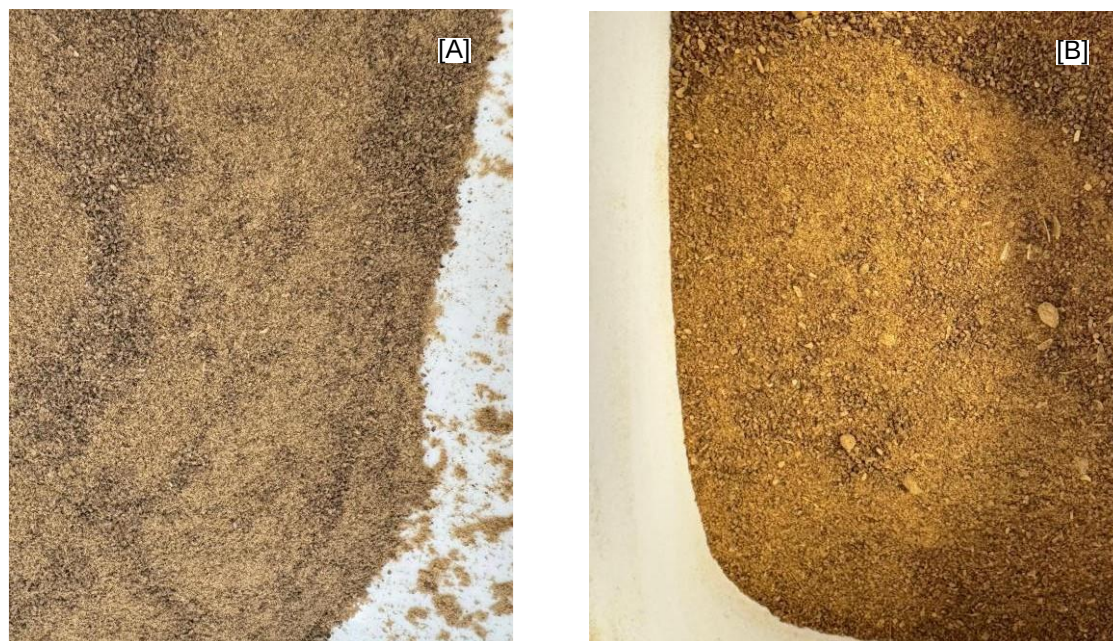
Figura 6 – Fluxograma das coletas realizadas *in loco*.



Fonte: A autora (2024).

Após realizadas as coletas, os resíduos foram acondicionados em sacos plásticos, à temperatura de congelamento para que não houvessem perdas de propriedades durante o armazenamento até o processamento do material para realização das análises do presente estudo. Posteriormente, estes resíduos foram secos em estufa, triturados em liquidificador doméstico e peneirados em uma peneira de 100 Mesh (149 μm), para que houvesse uma padronização no tamanho das partículas, visto que a trituração realizada não havia sido completamente homogênea. A trituração foi empregada de forma a reduzir o tamanho das partículas, de alta rigidez, e facilitar o acesso do microrganismo aos nutrientes presentes no meio. Visualmente, conforme Figura 7, quando comparados os resíduos, os mesmos apresentam pouca diferença entre si, sendo o resíduo composto pelas sementes e cascas [B], levemente alaranjado, provavelmente proveniente da coloração das cascas da maçã.

Figura 7 - Resíduo composto pelo bagaço [A] e resíduo composto pelas sementes e cascas [B].



Fonte: A autora (2024).

3.6 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Aspergillus oryzae* IPT-301, cedido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (São Paulo, SP) e descrito por Malvessi & Silveira (2004), Fontana *et al.* (2009) e Meneghel *et al.* (2014) como produtor de pectinases quando cultivado em meio líquido. A cultura foi mantida em meio sólido glicerinado, a 4°C.

3.7 MEIOS DE CULTIVO

3.7.1 Conservação

Para a conservação e propagação do microrganismo foi utilizado o meio de cultura descrito por Maiorano (1982), com a seguinte formulação, em g/L: glicerina, 25; glicose, 25; extrato de levedura, 5; ágar-ágar, 20. A cultura foi crescida neste meio sólido glicerinado por 96 horas a 28°C e, posteriormente, armazenada a 4°C. A cultura crescida pode ser observada na Figura 8.

Figura 8 - Placa com a cultura crescida de *Aspergillus oryzae* IPT-301.



Fonte: A autora (2024).

3.7.2 Cultivos submersos

O meio de cultivo a ser utilizado como base para a produção de pectinases, descrito por Reginatto *et al.*, (2017) e adaptado, é composto basicamente por farelo de trigo, pectina e sais minerais.

Inicialmente cogitou-se a utilização da concentração de 20 g/L de pectina cítrica comercial ou bagaços, conforme descrito por Reginatto *et al.* (2017). Porém, durante a preparação dos extratos aquosos dos resíduos, foi necessário o aumento da quantidade de água adicionada, em função da posterior etapa de esterilização. Dessa forma, foram realizados testes com o uso de 10 g/L de pectina correspondente no meio. A composição do meio é descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo para produção de pectinases.

(continua)

Composto	Quantidade (g/L)
Pectina cítrica comercial ou bagaços	10,00
Farelo de trigo (em extrato aquoso)	40,00
Extrato de levedura	0,05
Glicose	5,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00

(conclusão)

Composto	Quantidade (g/L)
MgSO ₄	0,50
KH ₂ PO	2,50
FeSO ₄ 7H ₂ O	6,3x10 ⁻⁴
ZnSO ₄	6,2x10 ⁻⁴
MnSO ₄	1,0x10 ⁻⁵

Fonte: Adaptado de Reginatto *et al.*, (2017).

Ao esterilizar o extrato aquoso referente ao resíduo de bagaço (polpa da fruta) na concentração de 10 g/L, houve grande absorção da água por parte do resíduo, fazendo com que a mistura se tornasse pastosa e não líquida, impossibilitando a filtração deste extrato aquoso. Por este motivo e pela quantidade limitada do resíduo, optou-se por realizar mais uma diluição deste substrato, considerando uma diluição na proporção de 1:1.

3.8 PRODUÇÃO DE PECTINASE EM CULTIVO SUBMERSO

3.8.1 Preparo da suspensão de esporos

A suspensão de esporos, foi preparada da mesma forma para todos os meios. Em câmara de fluxo laminar, foi adicionada água destilada à placa com a cultura de *A. oryzae* IPT-301. A mesma foi raspada para liberação dos esporos, formando uma suspensão cuja concentração foi definida por contagem em câmara de Neubauer. A inoculação para os cultivos submersos foi feita com 10⁸ esporos por litro de meio de cultivo.

3.8.2 Cultivos em frascos sob agitação

Os ensaios foram realizados seguindo o método descrito por Meneghel (2015). Foram realizados ensaios em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com gargalo alongado, contendo 100 mL de meio, cobertos com gaze e algodão hidrófobo, em agitador recíproco (B. Braun Biotech, modelo Certomat, RFA), a 300 rpm e 28°C durante 120 horas (Reginatto, 2016), conforme Figura 9.

Figura 9 - Representação do cultivo de *Aspergillus oryzae* em frascos Erlenmeyer, conduzidos em agitadores de bancada.



Fonte: A autora (2024).

Foi avaliado o efeito das fontes e concentrações de indutores/resíduos, bagaço e semente de maçã, considerando o teor médio de pectina relatado na literatura (cerca de 26%), em comparação com o meio contendo pectina comercial Delaware (Meneghel *et al.*, 2014). O ajuste de pH dos meios de cultivo foi realizado pela adição de H_2SO_4 1,5 mol/L.

Os meios foram submetidos à esterilização em 120°C a 1 atm por 15 minutos. Os cultivos foram realizados em duplicata, sendo que a cada 24 horas dois frascos de cada substrato eram retirados do agitador para análise e não retornavam ao processo.

3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.9.1 Concentração celular e pH

A determinação da concentração celular foi avaliada por gravimetria, com a quantificação de massa seca. Um volume conhecido de amostra foi filtrado, em papel filtro previamente seco em estufa a $90 \pm 5^\circ\text{C}$ 24 horas com auxílio de uma bomba a vácuo, conforme Figura 10.

Depois deste procedimento, as amostras, em papel filtro, foram acondicionadas em estufa a $90 \pm 5^\circ\text{C}$ por 24 horas, para a remoção da umidade presente e, então, foi determinada a concentração celular utilizando a diferença de massas.

Figura 10 - Separação da biomassa do meio fermentado por filtração a vácuo [A] e papel filtro com biomassa úmida antes da secagem [B].



Fonte: A autora (2024).

Parte do volume das amostras dos cultivos foram centrifugadas, conforme Figura 11, para obtenção de caldo isento de células, que foi usado para as análises de açúcares redutores livres (AR), açúcares redutores totais (ART) e atividade de pectinases totais.

A análise de pH foi realizada utilizando um pHmetro de bancada calibrado e diretamente no caldo fermentado, previamente à separação da biomassa.

Figura 11 - Amostras de cultivos antes da centrifugação [A] e após a centrifugação [B].



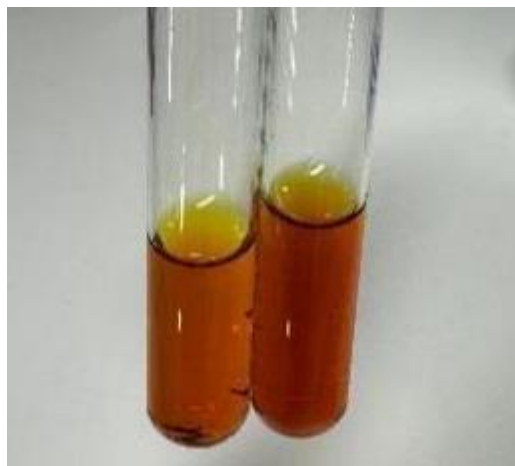
Fonte: A autora (2024).

3.9.2 Açúcares redutores livres (AR)

Os carboidratos solúveis foram analisados pelo método do ácido 3,5 di-nitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). Em um tubo de ensaio, 0,25 mL da amostra hidrolisada foi misturado com 0,75 mL da solução DNS. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos e depois resfriados em banho de gelo. Após o resfriamento, 4 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo, conforme Figura 12. Um branco foi preparado substituindo a amostra por água destilada.

A absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro a 545 nm, previamente zerado com o branco. A concentração de açúcares redutores nas amostras foi determinada com base em uma curva de calibração obtida a partir de soluções de glicose, as quais foram submetidas ao mesmo procedimento.

Figura 12 – Amostras prontas para leitura em espectrofotômetro a 545 nm.



Fonte: A autora (2024).

3.9.3 Açúcares redutores totais (ART)

A determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) foi realizada utilizando o método de hidrólise ácida, conforme descrito por Meneghel (2013). As amostras foram diluídas previamente em água destilada conforme necessidade. Alíquota de 1 mL dessa solução diluída foi transferida para um tubo de ensaio, ao qual se adicionou 1 mL de ácido clorídrico 2 mol/L. As amostras foram fervidas em banho-maria a 100°C por 10 minutos com os tubos tampados e, em seguida, resfriadas em banho de gelo. Para cada tubo, foi acrescentado 2,5 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L e 0,5 mL de água destilada para ajustar o volume. Um

branco foi preparado substituindo a amostra por água destilada.

Concluída a etapa da hidrólise, seguiu-se com a quantificação dos açúcares redutores, realizada pelo método do ácido 3,5-di-nitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959) descrito anteriormente.

3.9.4 Atividade de pectinases

A atividade das pectinases foi avaliada utilizando o método descrito por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi (2000). Esse procedimento baseia-se na medida da diminuição da viscosidade de uma solução padrão de pectina 0,63% (m/v), que é submetida à ação das enzimas pectinolíticas. Essas enzimas atuam rompendo as ligações glicosídicas internas da cadeia de ácido poligalacturônico.

A solução padrão de pectina foi preparada dissolvendo 0,63 g de pectina em 100 mL de uma solução tampão de acetato de sódio – ácido acético 0,05 mol/L, com pH 4,0, e mantendo-a em agitação por cerca de 12 horas.

Deu-se início a análise com a adição de 3,2 mL de extrato enzimático diluído em um tubo de ensaio, o qual foi colocado em um banho termostático a 30°C. Após a estabilização da temperatura das amostras, adicionaram-se 14,8 mL da solução de pectina 0,63% (m/v). Essa mistura foi mantida em banho a 30°C por 30 minutos. Após esse período, a viscosidade da solução foi medida usando um viscosímetro (modelo LDV-II+, Brookfield, EUA) a 60 rpm. Para cada amostra, foi preparado um controle (branco), no qual a solução enzimática diluída foi previamente inativada em banho-maria a 100°C por 30 minutos, seguindo o mesmo procedimento das amostras com a atividade enzimática ativa.

Com os valores de viscosidade obtidos para as amostras com e sem atividade enzimática, foi calculado o percentual de redução de viscosidade (A), utilizando a equação 1.

$$A(\%) = \frac{\text{visc. amostra inativada} - \text{visc. amostra}}{\text{visc. amostra inativada}} \times 100 \quad (1)$$

O percentual de redução da viscosidade foi associado à atividade das pectinases, utilizando uma curva padrão construída a partir de uma série de diluições (variando entre 1:30 e 1:300) do extrato enzimático obtido ao final do cultivo. Essas amostras diluídas foram analisadas quanto à diminuição da viscosidade, e com os

valores obtidos foram criadas curvas que relacionam a redução da viscosidade (A) com o logaritmo decimal do inverso das diluições, representando uma proporção da concentração de enzimas.

Define-se uma unidade (U) de pectinase como a quantidade de enzima capaz de provocar uma redução de 50% na viscosidade da solução, dentro das condições padronizadas. Os demais valores de unidades de pectinase foram então calculados proporcionalmente, e uma nova curva foi construída, associando a redução da viscosidade com o logaritmo decimal do número de unidades de pectinase. A partir do ajuste linear dessa curva, foram determinados os coeficientes necessários para calcular as atividades enzimáticas, conforme descrito na equação 2.

$$PT = 10^{\frac{A-a}{b}} \times \frac{dil}{v} \times fd \quad (2)$$

Onde PT representa a atividade enzimática de pectinases (U/mL), A indica a redução de viscosidade (%), a é o coeficiente linear da curva de calibração, b é o coeficiente angular dessa curva, dil corresponde à diluição da preparação enzimática após a extração, e v é o volume da preparação enzimática utilizado na análise (em mL) e fd é o fator de diluição na extração (mL/g de matéria seca).

3.10 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO PROCESSO

O fator de produção específica ($Y_{P/X}$) foi calculado a partir da média dos máximos valores de atividade enzimática (P_{max}) e de concentração de biomassa (X_{max}) considerando, também, o tempo de cultivo em que estes foram atingidos.

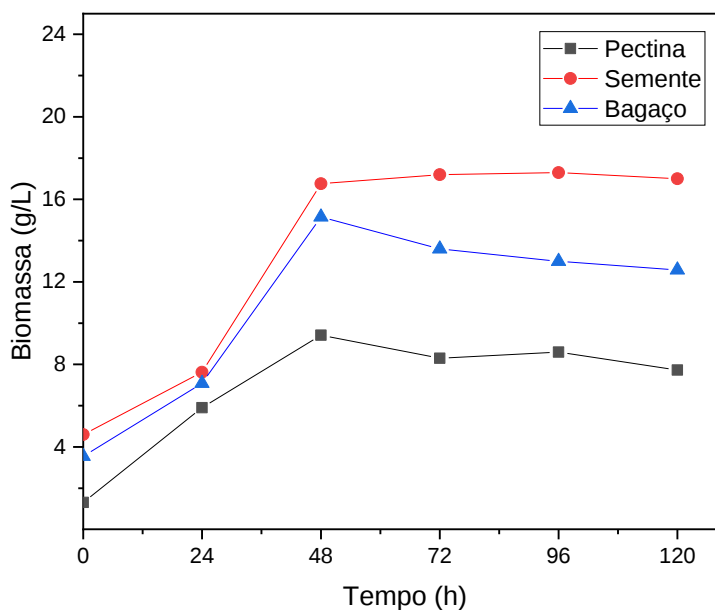
A produtividade (p), representa a atividade enzimática máxima no processo e o tempo em que foi atingida a maior atividade enzimática. A produtividade foi calculada relacionando a atividade enzimática máxima no processo ($P_{m\acute{a}x}$) e o tempo de processo em que ocorreu $P_{m\acute{a}x}$ ($t_{P,m\acute{a}x}$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da realização da etapa experimental proposta neste estudo, são apresentados e discutidos os resultados relativos à avaliação da produção de pectinases por *A. oryzae* IPT-301 a partir de em resíduos do processamento de maçãs, ricos em pectina, em ensaios em frascos sob agitação. Conforme mencionado anteriormente, a amostragem foi realizada em intervalos de 24 horas em um período total de 120 horas. Importante destacar que o uso de extratos aquosos de resíduos agroindustriais teve por objetivo a obtenção de um componente solúvel para o meio de cultivo, capaz de induzir a produção de enzimas pectinolíticas e permitir a homogeneidade do sistema.

Na sequência, são apresentados os resultados dos cultivos por *A. oryzae* IPT-301 em frascos sob agitação, correspondentes aos perfis de concentração celular, pH, consumo de substrato e atividade de pectinases totais. Como observado na Figura 13, há um incremento na concentração celular nas primeiras 48 horas de cultivo, chegando ao pico de 18,56 g/L no meio contendo extrato aquoso de semente/cascas de maçã, de 15,32 g/L com extrato aquoso de bagaço e de 9,76 g/L em amostras de pectina.

Figura 13 - Variação das concentrações de biomassa de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em função do tempo de cultivo com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.

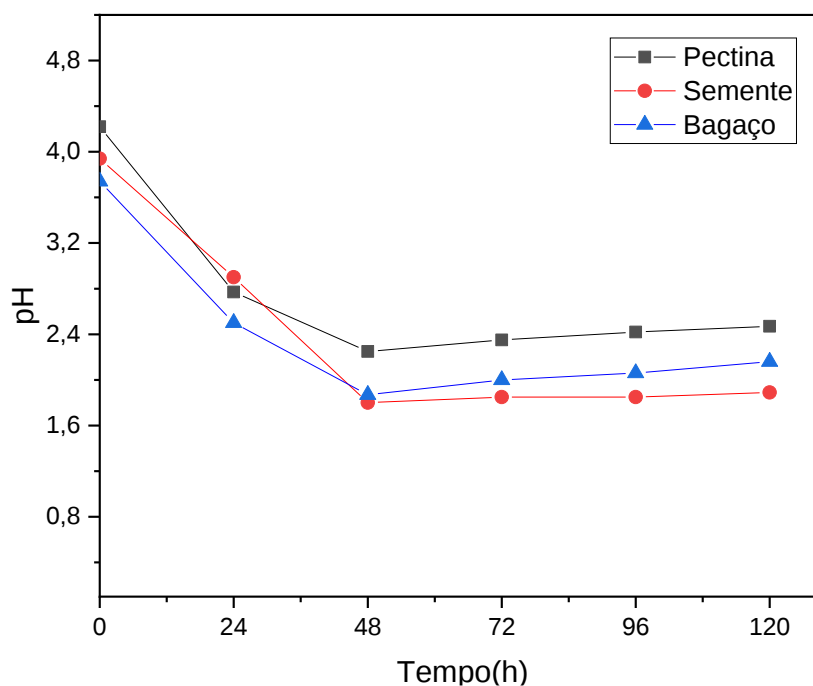


Fonte: A autora (2024).

Na sequência, com exceção do meio contendo extrato aquoso de sementes/cascas, cuja biomassa foi mantida no mesmo patamar até o final do cultivo, observou-se a redução do crescimento com o tempo, chegando aos valores mínimos de 8,0 e 13,0 g/L, respectivamente, nas amostras de extratos aquosos de bagaço e pectina, em 120 horas de processo (Figura 13). Salienta-se que não foi feita a caracterização físico-química dos próprios resíduos do processamento de maçãs e nem dos respectivos extratos aquosos, porém os efeitos positivos em termos de crescimento, quando comparados com o uso de pectina, podem estar associados à presença dos constituintes do farelo de trigo - carboidratos e vitaminas – e dos próprios resíduos, como proteínas, lipídeos e fibras.

O pH do meio foi ajustado para 4,0 no início do cultivo e foi observada intensa queda nas primeiras 48 horas de ensaio. Foi observado, na Figura 14, um perfil decrescente onde, com todos os substratos, valores mínimos foram identificados em 48 horas, de pH 2,2 para pectina, pH 1,8 para o resíduo de bagaço e também pH 1,8 para o resíduo composto de sementes e cascas de maçãs.

Figura 14 - Perfil de pH em função do tempo de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.

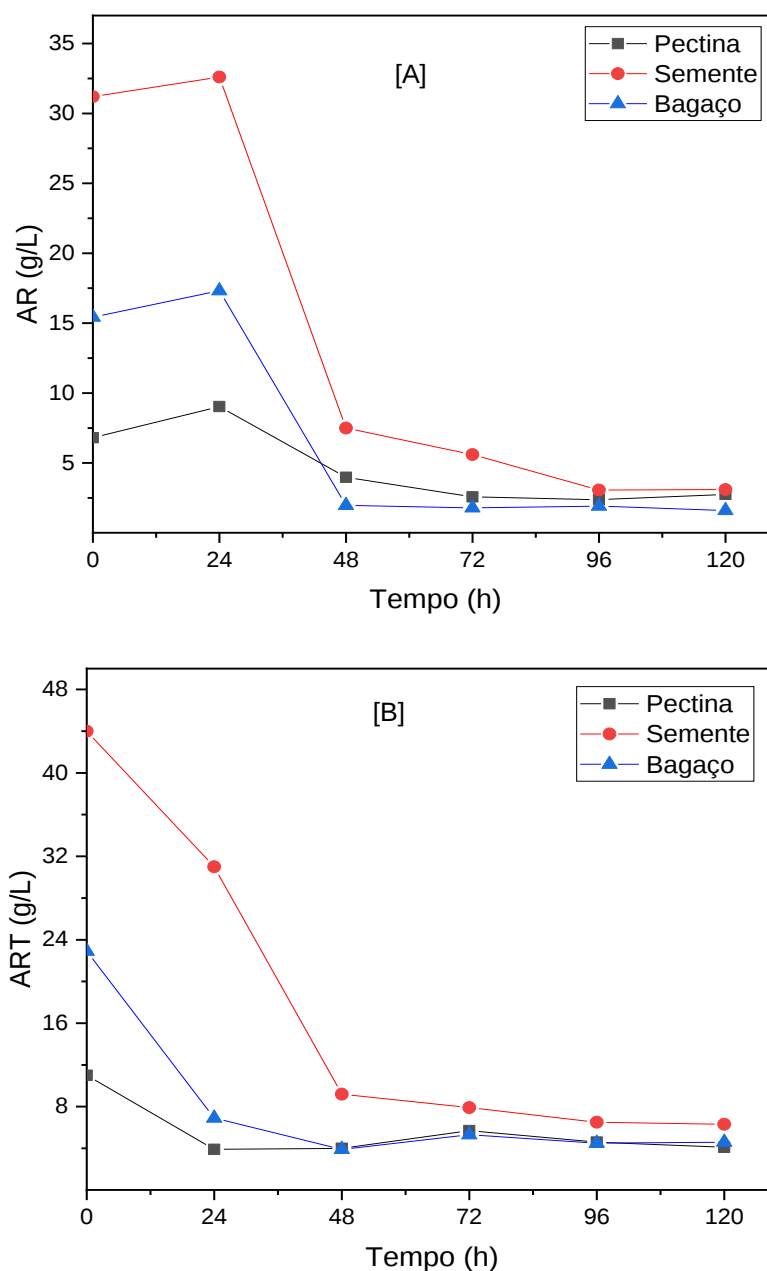


Essa queda de pH, observada na Figura 14, coincide com a fase de maior crescimento celular (Figura 13). Na sequência, com a redução do crescimento, até o final do cultivo observou-se um sutil aumento nos valores de pH para todas as condições, chegando a pH 2,5 com o uso de pectina, 2,16 no meio contendo extrato aquoso de bagaço e 1,93 no caso de extrato aquoso de sementes/cascas de maçãs. Este perfil de queda do pH durante a fase de intenso crescimento celular na produção de pectinases por fungos do gênero *Aspergillus* foi observado em relatos de outros autores (Malvessi e Silveira, 2004; Reginatto *et al.*, 2016); Sandri, 2010; Fontana e Silveira, 2012; Meneghel, 2020). O comportamento está associado a fatores como a produção de ácidos orgânicos do metabolismo celular, ácido carbônico gerado pela metabolização de carboidratos e à liberação do íon amônio (NH_4^+) (Moore-Landecker, 1996). Malvessi e Silveira (2004) observaram que a queda no pH é essencial para a excreção de pectinases, corroborada por Fontana e Silveira (2012) e Meneghel *et al.* (2014). Segundo os autores, no final do processo, o pH aumenta, relacionado à fase estacionária do crescimento celular.

Na Figura 15A, relacionado à variação da concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo, um perfil diferenciado é observado. Em 24 horas, observa-se um leve incremento na concentração de AR em todas as condições, o que pode estar relacionada à parcial hidrólise de compostos mais complexos pela ação de enzimas secretadas pelo fungo. Nos meios formulados com pectina, com extrato aquoso de bagaço e de sementes/cascas, os picos observados em 24 horas foram de 9,03, 17,32 e 32,6 g/L, respectivamente. No decorrer do processo, como resultado do crescimento celular (Figura 13), a redução da concentração de AR foi identificada a partir de 48 horas, chegando ao final do cultivo em valores residuais de 2,75, 1,62 e 3,1 g/L, respectivamente.

Ainda no que tange ao substrato, conforme pode-se observar na Figura 15 [B], houve uma redução expressiva das concentrações de açúcares redutores totais (ART) dos valores iniciais de 11,0, 22,9 e 44,0 g/L em até 48 horas de cultivo em todas as condições. Nesse tempo, a quantificação de ART foi de 3,9, 4,0 e 9,2g/L para os substratos pectina, extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas, respectivamente, e assim se mantiveram neste patamar médio até o final do cultivo. Esses valores residuais relacionados à quantificação de ART podem estar relacionados à presença de açúcares não metabolizáveis pela população microbiana.

Figura 15 - Variação das concentrações de açúcares redutores (AR) [A] e açúcares redutores totais (ART) [B] em função do tempo de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.

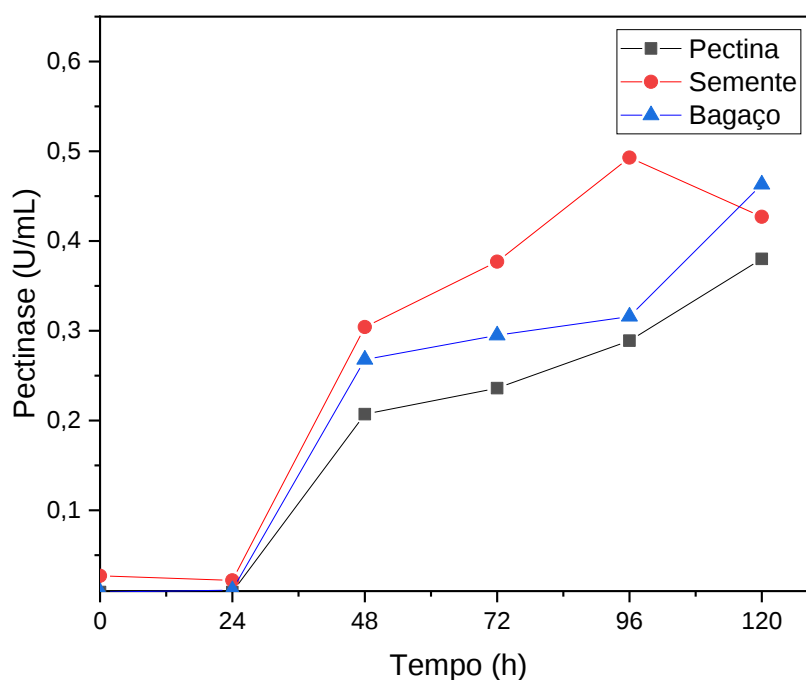


Fonte: A autora (2024).

Com relação à atividade enzimática de pectinases, nas condições testadas, observa-se o perfil distinto relacionado ao uso de extrato aquoso de sementes/cascas de maçã, o qual foi crescente até 96 horas, apresentando atividade de 0,52 U/mL (Figura 16). Em 120 horas, entretanto, foi identificada a queda para 0,43 U/mL. O

intervalo de tempo avaliado não pareceu suficiente para observa-se um decaimento na atividade da enzima quando utilizado a pectina comercial ou com extrato aquoso de bagaço de maçã, observou-se incremento gradual da atividade até 120 horas, quando os cultivos foram encerrados. Neste tempo de cultivo, foram quantificados 0,38 U/mL e 0,46 U/mL, respectivamente (Figura 16).

Figura 16 - Atividade de pectinases totais em função do tempo de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.



Fonte: A autora (2024).

Embora o pico de pectinases tenha sido observado em valores de pH inferiores (Figura 14), observa-se o aumento da atividade enzimática em todos os substratos a partir de 24 horas de cultivo, momento em que o pH se aproximou de 2,5 no meio contendo extrato aquoso de bagaço de maçã, e em torno de 2,8 para a pectina e com o resíduo de semente/cascas. Ao fazer a relação com a concentração de biomassa, por sua vez, observa-se que a produção de pectinases é incrementada na fase em que não se observa o perfil de aumento do crescimento, o que sugeriria a não associação e/ou a parcial associação da produção de enzimas com o crescimento fúngico. Salienta-se que neste trabalho não foi realizado ensaio na ausência total de indutor em função dos resultados anteriores reportados na literatura. Atividade

enzimática de pectinases praticamente nula foi observada em cultivo na ausência de indutor no meio, uma vez que as enzimas fúngicas do complexo pectinolítico são de caráter induzido (Meneghel, 2020).

Na Tabela 3 são apresentados os resultados globais dos cultivos de *A. oryzae*, de forma a proporcionar a comparação do efeito do uso das distintas fontes indutoras sobre o metabolismo e produção da enzima.

Tabela 3 - Parâmetros de avaliação do cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 com o uso de pectina comercial e de extratos aquosos de bagaço e de sementes/cascas de maçãs.

Parâmetro	Pectina comercial	Extrato aquoso de bagaço de maçã	Extrato aquoso de sementes/cascas de maçã
$X_{\max}$ (g/mL)	0,94	1,51	1,72
$t_{X,\max}$ (h)	48	48	72
$P_{\max}$ (U/mL)	0,380	0,463	0,521
$t_{P,\max}$ (h)	120	120	96
pH $P_{\max}$	2,47	2,16	1,89
$Y_{P/X}$ (U/g)	0,491	0,368	0,301
p (U/mL.h ⁻¹)	0,032	0,038	0,054

$X_{\max}$ – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu $X_{\max}$; $P_{\max}$ – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\max}$ – tempo em que ocorreu $P_{\max}$; pH $P_{\max}$ – valor de pH em que foi atingido $P_{\max}$; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; p – produtividade de $P_{\max}$.

Fonte: A autora (2024).

Observa-se que a máxima concentração de biomassa ($X_{\max}$) foi superior ao utilizar os extratos naturais no meio, sendo 1,51 g/mL para o bagaço de maçã e 1,72 g/mL para sementes/cascas de maçãs em comparação com a pectina comercial, de 0,94 g/mL. O tempo para atingir essa biomassa máxima ($t_{X,\max}$) foi de 48 horas tanto para a pectina comercial quanto para o bagaço de maçã. Por outro lado, com extrato de sementes/cascas o pico de biomassa foi tardio, em 72 horas.

Quanto à máxima atividade de pectinases ($P_{\max}$), os valores mais altos também foram observados nos cultivos com extratos naturais: 0,463 U/mL para bagaço de maçã e 0,521 U/mL para sementes/cascas de maçã, frente ao valor de 0,380 U/mL obtido com pectina comercial. Porém, como mencionado anteriormente, esses dados não podem ser considerados na íntegra por ter sido considerado o valor teórico de pectina contida no referido resíduo e não quantificado experimentalmente em relação à pectina comercial. Ainda, como mencionado anteriormente, não foi feita a

caracterização físico-química dos meios compostos por resíduos, o que poderia indicar alguma diferença nutricional que pudesse favorecer ou não o desenvolvimento microbiano e a produção de enzimas.

O tempo para atingir essa atividade máxima ($t_{p,max}$) foi de 120 horas para os substratos de pectina comercial e bagaço de maçã, enquanto no cultivo com sementes/cascas de maçã foi atingida a máxima atividade em 96 horas, indicando maior eficiência temporal.

Os valores de pH no momento de máxima atividade enzimática (pH_{Pmax}) foram ligeiramente mais baixos para os extratos naturais (2,16 para bagaço e 2,10 para sementes/cascas) em comparação com a pectina comercial (2,47), demonstrando que a produção de pectinases ocorre em meio ácido. A produção específica de pectinases ($Y_{P/X}$) foi superior com o uso de pectina comercial (0,491 U/g), enquanto os extratos de bagaço e sementes/cascas apresentaram valores de 0,368 U/g e 0,301 U/g, respectivamente. Isso indica que, apesar dos substratos naturais resultarem em maior produção de enzimas em termos absolutos, a eficiência por unidade de biomassa foi maior na pectina comercial.

Por fim, a produtividade (p) de pectinases foi mais elevada no cultivo com sementes/cascas de maçãs (0,054 U/mL.h⁻¹), seguido pelo bagaço de maçã (0,038 U/mL.h⁻¹) e pela pectina comercial (0,032 U/mL.h⁻¹). Assim, conclui-se que os extratos aquosos de bagaço e sementes/cascas de maçãs são substratos promissores para a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae*, oferecendo uma alternativa sustentável e eficiente em comparação à pectina comercial.

5 CONCLUSÃO

De forma geral, com esse estudo foi observada aplicabilidade e o potencial dos resíduos gerados no processamento de suco de maçã como indutores na formação de pectinases por *A. oryzae* em processo submerso, sendo observados resultados superiores ao cultivo com pectina cítrica comercial.

Os resultados mostraram que os extratos naturais apresentaram desempenho superior ao da pectina comercial, com destaque para o resíduo composto por sementes/cascas, que alcançou uma atividade enzimática máxima de 0,52 U/mL em 96 horas, comparado aos 0,38 U/mL obtidos com a pectina comercial no mesmo período e aos 0,46 U/mL obtidos com o extrato aquoso de bagaço de maçã em 120 horas.

Apesar dos resultados superiores em termos de produção de pectinases em cultivo no qual foi usado extrato aquoso de sementes/cascas de maçãs, pode-se sugerir que tenha sido similar ao obtido com o relativo ao bagaço de maçã, uma vez que foi realizada uma diluição adicional na etapa inicial de extração, sugerindo potencial para otimização em estudos futuros.

Em relação à biomassa, os cultivos contendo resíduos naturais mostraram maior concentração celular (até 17,2 g/L), reforçando a eficiência dos substratos em promover o crescimento fúngico e a indução enzimática.

A utilização desses extratos aquosos em substituição à pectina purificada pode contribuir para a diminuição significativa dos custos de produção de enzimas pectinolíticas, gerando uma economia circular. Além disso, essa substituição promove uma destinação mais eficiente para os resíduos agroindustriais gerados pelo processamento de frutas no Brasil, agregando valor a esses subprodutos e incentivando práticas mais sustentáveis.

Como perspectivas para a continuidade deste trabalho, sugerem-se a realização da caracterização físico-química das matérias-primas, bem como a análise prévia dos extratos aquosos quanto ao teor de pectina e de outros açúcares. Além disso, recomenda-se a realização de cultivos submersos em biorreator de bancada, com as condições controladas e posterior imobilização dos extratos enzimáticos brutos, os quais seriam usados na avaliação da clarificação de diferentes sucos de frutas. Também importante salientar a necessidade de avaliação de diferentes tipos

de enzimas que possam estar sendo produzidas durante o cultivo além de pectinases. Por fim, poderia ser incluída a análise econômica para a avaliação da viabilidade do processo em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <https://www.abpm.org.br/>. Acesso em: 23 mai. 2024.

AGAPOMI - **Associação Gaúcha de Produtores de Maçã**. Jornal da Agapomi edição 296, P. 07 - 2019.

AMIN, F. et al. Purification, Kinetic, and Thermodynamic Characteristics of an Exopolygalacturonase from *Penicillium notatum* with Industrial Perspective. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 183, p. 426-443, 2017.

AQUARONE, E. et al. Biotecnologia Industrial. **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 2001.

AREVALO-VILLENA, M. et al. Pectinases yeast production using grape skin as carbon source. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 89, 2011.

ASPINALL, G.O. Pectins, plants gums, and other plant polysaccharides. In: **The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**. New York: Academic Press. Vol. 2, p. 515, 1970.

BARREIRA J.C.M., ARRAIBI A.A., FERREIRA I.C.F.R. **Bioactive and functional compounds in apple pomace from juice and cider manufacturing: Potential use in dermal formulations**. Trends Food Sci Technol. p.76-87, 2019.

BASTOS, R.G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos – Editora Universitária, 2010.

BASTOS, S. C. Pectinases from *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) De Vries: culture conditions, partial purification and characterization. **Theses (doctorate)**. Federal University of Lavras, p.133, 2012.

BIZ, A. et al. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54–62, 2016.

BON, E. P. S. et al. Bioprocessos para produção de enzimas In: Elba P.S. Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado. **Anais**. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.

BOTEON, Margarete; et al. El Niño: efeitos no desenvolvimento da produção das frutas no verão 2023/24. **Brasil Hortifruti**, Piracicaba, v.22, n.241, p.8-10, fevereiro, 2024. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/el-nio-temperaturas-elevadas-afetam-producao-dos-hfs-em-2023-24.aspx>. Acesso em: 19 mai. 2024.

BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R.; **Enzyme Microb. Technol.**; v. 27, p. 127, 2000.

BRAVO S.M.E., MORALES M., DEL MÓNACO S.M., CABALLERO A.C.. Apple bagasse as a substrate for the propagation of Patagonian wine yeast biomass. **J Appl Microbiol**; p.1414–1425, 2019.

CAMILO, A. P.; DERNARDI, F. **Cultivares: descrição e comportamento no Sul do Brasil**. In: A CULTURA da macieira. Florianópolis: EPAGRI, p. 113-168, 2006.

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

COLLA, E. *et al.* Simultaneous Production of Amyloglucosidase and ExoPolygalacturonase by *Aspergillus niger* in a Rotating Drum Reactor. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 181, p. 627–637, 2016.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the Enzyme. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, n. 1, p. 135-141, 2009.

COSTA, L. F. F., SANTOS, M. G., MAFFESSIONI D. Evaluation of pectinase production potential from apple hand residue by solid state fermentation. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.3, p. 27797-27811, 2021

CULTIVO e mercado da maçã. **Sebrae**, 2014. Disponível em: <https://respostas.sebrae.com.br/cultivo-e-mercado-da-maca/>. Acesso em: 23 mai. 2024.

DE LUCA, G. B. Economia circular, benefícios, desafios e nova institucionalidade. Trabalho de conclusão de curso. **Faculdade Presbiteriana Mackenzie Rio**. Rio de Janeiro, 2024.

DHILLON G.S; KAUR S.; BRAR S.K. **Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review**. *RenewSustain Energy Rev.* p.789–805, 2013.

DOS 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**, v. 4, n. 2, p.181-188, 2018.

FAOSTAT - Agricultural Productions Statistics 2000-2021. **FAOSTAT Analytical Brief 60**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, p.9, (2021). Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/58971ed8-c831-4ee6-ab0a-e47ea66a7e6a/content>. Acesso em: 06 jul. 2024.

FAVELA-TORRES, E; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and**

Biotechnology, v. 44, p. 221-227, 2006.

FERNANDES P.A.R., FERREIRA S.S., BASTOS R., FERREIRA I., CRUZ M.T., PINTO A., *et al.* **Apple Pomace Extract as a Sustainable Food Ingredient.** Antioxidants; p.189, 2019.

FERREIRA, P. A. *et al.* **Revista Processos Químicos.** Goiás: Gerência de Educação Profissional, Faculdade de Tecnologia SENAI v.3, n.5, 2009.

FERTONANI, H. C. R. Estabelecimento de um modelo de extração ácida de pectinade bagaço de maçã. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006.

FINKLER, A. T. J. *et al.* Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.121, p.1–12, 2017.

FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. **Braz. J. Chem. Eng.** v. 29, p. 683-690, 2012.

GARG, G. *et al.* Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotech**, v. 6, p. 47, 2016.

GIRARDI César Luís, ZANDONÁ Giovana Paula. **Parâmetros tecnológicos para produção de suco integral de maçã.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215921/1/Doc-118.pdf>. Acesso em: 19 mai. 2024.

GRAMINHA, E. B. N. *et al.* Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p.1–22, 2008.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Application of pectinases in beverages. **Biotechnol. Progress.** p. 453-462, 1996.

HAMPSON, C. R.; KEMP, H. **Characteristics of important commercial apple cultivars.** In: FERRE, D. C.; WARRINGTON, I.J. Apples: botany, 2003.

HANG Y.D., WOODAMS E.E. Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production. **Mircen J.** p.283–287, 1986.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

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

IAC, INSTITUTO AGRONÔMICO CAMPINAS. **Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas**, SP, 7a ed., 452 p., 2014.

IBGE. **Produção de Maçã**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maca/br>. Acesso em: 19 mai.2024.

IGLESIAS, I.; CARBÓ, J.; BONANY, J.; MONTSERRAT, R. **Innovación varietal en manzano**. Fruticultura Profesional, Barcelona, p. 13-30, 2009.

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

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.** p.215-227, 2001.

KAUR, S. J.; GUPTA, V. K. Production of pectinolytic enzymes pectinase and pectinlyase by *Bacillus subtilis* SAV-21 in solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 333–342, 2017.

KLUGE, J.; TERFEHR, D.; KUCK, U. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 102, p. 6357–6372, 2018.

LAAKSONEN, O.; SANDELL, M.; NORDLUND, E.; HEINIÖ, R.L.; MALINEN, H.L.; JAAKKOLA, M.; KALLIO, H. The effect of enzymatic treatment on blackcurrant (*Ribesnigrum*) juice flavor and its stability. **Food Chem.** p.31-41, 2012.

LEA, A.G.H. Enzymes in production of beverages and fruit juices. In: **Enzymes in Food Processing**. Glasgow: Blackie Academic e Professional. p. 223-249, 1998.

LIMA, J. O. *et al.* Pectin lyase overproduction by *Penicillium griseoroseum* mutants resistant to catabolite repression. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p.602– 606, 2017.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de BROCK**. 14. ed. Flávio Guimarães da Fonseca, Porto Alegre: Artmed, c.5, p. 158-163, 2016.

MAIORANO, A.E. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. **Tese de Doutorado**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1990.

MAIORANO, A.E. Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. **Dissertação de mestrado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP, 1982.

MALVESSI E. Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Caxias do Sul,

2000.

Malvessi, E.; Silveira, M.M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Braz. Arch. Biol Technol.** v.47; p.693-702, 2004.

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

MARTOS, M. A. et al. Production of pectinases by *Aspergillus niger*: influence of fermentation conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 567–572, 2009.

MDIC - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **Diagnóstico de referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Bio-Rio, p.50, 2012.

MELLO, Loiva M. R. de. Comunicado Técnico, 50. **Embrapa**, Bento Gonçalves, ed. 1, 2004. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55299/1/cot050.pdf>. Acesso em: 19 mai. 2024.

MENEGHEL, L.; et al. Aproveitamento de resíduo de processamento de maçã para produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus oryzae*. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016**. p.1-4, 2015.

MENEGHEL, L.; NEGRI, F.; POZZA, A.; ROSSI, C.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Estudo do inóculo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a produção de pectinases em processo submerso. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais**. Fortaleza, 2015.

MENEGHEL, L.; REIS, G.P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochem.** v.49; p.1800-1807, 2014.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MOORE-LANDECKER, E. Fundamentals of Fungi. **New Jersey: Prentice Hall**. p.574, 1996.

MORDOR INTELLIGENCE. **Tamanho do mercado de enzimas industriais e análise de participação – Tendências e previsões de crescimento (2024 – 2029)**. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/industrial-enzymes-market>. Acesso em: 19 jun. 2024.

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

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, São Paulo, v. 41, n. 242, p.28-33, 2007.

NAJAFPOUR, G.D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1ed. Netherlands: Elsevier. p.421, 2007.

NCBE, National Center of Biotechnology Education. **Enzymes in fruit juice production**, 2000. Disponível em: <https://www.ncbe.reading.ac.uk/>. Acesso em 20 de jun. de 2024.

NGADI, M.O.; CORREIA, L.R. **Solid state ethanol fermentation of apple pomace as affected by moisture and bioreactor mixing speed**. Journal of Food Science, Chicago, n. 3, p.667-670, 1992.

OLIVEIRA, A. V. Estudo da produção e caracterização de biochar oriundo da pirólise do resíduo de maçã e suas aplicações. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, 2021.

ONU – Organização das Nações Unidas Brasil. **Os objetivos de desenvolvimento sustentável no Brasil**, 2024. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br>. Acesso em: 11 jul. 2024.

PAGANINI, C. *et al.* Aproveitamento de bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1231-1238, 2005.

PAGARRA, H. *et al.* Optimization and characterization of exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* cultured via solid state fermentation. **Jurnal Teknologi**, v. 81, n. 1, 2018.

PATIDAR M.K., NIGHOJKAR S., KUMAR A., NIGHOJKAR A. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. 3 **Biotech**. p.9, 2018.

PEZINI, L. *et al.* Produção e caracterização de farinhas alimentícias a partir da casca e da polpa da maçã gala. EIXO III – Ambiente, Sustentabilidades e Implicações na Saúde. **Revista rLAS®**; v. 5, n. 3, 2023.

PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. **Food Bioprod. Process**. p.259-265, 2010.

PINTO, L. L. L. Produção biotecnológica de álcool fenilético por fungos filamentosos em meio de cultura desenvolvido com utilização de resíduos de maçã (*Malus domestica*). **Tese de doutorado**, Universidade Estadual de Campinas,

2017.

PITOL, L.O. et al. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale-packed-bed bioreactor, **Chemical Engineering Journal**, v. 283 p. 1009–1018, 2016.

POLETO, P. et al. Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. **LWT - Food Science and Technology**, v.79, p.92-101, 2017.

POONDLA, V. et al. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 70–76, 2016.

PRAKASH, D.; NAWANI, N.; PRAKASH, M.; BODAS, M.; MANDAL, A.; KHETMALAS, M.; KAPADNIS, B. Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **BioMed Res**, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/264020>. Acesso em 10 jun. 2024.

REBELLO, S.; et al. Recent advancements in the production and application of microbial pectinase: an overview. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, n. 3, p. 381–394, 2017.

REGINATTO, C. Produção e caracterização parcial de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em processo submerso. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Caxias do Sul, 2016.

REGINATTO, C.; et al. Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. **Process Biochemistry**. v.58, p.1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.018>. Acesso em: 06 jul. 2024.

REID S., SIMS I.M., MELTON L.D., GANE A.M. **Characterization of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*)** *Carbohydr Polym.* p.369–379, 1999.

ROCHA PARRA A.F., SAHAGÚN M., RIBOTTA P.D., FERRERO C., GÓMEZ M. Particle Size and Hydration Properties of Dried Apple Pomace: Effect on Dough Viscoelasticity and Quality of Sugar-Snap Cookies. **Food Bioprocess Technol**; p.1083–1092, 2019.

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 em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2018.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; DE CARVALHO, J. C. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by

solidstate fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10657–10662, 2011.

ROSSI, C. *et al.* Efeito da fonte de carbono sobre a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em meio líquido. In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016. **Anais**. Caxias do Sul: ENZITEC, 2016.

SANDRI, I.G. Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos. Tese de doutorado. **Instituto de Biotecnologia**, Universidade de Caxias do Sul, 2010.

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

SANTIAGO, M., et al. Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Application of Cold-Active Enzymes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1408, 2016.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol 2. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. p.541, 2001.

SHAFIEE M.N. **Apple pomace: by product utilisation**. Int J Res Anal Rev. p.190–192, 2017.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. **Overview of applied solid-state fermentation in Brazil**. Biochem. Eng. J; v.13, p.205, 2003.

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** p.181-191, 1979.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **I.J.S.N.**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUCO de maçã e diferentes usos na indústria. **Universidade de São Paulo**, 2022. Disponível em: <https://fsp.usp.br/eccco/index.php/2022/11/03/suco-de-maca-e-diferentes-usos-na-industria/>. Acesso em: 19 mai. 2024.

SUHAIMI, N. et al. Optimization of pectinase production by *Aspergillus niger* using orange pectin based medium. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, p. 259-268, 2016.

TARI, C.; GÖGUS, N.; TOKATLI, F. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. **Enzyme Microb. Technol.** p.1108-1116, 2007.

TIGUNOVA, O.; Bratishko, V.; Shulga, S. Apple pomace as an alternative substrate for butanol production. **Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of**

Ukrain, 2023.

UENOJO, M.; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.

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

USDA. **U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE**. FoodData Central, 2020. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/>. Acesso em: 20 mai. 2024.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763–778, 2018.

VASHISHT A., THAKUR K., KAULDHAR B.S., KUMAR V., YADAV S.K. Waste valorization: Identification of an ethanol tolerant bacterium *Acetobacter pasteurianus* SKYAA25 for acetic acid production from apple pomace. **Sci Total Environ**, p.956–964, 2019.

WHITEHURST, R.J.; OORT, M. V. **Enzymes in Food Technology**. John Wiley & Sons. New Delphi, ed. 2, p. 245, 2010.