

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS

GABRIEL DO AMARAL MINUSSI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS EM
CULTIVOS COM PECTINA E AÇÚCARES PÉCTICOS

CERRO LARGO

2024

GABRIEL DO AMARAL MINUSSI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS EM
CULTIVOS COM PECTINA E AÇÚCARES PÉCTICOS**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Orientador: Sérgio Luiz Alves Júnior

Coorientador: João Paulo Bender

CERRO LARGO

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Minussi, Gabriel do Amaral

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS EM CULTIVOS COM PECTINA E AÇÚCARES PÉCTICOS / Gabriel do Amaral Minussi. -- 2024.

83 f.:il.

Orientador: Doutor Sérgio Luiz Alves Júnior

Co-orientador: Doutor João Paulo Bender

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis, Cerro Largo, RS, 2024.

1. Ácido galacturônico. 2. Fermentação. 3. Galactose. 4. Laranja. 5. Pectina. I. Júnior, Sérgio Luiz Alves, orient. II. Bender, João Paulo, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GABRIEL DO AMARAL MINUSSI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS EM
CULTIVOS COM PECTINA E AÇÚCARES PÉCTICOS**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de mestre em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 30/04/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO LUIZ ALVES JUNIOR**
Data: 20/06/2024 08:35:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFFS
Orientador

Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS
Co-orientador

Prof. Dr.^a Rosana Goldbeck – UNICAMP
Avaliadora

Documento assinado digitalmente
 **HELEN TREICHEL**
Data: 20/06/2024 08:41:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr.^a Helen Treichel – UFFS
Avaliadora

Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS
Avaliador

Dedico este trabalho aos meus pais Marivane
Cavalleiro do Amaral e Cláudio Pes Minussi
que sempre me apoiaram e me incentivaram
nessa caminhada até aqui para finalizar essa
etapa em meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Marivane Cavaleiro do Amaral e Claudio Pes Minussi, por me ensinarem os valores da vida, por acreditarem em meu potencial, pela dedicação e pelo investimento no meu ensino. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão e meu amor por vocês.

Aos meus amigos e colegas que estiveram juntos comigo nessa importante etapa. Aqui quero citar especialmente meu amigo Eduardo Dias Fenner que passou por quase as mesmas dificuldades durante esse período e agradecer o companheirismo e amizade partilhado durante essa etapa. E aos meus amigos Lucas Bohnenberger e Timóteo da Silva, pessoas admiráveis que proporcionaram momentos de conversas e descontração para que houvesse motivação para seguir em frente durante essa jornada. Vocês são especiais!

A Universidade Federal da Fronteira Sul, pelo ensino de qualidade, disponibilidade de infraestrutura, recursos, materiais e todo o corpo docente, pela oportunidade de ensino gratuito e de excelência, pelo incentivo à pesquisa e por todos os momentos que me propiciaram durante essa etapa. Agradeço a instituição também pela bolsa que me foi concedida em meu segundo ano de mestrado.

A orientação do professor Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior, pelos ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade e pelo apoio. Além do excelente profissional, é uma grande pessoa, que me ajudou em tudo que eu precisei no decorrer da minha pesquisa, esteve disponível sempre em explicar com muita maestria todas as dúvidas que surgiam.

A coorientação do professor Dr. João Paulo Bender, por me auxiliar em importante etapa na pesquisa do presente trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Leveduras, que foram fundamentais para que esse trabalho acontecesse, pois sempre estavam dispostos a ajudar seja em trabalhos laboratoriais ou compartilhando demais conhecimentos.

RESUMO

A produção em larga escala de sucos de laranja resulta em grandes volumes de resíduos, principalmente cascas da fruta, que são descartadas inadequadamente, causando problemas ambientais e econômicos. Para solucionar esse dilema, propõe-se o uso desses resíduos em biorrefinarias de segunda geração, onde microrganismos podem metabolizar os açúcares presentes nessa biomassa residual, produzindo compostos valiosos, como etanol. Essa abordagem integrada entre sustentabilidade e tecnologia mostra-se promissora para otimizar processos industriais e reduzir impactos ambientais. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial biotecnológico de leveduras isoladas de laranjas em decomposição e analisar suas capacidades em relação ao crescimento celular e atividade enzimática. Ademais, através de delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), foi avaliada a possibilidade da produção de etanol em meios ricos com pectina ou hidrolisado deste polissacarídeo. Para isso, foi inicialmente realizada a triagem de 38 leveduras em experimentos em microescala em meios mínimos contendo 6,7 g/L de base nitrogenada de leveduras, acrescentado, alternadamente, 20 g/L dos seguintes monossacarídeos: glicose, xilose, frutose, galactose ou ácido galacturônico. Todas as leveduras foram capazes de crescer utilizando glicose, xilose, frutose ou galactose como fontes de carbono. No meio contendo ácido galacturônico, apenas 13 cepas cresceram. Através desses experimentos em microescala, foi determinada a velocidade específica máxima de crescimento das leveduras. As maiores velocidades foram observadas em glicose, frutose e galactose (0,93–0,98 h⁻¹). Em ácido galacturônico, a máxima velocidade específica encontrada foi de 0,29 h⁻¹. Para os cultivos em frasco agitado, realizados na sequência, foram escolhidas 21 dessas linhagens. Neste caso, as leveduras foram submetidas a meios YP (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, pH 7,0) contendo, alternadamente, 1% de pectina bruta (obtida de cascas de laranja no presente trabalho – PB), 1% de pectina purificada (Sigma-Aldrich – PS) ou 1% de casca de laranja desidratada e triturada (CT), acrescidos ou não de 50 mg/L de pectinase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). Como controle, as leveduras também foram cultivadas em 1% de galactose (GAL) ou 1% de glicose (GLI). Nesses cultivos, foram analisadas as curvas de crescimento e foram realizados ensaios de atividade pectinase ao término de 90 h de incubação. Através desses experimentos, foi possível observar que duas linhagens tiveram atividade pectinolítica >40 U/mL e que outras duas se destacaram quanto ao crescimento celular. Na sequência, buscando otimizar as condições sobre o desempenho fermentativo, foram realizados dois delineamentos tipo DCCR utilizando essas duas cepas que melhor cresceram (CHAP-070 e CHAP-074). Para o primeiro DCCR, as cepas foram cultivadas em meio YPGAL (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 0,5% de galactose) com variação de pH e concentrações variáveis da pectina comercial e da pectinase de *A. niger*. No outro DCCR, as cepas foram cultivadas em YPGAL com variação de pH e concentrações variadas de hidrolisado de pectina. Para esse estudo, houve pequenas concentrações de etanol produzidas através das cepas de leveduras testadas; entretanto, os resultados obtidos indicam os parâmetros testados não influenciaram na produção de etanol.

Palavras-chave: Ácido galacturônico; Fermentação; Galactose; Laranja; Pectina.

ABSTRACT

The large-scale production of orange juice results in large volumes of waste, mainly fruit peels, which are inappropriately discarded, causing environmental and economic problems. To solve this dilemma, it is proposed to use these residues in second-generation biorefineries, where microorganisms can metabolize the sugars present in this residual biomass, producing valuable compounds, such as ethanol. This integrated approach between sustainability and technology shows promise for optimizing industrial processes and reducing environmental impacts. Therefore, the present work aimed to analyze the biotechnological potential of yeasts isolated from decaying oranges and their capabilities concerning cell growth and enzymatic activity. Furthermore, through Central Composite Rotatable Design (CCRD), the possibility of ethanol production in media rich in pectin or pectin hydrolyzate was evaluated. To this end, 38 yeast strains were initially screened in microscale experiments in minimal media containing 6.7 g/L of yeast nitrogen base, with 20 g/L of the following monosaccharides added alternately: glucose, xylose, fructose, galactose, or galacturonic acid. All yeasts were able to grow using glucose, xylose, fructose, or galactose as carbon sources. In the medium containing galacturonic acid, only 13 strains grew. Through these microscale experiments, the maximum specific growth rate of yeasts was determined. The highest rates were observed in glucose, fructose, and galactose ($0.93\text{--}0.98\text{ h}^{-1}$). In galacturonic acid, the maximum specific growth rate found was 0.29 h^{-1} . For the agitated-flask cultures we carried out afterwards, 21 of these strains were chosen. In this case, the yeasts were subjected to YP media (1% yeast extract, 2% peptone, pH 7.0) containing, alternately, 1% crude pectin (obtained from orange peels in the present work – PB), 1% purified pectin (Sigma-Aldrich – PS) or 1% dehydrated and crushed orange peel (CT), with or without 50 mg/L of *Aspergillus niger* pectinase (Sigma-Aldrich). As a control, yeasts were also grown in 1% galactose (GAL) or 1% glucose (GLI). In these cultures, growth curves were analyzed, and pectinase activity assays were performed after 90 h of incubation. Through these experiments, it was possible to observe that two strains had pectinolytic activity $>40\text{ U/mL}$ and that two others stood out regarding cell growth. Next, to optimize the conditions for fermentative performance, two CCRD-type designs were carried out using the two strains that grew best (CHAP-070 and CHAP-074). For the first CCRD, the strains were cultivated in YPGAL medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 0.5% galactose) with varying pH and varying concentrations of commercial pectin and *A. niger* pectinase. In the other CCRD, the strains were grown in YPGAL with varying pH and varying concentrations of pectin hydrolyzate. For this study, small ethanol concentrations were produced by the tested yeast strains; however, the results indicated that the tested parameters did not influence ethanol production.

Keywords: Fermentation; Galactose; Galacturonic acid; Orange; Pectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação esquemática do aparato experimental utilizado no experimento..	50
Figura 2.2 – Curvas de crescimento em microescala obtidas para o ácido galacturônico.	56
Figura 2.3 – Perfis de crescimento celular das leveduras testadas em frascos com agitação...	58
Figura 2.4 – Atividade enzimática nos meios contendo pectina bruta nas temperaturas de 30°C (A) e 50°C (B).....	59
Figura 2.5 – Atividade enzimática nos meios contendo pectina sigma nas temperaturas de 30°C (A) e 50°C (B).....	60
Figura 3.1 – Curvas de crescimentos CHAP-070 e CHAP-074 nos meios com pectina sigma e hidrolisado de pectina.....	66
Figura 3.2 – Superfícies de resposta para produção de etanol considerando pH vs concentração de pectinase (A), concentração de pectina vs concentração de pectinase (B) e concentração de pectina vs pH (C) para a linhagem CHAP-070 em t=48h.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Fator de hidrólise de cada açúcar, ácido orgânico ou inibidor utilizado para integralizar o cálculo de celulose e hemicelulose.....	48
Tabela 2.2 – Cepas de leveduras isoladas de laranja em decomposição.	51
Tabela 2.3 - Composição físico-química da fração sólida obtida após o tratamento com ácido acético em base seca.	53
Tabela 2.4 - Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) calculada para cada uma das linhagens a partir dos dados experimentais de crescimento celular obtidos durante cultivos em microescala. Os dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes. Os valores mencionados no texto encontram-se em negrito.	55
Tabela 3.1 – Valores codificados e reais para cada variável do Delineamento Composto Central Rotacional realizado com a Pectina comercial da Sigma e a Pectinase de <i>Aspergillus niger</i>	64
Tabela 3.2 – Valores codificados e reais para cada variável do Delineamento Composto Central Rotacional realizado com hidrolisado de pectina.	65
Tabela 3.3 – Produção de etanol (mg/L) obtida nos diferentes meios de cultivos em diferentes tempos de coleta	67

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	13
Objetivo geral.....	13
Objetivos específicos.....	13
ESTRUTURA DO TRABALHO	14
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 INTRODUCTION.....	17
1.2 ORANGE WASTES: A PECTIN-RICH SUBSTRATE	18
1.3 BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ORANGE RESIDUES	19
1.3.1 Bioethanol production	21
1.3.2 Xylitol production	24
1.3.3 Organic acids	25
1.3.4 Phenolic compounds.....	26
1.3.5 POSs.....	27
1.4 BESIDES PECTIN: HEMICELLULOSE AND CELLULOSE EXPLORATION	28
1.5 IMPROVING BIOCONVERSION FROM PECTIN-RICH WASTES	30
1.5.1 Yeast genetic and metabolic engineering	30
1.5.2 Indigenous yeasts on fruits: transforming their substrate into bioproducts ..	35
1.5.3 Laboratory, semi-industrial, and industrial scale experiments	40
1.6 CONCLUSION	41
CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO COM OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO 42	
2.1 INTRODUÇÃO.....	42
2.2 METODOLOGIA.....	44
2.2.1 Caracterização resíduos de casca de laranja	44
2.2.1.1 Determinação do teor de umidade das frações sólidas.....	44
2.2.1.2 Determinação do teor de cinzas das frações sólidas	45
2.2.1.3 Determinação do teor de extrativos das frações sólidas.....	45
2.2.1.4 <i>Determinação do teor de lignina total, celulose e hemicelulose das frações sólidas.....</i>	<i>46</i>

2.2.1.5	Determinação de proteínas totais.....	48
2.2.1.6	Extração pectina	49
3.2.2	Triagem leveduras.....	50
3.2.3	Curvas de crescimento em frasco agitado.....	51
3.2.4	Ensaio de atividade enzimática.....	52
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.3.1	Composição cascas de laranja.....	53
3.3.2	Cultivo celular em microescala	54
3.3.3	Crescimento em frascos agitados	57
3.3.4	Atividade enzimática.....	59
3.4	CONCLUSÃO	61
4	CAPÍTULO 3: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	62
4.1	INTRODUÇÃO	62
4.2	METODOLOGIA	63
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.4	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS.....	69

INTRODUÇÃO GERAL

Citrus é um dos gêneros de frutas mais produzidos e exportados no mundo (Papoutsis *et al.*, 2019), sendo consumido *in natura* ou como produtos derivados. O Brasil é o terceiro maior produtor global de frutos frescos e transformados, atrás apenas da China e Índia (Da Silva *et al.*, 2014).

A Laranja Doce (*Citrus sinensis*) é a variedade mais produzida no Brasil, cultivada em todos os estados com uma área de mais de 800 mil hectares. A produção e o processamento de *Citrus sinensis* representam um mercado robusto, liderado pelo Brasil, principal produtor e exportador global (Kanashiro *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2017).

Atualmente, mais da metade da produção de sucos de frutas no mundo vem do Brasil. Consequentemente, é previsível um nível muito elevado de resíduos resultantes maioritariamente da indústria de processamento de sucos, que, no ano de 2011, atingiu cerca de 9,3 milhões de toneladas de resíduos (Kanashiro *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2015).

O descarte excedente e inadequado desses resíduos agroindustriais vem causando problemas de poluição ambiental, além de déficit comercial, visto que podem ser empregados em processos biotecnológicos e resultar em novos produtos de alto valor agregado para diversas áreas das indústrias, como as indústrias farmacêuticas e alimentícias (Goula; Lazarides, 2015).

Dentre os principais componentes da casca da laranja, a pectina tem lugar de destaque (Ayala *et al.*, 2021). A pectina é um heteropolissacarídeo de cadeia complexa contendo, dentre outros monossacarídeos, ácido galacturônico, galactose e glicose, açúcares que podem ser utilizados por microrganismos (Ma *et al.*, 2016). Como resultado da metabolização desses açúcares, ocorre a fermentação gerando etanol e outros compostos desejáveis para o mercado de diversas indústrias.

Uma área biotecnológica bastante promissora é a de biorrefinarias de segunda geração, que combina sustentabilidade e tecnologia, utilizando os resíduos agroindustriais como substratos para cultivo de microrganismos, produzindo biomoléculas para diversas aplicações (Fleuri *et al.*, 2014; Neethu *et al.*, 2015). Nestes ambientes industriais, vários resíduos agroindustriais e subprodutos da produção agrícola, incluindo cascas e bagaço de laranja, podem ser transformados em bioprodutos de alto valor agregado através do metabolismo de microrganismos, como a levedura (Fenner *et al.*, 2022; Neethu *et al.*, 2015; Tadioto *et al.*, 2022a).

Nos processos fermentativos utilizados na biorrefinarias, a espécie de levedura mais comumente utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua capacidade de tolerar estresse

osmótico e níveis extremos de pH. Essa espécie destaca-se também pela elevada produção de etanol no final dos processos fermentativos (Alves Jr *et al.*, 2022; Scapini *et al.*, 2023; Vargas *et al.*, 2023). Entretanto, sabe-se que a levedura *S. cerevisiae* não consegue metabolizar alguns carboidratos, como por exemplo o ácido galacturônico, que está presente nas cascas de laranja e também nas moléculas de pectina (Huisjes *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2020).

Desse modo, a prospecção de microrganismos capazes de hidrolisar os polissacarídeos e metabolizar os monossacarídeos obtidos após a hidrólise tem se apresentado como estratégia para otimizar processos em biorrefinarias (Albarelo *et al.*, 2023). As enzimas produzidas por essas leveduras são capazes de hidrolisar polissacarídeos complexos encontrados nos resíduos lignocelulósicos, convertendo-os em carboidratos mais simples (dissacarídeos ou monossacarídeos) que são fermentáveis (Alves *et al.*, 2019). Desse modo, prospectar leveduras que consigam produzir enzimas capazes de quebrar cadeias complexas é de grande interesse comercial e industrial, visto que essas enzimas possuem valor elevado e também podem otimizar os processos das biorrefinarias (Ma *et al.*, 2016)

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar o potencial biotecnológico de leveduras isoladas de laranjas em decomposição e analisar suas capacidades em relação ao crescimento celular, atividade enzimática e de produção de etanol em meios com pectina e diferentes açúcares pécicos.

Objetivos específicos

- a. Caracterizar físico-quimicamente resíduos de casca de laranja;
- b. Realizar uma triagem de cepas de leveduras isoladas de laranjas em decomposição;
- c. Avaliar os perfis de crescimento celular e as atividades pectinolíticas de leveduras selecionadas na triagem;
- d. Avaliar o efeito do pH e das concentrações de pectina e pectinase sobre a produção de etanol por meio de delineamentos experimentais.

ESTRUTURA DO TRABALHO

A fim de atingir os objetivos definidos, este trabalho foi estruturado no formato de dissertação contendo artigos, como previsto pelo Ato Deliberativo N° 01/PPGATS/UFFS/2017, contendo os seguintes tópicos:

- (i) Capítulo 1: Apresenta um artigo de revisão bibliográfica intitulado “Transforming Orange Waste with Yeasts: Bioprocess Prospects”. Essa revisão analisa como os resíduos de laranja podem ser usados como matéria-prima de biorrefinaria para produzir diferentes bioprodutos utilizando leveduras como principais biocatalisadores;
- (ii) Capítulo 2: Os resultados obtidos durante este trabalho de dissertação são apresentados no formato de um artigo científico a ser submetido para publicação em periódico indexado na *Web of Science*;
- (iii) Capítulo 3: Apresenta os dados obtidos através de dois delineamentos experimentais que analisam os efeitos da disponibilidade de pectinase, da variação de pH e da concentração de substrato.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

Artigo publicado na Revista Brasileira de Ciências Ambientais | v.59 | e1859 | 2024

Transforming Orange Waste with Yeasts: Bioprocess Prospects

Transformando Resíduos de Laranja com Leveduras: Perspectivas de Bioprocessos

Gabriel do Amaral Minussi^{1,2}, Angela Alves dos Santos^{1,2}, Thamarys Scapini³, Charline Bonatto⁴, Eduardo Dias Fenner^{1,2}, Aline Perin Dresch⁵, Bruna Caline Sampaio dos Santos⁵, João Paulo Bender⁵, Sérgio Luiz Alves Jr.^{1,2,*}

¹Laboratory of Yeast Biochemistry, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó/SC, Brazil

²Graduate Program in Environment and Sustainable Technologies, Federal University of Fronteira Sul, Cerro Largo/RS, Brazil

³Graduate Program in Bioprocess Engineering and Biotechnology, Federal University of Paraná, Curitiba/PR, Brazil

⁴Laboratory of Microbiology and Bioprocesses, Federal University of Fronteira Sul, Erechim/RS, Brazil

⁵Laboratory of Solid Wastes, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó/SC, Brazil

*To whom correspondence should be addressed: slalvesjr@uffs.edu.br

Abstract

To make the circular economy a reality, developing ways of transforming waste into valuable products is mandatory. In this context, investigating the biotechnological potential of different residues is most welcome. This review analyzes how orange waste can be used as biorefinery feedstock to produce different bioproducts using yeasts as the major biocatalysts. In addition to the current orange market, its pectin-rich biomass is described in detail, aiming to elucidate how yeast cells can convert it into ethanol, xylitol, polyphenols, and organic acids (some of them, volatile compounds). Genetic, metabolic, and evolutionary engineering are also analyzed as biotechnological tools to improve the already existing processes. Finally, this review also addresses the potential employment of fruit-dwelling yeasts in biorefining pectin-rich biomasses such as orange wastes. All the data herein presented lead to the conclusion that these residues could already be used for noble purposes.

Keywords: Biomass, Pectin, Sugar, Fermentation, Bioproducts

Resumo

Para tornar a economia circular uma realidade, é obrigatório desenvolver formas de transformar resíduos em produtos de valor. Neste contexto, investigar o potencial biotecnológico de diferentes resíduos é bastante desejável. Esta revisão analisa como os resíduos de laranja podem ser usados como matéria-prima de biorrefinaria para produzir diferentes bioprodutos utilizando leveduras como principais biocatalisadores. Além do mercado atual da laranja, sua biomassa rica em pectina é descrita detalhadamente, visando elucidar como as células de levedura podem convertê-la em etanol, xilitol, polifenóis e ácidos orgânicos (alguns deles, compostos voláteis). As engenharias genética, metabólica e evolutiva também são analisadas como ferramentas biotecnológicas para melhorar os processos já existentes. Finalmente, esta revisão também aborda o potencial emprego de leveduras isoladas de frutas no biorrefinamento de biomassas ricas em pectina, como resíduos de laranja. Todos os dados aqui apresentados levam à conclusão de que esses resíduos já poderiam estar sendo aproveitados para fins nobres.

Palavras-chave: Biomassa, Pectina, Açúcar, Fermentação, Bioprodutos.

1.1 INTRODUCTION

The vast majority of the countries on all continents signed the Paris Agreement, thus compromising to reduce carbon dioxide emissions. In fact, to meet such an idealized agreement, CO₂ emissions must be reduced by 43% by 2030 (United Nations Climate Change, 2023). Although this goal frequently appears in many politicians' speeches, the truth is little has been done for it to be reached. Undoubtedly, without a fast and disruptive change of our linear economy model to a circular one, humanity will not avoid the serious consequences of severe climate change.

Ironically, the countries that historically have contributed less to the greenhouse effect suffer the most from climate change and are most likely to reverse this catastrophic scenario. This is the case of Brazil, whose energetic matrix is majorly renewable, besides having a huge potential to put a circular economy into practice. This is especially due to the possibility of employing its commodities production residual chain into second-generation bioprocesses (Alves *et al.*, 2023).

Orange is one of the leading Brazilian commodities. In the Systematic Survey of Brazilian Agricultural Production, carried out by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (2022), Brazil produced 16.9 million tons of orange in 2022. According to the Brazilian Ministry of Agriculture, around 80% of this production results in industrialized juices, with the European Union as their primary buyer. More than 67% of orange juice worldwide production happens in Brazil, which places the country in the spotlight for orange production and processing (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021). However, around 50% of the mass of processed fruits consists of waste, including peels, pomace, and seeds (de la Torre *et al.*, 2019; Gaiand, 2017; Šelo *et al.*, 2021).

However, as a negative impact, all this production accounts for the country's fourth-largest generation of residual biomass. According to the National Solid Waste Plan (Ministry of Environment, 2022), orange cultivation generates 8.8 million tons of waste annually in Brazil. This amount is behind only sugarcane (201.4 million tons of waste generated annually), soybeans (41.8 million tons/year), and corn (29.4 million tons/year). Orange waste, however, unlike the other three mentioned, ends up being underused. This is mainly due to its high moisture content and the high cost of drying, which makes transportation and storage difficult and makes it unfeasible to burn it to generate heat or electrical energy. Obviously, this waste can be destined for composting, where it increases the organic load of the soil and functions as

a source of nutrients. However, this alternative can reduce the soil's pH, negatively affecting the process (Ruiz and Flotats, 2014). Because of this, the pomace and peel of this fruit, when used, are primarily intended only for dietary supplementation for cattle and goats (Guzmán *et al.*, 2020; Oloche *et al.*, 2019). Controversially, though, this biomass imparts a bitter taste to animal food, and studies in the literature point to a potential generator of diseases in cattle (Bampidis and Robinson, 2006; de la Torre *et al.*, 2019).

On the other hand, these residues can fortunately have much more profitable and environmentally sustainable destinations if used in second-generation (2G) biorefineries. In these industrial environments, several agro-industrial wastes and by-products of agricultural production, including orange peels and pomace, can be transformed into a myriad of bioproducts through the metabolism of microorganisms such as yeast (Scapini *et al.* 2023b; Tadioto *et al.* 2022; Fenner *et al.* 2022). In this context, this review presents the state of the art and analyzes the biotechnological potential of orange waste in 2G biorefineries with fermentative processes driven by yeast. Literature was searched on the basis of previous studies and experiences of the authors, who have been working in the field for the last few years. The references were chosen according to their relevance to this study's subject. Also, foundational articles were sometimes used as jumping-off places, leading to more recent articles that cited them.

1.2 ORANGE WASTES: A PECTIN-RICH SUBSTRATE

Orange waste contains biopolymers and bioactive compounds, such as proteins, carbohydrates, lipids, lignin, polyphenols, and natural dyes, which can be recovered and applied in the production of food, pharmaceutical products, and cosmetics. Furthermore, some of these components can be converted into several high-value chemical products, such as bioplastics, functional materials, and biofuels (Fazzino *et al.*, 2021; Talekar *et al.*, 2023). Oranges also display several bioactive phenolic compounds such as hesperidin, naringin, quercetin, rutin, gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, and chlorogenic acid (Ortiz-Sanchez *et al.*, 2023; Singh B. *et al.*, 2020; Vadalà *et al.*, 2023). These compounds can benefit human health, mainly because they have antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and antidiabetic activities (Andrade Barreto *et al.*, 2023; Ortiz-Sanchez *et al.*, 2023).

On the other hand, to transform fruit waste into different bioproducts from the metabolism of yeast cells, attention must be paid to the carbohydrates present in these substrates, initially in the form of three polysaccharides: cellulose, hemicellulose, and pectin, whose concentrations vary according to the source of biomass used (Scapini *et al.*, 2023a). On average, orange residues are composed (on dry-weight basis) of 18.1% of cellulose, 13.1% of hemicellulose, and 28.5% of pectin (Vadalà *et al.*, 2023).

Cellulose is a homopolysaccharide of glucose, and hemicellulose is a heteropolymer whose composition varies according to the plant species, although it is mostly represented by xylan, a polysaccharide of xylose. Pectin, in turn, is formed by a linear chain of galacturonic acid molecules (which may or may not be methylated) linked together through β -1,4 glycosidic bonds, from which branches chains composed mainly of galactose, rhamnose, arabinose, and xylose (Figure 1.1) (Bai *et al.*, 2019; Brandon and Scheller, 2020; Zdunek *et al.*, 2021). The percentage of pectin tends to be lower in the so-called lignocellulosic biomasses, such as the woody structures of trees and sugarcane residues, and higher in residual biomasses such as fruit bagasse and peels (especially orange), as stated above. These residual biomasses are, therefore, called pectin-rich biomasses. In them, the lignin content hardly exceeds 2% of the dry weight, which makes their pretreatment (the process prior to hydrolysis and fermentation) more economical than that of lignocellulosic biomasses, where the percentage of lignin can exceed 30% (Paliga *et al.*, 2022; Venkatanagaraju *et al.*, 2020).

1.3 BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ORANGE RESIDUES

For the sugars available in residual plant biomasses to be metabolized by yeast cells, the polysaccharides must be initially hydrolyzed. Several alternatives to this initial process, also called saccharification, have been proposed to improve the availability of carbon sources for fermentation. However, the method currently recognized as the most viable does not only seek the hydrolysis of biomass separately from the fermentation process, but rather the combination of both, which is known as Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). SSF allows sugars released with the hydrolysis of polysaccharides to be readily metabolized by microbial cells (Panda and Maiti, 2023). In contrast, the conventional separate hydrolysis and fermentation (SHF) process allows the introduction of an intermediate detoxification step. This

step aims to remove possible inhibitors, optimizing the operational conditions independently for each stage of the process (Widmer *et al.*, 2010).

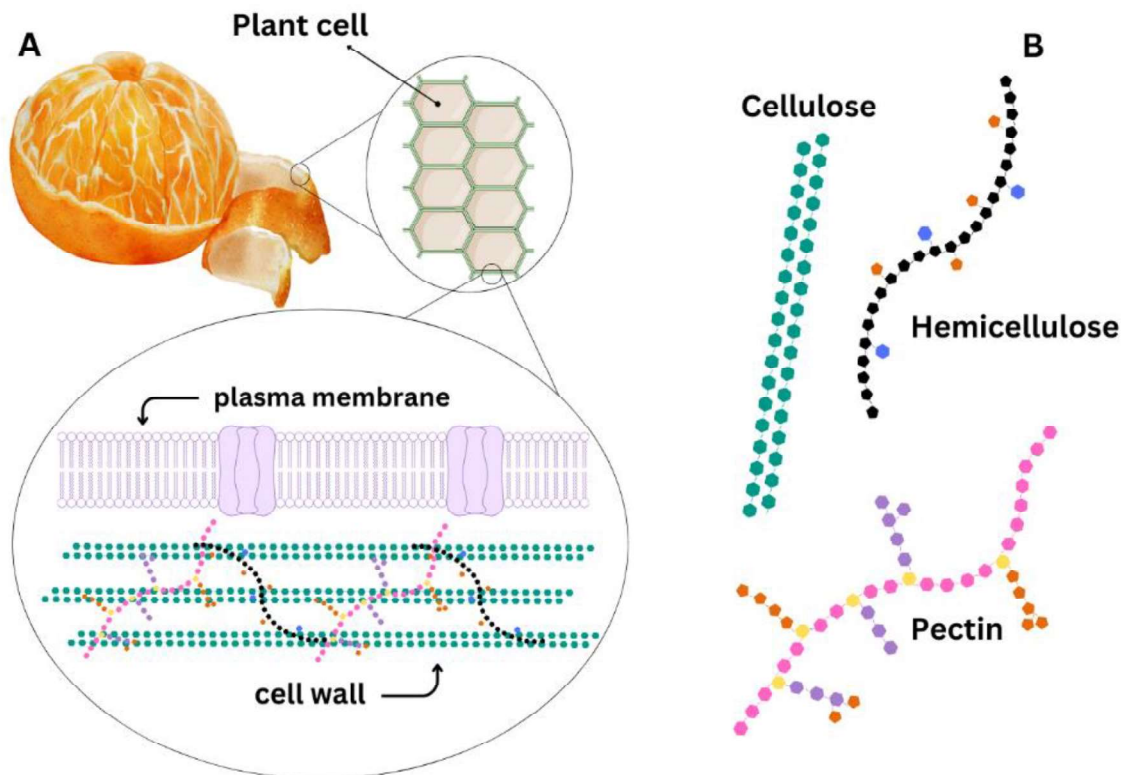


Figure 1.1. Plant cell walls' polysaccharides. (A) Cellulose, hemicellulose, and pectin are interconnected in orange peel's plant cell walls. (B) Cellulose is a homopolysaccharide of glucose (green hexagons), and hemicellulose has a main branch of xylose (black pentagons) in which arabinose (orange pentagons) and glucuronic acid (blue hexagons) molecules are attached. Pectin is mainly composed of galacturonic acid (pink hexagons), rhamnose (yellow hexagons), galactose (purple hexagons), and arabinose (orange pentagons). Adapted from Bai *et al.* (2019), Brandon and Scheller (2020), Cosgrove (2005), Phyto *et al.* (2017) and Zdunek *et al.* (2021).

Although the chemical hydrolysis of polysaccharides is possible, enzymatic methods have been more widely used due to higher yields and less formation of toxic products (Bonatto *et al.*, 2023). Cellulose and xylan hydrolysis have been extensively studied, given the interest in enabling ethanol production from lignocellulosic residues such as straw and sugarcane bagasse (by-products of first-generation ethanol production), which have negligible concentrations of pectin. On the other hand, assuming the use of residual fruit biomass, the pectin concentration is significantly higher, as already pointed out above. In this case, the hydrolysis of this last polysaccharide becomes predominant in enabling the desired biotransformation (Scapini *et al.*,

2023c). However, it is important to highlight that the enzymatic hydrolysis of xylan present in orange residues can be harnessed to generate Xylooligosaccharides, molecules with great potential as functional food ingredients (Ávila *et al.*, 2020; Martins and Goldbeck, 2023). In this context, for example, Martins and Goldbeck (2023) demonstrated that the integration of pectin production, Xylooligosaccharides, and bioenergy (with biogas production from free sugars and cellulose) could be an alternative to achieve the economic viability of orange waste-based biorefineries (see section 4).

In the Fungi kingdom, pectin hydrolysis depends on the synergistic action of enzymes that, together, are called pectinases, namely polymethylgalacturonate esterase, polygalacturonate lyase, endo-polygalacturonase, and exo-polygalacturonase. While the first removes the methyl ester groups from galacturonic acid, the last three are responsible for depolymerization. Endo-polygalacturonase promotes internal breaks randomly, and exo-polygalacturonase breaks from the ends of the pectin molecule. Polygalacturonate lyase catalyzes the cleavage of β -1,4 bonds in an endo or exo manner by trans elimination. The total hydrolysis of pectin releases especially the monosaccharides D-galacturonic acid, D-galactose, L-rhamnose, L-arabinose, and D-xylose (Bassim Atta and Ruiz-Larrea, 2022; Paliga *et al.*, 2022; Satapathy *et al.*, 2020).

After hydrolysis, the yeast employed in the process must be capable, as already mentioned, of metabolizing the sugars arising from the breakdown of polysaccharides. Depending on the metabolic routes they will follow, the products obtained can differ, as described below.

1.3.1 Bioethanol production

A profitable and environmentally sustainable destination for the residual orange biomass is the production of second-generation ethanol (2G ethanol). This residual plant biomass is rich in pectin, a heteropolysaccharide that, when hydrolyzed, mainly releases the sugars galacturonic acid, galactose, rhamnose, arabinose, and xylose (Paliga *et al.*, 2022). Therefore, ethanol production from this substrate depends on the action of microorganisms capable of metabolizing the a forementioned carbohydrates via fermentation.

D-galacturonic acid is the primary pectic sugar, accounting for approximately 70% of pectin (Frempong *et al.*, 2022; Grassino *et al.*, 2018; Vaez *et al.*, 2021). Within the Kingdom Fungi (which includes yeasts), the metabolism of this hexose initially depends on its reduction to L-galactonate, in a reaction catalyzed by the enzyme galacturonate reductase, which depends on the coenzymes NADPH or NADH as electron donors (Figure 2). Subsequently, galactonate dehydratase generates 2-keto-3-deoxy-L-galactonate, which is later converted to pyruvate and L-glyceraldehyde by the enzyme deoxygalactonate-aldolase (Biz *et al.*, 2016; Richard and Hilditch, 2009). While L-glyceraldehyde is reduced to glycerol by glyceraldehyde reductase, pyruvate can be (a) transformed into Acetyl-CoA and enter the Krebs Cycle if the metabolism is respiratory or (b) decarboxylated to acetaldehyde, which is finally reduced to ethanol, through alcoholic fermentation. In addition to these enzymes, for yeasts to metabolize galacturonic acid, a transporter must also be present on their plasma membrane (Protzko *et al.*, 2019).

Among the pectic sugars, the most widely fermented by yeast is D-galactose. For galactose to be metabolized, it initially enters cells through membrane transporters of the *HXT* family. In the cytoplasm, this hexose is converted to glucose-6-phosphate via the Leloir Pathway. This pathway comprises three sequential reactions: phosphorylation of galactose by galactokinase, generating galactose-1-phosphate, which is subsequently isomerized, by galactose-uridylyltransferase, to glucose-1-phosphate, which, finally, is converted to glucose-6-phosphate in a reaction catalyzed by phosphoglucomutase (Leloir, 1951; van Maris *et al.*, 2006). Glucose-6-phosphate then follows the glycolytic pathway until pyruvate, which ends up being converted to ethanol during alcoholic fermentation (Figure 2).

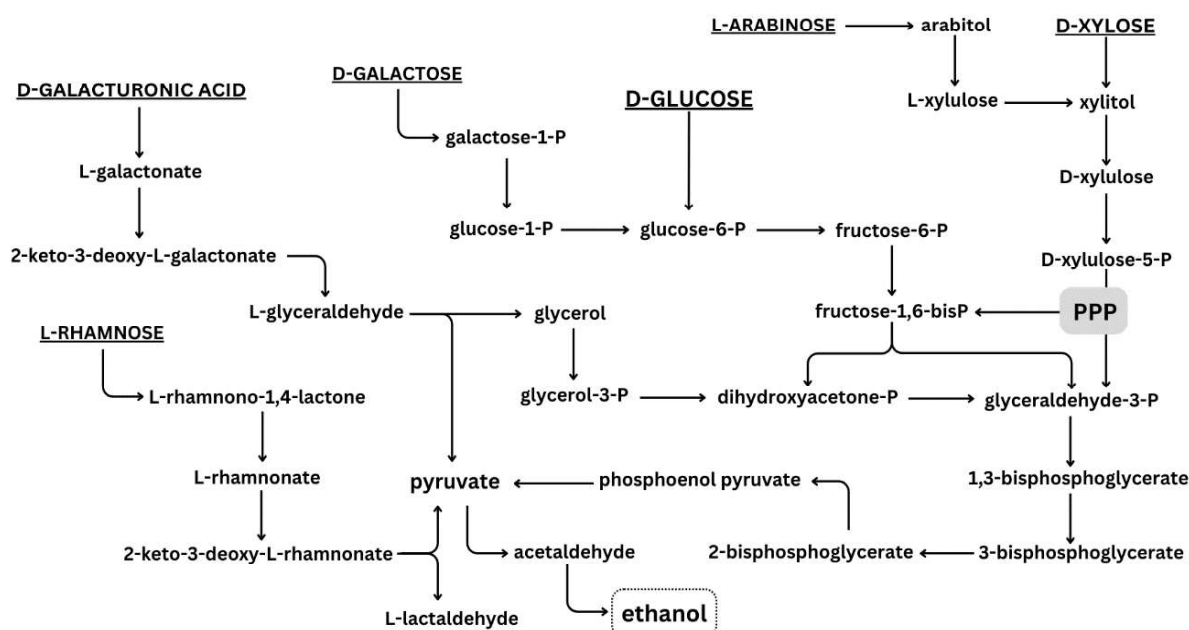


Figure 1.2. Yeast metabolic pathways from the main sugars in orange waste to ethanol. The most prevalent monosaccharides in cellulose, hemicellulose, and pectin are in underlined uppercases. Phosphate groups in each molecule are represented by “P”. The acronym PPP stands for the pentose-phosphate pathway.

Unlike most sugars, L-rhamnose and L-arabinose are more common in nature than their D isomers. In yeast capable of metabolizing L-rhamnose, it is initially oxidized by the enzyme rhamnose dehydrogenase to L-rhamnon-1,4-lactone, which is subsequently converted to L-rhamnonate by rhamnon-lactonase (Figure 2). This second product of the pathway is then dehydrated by rhamnonate dehydratase, generating 2-keto-3-deoxy-L-rhamnonate, which is finally cleaved into pyruvate and lactaldehyde by an aldolase (Twerdochlib *et al.*, 1994). Although L-arabinose is a pentose metabolized by a large number of yeast species, few of them are capable of fermenting it (i.e., they preferentially respire this sugar), and this fermentation is generally of low yield (Dien *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 1981). In these yeasts, L-arabinose is initially reduced to L-arabitol, which is then oxidized to L-xylulose by the action of arabinose reductase and arabinitol dehydrogenase, respectively (Figure 2). L-xylulose is isomerized to D-xylulose in two sequential reactions catalyzed by the enzymes xylulose reductase and xylitol dehydrogenase. Finally, D-xylulose, after being subsequently phosphorylated, enters the Pentose-Phosphate Pathway (PPP) to generate Glycolytic-Pathway intermediates and, subsequently, ethanol from pyruvate (Stambuk *et al.*, 2008).

Indeed, several studies have shown that it is feasible to produce ethanol from orange wastes. Oberoi *et al.* (2010), for example, succeeded in producing ethanol from orange peel

powder (OPP) with a yield of 0.46 g/g on a substrate-consumed basis and a volumetric productivity of 3.37 g/L/h. Interestingly, the authors submitted the OPP to two subsequent acid hydrolysis processes at an optimum pH of 5.4 and temperature of 34°C. Similarly, Joshi *et al.* (2015) obtained 41 g/L of ethanol from 380 g/L of total carbohydrate after a 48-h fermentation with an inoculum size of 20% (v/v) with the strain *Saccharomyces cerevisiae* NCIM3495. However, despite the high ethanol titer achieved, it should be noted that the amount of available sugar could have rendered an even higher final product's amount. The same holds for the results found by Jha *et al.* (2019), whose fermentations did not allow more than 50% of the sugar available to be consumed, and by Vadalà *et al.* (2023), who observed that ~14% of citrus-waste hydrolysate sugar content was not consumed by yeast cells. This incomplete sugar conversion is probably due to the incapacity of *S. cerevisiae* to ferment many of the orange biomasses' sugars. Fortunately, many strategies to overcome this issue have been developed, as addressed in section 4.

1.3.2 Xylitol production

Among sugars found in orange wastes, D-xylose is one of the best studied. As well as other monosaccharides, xylose initially needs to be transported from the extracellular environment to the interior of yeast cells to enable fermentation. Once inside the cell, this pentose must be reduced to xylitol, which is then oxidized to xylulose before following the PPP (Figure 2). However, for yeast cells to efficiently ferment xylose, there must be a redox balance in these first two reactions of xylose metabolization, which are catalyzed by Xylose reductase (XR) and Xylitol dehydrogenase (XDH), respectively. While the latter uses NAD^+ as a coenzyme (which is reduced to NADH), the former can make use of both NADH and NADPH (which are oxidized to NAD^+ or NADP^+), depending on the isoenzyme present. In those yeasts whose XR uses a coenzyme different from XDH, an imbalance may interrupt the metabolization of xylose so that yeast cells end up accumulating xylitol (Alves *et al.*, 2022).

Xylitol is a five-carbon polyol classified as a natural sweetener (Lenhart and Chey, 2017). Therefore, this compound can also be applied in areas of extreme importance for human subsistence, such as the food and pharmaceutical industries (Kumar *et al.*, 2022). It also helps

prevent cavities, osteoporosis, and infections, and there are also reports of anti-cancer effects (He *et al.* 2021; Xu *et al.* 2019).

The demand in the xylitol market is growing, requiring this product to be obtained in a sustainable and economical way, as it is produced by the chemical hydrogenation of xylose, which is highly expensive (Grembecka *et al.*, 2014). To reduce high costs, several biotechnological methods for generating xylitol from lignocellulosic and pectic biomass from fruit waste have been studied (Mathew *et al.*, 2018). Many wild yeasts have the potential to accumulate xylitol from the xylose available to the cells. In fact, since several yeasts display the redox imbalance mentioned above, yeast-based xylitol production may become a trend in the biorefinery context (Albarelo *et al.*, 2023; Tadioto *et al.*, 2022; Vargas *et al.*, 2023).

1.3.3 Organic acids

Organic acids are a group of mostly weak acids whose solubility in water relies on the size of their hydrocarbon chain (the smaller, the easier to soluble). They can be produced naturally by the living beings. These acids are high-value-added products with important applications in the food, pharmaceutical, and chemical industries. The impacts of producing these compounds, which are primarily made from fossil resources, have instigated the development of biotechnological routes, since they are more sustainable, less harmful to the environment, and economically more viable than the conventional method. Metabolic engineering and synthetic biology are biotechnological tools employed to develop high-performance microorganisms capable of producing organic acids with high conversion rates (Du *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017).

The microbial production of organic acids has some obstacles in its synthesis, as bacteria are normally not tolerant to low pH conditions, which often makes industrial processes very costly. Yeasts naturally have greater resistance to acidic pH, but their yield in the process is lower. As a result, several studies have been seeking a more sustainable way to produce organic acids, and one of the ways is to use fruit waste as biomass as feedstocks (Hong *et al.*, 2012; Tran and Zhao, 2022).

Some examples of organic acids that are part of the wide range of chemical products in different types of industries are Citric Acid (used as a food additive), Lactic Acid (production

of polymers, drinks, and foods), Acetic Acid, better known as vinegar (solvent and polymers), Succinic Acid (as building blocks and as a replacement for anhydrous maleic acid), Oxalic Acid (complexing agent) among many others. Most studies present the production of these compounds using the yeast *S. cerevisiae* (Panda *et al.*, 2016).

1.3.4 Phenolic compounds

Phenolic compounds are described as bioactive substances, that is, compounds that provide health benefits and are present in different fruits and vegetables. The quantity and structure of these compounds vary according to the plant matrix, being more present in fruit seeds than in their edible portions (Rabetafika *et al.*, 2014; Soong and Barlow, 2004). In foods and beverages, phenolic compounds are directly linked to attributes such as color, bitterness, astringency, aroma, and oxidative stability (Angelo and Jorge, 2007).

One of the options for managing fruit processing industry waste is the recovery of bioactive compounds in the byproducts. Oranges stand out due to their high global consumption and a significant amount of bioactive compounds such as hesperidin, naringin, naringenin, and quercetin — substances that can be applied in the food, cosmetic, and mainly pharmaceutical industries (Fierascu *et al.*, 2020; Madeira and Macedo, 2015). Among these compounds, flavonoids constitute the main subgroup, and their antioxidant activity has been reported in several studies (Babbar *et al.*, 2015; Jayaprakasha *et al.*, 2001; Soong and Barlow, 2004; Romero-Díez *et al.*, 2018). The flavonoids most present in citrus fruit residues are naringin and hesperidin, presenting many health benefits such as the ability to prevent cancer, suppress carcinogenesis, and induce cell apoptosis (Meiyanto *et al.*, 2012).

Fruit waste has a highly diverse microbiota. Yeasts have been isolated from these substrates and being applied in fermentation processes precisely on these residues, as they can metabolize the available carbohydrates and generate distinct phenolic compounds (Makopa *et al.*, 2023; Noori *et al.*, 2022). Bioactive compounds are naturally present in fruits, so just consuming them is beneficial for people. However, studies have reported that the bioaccessibility (absorption capacity of the human body's gastrointestinal system) of these compounds is higher after yeast fermentation, facilitating their access to systemic circulation. With this in mind, scientists are working to ensure that these microorganisms act on waste recovery to increase the production of phenolic compounds (Coelho *et al.*, 2021; Macêdo *et al.*,

2023; Stinco *et al.*, 2020). Indeed, the growing demand for these compounds cannot be supplied by purifying them from plant sources, requiring larger-scale production, which can be fulfilled through the fermentation of wastes by yeast (Tadioto *et al.*, 2023).

1.3.5 POSs

Although the complete hydrolysis of a given polysaccharide is usually the primary goal (once free monosaccharides are more easily converted into fermentation products), sometimes a partial depolymerization may be desirable. This is the case of Pectin Oligosaccharides (POSs), which are obtained through incomplete pectin hydrolysis processes. Depending on the pectin source, POSs may include products such as oligogalacturonides, galactooligosaccharides, arabinooligosaccharides, rhamnogalacturonooligosaccharides, and arabinogalactooligosaccharides (Concha Olmos and Zúñiga Hansen, 2012; Gómez *et al.*, 2016; Gullón *et al.*, 2013).

Because of their lower mass and lower degree of polymerization, POSs display better water solubility and, consequently, higher bioavailability than natural pectin (Kong *et al.*, 2023). In fact, recent papers have shown different human health benefits after POSs consumption, namely prebiotic effect and antioxidant and anti-inflammatory properties. Since they can be metabolized by beneficial gut bacteria, POSs stimulate these microorganisms' growth which improves the host immune system (Babbar *et al.*, 2016; Montilla *et al.*, 2022). POSs have also been linked to improvements in cholesterol and glucose blood levels, toxins binding and removal, and anticancer and antimetastatic effects (Minzanova *et al.*, 2018; Singh R.P. *et al.*, 2020; Zaitseva *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2019).

Interestingly, yeast can also work in the production of POSs through their pectin lyases, which cleave pectin glycosidic bonds at the fourth carbon, releasing hydrogen from the fifth carbon, and producing unsaturated 4,5-unsaturated oligogalacturonides (Yadav *et al.*, 2023). Pectin lyase activity has been reported in the following yeast species: *Pichia pinus* (Moharib *et al.*, 2000), *Cystofilobasidium capitatum* (Nakagawa *et al.*, 2005), *Kluyveromyces wickerhamii*, *Stephanoascus smithiae*, *Pichia anomala* (da Silva *et al.*, 2005), *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, and *Pichia kudriavzevii* (Haile and Kang, 2019). Additionally, genetically-engineered *Pichia pastoris* strains have shown to be well-succeeded in POS

production, yielding oligogalacturonides (Yang *et al.*, 2020) and rhamnogalacturonan (Normand *et al.*, 2012) as major products.

1.4 BESIDES PECTIN: HEMICELLULOSE AND CELLULOSE EXPLORATION

In addition to the abundant pectin structure found in orange waste, there is a broader scenario where cellulose and hemicellulose structures can be explored. These structures constitute the matrix of the waste (Figure 1) and offer potential for conversion into bioproducts of interest, expanding the possibilities beyond pectin (Patsalou *et al.*, 2020; Tsouko *et al.*, 2020). For example, Patsalou *et al.* (2020) investigated the conversion and recovery of four bioproducts from citrus waste: essential oils, pectin, succinic acid, and fertilizer.

In this scenario, the remaining solids rich in hemicellulose and cellulose can be recovered and utilized as raw material in other integrated pathways. The composition is abundant in sugars such as glucose, xylose, and arabinose, which can be converted into high and medium value-added bioproducts. These integrated conversion scenarios are noteworthy in the industrial sector due to the volume and characteristics of the waste generated. Citrus waste, owing to its high carbohydrate and low lignin content, can be exploited for biofuel and bioproducts production without requiring pretreatments with high concentrations of chemicals and substantial energy consumption. Consequently, pectin-free solid waste can be used to produce food additives, organic acids, biofuels, and agricultural inputs. Thus, assessing consecutive routes for producing bioproducts from this waste can be an approach to make these processes economically viable on a large scale.

Oligosaccharides can be derived from the hydrolysis of the hemicellulose structure present in orange waste. Similarly to what has been described above for POSs, these hemicellulose-derived oligosaccharides are prebiotics of significant interest in the food industry and can be prepared through autohydrolysis, acid hydrolysis, or enzymatic hydrolysis of the hemicellulose-rich fraction (Cho *et al.*, 2020; Martins and Goldbeck, 2023). Therefore, following the extraction of pectin, it is feasible to explore this conversion route. The hydrothermal process for extracting the pectin structure has been previously reported to preserve 60% of the xylan content, enabling enzymatic conversion to xylooligosaccharides (XOS). This process also facilitates the conversion of solid waste into energy, allowing for the

design of a self-sufficient plant in accordance with the principles of the circular economy and biorefineries (Martins and Goldbeck, 2023).

The utilization of this waste in the biofuel production chain is a viable strategy, primarily due to the high carbohydrate that remains in the solid residue. Biohydrogen, biogas and ethanol are among the most explored processes. Saadatinavaz *et al.* (2021) evaluated citrus waste for possible production routes of biomethane, acetone, butanol, biohydrogen, ethanol, acetic acid, and butyric acid. Hydrothermal pretreatment unit operations were common to all routes, and under optimized conditions, the prediction was a production of 4,560 kJ of energy through sustainable processes (Saadatinavaz *et al.*, 2021). Additionally, in an integrated context, pectin, bioethanol, and methane were produced from citrus waste, enhancing the total economic value of the products by 75 times compared to the approach of managing the waste solely for anaerobic digestion (Vaez *et al.* 2021).

In addition to bioenergy, the pectin-free solid residue can be exploited for conversion into various bioproducts. Recently, researchers utilized these residues to produce natural red colorant using the fungus *Talaromyces amestolkiae* (titer 2.75 g/L) (Lima *et al.*, 2023). The enzymatic production of xylanases and cellulases was also evaluated, offering a potential route for recovery (Lima *et al.*, 2023). Another innovative approach for this waste involves its conversion into bioplastics. A recent study explored this scenario using a cyanobacterial culture, demonstrating that citrus waste hydrolysates could serve as an alternative culture medium for polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation (Mishra and Panda, 2023). Arabino-oligosaccharides, glucose-rich hydrolysate, and polylactic acid (PLA) have also been successfully obtained from different fractions of citrus waste (tangerine peel) (Jang *et al.*, 2022). Additionally, bacterial cellulose has been obtained from pectin-free citrus waste, with the remaining solid predominantly composed of cellulose and hemicellulose (Tsouko *et al.*, 2020). Alternatively, non-biological conversion processes, such as the development of biofilms using residual pulp and peels post hydrothermal pre-treatment of the waste, have been explored as well (Santos *et al.*, 2023).

Integrating processes to obtain various bioproducts presents an interesting alternative for orange waste. After pectin removal, the remaining solids, typically rich in cellulose and hemicellulose, offer endless possibilities. Whether through thermal, chemical, or enzymatic hydrolysis, these pathways can provide alternative routes for obtaining a diverse range of

bioproducts and bioenergy. The scalability of these processes on an industrial level not only reduces waste generation but also establishes ecologically sustainable processes.

1.5 IMPROVING BIOCONVERSION FROM PECTIN-RICH WASTES

Despite the vast potential of orange waste as feedstock for multiproduct biorefineries, some challenges must be overcome to achieve highly efficient conversion of orange residues into valuable products. In this sense, the biotechnology field displays some tools that may offer improved alternatives according to the bioprocess aim. Interestingly, many of these improvements can be reached by engineering or prospecting the biocatalysts. The following sections address some of these strategies, considering yeasts as the main employed biocatalyst. It should be noted, though, that due to the limitation of optimization studies with oranges, other fruits were considered in this review, considering that they are all plant-waste material and pectin-rich biomasses. We are thus assuming that these similarities allow us to extrapolate many of the advances obtained with other fruits' waste to the orange residue scenario.

1.5.1 Yeast genetic and metabolic engineering

Genetic and metabolic engineering is a framework in scientific development and plays a key role in the global bioeconomy. In the bioprocess scenario, this field has been essential for the production of biofuels and biochemicals through the development of cell factories, which are engineered microorganisms that have had genes deleted or overexpressed with different objectives, e.g., tolerance to adverse compounds and conditions or production of more than one product of interest (Cámara *et al.*, 2022). The development of cell factories capable of efficiently fermenting complex streams (e.g., hydrolysates of vegetal biomass) and the possibility of developing new production routes of compounds (as alternatives to chemical routes) may be a strategy to improve the cost-effectiveness of microbial conversion processes (Table 1) (Cámara *et al.*, 2022; Yin *et al.*, 2020).

One of the fields where genetic engineering is heavily exploited is the development of robust strains for biofuel production. Plant-residual biomasses are widely available renewable resources and viable alternatives for the development of biorefinery processes. However, a

pretreatment step is essential to break the recalcitrant structure of these biomasses into cellulose, hemicellulose, and pectin in order to improve enzyme access and saccharide solubilization. This initial stage leads to the formation of inhibitory compounds, which include weak acids and furan aldehydes (Vanmarcke *et al.*, 2021). In this sense, to ensure a sustainable process, integrating research has been developed to identify determinants of tolerance, (over)expression of genes involved in the tolerance response, and the use of a robust microorganism capable of tolerating these stressors, which includes genetic engineering (Baptista *et al.*, 2021). Noteworthy, Cámara *et al.* (2022) carried out a huge data mining process of *S. cerevisiae* mutants (designed to increase tolerance to inhibitory compounds) that led to overexpression or deletion of approximately 4,000 unique genes, mostly for tolerance to compounds such as acetic acid, formic acid, and furans.

In addition to being used to improve tolerance to inhibitory compounds, genetic engineering has also been applied to enable yeast to metabolize different components (generated during the lignocellulosic biomass pretreatment and hydrolysis steps) that are not directly utilized by most yeasts — e.g., *S. cerevisiae* and the non-assimilation of pentoses like xylose (Moysés *et al.*, 2016; van Maris *et al.*, 2006). In fact, in the ethanol industry, the co-fermentation of pentose and hexose by simultaneous saccharification processes and microbial metabolism is an important strategy to improve ethanol production yields and ensure the development of a competitive and economically viable second-generation biorefinery (Liu *et al.*, 2022).

Table 1.1. Metabolic and genetic engineering strategies for production of high value-added chemicals from pectin-derived sugars

Compound	Yeast	Strategies	Substrate/Residue	Main results	Reference
Ethanol	<i>S. cerevisiae</i>	Implementation of nine repair fragments to establish the fungal d-GalUA pathway using CRISPR/Cas9 in the reference strain Gly (able to utilize glycerol efficiently via a NAD-dependent pathway)	Minimal medium with galacturonic acid (the main pectic sugar) and glycerol	Maximum specific galacturonic acid consumption rate of 0.23 g g _{CDW} ⁻¹ h ⁻¹ 0.48 ± 0.06 C-mol C-mol _s ⁻¹ ethanol yield	(Perpelea <i>et al.</i> , 2022)
Phenylalanine	Indigenous yeast and <i>S. cerevisiae</i> AWR1796	Yeast was exposed to toxic phenylalanine analogs	Chardonnay grape juice	<i>ARO4</i> and <i>TYR1</i> mutations – 20-fold increase in 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production	(Cordente <i>et al.</i> , 2018)
Oligogalacturonides	<i>Pichia pastoris</i>	The gene (GAQ40478.1) encoding endo-polygalacturonase (AnPG28A) from <i>Aspergillus niger</i> was expressed in <i>P. pastoris</i>	Mandarin and orange peel wastes	The best oligogalacturonides yield were 26.1%.	(Yang <i>et al.</i> , 2020)
Ethanol	<i>S. cerevisiae</i>	Industrial strain with CRISPR-Cas9-directed integration of cellulase genes	Orange peel	Ethanol yields: 7.53 g L ⁻¹ and 0.151 g g ⁻¹ orange peel	(Yang <i>et al.</i> , 2018)

Saccharomyces cerevisiae is the model industrial microorganism used to produce ethanol. For this reason, it is generally used as an ideal host cell for genetic engineering to perform simultaneous assimilation of glucose and other sugars (Wang *et al.*, 2018). In addition, *S. cerevisiae* is generally recognized as a safe (GRAS) organism, which enables it to be widely used for pharmaceuticals and food. Thus, it ends up being the more commonly used yeast to produce these compounds and in applications as a host for metabolic engineering strategies (Pereira *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2022). This can be seen from the studies presented in Table 1. Not limited to *S. cerevisiae*, other microorganisms have also been reported as hosts for metabolic engineering because they exhibit characteristics like high tolerance to fermentation inhibitors, act under low pH conditions, and are more tolerant to high temperatures, such as the *Issatchenkia orientalis* (Lee *et al.*, 2022).

As the polymeric matrix of pectin has a complex structure, pectin-rich residues present particular challenges in hydrolysis and fermentation. Depending on the pretreatment and hydrolysis process, d-galacturonic acid is one of the quantitatively most abundant monomers, negatively affecting yeast growth and fermentation (Martins *et al.*, 2020; Perpelea *et al.*, 2022). Given these considerations, the use of d-galacturonic acid in *S. cerevisiae* has been the focus of some recent studies (Perpelea *et al.*, 2022; Protzko *et al.*, 2018). An engineered strain was able to consume d-galacturonic acid with the reported maximum specific rate of $0.23 \text{ g g}_{\text{CDW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in minimal synthetic medium when glycerol was added under aerobic conditions. Adding glycerol in pectin-rich hydrolysates was seen to bring an additional advantage by increasing the available carbon that can be converted into ethanol. It was shown that ethanol production from the co-fermentation of d-galacturonic acid and glycerol is a realistic opportunity, given the yield obtained from this strategy ($0.48 \pm 0.06 \text{ C-mol C-mol}_{\text{substrate}}^{-1}$) (Perpelea *et al.*, 2022).

As the production of ethanol from lignocellulosic biomass has already been commercialized, research has been developed to expand the use of the substrate and to produce chemical compounds in addition to ethanol, such as organic acids (Perpelea *et al.*, 2022; Stovicek *et al.*, 2022). Dicarboxylic acids for example, are found at very low levels as yeast products. However, the concentrations can be improved by using metabolic engineering. Metabolic engineering strategies lead to relevant yields of dicarboxylic acids (malic and succinic acid) from xylose as a carbon source (Kang *et al.*, 2022; Stovicek *et al.*, 2022).

The development of cell factories has been created either as alternative routes to the chemical ones or to improve the efficiency of biochemical pathways naturally present in

microorganisms. For example, the production of gastrodin — a phenolic glycoside — was achieved using *S. cerevisiae* as a host of a compatible glycosyltransferase that recognizes 4-hydroxybenzyl alcohol as a substrate and then applying a simultaneous chromosomal integration strategy of *CAR^{syn}*, *PPTcg-I^{syn}*, *AsUGT^{syn}*, *ubiC^{syn}*, and *ARO4K229L* into the yeast chromosomal rDNA. The authors demonstrated that the engineered strain produced a much higher level of gastrodin (175 times more than the original gastrodin-producing strain) (Yin *et al.*, 2020).

Metabolic engineering can also be an interesting strategy in phenolic production when challenges surround the scaling-up by natural biochemical pathways. This is the case of resveratrol production, a polyphenolic compound of great importance mainly in the medical field and health products (Feng *et al.*, 2022). Efforts have been made to develop cell factories capable of efficiently producing these compounds, as in the study conducted by Li *et al.* (2016), which applied the pull-push-block metabolic engineering strategy for overexpression of the resveratrol biosynthesis pathway in *S. cerevisiae*, resulting in a concentration of 800 mg L⁻¹ of the compound in fed-batch fermentation using glucose as substrate. More recently, other strategies have been applied to yeasts such as *Yarrowia lipolytica*, which is a versatile yeast applied to the production of organic acids, and whose metabolic engineering has been demonstrated to be able to increase levels of phenolic compounds (Gu *et al.*, 2020; He *et al.*, 2020; Sáez-Sáez *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2020).

Another efficient possibility of increasing yeast resistance to inhibitor compounds is applying laboratory adaptive evolution. This approach approximates a process of evolution by natural selection through the application of restrictive conditions for microbial propagation in the laboratory, inducing the expression of a phenotype best suited to the hostile environment (Barrick and Lenski, 2013; Menegon *et al.*, 2022). It was recently reported that exposure of yeast to toxic phenylalanine analogs induced mutation in two genes of the aromatic amino acid biosynthetic pathway, *ARO4* and *TYR1*, leading to overproduction of 2-phenylethanol and 2-phenylethyl (Cordente *et al.* 2018).

Thus, although little explored, metabolic engineering and laboratory adaptive evolution will progressively allow the construction of more robust strains for application in industrial flows. This scenario may expand the variety of chemicals produced, making microbial cells economically feasible for integrated biorefinery systems (Baptista *et al.*, 2021).

1.5.2 Indigenous yeasts on fruits: transforming their substrate into bioproducts

Many species have already been isolated from different environments, and represent a still little-explored resource, offering innovation for biotechnological development in several fields (Nandal *et al.*, 2020). Indigenous microorganisms from diverse environments may present interesting characteristics for industrial processes, and it is of scientific interest to explore biological resources that enable the development of new strategies. Many researchers examine and characterize different yeast species that exhibit relevant characteristics, such as high tolerance to the saline environment, toxic compounds, high temperatures, and high substrate concentration, and that can produce certain bioproducts with high efficiency. In this context, when it comes to plant environments, yeast isolation may lead to the effective production of volatile organic compounds (Fenner *et al.*, 2022).

There is a wide diversity of microorganisms inhabiting fruits and vegetables, which are interesting substrates for yeast prospecting. In fact, among the microorganisms indigenous to these environments, yeasts are the dominant populations (10^5 a 10^7 CFU g⁻¹) (Pimentel *et al.*, 2021). These microorganisms play an important role in ecological relationships, which explains their abundance in these environments. Considering the prospection of fruit-dwelled yeasts, it is possible to explore the products resulting from these ecological relationships that can be highly lucrative, mainly by the fermentative capacity and metabolite production of commercial interest (Fenner *et al.*, 2022; Pimentel *et al.*, 2021). In addition, fermentative processes conducted by indigenous yeasts can result in better adaptation to environmental factors as well as enhanced volatile compound profiles (Macêdo *et al.*, 2023).

The increase in studies isolating yeast to produce volatile compounds and other bioproducts has been essential for the understanding of genetic diversity, as well as for the advances in the consolidation of commercial products, which is mainly directed to the food and beverage field (Amorim *et al.*, 2018; Macêdo *et al.*, 2023; Pimentel *et al.*, 2021; Rêgo *et al.*, 2020). Besides, the production of volatile organic compounds from yeast has also been widely evaluated as a biocontrol mechanism in agriculture. Several yeast species isolated from fruit exhibited the potential to control pathogenic fungi through the production of volatile organic compounds (see Table 1.2). As noted, the recovery of these compounds can be valuable for a wide range of applications.

Table 1.2. Recent studies evaluating the production of volatile compounds by yeasts isolated from fruit, with their respective applications

Yeast	Isolation site	Target compound	Application	Reference
<i>Aureobasidium pullulans</i>	The surface of 'Redhaven' peaches (Italy)	1-Propanol, 2-methyl/1-Butanol, 3-methyl Butanoic acid, 2-oxo Limonene Phenethyl alcohol	Biocontrol of postharvest fungal pathogens	(di Francesco <i>et al.</i> , 2015; Mari <i>et al.</i> , 2012)
<i>Clavispora lusitanae</i> AgL21	Lemon Packinghouse (Argentina)	Ethyl acetate Isoamyl acetate 3-methyl butanol Phenethyl alcohol	Biocontrol of fungal pathogens	(Pereyra <i>et al.</i> , 2021, 2022)
<i>Hanseniaspora vineae</i>	Cashew apple fruit (Brazil)	Octanoic acid β -farnesene Decanoic acid 2-phenyl acetate Acetophenone Acetic acid	Production of cashew wine	(Rêgo <i>et al.</i> , 2020)
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	Soursop and umbu-cajá (Caatinga Biome fruits, Brazil)	Ethanol Acetic acid Succinic acid 3-methyl-1-butanol α -terpineol Aldehyde Isobutyric acid	Produce fermented pulps	(Macêdo <i>et al.</i> , 2023)
<i>Meyerozyma caribbica</i>	Pineapple pulp and peel	Gallic acid Catechin Ferulic acid Vanillin Resveratrol Coumaric acid	Functional fermented beverage	(Amorim <i>et al.</i> , 2018)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> YCXT3	Healthy leaf of strawberry (China)	2-ethyl-1-hexanol 2-hexyl-1-decanol, 2,6,10-trimethyl-dodecane Pentadecane	Biocontrol of postharvest fungal pathogens	(Huang <i>et al.</i> , 2012)

			Tetradecane 1-chloro-octadecane			
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Cashew apple fruit (Brazil)	Isoamyl alcohol Phenylethyl alcohol Decanoic acid 3-methyl-1-pentanol Dodecanoic acid Acetic acid Benzoic acid	Production of cashew wine	(Rêgo <i>et al.</i> , 2020)		
<i>Wickerhamomyces anomalous</i> Disva 2	Grape berry surface	Ethyl acetate Ethyl butyrate Isoamyl acetate Ethyl hexanoate Isobutanol Amylic alcohol Isoamyl alcohol	Biocontrol of postharvest fungal pathogens	(Oro <i>et al.</i> , 2014, 2018)		
<i>Pichia galeiformis</i> BAF03	Lemon fruit surface (China)	Ethanol Acetic acid 3-methyl-1-butanol 3-methyl-1-butanol acetate Benzaldehyde Pentyl propanoate Benzeneacetaldehyde Phenylethyl alcohol	Biocontrol of citrus green mold (<i>Penicillium digitatum</i>)	(Chen <i>et al.</i> , 2020)		
<i>Pichia fermentans</i> JT-1-3	Soil of research center (China) for citrus fruits (orange and lemon)	3-methyl-1-Butanol 2-methyl-1-Butanol Phenylethyl Alcohol Ethyl 9-hexadecenoate Linoleic acid ethyl ester 4-ethyl-2-methoxy-Phenol 4-ethyl-1-Phenol Limonene	Production of kiwifruit wine	(Zhong <i>et al.</i> , 2020)		

<i>Candida parapsilosis</i> strains (IFM 48375 and NRRL Y-12969)	Orange bagasse (Brazil)	Ethanol	Fermentation of Citrus Pulp of Floater (a industrial residue from manufacturing of orange juice)	(Cypriano <i>et al.</i> , 2018; Tsukamoto <i>et</i> <i>al.</i> , 2013)
--	-------------------------	---------	--	---

Besides the relevance of yeast prospecting for the knowledge of the role of flavorings produced in food or the mechanism of action in biocontrol, the difference in the diversity of microorganisms is also a factor that affects the performance of autochthonous yeasts when used on substrates from which it was isolated. It has been demonstrated that yeast performance is enhanced when using fermentation media that have similarity to the source of the natural habitat of these organisms (Macêdo *et al.*, 2023; Pimentel *et al.*, 2021), as it is the case of fruit residues. Moreover, the microorganisms present in the residues can be different with the change of the environment, being strongly dependent on intrinsic parameters, such as carbohydrate and protein content and pH, and extrinsic parameters, such as climatic conditions and harvesting periods (Pimentel *et al.*, 2021). In summary, there is a scenario where yeasts isolated from fruit and fruit residues are currently related to the identification of flavorings in food and beverage (mostly) and biocontrol in agriculture. Fortunately, this can be exploited in bioprocesses by fermentation of orange wastes to recover volatile organic compounds, providing a wide range of opportunities for biotechnology expansion.

Recently, Macêdo *et al.* (2023) evaluated the yeasts *Hanseniaspora opuntiae* and *Issatchenkia terricola*, isolated from umbu-cajá, and *H. opuntiae*, isolated from soursop, in the fermentation of soursop and umbu-cajá pulp. Higher metabolic activity of the yeast strains was observed in the media produced with the fruit pulps from which the yeasts were isolated. All strains were able to ferment the pulp, increasing the production of acetic acid and the concentration of phenolics (Macêdo *et al.*, 2023).

Another interesting result for the production of volatile compounds by yeast isolated from fruits was presented by Rêgo *et al.* (2020), which demonstrated that fermentation can be directed to the production of specific volatile compounds from indigenous yeasts in cashew juice. When co-inoculating *Torulaspora delbrueckii* and *Hanseniaspora opuntiae* with *Saccharomyces cerevisiae*, the production of 2-propenoic acid and 3-phenyl-ethyl ester was detected, whereas this compound was not observed in simple fermentation (only with *S. cerevisiae*). The manuscript also identified 18 other volatile compounds from the mentioned yeasts in simple fermentation and co-fermentation (Rêgo *et al.*, 2020). These results supported the proposition that autochthonous microorganisms may be more adapted to the matrix and better able to carry out fermentative processes (Pimentel *et al.*, 2021), being interesting in the prospection for industrial expansion.

1.5.3 Laboratory, semi-industrial, and industrial scale experiments

Several laboratory experiments have been developed to (i) optimize industrial conditions, (ii) enable technology transfer, and (iii) ensure the production of chemicals in an integrated manner at the commercial level. It should be noted that, in addition to the efforts to optimize processes with different waste biomasses, there is a need to bring laboratory research closer to industrial demands. To this end, numerous efforts have been made to develop microbial cell factories to drive scaling-up.

Moreover, it is necessary to consider the concentration of the final product for the industry reality. For example, terpenoid production carried out in batch fermentations is at mg L^{-1} , which has no commercial significance. On the other hand, fermentation in a bioreactor with a fed-batch mode of operation can provide titers on the grams per liter scale and higher yields (Carsanba *et al.*, 2021). For this purpose, the industrial production of compounds, e.g., terpenoids, is conducted in fed-batch mode, as it combines advantages of both batch and continuous fermentation modes. Fed-batch in 2 L bioreactors conducted simulating the industrial process of β -farnesene production by Amyris Inc. using a recombinant *S. cerevisiae* strain resulted in yields above 97% after a six-days fermentation (Carvalho *et al.*, 2022). The same discussion can be extended to phenolics, such as resveratrol. Recently, in a fed-batch process, concentrations of approximately $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were achieved with glucose and ethanol as substrate using the strain *S. cerevisiae* ST4990 (Li *et al.*, 2016).

Strategies to optimize the production of high-value-added compounds are also explored, either by adapting fermentative processes (e.g., co-culture) or operationalization. It has been demonstrated that co-fermentation methods can improve other processes, such as with indigenous yeasts (*Hanseniaspora guilliermondii*) and *S. cerevisiae*, which in co-culture significantly improved the content of polyphenols and aromatic compounds (Xu *et al.*, 2022).

It is important to highlight that xylitol is already a large-scale product, being mostly produced from lignocellulosic biomass and chemical routes (Grand View Research, 2017). However, in recent decades, biological routes have gained ground in industries, and research efforts have driven these advances. For instance, to produce xylitol from lignocellulosic biomass using biological route, the yeast *S. cerevisiae* PE-2-GRE3 (yeast engineered for xylitol production, with overexpression of *GRE3* gene from *Pichia stipitis*) and an enzyme cocktail of cellulases and hemicellulases were used in simultaneous saccharification and fermentation process and showed interesting conversion results (Baptista *et al.*, 2020). In addition to

engineered organisms, native yeasts have been identified and evaluated for their ability to accumulate xylitol, especially yeasts of the genera *Spathaspora* and *Scheffersomyces*, which have been essential to promote advances in the fermentation and production processes in single or co-culture, besides enabling the identification of genes of interest for metabolic engineering (Farias and Maugeri-Filho, 2021; Hickert *et al.*, 2013; Neitzel *et al.*, 2022; Scapini *et al.*, 2022).

1.6 CONCLUSION

The most significant and recent findings about the biotechnological potential of orange wastes, as low-cost feedstocks, and yeasts, as a microbial cell factory, were highlighted in this review. Although for decades yeasts have shown an impressive competence in being genetically engineered, we showed that nature on its own can offer us indigenous strains with the ability to produce the most distinct and valuable bioproducts. This has been the case of fruit-isolated yeasts, which naturally work as fruit-decomposing microbes, thus showing an innate capacity to consume and transform residual biomasses.

According to the literature reviewed, at least twenty-one yeast species isolated from natural environments are capable of being employed in citrus-waste-based biorefineries. Cellulose, hemicellulose, and pectin hydrolysates have sugars that can be transformed into ethanol, xylitol, and volatile organic compounds by those yeasts. Moreover, in a multiproduct context, biorefineries may concomitantly produce bioactive polyphenols and terpenes that can be of interest to pharmaceutical companies and food industry. Last but not least, some indigenous yeasts display hydrolytic enzymes that can be used to generate xylan- and pectin-derived oligosaccharides, which also have been proven to benefit human health.

Finally, our review shows that, in this scenario, the current flagship is probably process scaling up. It is time to go from the laboratory to semi-industrial environments. Many laboratory-tested and -analyzed strategies now must be optimized on larger scales to make fruit-waste-based biorefineries real.

CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO COM OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS DURANTE O MESTRADO

2.1 INTRODUÇÃO

As cascas de laranja, embora frequentemente descartadas como resíduos, apresentam um potencial significativo para uma variedade de aplicações biotecnológicas. A crescente conscientização sobre a necessidade de reduzir o desperdício e aproveitar recursos renováveis está impulsionando a prospecção de métodos inovadores para valorizar esses subprodutos (Ortiz-Sanchez *et al.*, 2020, 2023; Sepúlveda *et al.*, 2020).

Um aspecto chave desse esforço é a prospecção de leveduras capazes de metabolizar os componentes presentes nas cascas de laranja. Essas leveduras são essenciais para catalisar os processos de fermentação que convertem os açúcares e outros compostos das cascas de laranja em produtos, como produtos para indústrias de fármacos, bebidas e biocombustíveis (Carvalho *et al.*, 2021; Sudeep *et al.*, 2020).

A pectina é uma molécula encontrada em muitas plantas, especialmente em frutas como a laranja. Ela é um polissacarídeo complexo que desempenha um papel importante na estrutura das plantas, ajudando a manter a integridade das células vegetais e fornecendo resistência mecânica aos tecidos (Gawkowska; Cybulska; Zdunek, 2018; Naqash *et al.*, 2017). A pectina consiste, de forma simplificada, em uma cadeia principal composta por várias unidades de ácido galacturônico ligadas por meio de ligações glicosídicas α -(1 $\rightarrow$ 4), que podem ser interrompidas por unidades de L-ramnose através de ligações α -(1 $\rightarrow$ 2), onde se localizam as cadeias laterais, compostas principalmente por galactose e arabinose, e em menor medida glicose e xilose (Seyfried *et al.*, 2016). A pectina é conhecida por sua capacidade de formar géis em soluções aquosas. Isso ocorre porque as cadeias de pectina podem se ligar umas às outras através de ligações de hidrogênio, formando uma rede tridimensional que aprisiona a água e cria uma estrutura gelatinosa. Esse gel é usado em muitas aplicações, incluindo na produção de geleias, compotas, iogurtes, sorvetes e produtos de panificação, onde atua como um espessante, estabilizante e agente de geleificação (Akin-Ajani *et al.*, 2021; Gawkowska; Cybulska; Zdunek, 2018; Seyfried *et al.*, 2016).

A quebra da pectina resulta em vários monossacarídeos, incluindo o ácido galacturônico, a galactose e a xilose, que, dependendo da levedura, podem ser metabolizados por meio da fermentação alcoólica para produzir etanol. Portanto, ao usar pectinases para quebrar a pectina e facilitar a metabolização dos monossacarídeos resultantes, é possível gerar

etanol. As pectinases são as enzimas responsáveis por essa quebra, e englobam atividades enzimáticas diferentes envolvidas na decomposição da pectina em várias plantas. E elas são produzidas por microrganismos, mas a principal fonte para usos comerciais é o fungo filamentoso *Aspergillus* sp.

Existem leveduras na indústria de fermentação capazes de fermentar carboidratos com rendimento de etanol próximo ao máximo teórico, considerando-se a conversão estequiométrica. Entre elas, destacam-se a *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida por sua ampla aplicação na produção de diversos produtos fermentados, como pão, cerveja e vinho (Inês *et al.*, 2021; Rodrigues; Wahl; Gombert, 2021). Outra levedura comum é o *Kluyveromyces lactis*, também utilizado em processos fermentativos industriais (Karlović *et al.*, 2020; Rodrigues; Wahl; Gombert, 2021). Além disso, a *Pichia stipitis*, famosa por sua capacidade de expressar proteínas heterólogas, também é uma grande fermentadora (Karlović *et al.*, 2020). Espécies do gênero *Candida*, como *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, são leveduras capazes de metabolizar ácido galacturônico, galactose e xilose (de Melo Pereira *et al.*, 2022; Yan *et al.*, 2021). Essas leveduras desempenham um papel fundamental na produção industrial de uma variedade de produtos fermentados, incluindo etanol, ácidos orgânicos e diversos produtos químicos.

Além da fermentação, a biotecnologia está prospectando enzimas como celulase, pectinase, amilase e xilanase, que tem diversas aplicações nas indústrias alimentícia e têxtil. Além disso há também a concentração de esforços para obter enzimas para biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica (Brexó *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2023). Essas enzimas são capazes de quebrar as estruturas complexas das moléculas, liberando açúcares e outros compostos que podem ser utilizados na produção de bioprodutos (Haile; Ayele, 2022; Ma *et al.*, 2016).

Compreender o desenvolvimento microbiano e a geração de produtos ao longo do tempo é fundamental, e isso é alcançado por meio de estudos cinéticos. Essas análises abrangem toda a complexidade da vida microbiana: desde o crescimento propriamente dito até a sobrevivência e a morte, passando pela produção de produtos, adaptações, mutações, ciclos celulares, efeitos ambientais e interações biológicas (Panikov, 2011).

Um dos principais objetivos dos estudos cinéticos é determinar a taxa ou velocidade de crescimento de uma população microbiana, cujo parâmetro central é a velocidade específica de crescimento. Durante o crescimento populacional do microrganismo, há uma fase em que as células não enfrentam limitações de nutrientes nem inibições, e o meio apresenta condições

físico-químicas adequadas e uma mistura homogênea. Nesse estágio, a população cresce à sua máxima velocidade possível, até que um substrato se torne limitante para o crescimento ou até que concentrações inibitórias de algum composto sejam atingidas (Hooper *et al.*, 2012; Panikov, 2011; Rakhmanov *et al.*, 2021).

A determinação da velocidade máxima de crescimento das leveduras e da quantidade de biomassa gerada é fundamental para otimizar os processos de fermentação. Esse conhecimento permite ajustar as condições de cultivo para maximizar a produção de compostos desejáveis, como etanol ou enzimas, enquanto minimiza o consumo de recursos (Inês *et al.*, 2021; Panikov, 2011).

Desse modo, o presente estudo tem como objetivo isolar leveduras a partir de resíduos de laranja em decomposição e realizar experimentos fermentativos em meios com carboidratos encontrados nos resíduos das frutas, avaliando sua velocidade de crescimento, biomassa gerada e atividade pectinolítica dessas leveduras isoladas.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Caracterização resíduos de casca de laranja

Para determinação do teor de umidade, cinzas, extrativos, lignina total (solúvel e insolúvel em ácido), celulose e hemicelulose da biomassa de cascas de laranja antes e após os tratamentos químicos realizados, seguiu-se os procedimentos descritos pela National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter *et al.*, 2008)(Sluiter *et al.*, 2012). Todas as análises foram realizadas em quadruplicada.

2.2.1.1 Determinação do teor de umidade das frações sólidas

Para determinar o teor de umidade, aproximadamente 6,0 gramas de amostra foram homogeneizadas, pesadas em uma placa de Petri e levadas à estufa a 105°C, até massa constante. O teor de umidade foi calculado a partir da Equação 1.

$$\% \text{ umidade} = \left(1 - \left(\frac{M3-M1}{M2-M1} \right) \right) * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: M1 é a massa da placa de petri vazia (g); M2 a massa da placa de petri com a amostra úmida (g); e M3 a massa da placa de petri com a amostra seca (g).

2.2.1.2 Determinação do teor de cinzas das frações sólidas

Para a quantificação do teor de cinzas, aproximadamente 1,0g de material seco foi pesado em cadinhos de porcelana, devidamente lavados e secos. A carbonização do material foi realizada em mufla, a 800°C, por duas horas. Em seguida, as amostras foram retiradas da mufla e colocadas em um dessecador até atingirem temperatura ambiente. A calcinação foi novamente realizada por mais 30 minutos para verificar a constância de massa. A concentração de cinzas foi calculada a partir da Equação 2.

$$\% \text{ cinzas} = \left(\left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \right) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: M1 é a massa do cadinho (g); M2 a massa do cadinho com a amostra (g); e M3 a massa do cadinho com as cinzas (g).

2.2.1.3 Determinação do teor de extrativos das frações sólidas

Cabe salientar que a determinação do teor de extrativos na biomassa apresenta duas finalidades: quantificar os extrativos para análise compositora e remover o material não estrutural antes da quantificação da lignina e dos carboidratos, para que não haja interferência nas etapas analíticas subsequentes.

Para a determinação dos extrativos, cerca de 2,0g do material seco foi adicionado ao cartucho de extração previamente confeccionado com papel filtro. Após a montagem dos cartuchos, este foi introduzido na corneta de extração do Soxhlet. Posteriormente, adicionou-se 150 mL de água destilada em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. O conjunto foi acoplado no equipamento e o aquecimento foi ligado, iniciando a extração. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor.

Após extração com água destilada, as amostras foram novamente submetidas à uma nova extração utilizando 150 mL de álcool etílico em cada balão extrator. A extração foi mantida até o desaparecimento total da descoloração das amostras. Ao término da extração, de forma a determinar a massa do material seco livre de extrativos, o cartucho foi seco em estufa a 105°C até massa constante. Para o cálculo do teor de extrativos utilizou-se a Equação 3.

$$\% \text{ extrativos} = \left(\left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \right) * 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: M₁ é a massa da biomassa utilizada (g); e M₂ a massa da biomassa livre de extrativos (g).

2.2.1.4 Determinação do teor de lignina total, celulose e hemicelulose das frações sólidas

Para determinar o teor de celulose, hemicelulose e lignina total (solúvel e insolúvel em ácido), cerca de 0,3g de amostra foram pesadas em tubos de ensaio juntamente com 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72% (v/v). Para a amostra controle, foram adicionados apenas 3 mL de ácido sulfúrico. Posteriormente, os tubos foram colocados em um banho termostático a 30°C por 1 h, sendo homogeneizados com um bastão de vidro a cada 5-10 min. Após o processo de hidrólise ácida concentrada, foi realizado o processo de hidrólise ácida diluída, no qual os tubos foram removidos do banho e tiveram seu conteúdo transferido para erlenmeyers de 250 mL, utilizando para isso, 84 mL de água destilada, sendo a concentração do meio ácido diluída para 4% (v/v). Para a completa hidrólise dos oligômeros, os frascos foram vedados e colocados em uma autoclave a 121°C e (1,1 bar) por 1 hora.

Decorrido o tempo, os frascos foram retirados da autoclave e resfriados até temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram filtradas a vácuo em funil de büchner, utilizando papel de filtro (Figura 3a). A fração sólida obtida, foi lavada com água destilada em abundância — aproximadamente 500 mL —, e depois, seca em estufa, a 40°C até massa constante. Para a fração líquida, foram realizados dois procedimentos:

- (i) O hidrolisado ácido foi diluído na razão de 1:100, para realizar a leitura em um espectrofotômetro UV-Visível (NOVA 1600/1800-UV Series) no comprimento de onda de 280 nm, utilizando cubetas de quartzo.
- (ii) Cerca de 20 mL do hidrolisado ácido foi adicionado em béqueres de 50 mL, para ter seu pH ajustado para a faixa entre 5 e 6 com o auxílio de Carbonato de Cálcio (CaCO₃) em pó. Posteriormente, uma alíquota foi filtrada em eppendorfs de 2 mL, utilizando seringa e filtros de seringa de 0,45 µm. A alíquota filtrada foi armazenada em freezer para posterior leitura em HPLC, a fim de quantificar as concentrações de lignina solúvel, carboidratos, grupos acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Para a quantificação dos carboidratos e produtos em decomposição, foi utilizado um HPLC (modelo LC-MS, Shimadzu), equipado com um detector de índice de refração (RID-1, Shimadzu) e uma coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H, Bio-Rad). Na fase móvel, foi utilizado 5 mM de ácido sulfúrico a uma temperatura de forno de 50 °C e um fluxo de 0,6 mL/min. As concentrações dos produtos de decomposição foram determinadas a partir da utilização de um detector SPD-M20A, operado com uma coluna

(NST-18), eluída com acetonitrila/água a uma razão de 85:15 (v/v) e com ácido acético 1% (v/v), a uma temperatura de forno de 40°C e um fluxo de 0,8 mL/min.

(Dresch *et al.*, 2022; Tadioto *et al.*, 2022b; Vargas *et al.*, 2023)

Para o cálculo do percentual de lignina solúvel e insolúvel em ácido, utilizou-se as Equações 4, 5 e 6.

$$\% \text{ lignina solúvel} = \left(\frac{\text{Conc. lignina solúvel} * V \text{ filtrado}}{M_1} \right) * 100 \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{Conc. lignina solúvel} = [41,87 * ((AT * FD) - APD) - 0,3279] * 10^{-3} \quad \text{Equação 5}$$

$$APD = C1 * \varepsilon_1 + C2 * \varepsilon_2$$

Onde: V_{filtrado} é o volume do hidrolisado filtrado (0,087 L); M_1 a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g); AT a absorbância da solução de lignina solúvel junto com os produtos de degradação lidos em espectro UV-Visível, a 280 nm; FD o fator de diluição para leitura da absorbância (100); e APD a absorbância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares, cujas concentrações C1 e C2 foram determinadas por HPLC e ε_1 e ε_2 são as absorvidades do furfural e HMF (146,85 e 114,00 L/g cm), sendo esses valores utilizados no cálculo do APD retirados em estudos encontrados na literatura.

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \left(\left(\frac{M_2}{M_1} \right) * 100 \right) - \% \text{ cinzas} \quad \text{Equação 6}$$

Onde M_1 é a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g); M_2 a massa da lignina insolúvel seca (g); e a % cinzas o teor de cinzas da biomassa *in natura* livre de extrativos.

O percentual de lignina total foi obtido a partir da soma da lignina solúvel em ácido (LSA) e lignina insolúvel em ácido (LIA) na biomassa, conforme mostra a Equação 7.

$$\% \text{ lignina total} = (\% \text{ LSA} + \% \text{ LIA}) * (1 - (E/100)) \quad \text{Equação 7}$$

Onde: E é o teor de extrativos da biomassa, em % (m/m).

Para determinar os teores de celulose e hemicelulose, faz-se necessário converter a concentração dos açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação na fonte de carboidrato precursor. Diante disso, são usados fatores de hidrólise para a obtenção de cada composto, conforme indicado na Tabela 2.1. Para o cálculo de determinação da celulose (Equação 8), são somadas celobiose, glicose e HMF, enquanto para a hemicelulose (Equação 9), são somadas xilose, arabinose, ácido acético e furfural.

Tabela 2.1 - Fator de hidrólise de cada açúcar, ácido orgânico ou inibidor utilizado para integralizar o cálculo de celulose e hemicelulose.

Componente	Açúcar, ácido orgânico ou inibidor	Fator de hidrólise
Celulose	Celobiose	0,95
	Glicose	0,90
	HMF	1,29
Hemicelulose	Xilose	0,88
	Arabinose	0,88
	Ácido Acético	0,72
	Furfural	1,37

Fonte: (Scopel, 2019).

$$\% \text{ celulose} = \left\{ \frac{[(0,95 * Ce) + (0,90 * G) + (1,29 * HMF) * V] * [1 - (\frac{E}{100})]}{M} \right\} \quad \text{Equação 8}$$

Onde: Ce é a concentração de celobiose (g/L); G é a concentração de glicose (g/L); HMF é a concentração de hidroximetilfurfural (g/L); V é o volume do hidrolisado filtrado (0,087 L); E é o teor de extrativos da biomassa (%); e M a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g).

$$\% \text{ hemicelulose} = \left\{ \frac{[(0,88 * X) + (1,37 * F) + (0,72 * AA) + (0,88 * ARA) * V] * [1 - (\frac{E}{100})]}{M} \right\}$$

Equação 9

Onde: X é a concentração de xilose (g/L); F é a concentração de furfural (g/L); AA é a concentração de ácido acético (g/L); ARA é a concentração de arabinose (g/L); V é o volume do hidrolisado filtrado (0,087 L); E é o teor de extrativos da biomassa (%); e M é a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g).

2.2.1.5 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas foi realizada seguindo o método de Kjeldahl modificado, conforme procedimento padrão descrito em manual do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Esse método baseia-se na digestão da amostra livre de umidade com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento contínuo, convertendo todo o nitrogênio orgânico em íon amônio. Posteriormente, a solução obtida é alcalinizada com hidróxido de sódio concentrado, a amônia produzida nessa etapa destilada em sistema automático de destilação e imediatamente captada por uma solução de ácido bórico, que finalmente é titulada com ácido clorídrico de concentração conhecida e padronizada. O método é dividido nas etapas de digestão, destilação e titulação.

Na etapa de digestão, aproximadamente 0,2 g de amostra livre de umidade foi pesada em papel filtro, seu peso anotado (P) e transferida para o tubo de Kjeldahl juntamente com 2 g de catalisador (10 Na₂SO₄:1 CuSO₄.5H₂O) e 5 mL de ácido sulfúrico P.A. O ensaio foi realizado em triplicata. Os tubos foram então colocados no bloco digestor previamente aquecido a uma temperatura entre 160-280°C por 10 a 15 min dentro de capela de exaustão. Após esse período, a temperatura foi elevada para 375°C e a digestão foi mantida até o conteúdo dos tubos de Kjeldahl tornar-se límpido (cor amarelo-esverdeada). Os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e seguiram para a etapa de destilação.

Em seguida, misturou-se 5 mL de água destilada ao tubo com amostra digerida e acoplou-se ao destilador de nitrogênio, onde, lentamente, adicionou-se 20 mL de hidróxido de sódio 40%, a fim de alcalinizar a amostra. Após o cessamento da reação no tubo, o destilador foi ligado. Depois de alguns instantes, o frasco contendo 10 mL de solução de ácido bórico 3% e três gotas de indicador vermelho de metila 0,2% + azul de metileno 0,2% (em álcool 95%) foi acoplado no bico do condensador. A destilação perdurou até a solução de ácido bórico atingir uma coloração verde clara, completando um volume de cerca de 50 mL, garantindo a completa evaporação e condensação da amônia presente na amostra. Por fim, o conteúdo do frasco foi titulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N padronizado até a viragem do indicador de verde claro para rosa, tendo o volume de ácido usado na titulação anotado (V).

Para determinar a porcentagem de proteínas totais presentes no bagaço de malte utilizou-se a Equação 10.

$$\% \text{ proteínas} = \left(\frac{V \times f \times 6,25 \times 0,0014}{P} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

P = peso da amostra em gramas (g).

V = volume gasto de HCl 0,1 N na titulação (mL).

f = fator de correção resultante da padronização do HCl 0,1 N.

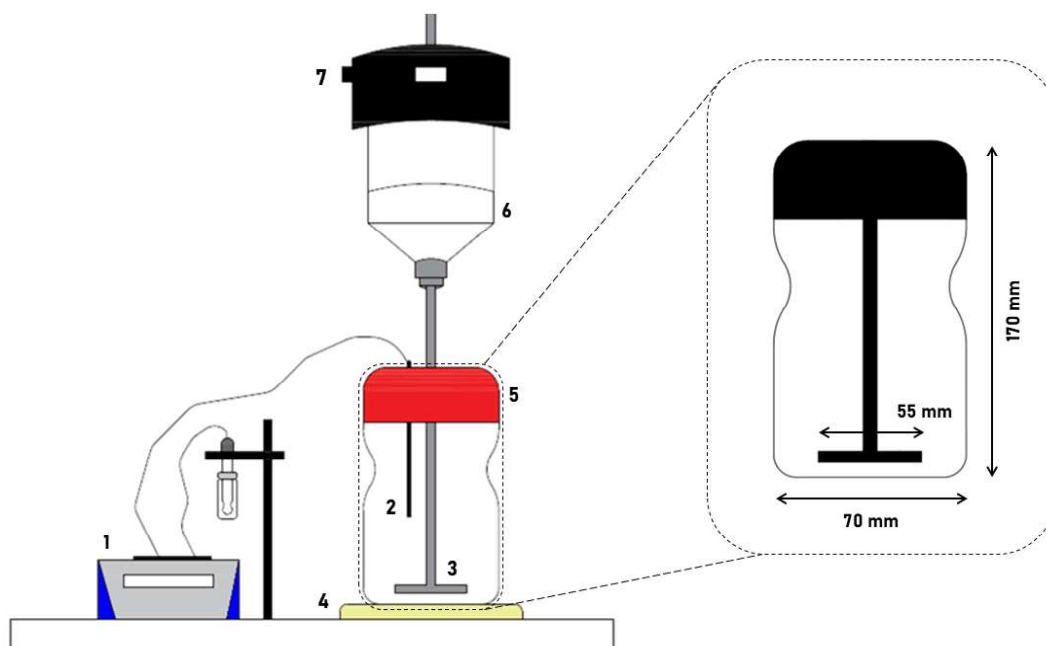
6,25 = fator de conversão geral.

0,0014 = miliequivalente grama do nitrogênio.

2.2.1.6 Extração pectina

Para extração da fração de pectina da casca de laranja utilizou-se uma unidade experimental composta por reator tipo tanque agitado e agitador mecânico (Fisatom, Modelo 713D) acoplado a um impelidor do tipo hélice naval, conforme mostra a Figura 2.1.

Figura 2.1 - Representação esquemática do aparato experimental utilizado no experimento.



(1) pHmetro de bancada; (2) Eletrodo de temperatura; (3) Impelidor; (4) Chapa aquecedora com controle de temperatura; (5) Reator; (6) Motor de agitação e; (7) Controlador de agitação (rpm).

Fonte: Dresch *et al.*, (2023)

Para a extração, aproximadamente 15,0g da casca de laranja em pó (< 60 mm) foi tratada com 200 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M (pH 2,0). A extração ocorreu a 650 rpm e 80°C por 2 horas em agitador mecânico. Após o término da extração, o hidrolisado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner utilizando o tecido VOAL. A fração sólida obtida foi seca em estufa a 60°C por 24 horas, para a realização da caracterização físico-química em termos do conteúdo de lignina total, celulose e hemicelulose. A pectina presente na fração líquida foi precipitada com etanol 95% (v/v) a 4°C, em uma razão 1:2 (v/v). Posteriormente, a pectina precipitada foi filtrada, lavada com etanol e seca em estufa a vácuo a 60°C até atingir peso constante. A pureza da pectina foi determinada com base no teor de proteína (pureza (%) = 100 – teor de proteína) pelo método Kjeldahl, empregando fator de correção de 6,25 para nitrogênio total.

2.2.2 Triagem leveduras

Trinta e oito linhagens de leveduras previamente isoladas de laranjas em decomposição, pertencentes à Coleção Microbiológica do Laboratório de Bioquímica de Leveduras do Campus Chapecó da UFFS, foram analisadas neste trabalho. Os códigos dessas leveduras estão discriminados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Cepas de leveduras isoladas de laranja em decomposição.

CHAP-045	CHAP-055	CHAP-065	CHAP-075
CHAP-046	CHAP-056	CHAP-066	CHAP-076
CHAP-047	CHAP-057	CHAP-067	CHAP-077
CHAP-048	CHAP-058	CHAP-068	CHAP-078
CHAP-049	CHAP-059	CHAP-069	CHAP-079
CHAP-050	CHAP-060	CHAP-070	CHAP-080
CHAP-051	CHAP-061	CHAP-071	CHAP-081
CHAP-052	CHAP-062	CHAP-072	CHAP-082
CHAP-053	CHAP-063	CHAP-073	
CHAP-054	CHAP-064	CHAP-074	

Fonte: Elaborado pelo autor, (2024).

Para o crescimento celular em microescala, as leveduras foram pré-crescidas em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose) por aproximadamente 16 horas. Em seguida, alíquotas destes pré-crescimentos foram retiradas e utilizadas para inocular (a uma absorbância de aproximadamente 0,1 a 600 nm) meios mínimos contendo 6,7 g/L de YNB (base nitrogenada de leveduras, pH 5,0) sem aminoácidos acrescidos de 20g/L de um dos seguintes carboidratos: glicose, xilose, frutose, galactose ou ácido galacturônico. As leveduras foram cultivadas em placas de 96 poços com 100 µL de meio de cultivo em cada poço e seladas com AccuClear Sealing Film for qPCR (E & K Scientific), objetivando condições de crescimento microaeróbias. As placas foram incubadas a 30°C e agitação orbital (amplitude 2 mm) em um leitor multifuncional (TECAN ECHISTO INFINITE M200 PRO), onde o crescimento celular foi acompanhado pela absorbância a 570 nm a cada 15 minutos. O experimento foi realizado em duplicata.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi determinada através da Planilha de cálculo de velocidade específica conforme Schimidell *et al.* (2001) pelo método geométrico de cálculo de derivadas.

2.2.3 Curvas de crescimento em frasco agitado

Inicialmente, foi realizado um pré-inóculo das cepas por 48 horas em meio sólido YPDA (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona de caseína, 20 g/L de glicose e 20 g/L de ágar). Os pré-cultivos foram mantidos por 48 h em estufa a 30°C. Posteriormente, as cepas foram cultivadas em meios YP (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, pH 7,0) contendo,

alternadamente, 1% de pectina bruta (PB), 1% de pectina purificada (Sigma-Aldrich) (PS), 1% de casca de laranja desidratada e triturada (CT), 1% de galactose (GAL) ou 1% de glicose (GLI). As leveduras também foram testadas em meios acrescidos de 50 mg/L de pectinase de *Aspergillus niger* (Sigma), conforme descrito por Ma *et al.* (2016): pectina bruta+pectinase (PBE), pectina sigma+pectinase (PSE) ou casca triturada+pectinase (CTE).

Os inóculos foram realizados com alça estéril calibrada de 1 uL em frascos erlenmeyer de 250 mL com um quinto do seu volume preenchidos com os meios de cultura (contendo 25 mL de YP + 25 mL dos meios com açúcares supracitados). Após inóculo, os frascos foram incubados a 30°C sob agitação de 145 rpm pelo período de 90 horas. Dentro desse período, foram realizadas coletas a cada 12 h para acompanhar o crescimento celular das leveduras por espectrofotometria (Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer) com o comprimento de onda de 570 nm.

2.2.4 Ensaios de atividade enzimática

Para as análises da atividade pectinolítica, vinte e uma linhagens de levedura foram cultivadas conforme descrito na seção anterior. Ao fim dos cultivos, 1 mL do meio de cada cultura foi centrifugado (3 min a 5000 rpm) e os sobrenadantes coletados foram utilizados para determinação da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados seguindo um protocolo adaptado de (Albarello *et al.*, 2023). Resumidamente, 10 µL do sobrenadante coletado de cada cultura (conforme descrito acima) foram transferidos para microplacas de 96 poços com 15 µL de tampão Succinato-Tris 0,15 M contendo 10 g/L pectina purificada sigma (pH 5,0), visando permitir que enzimas eventualmente presentes no sobrenadante coletado pudessem hidrolisar a pectina liberando ácido galacturônico. A reação ocorreu com a placa selada por um período de 1 h em banho-maria ultratermostatizado a 30 e 50 °C. Como controles negativos, foram utilizados 10 µL de meio de cultura estéril (não inoculado).

Após a incubação, a concentração de açúcar redutor (ácido galacturônico) em cada poço foi determinada conforme descrito por (Santos *et al.*, 2017). Para tanto, foi preparada uma curva de calibração adicionando concentrações crescentes de ácido galacturônico (0 a 2 g/L) a novos poços. Em seguida, 25 µL de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico a 1% e tartarato duplo de sódio e potássio a 30% em NaOH 0,4 M) foram adicionados a todos os poços (contendo as amostras, o controle negativo e a curva padrão). A placa foi novamente selada e, desta vez, incubada por 5 min a 100°C para reação com DNS. Posteriormente, 330 µL de água destilada foram adicionados a cada poço e as medidas de absorbância foram imediatamente realizadas em leitor

de microplacas sob comprimento de onda de 490 nm. Com base na quantidade de ácido galacturônico nos poços, a atividade de pectinase foi expressa como U/mL, onde uma unidade (U) corresponde a 1 nmol de açúcar liberado por minuto a temperatura de 30 ou 50 °C.

A determinação da atividade pectinolítica de cada cepa será realizada em triplicata. Os resultados da atividade enzimática serão submetidos à análise de variância (ANOVA) com valor de $p < 0,05$, para verificar se os grupos amostrais diferiram significativamente do grupo controle (meio de cultura), e teste de Tukey com aceitação de 95% ($p < 0,05$), para verificar se os grupos amostrais diferiram significativamente entre si. Essas análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism. Os dados são apresentados como médias $\pm$ desvios padrão.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Composição cascas de laranja

A composição físico-química da biomassa das cascas de laranja foi analisada para a determinação do percentual de extrativos, lignina total, celulose e hemicelulose presente no referido resíduo. Os percentuais de celulose e hemicelulose encontrados (vide Tabela 2) são três vezes maiores do que os observados por Gaind (2017), que realizou a caracterização de cascas de laranja e obteve 12,7% de celulose e 5,3% de hemicelulose. Já no estudo realizado por Dávila *et al.* (2015), as cascas de laranja apresentaram 60,96% de celulose, 32,97% de hemicelulose e 6,07 de lignina total. Os dados de Rivas *et al.* (2008), por sua vez, apontam 16,9% de extrativos, 9,21% de celulose e 10,5% de hemicelulose em cascas de laranjas.

Tabela 2.3 - Composição físico-química da fração sólida obtida após o tratamento com ácido acético em base seca.

Cinzas (%)	Extrativos (%)	Lignina total (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)
nd*	25,16 $\pm$ 0,52	18,68 $\pm$ 1,01	37,77 $\pm$ 1,15	18,14 $\pm$ 3,87

*nd: não detectado

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A partir do método de extração ácida realizado no presente trabalho foi possível obter 11,63% de pectina (18,88 g/L) com grau de pureza de 92,83% através das cascas de laranja. Em um comparativo com estudos similares, o estudo conduzido por Rivas *et al.* (2008) obteve

42,5% de pectina, enquanto Fakayode e Abobo (2018) obtiveram um rendimento entre 12,93 e 29,05%.

Essa variação de rendimento entre os estudos, segundo Iñiguez-Moreno *et al.* (2024), está relacionado à influência do pH e da temperatura com o tempo de extração. À medida que a temperatura aumenta, aumenta-se solubilidade da pectina e, conseqüentemente, a taxa de extração (Fakayode; Abobi, 2018).

2.3.2 Cultivo celular em microescala

A velocidade específica máxima de crescimento foi determinada em todas as leveduras isoladas. As linhagens foram assim testadas diante dos monossacarídeos glicose, xilose, frutose, galactose e ácido galacturônico, constituintes da pectina de cascas de laranja (Dávila; Rosenberg; Cardona, 2015; Ma *et al.*, 2016).

Foi possível observar que nos meios contendo glicose, xilose, frutose e galactose todas as linhagens apresentaram crescimento celular. Diante do ácido galacturônico, porém, apenas 13 das 38 linhas foram capazes de crescer. Os valores de μ_{max} obtidos para cada uma das cepas em cada um dos meios testados estão discriminados na Tabela 2.4. Em glicose, a linhagem CHAP-049 foi a que apresentou maior velocidade específica de crescimento ($\mu_{max}=0,93/h$). Diante da xilose, as cepas CHAP-058, CHAP-071 e CHAP-077 se destacaram, com o valor de $\mu_{max}=0,82/h$. No meio contendo frutose foi obtido um $\mu_{max}=0,98/h$ para a cepa CHAP-058; para o meio contendo galactose o maior valor ($\mu_{max}=0,96/h$) foi observado para a CHAP-060; e, para o meio com ácido galacturônico, a melhor performance foi da cepa CHAP-054, com $\mu_{max}=0,29/h$.

Inês *et al.* (2021) realizaram um trabalho utilizando diferentes linhagens de *S. cerevisiae* em meios contendo glicose e frutose e verificaram que a velocidade específica de crescimento máximo variou entre 0,28 e 0,31/h em glicose e entre 0,36 e 0,32/h diante da frutose. Assim sendo, nossos dados apontam que as linhagens isoladas de laranjas em decomposição apresentaram velocidades três vezes superiores às da espécie mais empregada pela indústria.

Num estudo que empregou cepas de *Kluyveromyces marxianus* em meios contendo galactose, os autores observaram μ_{max} de 0,34-0,37/h (Rodrigues; Wahl; Gombert, 2021), o que corresponde a pouco mais de um terço daquilo que observamos em nossas análises. Em estudo realizado com *Pichia stipitis* em meios contendo 30 g/L xilose, a taxa máxima de crescimento específico foi observada numa variação de 0,17 a 0,28/h (Lee *et al.*, 2000),

aproximadamente um quarto do que foi aqui verificado para as linhagens CHAP-058, CHAP-071 e CHAP-077.

Tabela 2.4 - Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) calculada para cada uma das linhagens a partir dos dados experimentais de crescimento celular obtidos durante cultivos em microescala. Os dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes. Os valores mencionados no texto encontram-se em negrito.

Cepa	Carboidrato				
	Glicose	Xilose	Frutose	Galactose	Ácido Galacturônico
CHAP-045	0,34 ± 0,00	0,42 ± 0,03	0,57 ± 0,18	0,53 ± 0,01	-
CHAP-046	0,82 ± 0,21	0,20 ± 0,00	0,97 ± 0,20	0,88 ± 0,01	-
CHAP-047	0,92 ± 0,29	0,67 ± 0,18	0,92 ± 0,07	0,28 ± 0,01	-
CHAP-048	0,70 ± 0,01	0,72 ± 0,02	0,88 ± 0,22	0,07 ± 0,00	0,26 ± 0,01
CHAP-049	0,93 ± 0,02	0,65 ± 0,10	0,39 ± 0,00	0,43 ± 0,00	0,13 ± 0,00
CHAP-050	0,68 ± 0,13	0,46 ± 0,01	0,73 ± 0,06	0,59 ± 0,01	0,12 ± 0,00
CHAP-051	0,85 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,69 ± 0,05	-
CHAP-052	0,62 ± 0,12	0,36 ± 0,00	0,63 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,14 ± 0,01
CHAP-053	0,68 ± 0,22	0,31 ± 0,01	0,73 ± 0,11	0,52 ± 0,03	-
CHAP-054	0,69 ± 0,02	0,61 ± 0,05	0,58 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,29 ± 0,01
CHAP-055	0,83 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,51 ± 0,00	-
CHAP-056	0,65 ± 0,22	0,74 ± 0,15	0,45 ± 0,02	0,61 ± 0,20	-
CHAP-057	0,74 ± 0,12	0,76 ± 0,05	0,73 ± 0,03	0,88 ± 0,09	-
CHAP-058	0,83 ± 0,10	0,82 ± 0,01	0,98 ± 0,04	0,65 ± 0,01	0,10 ± 0,00
CHAP-059	0,73 ± 0,04	0,45 ± 0,00	0,60 ± 0,09	0,75 ± 0,02	-
CHAP-060	0,61 ± 0,00	0,31 ± 0,02	0,85 ± 0,35	0,96 ± 0,06	-
CHAP-061	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,07	0,67 ± 0,09	0,64 ± 0,03	-
CHAP-062	0,56 ± 0,08	0,31 ± 0,01	0,65 ± 0,25	0,41 ± 0,01	-
CHAP-063	0,51 ± 0,08	0,62 ± 0,09	0,50 ± 0,02	0,44 ± 0,02	-
CHAP-064	0,42 ± 0,04	0,31 ± 0,01	0,45 ± 0,03	0,49 ± 0,00	-
CHAP-065	0,59 ± 0,12	0,24 ± 0,03	0,52 ± 0,05	0,79 ± 0,12	0,24 ± 0,02
CHAP-066	0,39 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,46 ± 0,09	0,56 ± 0,15	-
CHAP-067	0,80 ± 0,00	0,48 ± 0,08	0,52 ± 0,06	0,67 ± 0,02	-
CHAP-068	0,66 ± 0,22	0,31 ± 0,01	0,66 ± 0,09	0,80 ± 0,00	-
CHAP-069	0,43 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,49 ± 0,02	0,51 ± 0,06	0,25 ± 0,02
CHAP-070	0,91 ± 0,05	0,20 ± 0,00	0,80 ± 0,10	0,81 ± 0,09	0,28 ± 0,03
CHAP-071	0,92 ± 0,07	0,82 ± 0,09	0,76 ± 0,14	0,85 ± 0,07	-
CHAP-072	0,41 ± 0,11	0,31 ± 0,04	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,15 ± 0,01
CHAP-073	0,55 ± 0,02	0,57 ± 0,00	0,70 ± 0,01	0,47 ± 0,00	0,16 ± 0,05
CHAP-074	0,68 ± 0,24	0,35 ± 0,02	0,75 ± 0,11	0,75 ± 0,03	0,20 ± 0,00
CHAP-075	0,79 ± 0,06	0,31 ± 0,01	0,79 ± 0,04	0,62 ± 0,10	0,21 ± 0,10
CHAP-076	0,55 ± 0,01	0,52 ± 0,30	0,48 ± 0,05	0,78 ± 0,08	-
CHAP-077	0,71 ± 0,20	0,82 ± 0,15	0,68 ± 0,01	0,78 ± 0,33	-

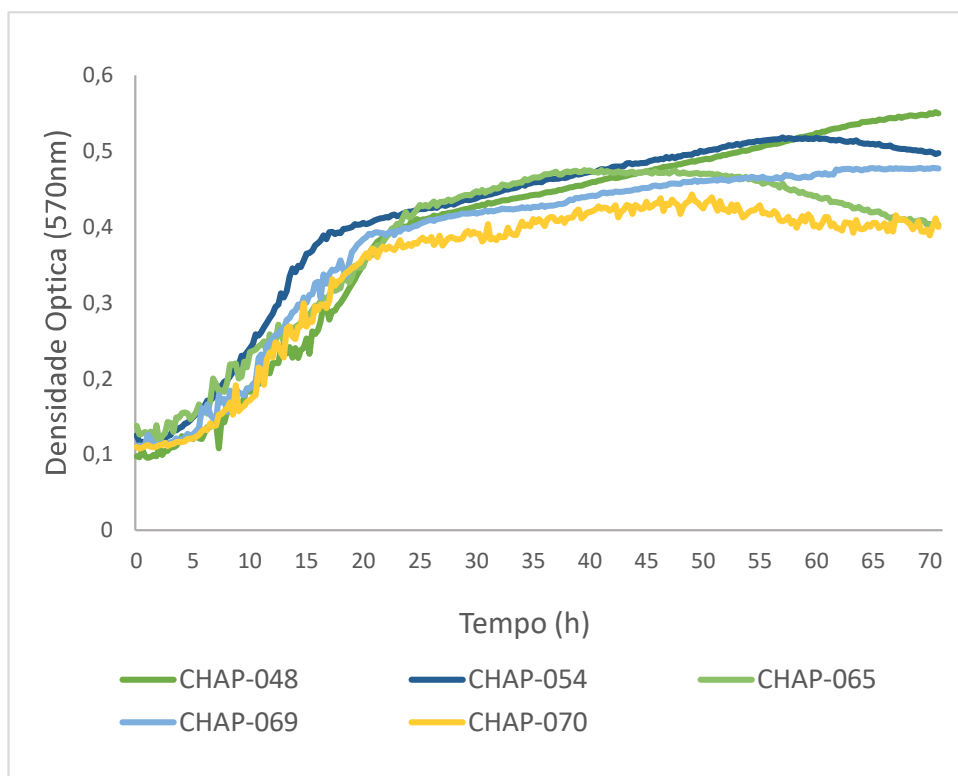
CHAP-078	$0,69 \pm 0,23$	$0,31 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,03$	-
CHAP-079	$0,51 \pm 0,11$	$0,68 \pm 0,16$	$0,84 \pm 0,06$	$0,74 \pm 0,04$	-
CHAP-080	$0,57 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,10$	$0,48 \pm 0,13$	$0,45 \pm 0,04$	-
CHAP-081	$0,71 \pm 0,18$	$0,47 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,04$	-
CHAP-082	$0,58 \pm 0,12$	$0,53 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,09$	$0,80 \pm 0,03$	-

(-) linhagem não apresentou crescimento celular no carboidrato.

Fonte: Elaborado pelo autor, (2024).

Na figura 2.2 encontram-se as curvas de crescimento em microescala das cinco linhagens que se destacaram diante do ácido galacturônico: CHAP-048, CHAP-054, CHAP-65, CHAP-069 e CHAP-070. As cinco cepas apresentaram valores de μ_{max} bastante semelhantes: 0,26, 0,29, 0,24, 0,25 e 0,28/h, respectivamente.

Figura 2.2 – Curvas de crescimento em microescala obtidas para o ácido galacturônico nas cepas da CHAP-048, CHAP-054, CHAP-65, CHAP-069 e CHAP-070.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2024).

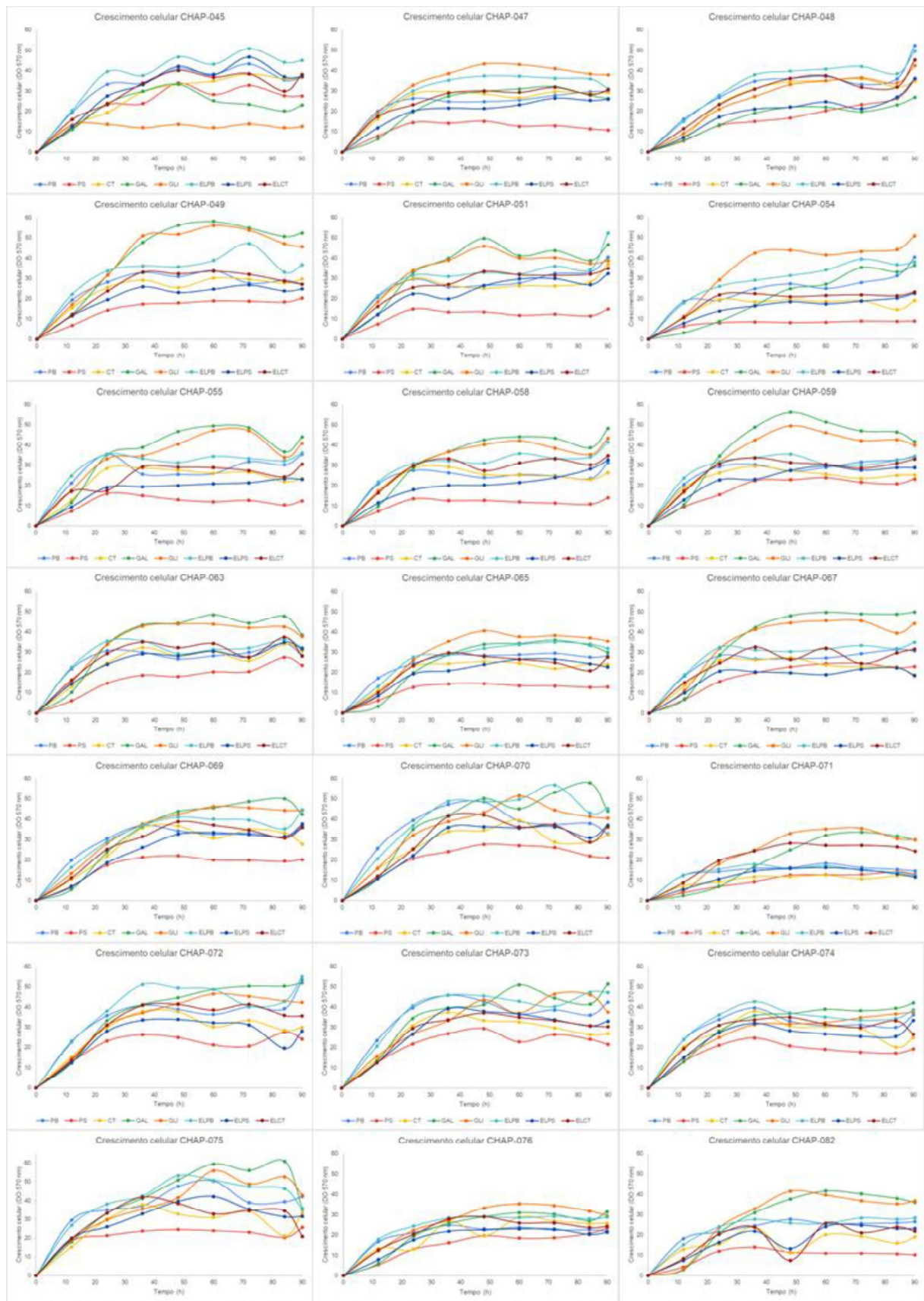
O ácido galacturônico é o principal composto presente na pectina e, desse modo, avaliar como essas leveduras se desenvolvem nesse açúcar é de suma importância para conseguir identificar leveduras capazes de transformar hidrolisados de pectina em produtos de interesse industrial.

2.3.3 Crescimento em frascos agitados

Através dos ensaios em microescala, foi possível avaliar os melhores desempenhos diante dos monossacarídeos que compõem a pectina. Desse modo, para subsequente análise em frascos agitados, foram escolhidas as onze cepas que melhor cresceram em ácido galacturônico e outras dez com base nos demais açúcares testados. Dessa forma, as seguintes linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer diante da pectina bruta que obtivemos (PB), da casca de laranja triturada (CT), da pectina comercial (PS) e dos monossacarídeos glicose (GLI) e galactose (GAL), com ou sem adição de pectinase de *A. niger*: CHAP-045, CHAP-047, CHAP-048, CHAP-049, CHAP-051, CHAP-054, CHAP-055, CHAP-058, CHAP-059, CHAP-063, CHAP-065, CHAP-067, CHAP-069, CHAP-070, CHAP-071, CHAP-072, CHAP-073, CHAP-074, CHAP-075, CHAP-076 e CHAP-082.

As vinte e uma linhagens acima foram capazes de crescer em todas as condições testadas (Figura 3). Os maiores crescimentos foram observados nos meios com glicose e galactose, por serem monômeros menos complexos para metabolização, tendo destaque para as cepas CHAP-049 e CHAP-070. Para os demais meios contendo PB, CT, PBE, PSE e CTE, as curvas de crescimento foram similares. E para o meio contendo apenas PS, as leveduras tiveram menor densidade óptica detectada.

Figura 2.3 – Perfis de crescimento celular das leveduras testadas em frascos com agitação contendo meios de PB, PS, CT, GLI, GAL, PBE, PSE e CTE.



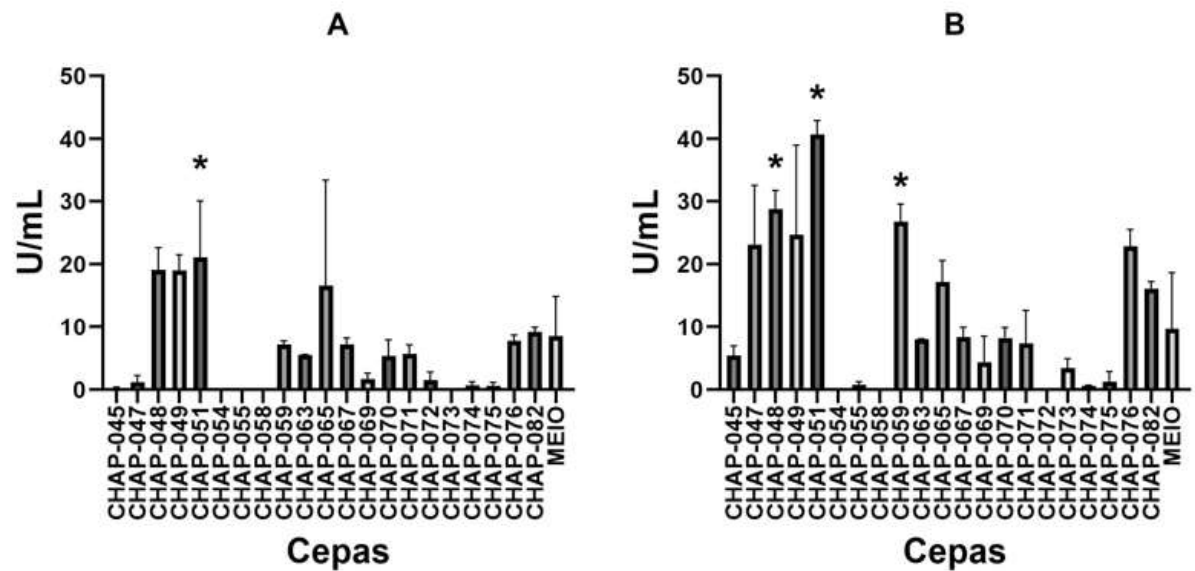
Fonte: Elaborado pelo autor, (2024).

2.3.4 Atividade enzimática

Os experimentos de atividade enzimática foram conduzidos com as vinte e uma linhagens testadas em frascos agitados. As capacidades pectinolíticas foram verificadas nos cultivos com pectina bruta extraída das cascas de laranja, pectina purificada da sigma e cascas de laranjas trituradas. Meios estéreis foram utilizados como controles negativos. Haja vista que os meios estéreis apresentaram algumas quantidades de açúcar redutor, todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com valor de $p < 0,05$, para verificar se os grupos amostrais diferiam significativamente do meio de cultura.

Assim, considerando a ANOVA para as atividades detectadas em meios com pectina bruta, a atividade pectinase da cepa CHAP-051 se destacou a 30°C (Figura 2.4-A). Para a temperatura de 50°C, três linhagens apresentaram atividade significativa: CHAP-048, CHAP-051 e CHAP-059 (Figura 2.4-B).

Figura 2.4 – Atividade enzimática nos meios contendo pectina bruta nas temperaturas de 30°C (A) e 50°C (B).

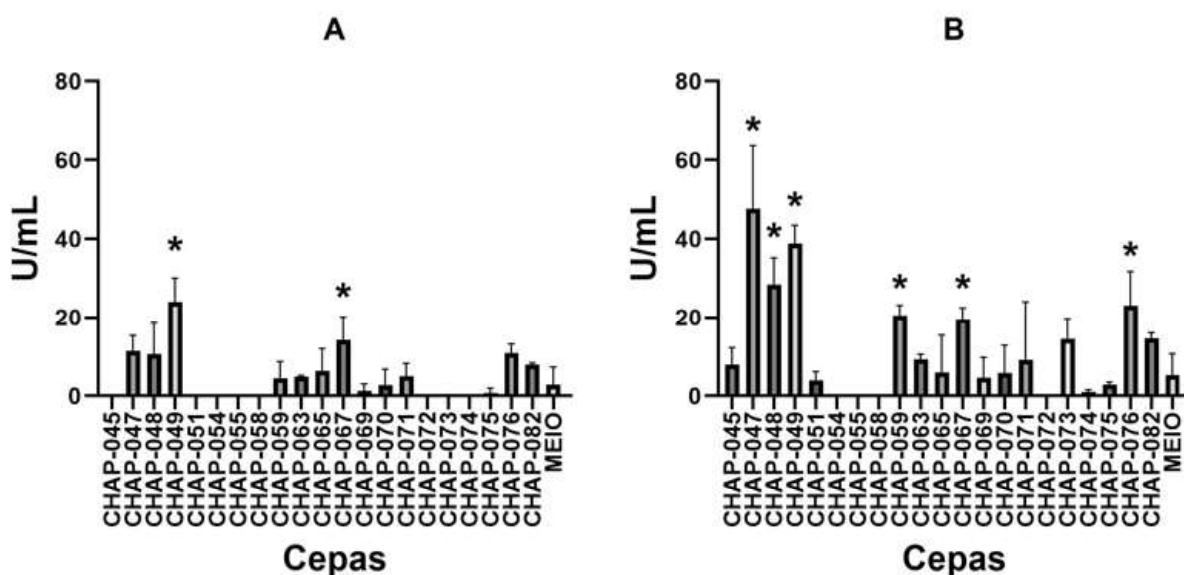


Fonte: Elaborado pelo autor, (2024)

Nos meios contendo a pectina da sigma, duas cepas apresentaram produção de pectinase detectável a 30°C: CHAP-049 e CHAP-067 (Figura 2.5-A), com 24,053 e 14,209 U/mL, respectivamente. Para a temperatura de 50°C, 6 cepas tiveram destaque, atividades de 47,723,

28,529, 38,856, 20,573, 19,600 e 23,124 U/mL para CHAP-047, CHAP-048, CHAP-049, CHAP-059, CHAP-067 e CHAP-076, respectivamente (Figura 2.5-B).

Figura 2.5 – Atividade enzimática nos meios contendo pectina sigma nas temperaturas de 30°C (A) e 50°C (B).



Fonte: Elaborado pelo autor, (2024).

A diferença entre o controle negativo e os sobrenadantes dos cultivos foi mais pronunciada quando os testes utilizaram amostras de meio contendo a pectina comercial (Sigma). Essa diferença é possivelmente devida ao menor grau de pureza da pectina bruta que aqui obtivemos. É provável que, nesse caso, açúcares redutores contaminantes da pectina bruta tenham elevado os valores do respectivo controle negativo.

Para o meio contendo as cascas trituradas, não foi identificado diferença significativa entre o meio estéril e os demais meios inoculados com as cepas de leveduras. Esse fato pode estar relacionado com os açúcares redutores presentes nas cascas de laranja.

As aplicações de preparação enzimática são limitadas pelo elevado custo das pectinases (Ma *et al.*, 2016). Desse modo, obter linhagens de leveduras capazes de promover a quebra da pectina em frações menores é extremamente desejável, o que demonstra o potencial biotecnológico desses microrganismos. Duas das linhagens aqui estudadas (CHAP-047 e CHAP-051) apresentaram atividade pectinolítica >40 U/mL. Esses dados, quando comparados aos da literatura (apontados acima), sugerem que essas leveduras poderiam ser utilizadas em atividades industriais que requeiram a hidrólise do polissacarídeo em questão.

2.4 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu realizar a caracterização físico-química de cascas de laranja. Além disso, cultivos celulares em microescala diante de cinco diferentes açúcares pécnicos (glicose, frutose, xilose, galactose e ácido galacturônico) permitiram identificar, dentre 38 linhagens isoladas de laranjas em decomposição, leveduras com alta velocidade específica de crescimento. Essas características são relevantes para atividades industriais que tenham resíduos de laranjas como matéria-prima ou hidrolisados pécnicos como substrato.

As análises enzimáticas apontaram sete cepas com atividade pectinase significativa. A obtenção de linhagens de leveduras capazes de catalisar a quebra da pectina em frações menores é altamente vantajosa, evidenciando o notável potencial biotecnológico dos microrganismos aqui caracterizados. Além disso, os dados sugerem que essas leveduras produzem pectinases com possíveis aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de biocombustíveis.

CAPÍTULO 3: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de resíduos de cascas de laranja na obtenção de etanol é uma prática promissora e sustentável que tem recebido crescente atenção devido aos seus benefícios econômicos e ambientais. As cascas de laranja, frequentemente descartadas como resíduos pela indústria de processamento de frutas, representam uma fonte rica em açúcares fermentáveis, tornando-as uma matéria-prima atrativa para a produção de biocombustíveis, como o etanol (Sharma *et al.*, 2017).

O processo de obtenção de etanol a partir de resíduos de cascas de laranja envolve várias etapas. Inicialmente, as cascas de laranja são coletadas e preparadas para extração dos açúcares presentes em sua composição. Este processo pode incluir a trituração das cascas para aumentar a área de superfície disponível para a extração e a aplicação de métodos enzimáticos ou químicos para quebrar as estruturas celulares e liberar os açúcares (Zema *et al.*, 2018).

Uma vez extraídos, os açúcares podem ser fermentados por leveduras em um ambiente controlado. As leveduras, assim, metabolizam esses carboidratos convertendo-os em etanol e dióxido de carbono por meio da fermentação alcoólica. Este processo é semelhante ao utilizado na produção de etanol a partir de outras fontes de biomassa, como grãos de cereais ou cana-de-açúcar (Peršurić *et al.*, 2020), embora os açúcares disponíveis à fermentação sejam distintos.

Após a fermentação, o líquido resultante, conhecido como mosto fermentado, passa por processos de destilação para separar o etanol do restante dos componentes presentes. O etanol obtido pode então ser purificado e utilizado como biocombustível em motores de combustão interna ou como aditivo em combustíveis convencionais (Zema *et al.*, 2018).

A utilização de resíduos de cascas de laranja na produção de etanol apresenta diversas vantagens. Além de aproveitar uma matéria-prima abundante e frequentemente subutilizada, esse processo contribui para a redução do volume de resíduos orgânicos destinados a aterros sanitários, ajudando a mitigar problemas ambientais associados à disposição inadequada de resíduos. Além disso, a produção de etanol a partir de fontes renováveis como as cascas de laranja contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa, ajudando a combater as mudanças climáticas (Suri; Singh; Nema, 2021).

A utilização de resíduos de cascas de laranja na obtenção de etanol utilizando leveduras representa uma abordagem sustentável e economicamente viável para a produção de biocombustíveis. Esse processo demonstra o potencial de aproveitamento de recursos naturais

renováveis e a importância da inovação na busca por soluções energéticas limpas e sustentáveis (Nirmal *et al.*, 2023).

Assim, no intuito de avaliar o efeito de diferentes variáveis sobre o desempenho fermentativo das leveduras, foi realizado um delineamento experimental com as 2 cepas (CHAP-070 e CHAP-074) que se destacaram nos experimentos apresentados no capítulo anterior.

3.2 METODOLOGIA

As leveduras selecionadas (CHAP-070 e CHAP-074) foram pré-crescidas pelo período de 48 h em meio sólido de YPDA (descrito no capítulo anterior) e então submetidas aos dois Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR) abaixo descritos, elaborados no software Protimiza Experimental Design (Rodrigues; Iemma, 2014). Após o pré-cultivo, os inóculos foram realizados com alça estéril calibrada de 1 uL.

Em um dos delineamentos, as cepas foram cultivadas em frascos Erlenmeyer preenchidos em 1/5 da capacidade com meio YPGAL (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 0,5% de galactose) com variação de pH e concentrações variáveis da pectina comercial da Sigma (PS) e da pectinase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich), conforme descrito na Tabela 3.1. Os frascos foram mantidos a 30°C sob uma agitação de 145 rpm por 90 h. Dentro desse período, foram realizadas coletas a cada 12 h para acompanhar o crescimento celular das leveduras. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer ® com o comprimento de onda de 570nm.

Tabela 3.1 – Valores codificados e reais para cada variável do Delineamento Composto Central Rotacional realizado com a Pectina comercial da Sigma e a Pectinase de *Aspergillus niger*.

Assay	Variáveis					
	Pectinase (mg)		pH		Pectina (%)	
	Codificados	Reais	Codificados	Reais	Codificados	Reais
1	-1	25	-1	5	-1	0,5
2	1	50	-1	5	-1	0,5
3	-1	25	1	9	-1	0,5
4	1	50	1	9	-1	0,5
5	-1	25	-1	5	1	1
6	1	50	-1	5	1	1
7	-1	25	1	9	1	1
8	1	50	1	9	1	1
9	-1,68	16,48	0	7	0	0,75
10	1,68	58,52	0	7	0	0,75
11	0	37,5	-1,68	3,64	0	0,75
12	0	37,5	1,68	10,36	0	0,75
13	0	37,5	0	7	-1,68	0,33
14	0	37,5	0	7	1,68	1,17
15	0	37,5	0	7	0	0,75
16	0	37,5	0	7	0	0,75
17	0	37,5	0	7	0	0,75

Fonte: Elaborado pelo autor, (2024)

Em cada coleta também foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada Erlenmeyer para centrifugação (9000 rpm/3 min) e armazenamento dos sobrenadantes a -20°C. Alíquotas dos meios antes do inóculo (t=0h) e os sobrenadantes dos três pontos correspondentes ao fim da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária (t=24h, t=36h e t=48h) foram filtrados (filtro de 0,45 µM) e analisados em HPLC. Para a determinação do etanol foi utilizado o HPLC LCMS-2020 com detector de índice de refração RID-10 (Shimadzu). A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87P sendo ajustada uma vazão de 0,6 mL/min cuja fase móvel era água Milli-Q®.

Em outro DCCR, as cepas foram cultivadas em YPGAL com variação de pH e concentrações variadas de hidrolisado de pectina (descrito no capítulo anterior), conforme distribuição apresentada na Tabela 3.2. Os cultivos foram realizados a 30°C e 145 rpm por 90 h. Amostras foram coletadas a cada 12 h para a determinação do crescimento celular e reserva de sobrenadantes. Além das amostras t=0h de cada meio, foram submetidas à análise em HPLC (conforme descrito acima) as amostras correspondentes ao fim da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária — neste caso, t=24h, t=36h e t=48h, para a CHAP-070, e t=24h, t=48h e t=72h, para a CHAP-074.

Tabela 3.2 – Valores codificados e reais para cada variável do Delineamento Composto Central Rotacional realizado com hidrolisado de pectina.

Assay	Variáveis			
	Hidrolisado (%)		pH	
	Codificados	Reais	Codificados	Reais
1	-1	0,5	-1	5
2	1	1	-1	5
3	-1	0,5	1	9
4	1	1	1	9
5	-1,41	0,4	0	7
6	1,41	1,1	0	7
7	0	0,75	-1,41	4,17
8	0	0,75	1,41	9,83
9	0	0,75	0	7
10	0	0,75	0	7
11	0	0,75	0	7

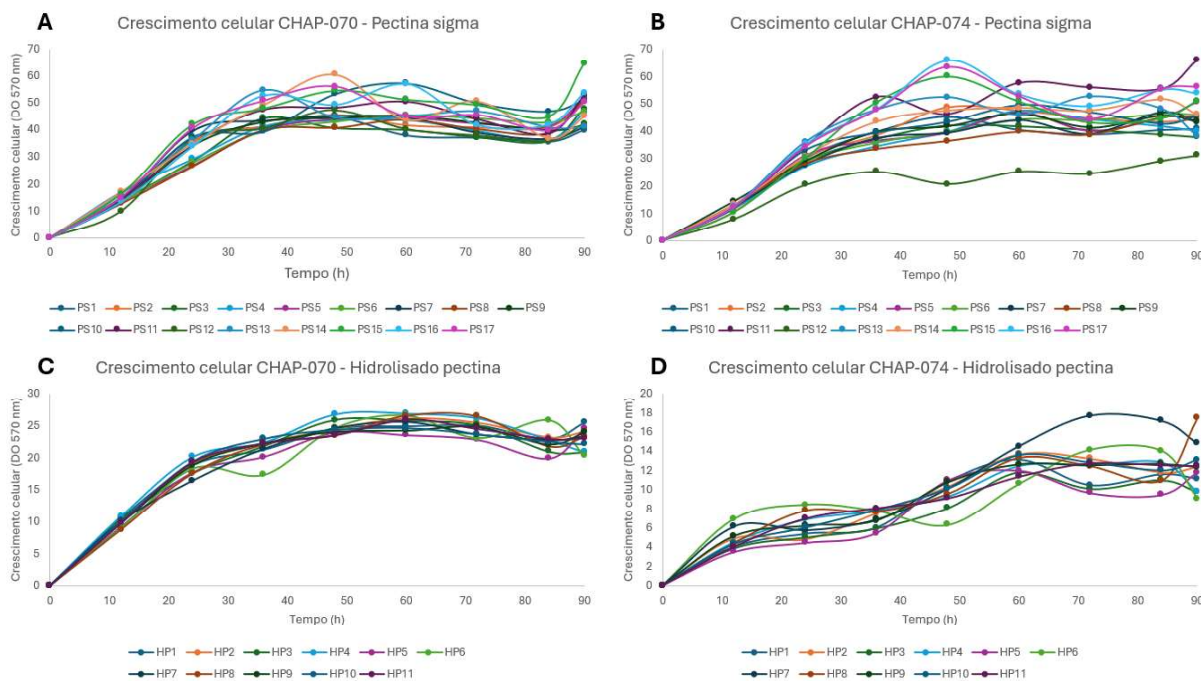
Fonte: Elaborado pelo autor, (2024)

Os dados obtidos por HPLC foram todos submetidos a análises estatísticas no software Protimiza (citado anteriormente) com um nível de significância de 10%. Como resposta dos delineamentos, foi avaliada a produção de etanol.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as cepas testadas foram capazes de crescer nas diferentes condições fornecidas através dos delineamentos experimentais. As amostras escolhidas para análise em HPLC foram as do t=0h; t=24h; t=36h e t=48h para os meios da pectina sigma em ambas as cepas escolhidas (CHAP-070 e CHAP-074). Para os experimentos com o hidrolisado de pectina na CHAP-070 foram escolhidos os t=0h; t=24h; t=36h e t=48h; e para a CHAP-074, t=0h; t=24h; t=48h e t=72h. A escolha dos diferentes tempos para as análises foi através das curvas de crescimento das leveduras, e os tempos escolhidos se deram por ser onde inicia a fase estacionária das leveduras, conforme Figura 3.1.

Figura 3.1 – Curvas de crescimentos CHAP-070 e CHAP-074 nos meios com pectina sigma e hidrolisado de pectina.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2024)

A produção de etanol obtida a partir dos experimentos realizados no delineamento experimental está disposta na Tabela 3.3. Nota-se que no meio contendo a pectina comercial, com a CHAP-070 nos experimentos 2 e 3, no $t=24h$, foram obtidas as maiores concentrações de etanol, sendo de 3343 e 3943 mg/L, respectivamente. Para a CHAP-074, os maiores valores obtidos foram de 1145 mg/L no $t=24h$ do experimento 16 e 1338mg/L no $t=36h$ do experimento 14. Na CHAP-074, observou-se que no $t=36h$, em alguns dos experimentos, o etanol não foi identificado, indicando que foi consumido pelos microrganismos. E após, no $t=48h$, se obteve concentrações de etanol novamente, podendo assim indicar que houve uma hidrólise da molécula de pectina e ocorreu novo processo de fermentação.

Para os experimentos onde foi utilizado o hidrolisado de pectina, a CHAP-070 teve concentrações mais elevadas na produção de etanol em relação a outra cepa testada (Tabela 3.3). As concentrações mais elevadas foram identificadas no $t=24h$, possuindo a concentração mais elevada de 909 mg/L no experimento 11. Pode-se identificar que no $t=48h$ e $t=72h$ não havia mais etanol nos meios, indicando o consumo do etanol pelos microrganismos.

Tabela 3.3 – Produção de etanol (mg/L) obtida nos diferentes meios de cultivos em diferentes tempos de coleta

Nº	Pectina sigma						Hidrolisado pectina					
	CHAP-070			CHAP-074			CHAP-070			CHAP-074		
	Produção etanol (mg/L)						Produção etanol (mg/L)					
	t=24h	t=36h	t=48h	t=24h	t=36h	t=48h	t=24h	t=36h	t=48h	t=24h	t=48h	t=72h
1	165	304	337	472	0	246	605	252	0	158	227	0
2	3343	289	357	626	0	294	705	238	0	150	375	0
3	3943	512	444	545	376	221	653	334	0	232	298	0
4	152	526	547	578	0	460	825	253	0	188	235	0
5	155	346	525	622	0	306	892	474	0	185	251	0
6	406	313	406	764	0	292	854	507	0	294	191	0
7	264	204	482	773	0	549	815	509	0	274	255	0
8	211	845	456	883	0	324	776	424	0	190	170	0
9	197	461	416	719	0	402	822	484	0	209	220	0
10	339	879	423	435	479	308	694	319	0	179	214	0
11	359	514	653	307	0	376	909	422	0	163	229	0
12	278	456	499	305	875	0	-	-	-	-	-	-
13	339	360	579	452	299	262	-	-	-	-	-	-
14	363	426	325	301	1338	344	-	-	-	-	-	-
15	437	158	534	315	163	0	-	-	-	-	-	-
16	586	729	723	1145	308	345	-	-	-	-	-	-
17	617	492	544	439	294	213	-	-	-	-	-	-

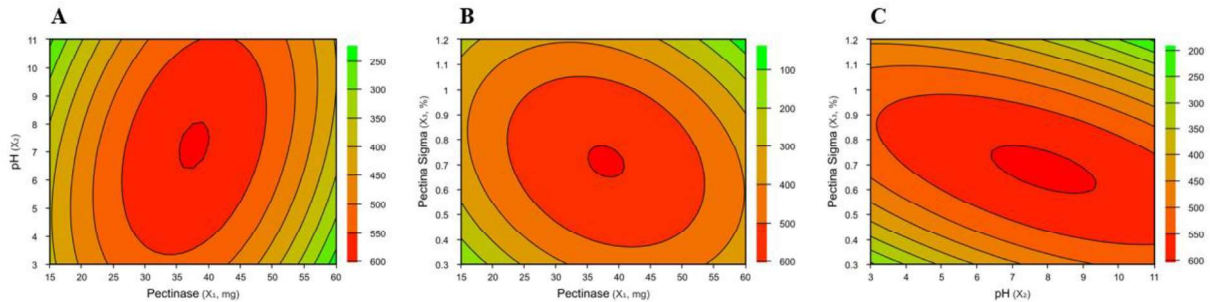
Fonte: Elaborado pelo autor, (2024).

Koutinas *et al.* (2016) exploraram o potencial de produção de etanol a partir de casca de laranja e obtiveram 54 g/L do álcool após a otimização de parâmetros com a levedura *Pichia kudriavzevii* KVMP10. No trabalho realizado por Kyriakou *et al.* (2020), que utilizaram hidrolisados sintéticos de resíduos de cascas cítricas (contendo glicose, frutose, sacarose), os autores verificaram até 63 g/L de etanol utilizando *S. cerevisiae* como microrganismo fermentador. Esses valores encontrados na literatura estão bastante acima dos encontrados no presente trabalho. Contudo, vale notar, especialmente neste último, que os açúcares disponibilizados são sabidamente fermentados com facilidade pelas leveduras, diferentemente das condições a que nós submetemos as linhagens CHAP-070 e CHAP-074.

A partir da análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos da produção de etanol nos meios contendo a pectina comercial, o valor do coeficiente de correlação mais elevado foi de $R^2=56,45\%$ para a CHAP-070 em $t=48h$. Apesar do baixo coeficiente de correlação, a análise dos gráficos de superfície resposta (Figura 3.2) sugerem que os valores intermediários de pH,

pectina e pectinase promovem as melhores condições para uma maior produção de etanol. Para a CHAP-074, os coeficientes foram todos inferiores a 50% (dados não mostrados).

Figura 3.2 – Superfícies de resposta para produção de etanol considerando pH vs concentração de pectinase (A), concentração de pectina vs concentração de pectinase (B) e concentração de pectina vs pH (C) para a linhagem CHAP-070 em t=48h.



Fonte: Elaborado pelo autor, (2024).

Para o meio contendo o hidrolisado de pectina, os coeficientes de correlação foram ainda menores, inviabilizando qualquer possibilidade de conclusão a partir dos dados obtidos.

3.4 CONCLUSÃO

O presente estudo tentou realizar a otimização das condições testadas através do DCCR com meios variando concentração de pectina, concentração de hidrolisado de pectina, pH, concentração de pectinase em fermentações conduzidas pelas cepas CHAP-070 e CHAP-074.

Foi possível constatar que houve pequenas concentrações de etanol produzidas através das cepas de leveduras testadas, entretanto, os resultados obtidos indicam os parâmetros testados não influenciaram na produção de etanol.

REFERÊNCIAS

- AKIN-AJANI, O. D. *et al.* Pharmaceutical Applications of Pectin. **Pectins - The New-Old Polysaccharides**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/78624>. Acesso em: 13 abr. 2024.
- ALBARELLO, Maria L.R. *et al.* Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of Spodoptera frugiperda Larvae. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 2046–2057, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-023-10616-4>. Acesso em: 31 mar. 2024.
- ALVES JR, S. L. *et al.* Engineered Saccharomyces or Prospected non-Saccharomyces: Is There Only One Good Choice for Biorefineries?. In: YEASTS: FROM NATURE TO BIOPROCESSES. [S. l.: s. n.], 2022b. p. 243–283. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/node/202241>.
- ALVES JÚNIOR, S. L.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Second-generation biorefinery: a Brazilian perspective. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 1075–1076, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00449-023-02901-5>.
- AMORIM, J. C.; PICCOLI, R. H.; DUARTE, W. F. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. **Food Research International**, [s. l.], v. 107, p. 518–527, 2018.
- ANDRADE BARRETO, S. M. *et al.* Effect of commercial yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) on fermentation metabolites, phenolic compounds, and bioaccessibility of Brazilian fermented oranges. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 408, p. 135121, 2023.
- ÁVILA, P. F. *et al.* Xylooligosaccharides production by commercial enzyme mixture from agricultural wastes and their prebiotic and antioxidant potential. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s. l.], v. 24, p. 100234, 2020.
- AYALA, J. R. *et al.* Characterization of Orange Peel Waste and Valorization to Obtain Reducing Sugars. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1348, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/5/1348>. Acesso em: 24 ago. 2023.
- BABBAR, N. *et al.* Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 594–606, 2016.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 319–337, 2015.
- BAI, F.-W.; YANG, S.; HO, N. W. Y. Fuel Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass. In: COMPREHENSIVE BIOTECHNOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 49–65.
- BAMPIDIS, V. A.; ROBINSON, P. H. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, [s. l.], v. 128, n. 3–4, p. 175–217, 2006.
- BAPTISTA, S. L. *et al.* Development of a sustainable bioprocess based on green technologies for xylitol production from corn cob. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 156, p. 112867, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669020307846>.

- BAPTISTA, S. L. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top value chemicals from biorefinery carbohydrates. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 47, p. 107697, 2021.
- BARRICK, J. E.; LENSKE, R. E. Genome dynamics during experimental evolution. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 827–839, 2013.
- BASSIM ATTA, M.; RUIZ-LARREA, F. Fungal Pectinases in Food Technology. *In*: PECTINS - THE NEW-OLD POLYSACCHARIDES. [S. l.]: IntechOpen, 2022. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/79994>.
- BIZ, A. *et al.* The introduction of the fungal d-galacturonate pathway enables the consumption of d-galacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 144, 2016.
- BONATTO, C. *et al.* Microbiology of biofuels: Cultivating the future. *In*: RELATIONSHIP BETWEEN MICROBES AND THE ENVIRONMENT FOR SUSTAINABLE ECOSYSTEM SERVICES, VOLUME 3. [S. l.]: Elsevier, 2023. p. 15–42. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323899369000059>.
- BRANDON, A. G.; SCHELLER, H. V. Engineering of Bioenergy Crops: Dominant Genetic Approaches to Improve Polysaccharide Properties and Composition in Biomass. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 11, 2020.
- BREXÓ, R. P. *et al.* Yeasts from indigenous culture for cachaça production and brewer's spent grain: Biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 124, p. 107–120, 2020. Disponível em: Acesso em: 3 abr. 2024.
- CÁMARA, E. *et al.* Data mining of *Saccharomyces cerevisiae* mutants engineered for increased tolerance towards inhibitors in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 57, p. 107947, 2022.
- CARSANBA, E.; PINTADO, M.; OLIVEIRA, C. Fermentation Strategies for Production of Pharmaceutical Terpenoids in Engineered Yeast. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 295, 2021.
- CARVALHO, J. K. *et al.* Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 30, p. e00630, 2021. Disponível em: Acesso em: 3 abr. 2024.
- CARVALHO, L. C. *et al.* Phenolic compounds modulation in β -farnesene fed-batch fermentation using sugarcane syrup as feedstock. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 188, p. 115721, 2022.
- CHEN, O. *et al.* Screening antagonistic yeasts against citrus green mold and the possible biocontrol mechanisms of *Pichia galeiformis* (<scp>BAF03</scp>). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 100, n. 10, p. 3812–3821, 2020.
- CHO, E. J. *et al.* Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 298, p. 122386, 2020.
- COELHO, E. M. *et al.* Multivariate chemometric analysis for the evaluation of 22 Citrus fruits growing in Brazil's semi-arid region. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 101, p. 103964, 2021.
- CONCHA OLMOS, J.; ZÚÑIGA HANSEN, M. E. Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a potential source for functional carbohydrates. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 192, p. 29–36, 2012.

- CORDEnte, A. G. *et al.* Novel wine yeast with ARO4 and TYR1 mutations that overproduce ‘floral’ aroma compounds 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 14, p. 5977–5988, 2018a.
- CORDEnte, A. G. *et al.* Novel wine yeast with ARO4 and TYR1 mutations that overproduce ‘floral’ aroma compounds 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 14, p. 5977–5988, 2018b.
- COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 850–861, 2005.
- CYPRIANO, D. Z.; DA SILVA, L. L.; TASIC, L. High value-added products from the orange juice industry waste. **Waste Management**, [s. l.], v. 79, p. 71–78, 2018.
- DA SILVA, L. M. R. *et al.* Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, [s. l.], v. 143, p. 398–404, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24054258/>. Acesso em: 31 mar. 2024.
- DASILVA, E. *et al.* Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 859–865, 2005.
- DÁVILA, J. A.; ROSENBERG, M.; CARDONA, C. A. Techno-economic and Environmental Assessment of p-Cymene and Pectin Production from Orange Peel. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 253–261, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-014-9339-y>. Acesso em: 3 abr. 2024.
- DE LA TORRE, I. *et al.* Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 15, p. 5975–5991, 2019.
- DE LOURDES CHAVES MACÊDO, E. *et al.* Yeasts from fermented Brazilian fruits as biotechnological tools for increasing phenolics bioaccessibility and improving the volatile profile in derived pulps. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 401, p. 134200, 2023.
- DE MELO PEREIRA, G. V. *et al.* What Is Candida Doing in My Food? A Review and Safety Alert on Its Use as Starter Cultures in Fermented Foods. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 9, 2022. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC9502980/>. Acesso em: 13 abr. 2024.
- DI FRANCESCO, A. *et al.* Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, [s. l.], v. 81, p. 8–14, 2015.
- DIEN, B. S. *et al.* Screening for l-arabinose fermenting yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 57–58, n. 1, p. 233–242, 1996.
- DRESCH, A. P. *et al.* Different treatments of pearl millet for cellulose recovery: effects on lignocellulosic composition. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://www.researchsquare.com>. Acesso em: 31 mar. 2024.
- DU, J.; SHAO, Z.; ZHAO, H. Engineering microbial factories for synthesis of value-added products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 873–890, 2011.
- FAKAYODE, O. A.; ABOBI, K. E. Optimization of oil and pectin extraction from orange (*Citrus sinensis*) peels: a response surface approach. **Journal of Analytical Science and Technology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://jast-journal.springeropen.com/articles/10.1186/s40543-018-0151-3>. Acesso em: 3 abr. 2024.

- FARIAS, D.; MAUGERI-FILHO, F. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar composition. **Fuel**, [s. l.], v. 288, p. 119673, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236120326697>.
- FAZZINO, F. *et al.* Integral valorization of orange peel waste through optimized ensiling: Lactic acid and bioethanol production. **Chemosphere**, [s. l.], v. 271, p. 129602, 2021.
- FENG, C. *et al.* Synthetic Biology-Driven Microbial Production of Resveratrol: Advances and Perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, 2022.
- FENNER, E. D. *et al.* Nature's Most Fruitful Threesome: The Relationship between Yeasts, Insects, and Angiosperms. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 984, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/8/10/984>.
- FIERASCU, R. C. *et al.* Fruits By-Products – A Source of Valuable Active Principles. A Short Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, 2020.
- FLEURI, L. F. *et al.* Biochemical characterisation and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 49, n. 12, p. 2585–2591, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12589>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- FREMPONG, K. E. B. *et al.* Study on textural changes and pectin degradation of tarocco blood Orange during storage. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 344–358, 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2022.2032736>.
- GAIND, S. Exploitation of Orange Peel for Fungal Solubilization of Rock Phosphate by Solid State Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1351–1360, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-016-9682-2>. Acesso em: 3 abr. 2024.
- GAWKOWSKA, D.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review. **Polymers**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2018. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC6404037/>. Acesso em: 9 abr. 2024.
- GÓMEZ, B. *et al.* Production of pectin-derived oligosaccharides from lemon peels by extraction, enzymatic hydrolysis and membrane filtration. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 234–247, 2016.
- GONG, C.-S. *et al.* Production of Ethanol from α -Xylose by Using α -Xylose Isomerase and Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 430–436, 1981.
- GOULA, A. M.; LAZARIDES, H. N. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 167, p. 45–50, 2015. Disponível em: Acesso em: 31 mar. 2024.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Xylitol market analysis by application**. [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/xylitol-market>.
- GRASSINO, A. N. *et al.* Analytical tools used for the identification and quantification of pectin extracted from plant food matrices, wastes and by-products: A review. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 266, p. 47–55, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618309178>.
- GREMBECKA, M.; LEBIEDZIŃSKA, A.; SZEFER, P. Simultaneous separation and determination of erythritol, xylitol, sorbitol, mannitol, maltitol, fructose, glucose, sucrose and maltose in food products

by high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detector. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 117, p. 77–82, 2014.

GU, Y. *et al.* Engineering *Yarrowia lipolytica* as a Chassis for De Novo Synthesis of Five Aromatic-Derived Natural Products and Chemicals. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 2096–2106, 2020.

GULLÓN, B. *et al.* Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 153–161, 2013.

GUZMÁN, J. L. *et al.* The Use of Concentrates Rich in Orange By-Products in Goat Feed and Its Effects on Physico-Chemical, Textural, Fatty Acids, Volatile Compounds and Sensory Characteristics of the Meat of Suckling Kids. **Animals**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 766, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/5/766>.

HAILE, M.; KANG, W. H. Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 401, 2019.

HAILE, S.; AYELE, A. Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/1881305>. Acesso em: 3 abr. 2024.

HE, Q. *et al.* Production of resveratrol from glycerol by engineering different metabolic pathways in *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering Communications**, [s. l.], v. 11, p. e00146, 2020.

HE, Y. *et al.* Production of xylitol by *Saccharomyces cerevisiae* using waste xylose mother liquor and corncob residues. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 2059–2071, 2021.

HICKERT, L. R. *et al.* Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 143, p. 112–116, 2013.

HONG, W. *et al.* Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 328–335, 2012.

HOOPER, D. U. *et al.* A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. **Nature** **2012** **486**:7401, [s. l.], v. 486, n. 7401, p. 105–108, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature11118>. Acesso em: 13 abr. 2024.

HUANG, R. *et al.* Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. **Biological Control**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 53–63, 2012.

HUISJES, E. H. *et al.* Galacturonic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on galactose, xylose, and arabinose. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 15, p. 5052–5059, 2012. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.07617-11>. Acesso em: 17 abr. 2024.

INÊS, C. *et al.* Aerobic growth physiology of *Saccharomyces cerevisiae* on sucrose is strain-dependent. **bioRxiv**, [s. l.], p. 2021.02.25.432870, 2021. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.02.25.432870v1>. Acesso em: 3 abr. 2024.

IÑIGUEZ-MORENO, M. *et al.* Enhancing pectin extraction from orange peel through citric acid-assisted optimization based on a dual response. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 263, p. 130230, 2024. Disponível em: Acesso em: 3 abr. 2024.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: [s. n.], 2008.

- JANG, S.-K. *et al.* An integrated biorefinery process for mandarin peel waste elimination. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 371, p. 133594, 2022.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 285–290, 2001.
- JEONG, D. *et al.* Simultaneous fermentation of galacturonic acid and five-carbon sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 295, p. 122259, 2020. Disponível em: Acesso em: 17 abr. 2024.
- JHA, P. *et al.* Valorisation of orange peel: supplement in fermentation media for ethanol production and source of limonene. **Environmental Sustainability**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 33–41, 2019.
- JOSHI, S. M. *et al.* Bio-ethanol and bio-butanol production from orange peel waste. **Biofuels**, [s. l.], v. 6, n. 1–2, p. 55–61, 2015.
- KANASHIRO, A. M. *et al.* *Penicillium italicum*: An Underexplored Postharvest Pathogen. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 606852, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.606852/full>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- KANG, N. K. *et al.* L-malic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 2000431, 2022.
- KARLOVIĆ, A. *et al.* By-Products in the Malting and Brewing Industries—Re-Usage Possibilities. **Fermentation** 2020, Vol. 6, Page 82, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 82, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/3/82/htm>. Acesso em: 13 abr. 2024.
- KONG, H. *et al.* **Progress in Preparation, Purification, and Biological Activities of Pectic Oligosaccharides**. [S. l.]: Chinese Chamber of Commerce, 2023.
- KOUTINAS, M. *et al.* High temperature alcoholic fermentation of orange peel by the newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* KVMP10. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 75–83, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1111/lam.12514>. Acesso em: 14 abr. 2024.
- KUMAR, K.; SINGH, E.; SHRIVASTAVA, S. Microbial xylitol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 971–979, 2022.
- KYRIAKOU, M. *et al.* Enhancing bioproduction and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* via cell immobilization on biochar: Application in a citrus peel waste biorefinery. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 155, p. 53–64, 2020. Disponível em: Acesso em: 14 abr. 2024.
- LEE, T. Y. *et al.* A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 27–31, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02932349>. Acesso em: 4 abr. 2024.
- LEE, Y.-G. *et al.* Cas9-Based Metabolic Engineering of *Issatchenkia orientalis* for Enhanced Utilization of Cellulosic Hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 70, n. 38, p. 12085–12094, 2022.
- LELOIR, L. F. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 186–190, 1951.
- LENHART, A.; CHEY, W. D. A Systematic Review of the Effects of Polyols on Gastrointestinal Health and Irritable Bowel Syndrome. **Advances in Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 587–596, 2017.

- LI, M. *et al.* Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 36827, 2016.
- LIMA, C. A. *et al.* Process development and techno-economic analysis of co-production of colorants and enzymes valuing agro-industrial citrus waste. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 35, p. 101204, 2023.
- LIU, H. *et al.* An accessory enzymatic system of cellulase for simultaneous saccharification and co-fermentation. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 101, 2022.
- LIU, J. *et al.* Protein and metabolic engineering for the production of organic acids. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 239, p. 412–421, 2017.
- MA, X. *et al.* Synergistic Effect and Mechanisms of Combining Ultrasound and Pectinase on Pectin Hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1249–1257, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-016-1689-y>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- MACÊDO, E. de L. C. *et al.* Yeasts from fermented Brazilian fruits as biotechnological tools for increasing phenolics bioaccessibility and improving the volatile profile in derived pulps. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 401, p. 134200, 2023.
- MADEIRA, J. V.; MACEDO, G. A. Simultaneous extraction and biotransformation process to obtain high bioactivity phenolic compounds from brazilian citrus residues. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 1273–1279, 2015.
- MAKOPA, T. P. *et al.* The *marula* and elephant intoxication myth: assessing the biodiversity of fermenting yeasts associated with marula fruits (*Sclerocarya birrea*). **FEMS Microbes**, [s. l.], v. 4, 2023.
- MARI, M. *et al.* Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. **Biological Control**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 132–140, 2012.
- MARTINS, L. C. *et al.* Valorisation of pectin-rich agro-industrial residues by yeasts: potential and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 104, n. 15, p. 6527–6547, 2020.
- MARTINS, M.; GOLDBECK, R. Integrated biorefinery for xylooligosaccharides, pectin, and bioenergy production from orange waste. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 1775–1788, 2023.
- MATHEW, A. K. *et al.* Lignocellulosic Biorefinery Wastes, or Resources?. *In*: WASTE BIOREFINERY. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 267–297.
- MEIYANTO, E.; HERMAWAN, A.; ANINDYAJATI, A. Natural Products for Cancer-Targeted Therapy: Citrus Flavonoids as Potent Chemopreventive Agents. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 427–436, 2012.
- MENEGON, Y. A.; GROSS, J.; JACOBUS, A. P. How adaptive laboratory evolution can boost yeast tolerance to lignocellulosic hydrolyses. **Current Genetics**, [s. l.], v. 68, n. 3–4, p. 319–342, 2022.
- MINZANOVA, S. *et al.* Biological Activity and Pharmacological Application of Pectic Polysaccharides: A Review. **Polymers**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1407, 2018.
- MISHRA, P.; PANDA, B. Polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation by a mangrove isolated cyanobacteria *Limnithrix planktonica* using fruit waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 252, p. 126503, 2023.

- MOHARIB, S. A.; EL-SAYED, S. T.; JWANNY, E. W. Evaluation of enzymes produced from yeast. **Nahrung/Food**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 47–51, 2000.
- MONTILLA, A.; MUÑOZ-ALMAGRO, N.; VILLAMIEL, M. A new approach of functional pectin and pectic oligosaccharides: role as antioxidant and antiinflammatory compounds. *In: CURRENT ADVANCES FOR DEVELOPMENT OF FUNCTIONAL FOODS MODULATING INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS*. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 105–120.
- MOYSES, D. *et al.* Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 207, 2016.
- NAKAGAWA, T. *et al.* A cold-active pectin lyase from the psychrophilic and basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 193–196, 2005.
- NANDAL, P.; SHARMA, S.; ARORA, A. Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 147, p. 1694–1703, 2020.
- NAQASH, F. *et al.* Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 168, p. 227–239, 2017. Disponível em: Acesso em: 9 abr. 2024.
- NEETHU, C. S. *et al.* Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 703–709, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818115001206>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- NEITZEL, T. *et al.* RNA-seq based transcriptomic analysis of the non-conventional yeast *Spathaspora passalidarum* during Melle-boinot cell recycle in xylose-glucose mixtures. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 201, p. 486–498, 2022.
- NIRMAL, N. P. *et al.* Valorization of Fruit Waste for Bioactive Compounds and Their Applications in the Food Industry. **Foods**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–26, 2023.
- NOORI, S. D. *et al.* In-vitro evaluation of anticancer activity of natural flavonoids, apigenin and hesperidin. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 60, p. 1840–1843, 2022.
- NORMAND, J.; BONNIN, E.; DELAVAUULT, P. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of an *Irpex lacteus* rhamnogalacturonan hydrolase tolerant to acetylated rhamnogalacturonan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 1543–1552, 2012.
- OBEROI, H. S. *et al.* Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 3422–3429, 2010.
- OLOCHE, J.; ATOOSHI, M. Z.; TYOKASE, M. U. Growth performance and blood profile of West African Dwarf (WAD) goats fed varying levels of treated sweet orange peels. **Tropical Animal Health and Production**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 131–136, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11250-018-1667-7>.
- ORO, L. *et al.* Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. **Postharvest Biology and Technology**, [s. l.], v. 96, p. 64–68, 2014.

- ORO, L. *et al.* Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 265, p. 18–22, 2018.
- ORTIZ-SANCHEZ, M. *et al.* Pre-feasibility analysis of the production of mucic acid from orange peel waste under the biorefinery concept. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 161, p. 107680, 2020. Disponível em: Acesso em: 2 abr. 2024.
- ORTIZ-SANCHEZ, M. *et al.* Valorization routes of citrus waste in the orange value chain through the biorefinery concept: The Argentina case study. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [s. l.], v. 189, p. 109407, 2023.
- PALIGA, L. R. *et al.* Feedstock for Second-Generation Bioethanol Production. In: LIQUID BIOFUELS: BIOETHANOL . [S. l.: s. n.], 2022. p. 165–186. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-01241-9_8.
- PANDA, S. K. *et al.* Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, [s. l.], v. 146, p. 161–172, 2016.
- PANDA, S. K.; MAITI, S. K. Novel cyclic shifting of temperature strategy for simultaneous saccharification and fermentation for lignocellulosic bioethanol production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 391, p. 129975, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852423014037>.
- PANIKOV, N. S. 1.20 - Microbial Growth Dynamics. **Comprehensive Biotechnology**, [s. l.], v. 1, p. 257–284, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/220042951>. Acesso em: 13 abr. 2024.
- PAPOUTSIS, K. *et al.* Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 86, p. 479–491, 2019. Disponível em: Acesso em: 31 mar. 2024.
- PATSALOU, M. *et al.* A biorefinery for conversion of citrus peel waste into essential oils, pectin, fertilizer and succinic acid via different fermentation strategies. **Waste Management**, [s. l.], v. 113, p. 469–477, 2020.
- PEREIRA, R. *et al.* Adaptive laboratory evolution of tolerance to dicarboxylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 56, p. 130–141, 2019.
- PEREYRA, M. M. *et al.* Screening Methods for Isolation of Biocontrol Epiphytic Yeasts against *Penicillium digitatum* in Lemons. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 166, 2021.
- PEREYRA, M. M. *et al.* Volatile organic compounds of *Clavispora lusitaniae* AgL21 restrain citrus postharvest pathogens. **Biological Control**, [s. l.], v. 174, p. 105025, 2022.
- PERPELEA, A. *et al.* Towards valorization of pectin-rich agro-industrial residues: Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for co-fermentation of d-galacturonic acid and glycerol. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 69, p. 1–14, 2022.
- PERŠURIĆ, Ž. *et al.* Assessment of the Biological Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 24, p. 1–13, 2020.

- PHYO, P. *et al.* Effects of Pectin Molecular Weight Changes on the Structure, Dynamics, and Polysaccharide Interactions of Primary Cell Walls of *Arabidopsis thaliana*: Insights from Solid-State NMR. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 2937–2950, 2017.
- PIMENTEL, T. C. *et al.* Understanding the potential of fruits, flowers, and ethnic beverages as valuable sources of techno-functional and probiotics strains: Current scenario and main challenges. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 114, p. 25–59, 2021.
- PROTZKO, R. J. *et al.* Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of d-galacturonic acid and d-glucose from citrus peel waste. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5059, 2018.
- PROTZKO, R. J. *et al.* Genomewide and Enzymatic Analysis Reveals Efficient D-Galacturonic Acid Metabolism in the Basidiomycete Yeast *Rhodospiridium toruloides*. **mSystems**, [s. l.], v. 4, n. 6, 2019. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.00389-19>.
- RABETAFIKA, H. N. *et al.* Fractionation of apple by-products as source of new ingredients: Current situation and perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 99–114, 2014.
- RAKHMANOV, S. *et al.* Construction of mathematical modelling of a population of microalgae. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s. l.], v. 939, n. 1, p. 012054, 2021. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/939/1/012054>. Acesso em: 13 abr. 2024.
- RÊGO, E. S. B. *et al.* Cashew wine and volatile compounds produced during fermentation by non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeast. **LWT**, [s. l.], v. 126, p. 109291, 2020.
- RICHARD, P.; HILDITCH, S. d-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 597–604, 2009.
- RIVAS, B. *et al.* Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 2380–2387, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf073388r>. Acesso em: 3 abr. 2024.
- RODRIGUES, C. I. S.; WAHL, A.; GOMBERT, A. K. Aerobic growth physiology of *Saccharomyces cerevisiae* on sucrose is strain-dependent. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 21, 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/femsyr/foab021>. Acesso em: 4 abr. 2024.
- ROMERO-DÍEZ, R. *et al.* Phenolic characterization of aging wine lees: Correlation with antioxidant activities. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 259, p. 188–195, 2018.
- RUIZ, B.; FLOTATS, X. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. **Waste Management**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 2063–2079, 2014.
- SAADATINAVAZ, F.; KARIMI, K.; DENAYER, J. F. M. Hydrothermal pretreatment: An efficient process for improvement of biobutanol, biohydrogen, and biogas production from orange waste via a biorefinery approach. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 341, p. 125834, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852421011755>.
- SÁEZ-SÁEZ, J. *et al.* Engineering the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for high-level resveratrol production. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 62, p. 51–61, 2020.
- SANTOS, A. A. dos *et al.* Dosagem de açúcares redutores com o reagente DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 20, n. 0, 2017. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232017000100402&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 23 ago. 2023.

SANTOS, C. M. *et al.* Application of orange peel waste in the production of solid biofuels and biosorbents. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 196, p. 469–479, 2015. Disponível em: Acesso em: 31 mar. 2024.

SANTOS, L. B. *et al.* Bioplastics from orange processing byproducts by an ecoefficient hydrothermal approach. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 38, p. 101114, 2023.

SATAPATHY, S. *et al.* Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 7, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2020.00117/full>.

SCAPINI, T. *et al.* Bioenergy and beyond. In: GREEN APPROACH TO ALTERNATIVE FUEL FOR A SUSTAINABLE FUTURE. [S. l.]: Elsevier, 2023a. p. 335–347. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128243183000151>.

SCAPINI, T. *et al.* Bioethanol and biomethane production from watermelon waste: A circular economy strategy. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 170, p. 106719, 2023b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096195342300017X>.

SCAPINI, T. *et al.* Bioethanol and biomethane production from watermelon waste: A circular economy strategy. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 170, p. 106719, 2023c. Disponível em: Acesso em: 31 mar. 2024.

SCAPINI, T. *et al.* Microbial Enzymes in Action with Bioethanol. In: MICROBIAL BIOPROCESSING OF AGRI-FOOD WASTES. Boca Raton: CRC Press, 2023d. p. 23–47. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781003341017/chapters/10.1201/9781003341017-2>.

SCAPINI, T. *et al.* Spathaspora and Scheffersomyces: Promising Roles in Biorefineries. In: ALVES JÚNIOR, S. L. *et al.* (org.). **Yeasts: From Nature to Bioprocesses**. 1. ed. [S. l.]: Bentham Science Publisher, 2022. v. 1, p. 216–242.

SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 2

SCOPEL, E. **Aproveitamento integral do capim elefante na produção de etanol celulósico**. 2019. - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

ŠELO, G. *et al.* A Comprehensive Review on Valorization of Agro-Food Industrial Residues by Solid-State Fermentation. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 927, 2021.

SEPÚLVEDA, L. *et al.* Ellagic acid production using polyphenols from orange peel waste by submerged fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 43, p. 1–7, 2020. Disponível em: Acesso em: 2 abr. 2024.

SEYFRIED, M. *et al.* Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 201–214, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/8spB3JMTYHfCSxF9mxPB5BH/?lang=pt>. Acesso em: 13 abr. 2024.

SHARMA, K. *et al.* Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. **Nutrition**, [s. l.], v. 34, p. 29–46, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900716302131>. Acesso em: 23 ago. 2023.

SINGH, B. *et al.* Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. **Food Research International**, [s. l.], v. 132, p. 109114, 2020.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, [s. l.], p. 1–17, 2008. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34289991/Determination-Structural-Carbohydrates-L...-libre.pdf?1406295125=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DA_national_laboratory_of_the_National_Re.pdf&Expires=1711971737&Signature=Mdf1Rxw~3zrUkNLoo58ByhwJHg7x3016oj7mJxtLD5NqT9sv55rF5QVUN4Ao5dRumB7Rn~xk7EyoQENMIOq1ovB1UyaKD3-EmL~JqWsNhWP669MGMWLKU6EFLD-PHWsIuSXoq4Zj4W4vrJL6VUJWGFpQoS8WV8JRHcW9nQFixX5yj0y3Uq04nrx3XixZ978OYyphj53g9eqVRUuuONVvd9Gk6~Ks6mBHnPnkYdVDzTT6E7mBPFyxhYipz4I7upq7RSirBPeaK1L1LLG1YloKcVEWkk8U7YeniARuYmIhMsdU3W8tdPdgo6Bu71oeIfUMJyz0dZzq1fjBR7uVVigRyw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA. Acesso em: 31 mar. 2024.

SLUITER, A. *et al.* Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass - NREL/TP-510-42618. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, [s. l.], n. April 2008, p. 17, 2012.

SOONG, Y.-Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 411–417, 2004.

STINCO, C. M. *et al.* Influence of high pressure homogenization and pasteurization on the in vitro bioaccessibility of carotenoids and flavonoids in orange juice. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 331, p. 127259, 2020.

STOVICEK, V. *et al.* Rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of dicarboxylic acids from lignocellulosic biomass and exploring genetic mechanisms of the yeast tolerance to the biomass hydrolysate. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 22, 2022.

SUDEEP, K. C. *et al.* Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. **Fermentation 2020, Vol. 6, Page 59**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 59, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-5637/6/2/59/htm>. Acesso em: 4 abr. 2024.

SURI, S.; SINGH, A.; NEMA, P. K. Recent advances in valorization of citrus fruits processing waste: a way forward towards environmental sustainability. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 13, p. 1601–1626, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00984-y>.

TADIOTO, V. *et al.* Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 1–14, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-021-03221-0>. Acesso em: 31 mar. 2024.

TADIOTO, V. *et al.* Bioactive Compounds from and against Yeasts in the One Health Context: A Comprehensive Review. **Fermentation**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 363, 2023.

TALEKAR, S. *et al.* Food waste biorefinery towards circular economy in Australia. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 388, p. 129761, 2023.

TRAN, V. G.; ZHAO, H. Engineering robust microorganisms for organic acid production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 49, n. 2, 2022.

TSOUKO, E. *et al.* Integrated biorefinery development for the extraction of value-added components and bacterial cellulose production from orange peel waste streams. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 160, p. 944–954, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148120308065>.

TSUKAMOTO, J.; DURÁN, N.; TASIC, L. Nanocellulose and Bioethanol Production from Orange Waste using Isolated Microorganisms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], 2013.

TWERDOCHLIB, A. L. *et al.* L-Rhamnose metabolism in *Pichia stipitis* and *Debaryomyces polymorphus*. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 896–902, 1994.

VADALÀ, R. *et al.* A Sustainable Strategy for the Conversion of Industrial Citrus Fruit Waste into Bioethanol. **Sustainability**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 9647, 2023.

VAEZ, S. *et al.* An optimal biorefinery development for pectin and biofuels production from orange wastes without enzyme consumption. **Process Safety and Environmental Protection**, [s. l.], v. 152, p. 513–526, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0957582021003037>.

VAN MARIS, A. J. A. *et al.* Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 391–418, 2006.

VANMARCKE, G. *et al.* Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 92, 2021.

VARGAS, Ana C.G. *et al.* Batch Fermentation of Lignocellulosic Elephant Grass Biomass for 2G Ethanol and Xylitol Production. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 2219–2228, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12155-022-10559-2>. Acesso em: 31 mar. 2024.

VENKATANAGARAJU, E. *et al.* Extraction and Purification of Pectin from Agro-Industrial Wastes. *In*: PECTINS - EXTRACTION, PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS. [S. l.]: IntechOpen, 2020.

WANG, C. *et al.* Progress in research of pentose transporters and C6/C5 co-metabolic strains in *Saccharomyces cerevisiae*. **Chinese Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 1543–1555, 2018.

WIDMER, W.; ZHOU, W.; GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 14, p. 5242–5249, 2010.

XU, A. *et al.* Use of Non-Saccharomyces Yeast Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to Improve the Polyphenol and Volatile Aroma Compound Contents in Nanfeng Tangerine Wines. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 128, 2022.

XU, Y. *et al.* Biosynthetic strategies to produce xylitol: an economical venture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 13, p. 5143–5160, 2019.

YADAV, K. *et al.* Recent insights into microbial pectin lyases: A review. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 134, p. 199–217, 2023.

YAN, W. *et al.* Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology advances**, [s. l.], v. 46, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33276074/>. Acesso em: 13 abr. 2024.

YANG, G. *et al.* Application of engineered yeast strain fermentation for oligogalacturonides production from pectin-rich waste biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 300, p. 122645, 2020.

YANG, P. *et al.* CRISPR-Cas9 Approach Constructing Cellulase secreting-Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for the Production of Orange Peel Ethanol. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018.

YIN, H. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of gastrodin from glucose. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 218, 2020.

YUAN, S.-F. *et al.* De novo resveratrol production through modular engineering of an *Escherichia coli*–*Saccharomyces cerevisiae* co-culture. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 143, 2020.

ZAITSOVA, O. *et al.* Pectins as a universal medicine. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 146, p. 104676, 2020.

ZDUNEK, A.; PIECZYWEK, P. M.; CYBULSKA, J. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1101–1117, 2021.

ZEMA, D. A. *et al.* Valorisation of citrus processing waste: A review. **Waste Management**, [s. l.], v. 80, p. 252–273, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>.

ZHONG, W. *et al.* Isolation and Selection of Non-*Saccharomyces* Yeasts Being Capable of Degrading Citric acid and Evaluation Its Effect on Kiwifruit Wine Fermentation. **Fermentation**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 25, 2020.

ZHU, R. *et al.* Pectin oligosaccharides from fruit of *Actinidia arguta*: Structure-activity relationship of prebiotic and antiglycation potentials. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 217, p. 90–97, 2019.