



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS – PCF

**Enzimas produzidas pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* - cepa  
PI3S3 – Caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas**

JULIANE ALMEIDA BATTISTI

CASCAVEL-PR  
2022

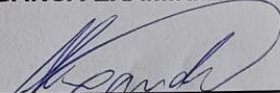
**Juliane Almeida Battisti**

**Enzimas produzidas pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* -  
cepa PI3S3 – Caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microorganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

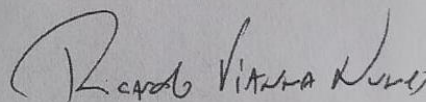
Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Maller

**BANCA EXAMINADORA:**



---

Prof. Dr. Alexandre Maller  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná UNIOESTE  
Orientador



---

Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná UNIOESTE



---

Prof. Dr. Marina Kimiko Kadōwaki  
Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná UNIOESTE

**Cascavel - PR  
2022**

## **Enzimas produzidas pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* - cepa PI3S3 - Caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas**

### **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Juliane Almeida Battisti, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida em 7 de março de 1998, graduou-se em Biomedicina, pela Universidade Paranaense - Unipar em 2020. Trabalhou como estagiária na área, de 2016 a 2019, em Cascavel. Em março de 2020, iniciou as atividades como aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas e desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo docente Dr. Alexandre Maller.

Almeida Battisti, Juliane

Enzimas produzidas pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* - cepa PI3S3 ? Caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas / Juliane Almeida Battisti; orientador Alexandre Maller. -- Cascavel, 2023.

105 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. pectinases. 2. sacarificação de resíduos agroindustriais. 3. tecido denim. 4. ração animal. I. Maller, Alexandre, orient. II. Título.

**“Deus não nos inspira sonhos irrealizáveis”**

(Santa Teresinha do Menino Jesus)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu guia, sempre abrindo as portas e mostrando as oportunidades.

À minha mãe, que sempre me incentivou com seu exemplo de dedicação e coragem para atingir suas metas.

Ao meu esposo, por todo apoio e parceria.

À minha avó, Ana, por toda ajuda.

Aos amigos do laboratório, tanto da Unioeste de Cascavel como de Marechal Cândido Rondon, incluindo alunos de mestrado, de iniciação científica e professores, por toda troca de conhecimento, apoio, favores e parceria.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Maller, primeiramente pela oportunidade e por toda orientação e paciência.

Agradeço ao CNPq, CAPES, FUNDEP e PCF UNIOESTE, que contribuíram com o trabalho financeiramente.

Somente com o auxílio de todos é que foi possível a obtenção do título de mestre.

## Enzimas produzidas pelo fungo filamentoso *Thermoascus aurantiacus* - cepa PI3S3 - Caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas

### RESUMO

A biotecnologia, atualmente, já expressa a sua grande importância, demonstrada por meio da obtenção de várias substâncias através da manipulação de microrganismos, para a criação de novas tecnologias, as quais apresentam benefícios para a saúde humana e para a ecologia. Nesse contexto, é possível salientar que as enzimas são aplicadas nas indústrias farmacêuticas, na produção de alimentos, na manutenção do equilíbrio do ambiente, aplicação na indústria têxtil e na nutrição animal, entre outras aplicações. Porém, ainda se fazem necessários estudos para melhoramento genético e novas aplicações enzimáticas. O fungo *Thermoascus aurantiacus* é um fungo filamentoso, termofílico e excelente produtor de diversas enzimas com potencial para aplicações biotecnológicas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar aplicações biotecnológicas com o extrato bruto do fungo que contém atividade de diferentes glicosil hidrolases, como amilase (20,86 U mL<sup>-1</sup>), celulase (10,46 U mL<sup>-1</sup>), invertase (1,65 U mL<sup>-1</sup>), pectinase (29,14 U mL<sup>-1</sup>) e xilanase (41,84 U mL<sup>-1</sup>). Foi realizada aplicação do extrato enzimático para verificar a hidrólise da biomassa, bagaço de cana, milho e resíduo de milho, e a maior liberação de açúcar redutor foi observada no resíduo de milho (49,3 mg.g<sup>-1</sup>) com 72 horas de tratamento, contra 35,14mg.g<sup>-1</sup> do bagaço de cana. O extrato enzimático foi aplicado na ração animal, com diferentes concentrações, de modo que esta foi hidrolisada, liberando 158 g de açúcarredutor por kg de ração com 12 h de tratamento. Os tratamentos com 1, 3 e 6 horas aumentaram a liberação de açúcar redutor em 1,8; 3,0 e 4,9 vezes, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle. *In vivo* não foi observada melhora no ganho de peso e conversão alimentar dos frangos de corte, porém, na morfofisiologia do intestino, verificada por meio de microscopia óptica, observou-se pequeno aumento na área de absorção, além de sutil melhora na energia metabolizável das excretas. A enzima Poligalacturonase (PG) foi semipurificada, por meio de colunas cromatográficas, com peso molecular estimado em 39 kDa, foi aplicada no tecido denim (jeans), gerando um biopolimento da fibra comprovado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de modo que tal metodologia pode ser empregada substituindo metodologias poluentes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pectina, pectinases, extrato enzimático, sacarificação de resíduos agroindustriais; tecido denim; ração animal.

## **Enzymes produced by the filamentous fungus *Thermoascus aurantiacus* - strain PI3S3 - Biochemical characterization and biotechnological applications**

### **ABSTRACT**

Currently, biotechnology is already of great importance, demonstrated through the expression of the ecology of various substances through the manipulation of new microorganisms, for the creation of technologies, which have health benefits. In this context, the enzymes applied in the food industries, in the maintenance of the environment, among other industries, stand out. However, genetic studies are still being carried out for improvement and new enzymatic applications. *Thermoascus aurantiacus* is a filamentous, thermophilic fungus and an excellent producer of a range of enzymes with biotechnological applications. Thus, the present work aimed to carry out biotechnological applications with the crude extract of the fungus that contemplate the activity of different glycosyl hydrolases, such as amylase ( $20.86 \text{ U mL}^{-1}$ ), cellulase ( $10.46 \text{ U mL}^{-1}$ ), invertase ( $1.65 \text{ U mL}^{-1}$ ), pectinase ( $29.14 \text{ U mL}^{-1}$ ) and xylanase ( $41.84 \text{ U mL}^{-1}$ ). The application of the extract to verify the hydrolysis of the biomass showed that the enzyme complex presented on the three substrates tested, corn bagasse and corn sugar, and the highest application of reducing sugar was observed in corn corn ( $49.3 \text{ mg.g}^{-1}$ ) after 72 hours of treatment, against  $35.14 \text{ mg.g}^{-1}$  for sugarcane bagasse. The enzymatic extract was applied to the animal feed, so that it was hydrolyzed, reducing 158 g of sugar per kg of feed with 12 h of treatment, treatments with 1, 3 and 6 hours increased the release of reducing sugar by 1 hour .8; 3.0 and 4.9 times, respectively, when compared to the control treatment. In vivo, no improvement was observed in the weight gain and conversion of broilers, however, in the morphology of the intestine, verified by optical microscopy, a small increase in the absorption area was observed, in addition to a subtle improvement in the metabolism of excreta. The Polygalacturo-purified enzyme, through DEAE Sephadex column, having an estimated molecular weight of 39 k molecular weight, was applied to the denim fabric (PG) generating a biopolishing of the Daje fiber and chromatographic weight by denim electron microscopy (SEM), generating in a way that such methodology can be employed employing methodologies.

**KEYWORDS:** Pectin, pectinases, enzymatic extract, saccharification of agro-industrial residues; denim fabric; animal food.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	6
1.1.	Fungos.....	6
1.2.	Pectina.....	7
1.3.	Enzimas pectinolíticas - pectinases.....	8
1.4.	Aproveitamento da biomassa lignocelulósica .....	9
1.5.	Aplicações enzimáticas biotecnológicas .....	11
1.5.1.	Ração animal .....	11
1.5.2.	Etanol de segunda geração .....	13
1.5.3.	Aplicação enzimática no tecido denim .....	15
2.	OBJETIVOS .....	16
2.1.	Geral .....	16
2.2.	Específicos.....	16
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1.	Microrganismo utilizado .....	17
3.2.	Produção enzimática.....	17
3.3.	Determinação da atividade enzimática e conteúdo proteico .....	17
3.4.	Sacarificação do bagaço de cana e resíduo de milho pelo extrato bruto de <i>T. aurantiacus</i> .....	18
3.5.	Tratamento da ração de frangos com extrato enzimático bruto de <i>T. aurantiacus</i> PI3S3 .....	18
3.5.1.	Testes <i>in vitro</i> .....	18
3.5.2.	Teste de digestibilidade em vitro .....	19
3.5.2.1.	Simulação da digestão da ração no Papo.....	19
3.5.2.2.	Simulação de digestão da ração na Moela/Estômago .....	19
3.6.	Análise de citotoxicidade.....	19
3.7.	Aplicação na ração animal <i>in vivo</i> .....	20
3.7.1.	Instalações animais.....	20



3.7.2. Tratamentos realizados.....	20
3.7.3. Desempenho.....	22
3.7.4. Morfometria intestinal.....	22
3.7.5. Determinação dos valores de energia metabolizável.....	23
3.8. Purificação da Poligalacturonase.....	23
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da enzima poligalacturonase.....	24
3.10. Energia de ativação.....	24
3.11. Biopolimento do tecido denim (jeans).....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Composição do extrato enzimático bruto.....	25
4.2. Influência do extrato de <i>T. aurantiacus</i> na sacarificação do bagaço de cana e resíduo de milho.....	27
4.3. Ração animal tratada com extrato enzimático bruto de <i>T. aurantiacus</i> ....	28
4.4. Análise de citotoxicidade.....	29
4.5. Efeito da aplicação do extrato de <i>T. aurantiacus</i> na ração animal de aves <i>in vivo</i> .....	31
4.5.1. Desempenho.....	31
4.5.2. Morfometria intestinal.....	32
4.5.3. Determinação dos valores de energia metabolizável.....	35
4.6. Purificação.....	36
4.6.1. Eletroforese.....	37
4.7. Energia de ativação.....	38
4.8. Aplicação da PG no biopolimento do tecido denim (jeans).....	39
5. CONCLUSÃO.....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
7. ANEXO I.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b>	Safra de produtos agrícolas e frutas 2021 atualizada em dezembro de 2021 (IBGE).....	10
<b>TABELA 2:</b>	Enzimas e seus respectivos substratos e efeitos (Adaptado de HENN, 2002).....	12
<b>TABELA 3:</b>	Problemas apresentados pelos combustíveis fósseis resolvidos pelo etanol.....	13
<b>TABELA 4:</b>	Conteúdo de ingredientes e nutrientes presente na ração em cada tratamento.....	21
<b>TABELA 5:</b>	Perfil enzimático do extrato bruto de <i>Thermoascus aurantiacus</i> PI3S3.....	25
<b>TABELA 6:</b>	Efeito do tempo de tratamento da ração com extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> na liberação de açúcares redutores por Kg de ração.....	28
<b>TABELA 7:</b>	Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo o extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> .....	31
<b>TABELA 8:</b>	Morfometria do segmento duodeno de frangos de corte alimentados com dietas contendo o extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> .....	32
<b>TABELA 9:</b>	Morfometria do segmento jejuno de frangos de corte alimentados com dietas contendo o extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i> .....	33

<b>TABELA 10:</b>	Energia metabolizável aparente expressa em kcal/kg de matéria seca (MS) e Matéria natural (MN) de excretas de frangos de corte tratados com extrato de <i>T. aurantiacus</i> PI3S3.....	35
<b>TABELA 11:</b>	Etapas de purificação de uma poligalacturonase de <i>T. aurantiacus</i> PI3S3.....	36
<b>TABELA 12:</b>	Efeito da Poligalacturonase de <i>T. aurantiacus</i> na liberação de açúcares redutores e perda de peso do jeans denim.....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b>	Molécula de pectina presente na estrutura da parede celular vegetal (MARTINS <i>et al.</i> , 2006).....	08
<b>FIGURA 2:</b>	Ação da endo e exo-poligalacturonase nos resíduos de ácido galacturônico (PAGNONCELI, 2018).....	09
<b>FIGURA 3:</b>	Ranking - Pecuária - Rebanhos (IBGE, 2020).....	13
<b>FIGURA 4:</b>	Comparação das etapas de produção de etanol de 1ª geração e etanol de 2ª geração (Figura elaborada pelo autor).....	15
<b>FIGURA 5:</b>	Efeito do extrato bruto de <i>T. aurantiacus</i> na liberação de açúcares redutores na sacarificação do bagaço de cana e resíduo de milho. Símbolos: (■) Controle; (□) Tratamento.....	27
<b>FIGURA 6:</b>	Efeito do extrato bruto de <i>T. aurantiacus</i> PI3S3 na liberação de açúcar redutor na simulação de digestibilidade. Símbolos: (■) Controle; (□) Tratamento. ....	29
<b>FIGURA 7:</b>	Análise de citotoxicidade do extrato bruto de <i>T. aurantiacus</i> através da viabilidade celular de macrófagos de acordo com atividade mitocondrial. Controle – meio de cultura; controle do diluente – maior quantidade de diluente utilizado.....	30
<b>FIGURA 8:</b>	Morfologia das vilosidades do segmento duodeno: A) Tratamento 1, B) Tratamento 2, C) Tratamento 3 e D) Tratamento 4.....	33
<b>FIGURA 9:</b>	Morfologia das vilosidades do segmento jejuno: A) Tratamento 1, B) Tratamento 2, C) Tratamento 3 e D) Tratamento 4.....	34
<b>FIGURA 10:</b>	Purificação parcial de uma poligalacturonase de <i>T. aurantiacus</i> PI3S3 através de coluna cromatográfica DEAE Sephadex.....	36

<b>FIGURA 11A:</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Amostra semipurificada por DEAE Sephadex. Símbolos: (M) marcador de peso molecular; (A) amostra pós DEAE.....	37
<b>FIGURA 11B:</b>	Massa molecular da poligalacturonase obtida a partir da análise de migração de bandas em SDS-PAGE.....	38
<b>FIGURA 12:</b>	Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação (Ea) da pectinase.....	39
<b>FIGURA 13:</b>	Microscopia eletrônica de varredura de jeans tratados com poligalacturonase PI3S3 de <i>T. aurantiacus</i> purificada. (A) Controle; (B) Denim não tratado; (C) Denim tratado com 1 U mL <sup>-1</sup> ; (D) Denim tratado com 3 U mL <sup>-1</sup> ; (E) Denim tratado com 5 U mL <sup>-1</sup> .....	41

## 1. INTRODUÇÃO

Técnicas biotecnológicas de utilização de enzimas microbianas em processos industriais são extremamente vantajosas, pois demandam de baixo custo energético e financeiro, geram uma redução no impacto ambiental e utilizam matérias-primas renováveis. Os fungos e suas enzimas exercem papéis importantes na nova bioeconomia (LANGE, 2017).

Dentre os microrganismos produtores de enzimas, encontram-se os fungos, os quais estão presentes de maneira abundante na natureza, adaptam-se aos mais diversos tipos de substratos, podem ser suplementados com resíduos agroindustriais, apresentando um baixo custo de cultivo e produzem grandes quantidades de enzimas extracelulares e biodegradáveis; devido a essas características, podem ser classificados como referência na produção de enzimas com aplicações industriais (USMANI *et al.*, 2021).

A aplicação das pectinases no ramo industrial é muito variada, sendo aplicáveis na produção de bioetanol, fermentação de chá e café, clarificação de sucos e vinhos, indústria têxtil e de ração animal (BARRETO, 2016).

### 1.1. Fungos

Os fungos formam um grupo microbiano muito diverso, com grande variedade metabólica, morfológica, e de habitat; estima-se que constituam o grupo de microrganismos com o mais elevado número de espécies presentes na natureza (TAKAHASHI, 2017).

Os fungos que crescem em temperaturas próximas a 45°C são classificados como termofílicos. Esses microrganismos não eram muito utilizados no início do século, porém, ganharam destaque, pois apresentam algumas vantagens, como redução do risco de contaminação por mesofílicos e a produção de enzimas termoestáveis. Essas termozimas (enzimas termofílicas e termoestáveis) possuem maior estabilidade à temperatura elevada, são normalmente mais resistentes a enzimas proteolíticas e a agentes detergentes e são estáveis em consideráveis faixas de pH, ampliando, assim, seu horizonte de aplicação (MARTINS *et al.*, 2006).

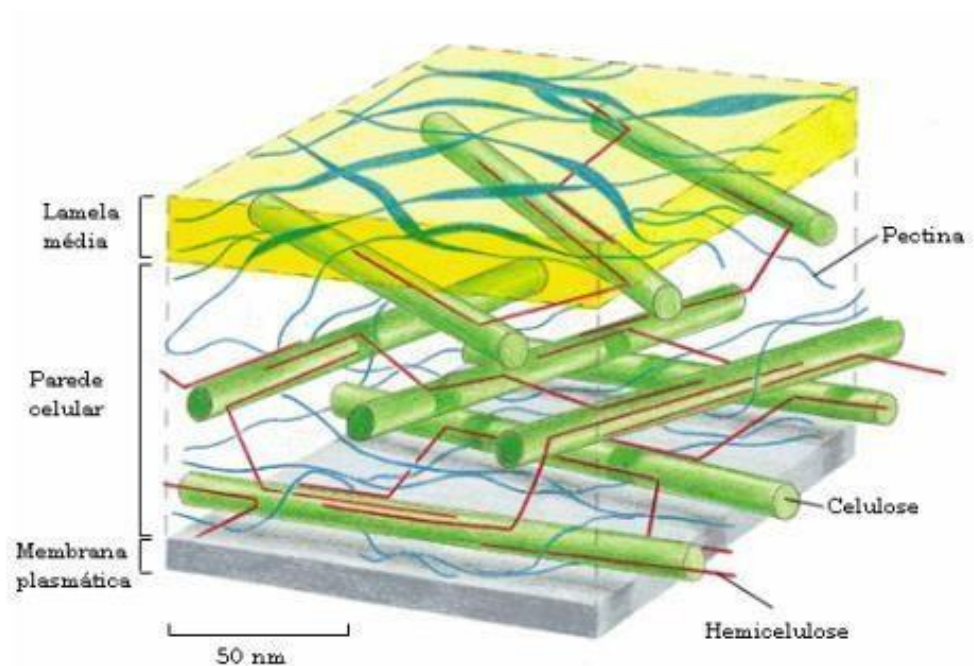
O fungo *T. aurantiacus* é um fungo filamentosos, termofílico e excelente produtor de pectinase com atividade simultânea de endo e exo-poligalacturonase (MARTINS *et al.*, 2007).

## 1.2. Pectina

A pectina é um polissacarídeo encontrado na parede celular de plantas (Figura 1) rico em ácido poligalacturônico (PAGNONCELI *et al.*, 2019). Encontra-se ligada a outros polissacarídeos estruturais, tais como celulose e hemicelulose e constitui em torno de 0,5 a 4% do peso absoluto das frutas (MARTINS *et al.*, 2006).

As pectinas possuem grande diversidade de funções, dentre elas, está o crescimento e desenvolvimento da planta, a sua defesa, estrutura da parede celular, incluindo a adesão celular, hidratação de sementes, perda de folhas e frutos (LARA-MÁRQUEZ *et al.*, 2011). Elas possuem uma complexa cadeia, a qual é composta principalmente por ácido galacturônico, mas também por outros açúcares neutros que se encontram ligados nas cadeias laterais (KUMAR *et al.*, 2014). Elas possuem algumas propriedades que possibilitam sua utilização na indústria como agentes gelificantes e como fibras nutricionais.

Porém, em certos casos, são indesejáveis e podem causar alguns problemas, tais como: dificuldade na extração da água em processamentos de concentração de sucos, além de entupimento de filtros em decorrência da gelificação, retardando, assim, a execução dos processos (MARTINS *et al.*, 2006).



**Figura 1** Molécula de pectina presente na estrutura da parede celular vegetal (MARTINS *et al.*, 2006).

### 1.3. Enzimas pectinolíticas - pectinases

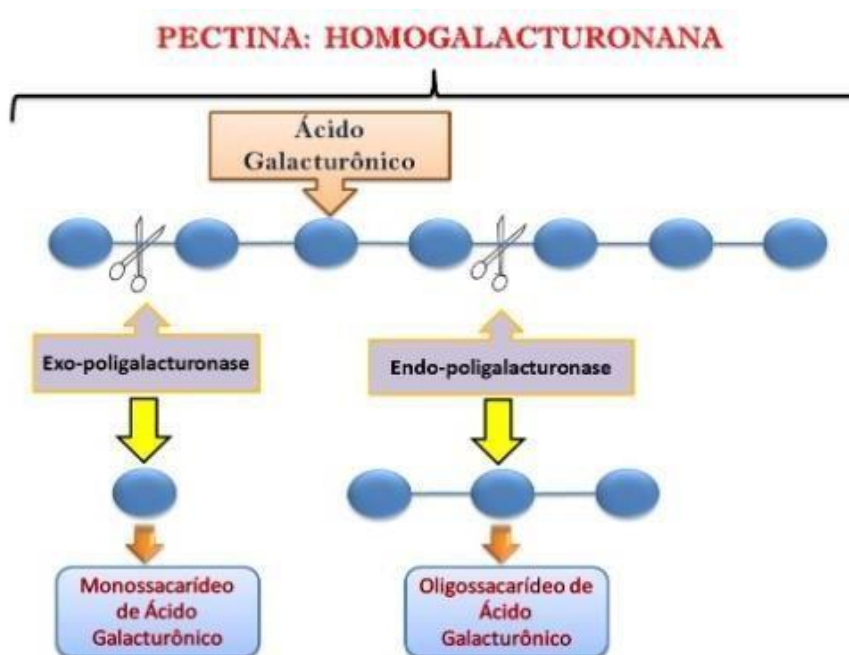
Pectinases são enzimas capazes de catalisar a degradação da pectina, liberando resíduos de ácido galacturônico. Elas são muito usadas no setor industrial para desempenhar diversas atividades, podendo atuar na clarificação de sucos e vinhos, degomagem de fibras vegetais, tratamentos de águas residuais industriais (PAGNONCELI *et al.*, 2019). Encontram-se em lugar de liderança entre as enzimas comercializadas nas indústrias mundialmente (AMIN *et al.*, 2019).

As pectinases são classificadas de acordo com a região em que atuam na molécula, sendo assim, de acordo com o local que realizam a hidrólise da ligação  $\alpha$ -1,4 entre os resíduos de ácido galacturônico, levam uma nomenclatura (PAGNONCELI, 2018).

A hidrólise pode ocorrer na extremidade não redutora ou internamente na cadeia principal, liberando, assim, monossacarídeos ou oligossacarídeos de ácido galacturônico, classificando as pectinases como exo-poligalacturonases ou endo-poligalacturonases, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 2 (PAGNONCELI, 2018). O fungo filamentoso *T. aurantiacus* possui uma atividade de endo e exo-poligalacturonase simultânea (MARTINS *et al.*, 2007).



As poligalacturonases (PGs) são divididas em 3 grupos, de acordo com seu modo de degradação do ácido poligalacturônico presente na pectina. O grupo das endo-poligalacturonases é caracterizado por agir nas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das cadeias polissacarídicas; o grupo das exo-poligalacturonases do tipo I, caracterizado por hidrolisar ácidos D-galacturônicos do terminal não redutor; e o grupo das exo-poligalacturonases tipo II, caracterizado por liberar digalacturonato do terminal não redutor do ácido poligalacturônico (PAGNONCELI *et al.*, 2019).



**Figura 2** Ação da endo e exo-poligalacturonase nos resíduos de ácido galacturônico (PAGNONCELI, 2018).

#### 1.4. Aproveitamento da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é classificada como recurso renovável proveniente de matéria orgânica, é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (FATIMA *et al.*, 2018).

Recentemente, notou-se que há um crescimento no interesse de utilização de vários resíduos agroindustriais, e muitos bioprocessos vêm se desenvolvendo para utilizar esses materiais como fonte para a produção de várias moléculas com grande valor agregado, por exemplo: enzimas que possuem as mais diversas aplicações industriais, proteínas microbianas, etanol e metabólitos secundários biologicamente ativos. A utilização dos resíduos agroindustriais como fonte em bioprocessos se

apresenta economicamente viável e, além disso, auxilia na resolução de problemas ambientais que são consequência de seu acúmulo na natureza (BARROS *et al.*, 2019).

Nesse contexto, é possível salientar que o Brasil é um grande produtor agrícola, como se pode observar na Tabela 1, porém, não apresenta geralmente um fim destinado aos resíduos agrícolas produzidos, realizando descarte incorreto, gerando prejuízos ao meio ambiente (PAULA, 2019).

**Tabela 1** Safra de produtos agrícolas e frutas 2021 atualizada em dezembro de 2021 (IBGE).

<b>Cultura agrícola</b>	<b>Produção anual (milhões de toneladas)</b>	<b>% médio de resíduo gerado</b>	<b>Resíduo anual gerado (milhões de toneladas)</b>
Cana-de-açúcar	609,28	30%	182,78
Milho	25,66	31,96%	8,2
Mandioca	18,49	20%	3,69
Arroz	11,62	22%	2,55
Banana	7,01	40%	2,80
Café	1,92	66%	1,26

O interesse em dar um destino correto e proveitoso para a biomassa residual não é algo novo. Em 1989, já se estimava que a produção anual mundial de biomassa alcançava 100 bilhões de toneladas (DEKKER, 1989).

O trabalho de Alexandrino (2007) mostra um pouco mais desse grande montante de resíduos agroindústrias, abordando a produção de laranja, a qual encontra-se entre as frutas mais produzidas no mundo, de modo que sua produção está acima de 80 milhões de toneladas por ano. A plantação de frutas cítricas está entre as atividades agrícolas que mais se desenvolve na região noroeste do Estado Paraná, produzindo cerca de 200 mil toneladas por ano. Estima-se que de 34% a 96% da produção é convertida em suco, gerando altas quantidades de resíduos, o qual equivale a 50% do peso da fruta. Porém, a polpa cítrica pode ser empregada na alimentação animal, por exemplo.

## 1.5. Aplicações enzimáticas biotecnológicas

A biotecnologia, atualmente, já expressa a sua grande importância, demonstrada por meio da obtenção de várias substâncias através da manipulação de microrganismos para a criação de novas tecnologias, as quais apresentam benefícios para a saúde humana e para a ecologia. Nesse contexto, é possível salientar que as enzimas são aplicadas nas indústrias farmacêuticas, na produção de alimentos, na manutenção do equilíbrio do ambiente, entre outras aplicações. Porém, ainda se fazem necessários estudos para melhoramento genético e novas aplicações enzimáticas (DE ABREU, 2015).

### 1.5.1. Ração animal

Nos dias de hoje, os grandes avanços tecnológicos relacionados à nutrição animal têm como base ajustes dos componentes nutricionais ou descobertas de novos componentes, com o objetivo de melhorar a eficiência da ração. Desse modo, para uma nutrição adequada, é essencial realizar a combinação de vários alimentos, com o objetivo de obter um composto balanceado e completo (MALLER, 2014).

Enzimas exógenas derivadas de microrganismos já mostram efeitos benéficos bem estabelecidos, de modo que aumentam a digestibilidade dos nutrientes para aves (SOUZA *et al.*, 2008). Aproximadamente 70% das rações para frangos de corte no Brasil são peletizadas, sendo imprescindível a avaliação de termoestabilidade enzimática (EMBRAPA, 2015), visto que as condições de processamento de peletização podem afetar os aditivos, prejudicando o efeito esperado, pois ocorre desnaturação enzimática decorrente das altas temperaturas utilizadas no processo (SOUZA *et al.*, 2008).

Os aditivos enzimáticos por si só não apresentam função nutricional direta, porém, ajudam no processo digestivo, aumentando a digestibilidade dos nutrientes, tendo como objetivo melhorar o desempenho da ração animal e, conseqüentemente, a sua rentabilidade (ANDRADE *et al.*, 2018).

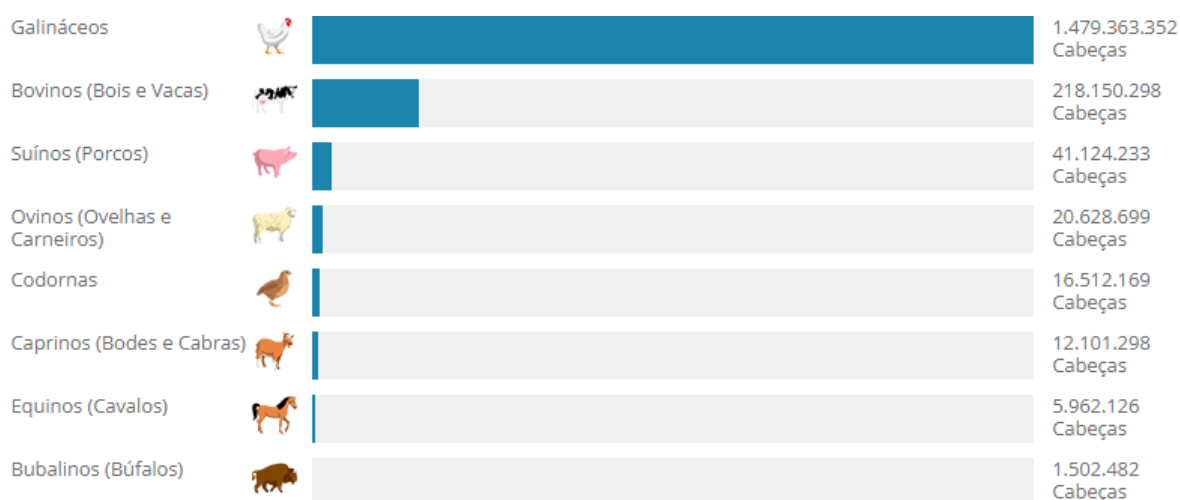
A poluição ambiental também é diminuída com a adição de enzimas, já que os resíduos poluentes das excretas dos animais diminuem (GUENTER, 2002). Além disso, torna-se possível o uso de alimentos alternativos, provavelmente mais baratos,

compostos por ingredientes com alto teor de PNA's (polissacarídeos não-amiláceos). Esses compostos são resistentes à degradação que ocorre no trato gastrointestinal dos animais não-ruminantes, assim, não são digeridos ou têm digestão incompleta, problema que pode ser resolvido com a utilização de enzimas (FERREIRA *et al.*, 2015; MACAMBIRA *et al.*, 2021). Os PNA's solúveis comprometem a digestibilidade, uma vez que têm grande capacidade de absorver água, acarretando um aumento na viscosidade do quimo, diminuindo o trânsito intestinal, levando a um aumento no volume da digesta e, conseqüentemente, comprometendo a associação de enzimas e substratos. Entre os PNA's solúveis, estão a hemicelulose (arabinoxilanos,  $\beta$ - glucanos, xiloglucanos etc.), gomas e pectinas (SILVA *et al.*, 2012). A Tabela 2 apresenta o efeito da ação enzimática em cada respectivo substrato.

**Tabela 2** Enzimas e seus respectivos substratos e efeitos (Adaptado de HENN, 2002).

<b>Enzima</b>	<b>Substrato</b>	<b>Efeitos</b>
Amilase	Amido	Suplementação das enzimas endógenas e maior degradação do amido
Celulase	Celulose	Degradação da celulose com conseqüente liberação de açúcares
Invertase	Sacarose	Degradação da sacarose com conseqüente aumento de teores de glicose e frutose
Pectinase	Pectinas	Redução da viscosidade do alimento com conseqüente aumento de absorção
Xilanase	Arabinoxilanas	Redução da viscosidade do alimento com conseqüente aumento de absorção

O Brasil apresenta-se como um grande produtor de aves, de modo que a criação está superior à dos outros animais, sendo criadas 1.479.363.352 cabeças em 2020; aqui estão inclusas todas as aves, tanto frango de corte como aves de postura (Figura 3).



**Figura 3** Ranking - Pecuária - Rebanhos (IBGE, 2020).

### 1.5.2. Etanol de segunda geração

Os biocombustíveis, como o etanol, trazem vantagens ao meio ambiente, pois substituem combustíveis de origem fóssil e geram diminuição de gases responsáveis pelo efeito estufa (MANOCHIO *et al.*, 2014), além de resolver problemas relacionados ao custo, visto que os combustíveis fósseis podem entrar em escassez, gerando alta dos preços (FATIMA *et al.*, 2018). Pode-se observar, na Tabela 3, alguns fatos não vantajosos apresentados pelos combustíveis fósseis, os quais são solucionados pelo uso de etanol.

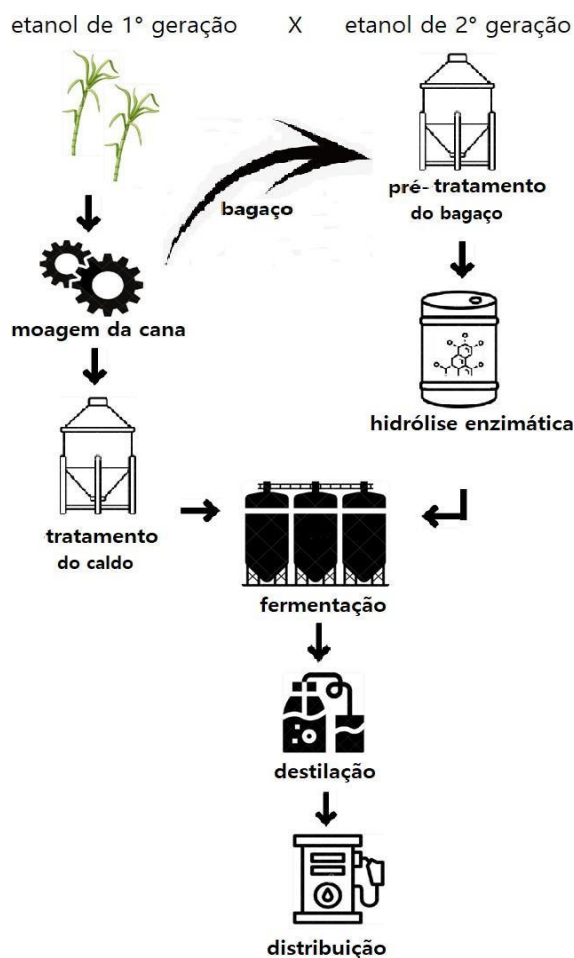
**Tabela 3** Problemas apresentados pelos combustíveis fósseis resolvidos pelo etanol.

Combustíveis fósseis	Etanol
Fonte esgotável	Renovável
Alto custo	Custo inferior
Poluente	Sustentável

Além de todos esses benefícios, pode-se citar a viabilidade econômica, gerando certa independência do mercado mundial de petróleo (PINTO, 2010).

Desse modo, com o objetivo de evitar a expansão desenfreada das áreas de cultivo, técnicas biotecnológicas vêm sendo empregadas para prevenir o desperdício, empregando o aproveitamento da biomassa residual de alguns produtos advindos da terra, como cana-de-açúcar e milho para a fabricação de etanol de segunda geração.

No entanto, o etanol de segunda geração possui um substrato mais complexo, o que dificulta fermentação microbiana, sendo necessária a inclusão de duas etapas extras ao processo habitual de fabricação de etanol, que são: pré-tratamento e hidrólise enzimática (Figura 4). Tais etapas tornam-se essenciais, pois, diferentemente das matérias-primas do etanol de primeira geração, a biomassa lignocelulósica não possui dois açúcares livres em sua estrutura para que os microrganismos possam realizar a fermentação. Desse modo, a hidrólise tem como função realizar a quebra da hemicelulose e da celulose, produzindo açúcares livres (monômeros de glicose e frutose), os quais serão fermentados pelos microrganismos (MORAIS, 2017). Ou seja, o pré-tratamento se faz necessário para realizar o rompimento da lignina e do complexo celulose-hemicelulose, de modo que venha a expor a superfície da celulose para a ação enzimática, e de modo que a celulase transforme o polissacarídeo em açúcares fermentáveis (FATIMA *et al.*, 2018).



**Figura 4** Comparação das etapas de produção de etanol de 1ª geração e etanol de 2ª geração (Figura elaborada pelo autor).

No Brasil, existe a possibilidade de produção desse biocombustível sem realizar a ampliação da área desmatada e sem reduzir a área que se destina à produção de alimentos. Estima-se que, empregando o bagaço e outras partes da cana-de-açúcar que seriam resíduos agroindustriais, como as palhas e pontas, aumenta-se a produção de etanol cerca de 30 a 40% (EMBRAPA, 2011).

### 1.5.3. Aplicação enzimática no tecido denim

Atualmente, o jeans está fortemente inserido no cotidiano das pessoas de várias faixas etárias, culturas, gêneros, e não só no Brasil, mas no mundo todo, sendo uma peça antiga que, ao longo do tempo, sofreu diversas mudanças (MÜNCHEN, 2015).

A história do jeans começou em 1792; nessa época, apresentava-se como um tecido robusto e durável, sendo uma combinação de seda e lã, criado na França, que começou a se expandir pelo mundo e passar por várias mudanças (ALEXANDRE, 2018). Em 1967, com o propósito de aumentar o conforto e o desbotamento das roupas, o casal de estilistas Marithé Bachelard e François Girbaud criaram a metodologia "stone wash", traduzindo esse termo quer dizer "lavagem com pedra"; esse método consistia na utilização da pedra pomes, uma rocha que gerava o aspecto desejado (CAMPOS, 2019). Porém, pelo fato de não haver vulcões em atividade no Brasil, essa rocha vulcânica precisou sofrer substituição por outros agentes abrasivos (CAMPOS, 2019).

Há atual necessidade de moda sustentável, visto que, para se chegar ao aspecto desgastado desejado do jeans, por exemplo, são utilizadas substâncias químicas poluentes e prejudiciais à saúde, como amônia e soda cáustica (EID *et al.*, 2021). Portanto, o uso de enzimas para o tratamento de tecido denim consiste em uma alternativa para substituir metodologias poluidoras ultrapassadas (FERREIRA *et al.*, 2019).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Realizar a caracterização bioquímica da poligalacturonase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* – Cepa PI3S3 e verificar suas aplicações biotecnológicas, investigando a atuação do extrato bruto enzimático de *T. aurantiacus* PI3S3 sobre resíduos agrícolas e ração de frangos, bem como purificar e caracterizar a poligalacturonase e verificar seu efeito no biopolimento do tecido Denim.

### **2.2. Específicos**

- 2.2.1.** Realizar aplicação do extrato bruto enzimático de *T. aurantiacus* PI3S3 em resíduos agroindustriais, como bagaço de cana e resíduo de milho, para verificar a hidrólise e potencial produção de etanol de segunda geração;
- 2.2.2.** Realizar aplicação do extrato bruto na ração de frangos de corte, verificando seu efeito *in vitro* e *in vivo*;



**2.2.3.** Realizar a purificação da poligalacturonase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* através de colunas cromatográficas;

**2.2.4.** Realizar aplicações da Enzima poligalacturonase no tecido Jeans, para investigar o potencial biopolimento.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Microrganismo utilizado**

O fungo filamentoso *T. aurantiacus* – PI3S3 encontra-se disponível na Coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Unioeste. A manutenção da linhagem foi realizada em placas de Petri estéreis, contendo de 15 a 20 mL de meio BDA. Foram realizados repiques periódicos, mantendo-se as cepas em estufa a 40 - 45°C, por aproximadamente 10 dias. Posteriormente, as cepas foram conservadas em geladeira por até 30 dias.

#### **3.2. Produção enzimática**

Uma suspensão dos esporos foi obtida em uma solução de NaCl 0,8% e Tween 0,05% a partir dos cultivos de *T. aurantiacus* PI3S3 em meio BDA e 1 mL dessa solução foi inoculado em frascos Erlenmeyer (125 mL) com 25 mL do meio Vogel suplementado com casca de maracujá a 2%. A incubação dos cultivos foi conduzida em estufa a 46°C, por 96 horas e sob agitação orbital de 120 rpm. O extrato enzimático bruto foi obtido por meio de filtração dos cultivos a vácuo em funil de Büchner e papel filtro Whatman n.º 1.

#### **3.3. Determinação da atividade enzimática e conteúdo proteico**

A fim de verificar as enzimas presentes no extrato bruto, foi realizada a dosagem dos açúcares redutores por meio do método Miller (1959) com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) com diferentes substratos, sendo eles: amido, carboximetilcelulose, pectina, sacarose e xilano. Foi realizada padronização por meio de curvas de concentração de glicose, ácido galacturônico e xilose, nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg/mL, e uma unidade enzimática foi definida como a quantidade necessária de enzima para liberar 1  $\mu$ mol de produto por minuto nas condições do ensaio.

A atividade da enzima foi determinada por meio de uma mistura de 50 µl do respectivo substrato diluído em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 incubado com o extrato enzimático bruto a 70°C por 5 minutos, a reação foi interrompida com 100 µl de DNS diluída em 1 mL de água deionizada e a leitura de absorvância realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

A quantificação de proteínas foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se como padrão albumina de soro bovino (BSA).

### **3.4. Sacarificação do bagaço de cana e resíduo de milho pelo extrato bruto de *T. aurantiacus***

Para verificar a eficiência na hidrólise da biomassa pelo extrato enzimático de *T. aurantiacus*, utilizou-se a metodologia adaptada de Dudek *et al.* (2020), realizou-se a incubação de 20 mg de bagaço de cana moída seca ou resíduo de milho, 0,2 mg de proteína do extrato e quantidade suficiente de tampão citrato 100 mM pH 5,0 para uma reação final de 1,5 mL a 50°C. Foram retiradas alíquotas com 24 e 72 h, as quais passaram por fervura por 10 min e centrifugação por 10 minutos a 10.000 xg. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de açúcar redutor, segundo Miller (1959) com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O tratamento controle foi realizado utilizando as mesmas condições, porém, sem adição da enzima.

### **3.5. Tratamento da ração de frangos com extrato enzimático bruto de *T. aurantiacus* PI3S3**

#### **3.5.1. Testes *in vitro***

O protocolo de aplicação na ração animal consistiu na adaptação da metodologia descrita por Dudek *et al.* (2020), de modo que se realizou a incubação a 70°C das amostras, acondicionadas em microtubos de 1,5 mL, contendo 20 mg de ração animal, 0,2 mg de proteína do extrato e quantidade suficiente de tampão citrato 100 mM pH5,0 para uma reação final de 1,5 mL. Foram retiradas alíquotas de 100 µl nos tempos 0, 1, 3, 6 e 12 horas, e fervidas por 10 minutos; após essa fase, centrifugadas por 10 minutos a 10.000 xg. Utilizou-se o sobrenadante para dosagem de açúcares redutores, segundo Miller (1959), com o reagente ácido 3,5-

dinitrosalicílico (DNS). Foi realizado teste controle, o qual consistiu na utilização de tampão no lugar da enzima.

### **3.5.2. Teste de digestibilidade *in vitro***

Foi realizada a simulação de digestibilidade no papo e no estômago, para isso, foi adaptada a metodologia de Zyra (1999), conforme descrito a seguir.

#### **3.5.2.1. Simulação da digestão da ração no Papo**

Em microtubo de 1,5 mL, foi adicionado 0,25 grama de ração e 0,5 mL de água destilada (controle) ou extrato enzimático (amostra teste) em diferentes concentrações, e o pH foi corrigido inicialmente com a adição de tampão citrato de sódio 20 mM para 5,9. A mistura foi agitada e incubada a 40°C por 30 minutos sob rotação a 200 rpm.

#### **3.5.2.2. Simulação de digestão da ração na Moela/Estômago**

Posteriormente, o pH foi ajustado para 2,9 com tampão fosfato 50mM; adicionou-se 0,25 mL de pepsina 6000 U/mL e a reação foi novamente incubada a 40°C sob rotação de 200 rpm, por 45 minutos. Após esse período, adicionou-se 0,25 mL de pancreatina 3,7 mg/mL diluída em NaHCO<sub>3</sub> 1 M, acertou-se o pH para 6,1 com tampão citrato de sódio a 100 mM e novamente a amostra foi incubada a 40°C sob agitação de 200 rpm por 2 horas. Finalmente, foi realizada centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm e dosagem açúcar redutor (MILLER, 1959).

### **3.6. Análise de citotoxicidade**

Para verificar se o extrato bruto de *T. aurantiacus* era tóxico, foi realizado ensaio para acompanhamento de atividade do metabolismo mitocondrial. Em uma placa de 96 poços, 2x10<sup>5</sup> células foram distribuídas em cada poço em meio DMEM (Dulbelcco's Modified Eagle Medium) com 10% de SFB (soro fetal bovino), e foram incubadas em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 12 horas. As células fagocíticas (macrófagos) foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) morno e tratadas com as diferentes

concentrações dos extratos, ou meio de cultura (controle) ou controle do diluente por 24 horas.

Após o período de incubação celular com os tratamentos, foi adicionado 100 µl da solução de 3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (0,5 mg/mL) em cada poço e a incubação foi realizada por mais 4 h. O sobrenadante foi retirado e os cristais foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) e a leitura foi realizada em leitor de placas a 540 nm.

### **3.7. Aplicação na ração animal *in vivo***

#### **3.7.1. Instalações animais**

O manejo com as aves foi realizado no Centro de Pesquisa em Avicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, *campus* de Marechal Cândido Rondon-PR.

#### **3.7.2. Tratamentos realizados**

Foram utilizados 96 pintos de corte, machos, com 14 dias de idade, que foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, o qual foi composto por 4 tratamentos e 6 repetições com 4 aves cada, totalizando 96 frangos de corte. Os tratamentos foram: T1 – Ração controle (RC), seguindo recomendações da linhagem Coob; T2 - Ração controle negativo valorizada em 100 kcal kg<sup>-1</sup> (RCN), totalizando 3000 kcal kg<sup>-1</sup>; T3 – RCN + E/2 com inclusão de metade da atividade enzimática do extrato bruto (384 U kg<sup>-1</sup> de Amilase, 94 U kg<sup>-1</sup> de CMCCase, 372,5 U kg<sup>-1</sup> de Pectinase, 50 U kg<sup>-1</sup> de Invertase e 891,5 U kg<sup>-1</sup> de Xilanase); e T4 - RCN + E com inclusão do total de atividade enzimática do extrato bruto (768 U kg<sup>-1</sup> de Amilase, 188 U kg<sup>-1</sup> de CMCCase, 745 U kg<sup>-1</sup> de Pectinase, 100 U kg<sup>-1</sup> de Invertase e 1783 U kg<sup>-1</sup> de Xilanase). As aves receberam uma ração inicial à base de milho e farelo de soja, até os 14 dias de idade. A partir dos 15 dias de idade, iniciou-se o fornecimento da dieta experimental, contendo o extrato enzimático de *T. aurantiacus*.

Como procedimento estatístico, foi realizada análise de normalidade e homogeneidade, as médias foram submetidas à ANOVA e, quando houve diferença estatística (P<0,05), foram submetidas ao teste de média Student Newman Keuls.

**Tabela 4** Conteúdo de ingredientes e nutrientes presente na ração em cada tratamento.

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>Tratamento 1 (T1) – RC</b>	<b>Tratamento 2 (T2) - RCN</b>	<b>Tratamento 3 (T3) – RCN + E/2</b>	<b>Tratamento 4 (T4) - RCN + E</b>
Milho Grão (7,88% PB)	606,67	629,61	629,61	629,61
Farelo de soja (46% PB)	331,10	327,05	327,05	327,05
Óleo de soja degomado g kg <sup>-1</sup>	27,26	8,17	8,17	8,17
Calcário calcítico (36%)	7,30	7,35	7,35	7,35
Fosfato bicálcico (18%)	14,47	14,44	14,44	14,44
Sal refinado	4,92	4,92	4,92	4,92
Lisina sulfato (60%)	2,46	2,57	2,57	2,57
DL-Metionina (99%)	2,75	2,73	2,73	2,73
L-Treonina (99%)	0,47	0,47	0,47	0,47
L-Valina (99%)	0,19	0,20	0,20	0,20
Vitamina <sup>1</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Mineral <sup>2</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
Cloreto de colina (60%)	0,40	0,40	0,40	0,40
Anticoccidiano <sup>3</sup>	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Energia metabolizável (kcal kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>3.100</b>	<b>3.000</b>	<b>3.000</b>	<b>3.000</b>
<b>Composição Calculada</b>				
Proteína bruta (g kg <sup>-1</sup> )	205,80	205,80	205,80	205,80
Cálcio (g kg <sup>-1</sup> )	7,58	7,58	7,58	7,58
Fósforo disponível (g kg <sup>-1</sup> )	3,74	3,74	3,74	3,74
Lisina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	11,24	11,24	11,24	11,24
<i>Met+Cis digest. (g kg<sup>-1</sup>)</i>	8,32	8,32	8,32	8,32
Treonina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	7,42	7,42	7,42	7,42
Triptofano digestível (g kg <sup>-1</sup> )	2,32	2,31	2,31	2,31
Valina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	8,65	8,65	8,65	8,65
Isoleucina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	7,85	7,82	7,82	7,82
Arginina digestível (g kg <sup>-1</sup> )	12,59	12,54	12,54	12,54
Sódio (g kg <sup>-1</sup> )	2,08	2,08	2,08	2,08
Potássio (g kg <sup>-1</sup> )	8,00	7,99	7,99	7,99
<b>Enzimas de <i>T. aurantiacus</i> PI3S3</b>				

Amilase	0	0	384 U/Kg	768 U/Kg
CMCase	0	0	94 U/Kg	188 U/Kg
Pectinase	0	0	372,5 U/Kg	745 U/Kg
Invertase	0	0	50 U/Kg	100 U/Kg
Xilanase	0	0	891,5 U/Kg	1783 U/Kg

<sup>1</sup> Suplemento Vitamínico para aves, Níveis de Garantia por Quilograma de ração: Vit. A (min) 110.000UI, Vit. D<sub>3</sub> (min) 4.000UI, Vit. E (min) 55UI, Vit. K<sub>3</sub> (min) 3,00mg, Vit. B<sub>1</sub> (min) 2,30mg, Vit. B<sub>2</sub> (min) 7,00mg, Vit. B<sub>6</sub> (min) 4,00mg, Vit. B<sub>12</sub> (min) 25,00mg, Ácido Pantotênico (min) 12,00mg, Niacina (min) 60,00mg, Ácido Fólico (min) 2,00mg, Biotina (min) 0,25mg, Se (min) 0,30mg; <sup>2</sup> Suplemento Mineral para aves, Níveis de Garantia por Quilograma de Ração: Cobre (min) 10mg, Ferro (min) 50mg, Manganês (min) 65mg, Zinco (min) 65mg, Iodo (min) 1mg; <sup>3</sup> Salinomicina 12%.

### 3.7.3. Desempenho

O peso das aves e o consumo de ração foram registrados aos 14 e 26 dias de idade para determinação do ganho de peso médio (GPM), consumo médio de ração (CMR) e conversão alimentar (CA). A correção da mortalidade das aves foi realizada com correção no consumo de ração e conversão alimentar, seguindo a metodologia de Sakomura e Rostagno (2016).

### 3.7.4. Morfometria intestinal

A morfometria intestinal (altura de vilos, profundidade de cripta, relação vilos:cripta e área de absorção) foi avaliada aos 26 dias de idade do duodeno e do jejuno. Para amostragem, considerou-se o duodeno a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal e jejuno, desde a porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel. Fragmentos de dois cm do segmento foram abertos longitudinalmente, lavados com solução salina, fixados em solução de formalina tamponada (10%) e em seguida desidratados em uma série de concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (LUNA, 1968). Após a microtomia semisseriada (cortes de sete  $\mu$ m), os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Então, as amostras foram avaliadas através de microscopia óptica em aumento de 10 x.

As análises morfométricas foram realizadas utilizando o sistema de imagens PROPLUS IMAGE 4.1. Para cada lâmina, foram mensurados o comprimento e a largura de 30 vilos e profundidade e largura de 30 criptas. Essas medidas morfométricas foram utilizadas para o cálculo da área da superfície de absorção da mucosa intestinal, por meio da fórmula proposta por Kisielinski *et al.* (2002). Em

adição, foi calculada a relação altura de vilo:profundidade de cripta, dividindo-se o valor da altura do vilo pelo valor de profundidade de cripta.

### **3.7.5. Determinação dos valores de energia metabolizável**

Para titulação de proteína bruta, foi realizada coleta de excretas ao 24º, 25º e 26º dia; as amostras foram homogeneizadas e secas em estufa a 55°C por 72 h; após o resfriamento das amostras, elas foram moídas, então se realizou a pesagem de 200 mg da amostra em balança analítica, a qual foi acondicionada em tubo digestor. Posteriormente, adicionaram-se 2 g de mistura digestora (mistura de sulfato de sódio e sulfato de cobre na proporção 10:1) e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. concentrado, os tubos foram colocados no bloco digestor, em capela com o exaustor, e aquecidos lentamente até atingirem 400°C. Tal temperatura foi mantida até a solução ficar translúcida (coloração pode variar de verde a azul). Após esse processo, esperou-se o resfriamento dos tubos e, em seguida, foram adicionados 10 mL de água destilada, com o objetivo de evitar ou minimizar a cristalização da solução. Adicionaram-se, em erlenmeyer, 10 mL de solução de ácido bórico 2% (solução indicadora contendo 1 L de água destilada, 20 g de ácido bórico P.A., 12,5 mL da solução alcoólica de vermelho de metila e 6 mL da solução alcoólica de verde de bromocresol), então o erlenmeyer foi acoplado ao destilador, juntamente com o tubo digestor, e adicionaram-se 25 mL de solução de hidróxido de sódio (soda 25%, contendo 250 g de hidróxido de sódio para 1 L de água destilada). Foi realizada destilação até obter o volume de 50 mL no erlenmeyer. Então, realizou-se a titulação com a solução de ácido clorídrico (2 mL para 1 L de água destilada) até a mudança de cor do indicador (de verde para rosa claro). O branco consistiu em tubos digestores sem amostra, apenas com misturadigestora e ácido sulfúrico.

### **3.8. Purificação da Poligalacturonase**

A purificação parcial da Poligalacturonase foi conduzida em cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephadex, previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,2. O fluxo foi estabelecido de 2,0 mL por minuto. Foram coletadas frações de 5 mL por tubo a 4°C, realizando dosagens a 280 e 540 nm, as frações que demonstraram possuir atividade pectinolítica foram reunidas, resultando em 35 mL.

Posteriormente, realizou-se diálise contra água deionizada com constantes trocas por 12 horas para retirada de sais, então a amostra foi liofilizada, concentrada e ressuspendida em 1,5 mL de tampão acetato de sódio.

### **3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) da enzima poligalacturonase**

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes, conforme descrito por Laemmli (1970), com o objetivo de avaliar o grau de pureza da amostra, bem como estimar a massa molecular da proteína purificada. O gel foi corado, utilizando *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,5% (p/v) por 16 horas (overnight), depois, procedeu-se à descoloração com uma solução composta por metanol (40%) e ácido acético (7%). Os marcadores de massa molecular usados foram de 14,4 a 97 kDa LMW-SDS Marker Kit da GE Healthcare®.

### **3.10. Energia de ativação**

A energia de ativação ( $E_a$ ) da enzima foi calculada de acordo com a equação de Arrhenius (BERGAMASCO *et al.*, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020), a partir da inclinação da reta do gráfico semi-log de  $\ln k$  versus  $1/T$ :

$$\ln k = - E_a/RT + \ln A.$$

### **3.11. Biopolimento do tecido denim (jeans)**

Os ensaios de biopolimento de tecido Denim seguiram a metodologia adaptada de Bussler *et al.* (2019), em que foram utilizados tecidos denim (especificação do fabricante: 98% de algodão e 2% de elastano) com dimensões de 1 x 1 cm. Os tecidos foram incubados com a enzima poligalacturonase em diferentes concentrações (1 U mL<sup>-1</sup>; 3 U mL<sup>-1</sup> e 5 U mL<sup>-1</sup>), em tampão citrato de sódio pH 5 a 70°C por 12 h, sem agitação. Em seguida, realizou-se a inativação enzimática por meio de fervura por 5 minutos; posteriormente, os tecidos foram lavados com água fria e secos à temperatura ambiente durante 48 horas. O controle teve as mesmas condições, porém, sem adição da enzima.



O sobrenadante resultante da imersão do tecido foi analisado quantitativamente, sendo realizada a dosagem dos açúcares redutores por meio do método Miller (1959) com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em equipamento da marca TESCAN®, modelo VEGA3. Tal análise foi efetuada com o objetivo de avaliar a estrutura morfológica do tecido denim tratado em diferentes concentrações e não tratado. As micrografias foram realizadas com aumento de 5x em módulo SE, com detector de elétrons secundários.

Também foi verificada a perda de peso das amostras, a seguinte equação foi usada para calcular a perda de peso percentual:

$$\text{Perda de peso \%} = \frac{P1-P2}{P1} \times 100$$

Sendo P1 o peso do tecido antes do tratamento e P2 o peso do tecido depois do tratamento.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Composição do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto do fungo *T. aurantiacus* PI3S3 cultivado em meio Vogel, suplementado com casca de maracujá 2%, apresentou atividade de diferentes glicosil hidrolases, como xilanase (41,84 U mL<sup>-1</sup>), pectinase (29,14 U mL<sup>-1</sup>), amilase (20,86 U mL<sup>-1</sup>), celulase (10,46 U mL<sup>-1</sup>) e invertase (1,65 U mL<sup>-1</sup>), como se pode observar na Tabela 5.

**Tabela 5** Perfil enzimático do extrato bruto de *Thermoascus aurantiacus* PI3S3.

Enzima	Atividade enzimática (U mL <sup>-1</sup> )
Xilanase	41,84 ± 0,56
Pectinase	29,14 ± 1,60
Amilase	20,86 ± 1,05
Celulase	10,46 ± 0,12

Invertase	1,65 ± 0,93
-----------	-------------

Notou-se que o extrato bruto do fungo *T. aurantiacus* PI3S3 suplementado com casca de maracujá possui um gama de enzimas com alta atividade, sendo elas amilase, celulase, invertase, pectinase e xilanase. Tal resultado já foi confirmado há bastante tempo por outros estudos com diferentes linhagens do mesmo microrganismo.

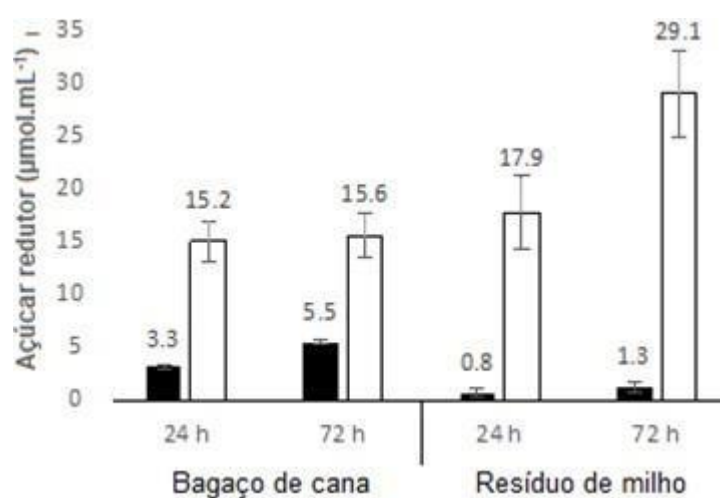
Herrera (1991) realizou o cultivo de *T. aurantiacus* e obteve diferentes enzimas, variando conforme o suplemento e a forma de cultivo. O autor utilizou materiais lignocelulósicos, como bagaço de cana, casca de arroz e serragem de *Eucaliptus grandis*, e observou que os crescimentos nesses substratos foram melhores do que em substratos celulósicos, denotando que o fungo produziu enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e lignocelulolíticas em diferentes quantidades. *T. aurantiacus* exibe atividade comparável a *T reesei*.

Pinto (2010) também destaca atividades de cada enzima de *T. aurantiacus* CBMAI 756, segundo diferentes tempos de cultivo. O autor constatou que o fungo *T. aurantiacus* CBMAI 756 apresentou atividade de CMCase muito superior aos demais fungos testados, apresentando uma atividade cerca de 10 vezes maior em relação ao *Trichoderma reesei* QM9414. Ainda segundo o autor, o *T. aurantiacus* CBMAI 756 também foi o melhor produtor dentre os quatro analisados (*Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3) em relação à enzima xilanase sendo quatro vezes superior em comparação fungo que ficou em segundo lugar o fungo *T. lanuginosus*. O microrganismo ainda apresentou a maior produção de poligalacturonase e  $\beta$ -xilosidase.

Tari *et al.* (2008) evidenciaram que enzimas pectinolíticas no extrato bruto possuem maior estabilidade que as enzimas parcialmente purificadas e destacamação colaborativa de diferentes enzimas pectinolíticas no extrato bruto. Estudos anteriores que corroboram com este estudo descrevem cepas de *T. aurantiacus* comoprodutoras de xilanases e celulases, principalmente quando cultivadas em meios suplementados com resíduos agroindustriais (COSTA *et al.*, 2016).

#### 4.2. Influência do extrato de *T. aurantiacus* na sacarificação do bagaço de cana e resíduo de milho

A aplicação do extrato para verificar a hidrólise da biomassa mostrou que o complexo enzimático apresentou ação sobre os substratos testados, bagaço de cana e resíduo de milho (Figura 5). A maior liberação de açúcar redutor foi observada no resíduo de milho ( $29,14 \text{ mg.g}^{-1}$ ) com 72 horas de tratamento, contra  $15,62 \text{ mg.g}^{-1}$  do bagaço de cana. A comparação entre os períodos de 24 e 72 horas de incubação de cada resíduo não mostra grande diferença na degradação do substrato e consequente liberação de açúcares, apresentando um pequeno aumento.



**Figura 5** Efeito do extrato bruto de *T. aurantiacus* na liberação de açúcares redutores na sacarificação do bagaço de cana e resíduo de milho. Símbolos: (■) Controle; (□) Tratamento.

Os resultados mostram que a hidrólise do resíduo de milho liberou 40% mais açúcar redutor quando comparado à degradação do bagaço de cana. Quando comparado com o ensaio controle, a hidrólise do resíduo de milho também foi superior à do bagaço de cana.

Em 24 horas, o resíduo de milho tratado com o extrato enzimático bruto aumentou a liberação de açúcar redutor em 22,3 vezes em relação ao tratamento controle e o bagaço de cana liberou apenas 4,6 vezes. Essa diferença foi mais evidente às 72 horas de tratamento, quando o resíduo de milho aumentou em 22,4 vezes a liberação de açúcar redutor e o bagaço de cana aumentou apenas 2,8 vezes.

Nunes *et al.* (2014) também apresenta resultados promissores em relação à sacarificação de resíduos agroindustriais e destaca o potencial para produção de etanol de segunda geração no Brasil. Nesse sentido, a técnica de hidrólise mais utilizada e desenvolvida na produção de etanol é com o uso de enzimas. No entanto, produzir essas enzimas a baixo custo ainda é um dos principais desafios (LORENZI; ANDRADE, 2019).

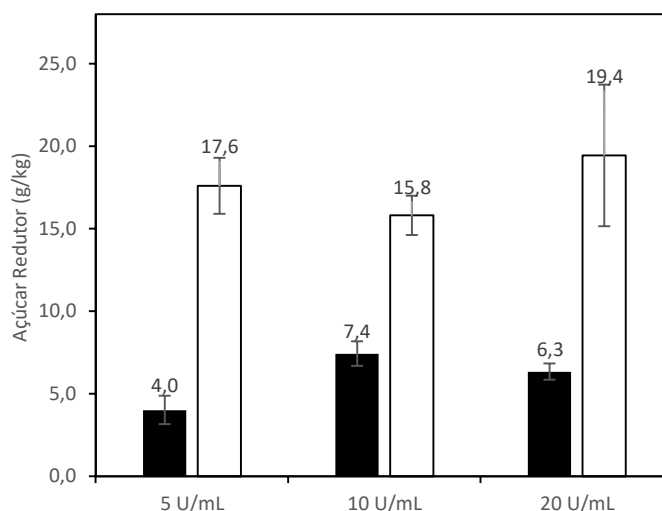
#### 4.3. Ração animal tratada com extrato enzimático bruto de *T. aurantiacus*

Os ensaios de aplicação da enzima em ração animal estão descritos na Tabela 6. Os resultados mostram que a ração tratada com extrato enzimático bruto de *T. aurantiacus* PI3S3 foi hidrolisada, liberando 158 g de açúcar redutor por kg de ração com 12 h de tratamento. Ressalta-se que os tratamentos com 1, 3 e 6 h aumentaram a liberação de açúcar redutor em 1,8; 3,0 e 4,9 vezes, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle.

**Tabela 6** Efeito do tempo de tratamento da ração com extrato enzimático de *T. aurantiacus* na liberação de açúcares redutores por Kg de ração.

Tratamento	Açúcar (g/kg ração)	
Controle	19	±1
Com enzima por 1h	54	±3
Com enzima por 3h	76	±5
Com enzima por 6h	112	±18
Com enzima por 12h	158	±22

A liberação de açúcar redutor foi utilizada para verificar o efeito do tratamento da ração com o extrato enzimático bruto nos ensaios de simulação de digestibilidade *in vitro*. A Figura 6 mostra que houve aumento na liberação de açúcar nas dietas em todas as concentrações de enzimas testadas, quando comparadas aos controles. Os resultados mostram um aumento de 340,0%, 113,5% e 207,9% na presença de açúcar redutor nas dietas tratadas com 5, 10 e 20 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Ressalta-se que o maior resultado foi observado na presença de 20 U mL<sup>-1</sup>, com 19,4 g de açúcar redutor por kg de ração animal.

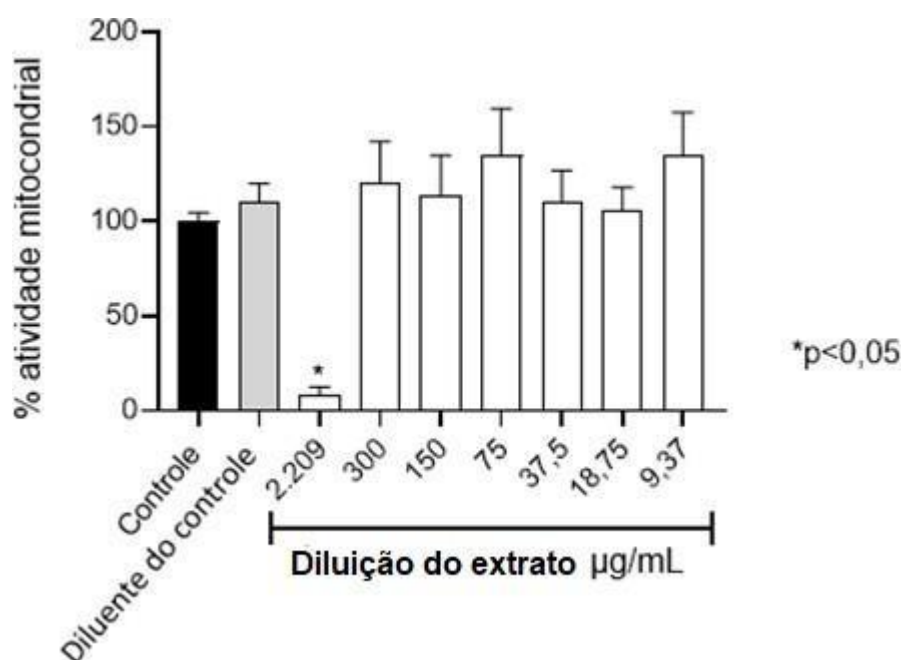


**Figura 6** Efeito do extrato bruto de *T. aurantiacus* PI3S3 na liberação de açúcar redutor na simulação de digestibilidade. Símbolos: (■) Controle; (□) Tratamento.

Dessa forma, observou-se que o extrato enzimático bruto de *T. aurantiacus* PI3S3 foi eficiente na liberação de açúcar redutor em rações comerciais de frangos de corte suplementada em diferentes tempos e concentrações de enzimas, tanto no tratamento direto quanto nos ensaios de simulação de digestibilidade *in vitro*. Esses resultados corroboram a literatura, em que Maller *et al.* (2014) descrevem a liberação de elevadas concentrações de fosfato e açúcar redutor *in vitro* em rações tratadas com o extrato enzimático de *Aspergillus japonicus* contendo fitase, xilanase, celulase e amilase. Outras enzimas são relatadas como tendo um possível efeito benéfico na alimentação animal. Neto *et al.* (2020) estudaram o uso da tanase de *A. niger* URM 7131 para simular a digestão da ração *in vitro* em animais monogástricos e descrevem que a enzima contribuiu para remover os efeitos indesejáveis dos taninos. Esses compostos formam complexos com proteínas, gerando inibição de enzimas digestivas e consequentemente reduzindo o valor nutricional da dieta, pois interferem na digestibilidade proteica.

#### 4.4. Análise de citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT, com o extrato bruto puro de *T. aurantiacus* em uma concentração de 2.209  $\mu\text{g/mL}$  e com diluições variando a partir de 300  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato enzimático bruto diluído demonstrou não ser tóxico para as células RAW 264,7 após 24 horas de incubação, como se pode observar na Figura 7.



**Figura 7** Análise de citotoxicidade do extrato bruto de *T. aurantiacus* através da viabilidade celular de macrófagos de acordo com atividade mitocondrial. Controle – meio de cultura; controle do diluente – maior quantidade de diluente utilizado.

As diferentes concentrações de extrato enzimático utilizadas *in vitro* não alteraram a viabilidade celular dos macrófagos, demonstrando não haver citotoxicidade no extrato enzimático diluído. Outros autores também verificaram se o extrato enzimático apresentaria micotoxinas ou algum efeito citotóxico para posterior aplicação em ração. Nesse sentido, Maller *et al.* (2012) testaram o extrato enzimático bruto de *Aspergillus japonicus*, observando que a viabilidade celular não foi significativamente prejudicada em todos os tratamentos.

Aureli *et al.* (2018) verificaram, por meio de diferentes testes, a inexistência de alterações significativas devido à administração dietética de uma nova glucuronoxilano hidrolase de *Bacillus subtilis* produzida por fermentação em *Bacillus licheniformis*, demonstrando a segurança da glucuronoxilano hidrolase como aditivo alimentar, em frangos de corte. Em tal estudo, o crescimento de células tratadas com diferentes concentrações enzimáticas foi comparado com culturas de controle após 48 h de exposição, de modo que a glucuronoxilano hidrolase demonstrou citotoxicidade em comparação com o controle do veículo na concentração mais

elevada de 30 mg/mL, leve citotoxicidade em concentrações de 10–3 mg/mL e nenhuma citotoxicidade observada nas concentrações mais baixas de 1–0,01 mg/mL.

O estudo de tolerância de 6 semanas confirmou que a glucuronoxilano hidrolase é segura para frangos de corte, quando alimentados na dose máxima recomendada, bem como na dose 10 vezes maior. Corroborando com o presente estudo, em que o extrato enzimático diluído não apresenta citotoxicidade (Figura 7).

#### 4.5. Efeito da aplicação do extrato bruto de *T. aurantiacus* na ração de aves *in vivo*

##### 4.5.1. Desempenho

A inclusão dietética de enzimas na ração não interferiu no consumo médio de ração (CMR), ganho de peso médio (GPM) e conversão alimentar (CA), como se pode observar na Tabela 7.

**Tabela 7** Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo o extrato enzimático de *T. aurantiacus*.

Tratamentos	CRM Final	PM Final	GP final	CA Final
1	1547	1602	1126a	1,375b
2	1504	1550	1044b	1,444a
3	1575	1522	1045b	1,509a
4	1595	1573	1099b	1,451a
EPM	70,27	47,44	54,7	0,05
CV%	4,52	3,04	5,08	3,44
P	0,1683	0,0701	0,0531	0,0029

CMR- consumo médio de ração; PM- Peso médio; GPM- ganho de peso médio; CA- conversão alimentar; EPM- erro padrão da média; CV- coeficiente de variação.

O resultado de tratamentos 1 (ração controle), 2 (ração controle negativo), 3 (RCN com inclusão de metade da atividade enzimática do extrato bruto) e 4 (RCN com inclusão do total de atividade enzimática do extrato bruto) mostraram resultados muito similares sem diferença estatística entre os tratamentos. Maller *et al.* (2014) mostraram em seu estudo que também não houve diferenças estatisticamente

significativas entre o experimento controle e os tratamentos, em relação ao ganho de peso, conversão alimentar e consumo médio de ração.

Outros trabalhos apresentam efeitos benéficos *in vivo* do uso de enzimas na alimentação de frangos. Nesse sentido, Andrade *et al.* (2018) avaliaram o uso de complexos enzimáticos contendo xilanase e amilase em uma dieta à base de milho e soja e verificaram a melhora na digestibilidade dos nutrientes e no desempenho de frangos de corte. Além disso, Osman *et al.* (2018) descrevem o uso de xilanase,  $\beta$ -glucanase, celulase e  $\alpha$ -amilase e afirmam que os efeitos negativos do trigo na mineralização óssea podem ser prevenidos pela suplementação enzimática nas dietas de galinhas poedeiras.

#### 4.5.2. Morfometria intestinal

A morfometria intestinal apresentou pequena mudança nos frangos que foram alimentados com ração contendo o extrato enzimático de *T. aurantiacus*. Como se pode observar nas Tabelas 8 e 9, bem como, nas Figuras 8 e 9, a altura do vilo, a relação Vilo:Cripta e a área de absorção foram ligeiramente maiores em relação aos tratamentos controles (1 e 2) e ao tratamento com metade da dose de extrato enzimático (tratamento 3). Desse modo, o tratamento 4 (RCN valorizada em 100 kcal/kg com inclusão do total de atividade enzimática do extrato bruto) apresentou uma área de absorção maior que os outros tratamentos, sendo 15,5% superior no duodeno e 34,2% superior no jejuno, quando comparado ao tratamento 2 (RCN).

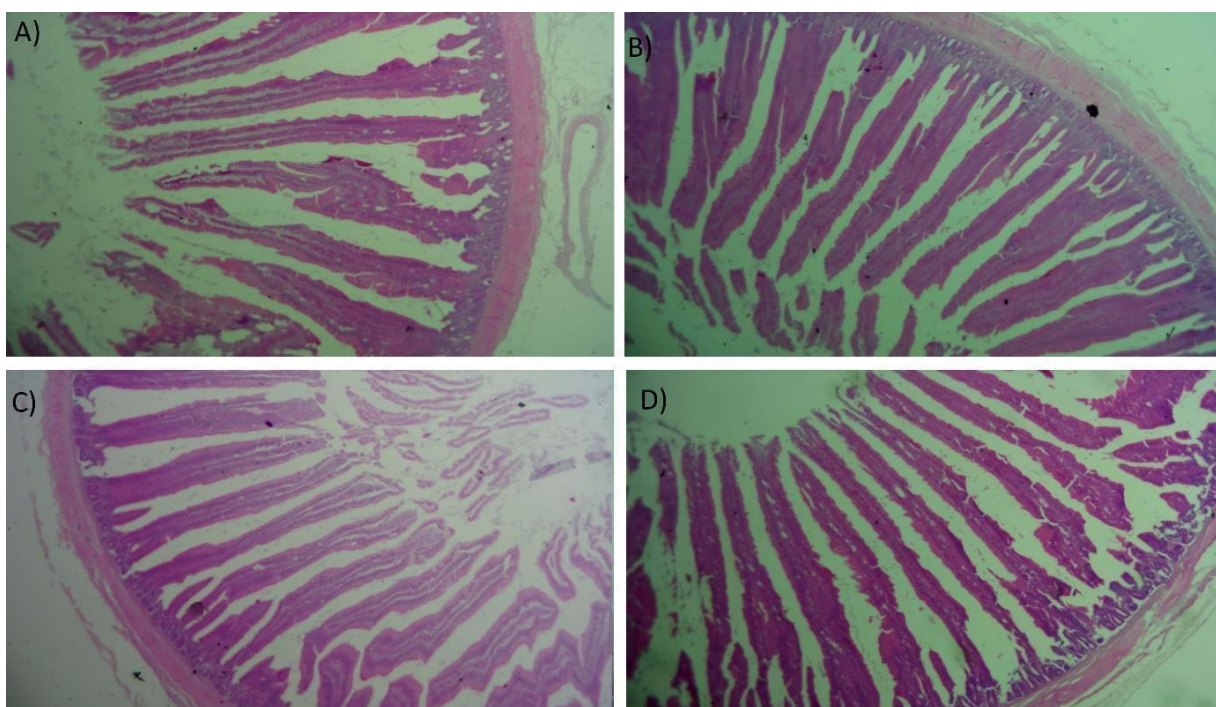
A literatura relata que as alterações na morfologia das vilosidades encontram-se mais evidentes no jejuno do que no duodeno, se dá graças ao fato de que a digestão lipídica em frangos ocorre no jejuno e íleo superior (TANCHAROENRAT *et al.*, 2014; APPERSON; CHERIAN, 2017).

**Tabela 8** Morfometria do segmento duodeno de frangos de corte alimentados com dietas contendo o extrato enzimático de *T. aurantiacus*

Tratamento	Duodeno			
	Altura Vilo ( $\mu\text{m}$ )	Profundidade Cripta ( $\mu\text{m}$ )	Relação Vilo:Cripta	Área de Absorção ( $\mu\text{m}^2$ )
1	1293,40	187,16	6,69	19,64



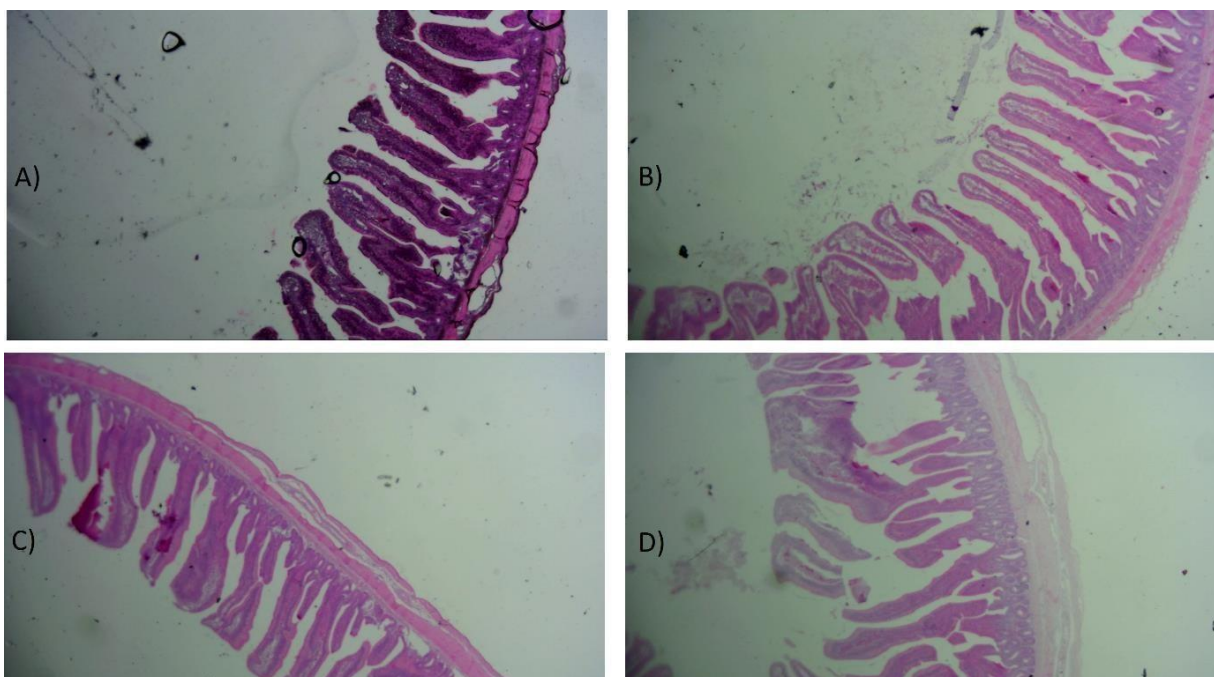
2	1288,90	211,60	6,22	21,89
3	1308,05	196,80	6,84	22,16
4	1404,90	200,23	7,51	25,29
EPM	194,85	16,38	1,20	4,07
CV (%)	14,70	8,18	17,54	18,18
P	0,7108	0,2519	0,3439	0,1804



**Figura 8** Morfologia das vilosidades do segmento duodeno: A) Tratamento 1, B) Tratamento 2, C) Tratamento 3 e D) Tratamento 4.

**Tabela 9** Morfometria do segmento jejuno de frangos de corte alimentados com dietas contendo o extrato enzimático de *T. aurantiacus*

Tratamento	Jejuno			
	Altura Vilo	Profundidade cripta	Relação Vilo:Cripta	Área de absorção
1	607,47	154,46b	3,92	16,14
2	618,10	167,59ab	3,48	14,41
3	649,02	170,69ab	4,03	16,24
4	724,24	208,33a	3,73	19,34
EPM	126,32	31,59	0,85	3,33
CV (%)	19,37	17,93	22,40	20,03
P	0,4110	0,0528	0,7439	0,1320



**Figura 9** Morfologia das vilosidades do segmento jejuno: A) Tratamento 1, B) Tratamento 2, C) Tratamento 3 e D) Tratamento 4.

Corroborando esse resultado, Apperson e Cherian (2017) verificaram que frangos de corte alimentados com ração à base de milho e farelo de soja suplementado com 15% de linhaça e 0,05% de enzima – celulase (5.600 U/g), xilanase(2.000 U/ g), glucanase (1.200 U/g), mananase (800 U/g) e galactanase (100 U/g) – tiveram a altura do vilo aumentada em aproximadamente 24,2%, mesmo com aumento da área de absorção, os autores também constataram não haver diferenças no peso corporal, ganho médio diário ou consumo de ração durante a fase inicial ou de crescimento.

Macambira *et al.* (2021) destaca que o uso de enzimas exógenas, como as carboidrases, causam efeitos positivos sobre a morfometria intestinal. Roofchaei *et al.* (2019) verificaram que a combinação entre xilanase e fitase provocou aumento do comprimento das vilosidades do jejuno. Liu *et al.* (2012) constataram que a xilanase, quando inserida na ração à base de trigo, não teve influência sobre a profundidade das criptas (PC) e altura de vilosidades (AV) do duodeno, jejuno e íleo, mas teve a capacidade de aumentar a relação vilosidades:criptas no jejuno. Contudo, Jasim e Fadel (2020) não encontraram diferenças na morfometria intestinal de galinhas poedeiras, alimentadas com ração à base de milho, farelo de soja e trigo suplementada com um complexo de carboidrases que continha xilanase, glucanase e amilase.

### 4.5.3. Determinação dos valores de energia metabolizável

Foram determinados os valores de energia metabolizável aparente (EMA) e energia metabolizável aparente corrigida (EMAc), expressos em kcal/kg de matéria seca (MS) e Matéria natural (MN). A EMA e EMAc foram influenciadas pelos diferentes níveis de inclusão de extrato enzimático de *T. aurantiacus* PI3S3, apresentando uma diminuição, comprovando, assim, a eficácia das enzimas, porém, essa diminuição foi branda, de modo que não chegou a atingir o nível do controle, como se pode observar na Tabela 10.

**Tabela 10** Energia metabolizável aparente expressa em kcal/kg de matéria seca (MS) e Matéria natural (MN) de excretas de frangos de corte tratados com extrato de *T. aurantiacus* PI3S3.

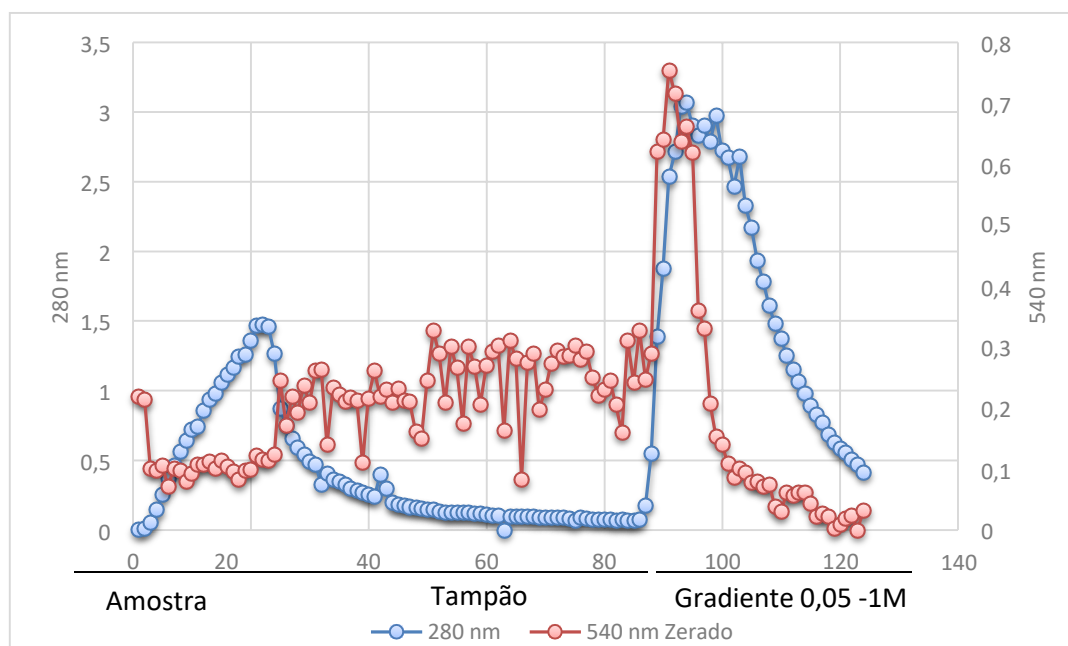
Tratamento	EMA Kcal/KgMS	EMAc Kcal/Kg MS	EMA, Kcal/MN	EMAc, Kcal/MN
1	3497a	3312a	3046a	2885a
2	3287c	3084c	2837d	2662d
3	3391b	3184b	2928b	2749b
4	3362b	3162b	2885c	2714c
EPM	24,38	20,59	21,1	17,82
CV (%)	0,72	0,65	0,72	0,65
P	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

A presença de amônia-N nas excretas, decorrente da desaminação de aminoácidos, consiste em um indicativo de má utilização de proteínas, o que leva ao comprometimento da conversão alimentar (LIU *et al.*, 2021). Silva *et al.* (2008) demonstram a minimização na excreção de minerais (fósforo, nitrogênio e cobre), quando utilizados níveis baixos de proteína bruta e de fósforo disponível em ração, suplementada com fitase, destacando a diminuição na poluição ambiental causada por tais minerais.

Ao contrário, o estudo de Apperson e Cherian (2017) demonstraram que o nível de linhaça e a suplementação enzimática – celulase (5.600 U/g), xilanase (2.000 U/ g), glucanase (1.200 U/g), mananase (800 U/g) e galactanase (100 U/g) – não apresentaram efeito sobre o teor de matéria seca das amostras de digesta.

#### 4.6. Purificação

O extrato enzimático bruto foi aplicado a uma coluna DEAE Sephadex, em que foi semipurificado. Como se pode observar na Figura 10, houve ligação da enzima à coluna, evidenciando que a enzima possui carga negativa no pH 7,2. Observa-se um pequeno pico de proteínas inicial, as quais não são de interesse, pois não têm atividade pectinolítica, e um segundo pico que coincide com a atividade testada do tubo 89 ao 95, onde foi aplicado tampão NaCl 5 mM.



**Figura 10** Purificação parcial de uma poligalacturonase de *T. aurantiacus* PI3S3 através de coluna cromatográfica DEAE Sephadex.

Após a purificação da enzima através da coluna cromatográfica DEAE Sephadex, obteve-se a recuperação de 34 mL, a quantidade de proteínas diminuiu, assim como a atividade total e a atividade específica aumentou, resultando em um fator de purificação de 1,13; tais dados são apresentados na Tabela 11.

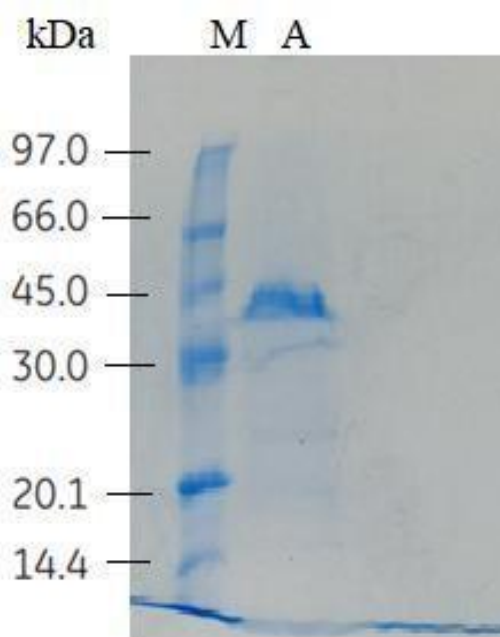
**Tabela 11** Etapas de purificação de uma poligalacturonase de *T. aurantiacus* PI3S3.

Etapa	Volume (mL)	Proteína (mg)	Atividade (U totais)	Atividade específica (U/mg totais)	Recuperação (%)	Fator de purificação (X)
Extrato Bruto	124	174	5.207	29,89	100	1
DEAE Sephadex	34	34,58	1.173,68	33,94	22,54	1,13

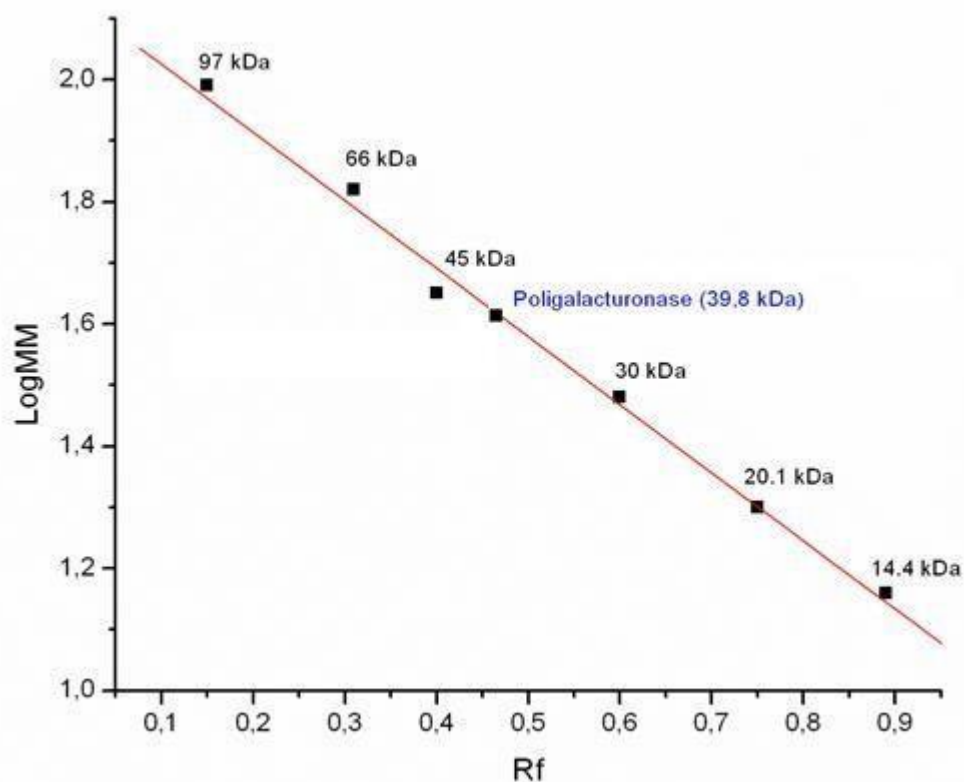
Barreto (2016) também purificou uma poligalacturonase produzida pelo fungo *Chrysosporthe cubensis*, aplicando seu extrato em cromatografia de troca iônica, obteve um fator de purificação de 3,13 e posteriormente em sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) em uma coluna Sephacryl S-200.

#### 4.6.1. Eletroforese

De acordo com a eletroforese realizada, a amostra aplicada (A) demonstrou que estava semipurificada e possui aproximadamente 39 kDa, comparando com o marcador de peso molecular (M), como se pode observar na Figura 11A, fato confirmado por meio do gráfico gerado pelo software *OriginPro*, como se pode observar na Figura 11B.



**Figura 11A** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): Amostra semipurificada por DEAE Sephadex. Símbolos: (M) marcador de peso molecular; (A) amostra pós DEAE.

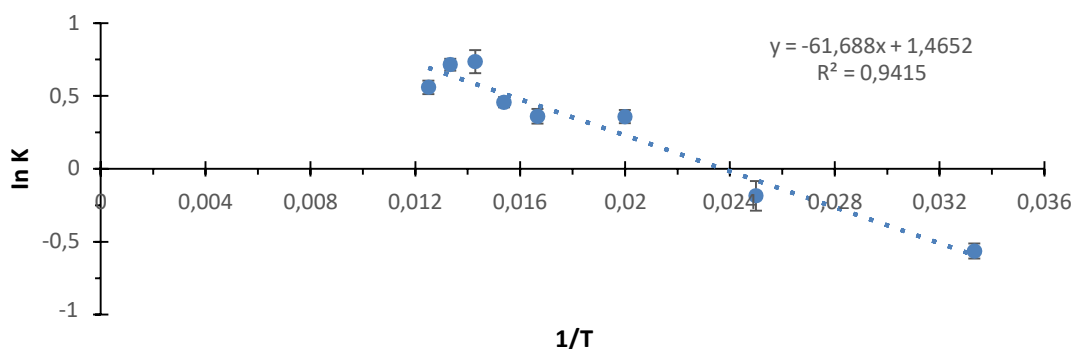


**Figura 11B** Massa molecular da poligalacturonase obtida a partir da análise de migração de bandas em SDS-PAGE.

Martins (2006) purificou uma poligalacturonase de *T. aurantiacus* cultivada em fermentação submersa e estimou o valor de peso molecular em 35 kDa, próximo ao peso verificado neste trabalho. O autor purificou a enzima por meio de aplicação em coluna de cromatografia de gel filtração com gel Sephadex G-75 e posteriormente procedeu à aplicação coluna de troca iônica SP Sepharose.

#### 4.7. Energia de ativação

A energia de ativação da reação bioquímica catalisada pela pectinase em estudo foi de 0,513 KJ/mol<sup>-1</sup> (Figura 12).



**Figura 12** Gráfico de Arrhenius para a determinação da energia de ativação ( $E_a$ ) da pectinase.

O valor de energia de ativação de  $0,513 \text{ kJ/mol}^{-1}$  encontra-se abaixo dos relatados por Mutlu *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2014), os quais observaram energia de ativação de  $9,316 \text{ kcal mol}^{-1}$  e  $9,66 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, baixas energias de ativação são vantajosas em processos industriais, visto que isso acarreta menores custos de produção, uma vez que a energia necessária para que a molécula de substrato alcance o estado ativado no sistema reacional é menor (SILVA *et al.*, 2014).

#### 4.8. Aplicação da PG no biopolimento do tecido denim (jeans)

A Tabela 12 mostra que a maior perda de peso ocorreu com o tratamento que utilizou a enzima na concentração de  $5 \text{ U mL}^{-1}$  (5,6%), semelhante ao tratamento com  $3 \text{ U mL}^{-1}$  (5,4%), indicando que esses tratamentos podem causar danos às fibras. Em contrapartida, o tratamento com  $1 \text{ U mL}^{-1}$  apresentou perda de peso de apenas 4%.

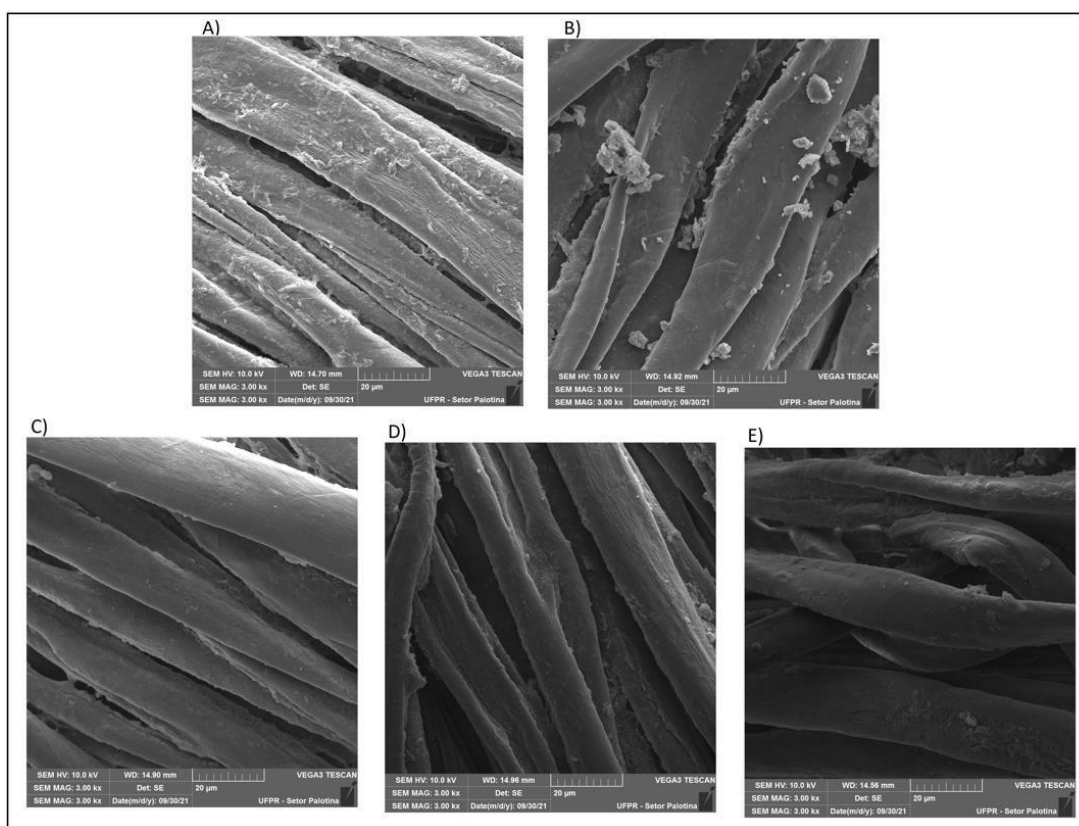
**Tabela 12** Efeito da Poligalacturonase de *T. aurantiacus* na liberação de açúcares redutores e perda de peso do jeans denim.

Tratamento	Açúcar redutor ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ )	Perda de peso (%)
Controle	0	2,4
PG $1 \text{ U mL}^{-1}$	$11,8 \pm 1,21$	4,0
PG $3 \text{ U mL}^{-1}$	$12,92 \pm 3,75$	5,4
PG $5 \text{ U mL}^{-1}$	$5,9 \pm 1,40$	5,6

A degradação do tecido é determinada normalmente pela diminuição no peso. Os resultados da aplicação da poligalacturonase no biopolimento do tecido denim (jeans) mostraram que ocorreu degradação do tecido, conseqüente liberação de açúcar redutor e diminuição no peso, como é comprovado na Tabela 12. E a perda de peso ideal está entre 3 e 5%, visto que valores superiores caracterizam uma degradação excessiva do tecido (ŠIMIĆ *et al.*, 2015). Ocorre uma maior degradação da fibra conforme se aumenta a concentração enzimática aplicada ao tratamento na mesma proporção, o que é confirmado na Figura 13. Os tratamentos enzimáticos foram realizados sem agitação, visto que a combinação do tratamento mecânico e enzimático pode gerar danos às fibras (ESFANDIARI *et al.*, 2014), ocasionando maior perda de peso e fragilidade da fibra, de modo que ocorre uma perda na força do tecido e também na qualidade do fio, diminuindo, assim, seu valor econômico (BUSSLER *et al.*, 2019).

A morfologia da superfície do tecido resultante do biopolimento tecidual pode ser visualizado por microscopia eletrônica de varredura. Assim, a Figura 13 ilustra que todos os tratamentos resultaram no biopolimento do jeans, com redução de irregularidades e saliências na superfície das fibras, quando comparado ao tratamento controle (Figura 13 A) e tecido não tratado (Figura 13 B). O resultado do tratamento com  $1 \text{ U mL}^{-1}$  (Figura 13 C) mostrou fibras mais homogêneas, indicando a geração de pouco dano à estrutura tecidual, quando comparado aos tratamentos com 3 e  $5 \text{ U mL}^{-1}$  (Figuras 13 D e 13 E).





**Figura 13** Microscopia eletrônica de varredura de jeans tratados com poligalacturonase PI3S3 de *T. aurantiacus* purificada. (A) Controle; (B) Denim não tratado; (C) Denim tratado com 1 U mL<sup>-1</sup>; (D) Denim tratado com 3 U mL<sup>-1</sup>; (E) Denim tratado com 5 U mL<sup>-1</sup>.

Os dados de perda de peso do jeans mostram o efeito total da retirada de impurezas do tecido, já os dados referentes às dosagens de açúcares redutores denotam a eficácia da ação enzimática (BUSSLER *et al.*, 2019). Bussler (2019) obteve resultados similares, utilizando uma celulase (Cela) de *C. crescentus*, apresentando dados como perda de peso de 2,43% e 2,17 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de açúcar redutor, além de visualização no MEV revelando mudanças de morfologia, sofrendo remoção de impurezas sem desbotamento e prejuízo do tecido.

Sabe-se que a ação das enzimas gera um melhor acabamento no jeans, pois, nesse processo, ocorre a remoção das penugens e pelos presentes na superfície do tecido, fato que pode ser observado na Figura 13, dando ainda a ideia de que, após o tratamento, a fibra passe a apresentar uma melhora na sua qualidade, aumentando resistência, maciez e suavidade, além de melhor organização das fibras (BUSSLER *et al.*, 2019). Além disso, o uso de enzimas para tal tratamento tem como objetivo principal substituir metodologias poluentes (EID *et al.*, 2021).

## 5. CONCLUSÃO

O fungo *T. aurantiacus* PI3S3 cultivado em meio Vogel, suplementado com 2% de casca de maracujá, é um excelente produtor de enzimas com atividade de amilase, celulase, invertase, pectinase e xilanase, as quais apresentam potencial para um gama de aplicabilidades.

Em relação à aplicação do extrato de *T. aurantiacus* na sacarificação, observou-se que houve atividade com os dois substratos testados (bagaço de cana e resíduo de milho). Porém, ocorreu maior liberação de açúcares redutores no experimento com o resíduo de milho; essa aplicação apresenta potencial futuro para a produção de etanol de segunda geração em escala industrial, visto que não tem matéria-prima poluente e apresenta baixo custo.

Em relação à adição na ração de frangos *in vitro*, observou-se que o extrato enzimático realizou hidrólise de modo eficiente, aumentando a disponibilidade de açúcares. Embora esses resultados *in vivo* não tenham aumentado o ganho de peso dos frangos de corte, foi notado o aumento nas vilosidades intestinais e a melhora na energia metabolizável das excretas.

Em relação ao efeito da PG purificada no biopolimento do tecido denim, concluiu-se que a enzima hidrolisou de modo efetivo as imperfeições presentes na fibra. A melhor concentração a ser utilizada foi  $1 \text{ U mL}^{-1}$ , visto que realizou um acabamento eficaz e não degradou a fibra, de modo que tal enzima pode ser empregada no biopolimento de tecidos, reduzindo custos e impacto ambiental, além de melhorar as propriedades físicas do tecido, apresentando uma superfície limpa e suave.

Desse modo, é possível salientar que as enzimas produzidas pelo fungo *T. aurantiacus* PI3S3 possuem um grande potencial de aplicação industrial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 148–154, 2016.

ALEXANDRE, R. **História do jeans**. Disponível em: <https://webinsider.com.br/a-historia-do-jeans/>. Acesso em: 4 mar. 2022.

ALEXANDRINO, A. M.; de FARIA, H. G.; de SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M.; Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Food Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 364–368, 2007.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1017–1026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>. Acesso em: 21/02/2022

ANDRADE, T. DOS S.; NUNES, R. V.; WACHHOLZ, L.; SILVA, I. M.; FREITAS, D. M. O efeito de enzimas exógenas no desempenho e digestibilidade de nutrientes em frangos de corte. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 711-718, 2018. doi: 10.5433/1679-0359.2018v39n2p711.

APPERSON, K.; CHERIAN, G. Effect of whole flax seed and carbohydrase enzymes on gastrointestinal morphology, muscle fatty acids, and production performance in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 5, p. 1228–1234, 2017.

AURELI, R.; LA-MARTA, J.; GROSSI, A. B.; DELLA PIA, E. A.; ESTEVE-GARCIA, E.; WULF-ANDERSEN, L.; THORSEN, M. A novel glucuronoxylan hydrolase produced by fermentation is safe as feed additive: toxicology and tolerance in broiler chickens. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 99, p. 213–224, 2018.

AYALA, T. S. **A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos**. 2019. 153 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

BARRETO, E. da S. **Produção, purificação e caracterização de uma poligalacturonase do *Chrysosporthe cubensis***. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

BARROS, R. N.; SANTOS, M. S. M.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. A utilização de resíduos agroindustriais para produção de bioetanol. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 31–43, 2019.

BERGAMASCO, R.; BASSETTI, F. J.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of

activation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 4–7, p. 873–880, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322000000400051>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BUSSLER, L. **Caulobacter crescentus**: caracterização, expressão heteróloga e aplicações biotecnológicas do gene *celA*. 2019. 117 f. Tese (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2019.

CAMARGO, S. G.; ALMEIDA, J.; SANCHES, A. C. C.; MALLER, A. Ação das enzimas celulase, invertase, pectinase e xilanase na produção de vinhos—uma revisão sistemática da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 19296–19317, 2021.

CAMPOS, E. M. **Estudo de caso comparativo**: estonagem com enzima celulósica ou ataque éko, métodos distintos dentro da lavanderia têxtil, como influenciam na qualidade do denim ou do jeans fisicamente. 47 f. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Produção Têxtil) – Faculdade de Tecnologia de Americana, Americana, 2019.

COSTA, A. C.; SCALABRINI, R. P.; SILVESTRE, M. A.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Produção de xilanase por uma nova cepa de *Thermoascus aurantiacus*: obtenção de extrato enzimático com atividade celulolítica reduzida para aplicação em indústrias de celulose e papel. **Biosci. J.**, p. 1040–1048, 2016.

DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v. 7, p. 447–454, 1964.

DE ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. A F. DA S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review Journal**, v. 21, n. 1, 2015.

DE CARVALHO, R. V. D.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M. D.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Optimization of culture conditions for the production of amylases by thermophilic *Bacillus* sp. and hydrolysis of starches by the action of the enzymes. **Food Sci. Technol**, v. 28, n. 2, p. 380–386, 2008.

DEKKER, R. F. H., Enzymatic hidrolisis of plant polysaccharides substrates for fermentation. **Brasilian J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p. 1441–1456, 1989.

DE OLIVEIRA, R. L.; DA SILVA, M. F.; DA SILVA, S. P.; CAVALCANTI, J. V. F. L.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Immobilization of a commercial *Aspergillus aculeatus* enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: a kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 169–182, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.05.001>.

DUDEK, D. N.; BUENO, I. K.; RASBOLD, L. M.; PAGNONCELI, J.; CORRÊA, J. M.; SILVA, J. L. DA C.; KADOWAKI, M. K.; SIMÃO, R. DE C. G.; SILVA, R. N.; MALLER, A. Enhance of cellulase production and biomass degradation by transformation of the trichoderma reesei RUT-C30 $\Delta$ zface1 Strain. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63(Cmc), p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020180185>.

EID, B. M.; IBRAHIM, N. A. Recent Developments in Sustainable Finishing of Cellulosic Textiles Employing Biotechnology. **Journal of Cleaner Production**, v. 284,124701, 2021.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Etanol lignocelulósico**. 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Uso de complexo enzimático em rações fareladas ou peletizadas para frangos de corte**. 2015.

ERLANGER, B. F.; EDEL, F.; COOPER, A. G. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 115, p. 206-210, 1966.

ESFANDIARI, A.; FIROUZI-POUYAEI, E.; AGHAEI-MEIBODI, P. Effect of enzymatic and mechanical treatment on combined desizing and bio-polishing of cotton fabrics. **Journal of the Textile Institute**, v. 105, n. 11, p. 1193–1202, 2014. <https://doi.org/10.1080/00405000.2014.880222>.

FATMA, S.; HAMEED, A.; NOMAN, M.; AHMED, T.; SHAHID, M.; TARIQ, M.; TABASSUM, R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. **Protein and Peptide Letters**, v. 25, n. 2, p. 148–163, 2018.

FERREIRA, C. B.; GERALDO, A.; VIEIRA FILHO, J. A.; BRITO, J. Á. G. D.; BERTECHINI, A. G.; PINHEIRO, S. R. F. Associação de carboidrases e fitase em dietas valorizadas e seus efeitos sobre desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras leves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 249–254, 2015.

FERREIRA, V. X.; CINTRÃO, J. F. F.; SILVA, E. C. C.; MAINTINGUER, S. I. Uso sustentável da água: produção mais limpa em uma indústria têxtil no estado de São Paulo. **Revista Brasileira Multidisciplinar (ReBram)**, v. 22, n. 3, p. 119, 2019. <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2019.v22i3.777>

GUENTER, W. **Practical experience with the use of enzymes**. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=C6vbeWcMGXgC&oi=fnd&pg=PA53&dq=GUENTER,+W.+2002+Practical+experience+with+the+use+of+enzymes.&ots=eaZcczZ5mZ&sig=b\\_tbVA-cbVPPX2fFGPv7iApJV-8#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=C6vbeWcMGXgC&oi=fnd&pg=PA53&dq=GUENTER,+W.+2002+Practical+experience+with+the+use+of+enzymes.&ots=eaZcczZ5mZ&sig=b_tbVA-cbVPPX2fFGPv7iApJV-8#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 2 fev. 2022.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - A review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987–996, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00203-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00203-0).

HENN, J. D. **Aditivos enzimáticos em dietas de suínos e aves**: Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal (VET00036) do Programa de PósGraduação em Ciências Veterinárias da UFRGS. 16p. 2002.

HERRERA, A. E. M. ***Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira)**: Aspectos do crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos. UNICAMP. Campinas, 1991.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Editoria**: Estatísticas Econômicas, Carmen Nery: Abate de bovinos recua 8,2% e de frangos cai 1,2% no 4º trimestre, mas de suínos cresce 5,8%. 2022. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/32946-abate-de-bovinos-recua-8-2-e-de-frangos-cai-1-2-no-4-trimestre-mas-de-suinos-cresce-5-8>. Acesso em: 3 mar. 2022.

JABLONSKI, D. B. Farinha de mexilhão dourado na alimentação de frangos de corte. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2021.

JASIM, M. S.; FADEL, G. Y. Effect of feed supplementation of probiotic and digestive enzymes in production performance and intestinal biometrics of laying hens. **Plant Archives**, v. 20, n. 1, p. 1773–1781, 2020.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 376–382, 1974.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 217-225, 2001.

KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A.; KLOSTERHALFEN, B.; SCHUMPELICK, V. A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clinical and experimental medicine**, v. 2, n. 3, p. 131-135, 2002.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; NAMBI, V. E.; GUPTA, R. K. Alterações pós-colheita na capacidade antioxidante, atividade enzimática e perfil microbiano de frutos de morango tratados com íons enzimáticos e bivalentes. **Food Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2060–2070, 2014. doi: 10.1007/s11947-013-1212-7.

ŻYŁA, K.; GOGOL, D.; KORELESKI, J.; ŚWIATKIEWICZ, S.; LEDOUX, D. R. Simultaneous application of phytase and xylanase to broiler feeds based on wheat: in vitro measurements of phosphorus and pentose release from wheats and wheat-based feeds. **J Sci Food Agric**, v. 79, p. 1832–1840, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LARA-MÁRQUEZ, A.; ZAVALA-PÁRAMO, M. G.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CAMACHO, H. C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 5, p. 859–868, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0520-0>.

LANGE, L. Fungal Enzymes and Yeasts for Conversion of Plant Biomass to Bioenergy and High-Value Products. **Microbiol Spectr.**, v. 5, n. 1, jan. 2017. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0007-2016.28155810.

LIU, D.; GUO, S.; GUO, Y. Xylanase supplementation to a wheat-based diet alleviated the intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged by *Clostridium perfringens*. **Avian Pathology**, v. 41, n. 3, p. 291–298, 2012.

LORENZI, B. R.; ANDRADE, T. H. N. Etanol de segunda geração no brasil: políticas e redes sociotécnicas. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 34, e3410014, 2019. [doi.org/10.1590/3410014/](https://doi.org/10.1590/3410014/).

MACAMBIRA, G. M.; RABELLO, C. B. V.; LOPES, C. DA C.; SANTOS, M. J. B. DOS; RIBEIRO, A. G.; OLIVEIRA, H. S. DE H.; SILVA, D. A. DA; SANTOS, A. C. F. DOS; MOTA, M. A. A.; SILVA, M. F. DA; RODRIGUES, Z. F.; RODRIGUES, M. R. DE S.; FERREIRA, M. L. S.; MARINHO, J. B. M.; SILVA, G. D.; ABREU, K. L. DE; SILVA, J. M. DOS S. Exogenous carbohydrases and gut health in birds. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e48910716774, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i7.16774.

MALLER, A.; POLIZELI, M. L. T. M. **Fitase de *Aspergillus japonicus***: estudos de produção em biorreatores, caracterização, aplicação em ração animal e expressão em pichia pastoral. 2012.

MALLER, A.; VICI, A. C.; FACCHINI, F. D. A.; SILVA, T. M.; KAMIMURA, E. S.; RODRIGUES, M. I.; JORGE, A. J.; TERENCE, H. C.; POLIZELI, M. L. T. M. Increase of the phytase production by *Aspergillus japonicus* and its biocatalyst potential on chicken feed treatment. **J. Microbiol Básico**, v. 54, p. S152-S160, 2014. [doi.org/10.1002/jobm.201300315](https://doi.org/10.1002/jobm.201300315).

MANOCHIO, C. **Produção de bioetanol de cana de açúcar, milho e beterraba**: uma comparação dos indicadores tecnológicos, ambientais e econômicos. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

MARTIN, N. Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase. **Aleph**, xi, 65 f., 2006.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; LEITE, R. S. R.; GOMES, E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*,

**International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 291–299, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9114-6>.

MARTINS, E. S. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2006.

MORAIS, P. P.; PASCOAL, P. V. V. P.; ROCHA, E. D. S. D. S.; MARTINS, E. C. A. Etanol de 2 geração: atual produção e perspectivas. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 7, n. 1, 2017.

MUNCHEN, S.; ADAIME, M. B.; PERAZOLLI, L. A.; AMANTÉA, B. E.; ZAGHETE, M. A. Jeans: a relação entre aspectos científicos, tecnológicos e sociais para o Ensino de Química. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 3, 2015.

MUTLU, M.; SARIOĞLU, K.; DEMIR, N.; ERCAN, M. T.; ACAR, J. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 3-4, p. 147–150, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.

NETO, G. J. S.; LEAL, T.; DE OLIVEIRA, J. R. G.; DE MELLO, M. R. F. T.; LEITE, T. C. C.; DE SENA, A. R. Aplicação de tanase purificada em teste de digestão in vitro de animais monogástricos. **Revista Brasileira de Pesquisa Animal e Ambiental**, v. 3, n. 3, p. 1158–1169, 2020. <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n3-035>.

NUNES, R. DE M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, Á. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 135–150, 2014.

OSMAN, O.; ALTAY, Y.; YILDIZ, A. O. Efeitos da suplementação da enzima carboidrase no desempenho, qualidade da casca do ovo e parâmetros ósseos de galinhas poedeiras alimentadas com dietas à base de milho e trigo. **British Poultry Science**, v. 59, n. 2, p. 211–217, 2018. [doi.org/10.1080/00071668.2018.1423677](https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1423677).

PAGNONCELI, J.; PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA EXO-POLIGALACTURONASE DE *Penicillium janthinellum* VI2R3M. 53, 42. 2018. [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book\\_part](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part).

PAGNONCELI, J.; RASBOLD, L. M.; ROCHA, G. B.; SILVA, J. L. C.; KADOWAKI, M. K.; SIMÃO, R. C. G.; MALLER, A. Biotechnological potential of an exo-polygalacturonase of the new strain *Penicillium janthinellum* VI2R3M: biochemical characterization and clarification of fruit juices. **Journal of Applied Microbiology**, v.127, n. 6, p. 1706–1715, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14426>.



PAULA, F. M. F. **Produção de holocelulases por isolado fúngico cultivado em biomassa residual de safras agrícolas**. 2019. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.

PINTO, T. O. P. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 E aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2010.

ROOFCHAEI, A.; REZAEIPOUR, V.; VATANDOUR, S.; ZAEFARIAN, F. Influence of dietary carbohydrases, individually or in combination with phytase or an acidifier, on performance, gut morphology and microbial population in broiler chickens fed a wheat-based diet. **Animal Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 63-67, 2019.

SAKOMURA, N. K.; ROSTAGNO, H. S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2016.

SARAVANAN, D.; SREE LAKSHMI, S. N.; SENTHIL RAJA, K.; VASANTHI, N. S. Biopolishing of cotton fabric with fungal cellulase and its effect on the morphology of cotton fibres. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 38, n. 2, p. 156–160, 2013.

SILVA, J.; SIQUEIRA, J.; PORTO, T. Termodinâmica e cinética da poligalacturonase de *Aspergillus japonicus* URM5620. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1208–1215, 2015.

SILVA, V.; MORITA, V.; BOLELI, I. Desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com pectina na ração. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 1017-1026, 2012.

SILVA, Y. L.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F.; ZANGERONIMO, M. G.; FIALHO, E. T. Níveis de proteína e fósforo em rações com fitase para frangos de corte, na fase de 14 a 21 dias de idade: 2. valores energéticos e digestibilidade de nutrientes. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 469–477, 2008.

ŠIMIĆ, K.; SOLJAČIĆ, I.; PUŠIĆ, T. Application of Cellulases in the Process of Finishing Uporaba celulaza v procesu plemenitenja. **Scientific Review/Pregledni Znanstveni Članek**, v. 58, n. 1, p. 47–56, 2015.  
<https://doi.org/10.14502/Tekstilec2015.58.47>.

SOUZA, R. M. D.; BERTECHINI, A. G.; SOUSA, R. V. D.; RODRIGUES, P. B.; CARVALHO, J. C. C. D.; BRITO, J. Á. G. D. Efeitos da suplementação enzimática e da forma física da ração sobre o desempenho e as características de carcaça de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 584–590, 2008.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 6, p. 2351–2382, 2017.

TANCHAROENRAT, P.; RAVINDRAN, F.; ZAEFARIAN, E. G.; RAVINDRAN, V. Digestão de gorduras e ácidos graxos ao longo do trato gastrointestinal trato de frangos de corte. **Poultry Sci.**, v. 93, p. 371379. 2014.

TARI, C.; DOGAN, N.; GOGUS, N. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. **Food Chemistry**, v. 111, p. 824–829, 2008.

USMANI, Z.; SHARMA, M.; AWASTHI, A. K.; SIVAKUMAR, N.; LUKK, T.; PECORARO, L., GUPTA, V. K., Bioprocessamento de biomassa residual para o desenvolvimento sustentável de produtos e minimização do impacto ambiental. **Bioresource Technology**, v. 322, n. 124548, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124548.

## ANEXO I

### AÇÃO DAS ENZIMAS CELULASE, INVERTASE, PECTINASE E XILANASE NA PRODUÇÃO DE VINHOS – UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

Gabrielle dos Santos Camargo<sup>1</sup>, Juliane Almeida<sup>1</sup>, Andreia Cristina Conegero Sanches<sup>1</sup>, Alexandre Maller<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, Brasil.

\*Autor correspondente: Alexandre Maller

e-mail: [alexandre.maller@unieoste.br](mailto:alexandre.maller@unieoste.br)

Rua Universitária, Jardim Universitário, Cascavel, Paraná, Brasil.

CEP 85819-110

#### RESUMO:

O vinho é uma bebida popular no mundo todo e a prática de vinificação é uma técnica complexa de elevadas operações convenientes às particularidades da uva para a fabricação do produto desejado. A potencialização destas operações sucede-se por ações enzimáticas. Desta forma, essa revisão objetiva reunir evidências de estudos biotecnológicos que visam o uso das enzimas celulase, pectinase, invertase e xilanase durante o processamento de vinhos. Essas macromoléculas apresentam uma gama de valores industriais e agem em função de promover melhorias na produção de vinhos em etapas como: fermentação, maceração, estabilidade, clarificação e extração de compostos fenólicos. Quando em conjunto, algumas enzimas podem ter seus efeitos biotecnológicos intensificados. Entretanto, a literatura científica carece de estudos sobre a otimização de produção enzimática, o momento ideal de aplicação de cada tipo de macromolécula, além de estudos voltados para melhoramento genético e imobilização, que busquem aperfeiçoar a produção e atividade enzimática.

**PALAVRAS-CHAVE:** *vinho, vinificação, enzimas, celulase, invertase, pectinase, xilanase.*

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de vinho é uma das mais importantes em várias regiões do mundo (MAICAS, MATEO, 2020). O consumo moderado dessa bebida aumenta a longevidade, reduz o risco de doenças cardiovasculares e não influencia de maneira significativa o risco geral de câncer (GIACOSA *et al.*, 2016; TABORSKY *et al.*, 2017). A qualidade dos vinhos está intimamente relacionada à aplicação de enzimas no processo de vinificação. Enzimas são macromoléculas com atividade de catalisadores biológicos altamente específicos envolvidos na biotecnologia alimentar (MESHRAM *et al.*, 2019) e possuem aplicabilidade substituta para alguns produtos químicos tóxicos, que estavam anteriormente envolvidos no processamento de vinhos (SATAPATHY *et al.*, 2020). As enzimas atuam no pré-tratamento, fermentação, filtração, aromatização, envelhecimento e armazenamento, ou seja, ao longo de todo o processo de formação de vinhos de frutas (OTTONE *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020).

As enzimas melhoram a extração de polifenóis e as propriedades coloidais do vinho (CAMARGO *et al.*, 2016; KASSARA *et al.*, 2019; MONTIBELLER *et al.*, 2019). Além disso, a ação enzimática otimiza a clivagem dos polissacarídeos (GAO *et al.*, 2019), contribui com a redução do consumo de energia (YANG *et al.*, 2020) e proporciona uma ampla gama de efeitos, como maximização do rendimento do suco, melhoramento da extração de compostos aromáticos, intensificação do sabor e cor em vinhos tintos, contribuição com a remoção de partículas coloidais indesejadas dissolvidas, diminuição da viscosidade e turbidez e consequente melhoramento o processo de filtração (ESPEJO, 2021).

### 1.1 Vinificação

A vinificação é um processo microbiano complexo em que as leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, consomem os açúcares presentes na uva para dar origem ao etanol. Este processo é conhecido como fermentação alcoólica e leva à transformação do mosto em vinho (BRIZUELA *et al.*, 2019). O processo de vinificação começa por incluir um elevado número de operações e técnicas de acordo com as características da uva e do tipo de vinho desejado (JORDÃO *et al.*, 2019). Seu processo fundamenta-se desde a colheita da uva até seu engarrafamento e cada etapa tem um impacto significativo no resultado do produto (UNTERKOFLENER *et al.*, 2020).

Por sua natureza, as uvas tendem a apresentar graus relevantes de heterogeneidade entre si, assim, é fundamental que o manipulador analise a qualidade média do estado de saúde e maturação da fruta (OSSORIO, TORRES, 2019). A sua colheita pode ser realizada de forma mecânica ou manual, de acordo com o seu estado fitossanitário e da destinação tecnológica (OLEJAR *et al.*, 2016). Durante o transporte da uva até a adega é necessário a conservação em baixa temperatura (CROITORU, RÁPEANU, 2019).

Após a colheita, é realizada a secagem e desidratação da uva a fim de complementar a maturação da fruta, aumentar o álcool potencial e melhorar a composição química e sabor (INGLIS *et al.*, 2016; OSSORIO, TORRES, 2019). Em seguida iniciará o processo de desengace e separação da uva, que irão assegurar a separação das bagas inteiras e exclusão da massa vegetal total do talo. Os mostos passam, então, pelos processos de maceração, tratamento enzimático, proteção antioxidante, bem como prensagem dos bagos para obter frações do sumo durante um ciclo completo de prensagem (OLEJAR *et al.*, 2016; RÁPEANU, 2019). A maceração é o tempo durante o qual os vinhos são fermentados, na presença da matéria da uva, incluindo películas, polpa e sementes. Este processo é crucial para a extração de pigmentos (MCRAE *et al.*, 2019) e pode incluir a aplicação de enzimas. A maceração enzimática tem como o objetivo extrair odorantes e seus precursores de películas de frutas silvestres (OLEJAR *et al.*, 2016; CROITORU, RÁPEANU, 2019). Durante a maceração, compostos fenólicos são extraídos das partes sólidas da uva, os quais são responsáveis pela coloração do vinho (BAILÓN *et al.*, 2019). Assim, a maceração é um dos processos mais importantes, conferindo as características de sabor ao vinho (GUZZON *et al.*, 2020; JORDÃO *et al.*, 2019).

As atividades enzimáticas extracelulares das leveduras têm um papel relevante na vinificação, liberando componentes aromáticos voláteis de seus substratos e estabilizando o vinho (CIANI, COMITINI, 2019). Enzimas hidrolíticas, como as pectinases, promovem a clivagem de constituintes do bagaço (JACKSON, 2017). O conjunto dessas ações irá influenciar significativamente no processamento da uva, nas propriedades sensoriais dos vinhos e clarificação dos mostos livres. Vale ressaltar que a modificação do perfil aromático vinífico também está intrinsecamente relacionado à diferentes atividades enzimáticas (BRIZUELA *et al.*, 2018; BRIZUELA *et al.*, 2019).

O vinho recém-fermentado é protegido do oxigênio ou é permitido apenas uma exposição mínima à essa molécula. Isso limita a oxidação indesejável de compostos

fenólicos e aromatizantes, além da deterioração microbiana. Várias semanas após o término da fermentação, o vinho é submetido à primeira trasfega para separar quaisquer sólidos que se tenham sedimentado durante a clarificação espontânea (JACKSON, 2017).

Durante a maturação, o excesso de dióxido de carbono dissolvido escapa do vinho, seus odores de fermento começam a se dissipar e o material em suspensão se estabelece. Alternativamente, o rendimento de etanol pode ser aumentado pela utilização de todo o material, que se beneficia pelo pré-tratamento com hidrólise enzimática (DÁVILA *et al.*, 2017). Mudanças no aroma desde o início de processos levam a um buquê (aromas terciários) melhorado, esse procedimento pode começar durante a maturação, continuando esperançosamente durante o envelhecimento em garrafa. Assim, por meio da ação de diferentes enzimas obtém-se o realce e a ampla volatilização do aroma em vinhos (JIMÉNEZ *et al.*, 2020; TAVERNINI *et al.*, 2020; PATIL *et al.*, 2021).

## **2. OBJETIVO**

Apesar do vasto uso enzima, ainda há pouco conhecimento sobre a ação específica destas macromoléculas sobre as etapas da produção de vinho. A deficiência de informação pode levar a inconsistências na eficiência da aplicação enzimática por apresentar alvos pouco claros (GAO *et al.*, 2019). Em razão disso, esta revisão tem o objetivo de reunir evidências de estudos biotecnológicos que visam o uso das enzimas celulase, pectinase, invertase e xilanase durante o processamento de vinhos.

## **3. MÉTODOS**

Esse estudo de revisão sistemática seguiu as recomendações do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) juntamente, com o cumprimento das orientações do *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, *The Cochrane Collaboration*.

### **3.1 Buscas estratégicas, seleção dos estudos e extração de dados**

A revisão sistemática foi atualizada em 18 de julho de 2021 identificados por meio da Biblioteca Virtual, da base de dados ScienceDirect, Pubmed e Google Acadêmico, usando os descritores: studies biotechnological, biotechnological studies, winemaking, invertase wine, wine invertase, xylanase wine, wine xylanase, cellulase wine, wine cellulase\*, enzyme wine, wine enzyme, pectinase wine, wine pectinase, enzyme, enzymes, wine, combinados com os operadores booleanos AND e OR (de acordo com o Apêndice 1 presente no material suplementar a estratégia de busca completa). A restrição de tempo foi pautada na busca das últimas publicações, utilizadas como alvo os artigos de vanguarda demarcados nos últimos cinco anos. A busca manual foi realizada por meio da pesquisa de artigos elegíveis na lista de referencias bibliográficas dos estudos incluídos.

Foram incluídos estudos biotecnológicos, artigos originais, revisões sistemáticas, estudos experimentais envolvendo ação biotecnológica de enzima em diferentes tipos de vinhos, artigos publicados em periódicos e escritos no alfabeto romano. De forma independente, dois autores realizaram a leitura de títulos e resumos, juntamente a leitura de estudos na íntegra para a procedência de extração de dados. Em casos de divergências, um terceiro revisor foi consultado. No apêndice 2 é possível observar os estudos sujeitos de exclusão por não se enquadrarem aos critérios vigentes à realização dessa revisão sistemática.

#### **4. RESULTADOS**

Após a realização da pesquisa nas bases de dados, 331 publicações foram potencialmente elegíveis identificadas. Entretanto, após a pré-seleção, foram realizadas a remoção de duplicatas, a qual resultou em 312 estudos. Dentre esses, 34 foram excluídos por não preencherem os critérios de inclusão. Restou-se um total de 278 estudos. Após a leitura de títulos e resumos, foram selecionadas por fim 78 artigos, que se enquadraram no foco principal da revisão sistemática proposta a ser realizada.

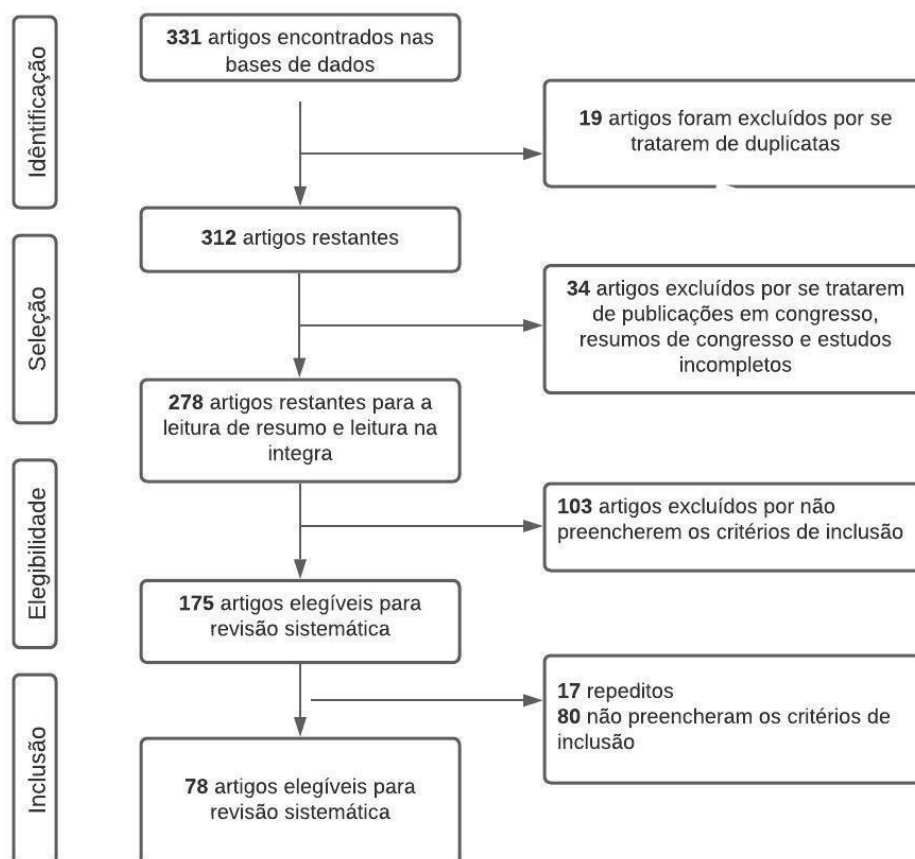


FIGURA 1. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SELEÇÃO DOS ARTIGOS (PRISMA).

#### 4. DISCUSSÃO

As enzimas são macromoléculas bem vistas durante o processamento de vinhos, pois essa é uma das indústrias mais repercutidas mundialmente, isso é exposto nas Figuras 2 e 3.





FIGURA 2. COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE VINHO NA EUROPA E MUNDIAL (Adaptado de OIV, 2020).

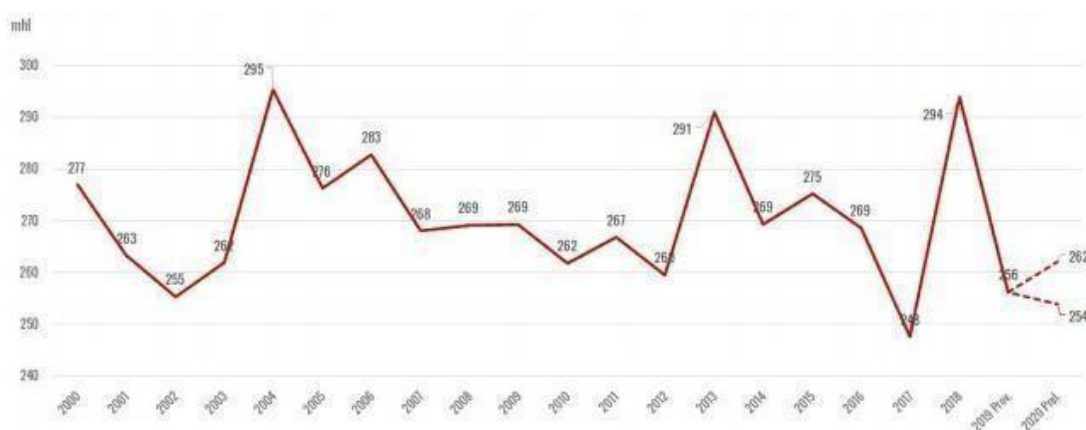


FIGURA 3. PRODUÇÃO MUNDIAL DE VINHO (OIV, 2020).

A Figura 2 expõe a curva heterogênea da fabricação de vinhos durante os últimos anos. Quando comparado à Figura 3, observa-se uma divergência entre o mercado europeu e mundial na questão da vinicultura (OIV, 2020).

As enzimas podem ser aplicadas durante várias etapas do longo processo de vinificação, como é descrito na Figura 4. Estudos apontam que quando em conjunto, as suas ações podem ser atenuadas ou acentuadas (ESPEJO, 2021).

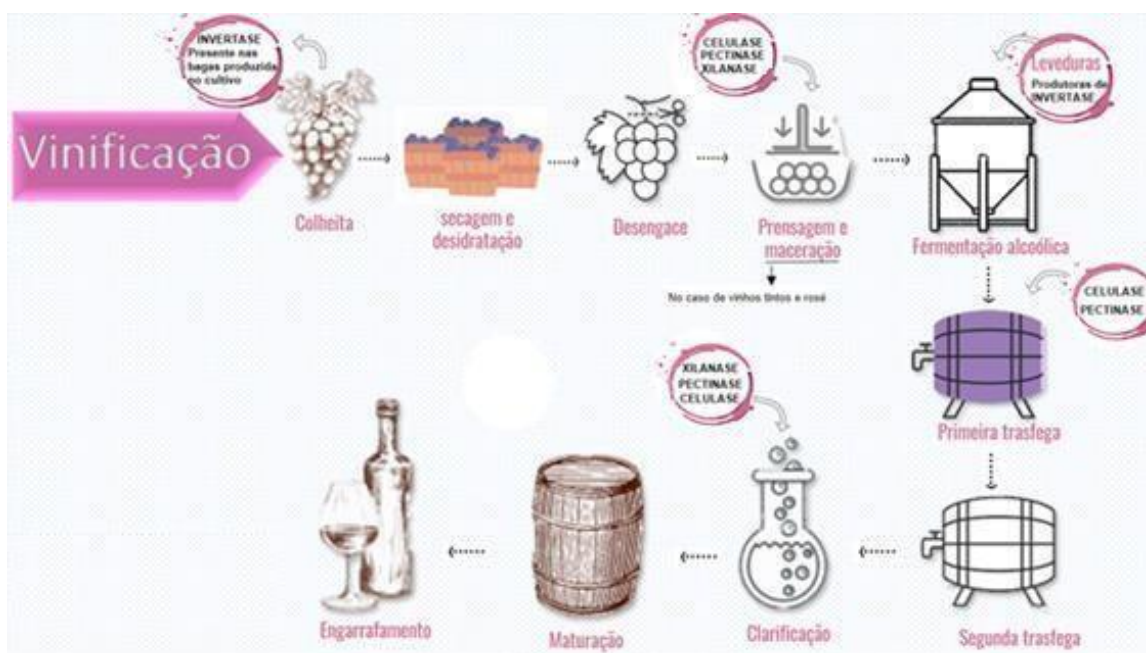


FIGURA 4. APLICAÇÃO ENZIMÁTICA NO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO.

No que tange ao consumo de vinho, os consumidores estão cada vez mais exigentes, desse modo, além das práticas enológicas, enzimas vêm sendo empregadas no processo de vinificação para otimizar o desempenho e aumentar a qualidade final do produto (MACHADO, 2019). As enzimas comerciais podem ser utilizadas e proporcionar vários efeitos benéficos, tais como, maximização do rendimento do suco, melhoria da composição química, bem como de aroma e sabor, otimização na extração de cor no caso de vinhos tintos, remoção de partículas indesejadas e outras (ESPEJO, 2021).

#### 4.1 Celulase

A celulase é uma enzima que hidrolisa a celulose em açúcares simples e pode ser produzida a partir de microrganismos (GHAZANFAR *et al.*, 2019). Fazem parte de um grupo importante de enzimas industriais que possuem várias aplicações (HMAD *et al.*, 2017), como na fabricação de vinho (NUNES, 2018). Nesse sentido, essa macromolécula catalisa a hidrólise de polissacarídeos estruturais da parede celular da uva, degradando a celulose (CLAUS, MOJSOV, 2018) e auxilia na liberação de compostos bioativos, potencializando a recuperação de fenóis e antocianinas, que de outra forma seriam perdidos nos resíduos da prensagem (MAGRO *et al.*, 2016). Elas

agem de forma a promover melhoria na fermentação, maceração e extração da cor das uvas, aumento da qualidade, estabilidade e aroma dos vinhos além de clarificação (DARRA *et al.*, 2016; BEHERA *et al.*, 2017), e melhor extração de compostos fenólicos das uvas (BUENO *et al.*, 2020).

O principal proveito da celulase na vinificação, está relacionado à etapa de maceração (ESCRIBANO *et al.*, 2017). Sua ação resulta em uma melhor extração da cor das uvas, aumento da qualidade, estabilidade, clarificação e aroma dos vinhos (BEHERA *et al.*, 2017). Os efeitos durante a maceração podem ainda ser consideravelmente melhorados, quando em conjunto com outras enzimas, como a glucanase e pectinase. A celulase também se mostrou como uma ferramenta eficaz durante o tratamento de hidrólise dos compostos polifenólicos poliméricos e/ou liberação de suas ligações estreitas às matrizes de celulose (MARTINS *et al.*, 2016). Além disso, esse efeito foi potencializado em outro estudo, quando a combinou com a pectinase (MEINI *et al.*, 2019). Pois, em conjunto elas despolimerizam até as películas ricas em hemicelulose revestidas com pectina (ZIETSMAN *et al.*, 2017).

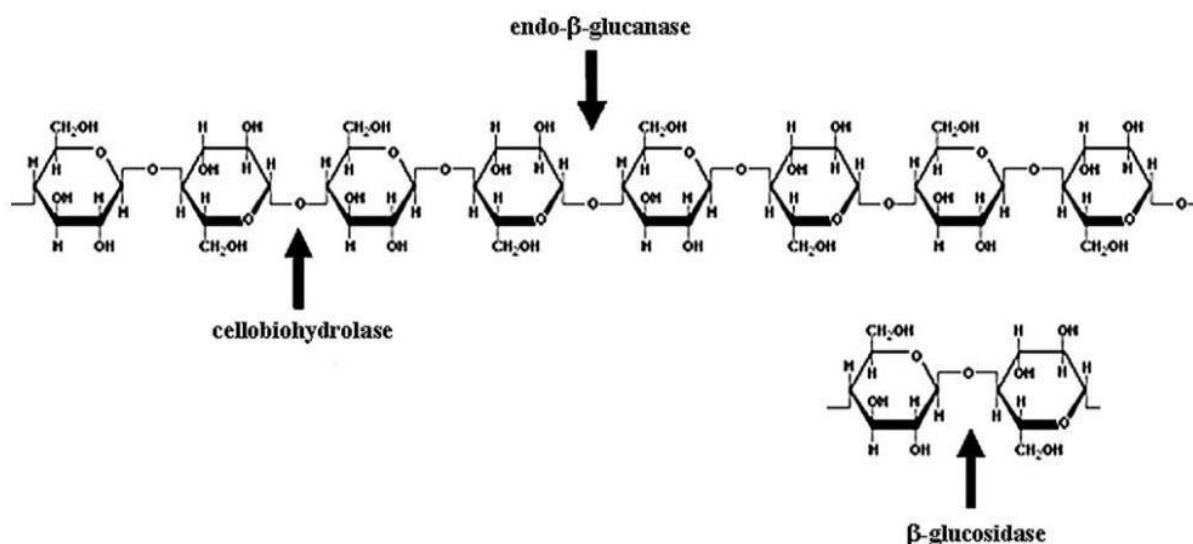


FIGURA 5. HIDRÓLISE DA CELULOSE PELA AÇÃO DE CELULASES (Kumar *et al.*, 2008).

## 4.2 Invertase

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a fonte mais significativa de  $\beta$ -frutofuranosidase (EC 3.2.1.26), comumente conhecida como invertase, pertencente

à família GH32 das glicosil hidrolases (MARGETIĆ, VUJČIĆ, 2017; TOLEDO *et al.*, 2019; SINDHU *et al.*, 2021;). A maior quantidade de invertase está localizada no espaço periplasmático da levedura (MARGETIĆ, VUJČIĆ, 2017) e desempenha um papel fundamental no controle da diferenciação e desenvolvimento celular (TOLEDO *et al.*, 2019). Essa enzima é responsável pela clivagem de sacarose produzindo D- glicose e D-frutose (LINCOLIN, MORE, 2017; TOLEDO *et al.*, 2019), como exposto na Figura 5, sendo utilizada na indústria alimentícia como enzima solúvel ou imobilizada (MARGETIĆ, VUJČIĆ, 2017).

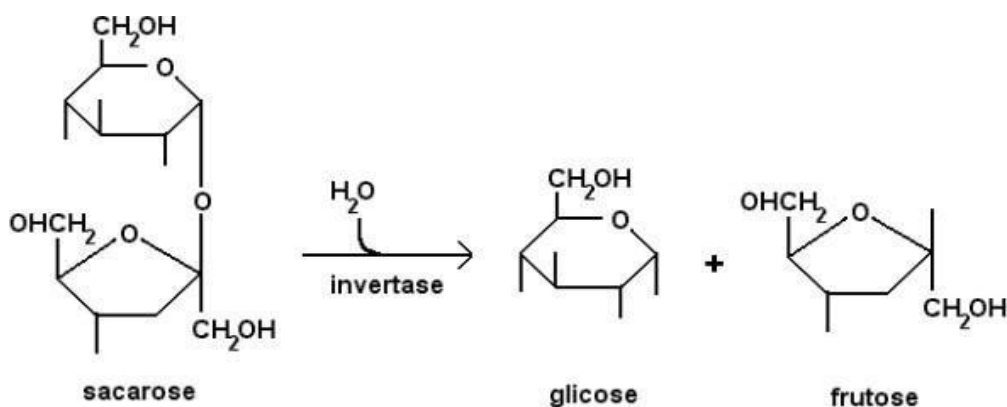


FIGURA 6. HIDRÓLISE DA SACAROSE PELA INVERTASE (Pereira, 2010).

A catálise da hidrólise irreversível da sacarose libera glicose e frutose (XIE *et al.*, 2018), que podem ser utilizadas pelos microrganismos durante a fermentação alcoólica para produzir etanol (TRAN *et al.*, 2020). Devido a isso, é considerada como enzima chave do metabolismo do açúcar nas uvas (HOVASSE *et al.*, 2016).

Um estudo apontou benefícios na viticultura, ao induzir a produção de invertase por *S. cerevisiae* na baga de uvas, os resultados expõem maiores índices fenólicos totais, maiores teores de antocianinas e menor acidez titulável (HAN *et al.*, 2019). Além disso, por ser uma proteína, a invertase pode ser utilizada para quantificação desse tipo de macromolécula durante a fabricação de vinho, podendo ser aplicada em testes que verificam a qualidade da bebida (CONDÉ *et al.*, 2017). Dessa forma, um nanosensor pode ser utilizado para detectar presença de *S. cerevisiae* viva e outras leveduras graças a produção desta enzima (FALCAO *et al.*, 2020).

### 4.3 Pectinase

Os métodos tradicionais de processamento de vinho de frutas geralmente começam processando a fruta em suco, esmagando-a, pressionando o suco cru turvo e filtrando o resíduo. Este processo geralmente é realizado por meio de prensas mecânicas (YANG *et al.*, 2020). Porém, devido à presença da pectina, nem sempre se consegue um alto índice de rendimento (SATAPATHY *et al.*, 2020). Com isso, as pectinases são amplamente empregadas, pois essas enzimas irão despolimerizar a pectina como resultado de reações de desesterificação e hidrólise (MONTIBELLER *et al.*, 2019; RIVERA *et al.*, 2021). A utilização destas enzimas favorecerá menores custos para a viticultura (BELDA *et al.*, 2016; OTTONE *et al.*, 2020), além de favorecer melhorias sob as propriedades sensoriais e tecnológicas do vinho (MERÍN, AMBROSINI, 2018) e melhorias na extração e clarificação da polpa (JIANG *et al.*, 2020), facilitando a liberação de compostos fenólicos (BELDA *et al.*, 2016; CHENG *et al.*, 2016). Devido a isso, as pectinases são consideradas ferramentas biotecnológicas que estão sendo amplamente utilizadas em várias indústrias.

As pectinases hidrolisam o polímero de pectina de forma mais eficiente do que outros grupos de enzimas. Suas ações também são mais específicas por pertencerem a um grupo heterogêneo de enzimas denominadas poligalacturonases (PGs), pectinesterase (PE) e pectina liase (PL) (SATAPATHY *et al.*, 2020; VERMA *et al.*, 2018). As pectinases são as enzimas emergentes da indústria de biotecnologia, com 25% de participação no mercado mundial de enzimas para alimentos e bebidas (YANG *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021). A incidência do uso dessa macromolécula é proveniente da sua capacidade de alteração do aroma, cor, e capacidade de antioxidação sobre o vinho de frutas (MA *et al.*, 2018; ROLLERO *et al.*, 2018). O uso de preparações enzimáticas com pectinases na vinificação promoveu aumento das contribuições de polissacarídeos de alto peso molecular ricos em manose e glicose, além de remoção de polissacarídeos ricos em arabinoses de tamanho intermediário (KASSARA *et al.*, 2019). Consequentemente, as pectinases são consideradas como biomoléculas vitalmente imperativas e ainda um artifício não tóxico, com amplo potencial de aplicação (GUAN *et al.*, 2020; SATAPATHY *et al.*, 2020).

Um estudo ressaltou que a utilização da pectinase exibiu resultados promissores, como maior rendimento do vinho e maior teor de fenólicos totais (JIANG *et al.*, 2020), motivada a sua ampla ação em meio ácido (AHMED, SOHAIL, 2020). Entretanto, a presença dessa enzima também promoveu maior produção de ácido acético e prejuízo significativo da levedura, perda de pigmento de betacianina e intensidade de cor. Os níveis do conteúdo fenólico total (TPC) ou capacidade

antioxidante total (TAC) foram elevados, todavia, após a fermentação alcoólica, os níveis desses dois marcadores foram respectivamente diminuídos, resultado que sugere que os efeitos na liberação de compostos fenólicos dependem em grande medida da matriz alimentar (JIANG *et al.*, 2020). Outros estudos ressaltam a obtenção de maiores rendimentos intrinsecamente relacionada com baixas temperaturas durante o processo de fermentação do vinho (MARTÍN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020). Tais resultados destacam essa molécula como uma opção promissora para aplicação na viticultura (BENITO, 2020).

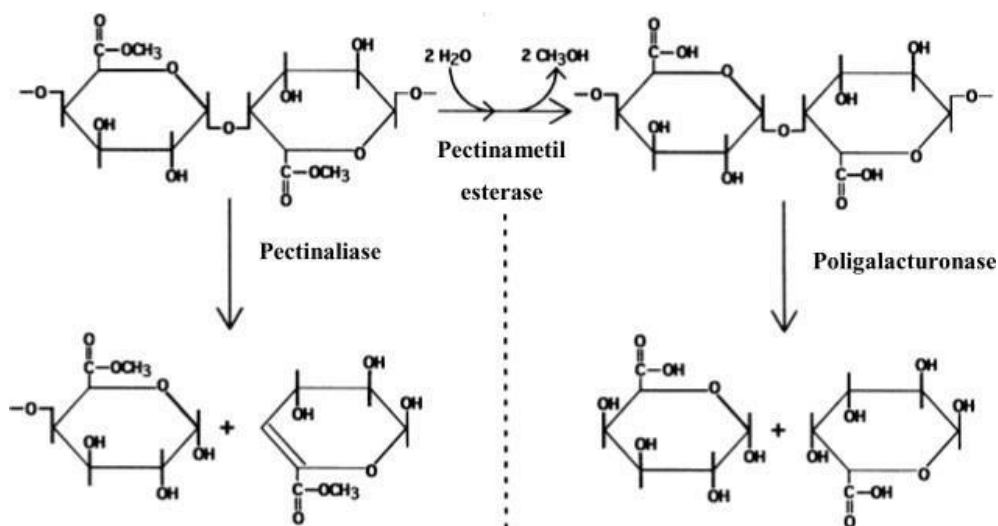


FIGURA 7. HIDRÓLISE DA PECTINA ATRAVÉS DA AÇÃO DE PECTINASES. (Catarina, 2013)

#### 4.4 Xilanase

As xilanases (EC 3.2.1.8,  $\beta$ -1,4-D-xilan-xilanohidrolase) despolimerizam o polissacarídeo linear xilano (ou xilana) para liberar D-xilose, resultando na degradação da hemicelulose presente na parede celular de plantas (DAS *et al.*, 2016).

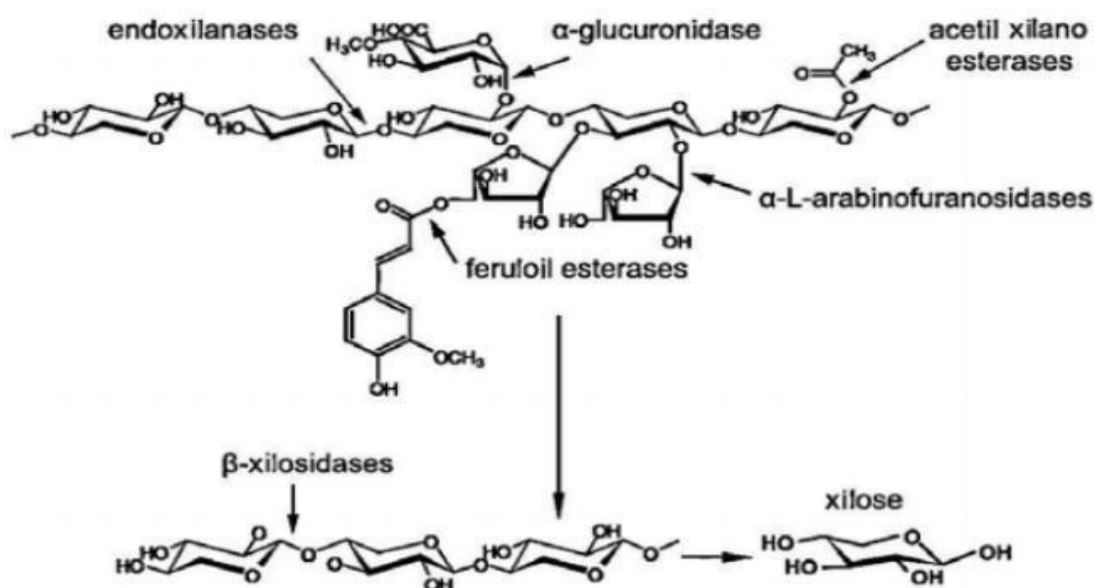


FIGURA 8. HIDRÓLISE DA XILANA PELA XILANASE (SUN *et al.*, 2012).

Em razão disso, a xilanase é amplamente utilizada em alimentos fermentados para conferir sabor, aroma e textura desejável (SAKANDAR *et al.*, 2020), essa enzima possui um baixo custo de produção, sendo visada para aplicação industrial (BHARTI *et al.*, 2019). Sua ação pode ser potencializada quando em conjunto com as pectinases (DAS *et al.*, 2016) e com celulase em processos industriais (BAJAJ, MAHAJAN, 2019).

No processamento de vinhos, a sua utilização auxilia na melhor extração de açúcares fermentáveis por meio da degradação da viscosidade da uva (NIGAM *et al.*, 2018). Sua atividade em pH baixo torna esta enzima particularmente útil em aplicações potenciais que requerem esta condição, como para aumentar o sabor do vinho (FAÚNDEZ *et al.*, 2019).

Além da aplicabilidade já conhecida de determinadas enzimas, alguns autores usam compostos multienzimáticos, que possuem uma aplicação mais abrangente (MONTIBELLER M. J. 2019; CAMARGO A. C. 2016). Outros ainda, estudam formas de melhorar a utilização das enzimas através de imobilização, a qual permite uma maior eficiência e possibilidade de reutilização tornando o catalisador recuperável, isso gera impacto na viabilidade do processo pela redução de custos em relação ao uso de enzimas, sem interferir na qualidade do produto (OTTONE *et al.*, 2020).

Enzima	Processo	Vantagem da aplicação da enzima	Autor/ ano
--------	----------	---------------------------------	------------

Celulase	Fermentação	Melhora o aroma a cor do vinho.	DARRA <i>et al.</i> , 2016; BEHERA <i>et al.</i> , 2017
	Maceração	Gera aumento do rendimento e liberação de compostos bioativos, potencializando a recuperação de fenóis e antocianinas.	MAGRO <i>et al.</i> 2016; ESPEJO, 2021
	Trasfega	Melhora o processo de filtração devido a diminuição de viscosidade e turbidez.	ESPEJO, 2021
	Clarificação	Otimiza o processo de clarificação.	ESPEJO, 2021
Invertase	Cultivo	Diminui acidez apresenta maior índice fenólico total e antocianinas.	HAN <i>et al.</i> , 2019
	Testes de qualidade do vinho	Pode ser utilizada como padrão para detecção de proteínas.	CONDÉ <i>et al.</i> , 2017
	Testes de qualidade do vinho	Nanosensores podem detectar a presença de <i>S. cerevisiae</i> viva e outras leveduras graças a produção dessa enzima.	FALCAO <i>et al.</i> , 2020
Pectinase	Maceração	Hidrolise específica da pectina. Aumenta o rendimento do vinho, promove clarificação, maior rendimento e maior teor de fenólicos totais, além da otimização na produção e melhora nas propriedades coloidais.	SATAPATHY <i>et al.</i> , 2020; VERMA <i>et al.</i> , 2018; ESPEJO, 2021; JIANG <i>et al.</i> , 2020; MERÍN, AMBROSINI, 2018; MA <i>et al.</i> , 2018; GU <i>et al.</i> , 2018; ROLLERO <i>et al.</i> , 2018
	Fermentação	Melhoramento de aroma e cor.	DARRA <i>et al.</i> , 2016
	Trasfega	Melhora o processo de filtração devido a diminuição de viscosidade e turbidez.	ESPEJO, 2021
	Clarificação	Otimiza o processo de clarificação auxiliando na extração, aumentando o rendimento, facilitando a filtração e acentuando o sabor, além de reduzir a viscosidade e turvação.	OTTONE <i>et al.</i> , 2020
Xilanase	Vinificação	Diminuição do custo.	BHARTI <i>et al.</i> , 2019



	Maceração	Possui ação sinérgica com outras enzimas promovendo: otimização na degradação da parede celular, aumento do rendimento e da estabilidade do suco e destintamento.	BAJAJ, MAHAJAN, 2019
	Possui potencial de aplicação em reações que necessitam de pH baixo	Aumenta aroma e sabor.	FAÚNDEZ <i>et al.</i> , 2019

**QUADRO 1: VANTAGENS DA APLICAÇÃO ENZIMÁTICA NO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO SEGUNDO DIFERENTES AUTORES.**

## CONCLUSÃO

Observou-se que as quatro enzimas estudadas, celulase, pectinase, invertase e xilanase, possuem aplicabilidade na indústria vinícola, proporcionando muitos benefícios ao vinho, tais como: aumento da clarificação e do rendimento, maior liberação de compostos bioativos que potencializam a recuperação de fenóis e antocianinas, diminuição da acidez e melhora das propriedades organolépticas como textura, sabor e aroma como se pode observar no quadro 1.

Além disso, foi verificado que os compostos enzimáticos contendo diferentes macromoléculas, que trabalham concomitantemente, apresentaram um melhor desempenho, sendo que sua ação simultânea é de fato vantajosa. Porém, pouco se sabe em relação à concentração ideal de aplicação de cada enzima e momento ideal de aplicação. Dessa forma, ainda existe a demanda de estudos sobre otimização de produção enzimática, combinação proporcional ideal entre as enzimas e momento ideal de aplicação de cada tipo de macromolécula, além de estudos voltados para melhoramento genético e imobilização, que busquem aperfeiçoar a produção e atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed A, Sohail S. Characterization of pectinase from *Geotrichum candidum* AA15 and its potential application in orange juice clarification. *Journal of King Saud University - Science*. 2020;32(1):955-961.
- Bailón M.T.E, Gonzalo J.C.R, Estévez G. Chapter 13 - Wine Color Evolution and Stability - *Rede Wine Technology*. 2019;195-205.
- Bajaj P, Mahajan R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019;103(21-22):8711-8724.
- Behera B.C, Sethi B.K, Nusgra R.R, Dutta S.K, Thatoi H.N. Microbial cellulases - Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2017;15(1):197-210.
- Benito, S. Combined Use of *Lachancea thermotolerans* and *Schizosaccharomyces pombe* in Winemaking: A Review. *Microorganisms*. 2020;8(5):655.
- Belda I, Conchillo L.B, Ruiz J, Navascués E, Marquina D, Santos A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International journal food microbiology*. 2016;16(223):1-8.
- Bueno J.N, Bocanegra B.B, Heredia F.F. Phenolic compounds extraction in enzymatic macerations of grape skins identified as low-level extractable total anthocyanin content. *Journal of food science*. 2020;85(2):324-331.
- Bharti A.K, Kumar A, Kumar A, Dutt D. Exploitation of *Parthenium hysterophorus* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. 2019;11(4):271-280.
- Brizuela N.S, Ferrada B.M.B, Bayon M.A.P, Semorile L, Tymczyszyn E. Changes in the volatile profile of Pinot noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains. *Food Research International*. 2018;106:22-28.
- Brizuela N, Tymczyszyn E, Semorile L.C, Hens D.V, Delfederico L, Hollmann A, Ferrada B.B. *Lactobacillus plantarum* as a malolactic starter culture in winemaking: A new (old) player?. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2019;38:10-18.
- Camargo A.C, D'Arce M.A.B.R, Biasoto A.C.T, Shahidi F. Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chem*. 2016;212:395-402.
- Catarina, S. Impacto da aplicação de enzimas pectinolíticas comerciais no. February 2013. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3505.7043>
- Ciani M, Comitini F. Chapter 4 - Use of Non - *Saccharomyces* Yeasts in Red Winemaking. *Rede Wine Technology*. 2019;51-68.
- Condé B.C, Bouchard E, Culbert J.A, Wilkinson K.L, Fuentes S, Howell K.S. Soluble Protein and Amino Acid Content Affects the Foam Quality of Sparkling Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(41):9110-9119.

- Cheng Z, Chen D, Lu B, Wei Y, Xian L, Li Y, Luo Z, Huang R. A Novel Acid-Stable Endo-Polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: Purification, Characterization, and Application in the Beverage Industry. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2016;26(6):989-98.
- Claus H, Mojsov K. Enzymes for Wine Fermentation: Current and Perspective Applications. *Fermentation*. 2018;4(3):52.
- Croitoru, Râpeanu, 2019. New Insights on Winemaking of White Grapes. *Fermented Beverages - The Science of Beverages*. 2019;5:103-145
- Das A, Ray L. Production of crude xylanase using a isolated fungal strain *Aspergillus sp.S6* by solid state fermentation. *Materialstoday Proceedings*. 2016;3(10)A:3343-3360.
- Darra N.E, Turk M.F, Ducasse M.A, Grimi N, Maroun R.G, Louka N, Vorobiev E. Changes in polyphenol profiles and color composition of freshly fermented model wine due to pulsed electric field, enzymes and thermovinification pretreatments. *Food Chemistry*. 2016;194:944-950.
- Dávila I, Robles E, Egüés I, Labidi J, Gullón P. 2 - The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products. *Handbook of Grape Processing by-products - Sustainable Solutions*. 2017;29-53
- Escribano R, Arenzana L.G, Garinjo P, Berlanas C, Alfaro I.P, López R, Gutiérrez A.R, Santamaria P. Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of food science and technology*. 2017;54(6):1555- 1564.
- Espejo F. Role of commercial enzymes in wine production: a critical review of recent research. *J. Food Sci Technol*. 2021;58(1):9-21.
- Falcao S.J, Villalonga A, Villena M.A, Péres B.A, Máñez R.M, Ruiz P.M, Villalonga R. Enzyme-controlled mesoporous nanosensor for the detection of living *Saccharomyces cerevisiae*. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2020;303.
- Faúndez C, Pérez R, Ravanal M.C, Eyzaguirre J. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, GH3 beta-xylosidase: Heterologous expression and characterization of the enzyme. *Carbohydrate Research*. 2019;482.
- Gao Y, Zietsman A.J.J, Vivier M.A, Moore J. Deconstructing Wine Grape Cell Walls with Enzymes During Winemaking: New Insights from Glycan Microarray Technology. *Molecules*. 2019;24(1):165.
- Gao Y, Fangel J, Willats W.G.T, Moore J. Tracking polysaccharides during white winemaking using glycan microarrays reveals glycoprotein-rich sediments. *Food Res Int*. 2019;123:662-673.
- Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Faliva M.A, Gerbi V, Vecchia C.L, Negri E, Opizzi A, Perna S, Pezzotti M, Rondanelli M. Mediterranean Way of Drinking and Longevity. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2016;56(4):635-40.

- Guan Y, Wang D, Lv C, Zhang Y, Gelbic I, Ye X. Archives of microbiology: screening of pectinase-producing bacteria from citrus peel and characterization of a recombinant pectate lyase with applied potential. *Archives of microbiology*. 2020;202(5):1005-1013.
- Guzzon R, Malacarne M, Larcher R, Franciosi E, Toffanin A. The impact of grape processing and carbonic maceration on the microbiota of early stages of winemaking. *Journal of applied microbiology*. 2020;128(1):209-224.
- Ghazanfar M, Irfan M, Nadeem M, Syed Q. Chapter 5 - Role of Bioprocess Parameters to Improve Cellulase Production: Part I. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering - From Cellulose to Cellulase: Strategies to Improve Biofuel Production*. 2019;63-76.
- Han W, Han N, He X, Zhao X. Berry thinning to reduce bunch compactness improves fruit quality of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*. 2019;246(27):598-596.
- Hovasse A, Alayi T.D, Dorselaer A.V, Marchal R, Jégou S, Reiss C.S. In-depth glycoproteomic characterisation of grape berry vacuolar invertase using a combination of mass spectrometry-based approaches. *Food chemistry*. 2016;200:237-44.
- Hmad I.B, Gargouri A. Neutral and alkaline cellulases: Production, engineering, and applications. *Journal Basic microbiology*. 2017;57(8):653-658.
- Inglis D.L, Kemp B, Dowling L, Kelly J, Diprofito F, Pickering G. A new wine style for Canada's cool climate wine regions based on the appassimento technique. *ICCWS - International Cool Climate Wine Symposium*. 2016.
- Jackson R.S. Chapter 2 - Visual Perceptions. *Wine Tasting (Third Edition): A professional Handbook*. 2017:19-40.
- Jackson R.S Chapter 7 - Styles and Types of Wine. *Wine Tasting (Third Edition). A professional Handbook*. 2017:293-335.
- Jiang X, Lu Y, Liu S. Effects of pectinase treatment on the physicochemical and oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Torulaspora delbrueckii*. *LWT - Food Science and technology*. 2020;132.
- Jiménez M.P, Fernández A.E, González C.M, Bayón M.A.P. Interactions Among Odorants, Phenolic Compounds, and Oral Components and Their Effects on Wine Aroma Volatility. *Molecules*. 2020;25(7):1701.
- Jordão A.M, M.J, Silva R. Chapter 12 - Evolution of proanthocyanidins during grape maturation, winemaking, and aging process of red wines. *Red wine technology*. 2019: 177-193
- Kassara S, Li S, Smith P, Blando F, Bindon K. Pectolytic enzyme reduces the concentration of colloidal particles in wine due to changes in polysaccharide structure and aggregation properties. *International journal of biological macromolecules*. 2019;1(140):546-555.
- Kumar, R., Singh, S., & Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass : biochemical and molecular perspectives. 377–391.

- Lincoln L, More S. Bacterial invertases: Occurrence, production, biochemical characterization, and significance of transfructosylation. *Journal of Basic Microbiology - Environment - Health Techniques*. 2017;57(10):803-813.
- Ma S, Neilson A, Lahne J, Peck G, O'Keefe S, Hurley K, Sandbrook A, Stewart A. Juice Clarification with Pectinase Reduces Yeast Assimilable Nitrogen in Apple Juice without Affecting the Polyphenol Composition in Cider. *Journal of Food Science*. 2018;83(11):2772-2781.
- MACHADO, M. L. da C. Enzimas e vinho: melhor qualidade e rendimento na indústria. Repositorio da Universidade e Lisboa. 2019.
- Maicas S, Mateo J. Sustainability of Wine Production. MDPI - Publisher of Open Access Journals. 2020;12(2):559.
- Magro L.D, Dalagnol L.M.G, Manfroi V, Hertz P.F, Klein M.P, Rodrigues R.C. Synergistic effects of Pectinez Ultra Clear and Lallzyme Beta on yield and bioactive compounds extraction of Concord grape juice. *LWT - Food Science and technology*. 2016;72:157-165.
- Margetić A, Vujčić Z, Comparative study of stability of soluble and cell wall invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 2017;47(3):305-311.
- Martín M, López O.V, Ciolino A.E, Morata V.I, Villar M.A, Ninago M.D. Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;18:101091.
- Martins I.M, Roberto B.S, Blumberg J.B, Chen C.Y.O, Macedo G.A. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. *Food Research International*. 2016;89(1):533-539.
- Meini M.R, Cabezudo I, Boschetti C.E, Romanini D. Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process. *Food Chemistry*. 2019;283:257-264.
- Meshram A, Singhai G, Bhagyawant S, Srivastava N. Chapter 28 - Plant - Derived Enzymes: A treasure for Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology - Production, Applications, and Future Prospects*. 2019:483-502.
- Merín M.G, Ambrosini V.I.M. Kinetic and metabolic behaviour of the pectinolytic strain *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. *International journal food microbiology*. 2018;20(285):18-26.
- Montibeller M.J, Monteiro P.L, Stoll L, Yerovi D.S, Rodrigues E, Rodrigues R.C, Rios A.O, Manfroi V. Improvement of Enzymatic Assisted Extraction Conditions on Anthocyanin Recovery from Different Varieties of *V. vinifera* and *V. labrusca* Grape Pomaces. 2019;12:2056-2068.
- McRae J.M, Teng B, Bindon K. Factors Influencing Red Wine Color From the Grape to the Glass. *Encyclopedia of Food Chemistry. Reference Module in Food Science*. 2019;97-106.

- Nigam D, Asthana M, Kumar A. Chapter 10 - Penicillium: A Fungus in the Wine and Beer Industries. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering - Penicillium System Properties and Applications*. 2018;187-200.
- Nunes C.S. Chapter 6 - Depolymerizing enzymes - cellulases. *Enzymes in Human and Animal Nutrition - Principles and Perspectives*. 2018;107-132.
- OIV. (2020). 2020 Wine production - OIV First Estimates. *International Organisation of Vine and Wine, April 2001*, 1–8.
- Olejar K, Fedrizzi B, Kilmartin P. Enhancement of Chardonnay antioxidant activity and sensory perception through maceration technique. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;65:152-157
- Ossorio P, Torres P.B. Chapter 17 - Sensory Analysis of Red Wine for Winemaking Purposes. *Red Wine Technology*. 2019:253-256.
- Ottone C, Romero O, Aburto C, Illanes A, Wilson L. Biocatalysis in the winemaking industry: Challenges and opportunities for immobilized enzymes. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2020;19(2):595-621.
- Patil P, Deshannavar U, Ramasamy M, Emani S. Production, optimization, and characterization of sugarcane (*Saccharum Officinarum*) - papaya (*Carica papaya*) wine using *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Technology & Innovation*. 2021;21:101290.
- Pereira, F. S. G. BIOCHEMISTRY IN A CHEMICAL APPROACH. *BIOQUÍMICA NUMA ABORDAGEM QUÍMICA*. 2010.
- Rivera O.M.P, Leos M.D.S, Solias V.E, Domínguez J.M. Recent trends on the valorization of winemaking industry wastes. *Current Opinion in Green And Sustainable Chemistry*. 2021;27:100415.
- Rollero, S., A. J. J. Zietsman, F. Buffetto, J. Schuckel, A. Ortiz-Julien, € and B. Divol. 2018. *Kluyveromyces marxianus* secretes a pectinase in Shiraz grape must that impacts technological properties and aroma profile of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(44):11739–47.
- Sakandar H.A, Hussain R, Khan Q.F, Zhang H. Functional microbiota in Chinese traditional Baijiu and Mijiu Qu (starters): A review. *Food Research International*. 2020;138B.
- Sun J, Tian C, Diamond S, Glass NL. Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 2012;11(4):482-493. doi:10.1128/EC.05327-11
- Satapathy S, Rout J.R, Kerry R.G, Thatoi H, Sahoo S.L. Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7:117.
- Sindhu R, Shiburaj S, Sabu A, Fernades P, Singhai R, Mathew G.M, Nair I.C, Jayachandran K, Vidya J, Vandenberghe L.P.S, Deniz I, Madhavan A, Binod P,
- Taborsky M, Ostadal P, Adam T, Moravec O, Gloger V, Schee A, Skala T. Red or white wine consumption effect on atherosclerosis in healthy individuals (In Vino Veritas

- study). Randomized Controlled Trial - Bratislavske lekarske listy; 2017;118(5):292-298.
- Tavernini L, Ottone C, Illanes A, Wilson L. Entrapment of enzyme aggregates in chitosan beads for aroma release in white wines. *Int J Biol Macromol.* 2020;154:1082-1090.
- Toledo L.E.T, García D.M, Cruz E.P, Intriago L.M.R, Pérez J.N, Chanfrau J.MP. Chapter 26 - Fructosyltransferases and Invertases: Useful Enzymes in the Food and Feed Industries. *Enzymes in Food Biotechnology - Production, Applications, and Future Prospects.* 2019:451-469.
- Tran T, Grandvalet C, Verdier F, Martin A, Alexandre H, Maréchal R. Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. *Foods.* 2020;9(7):963.
- Unterkofler J, Muhlack R, Jeffery D. Processes and purposes of extraction of grape components during winemaking: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology.* 2020;104(11):4737-4755.
- Verma H, Narnoliya LK, Jadaun JS. Pectinase: uma ferramenta útil nas indústrias de processamento de frutas . *Nutr Food Sci Int J.* (2018)
- Yang H, Cai G, Lu J, Plaza E.G. The production and application of enzymes related to the quality of fruit wine. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2020;19:1-11
- Xie J, Hu H.X, Cai K, Xia L.Y, Yang F, Jiang Y.L, Chen Y, Zhou C.Z. Structural and enzymatic analyses of *Anabaena* heterocyst-specific alkaline invertase InvB. *FEBS letters.* 2018;592(9):1589-1601.
- Zietsman A, Moore J.P, Fangel J.U, Willats W.G.T, Vivier M.A. Combining hydrothermal pretreatment with enzymes de-pectinates and exposes the innermost xyloglucan-rich hemicellulose layers of wine grape pomace. *Food Chemistry.* 2017;232:340-350.
- Zhang S, Bilal M, Zdarta J, Cui J, Kumar A, Franco M, Ferreira L, Iqbal H.M.N. Biopolymers and nanostructured materials to develop pectinases-based immobilized nano-biocatalytic systems for biotechnological applications. *Food Research International.* 2021;140:109979.