



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Condições operacionais para a produção de pectinases por  
*Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivo em estado sólido

**Caroline Reginatto**

Caxias do Sul

2022

**Caroline Reginatto**

Condições operacionais para a produção de pectinases por  
*Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivo em estado sólido

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando à  
obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Eloane Malvessi

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Eunice Valduga

Caxias do Sul

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

R335c Reginatto, Caroline

Condições operacionais para a produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivo em estado sólido [recurso eletrônico] / Caroline Reginatto. – 2022.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Orientação: Eloane Malvessi.

Coorientação: Eunice Valduga.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Pectinase. 2. *Aspergillus niger*. 3. Enzimas. 4. Biotecnologia. I. Malvessi, Eloane, orient. II. Valduga, Eunice, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 577.15

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

**Caroline Reginatto**

Condições operacionais para a produção de pectinases por  
*Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivo em estado sólido

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Eloane Malvessi  
Co-orientadora: Profa. Dra. Eunice Valduga

---

Profa. Dra. Eloane Malvessi

---

Profa. Dra. Eunice Valduga

---

Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

---

Profa. Dra. Aline Dettmer

---

Prof. Dr. Adriano Brandelli

*À minha filha Maria Luiza,  
minha inspiração, minha vida, meu amor.*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e participação de pessoas e instituições que me acompanharam no desenvolvimento desta pesquisa.

Inicialmente, gostaria de agradecer à Universidade de Caxias do Sul, pela estrutura física e de recursos humanos, e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Agradeço aos integrantes da banca de avaliação, Profa. Dra. Aline Dettmer, Prof. Dr. Adriano Brandelli e Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon, pelas contribuições e pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho. Assim como, aos membros da banca de acompanhamento, Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon e Profa. Dra. Janaína da Silva Crespo, pelas sugestões e disponibilidade em contribuir para a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eloane Malvessi, agradeço pela dedicação e comprometimento na orientação deste trabalho. Além disso, por ser uma amiga e incentivadora, por acreditar no meu potencial, por ter entendido meus medos e me ajudado a superá-los. Agradeço também à minha coorientadora, Profa. Dra. Eunice Valduga, pelas sugestões e contribuições indispensáveis para a elaboração deste trabalho.

Às bolsistas de iniciação científica, Gabriela P. dos Santos, Débora C. Vanni, Roberta S. Braga, Suélen R. Balen, Kimberly C. Ramos e Larissa F. Erlo, pela dedicação e comprometimento na realização dos experimentos e pela convivência de amizade.

À técnica e amiga Sabrina Carra, pela ajuda nas atividades e pelo incentivo constante. À minha amiga Lenara Meneghel, pela amizade e orientação desde o início de minha jornada na pesquisa, nada disso seria possível sem a sua ajuda. Aos colegas Analia B. Folle, Bruna C. de Souza, Marielem dos Santos, Maria G. Delagustin, Caroline Rossi e Maicon L. Flores, pela amizade e paciência nas conversas, por todo apoio, risadas e conselhos. Ao Prof. Tomás A. Polidoro, pela indispensável ajuda, principalmente em relação ao funcionamento do biorreator. Agradeço a todos os colegas que fizeram parte da equipe de Laboratório de Bioprocessos nesses anos e contribuíram para um ambiente de trabalho prazeroso e de amizade.

Aos Laboratórios de Enzimas e Biomassa, de Análises e Pesquisas em Alimentos e de Estudos do Sistema de Solo, Planta e Atmosfera e Metabolismo Vegetal, pela colaboração na realização dos experimentos. Às empresas que gentilmente cederam os subprodutos da produção de sucos, Naturasuc, Vinícola Nova Aliança e Tecnovin.

Aos meus pais Wilmar I. Reginatto e Rosa M. Reginatto e meu irmão Fabio Reginatto, pelo apoio incondicional, por aceitarem minhas escolhas, por acreditarem na minha capacidade e por cuidar da minha filha sempre que não pude estar presente. Agradeço também ao restante da minha família e aos amigos que, mesmo de longe, sempre estão torcendo por mim. O agradecimento mais especial é para minha filha Maria Luiza Reginatto Serafin, por alegrar os meus dias, por ser minha melhor amiga e por entender a minha ausência.

Agradeço a Deus pela minha saúde e por ter todas essas pessoas especiais ao meu lado nessa jornada.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
3.1 Enzimas em processos industriais .....	13
3.2 Substâncias pecticas e pectinases .....	14
3.3 Fontes de pectinases .....	16
3.4 Aplicações das pectinases .....	17
3.5 Processos de obtenção de pectinases .....	18
3.5.1 Cultivo em estado sólido .....	19
3.5.1.1 Biorreatores para cultivos em estado sólido .....	19
3.5.2 Fatores que influenciam a produção de pectinases em cultivo em estado sólido .....	21
3.5.2.1 Inóculo .....	21
3.5.2.2 Meio de cultivo e propriedades do suporte/substrato sólido .....	22
3.5.2.3 pH e temperatura .....	24
3.5.2.4 Aeração e agitação .....	25
3.6 Subprodutos agroindustriais .....	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
4.1 Artigo 1: Inoculation conditions improved the pectinase productivity in <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF solid-state cultivation .....	32
4.2 Artigo 2: Estratégias de agitação intermitente para produção de pectinases por <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo em escala de bancada .....	57
4.3 Artigo 3: Subprodutos da indústria de sucos como indutores da produção de pectinases em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em meio sólido .....	83
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>109</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>111</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>112</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>113</b>
<b>9 ANEXOS</b> .....	<b>133</b>
9.1 Anexo 1 - Descrição de metodologias .....	133
9.1.1 Cultivo em frascos .....	133
9.1.2 Cultivo em biorreator de tambor rotativo .....	133
9.1.3 Determinação da concentração celular .....	134
9.1.4 Coleta e tratamento de amostras .....	137
9.1.5 Determinação de açúcares redutores totais (ART) .....	137
9.1.6 Determinação da atividade de pectinases totais .....	138
9.1.7 Parâmetros de avaliação do processo .....	139

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Classificação dos biorreatores de acordo com as características do tipo de aeração e presença de agitação do sistema.....	20
<b>Figura 2</b> – Diagrama esquemático de um biorreator de tambor rotativo. ....	20

## RESUMO

As pectinases são enzimas que promovem a quebra de substâncias pécnicas e ganham destaque entre as enzimas de aplicação industrial, principalmente em indústrias que processam materiais vegetais. A produção de pectinases por fungos filamentosos pode ser realizada em cultivo em estado sólido e é influenciada pela variação de parâmetros processo. Nesse sentido, as condições operacionais da produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivos em estado sólido foram avaliadas visando o aumento da produtividade enzimática e a definição de estratégias que facilitem a aplicação industrial dessa tecnologia. Primeiramente, a partir da condição de inoculação padrão,  $7 \times 10^7$  esporos por 100 g de meio úmido (esporos/100gmu), foram testadas diferentes tamanhos de inóculo de suspensão de esporos ( $7 \times 10^4$  a  $7 \times 10^8$  esporos/100gmu), inóculo vegetativo sólido (50 e 100gmu) e líquido (5 e 10% v/m). Na segunda etapa, o volume de ocupação do biorreator de tambor rotativo foi avaliado frente à variação da massa de meio sólido (1100 e 1800gmu) e de tamanhos de partículas do suporte sólido (< 1,0 mm e 1,0 - 2,8mm). A partir da condição de agitação de 1rpm por 5min a cada 2h durante todo processo (padrão), foram avaliadas diferentes estratégias de agitação intermitente. Na terceira etapa do trabalho, subprodutos da produção industrial de sucos, secos e moídos, foram utilizados como indutores de pectinases em cultivos em frascos e em biorreator de tambor rotativo. Foram avaliados, em meios baseados em farelo de trigo e sais nutrientes, os bagaços de maçã, tangerina, laranja, uva branca e roxa em comparação ao meio padrão contendo pectina cítrica comercial. A partir dos resultados obtidos, foi observado que as variações de tamanho e tipo de inóculo exerceram forte influência sobre a cinética dos cultivos em frascos e em biorreator de tambor rotativo. Em comparação à inoculação padrão, em ensaios em biorreator de tambor rotativo, o uso de suspensão  $7 \times 10^4$  esporos/100gmu, inóculo vegetativo sólido (100 gmu) ou líquido (10% v/m), proporcionaram o aumento da produtividade em pectinases de 48, 42 e 85%, respectivamente. Na segunda etapa do trabalho, foi observado que o emprego de partículas de farelo de trigo de maior tamanho aliado ao uso de maior massa de meio favoreceu a produção de pectinases, sendo atingido  $P_{max}$  de 66,4 U por g de matéria seca (U/gms) em 96 horas de cultivo. Entre as estratégias de agitação testadas, a maior atividade enzimática (99,7 U/gms) foi obtida em 72 horas no cultivo com agitação padrão realizada apenas durante as primeiras 24 horas de cultivo. Neste caso, foi atingido o dobro de produtividade enzimática em comparação à condição padrão. Na avaliação dos subprodutos agroindustriais, a utilização de bagaço de maçã proporcionou a obtenção de maior atividade enzimática (59,5 U/gms) entre os bagaços testados nos ensaios frascos. Nos ensaios em biorreator, atividade de pectinases superior (83,4 U/gms) foi alcançada no ensaio com meio composto por bagaço de maçã, farelo de trigo e solução de sais nutriente em comparação ao valor obtido com o meio padrão (66,4U/gms). Esses resultados indicam a possibilidade de utilização bagaço de maçã para a produção de pectinases em cultivo em estado sólido. Nas etapas de avaliação desenvolvidas neste trabalho foram definidas estratégias que proporcionaram o aumento da atividade de pectinases e/ou da produtividade enzimática. Essas condições podem favorecer a aplicação desse processo em maior escala e reduzir os custos de obtenção dessas enzimas em cultivo em estado sólido.

## ABSTRACT

Pectinases are enzymes that promote the deconstruction of pectic substances and stand out among the enzymes of industrial application, mainly in industries that process plant materials. The pectinases production by filamentous fungi can be conducted in solid-state cultivation. The enzymatic activity results are influenced by process parameters variations. In this context, the operational conditions of pectinases production by *Aspergillus niger* LB-02-SF in solid-state cultivations were evaluated to increase enzymatic productivity and define strategies that facilitate the industrial application of this technology. From the inoculation by spore suspension in the concentration of  $7 \times 10^7$  spore/100 g of wet medium (gwm), which is standard inoculum condition, were evaluated: different sizes of spore suspension inoculum ( $7 \times 10^4$  a  $7 \times 10^8$  spore/100gwm), solid vegetative inoculum (50 e 100gwm), and liquid (5 e 10% v/w). In the second stage, the rotating drum bioreactor occupation volume was evaluated against the variation of the mass of solid medium (1100 and 1800gwm) and particle sizes of the solid support (< 1.0 mm and 1.0 - 2.8 mm). From the agitation condition of 1rpm for 5min every two hours throughout the process (standard), different intermittent agitation strategies were evaluated. In the third stage of the work, by-products from the industrial production of juices, dried and ground, were used as pectinase inducers in cultivations in flasks and in a rotating drum bioreactor. In media based on wheat bran and nutrient salts, apple, tangerine, orange, white, and purple grape pomace were evaluated in comparison to the standard medium containing commercial citrus pectin. Variations in inoculum size and type influenced the kinetics of the flasks and rotary drum bioreactor cultivations. Compared to the standard inoculation, in rotating drum bioreactor cultivations, the use of a suspension of  $7 \times 10^4$  spore/100gwm, solid (100 gwm) or liquid (10% v/w) vegetative inoculum, provided an increase in pectinase productivity of 48, 42 and 85%, respectively. In the second step, it was observed that the use of larger wheat bran particles (1.0-2.8 mm) combined with a larger mass of medium (1800 gwm) favored the production of pectinases, reaching a  $P_{max}$  of 66.4 U/gdm (g of dry matter) in 96 hours of the process. Among the agitation strategies tested, the highest enzymatic activity, 99.7 U/gdm, was obtained at 72 hours in the cultivation with standard agitation performed only during the first 24 hours of the process. In this case, the enzyme productivity was twice that achieved compared to the standard condition. In the evaluation of agro-industrial by-products, the use of apple pomace provided the highest enzymatic activity (59.5 U/gdm) among the pomace tested in flasks tests. In the bioreactor cultivations, higher pectinase activity (83.4 U/gdm) was achieved with the medium composed of apple pomace, wheat bran, and nutrient salt solution compared to the value obtained with the standard medium (66.4U /gdm). These results indicate the possibility of using apple pomace for pectinase production in solid-state cultivation. In the evaluation stages developed in this work, strategies were defined that provided an increase in pectinase activity or enzymatic productivity. These conditions may favor the application of this process on a larger scale and reduce the costs of obtaining these enzymes in solid-state cultivation.

## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de desenvolvimento de tecnologias de menor impacto ambiental é um dos fatores responsáveis pelo interesse crescente no uso de enzimas como catalisadores em processos industriais. Devido às características como alta eficiência catalítica, especificidade de substratos, biodegradabilidade e não toxicidade, esses biocatalisadores são alternativas para a substituição de catalisadores químicos em processos industriais. Entre as enzimas mais utilizadas industrialmente, destacam-se as pectinases ou enzimas pectinolíticas. Esse grupo de enzimas tem grande importância biotecnológica por ser empregado em diferentes processos industriais, principalmente no setor de alimentos e bebidas, onde são empregadas especialmente na produção de sucos, vinhos e polpas.

As pectinases podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, sendo que os microrganismos são os mais utilizados para a produção industrial desses biocatalisadores. A maioria das preparações comerciais de enzimas pectinolíticas é produzida por fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus*. A produção industrial de pectinases pode ser conduzida em cultivos submersos (CSm) ou em estado sólido (CES), diferenciados entre si, principalmente, pela quantidade de água presente no meio. Em escala industrial, a maioria das enzimas são produzidas em CSm, o que se deve a fatores como a melhor homogeneidade do sistema, que permite o controle e o monitoramento de parâmetros do processo. Contudo, a utilização industrial de CES vem ganhando espaço, especialmente por ser uma tecnologia mais simples e de menor consumo de energia. A possibilidade de emprego de subprodutos agroindustriais como componentes do meio de cultivo é outra vantagem relacionada à produção de metabólitos microbianos em CES. A substituição de componentes comerciais por esses materiais pode reduzir os custos de obtenção de produtos, além de ser uma forma de agregar valor a esses resíduos e diminuir os problemas ambientais relacionados à sua disposição.

As pectinases fúngicas são, em sua grande maioria, enzimas induzidas, ou seja, é necessária a adição de uma fonte de indução no meio de cultivo para sua formação. O principal indutor utilizado na produção dessas enzimas é a pectina purificada, entretanto, devido ao seu alto custo, procuram-se formas de substituir esse composto por outros materiais. Entre os subprodutos agroindustriais empregados na produção de pectinases

em CES é dado destaque para os resíduos gerados no processamento industrial de frutas, que são ricos em pectina e gerados em grande quantidade no Brasil e no mundo.

Uma das grandes limitações da aplicação de CES de fungos filamentosos em maior escala é relacionada à dificuldade de preparação do inóculo, o qual é geralmente obtido a partir de suspensão de esporos. Para a redução de problemas relacionados à necessidade de geração de grande quantidade de esporos, uma possibilidade seria o emprego de inóculo vegetativo, a partir de culturas previamente crescidas em meio líquido ou sólido. Considerando que as condições de inóculo influenciam o crescimento celular, observam-se, conseqüentemente, implicações em termos de obtenção de produtos, no tempo de cultivo e na viabilidade econômica do processo, sendo, portanto, de fundamental importância a avaliação desse parâmetro no desenvolvimento do processo.

Os cultivos em estado sólido podem ser conduzidos em diferentes biorreatores, com diferentes tipos de aeração e presença ou não de agitação. Entre os biorreatores que proporcionam a agitação do meio, salienta-se o biorreator de tambor rotativo, que consiste em um cilindro horizontal que gira em torno de seu eixo central promovendo a mistura do meio sólido. A agitação em biorreatores para CES é importante no sentido de manter a homogeneidade e evitar a formação de zonas compactadas e caminhos de ar preferenciais, além de favorecer os fenômenos de transferência de calor e massa. Contudo, em cultivos de fungos filamentosos, a utilização de agitação contínua ou com altas frequências de rotação pode causar dano celular e, conseqüentemente, diminuir a produção de metabólitos de interesse. Uma alternativa para reduzir os danos ao microrganismo e, com isso, aumentar a produtividade enzimática, é o emprego de regimes de agitação intermitente, com eventos de agitação apenas em determinados períodos do processo. Além disso, características do suporte como, por exemplo, o tamanho de partícula do substrato sólido e o volume de ocupação do tambor são fatores que influenciam as condições de mistura em CES de fungos filamentosos.

A cepa de *Aspergillus niger* LB-02-SF, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul, foi avaliada previamente e se destaca como produtora de pectinases em CES. Visando o aprimoramento desse processo, em busca de sua futura aplicação em escala industrial, revela-se importante a avaliação de condições de inoculação, da variação de parâmetros operacionais e da composição de meio de cultivo baseado em subprodutos agroindustriais regionais. Nesse contexto, foram definidos os objetivos desse trabalho, os quais estão apresentados a seguir.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a cinética do cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em estado sólido em função de variações de parâmetros de processo e do emprego de indutores alternativos à pectina, visando o aumento da produtividade em pectinases.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da variação das condições de inoculação sobre o crescimento celular e a produção de pectinases em cultivos conduzidos em frascos e em biorreator de tambor rotativo;
- Verificar a influência do volume de ocupação do biorreator de tambor rotativo sobre a produção de pectinases frente à variação da massa de meio sólido e de tamanho de partículas de farelo de trigo;
- Testar diferentes estratégias de agitação intermitente em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo;
- Comparar diferentes composições de meio de cultivo com substituição de indutor enzimático comercial por subprodutos gerados no processamento industrial de sucos em ensaios em frascos;
- Identificar subprodutos agroindustriais que induzam a produção de pectinases em ensaios em frascos com meios baseados em farelo de trigo e bagaços de laranja, maçã, tangerina, uva branca ou uva roxa;
- Avaliar o efeito da substituição de reagentes comerciais pelos bagaços selecionados sobre a produção de pectinases em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo.

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Enzimas em processos industriais**

Enzimas são moléculas com capacidade de catalisar reações e possuem características como alta eficiência catalítica, especificidade de substratos, biodegradabilidade e não toxicidade (Patel et al., 2017; Singh et al., 2016; Thapa et al., 2019). Esse potencial catalítico vem sendo amplamente utilizado em diferentes setores industriais, o que reflete nos dados do mercado global de enzimas, o qual movimentou cerca de 6,4 bilhões de dólares no ano de 2021 com tendência de atingir 8,7 bilhões de dólares até 2026, representando uma taxa de crescimento anual de 6,3% no período de 2021-2026 (BCC Research, 2021).

O interesse em processos que utilizam enzimas como agentes transformadores pode ser explicado pela necessidade crescente de desenvolvimento de tecnologias de menor impacto ambiental (Niyonzima et al., 2020; Ramesh et al., 2020; Thapa et al., 2019). Na literatura são reportadas avaliações ambientais comparativas entre processos que utilizam catalisadores enzimáticos e químicos, mostrando que a utilização de enzimas pode reduzir os danos ao meio ambiente (Delgove et al., 2019; Mello et al., 2017; Papadaskalopoulou et al., 2019). Entre as vantagens citadas, é dado destaque à economia de energia associada a processos enzimáticos, uma vez que são conduzidos em condições de operação mais brandas. Além disso, pela alta especificidade, os processos podem ser mais rápidos e com utilização de menores quantidades de matéria-prima, produtos químicos e água (Jegannathan & Nielsen, 2013).

Vegetais, animais e microrganismos são fontes de enzimas, porém, na obtenção de biocatalisadores de interesse industrial destacam-se as bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Niyonzima et al., 2020; Ramesh et al., 2020). A utilização de agentes microbianos para a produção industrial de enzimas tem como vantagens, em relação a animais e plantas, a capacidade de microrganismos secretarem grande quantidade e variedade de enzimas, a independência de sazonalidade e a facilidade de crescimento em variados substratos, incluindo o aproveitamento de tipos diferentes de resíduos agroindustriais (Anbu et al., 2017; Bon et al., 2008).

As enzimas têm aplicação em uma vasta gama de processos industriais, como nas áreas farmacêutica, biotecnológica e de nutrição animal (Liu e Kokare, 2017; Raveendran et al., 2018; Singh et al., 2019). Uma das principais aplicações é voltada ao setor de

alimentos, visto que a catálise enzimática vem sendo empregada de forma natural no processamento e obtenção de alimentos e bebidas há muitos séculos (Fernandes e Carvalho, 2017; Jegannathan e Nielsen, 2013; Vitolo, 2020). Entre as enzimas mais utilizadas no setor de alimentos e bebidas destacam-se as pectinases ou enzimas pectinolíticas (Amin et al., 2019; Patidar et al., 2018; Rebello et al., 2017; Sharma et al., 2017; Tapre e Jain, 2014; Uenojo e Pastore, 2007). Esse complexo enzimático é responsável pela quebra de polissacarídeos pécticos, como a pectina, sendo principalmente utilizado no processamento de frutas (Amin et al., 2019; Garg et al., 2016; Jayani et al., 2005; Shet et al., 2018).

### **3.2 Substâncias pécticas e pectinases**

As substâncias pécticas são heteropolissacarídeos ácidos de estrutura complexa, componentes da parede celular vegetal e formadas principalmente por ácido galacturônico (Chan et al., 2017; Mohnen, 2008). Os polissacarídeos pécticos são compostos por duas principais estruturas, as ramnogalacturonanas e as homogalacturonanas. A estrutura principal das ramnogalacturonanas é formada por unidades de ácido galacturônico interligadas por moléculas de ramnose e com cadeias laterais de arabinose, galactose e xilose. As homogalacturonanas são polímeros homogêneos formados por moléculas de ácido galacturônico ligadas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, com os grupos carboxila parcialmente esterificados por grupos metila (Harholt et al., 2010; Jayani et al., 2005; Nighojkar et al., 2019).

As protopectinas são as substâncias pécticas presentes nos tecidos vegetais, insolúveis em água. A partir da sua quebra, são formadas as demais substâncias pécticas, que são compostas por ácidos poligalacturônicos e diferenciam-se entre si pela quantidade de grupos carboxila metil-esterificados. Essas substâncias pécticas são classificadas em ácidos pécticos (não tem grupos carboxila esterificados), ácidos pectínicos (0-75% de grupos carboxila esterificados) e pectinas (mais de 75% de grupos carboxila esterificados) (Jayani et al., 2005; Kashyap et al., 2001; Nighojkar et al., 2019).

As substâncias pécticas se apresentam de várias formas nos tecidos vegetais e, devido à complexidade estrutural e heterogeneidade desses polissacarídeos, é necessário que diferentes enzimas se envolvam na sua degradação (Amin et al., 2019; Jayani et al., 2005). As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são enzimas que promovem a quebra dos polissacarídeos que formam as substâncias pécticas (Nighojkar et al., 2019; Tapre e Jain, 2014). Esse grupo de enzimas tem grande importância biotecnológica por ser

empregado em diferentes processos industriais, principalmente no setor de alimentos e bebidas (Amin et al., 2019; Garg et al., 2016; Jayani et al., 2005; Shet et al., 2018; Singh e Singh, 2015).

As enzimas pectinolíticas são classificadas pela sua forma de ação sobre as substâncias pécicas e são divididas em protopectinases, despolimerases e esterases. As protopectinases são responsáveis pela hidrólise da protopectina insolúvel, as despolimerases são as enzimas que catalisam a quebra das ligações entre as unidades de ácido galacturônico da cadeia principal e as esterases que atuam na remoção dos resíduos de metoxila, desesterificando a pectina e o ácido péctico (Nighojkar et al., 2019; Tapre e Jain, 2014).

As protopectinases são hidrolases e podem ser divididas com base no mecanismo de reação. Enquanto as protopectinases do tipo A atuam sobre a região interna da protopectina, sobre o ácido poligalacturônico, as do tipo B atuam na parte externa, hidrolisando as ligações com os polissacarídeos que se conectam com a cadeia principal (Jayani et al., 2005). As pectinaesterases (PE) catalisam a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, produzindo ácido péctico e metanol e atuam melhor em faixas de pH entre 4,0 e 8,0 e de temperatura entre 40 e 50°C (Jayani et al., 2005; Kashyap et al., 2001).

As despolimerases podem ser endo ou exopectinases, de acordo com o padrão de ação sobre os polissacarídeos pécticos, aleatório ou terminal, respectivamente. Esse grupo de enzimas também pode ser classificado pelo mecanismo de reação em hidrolases e liases. As hidrolases atuam na quebra das ligações glicosídicas (covalentes) por meio da participação de moléculas de água (Jayani et al., 2005; Nighojkar et al., 2019). Nesse grupo destacam-se as poligalacturonases (PG) e as polimetilgalacturonases (PMG), as quais promovem hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 no ácido péctico e na pectina, respectivamente. As poligalacturonases obtidas de diferentes fontes microbianas apresentam diferenças nas propriedades de reação. A maioria tem maior eficácia em uma faixa de pH ácida (3,5 a 5,5), porém também são relatadas condições alcalinas, com valores de pH ótimo podendo chegar a 11,0. Em relação à temperatura de ação, as poligalacturonases são mais eficientes entre 30 e 50°C (Amin et al., 2019; Jayani et al., 2005; Phutela et al., 2005). As liases agem quebrando as ligações glicosídicas por transeliminação e sua ação é favorecida em temperaturas em torno de 40 e 50°C e em faixas de pH alcalinas, entre 7,5 e 10,0 (Jayani et al., 2005; Tapre e Jain, 2014). As liases se dividem em poligalacturonato liases (PGL) que atuam sobre o ácido péctico, e polimetilgalacturonato liases, que agem sobre a pectina, sendo que ambas catalisam a

quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 por transeliminção (Amin et al., 2019; Jayani et al., 2005; Nighojkar et al., 2019).

### 3.3 Fontes de pectinases

As enzimas pectinolíticas são encontradas nas plantas superiores, principalmente nos frutos, pois participam do seu processo natural de amadurecimento (Kashyap et al., 2001). Essas enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, sendo que os microrganismos são os mais utilizados para a produção industrial desses biocatalisadores, devido a fatores como taxa de crescimento mais rápido e possibilidade de manipulações genéticas (Amin et al., 2019; Jayani et al., 2005; Kashyap et al., 2001).

Pectinases microbianas industrialmente relevantes podem ser obtidas a partir de cultivos em que são empregados mais de 30 diferentes gêneros de fungos filamentosos, leveduras e bactérias, como, por exemplo, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces* e *Bacillus* (Favela-torres et al., 2006; Nighojkar et al., 2019). Estes microrganismos são isolados a partir de fontes como resíduos agrícolas e vegetais deteriorados (Kashyap et al., 2001). A escolha do microrganismo deve ser avaliada para atender a demanda do processo em que esses biocatalisadores serão empregados, uma vez que enzimas sintetizadas por diferentes microrganismos apresentam características catalíticas distintas. Um exemplo está relacionado ao pH de ação do complexo enzimático, uma vez que pectinases ácidas são principalmente secretadas por fungos, enquanto pectinases de natureza alcalina são de origem bacteriana (Amin et al., 2019; Nighojkar et al., 2019). O tipo de processo de obtenção das enzimas também é um fator importante na escolha do agente microbiano, sendo que, geralmente, foi observado que fungos filamentosos se adaptam melhor a cultivos em meio sólido, enquanto bactérias apresentam melhores resultados de produção de pectinases em meio líquido (Jayani et al., 2005; Kashyap et al., 2001; Nighojkar et al., 2019).

A maioria das preparações comerciais de enzimas pectinolíticas é baseada no produto sintetizado por fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus* (Nighojkar et al., 2019; Tapre e Jain, 2014). A preferência por esses microrganismos pode estar ligada à capacidade de produção de mais de 90% de enzimas extracelulares, fato que facilitaria a etapa de recuperação do extrato enzimático (Jayani et al., 2005; Uenojo e Pastore, 2007). As pectinases secretadas por fungos filamentosos tem grande aplicação industrial devido à compatibilidade de ação em faixa ácida de pH utilizada em processos da indústria de alimentos, principalmente no processamento de frutas (Ueda et al., 1982).

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* ganha destaque como o mais utilizado na produção de pectinases de interesse industrial. Esse fungo é considerado seguro para a produção de metabólitos para a utilização na área alimentícia, pois possui a classificação *Generally Recognized As Safe* (GRAS) da *Food and Drugs Administration* (FDA), órgão do governo dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos e medicamentos. Também é listado como seguro para produção de todas as enzimas do complexo pectinolítico na Resolução RDC 53/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que relaciona os microrganismos utilizados na produção de enzimas para a indústria de alimentos (Brasil, 2014).

### **3.4 Aplicações das pectinases**

A utilização comercial de pectinases teve os primeiros registros com a preparação de suco de maçã e vinho, na década de 1930 (Garg et al., 2016; Kashyap et al., 2001). Com o passar dos anos, o avanço nos estudos sobre a composição dos tecidos vegetais, assim como técnicas de melhoramento genético dos microrganismos e otimização dos processos de obtenção, consolidaram essas enzimas como um dos mais versáteis biocatalisadores de aplicação industrial (Nighojkar et al., 2019; Tapre e Jain, 2014).

As enzimas pectinolíticas podem ser empregadas em uma ampla gama de setores industriais que processam materiais de origem vegetal (Garg et al., 2016; Kashyap et al., 2001; Rebello et al., 2017; Sharma et al., 2013; Tapre e Jain, 2014). Na indústria têxtil são utilizadas juntamente com lipases, amilases e celulasas, atuando na remoção de agentes de colagem em fibras de algodão e no branqueamento de tecidos. São também utilizadas no tratamento de águas residuais de indústrias que processam alimentos e na degomagem e tratamento de fibras naturais (Garg et al., 2016; Rebello et al., 2017). Fazem parte do conjunto de enzimas utilizadas para a produção de alimentos para animais, facilitando a liberação de nutrientes desses materiais (Kashyap et al., 2001; Nighojkar et al., 2019). São empregadas na produção de óleos vegetais de origem cítrica visando aumento da eficiência de extração e em processos de cura de café, tabaco e cacau (Garg et al., 2016; Kashyap et al., 2001; Sharma et al., 2013).

A principal aplicação de enzimas pectinolíticas é direcionada para a indústria de alimentos, nas etapas do processamento de frutas e vegetais, que envolvem a produção de suco e vinho (Sharma et al., 2017; Tapre e Jain, 2014; Uenojo e Pastore, 2007). Nesse caso, geralmente são empregadas pectinases de origem fúngica, pois atuam em faixa de pH ácido, compatível com valores de pH de sucos e vinhos (Tapre e Jain, 2014). As

pectinases são capazes de modificar e solubilizar os polissacarídeos pécticos presentes nos concentrados de frutas e sucos, promovendo a redução de viscosidade (Kashyap et al., 2001; Sharma et al., 2017). A presença de substâncias pécticas confere alta viscosidade ao suco, característica indesejada durante o processamento industrial e, posteriormente, no produto entregue ao consumidor (Alkorta et al., 1998). Esses biocatalisadores, juntamente com outros tipos de enzimas, são adicionados em várias etapas do processo e em condições diferentes para cada tipo de suco. Este aspecto está relacionado à heterogeneidade dos polissacarídeos pécticos observada em diferentes frutas (Nighojkar et al., 2019; Sharma et al., 2017). As pectinases podem ser empregadas durante a maceração e prensagem da fruta, para aumentar a eficiência e o rendimento da extração de sucos. Também são aplicadas na etapa de clarificação, onde atuam hidrolisando os resíduos de pectina provenientes da maceração da fruta, diminuindo a viscosidade e a turbidez do suco (Amin et al., 2019; Garg et al., 2016; Nighojkar et al., 2019; Tapre e Jain, 2014).

### **3.5 Processos de obtenção de pectinases**

A produção industrial de enzimas microbianas pode ser conduzida em cultivos em estado sólido (CES) ou submersos (CSm), diferenciados entre si, principalmente, pela quantidade de água presente no meio (Krishna, 2005; Solís-Pereira et al., 1993). Os cultivos em estado sólido se caracterizam por apresentar teor de umidade na faixa de 15 a 80% e o desenvolvimento da população microbiana ocorre sobre uma matriz não solúvel, a qual pode ter apenas a função de suporte ou também atuar como fonte de carbono e nutrientes (Nigam e Singh, 1994; Singhania et al., 2010; Viniegra-González, 1997). No caso de CSm, os componentes do meio são parcial ou totalmente dissolvidos no meio líquido e a massa de células fica em suspensão (Schmidell et al., 2001; Solís-Pereira et al., 1993).

A comparação entre CES e CSm para a obtenção de pectinases foi objeto de investigação em vários estudos, sendo relatado que as condições de mistura e difusão de nutrientes inerentes a cada processo podem afetar a produção e as características catalíticas do complexo pectinolítico formado (Kumar et al., 2011; Minjares-Carranco et al., 1997; Patil e Dayanand, 2006; Solís-Pereira et al., 1993).

Em escala industrial, a maioria das enzimas são produzidas em CSm, o que se deve a fatores como a melhor homogeneidade do sistema, que facilita o controle e o monitoramento de parâmetros do processo, e o maior conhecimento da engenharia do

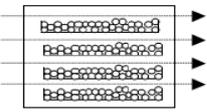
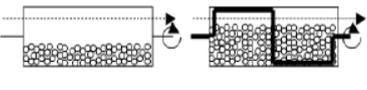
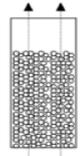
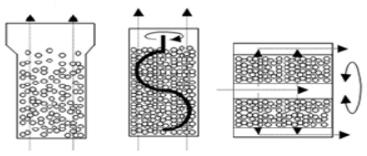
processo e dos mecanismos regulatórios de produção de pectinases nessa forma de cultivo (Amin et al., 2019; Couto e Sanromán, 2006). Mesmo considerando estes aspectos, a utilização industrial de CES vem ganhando espaço, especialmente por ser uma tecnologia mais simples, de menor consumo de energia e pelo importante papel relacionado à utilização de diferentes tipos de resíduos agroindustriais como matéria-prima de baixo custo (Amin et al., 2019; Thomas et al., 2013). Entre outras vantagens desse tipo de processo em relação ao CSm, pode-se citar o menor risco de contaminação devido à baixa atividade de água do meio de cultivo e reduzidos efeitos de inibição por substrato e produto (Hölker e Lenz, 2005; Krishania et al., 2018; Krishna, 2005; Mitchell et al., 2006a).

### **3.5.1 Cultivo em estado sólido**

A utilização de CES é relatada em diversos setores industriais, como nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica, sendo empregado na produção de alimentos e bebidas fermentadas, na produção de enzimas, de ácidos orgânicos, etc. (Krishna, 2005; Thomas et al., 2013). Esse tipo de cultivo é uma alternativa para a produção de enzimas fúngicas tendo em vista que o ambiente proporcionado em CES se aproxima do ambiente natural de desenvolvimento desses microrganismos (Amin et al., 2019; Sugai-Guérios et al., 2015)..

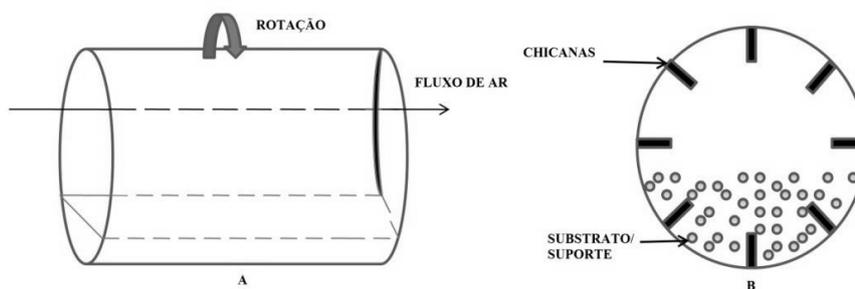
#### **3.5.1.1 Biorreatores para cultivos em estado sólido**

Os cultivos em estado sólido podem ser conduzidos em diferentes tipos de biorreatores, desde a escala laboratorial até a industrial. Os ensaios preliminares para a seleção de microrganismos e/ou definição das melhores condições de processo são realizados em nível de frascos/bandejas, com capacidade média de trabalho de 50 a 1000 g. Em laboratório, também são utilizados biorreatores com capacidade de até 20 kg (Mitchell et al., 2006a; Mitchell e Krieger, 2019). Posteriormente, as condições definidas nos ensaios em escala laboratorial são utilizadas para o projeto de biorreatores de maior capacidade de trabalho em nível industrial (Ashok et al., 2017; Lonsane et al., 1992; Thomas et al., 2013). Os equipamentos para a condução de cultivos em estado sólido podem ser classificados com base no modo de operação, tipo de aeração e presença de agitação, conforme esquema representado na Figura 1 (Mitchell et al., 2006a).

↓ Aeração ↘ Agitação →	<b>Sem agitação</b> (ou muito infrequente)	<b>Agitação contínua intermitente</b>
<b>Aeração superficial</b> (o ar passa ao redor do leito)	<b>GRUPO I</b>  Bandeja	<b>GRUPO III</b>  Tambor rotativo   Tambor agitado
<b>Aeração forçada</b> (o ar é soprado através do leito)	<b>GRUPO II</b>  Leito empacotado	<b>GRUPO IV</b>  Leito fluidizado   Leito agitado   Tambor de balanço

**Figura 1** - Classificação dos biorreatores de acordo com as características do tipo de aeração e presença de agitação do sistema (Mitchell et al., 2006a).

Entre os biorreatores que proporcionam a agitação do meio em CES, salienta-se o biorreator de tambor rotativo, referenciado na Figura 2, Grupo III. Este equipamento, o qual foi utilizado neste trabalho, consiste de um cilindro horizontal, provido de chicanas, que gira em torno de seu eixo central, promovendo a mistura do meio sólido (Ge et al., 2017; Mitchell et al., 2006d; Musoni et al., 2015). O tambor é parcialmente preenchido pelo substrato sólido e a aeração dentro do biorreator é realizada na parte superior do leito. A agitação do meio, provocada pela rotação do cilindro, favorece a mistura e a remoção de calor e de gases provenientes do metabolismo microbiano, facilitando o controle de temperatura no processo (Mitchell et al., 2006d; Thomas et al., 2013).



**Figura 2** – Diagrama esquemático de um biorreator de tambor rotativo. A – visão lateral; B – visão frontal (Arora et al., 2018).

### **3.5.2 Fatores que influenciam a produção de pectinases em cultivo em estado sólido**

#### **3.5.2.1 Inóculo**

As etapas prévias ao cultivo incluem o preparo do meio, a esterilização dos equipamentos e o preparo do inóculo (Lima et al., 2001). Em cultivos de fungos filamentosos, a inoculação pode ser realizada com uma suspensão de esporos ou a partir da cultura pré-crescida em meio de cultivo líquido ou sólido, denominado inóculo vegetativo (Ali et al., 2003; Gutarra et al., 2007; Papagianni e Moo-Young, 2002; Ul Haq et al., 2015). Uma das grandes dificuldades de utilização de CES em escala industrial está relacionada às limitações de propagação do inóculo que, no caso de cultivos fúngicos, é geralmente preparado a partir de suspensão de esporos. Muitos estudos buscam estratégias alternativas de inoculação para produção industrial de diferentes metabólitos obtidos de fungos filamentosos, visando solucionar o problema que é a dificuldade de geração de grandes quantidades de esporos (Castro et al., 2011; Demir e Tari, 2014; Gutarra et al., 2007).

Para a produção de lipases, Gutarra et al. (2007) relatam o uso de inóculos vegetativos de *Penicillium simplissimum* crescidos em meio líquido e sólido em comparação ao convencional inóculo de esporos. Os melhores resultados em termos de atividade enzimática e produtividade foram observados utilizando o inóculo vegetativo sólido quando comparados aos obtidos com inóculo vegetativo líquido ou uso de suspensão de esporos. Colla et al. (2017) compararam dois tipos de inóculos para a produção simultânea de poligalacturonases e amilases por *A. niger* em CES conduzido em biorreator de tambor rotativo. Segundo os autores, a inoculação com o uso de farelo de arroz fermentado (crescimento por 7 dias, a 30°C) foi mais favorável à produção de poligalacturonases do que a utilização de suspensão de esporos.

Castro et al. (2014) avaliaram diferentes cenários para a produção de um extrato multienzimático composto por amilases, proteases, celulasas e xilanases de *Aspergillus awamori* em CES com variadas condições de inoculação. Em ensaios conduzidos em biorreatores de bandeja em escala laboratorial, foram avaliadas cinco estratégias de preparação do inóculo, sendo três em meio líquido e duas em estado sólido. De forma geral, os autores observaram maiores atividades enzimáticas com a utilização de inóculos crescidos em meio líquido. Segundo a avaliação técnico-econômica de implantação e de produção em escala industrial apresentada no referido estudo, a utilização de inóculos líquidos torna o processo mais competitivo tanto em relação ao investimento total de

capital quanto em termos de custo unitário de produção. Segundo os autores, um dos fatores que contribuiu para esse resultado é o menor tempo de preparação dos inóculos líquidos em relação aos sólidos.

O tamanho/concentração de inóculo, na forma de suspensão de esporos ou vegetativo, também pode influenciar o crescimento celular e a obtenção de metabólitos de interesse (Castro et al., 2011; Demir e Tari, 2014). O emprego de baixas concentrações pode não ser suficiente para favorecer o crescimento fúngico, enquanto o aumento na quantidade de inóculo pode aumentar a velocidade do desenvolvimento microbiano. Porém, a proliferação rápida da biomassa pode ocasionar o esgotamento de nutrientes, diminuindo a atividade metabólica e, com isso, a síntese de enzimas (Patel et al., 2009; Sabu et al., 2005). Sethi et al. (2016) avaliaram diferentes tamanhos de inóculo de esporos para produção de pectinases por *Aspergillus terreus* em CES e observaram maior atividade enzimática com a utilização da menor concentração de inóculo. Por outro lado, Mrudula & Anitharaj (2011) e Maciel et al. (2011) relataram maiores atividades de pectinases utilizando maiores quantidades de suspensão de esporos como inóculo de *A. niger* em CES conduzidos em frascos. Alam et al. (2011) testaram diferentes concentrações (10 a 30% v/m) de inóculo líquido de *A. niger* e observaram maior produção de ácido cítrico com a utilização de 25% (v/m) de inóculo. Segundo Castro et al. (2011) o aumento da concentração (até 9,1 mg/g de meio) de cultura líquida como inóculo de *A. awamori* foi favorável a produção simultânea de amilases e proteases na faixa de concentrações avaliadas no estudo (3,5 a 9,7 mg/g de meio).

### **3.5.2.2 Meio de cultivo e propriedades do suporte/substrato sólido**

Os meios de cultivo para a produção de pectinases fúngicas são compostos, de forma geral, por fontes de carbono, fontes de nitrogênio e pectina (Martínez-Trujillo et al., 2009; Teixeira et al., 2000). A composição do meio de cultivo é um fator que está diretamente ligado à síntese de enzimas pectinolíticas, pois, em função dos componentes e da concentração utilizada, podem ser favorecidos os fenômenos de indução ou repressão catabólica (Gomes et al., 2018; Solís-Pereira et al., 1993).

As pectinases fúngicas são, em sua grande maioria, enzimas induzidas, ou seja, é necessária a adição de uma fonte de indução no meio de cultivo para sua formação. O principal indutor utilizado na produção dessas enzimas é a pectina purificada, que pode ser também utilizada como fonte de carbono (Maldonado e Strasser de Saad, 1998; Roumbouts e Pilnik, 1980). O emprego de pectina purificada comercial em escala

laboratorial pode até ser viável, mas, devido ao seu alto custo, procuram-se formas de substituir esse composto por outros materiais de menor custo quando se almeja o aumento de escala. Geralmente, são utilizados subprodutos agroindustriais, principalmente resíduos das indústrias de alimentos e bebidas que são ricos em pectina, como cascas de mamão e manga, cascas e bagaços de frutas cítricas, bagaços de maçã, morango e uva (Alkorta et al., 1998; Mahmoodi et al., 2019; Martínez-Trujillo et al., 2009; Patidar et al., 2016).

Nos cultivos em estado sólido, a matriz sólida pode servir como suporte inerte para o crescimento do microrganismo e também atuar como substrato e fonte de nutrientes. Nesse caso, são utilizados substratos orgânicos naturais, principalmente grãos e resíduos do processamento de cereais e frutos, sementes de leguminosas e resíduos de madeira (Pandey, 1992; Patidar et al., 2018; Singhanian et al., 2009). Para a definição da matéria-prima a ser utilizada como componente do meio, é importante avaliar as propriedades do substrato sólido. As variações de tamanho de partículas e umidade do substrato sólido alteram a porosidade do meio e podem afetar os fenômenos de transferência de calor e massa nesses processos (Mitchell et al., 2006c; Patidar et al., 2018). A avaliação do teor de umidade do meio é importante, sendo que a condição mais adequada a cada processo é dependente das características do substrato e do microrganismo utilizado. De forma geral, é relatado que o meio deve ser suficientemente úmido para a formação de um filme de água sobre o substrato, entretanto, a grande quantidade de água pode causar zonas de compactação de partículas e diminuir os espaços vazios entre elas, prejudicando a difusão de oxigênio e a remoção de calor e de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) gerados pelo metabolismo celular (Krishna, 2005; Manan & Webb, 2017). Para a produção de pectinases por diferentes microrganismos em CES são relatados teores de umidade inicial entre 40 e 80% (Nighojkar et al., 2019; Patidar et al., 2018).

O tamanho de partícula do substrato sólido é outro fator que exerce forte influência sobre as condições de disponibilidade de nutrientes e de transferência de oxigênio para a população microbiana (Guan et al., 2020; Manan e Webb, 2017; Schmidt e Furlong, 2012). O emprego de menores tamanhos de partícula aumenta a área superficial de contato e pode favorecer o acesso do microrganismo aos nutrientes, porém podem ser observados problemas de aglomeração e a redução de taxas de transferência de oxigênio. Com o aumento do tamanho de partículas, a difusão de oxigênio é facilitada, mas a diminuição da área de superfície pode dificultar o acesso aos nutrientes (Blandino et al., 2002; Doriya e Kumar, 2018; Schmidt e Furlong, 2012). Blandino et al. (2002), que em

cultivos de *A. awamori* em CES com grãos de trigo moídos em diferentes tamanhos (0,85-2,0 mm), observaram menor atividade de exopoligalacturonases no cultivo com meio composto pelo menor tamanho de partícula de substrato. Os autores relacionaram essa resposta com um possível efeito de repressão catabólica devido à maior concentração de glicose no meio composto por menores partículas de grãos de trigo.

Em CES, a variação do tamanho de partícula modifica a espessura do leito de meio, que é mais um fator crítico em cultivos em estado sólido, principalmente em cultivos estáticos, em relação ao acúmulo de calor e de CO<sub>2</sub> proveniente do metabolismo microbiano (Mitchell et al., 2006c; Pandey et al., 1999). No caso de biorreatores de tambor rotativo, o volume de ocupação do tambor, também influenciado pela quantidade de substrato empregada, pode influenciar as condições de transferência de calor e massa entre a fase gasosa e o meio sólido (Doriya e Kumar, 2018; Shahryari et al., 2020). Para processos conduzidos nesses equipamentos são relatados volumes de ocupação máximos entre 40 - 50% do volume útil do tambor, pois, o emprego de valores superiores pode ser desfavorável às condições da mistura (Arntz et al., 2008; Poletto et al., 2017; Stuart e Mitchell, 2003). Contudo, a avaliação do volume de ocupação é necessária, uma vez que a resposta em termos de mistura às variações desse parâmetro é dependente de cada combinação de substrato e microrganismo utilizada (Mitchell et al., 2006d).

### 3.5.2.3 pH e temperatura

Em cultivos em estado sólido o monitoramento e controle do pH durante o processo é dificultado em função das características gerais do meio, como heterogeneidade e ausência de água livre (Lonsane et al., 1985; Manan e Webb, 2017; Thomas et al., 2013). Geralmente, valores de pH iniciais são dependentes dos componentes do meio de cultivo, sendo que, são citados valores de pH na faixa ácida (3,0 - 6,0) como mais favoráveis para a produção de pectinases por fungos do gênero *Aspergillus* (Fawole e Odunfa, 2003; Fontana et al., 2005; Patil e Dayanand, 2006). Demir & Tari (2014) avaliaram a utilização de diferentes soluções tampão de acetato (pH 4,5 e 5,5) e de fosfato (pH 6,0, 7,0 e 8,0) como componentes do meio de cultivo para a produção de poligalacturonases por *Aspergillus sojae* em CES. Os autores relataram a obtenção de maiores atividades enzimáticas com a adição de água destilada ao meio sólido em comparação aos meios umidificados com soluções tampão. Ainda, foi sugerido que o farelo de trigo utilizado como substrato tem capacidade natural de tamponamento em valores próximos a 6,0, não sendo necessário qualquer ajuste do pH inicial do meio.

A temperatura em que é conduzido o cultivo exerce influência direta sobre o crescimento celular e a produção de pectinases fúngicas (Gomes et al., 2018; Lopez-Ramirez et al., 2018). Em CES, o aumento natural da temperatura devido ao metabolismo celular pode ser prejudicial ao desenvolvimento microbiano e também afetar a produção e a estabilidade das enzimas (Bianchi et al., 2001; Farinas, 2015; Manan e Webb, 2017). A dificuldade de remoção do calor resultante do metabolismo fúngico pode influenciar o controle de temperatura durante o processo (Finkler et al., 2017; Mitchell et al., 2019). Temperaturas entre 25 e 35°C são relatadas para a produção de pectinases por fungos do gênero *Aspergillus* em CES (Barman et al., 2014; Hendges et al., 2011; Joshi et al., 2006; Minjares-Carranco et al., 1997; Wong et al., 2017). Ainda, a produção de pectinases pode ser prejudicada em cultivos com temperaturas superiores a 40°C (Jahan et al., 2017; Pitol et al., 2016). Entretanto, segundo Poletto et al. (2017), o aumento natural da temperatura para valores em torno de 45°C favoreceu a produção de pectinases por *A. niger* em CES conduzido em biorreator de tambor rotativo.

#### **3.5.2.4 Aeração e agitação**

A aeração em CES é empregada com intuito de fornecer oxigênio para a população microbiana, atuando também na remoção de calor e gases decorrentes do metabolismo fúngico e no controle da umidade do meio durante o cultivo (Gervais e Molin, 2003; Manan e Webb, 2017). De acordo com o tipo de biorreator utilizado, a aeração pode ser realizada de forma superficial ou forçada através do leito de meio (Mitchell et al., 2006a; Mitchell e Krieger, 2019). No estudo da aeração é importante a avaliação das condições de vazão e de umidade do ar, pois, dependendo da condição de aeração empregada, pode ser observado o ressecamento do meio, prejudicando o desenvolvimento microbiano (Manan e Webb, 2017; Patidar et al., 2018).

Assim como a aeração, a agitação visa favorecer os fenômenos de transferência de calor e massa em CES, principalmente em relação ao controle da temperatura do cultivo e transferência de oxigênio ao microrganismo (Finkler et al., 2017; Mitchell et al., 2006d; Mitchell e Krieger, 2019). Além disso, é importante no sentido de manter a homogeneidade do meio sólido, reduzindo zonas de aglomerados de partículas de substrato e formação de caminhos preferenciais de ar (Reu *et al.*, 1993; Schutyser *et al.*, 2003; Finkler *et al.*, 2017). Entretanto, em cultivos de fungos filamentosos, as forças de cisalhamento devido aos eventos de agitação podem causar danos ao micélio fúngico e influenciar a morfologia de crescimento celular (Manan e Webb, 2017; Mitchell et al.,

2019). Nesse contexto, a agitação é um parâmetro importante a ser avaliado em CES conduzidos em sistemas que possibilitam a mistura do meio, como o biorreator de tambor rotativo. Nesse caso, a agitação ocorre pela rotação do casco cilíndrico em torno do seu eixo central. Também podem ser utilizadas chicanas, que tem função de melhorar a mistura do leito (Fung e Mitchell, 1995; Mitchell et al., 2006d). Geralmente, esses equipamentos são dotados de sistemas que permitem a configuração de diferentes condições de agitação, podendo ser contínua ou intermitente, em diferentes intervalos de tempo e frequências de rotação (Mitchell et al., 2006d; Schmidell et al., 2001).

Uma alternativa para a redução dos danos ao microrganismo causados pela agitação do meio em CES é o emprego de estratégias de agitação intermitente, onde a seleção do período de tempo de realização da agitação é importante (Arora et al., 2017; Schutyser et al., 2003). Arora et al. (2017), relataram melhores condições de crescimento celular de *Rhizopus oryzae* com a manutenção do biorreator de leito empacotado estático nas primeiras 16 horas de ensaio. Os autores sugerem que manter o meio estático no início do processo pode ter facilitado a formação de hifas aéreas e isso foi favorável ao crescimento celular, visto que, segundo Rahardjo et al. (2002), as hifas aéreas são as principais responsáveis pela captação de oxigênio.

Schutyser et al. (2003) propuseram um modelo para a simulação do movimento das partículas em CES de fungos filamentosos em biorreator de tambor rotativo considerando a resistência à tração das ligações das hifas. Os autores sugerem que avaliar tempo da primeira agitação é importante no sentido de impedir a formação de zonas de aglomerados de micélio que não são afetados com a posterior agitação, prejudicando as condições de mistura no restante do processo. Baseado nesse estudo, Finkler et al. (2017) avaliaram a agitação intermitente em diferentes intervalos de tempo de cultivos de *A. niger* em biorreator de leito empacotado (200 L) visando produção de pectinases. Foram testadas seis diferentes estratégias de agitação (2 rpm por 5 minutos) com variação da quantidade de eventos de agitação (0, 3 e 5) e tempos de processo (15, 20 e 26 horas). Os autores relataram a importância da agitação no início do cultivo para reduzir a formação de zonas de aglomeração de partículas e micélio, sendo obtidos melhores resultados em termos de atividade enzimática com a realização de três eventos de agitação (8, 10 e 12 horas) em cultivo de 20 horas.

### 3.6 Subprodutos agroindustriais

A possibilidade de emprego de subprodutos agroindustriais como componentes do meio de cultivo é uma das vantagens relacionadas à produção de metabólitos microbianos em CES (Amin et al., 2019; Nighojkar et al., 2019; Thomas et al., 2013). A substituição de componentes comerciais por esses materiais pode reduzir os custos de obtenção de produtos, além de ser uma forma de agregar valor a esses resíduos e diminuir os problemas ambientais relacionados à sua disposição (Jahan et al., 2017; John et al., 2017). Além dessas vantagens, a reutilização sustentável desses materiais é incentivada por políticas públicas que visam reduzir os problemas relacionados ao manejo inadequado de resíduos sólidos. No Brasil, a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), instituída pela Lei nº 12.305/10 de 2 de Agosto de 2010, dispõe sobre a gestão e gerenciamento desse tipo de material, prevendo a prevenção e redução da sua geração, além de propor instrumentos para aumento da reciclagem e reutilização (Brasil, 2010). Segundo a PNRS, os resíduos sólidos ou subprodutos consistem em materiais que tem valor econômico e podem ser reciclados e reaproveitados antes de seu rejeito final (Brasil, 2012). Nesse sentido, muitos estudos buscam desenvolver processos que utilizam subprodutos agroindustriais como matéria-prima na obtenção de diferentes produtos de interesse a partir de microrganismos como agentes de transformação (Botella et al., 2005; Demir et al., 2012; Mahmoodi et al., 2019; Marzo et al., 2019; Ruiz et al., 2012; Sethi et al., 2016).

Segundo Jahan et al. (2017), uma das limitações da produção de pectinases em escala industrial é o alto custo do meio de cultivo, que pode corresponder, de forma geral, de 30 a 40% do custo de produção dessas enzimas. Visando reduzir o custo do meio de produção, torna-se importante a avaliação do emprego de subprodutos gerados no processamento industrial de frutas e grãos na obtenção de pectinases por fungos filamentosos em CES. Para a seleção do material a ser utilizado devem ser considerados fatores relacionados ao seu custo, sazonalidade e disponibilidade regional (Jacob, 2009). No Brasil, por ser um país que se destaca como produtor agrícola, esse tipo de resíduo pode ser gerado em grande quantidade. Em 2021, o setor do agronegócio correspondeu a 27,4% do PIB do país, com estimativa de área plantada de cerca de 88 milhões de hectares para as diferentes culturas produzidas no ano de 2022 (CNA, 2022; IBGE, 2022). Em relação aos subprodutos utilizados no presente trabalho, podem ser observados na Tabela 1 os dados mais recentes de produção dessas culturas em âmbito nacional e no Rio Grande do Sul (RS). Os últimos dados disponíveis das culturas de maçã e tangerina são referentes ao ano de 2020.

**Tabela 1** – Produção nacional e estadual de laranja, maçã, tangerina, uva e trigo.

Culturas	Quantidade produzida (milhões de toneladas)					
	Brasil			Rio Grande do Sul		
	2018	2020	2022	2018	2020	2022
<b>Trigo</b>	5,47	6,35	9,68	1,75	2,10	4,57
<b>Laranja</b>	16,84	16,71	16,5	0,37	0,32	0,35
<b>Uva</b>	1,59	1,44	1,50	0,82	0,74	0,73
<b>Maçã</b>	1,20	0,98	-	0,58	0,49	-
<b>Tangerina</b>	1,00	1,02		0,14	0,12	-

Fontes: IBGE – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, (IBGE, 2022) IBGE – Produção Agrícola Municipal (IBGE, 2020).

O Brasil é destaque mundial na produção de grãos, com estimativa de produção de trigo de 9,68 milhões de toneladas em 2022 (IBGE, 2022). No ano de 2020, mais de 12 milhões de toneladas de trigo foram processadas no país, principalmente na produção de farinha (Abitrigo, 2021). O farelo de trigo é um subproduto gerado na produção de farinha e corresponde de 15 a 20% da massa do grão de trigo processada (Dobrev et al., 2007).

O Brasil também se destaca na fruticultura, principalmente na cultura de laranja, com produção de 16,5 milhões de toneladas na safra de 2022, sendo o Rio Grande do Sul (RS) responsável por 2,1% do total produzido. A produção de uva no estado correspondeu a cerca de 51% da produção nacional no ano de 2022 (IBGE, 2022). O RS também é destaque na produção de maçã e tangerina, correspondendo a 50 e 12% do montante nacional produzido no ano de 2020, respectivamente (IBGE, 2020).

Da quantidade total de frutas produzidas, mais da metade passa por algum tipo de beneficiamento industrial. A partir desse processamento são gerados diferentes tipos de subprodutos, que podem variar de 20 a 30% da biomassa original no beneficiamento de uva, de 20 a 35% em relação à maçã e chegar a cerca de 50% no caso de frutas cítricas (Ayala-Zavala et al., 2010; Sagar et al., 2018). Esses subprodutos, como os bagaços, são materiais heterogêneos e, dependendo do tipo de fruta, podem ser compostos por cascas, polpas, sementes e caules. Por conterem pectina em sua composição, são alternativas para a substituição de pectina purificada comercial na produção de enzimas pectinolíticas (Joshi et al., 2006; Mahmoodi et al., 2019). No Quadro 1 estão referenciados trabalhos relativos à produção de pectinases e outros tipos de enzimas, nos quais foram utilizados resíduos agroindustriais como substrato e fonte de indução em cultivos em estado sólido.

**Quadro 1** – Utilização de subprodutos agroindustriais de frutas para produção de enzimas em cultivos em estado sólido.

<b>Subproduto</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Produto</b>	<b>Referência</b>
Cascas de laranja	<i>Penicillium atrovenetum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus oryzae</i>	poligalacturonases e endoglicanases	(Adeleke et al., 2012)
	<i>Rhizopus sp.</i>	pectinases	(Handa et al., 2016)
	<i>Aspergillus awamori</i>	poligalacturonases e xilanases	(Marzo et al., 2019)
Cascas de laranja e farelo de trigo	<i>Aspergillus sojae</i>	poligalacturonases	(Demir et al., 2012)
	<i>Aspergillus sojae</i> <i>Aspergillus niger</i>	pectinases	(Heerd et al., 2012)
Bagaço de laranja	<i>Aspergillus niger</i>	pectinases	(Mahmoodi et al., 2019)
Bagaço de laranja e farelo de trigo	<i>Penicillium viridicatum</i>	pectinases	(Silva et al., 2005)
Bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	pectinases	(Martins et al., 2002)
Cascas de limão	<i>Aspergillus niveus</i>	poligalacturonases	(Maller et al., 2011)
	<i>Aspergillus flavipes</i> e <i>Aspergillus terreus</i>	pectinases	(Martínez-Trujillo et al., 2011)
	<i>Aspergillus niger</i>	pectinases	(Ruiz et al., 2012)
Polpa de frutas cítrica e palha de trigo e de arroz	<i>Aspergillus niger</i>	pectinases	(Anvari e Khayati, 2014)
Bagaço de maçã	<i>Aspergillus foetidus</i>	pectinases	(Hours et al., 1988)
	<i>Aspergillus niger</i>	poligalacturonases	(Hang e Woodams, 1994)
	<i>Aspergillus niger</i>	poligalacturonases e pectinaesterases	(Berovič e Ostroveršnik, 1997)
	<i>Aspergillus niger</i>	pectinaesterases	(Joshi et al., 2006)
Bagaço de uva	<i>Aspergillus awamori</i>	celulases, pectinases e xilanases	(Botella et al., 2005)
Bagaço de uva e cascas de laranja	<i>Aspergillus awamori</i>	pectinases e xilanases	(Díaz et al., 2012)
Cascas de manga	<i>Aspergillus foetidus</i>	pectinases	(Kumar et al., 2012)
Cascas de mamão	<i>Aspergillus tubingensis</i>	pectinaesterases	(Patidar et al., 2016)
Cascas de banana	<i>Aspergillus terreus</i>	pectinases	(Sethi et al., 2016)

Em relação às frutas utilizadas no presente trabalho, são relatados teores de pectina que variam entre 2 e 35% (m/m) em base seca (Mamma *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2016; Müller-Maatsch *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2017; John *et al.*, 2017; Güzel & Akpınar, 2019; Martins *et al.*, 2020; Morales-Contreras *et al.*, 2020). A ampla faixa de variação dos valores encontrados na literatura pode ser explicada pelos diferentes métodos analíticos empregados na quantificação de pectina (Nighojkar *et al.*, 2019). Além disso, a composição química desses materiais é dependente da variedade do fruto utilizada, assim como das condições de cultivo dos frutos e do seu processamento industrial (Grohmann e Bothast, 1994).

Como abordado nesta revisão da literatura, CES de fungos filamentosos são empregados para obtenção de uma vasta gama de metabólitos e a resposta em relação às variações de parâmetros operacionais pode ser dependente de fatores ligados à morfologia do fungo e de características do substrato utilizado. Nesse contexto, torna-se importante a avaliação de condições de processo que promovam o incremento da produtividade enzimática e a potencial redução dos custos operacionais. Dessa forma, no presente trabalho, o processo de obtenção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em CES, conduzidos em frascos e em biorreator de tambor rotativo, foi avaliado em relação às condições de inoculação e variação de parâmetros operacionais, assim como na seleção um subproduto agroindustrial da produção de sucos como fonte de carbono e indutor na produção das enzimas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos na forma de artigos os principais resultados obtidos no presente trabalho:

### **4.1 Artigo 1: Inoculation conditions improved the pectinase productivity in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivation**

Nesse item, o inóculo de *A. niger* é avaliado quanto ao tamanho (concentração de esporos) e quanto ao tipo (suspensão de esporos e vegetativo líquido/sólido), buscando definir as estratégias de inoculação que facilitem esta etapa do processo numa futura aplicação industrial. Os ensaios foram realizados, preliminarmente, em frascos sob condições estáticas, e as melhores condições reproduzidas em biorreator de tambor rotativo.

Este artigo foi publicado no periódico *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, sob o DOI <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102354>

### **4.2 Artigo 2: Estratégias de agitação de biorreator de tambor rotativo para obtenção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF.**

Nesse artigo, primeiramente, são apresentados resultados do estudo de tamanho de partícula de meio sólido e de volume de ocupação do biorreator. Após a definição das melhores condições, é mostrada a avaliação de diferentes estratégias de agitação do tambor, buscando o aumento de produtividade de pectinases e a redução do gasto energético do processo.

### **4.3 Subprodutos da indústria de sucos como indutores da produção de pectinases em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em meio sólido**

Esse item contempla os resultados da avaliação de subprodutos da produção industrial de sucos (bagaços de laranja, tangerina, maçã, uva branca e uva roxa) como indutores da produção de pectinases por *A. niger* em CES conduzidos em frascos e biorreator de tambor rotativo. A partir do meio controle, foi avaliada a substituição da pectina e glicose por estes bagaços secos e moídos, buscando reduzir os custos do processo.

**4.1 Artigo 1: Inoculation conditions improved the pectinase productivity in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivation**

Caroline Reginatto<sup>1,\*</sup>, Gabriela Posso dos Santos<sup>1</sup>, Kimberly Costa Ramos<sup>1</sup>, Analia Borges Folle<sup>1</sup>, Bruna Campos de Souza<sup>1</sup>, Lenara Meneghel<sup>1</sup>, Sabrina Carra<sup>1</sup>, Tomas Augusto Polidoro<sup>1</sup>, Mauricio Moura da Silveira<sup>1</sup>, Eunice Valduga<sup>2</sup>, Eloane Malvessi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Food Engineering, URI Erechim, Erechim, RS, Brazil.

---

\*Corresponding author

Phone: + 55 54 32182149

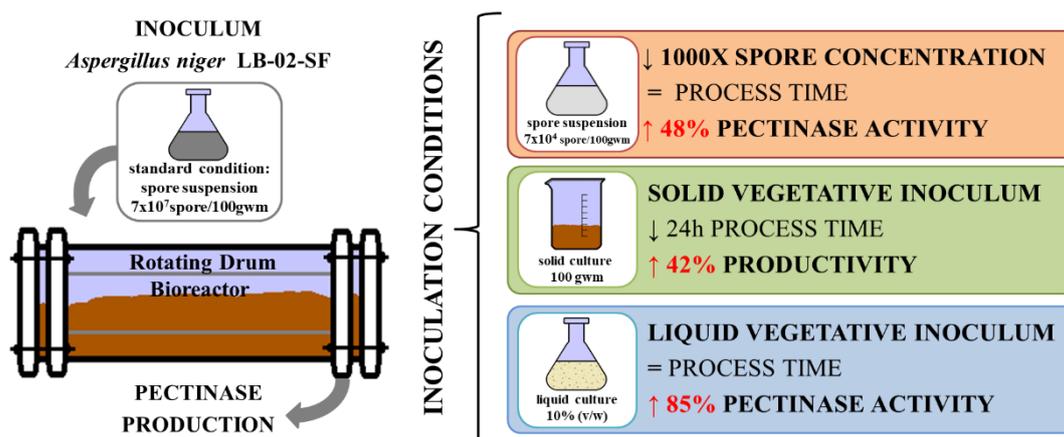
E-mail address: [c.b.reginatto@gmail.com](mailto:c.b.reginatto@gmail.com)

## ABSTRACT

In this work, the pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF was evaluated in relation to the inoculation conditions of solid-state cultivations carried out in Becher flasks and in rotating drum bioreactor. From the inoculation by spore suspension in the concentration of  $7 \times 10^7$  spore/100 g of wet medium (gwm), which is standard inoculum condition, were evaluated: different concentrations of spore suspension (from  $7 \times 10^4$  to  $7 \times 10^8$  spore/100 gwm), solid vegetative inoculum using 50 and 100 gwm of fermented solid medium (obtained from 48 hours of *A. niger* cultivation in Becher flasks, in a humidified atmosphere, 30°C) and liquid vegetative inoculum in the proportions of 5 and 10% (v/w) (obtained from 18 hours of *A. niger* cultivation at 300 rpm, 28°C). In comparison to the standard condition, with the use of the lowest spore concentration ( $7 \times 10^4$  spore/100 gwm), 100 gwm of solid vegetative inoculum and 10% (v/w) of liquid vegetative inoculum, higher pectinases productivities were observed, around 48, 42 and 85%, respectively. The results obtained indicate that the three inoculation strategies defined are alternatives to increase the enzyme productivity and to facilitate the inoculum preparation stage aimed at applying this process on an industrial scale.

**Keywords:** pectinases; *Aspergillus niger*; inoculum; rotating drum bioreactor; solid-state cultivation.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## 1. Introduction

Pectinases are enzymes that promote the deconstruction of pectic polysaccharides, which are the main components of the medium lamella of plant cells (Ahmed et al., 2021; Jayani et al., 2005; Nighojkar et al., 2019). This group of enzymes is of great biotechnological importance because it is used in different industrial processes (John et al., 2020; Satapathy et al., 2020; Shrestha et al., 2021). The main application is in the food industry, usually in the production of juices and wines (Nighojkar et al., 2019; Patidar et al., 2018). These enzymes can be obtained from plant, animal and microbial sources. Microorganisms are the most used in industrial production, with emphasis on filamentous fungi of the genus *Aspergillus* (Jayani et al., 2005; Radha et al., 2019).

The production of pectinases by filamentous fungi of the genus *Aspergillus* can be carried out in solid-state cultivation (SSC) or submerged cultivation (SmC) (Amin et al., 2019; John et al., 2020; Samreen et al., 2019). The industrial use of SSC has been gaining importance, mainly for being a simple technology, with less energy consumption and the possibility of using low-cost agro-industrial waste as raw material (Amin et al., 2019; Chilakamarry et al., 2022). In order to improve the production of pectinases in SSC, several operational parameters are evaluated to support the obtainment of these enzymes (Abdullah et al., 2018; Mahmoodi et al., 2019; Rocha et al., 2020; Sandri and Silveira, 2018; Shanmugavel et al., 2018).

In relation to the initial steps of cultivation, strategies concerning inoculation conditions affect the cell growth and morphologic development of fungal culture on a solid medium (Chilakamarry et al., 2022; Demir and Tari, 2014; Gutarra et al., 2007). Considering that, there are consequential implications in the obtainment of products, the cultivation time, and the economic viability of the process (Castro et al., 2011, 2014). Inoculum of filamentous fungi can be prepared from spore suspension or vegetative cultures (Kumar et al., 2021). The inoculum based on spore suspension is commonly used in SSC, mainly on a laboratory scale, due to its ease preparation and handling. On the other hand, the use of spore suspension on a large scale cultivation may not be advantageous due to the requirement of a great number of fungal spores (Alam et al., 2011; Kumar et al., 2021; Mitchell et al., 2019).

The difficulty of spore inoculum preparation is a limitation for SSC of filamentous fungi and one of the challenges to be overcome when studying the scale-up process (Alam et al., 2011; Castro et al., 2011, 2014; Gutarra et al., 2007). The vegetative inoculum can be an alternative to simplify the inoculation of large amounts of solid medium. The

vegetative cultures can be obtained from the fungal growth in liquid or solid media. Furthermore, the process conditions under which are prepared influence the performance when used as an SSC inoculum (Castro et al., 2014; Demir and Tari, 2014; Gutarra et al., 2007). Inoculation from pre-grown cultures can also favor the adaptation of the microorganism to the solid medium, leading to a reduction in the lag phase when compared to spore inoculation. Thus, the metabolites of interest can be obtained in a shorter cultivation time resulting in increment of productivity and process costs reduction (Assamoi et al., 2008; Castro et al., 2014; Gutarra et al., 2007).

The inoculum size also influences cell development and products formation (Alam et al., 2011; Boratyński et al., 2018; Castro et al., 2011; Sethi et al., 2016). The use of low inoculum concentration may not be enough to favor fungal growth, while a high proportion can increase the rate of microbial development. The rapid propagation of biomass can result in depletion of nutrients and substantial reduction in metabolic activity (Boratyński et al., 2018; Ezeilo et al., 2019; Ooi et al., 2021; Sethi et al., 2016).

The responses to different inoculation strategies are dependent on the type of microorganism, the properties of the solid support and, the operational conditions used during the process (Colla et al., 2017; Demir and Tari, 2014). Considering the great variety of microorganisms and substrates used in pectinases production by SSC, there is no consensus on the ideal conditions in relation to the type and size of the inoculum. Thus, the motivation of this work is to elucidate aspects related to the influence of SSC inoculation conditions and contribute to the development of new technologies in order to facilitate the implementation of SSC for enzymes production on an industrial scale. In this context, the present study aims at evaluating the process of pectinase obtainment by *A. niger* LB-02-SF, in SSC conducted in flasks and in rotating drum bioreactor, to define inoculation conditions that favor enzymes production and minimize the problems related to spore propagation in cultivations on a larger scale.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Microorganism*

The microorganism used was *Aspergillus niger* LB-02-SF, belonging to the collection of cultures of the Bioprocess Laboratory of the University of Caxias do Sul (Caxias do Sul, Brazil). This strain was isolated by Sandri et al. (2013) and it is also deposited in the Collection of Reference Microorganisms on Health Surveillance at the

Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) under the code INCQS 40371. The microorganism was kept at 4°C in a potato-dextrose-agar (PDA) medium and incubated at 30°C for 96 hours before the inoculum preparation.

## 2.2. Cultivation conditions and inocula preparation

The preliminary cultivations were carried out in 800 mL Becher flasks, containing 100 g of solid wet medium defined by Fontana et al. (2005) which had the following composition (g/100 g of wet medium): wheat bran (7-16 mesh), 36.6; citric pectin (Dellaware®), 6; glucose, 10; salt solution, 30.6. The salt solution contained (g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.0; MgSO<sub>4</sub>, 1.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0; FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 6.3x10<sup>-5</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 6.2x10<sup>-5</sup>; MnSO<sub>4</sub>, 1.0x10<sup>-6</sup>. The initial moisture of the solid media was adjusted to 55% by adding distilled water and inoculum. The flasks were covered with gauze and hydrophobic cotton wool and kept in a humidified atmosphere, at 30°C, for 96 hours, under static conditions. The rotating drum bioreactor used in this study was developed and fabricated by Bioprocess Laboratory researchers. This equipment is composed of an acrylic cylinder (140 x 400 mm) that rotates around its central axis, promoting the agitation of the medium at different speeds and intervals, as described by Poletto et al. (2017).

The cultivations were carried out using 1800 g of a wet medium (gwm) described above, resulting in a bioreactor occupation volume of around 60%. The humid air temperature was maintained at 30 °C, the specific airflow rate was 0.54 liter of air per kilogram of wet medium per minute and, the agitation of 1 rpm for 5 minutes every 120 minutes (Poletto et al., 2017). The cultivations in flasks and in bioreactor were carried out in triplicate.

The evaluation of the inoculation conditions was carried out starting from the standard condition of spore suspension at an initial concentration of 7x10<sup>7</sup> spore for 100 g of wet medium (spore/100gwm) (Fontana et al., 2005). Different initial concentrations of spore in the medium (7x10<sup>4</sup> to 7x10<sup>8</sup> spore/100gwm) were evaluated in Becher flasks cultivations (FS4 to FS8) and, subsequently, the best conditions were reproduced in bioreactor and compared to the standard condition (S7). In order to obtain a solid vegetative inoculum, the *A. niger* culture was exposed to 48 hours of previous growth in Becher flasks containing 100 g of the solid wet medium, inoculated with spore suspension (7x10<sup>7</sup> spore/100gwm) at incubation conditions described above. Amounts of 50 and 100 g of this fermented medium (wet basis) were added to the bioreactor as inoculum in SV50 and SV100, respectively. Biomass concentration of the solid vegetative inoculum was

determined as the one described for the flask tests. The liquid vegetative inoculum was prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks, containing 100 mL of the liquid medium (Reginatto et al., 2017), pectin free. The liquid medium was inoculated with a  $1 \times 10^8$  spores/L suspension, maintained in a bench shaker (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius) for 20 hours, at 300 rpm, 28°C (Meneghel et al., 2014). Volumes of this culture (biomass and liquid medium) were added to the bioreactor solid medium to provide initial inoculation proportions of 5 (LV5) and 10% (LV10) (v/w, wet basis). The biomass concentration of the liquid vegetative inocula was determined gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a Whatman n°1 filter and drying it at 80 °C for 24 h. The pre-growth times of cultures used as vegetative inocula were defined based on the exponential phase of cell growth. The inoculation proportions were defined so as not to provide significant changes in the other initial process parameters.

At the end of the all cultivations, the extraction of pectinases was made by suspending 1 g of moist medium in 10 mL of water at pH 4 adjusted with HCl solution to 2 mol/L, using an reciprocal shaker at 200 rpm, for 15 minutes, at 20°C. Then, the enzymatic solutions were centrifuged and filtered to remove suspended solids.

### *2.3. Analytical methods and process evaluation parameters*

Biomass concentration was indirectly determined from data obtained by oxygen balance, according to the method originally proposed by Zabriskie and Humphrey (1978) for SmC and adapted to SSC by Maiorano (1990). This method is based on the correlation between cell concentration in the solid medium and the oxygen uptake rate (OUR) for cultivation, calculated from partial oxygen pressure values, measured in an oximeter (Digimed, Brazil). For cultivations in Becher flasks, the method was performed according to that described in Fontana (2004). The Becher flasks were removed from the incubation oven and immediately placed in a bath at the same temperature (30°C). A closed hose system was attached to the flask. A peristaltic pump promoted the circulation of gases in this system. At one point in this circuit, the polarographic electrode of the oximeter was added. Decreasing values of oxygen fraction are measured as oxygen is converted to carbon dioxide due to fungal respiration. These values were measured at 30-second intervals over 10 minutes and later used to calculate the OUR value in flasks cultivations. The determination of OUR for cultivations in the bioreactor was conducted according to Poletto et al. (2017) using a digital oximeter (Digimed, Brazil). In both cases, the values of the true biomass yield from oxygen consumption ( $Y_{GO}$ ) –  $0.092 \text{ g}_{\text{biomass}}/\text{mmol O}_2$  – and

the maintenance coefficient for oxygen ( $m_o$ ) –  $1.25 \text{ mmol O}_2/\text{g}_{\text{biomass}}/\text{h}$  – for *A. niger* LB-02-SF were used, determined in Poletto et al. (2017). The cell concentration values were expressed in mg of biomass per g of dry matter (mg/gdm).

In Becher flasks cultivations, when removed from the incubator, the flask was taken to the OUR determination system as described above (Fontana, 2004). Posteriorly, all fermented medium contained in the Becher was homogenized, and moisture content and concentration of total reducing sugars (TRS) were determined (Fontana et al., 2005). The activity of total pectinases was evaluated according to the reduction in viscosity of a standard solution of citrus pectin (Dellaware®) 0.9 % (m/v) in 0.05 % acetate buffer (pH 4.0) according to the method defined by Maiorano (1990) with modifications proposed by Malvessi and Silveira (2004). To obtain the pectinase activity value in U/g of dry medium (U/gdm), the conditions of extraction and moisture content of the medium at each sampling point were considered. The determinations of enzymatic activity, moisture content and TRS were performed in duplicates.

In rotating drum bioreactor tests, the oxygen fraction values in the air, measured in a digital oximeter (Digimed, Brazil) at different cultivation times were used for the indirect determination of cell concentration. Sampling was performed every 24 hours. During the sampling, the air flow at the reactor inlet/outlet was also adjusted, and the temperature inside the medium bed was checked. After sampling, the same analytical protocols used in Becher flasks experiments were followed.

The specific production yield ( $Y_{P/X}$ ) was calculated from the maximum values of enzyme activity ( $P_{\text{max}}$ ) and biomass concentration ( $X_{\text{max}}$ ) in each cultivation. The yields from the substrate to pectinase ( $Y_{P/S}$ ) and biomass ( $Y_{X/S}$ ) were calculated from the relation between  $P_{\text{max}}$  and  $X_{\text{max}}$  obtained during the cultivation and substrate consumed until sampling time. The productivity ( $p$ ) represents the concentration of product formed related to the process time.

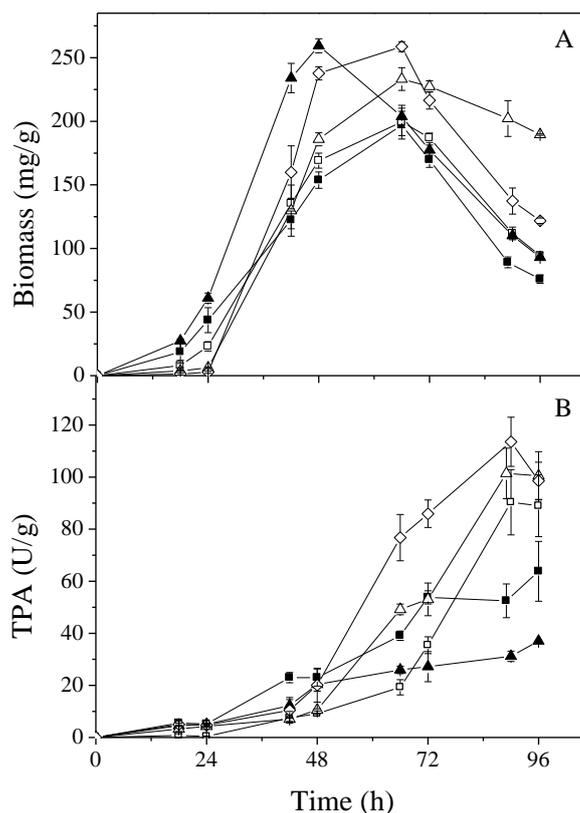
#### 2.4. Statistical analysis

Statistical tests were performed by analysis of variance (*one-way* ANOVA) with a confidence level of 5% ( $p < 0.05$ ) using SPSS program (version 20.0).

### 3. Results

#### 3.1. Spore suspension inoculum

The evaluation of the best inoculum size was performed by varying the concentration of the spore suspension. The tested concentrations were chosen based on the standard concentration ( $7 \times 10^7$  spores/100gwm). Preliminary tests were conducted in Becher flasks with concentrations varying between  $7 \times 10^4$  and  $7 \times 10^8$  spore/100gwm. The kinetic profiles of cell growth and pectinase production observed during these cultivations are shown in Fig. 1.



**Fig. 1** Variation of biomass (A) and total pectinases activity (TPA) (B) in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations conducted in Becher flasks with different concentrations of spore suspension inoculum. ( $\diamond$ ) FS4:  $7 \times 10^4$  spore/100gwm; ( $\Delta$ ) FS5:  $7 \times 10^5$  spore/100gwm; ( $\square$ ) FS6:  $7 \times 10^6$  spore/100gwm; ( $\blacksquare$ ) FS7:  $7 \times 10^7$  spore/100gwm; ( $\blacktriangle$ ) FS8:  $7 \times 10^8$  spore/100gwm.

In the first 24 hours of the processes, higher biomass values were achieved in media inoculated with higher inoculum concentrations. A more pronounced increase in biomass values was verified in FS8 up to the peak was reached in 48 hours. After this point, accentuated reduction of biomass was observed until the end of the process. In other conditions, the maximum biomass concentration ( $X_{\max}$ ) was reached in 66 hours of cultivations (Fig. 1A).

The maximum total pectinase activity ( $P_{\max}$ ) in standard cultivation (FS7) was reached in 96 hours, as seen in Fig. 1B. Among the conditions evaluated, the highest

enzymatic activities in the first 48 hours of the process were verified in FS7. Afterward, increasing profiles of total pectinase activity were verified in the FS4, FS5, and FS6 cultivations. In these cases, the  $P_{\max}$  values were reached in 90 hours of process and in higher values than those observed in the standard condition. Use of highest spore concentration (FS8) was not favorable to the pectinases production, with  $P_{\max}$  reached in 96 hours.

The comparison of the results obtained in flasks cultivations by using different concentrations of spores is shown in Table 1.

**Table 1** Results of *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations carried out in Becher flasks with different concentrations of spore suspension inoculum.

Parameters	FS4	FS5	FS6	FS7	FS8
$S_0$ (mg/gdm)	653.7 <sup>a</sup> ± 7.75	696.7 <sup>a</sup> ± 8.07	672.8 <sup>a</sup> ± 24.9	657.3 <sup>a</sup> ± 41.6	659.8 <sup>a</sup> ± 9.0
$S_{\text{cons}}$ (mg/gdm)	521.6 <sup>a</sup> ± 19.0	500.2 <sup>a</sup> ± 6.02	481.5 <sup>a</sup> ± 17.7	480.2 <sup>a</sup> ± 13.2	405.3 <sup>b</sup> ± 42.0
$M_0$ (%)	54.7 <sup>a</sup> ± 0.31	55.5 <sup>a</sup> ± 0.85	55.6 <sup>a</sup> ± 0.83	58.2 <sup>a</sup> ± 5.82	57.1 <sup>a</sup> ± 1.01
$M_f$ (%)	64.9 <sup>a</sup> ± 3.29	67.4 <sup>a</sup> ± 1.44	69.4 <sup>a</sup> ± 1.20	68.4 <sup>a</sup> ± 1.27	69.0 <sup>a</sup> ± 1.67
$X_{\max}$ (mg/gdm)	258.7 <sup>a</sup> ± 3.9	233.2 <sup>b</sup> ± 8.9	199.5 <sup>c</sup> ± 10.8	196.9 <sup>c</sup> ± 10.9	259.4 <sup>a</sup> ± 5.5
$t_{X_{\max}}$ (h)	66	66	66	66	48
$P_{\max}$ (U/gdm)	113.6 <sup>a</sup> ± 9.4	101.4 <sup>a</sup> ± 9.7	90.3 <sup>a</sup> ± 12.5	63.8 <sup>b</sup> ± 11.5	37.0 <sup>c</sup> ± 0.1
$t_{P_{\max}}$ (h)	90	90	90	96	96
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0.44 <sup>a</sup> ± 0.04	0.44 <sup>a</sup> ± 0.04	0.45 <sup>a</sup> ± 0.08	0.33 <sup>a</sup> ± 0.06	0.14 <sup>b</sup> ± 0.00
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0.66 <sup>a</sup> ± 0.00	0.47 <sup>c</sup> ± 0.02	0.54 <sup>b</sup> ± 0.06	0.46 <sup>c</sup> ± 0.02	0.66 <sup>a</sup> ± 0.02
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0.21 <sup>a</sup> ± 0.02	0.20 <sup>a</sup> ± 0.03	0.23 <sup>a</sup> ± 0.03	0.13 <sup>b</sup> ± 0.03	0.09 <sup>b</sup> ± 0.01
$p$ (U/gdm/h)	1.26 <sup>a</sup> ± 0.10	1.13 <sup>a</sup> ± 0.11	1.00 <sup>a</sup> ± 0.14	0.66 <sup>b</sup> ± 0.12	0.39 <sup>b</sup> ± 0.00

$S_0$  – initial concentration of total reducing sugars;  $S_{\text{cons}}$  – concentration of total reducing sugars consumed;  $M_0$  – initial moisture content;  $M_f$  – final moisture content;  $X_{\max}$  – maximum biomass concentration;  $t_{X_{\max}}$  – time for achieving  $X_{\max}$ ;  $P_{\max}$  – maximum total pectinase activity;  $t_{P_{\max}}$  – time for achieving  $P_{\max}$ ;  $Y_{P/X}$  – specific production yield;  $Y_{X/S}$  – biomass yield from  $S_{\text{cons}}$ ;  $Y_{P/S}$  – pectinase yield from  $S_{\text{cons}}$ ;  $p$  – productivity. **FS4** –  $7 \times 10^4$  spore/100gwm; **FS5** –  $7 \times 10^5$  spore/100gwm; **FS6** –  $7 \times 10^6$  spore/100gwm; **FS7** –  $7 \times 10^7$  spore/100gwm; **FS8** –  $7 \times 10^8$  spore/100gwm. The results represent means ( $n = 3$ ) ± standard deviation. Different letters (a-c) indicate significant differences ( $p < 0.05$ , Tukey's test).

The initial values of substrate concentration and moisture content were similar ( $p > 0.05$ ) in all cultivations, with an average of 668 mg/gdm and 56%, respectively (Table 1). The highest substrate consumption was observed in the FS4 to FS7 cultivations, with TRS values consumed around 500 mg/gdm at the end of the process. On the other hand, in FS8 was determined the lowest value of substrate consumed (405.3 mg/gdm). Similar final moisture contents were determined in all cultivations, around 68%.

The biomass peaks were reached in 66 hours in the FS4 to FS7 cultivations and 48 hours in FS8 (Table 1). The highest values of  $X_{\max}$  were attained in FS4 and FS8, around 260 mg/gdm, followed by 233 mg/gdm obtained in FS5. The lowest  $X_{\max}$  values were achieved in FS6 and FS7, around 200 mg/gdm. An increase in pectinase production was observed with the reduction of spore concentration in the inoculum. The  $P_{\max}$  values reached at 90 hours in FS4, FS5 and, FS6 cultivations were statistically similar ( $p > 0.05$ ) and superior to those obtained at 96 hours in the FS7 and FS8 tests. The specific production yield ( $Y_{P/X}$ ) achieved in FS8 (0.14 U/mg) was lower when compared to the other conditions evaluated. The highest values of  $Y_{X/S}$  were estimated in FS4 and FS8 (0.66 mg/mg). The  $Y_{P/S}$  and productivity in pectinases values were higher in the FS4, FS5, and FS6 cultivations.

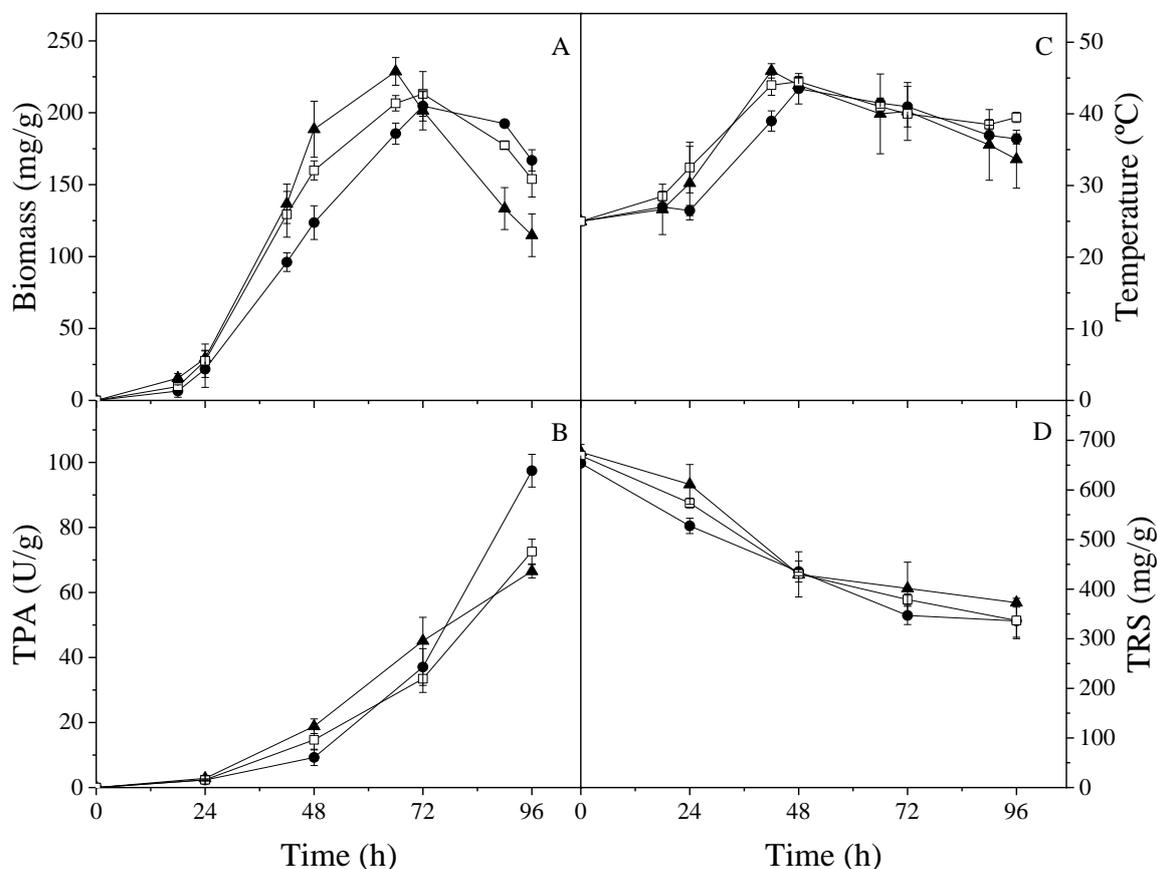
From the evaluation of the results obtained in Becher flasks tests presented in Fig. 1 and Table 1, the FS4 and FS5 cultivations were reproduced in the rotating drum bioreactor compared to the FS7 (standard condition). The kinetic profiles of these cultivations, designated as S4, S5 and S7, are shown in Fig. 2.

Similar biomass concentrations were verified during the initial 24 hours of the three cultivations. After this period, higher values of biomass concentration were observed in S7 cultivation until reaching  $X_{\max}$  (224.2 mg/gdm) in 66 hours. The maximum biomass values were reached in 72 hours in S4 and S5. After the biomass concentration peaks were obtained, the reduction was more pronounced in S7 cultivation compared to the other two conditions (Fig. 2A).

No differences were observed in enzyme activity during the first 24 hours of the process, as shown in Fig. 2B. The increase in enzymatic activity after 72 hours of S4 was higher when compared to the other conditions evaluated, reaching  $P_{\max}$  of 97.4 U/gdm at 96 hours. Although the same increase profile was observed at S5, the value of pectinase activity (72.6 U/gdm) reached at the end of the process was lower. The  $P_{\max}$  value (65.7 U/gdm) was also obtained in 96 hours in the S7 cultivation.

It is important to note that the temperature variation during cultivation is related to the metabolic activity of the microorganism since there are no changes in the temperature of the incoming air in the bioreactor or in the external temperature control chamber. The temperature profiles shown in Fig. 2C were similar in the three conditions. The increase in values was slower in S4, reaching  $T_{\max}$  (43.5°C) in 48 hours. The maximum temperature values in S5 and S7 were measured in 42 hours of the process, around 45°C. Similar substrate consumed profiles were observed in all tests despite the different results

of biomass and pectinase activity. Residual substrate around 350 mg/gdm was verified in the three cultivations (Fig. 2D).



**Fig. 2** Variation of biomass (A), total pectinases activity (TPA) (B), temperature (C) and total reducing sugars (TRS) (D) in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations conducted in a rotating drum bioreactor with different concentrations of spore suspension inoculum. (●) S4:  $7 \times 10^4$  spore/100gwm; (□) S5:  $7 \times 10^5$  spore/100gwm; (▲) S7:  $7 \times 10^7$  spore/100gwm.

Table 2 show the results obtained in bioreactor cultivations by using different concentration of spores in the inoculum.

The values of initial substrate concentration, substrate consumed, initial and final moisture content and maximum temperature were similar ( $p > 0.05$ ) in all cultivations (Table 2). The maximum biomass concentration also was similar in the three conditions, with values around 200 mg/g. The peak of pectinase activity obtained in S4 was significantly higher than the values reached in S5 and S7. Likewise, the highest values of  $Y_{P/X}$  and  $Y_{P/S}$  were obtained in the S4 cultivation. The productivity of pectinases obtained in S4 was 1.015 U/gdm/h. This value is about 48% higher than that achieved in the standard condition (0.691 U/gdm/h). The enzymatic productivity verified in S5 (0.756

U/gdm/h) was statistically similar ( $p > 0.05$ ) to that reached in S7.

**Table 2** Results of *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations carried out in a rotating drum bioreactor with different concentrations of spore suspension inoculum.

Parameters	S4	S5	S7
<b>S<sub>0</sub> (mg/gdm)</b>	653.6 <sup>a</sup> ± 4.93	669.3 <sup>a</sup> ± 9.02	676.3 <sup>a</sup> ± 15.3
<b>S<sub>cons</sub> (mg/gdm)</b>	317.7 <sup>a</sup> ± 35.7	332.4 <sup>a</sup> ± 24.9	303.6 <sup>a</sup> ± 23.6
<b>M<sub>0</sub> (%)</b>	54.0 <sup>a</sup> ± 1.12	54.3 <sup>a</sup> ± 2.00	54.4 <sup>a</sup> ± 3.24
<b>M<sub>f</sub> (%)</b>	56.3 <sup>a</sup> ± 4.26	63.0 <sup>a</sup> ± 6.60	62.4 <sup>a</sup> ± 2.77
<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>	43.5 <sup>a</sup> ± 2.12	44.0 <sup>a</sup> ± 1.41	46.0 <sup>a</sup> ± 1.00
<b>X<sub>max</sub> (mg/gdm)</b>	204.7 <sup>a</sup> ± 10.4	213.1 <sup>a</sup> ± 15.5	218.3 <sup>a</sup> ± 11.7
<b>t<sub>Xmax</sub> (h)</b>	72	72	66
<b>P<sub>max</sub> (U/gdm)</b>	97.5 <sup>a</sup> ± 5.03	72.6 <sup>b</sup> ± 3.81	66.4 <sup>b</sup> ± 1.91
<b>t<sub>Pmax</sub> (h)</b>	96	96	96
<b>Y<sub>P/X</sub> (U/mg)</b>	0.477 <sup>a</sup> ± 0.05	0.340 <sup>b</sup> ± 0.01	0.305 <sup>b</sup> ± 0.02
<b>Y<sub>X/S</sub> (mg/mg)</b>	0.668 <sup>a</sup> ± 0.02	0.734 <sup>a</sup> ± 0.06	0.832 <sup>a</sup> ± 0.06
<b>Y<sub>P/S</sub> (U/mg)</b>	0.307 <sup>a</sup> ± 0.01	0.219 <sup>b</sup> ± 0.02	0.219 <sup>b</sup> ± 0.01
<b>p (U/gdm/h)</b>	1.015 <sup>a</sup> ± 0.05	0.756 <sup>b</sup> ± 0.04	0.691 <sup>b</sup> ± 0.02

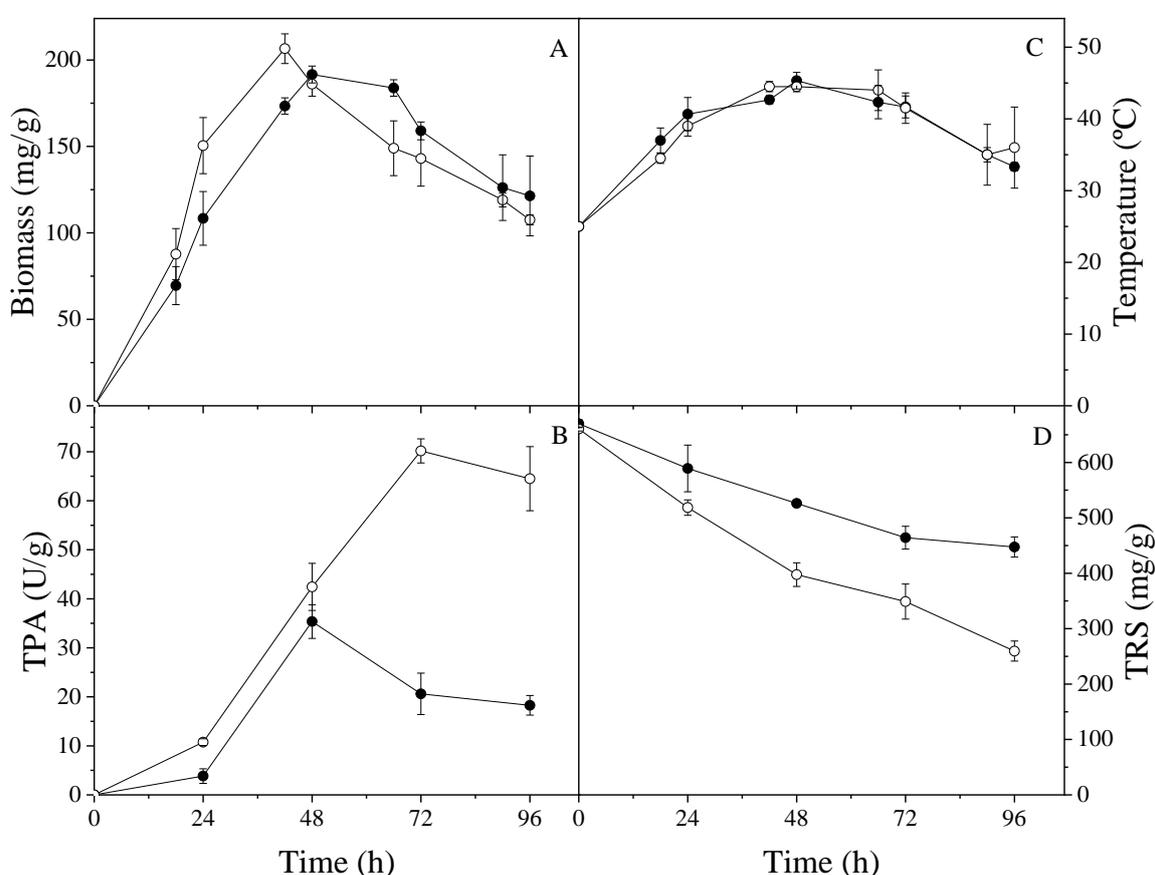
S<sub>0</sub> – initial concentration of total reducing sugars; S<sub>cons</sub> – concentration of total reducing sugars consumed; M<sub>0</sub> – initial moisture content; M<sub>f</sub> – final moisture content; T<sub>max</sub> – maximum temperature; X<sub>max</sub> – maximum biomass concentration; t<sub>X,max</sub> – time for achieving X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – maximum total pectinase activity; t<sub>P,max</sub> – time for achieving P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – specific production yield; Y<sub>X/S</sub> – biomass yield from S<sub>cons</sub>; Y<sub>P/S</sub> – pectinase yield from S<sub>cons</sub>; p - productivity. **S4** – 7x10<sup>4</sup> spore/100gwm; **S5** – 7x10<sup>5</sup> spore/100gwm; **S7** – 7x10<sup>7</sup> spore/100gwm. The results represent means (n = 3) ± standard deviation. Different letters (a-b) indicate significant differences (p < 0.05, Tukey's test).

### 3.2. Solid vegetative inoculum

The solid vegetative inoculum was prepared with *A. niger* grown in Becher flasks with 100 g of wet medium for 48 hours. After this period, the average cell concentration determined in the inoculum was 143.5 ± 3.7 mg/gdm. For this evaluation, masses of solid *A. niger* culture of 50 (SV50) and 100 gwm (SV100) were used as inoculum in cultivations conducted in rotating drum bioreactor. The kinetic profiles of these cultivations are shown in Fig. 3.

Higher biomass values were observed up to 42 hours of SV100. The peak was reached at this point, followed by a reduction until the end of the process (Fig. 3A). The

maximum cell concentration was obtained in 48 hours in SV50, and the profile of reduction was verified after 66 hours of the process. In Fig. 3B the enzymatic activity profiles of the cultivations with different sizes of solid vegetative inoculum are shown. The maximum pectinolytic activity (35.4 U/gdm) was reached in 48 hours in SV50. This value is comparable to that achieved at the same time in SV100, around 40 U/gdm. Enzymatic activity increase was observed after this period in SV100, and the peak was achieved in 72 hours. The activity value in SV100 was around double that reached in SV50 (Fig 3B). Figure 3C shows the temperature profiles that were similar in the two cultivations. Substrate concentrations were lower in SV100 at all sampling points, with residual TRS value around 250 mg/gdm (Fig. 3D).



**Fig. 3** Variation of biomass (A), total pectinases activity (TPA) (B), temperature (C) and total reducing sugars (TRS) (D) in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations conducted in a rotating drum bioreactor with different sizes of solid vegetative inoculum. (●) SV50: 50 gwm of solid vegetative inoculum; (○) SV100: 100 gwm of solid vegetative inoculum.

The comparison between results obtained in cultivations with vegetative inoculum (SV50 e SV100) and the standard condition (S7) is shown in Table 3.

Initial substrate concentration and moisture contents (initial and final) of the three cultivations were statistically similar ( $p > 0.05$ ). The substrate consumed at the end of SV50 (222.4 U/gdm) was the lowest compared to the other cultivations. On the other hand, the TRS consumed in SV100, around 400 mg/gdm, was higher than the value verified in S7. The maximum temperatures achieved in the three conditions did not show statistical differences ( $p > 0.05$ ).  $X_{\max}$  values around 200 mg/gdm were verified but reached at different times of each process. The maximum biomass concentration was observed in 66 hours of the S7 cultivation, while in SV50 and SV100, the peaks attainment times were 48 and 42 hours, respectively.

**Table 3** Results of *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations carried out in a rotating drum bioreactor with different sizes of solid vegetative inoculum compared to the standard condition.

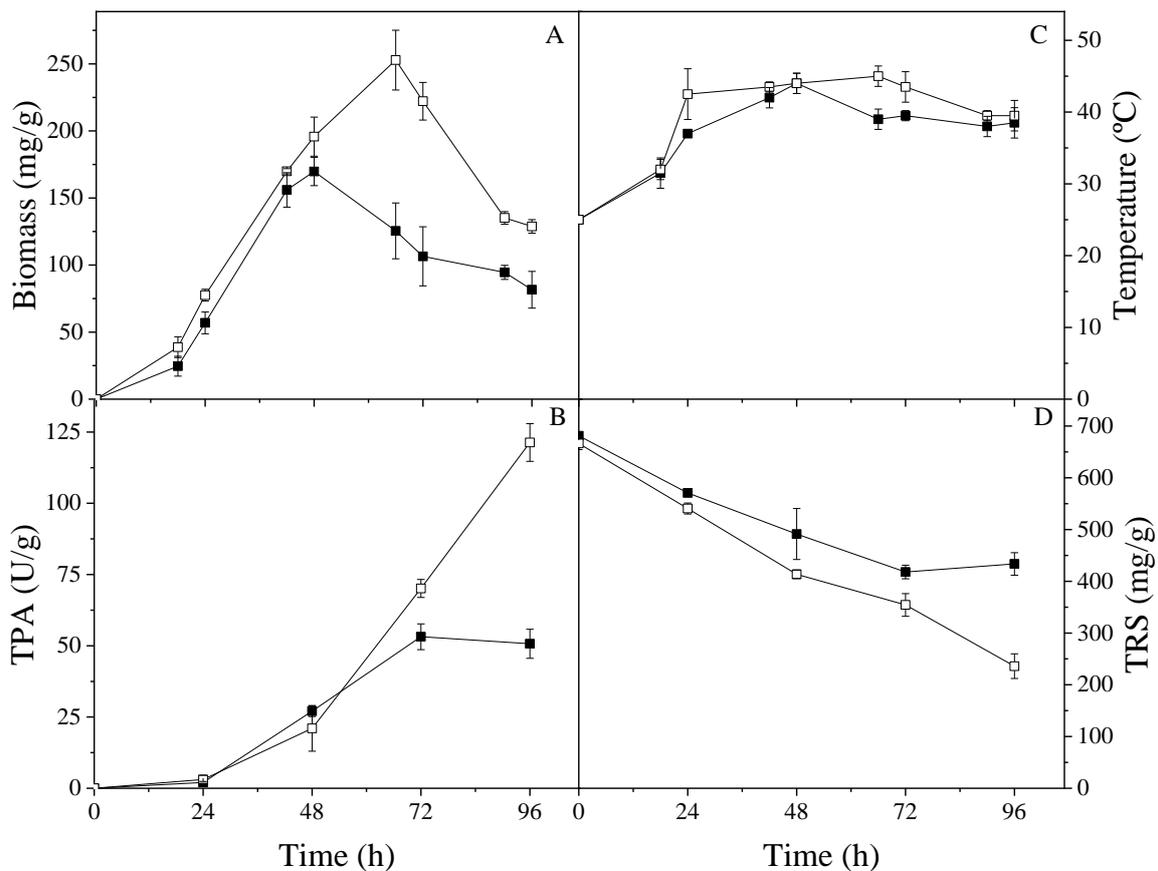
Parameters	S7	SV50	SV100
<b>S<sub>0</sub> (mg/gdm)</b>	676.3 <sup>a</sup> ± 15.3	669.8 <sup>a</sup> ± 6.99	660.4 <sup>a</sup> ± 3.42
<b>S<sub>cons</sub> (mg/gdm)</b>	303.6 <sup>b</sup> ± 23.6	222.4 <sup>c</sup> ± 19.5	400.8 <sup>a</sup> ± 14.7
<b>M<sub>0</sub> (%)</b>	54.4 <sup>a</sup> ± 3.24	55.0 <sup>a</sup> ± 2.63	56.7 <sup>a</sup> ± 0.96
<b>M<sub>f</sub> (%)</b>	62.4 <sup>a</sup> ± 2.77	68.3 <sup>a</sup> ± 3.37	63.2 <sup>a</sup> ± 0.01
<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>	46.0 <sup>a</sup> ± 1.00	45.3 <sup>a</sup> ± 1.15	45.0 <sup>a</sup> ± 0.00
<b>X<sub>max</sub> (mg/gdm)</b>	218.3 <sup>a</sup> ± 11.7	191.6 <sup>b</sup> ± 4.87	206.5 <sup>ab</sup> ± 8.61
<b>t<sub>Xmax</sub> (h)</b>	66	48	42
<b>P<sub>max</sub> (U/gdm)</b>	66.4 <sup>a</sup> ± 1.91	35.4 <sup>b</sup> ± 3.43	70.2 <sup>a</sup> ± 2.46
<b>t<sub>Pmax</sub> (h)</b>	96	48	72
<b>Y<sub>P/X</sub> (U/mg)</b>	0.305 <sup>a</sup> ± 0.02	0.185 <sup>b</sup> ± 0.02	0.339 <sup>a</sup> ± 0.00
<b>Y<sub>X/S</sub> (mg/mg)</b>	0.832 <sup>b</sup> ± 0.06	1.334 <sup>a</sup> ± 0.02	0.787 <sup>b</sup> ± 0.02
<b>Y<sub>P/S</sub> (U/mg)</b>	0.219 <sup>a</sup> ± 0.01	0.247 <sup>a</sup> ± 0.03	0.226 <sup>a</sup> ± 0.01
<b>p (U/gdm/h)</b>	0.691 <sup>b</sup> ± 0.02	0.737 <sup>b</sup> ± 0.07	0.974 <sup>a</sup> ± 0.03

S<sub>0</sub> – initial concentration of total reducing sugars; S<sub>cons</sub> – concentration of total reducing sugars consumed; M<sub>0</sub> – initial moisture content; M<sub>f</sub> – final moisture content; T<sub>max</sub> – maximum temperature; X<sub>max</sub> – maximum biomass concentration; t<sub>X,max</sub> – time for achieving X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – maximum total pectinase activity; t<sub>P,max</sub> – time for achieving P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – specific production yield; Y<sub>X/S</sub> – biomass yield from S<sub>cons</sub>; Y<sub>P/S</sub> – pectinase yield from S<sub>cons</sub>; p – productivity. **S7** – 7x10<sup>7</sup> spore/100gwm; **SV50** – 50 gwm of solid vegetative inoculum; **SV100** – 100 gwm of solid vegetative inoculum. The results represent means (n = 3) ± standard deviation. Different letters (a-b) indicate significant differences (p < 0.05, Tukey's test).

The values of  $P_{\max}$  and  $Y_{P/X}$  obtained in S7 and SV100 were statistically similar ( $p>0.05$ ) and higher compared to SV50. In SV50, the lowest  $P_{\max}$  value was observed among all the conditions tested, only 35.4 U/gdm. The  $Y_{X/S}$  and  $Y_{P/S}$  values obtained in the three conditions did not differ statistically ( $p>0.05$ ). The time to obtain  $P_{\max}$  was lower in cultivations with solid vegetative inoculum. Therefore, the productivities achieved in S7 and SV50 were statistically similar, around 0.7 U/gdm/h. In SV100, despite a similar  $P_{\max}$  value, productivity was about 42% higher than achieved in the standard condition.

### 3.3. Liquid vegetative inoculum

In this step, two proportions of liquid vegetative inoculum, 5 and 10% (v/w) were evaluated in the rotating drum bioreactor, designated LV5 and LV10, respectively. These cultivations were inoculated with different volumes of liquid culture of *A. niger* grown for 18 hours. After this period, the average biomass concentration of inoculum cultures was  $5.49 \pm 0.32$  g/L. The results obtained in LV5 and LV10 are shown in Fig. 4.



**Fig. 4** Variation of biomass (A), total pectinases activity (TPA) (B), temperature (C) and total reducing sugars (TRS) (D) in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations conducted in a rotating drum bioreactor with different sizes of liquid vegetative inoculum. (■) LV5: 5% (v/w); (□) LV10: 10% (v/w).

Similar biomass concentrations were observed in both cultivations for up to 48 hours when  $X_{\max}$  value of 169.8 mg/gdm was attained in LV5 (Fig. 4A). In LV10 the cell concentration peak was reached in 66 hours and in a higher value (252.8 mg/gdm).  $P_{\max}$  of 53.2 U/gdm was obtained in LV5 in 72 hours, keeping this value to the end of the process. In LV10, an increase of pectinase activity was observed after 72 hours, with the peak (121.3 U/gdm) reached at 96 hours. The pectinase production in a rotating drum bioreactor was favored by using vegetative inoculum in the proportion of 10% (v/w, LV10), and as a result, an enzyme activity value superior to that achieved in LV5 was observed (Fig. 4B). The profiles of temperature variation as a function of the cultivation time can be observed in Fig. 4C. In LV10, temperatures above 40°C were verified from 24 to 72 hours. The maximum temperature values in LV5 (43°C) and LV10 (45°C) were reached in 42 and 48 hours, respectively. The TRS consumed profiles shown in Fig. 4D were similar in both conditions. However, a residual substrate concentration of 236 mg/gdm was observed in LV10, lower than that observed in LV5 (380.0 mg/gdm).

Table 4 shows the comparison between the results obtained in cultivations with liquid vegetative inoculum and the control condition (S7).

The initial substrate concentration and initial moisture values determined in cultivations with different inoculum types were statistically similar ( $p > 0.05$ ). Likewise, the final moisture and the maximum temperatures reached in the three conditions did not show statistical differences. Higher TRS consumed (430.4 mg/gdm) was observed at the end of LV10 compared to values achieved in LV5 and S7, around 300 mg/gdm.  $X_{\max}$  obtained in LV10 (252.8 mg/gdm) was statistically similar to the value observed in S7. A lower biomass peak value was reached in LV5 (169.8 mg/gdm). On the other hand, the  $P_{\max}$  value obtained in LV5 (53.2 U/gdm) was statistically similar ( $p > 0.05$ ) to that achieved in the standard condition. The highest enzymatic activity among the conditions tested was reached in the LV10 cultivation (121.3 U/gdm). A similar  $Y_{X/S}$  value was achieved in the three cultivations, around 0.8 U/mg. The others process parameters were superior in the LV10, with the enzymatic productivity being about 85% higher than that obtained in the S7 (Table 4).

**Table 4** Results of *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivations carried out in a rotating drum bioreactor with different sizes of liquid vegetative inoculum compared to the standard condition.

Parameters	S7	LV5	LV10
<b>S<sub>0</sub> (mg/gdm)</b>	676.3 <sup>a</sup> ± 15.3	681.1 <sup>a</sup> ± 3.9	666.3 <sup>a</sup> ± 11.9
<b>S<sub>cons</sub> (mg/gdm)</b>	303.6 <sup>b</sup> ± 23.6	301.1 <sup>b</sup> ± 19.0	430.4 <sup>a</sup> ± 35.70
<b>M<sub>0</sub> (%)</b>	54.4 <sup>a</sup> ± 3.24	51.0 <sup>a</sup> ± 3.21	53.9 <sup>a</sup> ± 2.23
<b>M<sub>f</sub> (%)</b>	62.4 <sup>a</sup> ± 2.77	56.9 <sup>a</sup> ± 5.18	52.9 <sup>a</sup> ± 0.62
<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>	46.0 <sup>a</sup> ± 1.00	44.0 <sup>a</sup> ± 1.41	45.50 <sup>a</sup> ± 0.70
<b>X<sub>max</sub> (mg/gdm)</b>	218.3 <sup>a</sup> ± 11.7	169.8 <sup>b</sup> ± 10.5	252.8 <sup>a</sup> ± 22.3
<b>t<sub>Xmax</sub> (h)</b>	66	72	66
<b>P<sub>max</sub> (U/gdm)</b>	66.4 <sup>b</sup> ± 1.91	53.2 <sup>b</sup> ± 4.52	121.3 <sup>a</sup> ± 6.62
<b>t<sub>Pmax</sub> (h)</b>	96	72	96
<b>Y<sub>P/X</sub> (U/mg)</b>	0.305 <sup>b</sup> ± 0.02	0.315 <sup>b</sup> ± 0.05	0.480 <sup>a</sup> ± 0.02
<b>Y<sub>X/S</sub> (mg/mg)</b>	0.832 <sup>a</sup> ± 0.06	0.897 <sup>a</sup> ± 0.06	0.811 <sup>a</sup> ± 0.02
<b>Y<sub>P/S</sub> (U/mg)</b>	0.219 <sup>b</sup> ± 0.01	0.202 <sup>b</sup> ± 0.01	0.282 <sup>a</sup> ± 0.01
<b>p (U/gdm/h)</b>	0.691 <sup>b</sup> ± 0.02	0.738 <sup>b</sup> ± 0.06	1.264 <sup>a</sup> ± 0.06

S<sub>0</sub> – initial concentration of total reducing sugars; S<sub>cons</sub> – concentration of total reducing sugars consumed; M<sub>0</sub> – initial moisture content; M<sub>f</sub> – final moisture content; T<sub>max</sub> – maximum temperature; X<sub>max</sub> – maximum biomass concentration; t<sub>X,max</sub> – time for achieving X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – maximum total pectinase activity; t<sub>P,max</sub> – time for achieving P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – specific production yield; Y<sub>X/S</sub> – biomass yield from S<sub>cons</sub>; Y<sub>P/S</sub> – pectinase yield from S<sub>cons</sub>; p – productivity. **S7** – 7x10<sup>7</sup> spore/100gwm; **LV5** – 5% (v/w) liquid vegetative inoculum; **LV10** – 10% (v/w) liquid vegetative inoculum. The results represent means (n = 3) ± standard deviation. Different letters (a-b) indicate significant differences (p < 0.05, Tukey's test).

#### 4. Discussion

The process for obtaining pectinases by *A. niger* LB-02-SF in SSC was evaluated in relation to variation of inoculum type and size. The results achieved in flasks and rotating drum bioreactor cultivations confirmed the influence of inoculation conditions on fungal metabolism. This observation corroborates the literature reports that the inoculation conditions can affect cell growth and metabolite production in solid-state cultivations of filamentous fungi (Boratyński et al., 2018; Demir and Tari, 2014; Gutarra et al., 2007; Sethi et al., 2016).

More accelerated fungal growth was observed in the first hours of flasks (Fig 1A) and rotating drum bioreactor (Fig 2A) cultivations inoculated with higher spore concentrations. In FS8, a drop in cell concentrations was observed after the biomass peak

which was attained at 48 hours of cultivation. On the other hand, cell growth was slower in the first hours of FS4, the flask cultivation inoculated with the lowest spore concentration (Fig. 1A). In bioreactor cultivations, a slower increase in cell concentrations was observed up to 66 hours of S4 when compared to the others cultivations (Fig. 2A). Moreover, despite the faster cell growth in S5 and S7, the use of higher inoculum concentrations did not favor the pectinase production (Fig. 1B and Fig. 2B). This result can be explained by the metabolic activity reduction related to the imbalance or depletion of nutrients caused by the rapid increase in biomass at the beginning of the cultivations (Ooi et al., 2021; Sethi et al., 2016). Similar behavior was observed by Sethi et al. (2016), which reported the higher pectinase production using a lower concentration of *Aspergillus terreus* inoculum in SSC performed in flasks. The authors related these results to the exhaustion of nutrients caused by accelerated growth in the first hours of the process with the use of higher spore concentration. Bezawada and Raju (2018) related the reduction in pectinase production in flask SSC by using larger inoculum sizes of *A. niger* due to overcrowding of spores. Ezeilo et al. (2019) reported lower cellulase and xylanase activities using higher inocula of *Trichoderma asperellum* in SSC carried out in flasks. To explain this behavior, the authors cite the phenomenon of autoinhibition of spore germination, which may be related to a crowding effect caused by high concentrations of spores in the solid medium. In the present work, among the conditions evaluated in the bioreactor cultivations, the highest pectinase activity was obtained in S4. It is important to emphasize that despite the slower growth in this culture, the  $P_{\max}$  value was reached in 96 hours, at the same time observed in S5 and S7. Consequently, with higher pectinase activity and the same cultivation time, higher enzyme productivity was obtained in S4.

In the second step of this work, two sizes of solid vegetative inoculum pre-grown for 48 hours were evaluated. The best results of pectinase production were obtained using the highest mass (100 gwm) of the *A. niger* culture pre-grown as inoculum (SV100, Fig. 3B). In SV50, it is suggested that the inoculum amount used was not sufficient for the suitable fungal colonization of the solid medium. The comparison of TRS profiles during each cultivation reinforces this hypothesis (Fig. 3D). The TRS concentration measured at the end of the SV50 (450 mg/gdm) was higher than that verified in the SV100 cultivation (260 mg/gdm), endorsing the reduced substrate consumption in the SV50. In SV100, despite the results of pectinase activity similar to that achieved S7, a reduction of 24 hours for the obtainment of  $P_{\max}$  was verified (Table 3). Thereby, an increment of 42% in

pectinases productivity was achieved in SV100 when compared to S7. In addition, the biomass peaks were also reached in a shorter process time in cultures inoculated with pre-grown culture in a solid medium. The biomass concentrations observed in up to 24 hours in SV50 and SV100 (Fig. 3A) were higher than those observed in the same period for S7 (Fig. 2A). This fact indicates the reduction of the *lag* phase in cultivations with solid vegetative inoculum. Gutarra et al. (2007) reported *lag* phase reduction and also lipase productivity increase in solid cultivations inoculated with fermented cake of *Penicillium simplissimum* compared to those inoculated by spores. Higher xylanase productivity was achieved in SSC using a solid vegetative inoculum of *Penicillium canescens* compared to spore or liquid vegetative conditions in work carried out by Assamoi et al. (2008). In this case, a reduction of the *lag* phase and in the time for maximum enzymatic activity obtainment was also reported in cultivations using solid inoculum. The authors suggested that inoculum pre-grown under the same cultivation conditions favored the fungal colonization in the solid medium (Assamoi et al., 2008; Gutarra et al., 2007).

Among the conditions of liquid vegetative inoculum evaluated, the best results in terms of cell growth were achieved in LV10 (Fig 4A). Besides the favored conditions for cell growth, it was verified that the use of the highest proportion of liquid vegetative inoculum (10%, v/w) was more favorable to the pectinase production (Fig 4B). The same behavior was reported by Alam et al. (2011) and Castro et al. (2011), who using liquid cultures of the fungi of the genus *Aspergillus* as inoculum for citric acid and amylases production in SSC, respectively, obtained the best results using higher inoculum concentrations. As verified in the cultivation with the smallest solid vegetative inoculum (SV50), lower substrate consumption was observed in LV5. In this case, the residual TRS was around 380 mg/gwm, a value higher than that determined in LV10 (236 mg/gwm). This behavior indicates that the proportion of inoculum used in LV5 may not have been sufficient for adequate colonization of the culture medium. Compared to the results obtained in the standard condition (spore inoculum, S7), the enzymatic activity obtained in LV10 was about 85% higher than that achieved in S7 at the same processes time (Table 4). The higher results of pectinase production observed in LV10 could be related to the higher metabolic activity observed in this condition, verified by the longer time under temperatures above 40°C (Fig. 4C) in comparison to the S7 cultivation temperature profile (Fig. 2C). According to Poletto et al. (2017), the natural increase of temperature cultivation to values around 45°C was favorable to the pectinase production by *A. niger* in SSC.

The use of the highest proportion of liquid vegetative inoculum (10% v/w) was the most promising inoculation strategy for pectinase production among all the conditions evaluated in this work. The highest values of enzymatic activity, productivity, and substrate consumption were reached in this cultivation. The best results obtained in LV10 may be related to the morphological characteristics of filamentous fungi grown in the liquid medium that facilitated the adaptation of this culture to the solid medium. Different results of lipases production in SSC inoculated using cultures pre-grown in liquid medium (pellets) and spores of *P. simplissimum* were related by Gutarra et al. (2007). The authors correlated this behavior to different morphology characteristics of fungal growth in each inoculum assessed. Demir and Tari (2014) evaluated the influence of the use of liquid inoculum on polygalacturonases production by *Aspergillus sojae* in SSC performed in flasks. In this case, the variations in the pre-growth time affected characteristics such as size and pellets amount, being 24 hours of inoculum growth the best condition for enzymes production. Also, according the authors, the presence of small pellets and free mycelium promoted more homogenous distribution of inoculum and favored the fungal adaptation to solid medium. Castro et al. (2014) carried out an economic analysis based on studies of multi-enzymatic extract production using different inocula strategies in SSC. These authors also reported higher production in cultivations inoculated with *Aspergillus awamori* grown in the liquid medium compared to spore suspension and solid vegetative inoculum. Moreover, according to the authors, the implementation of the liquid vegetative inoculum is more competitive in terms of costs than the use of the other inocula conditions in the industrial process evaluated.

The inoculation conditions evaluated in this work have a strong influence on the process of obtainment of pectinases by *A. niger* LB-02-SF in a rotating drum bioreactor. The three inoculum strategies defined (S4, SV100 and LV10) can be alternatives to reduce the problems of inoculum propagation in larger-scale processes. In addition, an increase in pectinases productivity was obtained in all cases. Finally, considering the results presented, it is concluded that the industrial processes for pectinase production can be improved using the inoculum strategies defined in this work.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil, N°. 88881.068489/2014-01), the Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil) and the University of Caxias do Sul (UCS) for the financial support of this work.

## References

- Abdullah, R., Farooq, I., Kaleem, A., Iqtedar, M., Iftikhar, T., 2018. Pectinase production from *Aspergillus niger* IBT-7 using solid state fermentation. Bangladesh Journal of Botany 47, 473–478.  
<https://doi.org/10.3329/bjb.v47i3.38714>
- Ahmed, J., Thakur, A., Goyal, A., 2021. Emerging trends on the role of recombinant pectinolytic enzymes in industries- an overview. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 38, 102200. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102200>
- Alam, M.Z., Bari, M.N., Muyibi, S.A., Jamal, P., Al-Mamun, A., 2011. Development of culture inoculum for scale-up production of citric acid from oil palm empty fruit bunches by *Aspergillus niger*. Procedia Environmental Sciences 8, 396–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.062>
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M., 2019. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. International Journal of Biological Macromolecules 122, 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>
- Assamoi, A.A., Delvigne, F., Aldric, J.-M., Destain, J., Thonart, P., 2008. Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. Biotechnology, Agronomy and Society and Environment 12, 111–118. <https://doi.org/10.1385/ABAB:108:1-3:737>
- Bezawada, P., Raju, K.J., 2018. Screening of pectinolytic fungi and optimization of process parameters using guava peel powder as substrate under solid state fermentation. International Journal of Engineering Science Invention (IJESI) 7, 43–47.
- Boratyński, F., Szczepańska, E., Grudniewska, A., Gniłka, R., Olejniczak, T., 2018. Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. Scientific Reports 8, 1–9.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28412-y>
- Castro, A.M. de, López, J.A., dos Reis Castilho, L., Freire, D.M.G., 2014. Techno-economic analysis of a bioprocess for the production of multienzyme solutions from the cake of babassu industrial processing: Evaluation of five different

- inoculum propagation strategies. *Biomass Conversion and Biorefinery* 4, 237–247. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0106-2>
- Castro, A.M. de, Teixeira, M.M.P., Carvalho, D.F., Freire, D.M.G., Castilho, L.D.R., 2011. Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. *Enzyme Research* 2011, 1–9. <https://doi.org/10.4061/2011/457392>
- Chilakamarry, C.R., Mimi Sakinah, A.M., Zularisam, A.W., Sirohi, R., Khilji, I.A., Ahmad, N., Pandey, A., 2022. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology* 343, 126065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>
- Colla, E., Santos, L.O., Deamici, K., Magagnin, G., Vendruscolo, M., Costa, J.A.V., 2017. Simultaneous production of amyloglucosidase and exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* in a rotating drum reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181, 627–637. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2237-y>
- Demir, H., Tari, C., 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products* 54, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.025>
- Ezeilo, U.R., Lee, C.T., Huyop, F., Zakaria, I.I., Wahab, R.A., 2019. Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. *Journal of Environmental Management* 243, 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.113>
- Fontana, R.C., 2004. Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido. Universidade de Caxias do Sul.
- Fontana, R.C., Salvador, S., Da Silveira, M.M., 2005. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 371–377. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0004-0>
- Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2007. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 83, 313–318. <https://doi.org/10.1002/jctb>

- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40, 2931–2944.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
- John, J., Kaimal, K.K.S., Smith, M.L., Rahman, P.K.S.M., Chellam, P.V., 2020. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 162, 1086–1099.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A.K., Singhanian, R.R., 2021. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology* 323, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- Mahmoodi, M., Najafpour, G.D., Mohammadi, M., 2019. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101280>
- Maiorano, A.E., 1990. *Produção de pectinase por fermentação em estado sólido*. Universidade de São Paulo.
- Malvessi, E., Silveira, M.M. da, 2004. Influence of medium composition and ph on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47, 693–702.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500004>
- Meneghel, L., Reis, G.P., Reginatto, C., Malvessi, E., Da Silveira, M.M., 2014. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. *Process Biochemistry* 49. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.021>
- Mitchell, D.A., Luana Oliveira Pitol, Biz, A., Finkler, A.T.J., Jr., L.F. de L.L., Krieger, N., 2019. Design and operation of a pilot-scale packed-bed bioreactor for the production of enzymes by solid-state fermentation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 1–40. <https://doi.org/10.1007/10>
- Nighojkar, A., Patidar, M.K., Nighojkar, S., 2019. Pectinases: Production and applications for fruit juice beverages, in: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), *Processing and Sustainability of Beverages*. Woodhead Publishing, pp. 235–273.
- Ooi, C.K., Rasit, N., Abdullah, W.R.W., 2021. Optimization of protease from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation utilizing shrimp shell substrate.

Biointerface Research in Applied Chemistry 11, 14809–14824.

<https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1480914824>

- Patidar, M.K., Nighojkar, S., Kumar, A., Nighojkar, A., 2018. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. *3 Biotech* 8, 199. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1220-4>
- Poletto, P., Polidoro, T.A., Zeni, M., Silveira, M.M. da, 2017. Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. *LWT - Food Science and Technology* 79, 92–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018>
- Radha, A., Sneha, R., Kiruthiga, R., Priyadarshini, P., Prabhu, N., 2019. A Review on Production of polygalacturonase using various organisms and its applications. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology* 5, 1–12.  
<https://doi.org/10.9734/ajb2t/2019/v5i330063>
- Reginatto, C., Rossi, C., Miglioranza, B.G., Santos, M.D., Meneghel, L., Silveira, M.M.D., Malvessi, E., 2017. Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochemistry* 58, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.018>
- Rocha, J.C. da, Araújo, J. da S., Paiva, W.K.V. de, Ribeiro, E.S.S., Padilha, C.E. de A., Assis, C.F. de, Santos, E.S. dos, Macêdo, G.R. de, Sousa Junior, F.C. de, 2020. Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 30, 101876.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101876>
- Samreen, P., Mangipudi, M., Grover, S., Rajan, C., Sibi, G., 2019. Production of Pectinases and Pectinolytic Enzymes: Microorganisms, Cultural Conditions and Substrates. *Advances in Biotechnololy & Microbiology* 14, 53–59.  
<https://doi.org/10.19080/AIBM.2019.14.555884>
- Sandri, I.G., Lorenzoni, C.M.T., Fontana, R.C., da Silveira, M.M., 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Science and Technology* 51, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.015>

- Sandri, I.G., Silveira, M.M. da, 2018. Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Satapathy, S., Rout, J.R., Kerry, R.G., Thatoi, H., Sahoo, S.L., 2020. Biochemical prospects of various microbial pectinase and pectin: An approachable concept in pharmaceutical bioprocessing. *Frontiers in Nutrition* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>
- Sethi, B.K., Nanda, P.K., Sahoo, S., 2016. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. *3 Biotech* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0353-y>
- Shanmugavel, M., Vasantharaj, S., Yazhmozhi, A., Bhavsar, P., Aswin, P., Felshia, C., Mani, U., Ranganathan, B., Gnanamani, A., 2018. A study on pectinases from *Aspergillus tamarii*: Toward greener approach for cotton bioscouring and phytopigments processing. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 15, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.013>
- Shrestha, S., Rahman, M.S., Qin, W., 2021. New insights in pectinase production development and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, 9069–9087. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- Zabriskie, D.W., Humphrey, A.E., 1978. Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing. *AIChE Journal* 24, 138–146. <https://doi.org/10.1002/aic.690240116>

## 4.2 Artigo 2: Estratégias de agitação intermitente para produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo em escala de bancada

### RESUMO

A produção de metabólitos por fungos filamentosos em biorreatores de tambor rotativo é afetada pelas condições de mistura, as quais estão relacionadas, entre outros fatores, com o tipo de biorreator, as características do substrato sólido e as condições de agitação do meio. Visando definir estratégias que resultem em aumento da produtividade enzimática, a produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo foi avaliada em relação a variações de tamanho de partícula de farelo de trigo, de massa de meio e de condições de agitação intermitente. O emprego de partículas de farelo de trigo de maior tamanho (1,0-2,8mm) aliado ao uso de maior massa de meio (1800g) favoreceu a produção de pectinases, sendo atingido  $P_{\max}$  de 66,4U/gms em 96h de cultivo. Nesse ensaio foi utilizada condição de agitação de 1rpm por 5min a cada 2h durante todo processo (padrão). Entre as estratégias de agitação intermitente testadas, a maior atividade enzimática, de 99,7U/gms, foi obtida no ensaio com agitação (padrão) realizada apenas durante as primeiras 24h de cultivo. O pico de atividade de pectinases foi atingido em 72h desse ensaio, sendo atingido o dobro do valor de produtividade enzimática em comparação à condição padrão. A partir destes resultados observa-se a influência das condições de mistura sobre a obtenção de pectinases em cultivo de *A. niger* em biorreator de tambor rotativo.

**Palavras-chave:** pectinases; *Aspergillus niger*; biorreator de tambor rotativo; tamanho de partícula; volume de ocupação; agitação intermitente.

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são moléculas que tem capacidade de catalisar reações biológicas e possuem características como alta eficiência catalítica, especificidade de substratos, biodegradabilidade e não toxicidade. Esse potencial catalítico vem sendo cada vez mais utilizado industrialmente devido a essas características e também à necessidade crescente de desenvolvimento de tecnologias de menor impacto ambiental (Niyonzima et al., 2020). As enzimas microbianas têm aplicação em uma vasta gama de processos industriais (Singh et al., 2019). Uma das principais aplicações desses biocatalisadores é no setor de alimentício, visto que, a catálise enzimática vem sendo empregada de forma natural no processamento e obtenção de alimentos e bebidas há séculos (Fernandes e Carvalho, 2017). Entre as enzimas mais utilizadas nesse setor destacam-se as pectinases, aplicadas no processamento industrial de frutas, principalmente na produção de sucos e vinhos (Shrestha et al., 2021). Esse complexo enzimático é responsável pela quebra de polissacarídeos pécnicos, componentes da lamela média de células vegetais. As enzimas pectinolíticas também são utilizadas em outros setores industriais, como na degomagem e tratamento de fibras naturais, na extração de óleos vegetais, na indústria têxtil, na obtenção de produtos para nutrição animal e no tratamento de águas residuais do processamento de alimentos (John et al., 2020; Nighojkar et al., 2019).

A maioria das preparações comerciais de enzimas pectinolíticas é obtida a partir de cultivos de fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus* (Nighojkar et al., 2019). A produção industrial é conduzida em cultivos em estado sólido (CES) ou em cultivo submerso (CSm) (John et al., 2020; Singh et al., 2019). Apesar da maior utilização de CSm em processos industriais, o emprego de CES vem ganhando espaço e, com isso, muitas pesquisas tem como foco o desenvolvimento e melhoria do processo de obtenção de diferentes metabólitos de fungos filamentosos nesse tipo de cultivo (Arora et al., 2017; Doriya e Kumar, 2018; Mahmoodi et al., 2019; Reginatto et al., 2022; Shahryari et al., 2020). Os biorreatores para CES podem ser classificados com base no modo de operação, tipo de aeração e presença de agitação (Mitchell et al., 2006). Entre os sistemas que proporcionam a agitação do meio, o biorreator de tambor rotativo consiste em um cilindro horizontal que gira em torno de seu eixo central promovendo a mistura do meio sólido (Ge et al., 2017; Mitchell et al., 2006). Variações das condições operacionais de produção de pectinases em biorreator de tambor rotativo são reportadas (Colla et al., 2017; Díaz et al., 2009; Mahmoodi et al., 2019; Poletto et al., 2017). Entretanto, a resposta em relação a variações de parâmetros de processo é dependente, principalmente, da interação de

fatores como morfologia do crescimento celular e às propriedades do substrato sólido (Demir e Tari, 2014; Schutyser et al., 2003). Nesse contexto, torna-se importante a realização de estudos para definir estratégias que proporcionem melhores condições de mistura e de controle de parâmetros operacionais, sem prejudicar o desenvolvimento fúngico.

Entre as propriedades relacionadas ao substrato sólido, o tamanho de partícula exerce forte influência sobre as condições de mistura e a transferência de oxigênio para a população microbiana (Guan et al., 2020; Manan e Webb, 2017). Quanto menor o tamanho de partícula do suporte, maior a área superficial de contato, o que favorece a acessibilidade do microrganismo aos nutrientes. Por outro lado, podem ser observados problemas de compactação do meio e conseqüente redução do fornecimento de oxigênio à população microbiana. A difusão de oxigênio é facilitada com o aumento do tamanho de partículas, porém a diminuição da área superficial de contato pode dificultar o acesso do microrganismo aos nutrientes (Blandino et al., 2002; Doriya e Kumar, 2018).

Em CES, além do tamanho das partículas, a quantidade de substrato empregada e, em conseqüência, a variação do volume de ocupação do biorreator, também exerce influência sobre as condições de transferência de calor e massa entre a fase gasosa e o meio sólido (Doriya e Kumar, 2018; Shahryari et al., 2020). Para processos conduzidos em biorreator de tambor rotativo são relatados volumes de ocupação máximos entre 40 e 50% da capacidade do equipamento (Arntz et al., 2008; Poletto et al., 2017; Stuart e Mitchell, 2003). Contudo, a resposta em termos de mistura às variações de volume de ocupação é dependente da combinação de substrato e microrganismo utilizada (Mitchell et al., 2006).

Diferentes configurações de agitação podem ser empregadas em biorreatores de tambor rotativo, de forma contínua ou intermitente, em diferentes intervalos de tempo e frequências de rotação (Ge et al., 2017; Mitchell et al., 2006). A agitação em CES é importante para melhorar a homogeneidade, evitar a formação de zonas compactadas e de caminhos preferenciais de ar, além de favorecer os fenômenos de transferência de calor e massa, principalmente em relação ao controle da temperatura e fornecimento de oxigênio ao microrganismo durante o cultivo (Finkler et al., 2017; Gasiorek, 2008; Gassara et al., 2013; Guan et al., 2020; Schutyser et al., 2003). Em cultivos de fungos filamentosos, as condições de agitação influenciam a morfologia de crescimento (Manan e Webb, 2017; Schutyser et al., 2003). A utilização de agitação contínua ou com altas frequências de rotação pode causar dano celular e, conseqüentemente, diminuir a

produção de metabólitos de interesse (Gasiorek, 2008; Mitchell e Krieger, 2019; Musoni et al., 2015). Uma alternativa para reduzir esses danos é o emprego de regime intermitente, com eventos de agitação em determinados períodos do processo.

De uma forma geral, os estudos sobre variações de parâmetros de processo têm como principal foco o aumento da produção de enzimas com a redução dos custos de operacionais. Nesse sentido, os CES de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo foram inicialmente avaliados em relação aos efeitos da variação do tamanho de partícula do farelo de trigo e da massa de meio sobre o crescimento fúngico e a produção de pectinases. Em complemento, diferentes estratégias de agitação do tambor rotativo em escala da bancada foram estudadas buscando atingir maior produtividade em pectinases.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismo**

*Aspergillus niger* LB-02-SF, utilizado nesse trabalho, foi isolado por Sandri et al. (2013), pertence à coleção de culturas do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul (Caxias do Sul, Brasil) e está depositado na Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil) com o código INCQS 40371. O microrganismo é conservado em meio batata-dextrose-agar (BDA), a 4°C.

### **2.2 Meio de cultivo**

O meio de cultivo utilizado no presente estudo foi definido por Fontana et al. (2005), composto por (g/100g): farelo de trigo, 36,6; pectina cítrica, 6,0; glicose, 10,0; solução salina, 30,6. A solução de sais nutriente (pH ajustado em 4,0) contém, em g/L:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4,0;  $\text{MgSO}_4$ , 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $6,3 \times 10^{-5}$ ;  $\text{ZnSO}_4$ ,  $6,2 \times 10^{-5}$ ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $1,0 \times 10^{-6}$ . Os meios foram autoclavados a 1 atm por 20 minutos. Posteriormente, com a inoculação (suspensão de esporos -  $7 \times 10^7$  esporos/100gmu) e adição de água, umidade inicial do meio foi ajustada para aproximadamente 55%. Após a inoculação, o meio foi submetido à agitação de 1 rpm por 10 minutos para proporcionar a homogeneização do inóculo.

### 2.3 Condições de cultivo

O biorreator de tambor rotativo utilizado neste trabalho foi projetado pela equipe do Laboratório de Bioprocessos e construído com a participação da Oficina de Vidros e Laboratório de Tecnologia e Pesquisa da UCS, sendo concedida carta patente de modelo de utilidade MU 8901075-2 em maio de 2017 (Polidoro et al., 2009). Este equipamento é constituído de um tubo cilíndrico de acrílico com 140 mm de diâmetro e 400 mm de comprimento, com tampas de nylon em suas extremidades, apoiado horizontalmente sobre um suporte provido de roletes, que permite a rotação do tambor. Os cultivos foram conduzidos com temperatura do ar úmido a 30°C e fluxo específico de 0,54 litros de ar por quilograma de meio úmido por minuto (Poletto et al., 2017). Os cultivos conduzidos na primeira etapa do trabalho são descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Descrição dos cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF realizados com diferentes tamanhos de partículas do farelo de trigo e massas de meio sólido.

Ensaio	Tamanhos de partículas de farelo de trigo (mm)	Massa de meio úmido (gmu)	Volume de ocupação (% v/v)
T1M1	< 1,0*	1100	24,03 ± 3,8
T1M2	< 1,0*	1800	38,4 ± 3,1
T2M1	1,0 – 2,8**	1100	42,9 ± 3,0
T2M2	1,0 – 2,8**	1800	62,4 ± 3,9

Notas: \* < 16 mesh; \*\* 7-16 mesh.

Na segunda etapa, partindo-se dos resultados obtidos nos ensaios de tamanhos de partículas e de massa de meio, foi avaliada a influência da agitação do tambor sobre o crescimento fúngico e a obtenção de pectinases. A partir da condição de agitação de 1 rpm por 5 minutos a cada 2 horas, durante todo cultivo (Poletto *et al.*, 2017), foram testadas diferentes estratégias de agitação do biorreator de tambor rotativo, mantendo-se a frequência de rotação de 1 rpm. O cultivo A2 foi caracterizado pela condição estática durante as 24 horas iniciais, seguido de rotação por 5 minutos a cada 2 horas até o final do cultivo; A3, pela rotação por 5 minutos a cada 2 horas durante as 24 horas iniciais e sob condição estática até o final do cultivo; A4, pela rotação por 5 minutos a cada 2 horas durante as 48 horas iniciais e sob condição estática até o final do cultivo. Além disso, foi conduzido um cultivo estático (E) durante todo período de cultivo.

## 2.4 Métodos analíticos e extração de compostos solúveis

A amostragem foi realizada pela introdução de um tubo de vidro na tampa do biorreator, em condições estéreis, em capela de fluxo laminar. Os valores de fração de oxigênio no ar, identificados no oxímetro (DM-4P, Digimed, Brasil) em diferentes tempos de cultivo, foram utilizados para a determinação indireta da concentração celular. Para isso, foi utilizado o método proposto originalmente por Zabriskie & Humprey (1978) para CSm e adaptado para CES por Maiorano (1990), que se baseia na determinação da demanda de oxigênio pelo cultivo (*Oxygen Uptake Rate* – OUR). O procedimento utilizado para a determinação de OUR e para o cálculo da concentração celular foi descrito por Poletto et al. (2017). Durante a amostragem, também foi ajustada a vazão de ar na entrada e saída do biorreator e verificada a temperatura no interior do leito de meio. O conteúdo da amostra foi homogeneizado e uma porção utilizada para a determinação de umidade, a partir da secagem de 1 g da amostra úmida em estufa a 100°C até massa constante. Outra porção do meio fermentado foi utilizada para determinação da concentração de açúcares redutores totais, realizada a partir do método descrito por Fontana et al. (2005) para amostras sólidas, seguido de método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959).

A extração das enzimas foi realizada de acordo com procedimento descrito por Reginatto et al. (2022). A atividade de pectinases totais foi avaliada pelo método descrito por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi & Silveira (2004), que se baseia na medida da redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina em tampão acetato 0,05 mol/L, pH 4,0, submetida à ação das enzimas pectinolíticas produzidas. Neste caso, foi utilizada solução de pectina cítrica 0,9 % (m/v) e a viscosidade da mistura foi determinada em viscosímetro (modelo LDV-II+, Brookfield, EUA) a 60 rpm. Os valores de atividade enzimática, teor de umidade e ART foram determinados em duplicatas.

## 2.5 Parâmetros de avaliação do processo

O fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ) relaciona a máxima atividade enzimática ( $P_{max}$ ) com a máxima concentração celular ( $X_{max}$ ) obtidas no processo. Os fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em células ( $Y_{X/S}$ ) foram calculados a partir da relação entre  $P_{max}$  e  $X_{max}$  obtidos no cultivo e o consumo de substrato até o momento de obtenção dos picos. A produtividade ( $p$ ) representa a concentração de produto formado por tempo de processo.

## 2.6 Análises estatísticas

Neste trabalho, os testes estatísticos foram realizados por análise de variância (*one-way ANOVA*) e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa SPSS (versão 20.0).

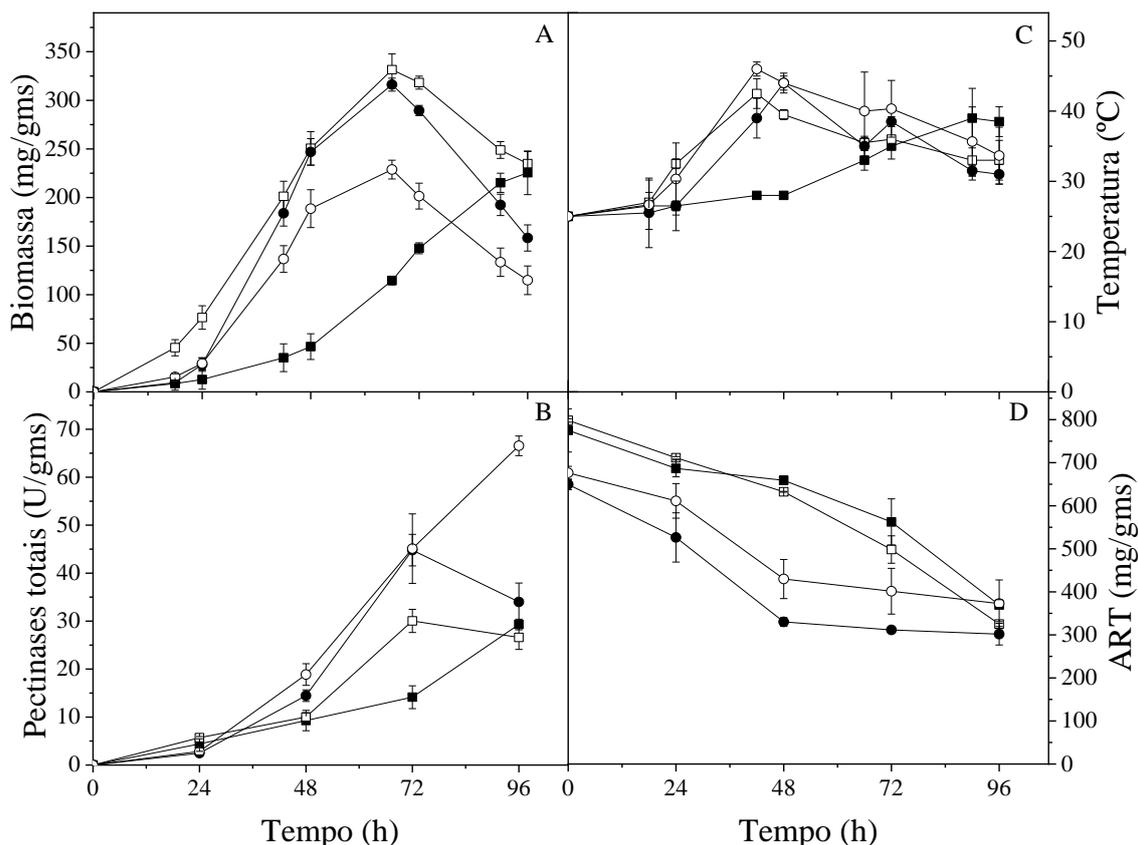
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Tamanho de partícula e massa de meio

Nessa avaliação inicial foram conduzidos ensaios com farelo de trigo classificado granulometricamente em dois tamanhos de partículas: T1 (1,0 mm) e T2 (1,0 - 2,8 mm). Além disso, a influência do tamanho das partículas de farelo foi testada em cultivos com diferentes massas de meio úmido, de 1100 (M1) e 1800 g (M2).

Na Figura 1 são apresentados os perfis cinéticos dos cultivos conduzidos com diferentes tamanhos de partículas de farelo de trigo e massas de meio sólido.

A condição T1M1 não foi favorável ao crescimento celular, sendo determinados valores inferiores aos observados nos outros ensaios em todos os pontos de amostragem até 72 horas de processo. O pico de biomassa (225 mg/gms), além do valor inferior aos demais, foi atingido apenas em 96 horas de processo (Figura 1A). No cultivo T1M2, com o mesmo tamanho de partículas, foram determinadas concentrações celulares superiores a todos os outros ensaios até 42 horas de cultivo, com pico de biomassa sendo atingido em 66 horas. Nos ensaios T2M1 e T2M2, os picos de biomassa foram atingidos em 66 horas. Em T2M1, o perfil de concentração celular em função do tempo foi semelhante ao verificado em T1M2, porém com queda mais acentuada após a obtenção do pico. Como mostrado no item 2.3 de Materiais e Métodos, os volumes de ocupação nos ensaios T1M2 e T2M1 são semelhantes, em torno de 40%. Assim, pode-se sugerir que o volume de ocupação utilizado em ambos os casos tenha sido mais favorável ao desenvolvimento fúngico em relação às outras condições, independente do tamanho de partículas utilizado. Em T2M1 e T2M2, os perfis de crescimento foram semelhantes durante todo o cultivo, embora em valores mais baixos em T2M2. Na comparação dos ensaios com maior tamanho de partículas de farelo de trigo, os melhores resultados em termos de crescimento celular foram verificados com a menor massa de meio, indicando que as condições de fornecimento de oxigênio podem ter sido prejudicadas com o aumento da ocupação do tambor (Arora et al., 2017; Gasiorek, 2008; Poletto et al., 2017).



**Figura 1** - Variação da concentração celular [A], atividade de pectinases totais [B], temperatura [C] e ART [D] em função do tempo de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com diferentes tamanhos de partículas e massas de meio sólido (■) T1M1: menores partículas de farelo de trigo (<1,0mm), massa de meio úmido de 1100 g e volume de ocupação de 24% ; (□) T1M2: menores partículas de farelo de trigo (<1,0mm), massa de meio úmido de 1800 g e volume de ocupação de 38,4%; (●) T2M1: maiores partículas de farelo de trigo (1,0-2,8mm), massa de meio úmido de 1100 g e volume de ocupação de 42,9%; (○) T2M2: maiores partículas de farelo de trigo (1,0-2,8mm), massa de meio úmido de 1800 g e volume de ocupação de 62,4%.

Nos ensaios com meios formulados com menores partículas de farelo de trigo, apesar das maiores concentrações celulares atingidas em T1M2, os resultados de atividade de pectinases totais foram semelhantes, em torno de 30 U/gms. Os perfis observados nesses ensaios (Figura 1B) foram distintos, com picos atingidos em 72 e 96 horas em T1M2 e T1M1, respectivamente. Essa diferença de tempo pode estar relacionada ao perfil de crescimento mais lento observado durante o ensaio T1M1. Por outro lado, foi observado que o aumento do tamanho das partículas de farelo de trigo proporcionou a obtenção de atividades de pectinases superiores. Os perfis de atividade foram semelhantes nos ensaios T2M1 e T2M2 até 72 horas, quando foi atingido o valor de  $P_{max}$  em T2M1. Em T2M2 foi observado comportamento diferente, com aumento da atividade após 72 horas, atingindo o pico ao final do ensaio. Apesar de o crescimento

celular ter sido favorecido no ensaio T2M1, a atividade de pectinases foi superior em T2M2. A comparação dos perfis de biomassa (Figura 1A) e de atividade enzimática (Figura 1 B) dos ensaios T2M1 e T2M2 indica que a produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF é apenas parcialmente dependente do crescimento celular, como relatado por Poletto et al. (2017). Segundo os autores, além da relação com a biomassa atingida, a obtenção das enzimas pode ser influenciada por fenômenos de repressão catabólica e de estresse decorrentes da variação de parâmetros do processo e de condições de mistura do meio.

Em relação aos dados de temperatura medidos durante o cultivo, é importante ressaltar que a variação desse parâmetro é consequência do metabolismo fúngico em cada situação. Ao analisarmos os valores de temperatura (Figura 1C), foram observados perfis semelhantes ao longo dos cultivos T1M2, T2M1 e T2M2, com queda após ser atingido o pico médio de 45°C em 42 horas de processo. É relatado que o aumento do volume de ocupação pode dificultar o controle de temperatura em cultivos em biorreatores de tambor rotativo (Stuart e Mitchell, 2003). Entretanto, nos ensaios conduzidos neste estudo não foram observados efeitos associados à maior retenção de calor em função das variações de tamanho de partículas ou da massa de meio sólido. As temperaturas verificadas em T1M1 foram inferiores às observadas nos outros cultivos, com temperatura máxima (39°C) atingida apenas em 90 horas de ensaio, possivelmente pela menor atividade metabólica de *A. niger* identificada nesse caso. Na Figura 1D pode ser observada diferença entre as concentrações iniciais de substrato para os meios com diferentes tamanhos de partículas de farelo de trigo, com valores de  $S_0$  superiores nos meios com menores partículas. Entretanto, ao final de todos os ensaios foram determinadas concentrações residuais de substrato entre 300 e 400 mg/gms.

Os resultados obtidos nos ensaios com utilização de diferentes tamanhos de partículas e massas de meio estão apresentados na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de umidade no início dos distintos cultivos, sendo determinados teores médios entre 55 e 60%. Ao final, valores de umidade semelhantes foram determinados em todas as condições. Por outro lado, as concentrações iniciais de substrato ( $S_0$ ) foram superiores nos cultivos com menor tamanho de partículas de farelo de trigo, em torno de 800 mg/gms, em comparação aos valores determinados nos ensaios T2M1 (653 mg/gms) e T2M2 (676,3 mg/gms). O consumo também foi superior nos ensaios T1M1 e T1M2, com cerca de 470 mg/gms de substrato consumido ao final dos cultivos. Nos cultivos com meios formulados com

maiores partículas de farelo de trigo, os dados de ART consumido foram de 354,8 e 303,6 mg/gms, para T2M1 e T2M2, respectivamente (Tabela 2). Os maiores valores  $S_{\text{cons}}$  nos ensaios T1M1 e T1M2 indicam que a redução do tamanho de partícula pode favorecer o acesso do microrganismo aos nutrientes do meio. Segundo Nigam (2009), com o emprego de partículas de menor tamanho é observado aumento da área superficial, favorecendo o contato do microrganismo com os nutrientes presentes no substrato sólido.

**Tabela 2** - Resultados gerais obtidos em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com diferentes tamanhos de partículas de farelo de trigo e massas de meio úmido

	<b>T1M1</b>	<b>T1M2</b>	<b>T2M1</b>	<b>T2M2</b>
<b>S<sub>0</sub> (mg/gms)</b>	805,1 ± 7,85 <sup>a</sup>	798,2 ± 3,87 <sup>a</sup>	653,0 ± 17,3 <sup>b</sup>	676,3 ± 15,3 <sup>b</sup>
<b>S<sub>cons</sub> (mg/gms)</b>	469,8 ± 1,85 <sup>a</sup>	473,1 ± 2,00 <sup>a</sup>	354,8 ± 2,85 <sup>b</sup>	303,6 ± 23,6 <sup>c</sup>
<b>U<sub>i</sub> (%)</b>	58,4 ± 3,76 <sup>a</sup>	59,9 ± 1,93 <sup>a</sup>	55,1 ± 1,76 <sup>a</sup>	54,4 ± 3,24 <sup>a</sup>
<b>U<sub>f</sub> (%)</b>	65,4 ± 1,32 <sup>ab</sup>	63,1 ± 3,23 <sup>ab</sup>	70,8 ± 0,64 <sup>a</sup>	62,4 ± 2,77 <sup>b</sup>
<b>X<sub>max</sub> (mg/gms)</b>	225,4 ± 22,5 <sup>b</sup>	337,3 ± 8,1 <sup>a</sup>	316,2 ± 6,7 <sup>a</sup>	218,3 ± 11,7 <sup>b</sup>
<b>t<sub>Xmax</sub> (h)</b>	96	66	66	66
<b>P<sub>max</sub> (U/gms)</b>	29,3 ± 1,1 <sup>c</sup>	30,0 ± 2,41 <sup>c</sup>	44,8 ± 3,29 <sup>b</sup>	66,4 ± 1,91 <sup>a</sup>
<b>t<sub>Pmax</sub> (h)</b>	96	72	72	96
<b>Y<sub>P/X</sub> (U/mg)</b>	0,13 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>Y<sub>X/S</sub> (mg/mg)</b>	0,48 ± 0,05 <sup>c</sup>	2,48 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>Y<sub>P/S</sub> (U/mg)</b>	0,08 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,10 ± 0,0 <sup>bc</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>p (U/gms/h)</b>	0,30 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,42 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,02 <sup>a</sup>

U<sub>i</sub> – teor de umidade inicial; U<sub>f</sub> – teor de umidade final; S<sub>0</sub> – Concentração inicial de açúcares redutores totais; S<sub>cons</sub> - açúcares redutores totais consumidos em 96 horas; X<sub>max</sub> – máxima concentração de biomassa; t<sub>X,max</sub> – tempo em que ocorreu X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – máxima atividade de pectinases totais; t<sub>P,max</sub> – tempo em que ocorreu P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – fator de produção específica; Y<sub>P/S</sub> – fator de conversão de substrato em produto; Y<sub>X/S</sub> – fator de conversão de substrato em células; p - produtividade. **T1M1**- menores partículas de farelo de trigo (<1,0mm) e menor massa de meio úmido (1100 g); **T1M2** - menores partículas de farelo de trigo (<1,0mm) e maior massa de meio úmido (1800 g); **T2M1** - maiores partículas de farelo de trigo (1,0-2,8mm) e menor massa de meio úmido (1100 g); **T2M2** - maiores partículas de farelo de trigo (1,0-2,8mm) e maior massa de meio úmido (1800 g).

O crescimento celular não foi favorecido no ensaio T1M1 (Figura 1A), com X<sub>max</sub> de 225,4 mg/gms sendo atingido apenas em 96 horas de processo. No cultivo T1M2, comportamento distinto foi verificado, sendo obtido valor de X<sub>max</sub> superior, de 337,3 mg/gms em 66 horas de ensaio (Tabela 2). Os resultados inferiores em termos de biomassa observados em T1M1 podem estar relacionados à redução da porosidade ou

mesmo aos problemas de compactação do meio devido ao menor tamanho de partículas utilizado nesse cultivo, fatores que afetam negativamente a difusão de oxigênio e, em consequência, o desenvolvimento fúngico (Manan e Webb, 2017; Schmidt e Furlong, 2012; Stuart et al., 1999). Entretanto, esse comportamento não foi observado em T1M2, conduzido com mesmo tamanho de partículas, indicando que essa limitação poderia estar relacionada a menor quantidade de meio no tambor em T1M1. Arntz et al. (2008), ao avaliarem os efeitos da variação de parâmetros operacionais em biorreator de tambor rotativo, relataram melhores condições de mistura devido ao movimento mais vigoroso do meio quando empregados volumes de ocupação em torno de 25%. Porém, quando considerado o cultivo de fungos filamentosos, essa condição de mistura mais vigorosa pode ter causado maiores danos ao micélio, prejudicando o crescimento celular no caso do ensaio T1M1.

Como pode ser observado na Tabela 2, em T2M1 foi obtido valor de  $X_{max}$  (316,2 mg/gms) semelhante ao observado em T1M2, também em 66 horas. Isso pode indicar que o volume de ocupação utilizado nesses ensaios (~40%) exerceu maior influência sobre o crescimento celular em comparação aos efeitos do tamanho de partículas e da consequente concentração de substrato inicial. No cultivo T2M2,  $X_{max}$  também foi atingido em 66 horas de processo, porém em valor inferior, de 218,3 mg/gms. Os resultados superiores em termos de crescimento celular em T2M1 podem ser explicados pelas melhores condições de transferência de massa e mistura que são relacionadas com a menor ocupação do tambor nesse caso. O emprego de menores volumes de ocupação, no caso de biorreatores com agitação, favorece o fornecimento de oxigênio, a remoção de calor e de  $CO_2$  gerado no metabolismo microbiano, proporcionando melhores condições para o crescimento celular (Doriya e Kumar, 2018; Poletto et al., 2017; Shahryari et al., 2020).

Na análise do crescimento celular, não foi possível definir qual tamanho de partículas foi mais favorável, porém em relação às enzimas, a utilização de maior tamanho de partículas contribuiu para maiores atividades de pectinases. O maior valor de  $P_{max}$  (66,4 U/gms) foi obtido em 96 horas do cultivo T2M2 e em T2M1 foi atingido 44,8 U/gms, em 72 horas de cultivo. Nos ensaios com menores partículas de farelo de trigo, foram obtidos valores de  $P_{max}$  em torno de 30 U/gms, em 96 e 72 horas dos cultivos T1M1 e T1M2, respectivamente (Tabela 2). Os menores valores de atividade enzimática observados nesses ensaios podem estar relacionados à repressão catabólica pelas maiores concentrações de ART presentes no meio no início dos cultivos T1M1 e T1M2, cerca de

150 mg/gms superior que nos ensaios com maior tamanho de partícula. Mesmo comportamento foi relatado por Blandino et al. (2002), que em cultivos de *A. awamori* em CES com grãos de trigo moídos em diferentes tamanhos (0,85 - 2,0 mm), observaram maior concentração de amido no meio com o menor tamanho de partículas. Nessa condição, os autores relacionam a menor atividade de exopoligalacturonases com repressão catábólica ocasionada pela maior concentração de glicose, liberada pela hidrólise do amido. A repressão da produção de pectinases pela presença de glicose na composição do meio de cultivo é relatada principalmente em CSm (Gomes et al., 2018; Solís-Pereira et al., 1993). Porém, para a cepa de *A. niger* utilizada no presente trabalho, a redução da atividade de pectinases em função do aumento da concentração de glicose no meio de cultivo foi relatada tanto em CSm quanto em CES, por Reginatto et al. (2017) e Sandri & Silveira (2018), respectivamente.

Entre os ensaios com maior tamanho de partícula (T2M1 e T2M2), a utilização de maior massa de meio foi mais favorável à produção de pectinases. Por outro lado, o aumento da massa de meio sólido e, conseqüentemente, do volume de ocupação do biorreator, foi prejudicial ao crescimento celular. Poletto et al. (2017) e Doriya & Kumar (2018), relacionaram a obtenção de maiores atividades enzimáticas ao estresse resultante das condições de mistura e transferência de oxigênio menos favoráveis identificadas em cultivos com maior volume de ocupação do biorreator de tambor rotativo. Segundo os autores, a maior disponibilidade de oxigênio observada em cultivos com menores volumes de ocupação foi prejudicial à produção de pectinases por *A. niger* e L-asparaginase por *Aspergillus tubingensis*, respectivamente.

Na Tabela 2 também são mostrados os parâmetros de processo que foram determinados para os ensaios conduzidos nessa etapa do trabalho. Em T2M2, maior valor de  $Y_{P/X}$  (0,29 U/mg) foi obtido em função da maior atividade de pectinases frente ao menor crescimento fúngico, sendo aproximadamente 50% superior aos obtidos nos outros cultivos. Com relação a  $Y_{X/S}$ , o maior valor foi observado em T1M2, de 2,48 mg/mg, seguido por T2M1 e T2M2 com valores semelhantes em torno de 0,9 mg/mg. No cultivo T2M2, destaca-se também o resultado de  $Y_{P/S}$ , de 0,22 U/mg, cerca de 70% superior ao obtido em T2M1. Nos ensaios com meios formulados com menores partículas de farelo de trigo, devido aos baixos valores de atividade enzimática e ao maior consumo de substrato, foram obtidos valores inferiores de  $Y_{P/S}$ , em torno de 0,06 U/mg. Da mesma forma, menores valores de produtividade enzimática foram obtidos nos ensaios T1M1 (0,30 U/gms/h) e T1M2 (0,42 U/gms/h), indicando que a utilização de menor tamanho de

partículas, nas condições avaliadas, não foi favorável à produção de pectinases, independente da massa de meio utilizada. Como comentado anteriormente, pode ter ocorrido repressão da produção de pectinases devido a alta concentração inicial de ART nesses casos. Nos ensaios com maiores partículas de farelo de trigo, foram obtidas produtividades semelhantes, superiores a 0,6 U/gms/h, pois, mesmo com menor valor de  $P_{max}$  observado em T2M1, o pico foi atingido 24 horas antes que em T2M2 (Tabela 2).

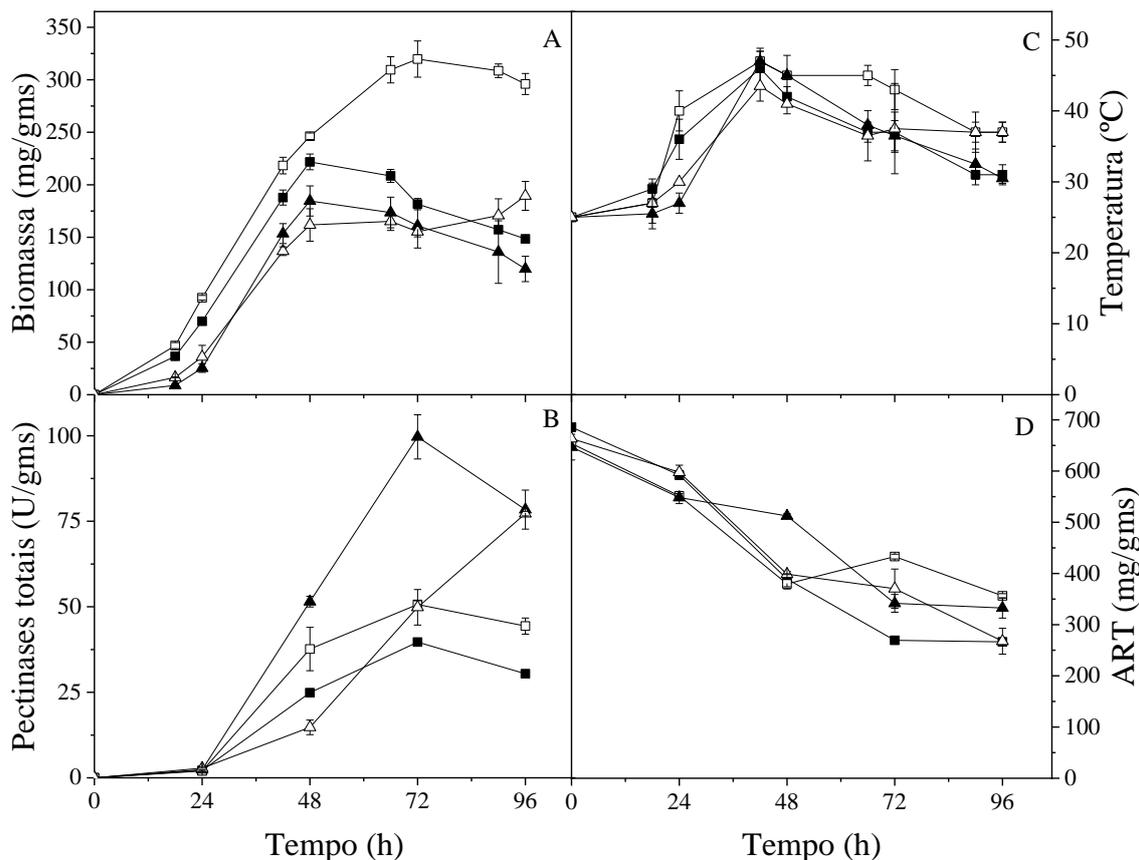
Ao final dessa etapa do estudo, nas condições avaliadas, foram obtidos melhores resultados de atividade e produtividade de pectinases nos ensaios com maior tamanho de partícula de farelo de trigo, cultivos T2M1 e T2M2. Entre esses cultivos, considerando os parâmetros relacionados com a produção de pectinases, maiores valores de  $P_{max}$ ,  $Y_{P/X}$  e  $Y_{P/S}$  foram obtidos com a maior massa de meio e, por isso, a condição reproduzida no ensaio T2M2 foi utilizada na sequência dos estudos relacionados aos efeitos de diferentes estratégias de agitação intermitente sobre o processo de obtenção de pectinases em CES.

### **3.2 Estratégias de agitação de biorreator de tambor rotativo**

O cultivo T2M2 foi conduzido com a condição de agitação de 1 rpm, por 5 minutos a cada 2 horas (Poletto et al., 2017). Esse ensaio foi utilizado como padrão para a avaliação de outras estratégias de agitação intermitente. Foi realizado um cultivo estático (E), apenas com a agitação (1 rpm) de 10 minutos no início do ensaio para a melhor uniformidade de propagação do inóculo. Também foram avaliadas três estratégias com agitação (1 rpm, por 5 minutos a cada 2 horas) em diferentes períodos do processo. Na condição A2, o biorreator foi mantido estático durante 24 horas iniciais e os eventos foram realizados a partir desse momento e até o final do cultivo. Nos ensaios A3 e A4 foi realizada agitação do meio apenas durante 24 e 48 horas iniciais, respectivamente. Os perfis obtidos na realização desses ensaios são mostrados na Figura 2.

Na Figura 2A podem ser observados perfis de biomassa semelhantes em E e A2 nas primeiras 48 horas dos ensaios. A partir desse ponto, foi verificado aumento da biomassa em A2, indicando que realização dos eventos de agitação apenas após 24 horas iniciais favoreceu o crescimento celular, sendo observadas concentrações de biomassa superiores às verificadas nos outros ensaios, com pico atingido em 72 horas. Nos ensaios A3 e A4, com agitação inicial, perfis semelhantes de biomassa foram verificados por até 48 horas, quando foi atingido o pico em A3. Em A4, foi observado aumento na concentração celular a partir de 72 horas, com  $X_{max}$  verificado somente em 96 horas de ensaio, diferente do observado em A3, com perfil de queda após 48 horas.

Apesar das maiores concentrações celulares em E e A2, a produção das enzimas não foi favorecida nesses cultivos, sendo observados perfis de atividade de pectinases semelhantes, com picos alcançados em 72 horas em ambos os processos (Figura 2B). Com o emprego de agitação apenas durante as 24 horas iniciais, foram obtidas as maiores atividades enzimáticas até 72 horas de processo, quando foi atingido  $P_{max}$  no ensaio A3. O perfil de atividade de pectinases observado no ensaio A4 foi diferente, com valor máximo sendo atingido em 96 horas de ensaio.



**Figura 2** - Variação da concentração celular [A], atividade de pectinases totais [B], temperatura [C] e ART [D] em função do tempo de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com diferentes condições de agitação intermitente. (■) E: estático; (□) A2: estático durante 24 horas iniciais e rotação por 5 minutos a cada 2 horas até o final do cultivo; (▲) A3: rotação por 5 minutos a cada 2 horas apenas nas 24 horas iniciais; (Δ) A4: rotação por 5 minutos a cada 2 horas apenas nas 48 horas iniciais.

Ao analisar o perfil do ensaio A4, no tempo de 48 horas, foi observada a menor atividade enzimática em comparação a todas as outras condições. Esse valor, em torno de 15 U/gms, é semelhante ao obtido em T2M2 (Figura 1B) que foi conduzido nas mesmas condições de agitação até esse período dos ensaios (1 rpm por 5 minutos a cada 2 horas). Assim, sugere-se que a agitação durante as 48 horas iniciais de cultivo está relacionada a

um aumento menos acentuado da atividade enzimática em comparação aos perfis verificados nas outras estratégias de agitação. No ensaio A2, mantido estático durante 24 horas iniciais, foi observada atividade enzimática superior (40 U/gms) em 48 horas. Nesse mesmo tempo, no ensaio E, o valor de atividade também foi superior ao obtido em A4, cerca de 25 U/gms. Esses dados indicam que a manutenção do biorreator estático nas horas iniciais do ensaio seria mais favorável à formação das enzimas se avaliado o valor de atividade enzimática no tempo de 48 horas de processo. Entretanto, ao avaliar todo o período de cultivo, os valores de  $P_{max}$  atingidos em A2 e E foram inferiores aos obtidos nos outros ensaios. Em A3, foi obtido o maior valor de atividade enzimática em 48 horas entre todas as condições, em torno de 50 U/gms, com aumento até 72 horas quando foi atingido o pico. Dessa forma, pode ser concluído que a produção de pectinases foi favorecida com a utilização da estratégia de agitação reproduzida em A3, com agitação realizada apenas nas primeiras 24 horas de processo.

Em relação ao perfil de temperatura identificado em A3 (Figura 2C), pode ser observado acentuado incremento entre 24 e 42 horas de ensaio ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ), quando foi observado o pico ( $47^{\circ}\text{C}$ ), seguido de queda até o final do ensaio. Este aumento da temperatura pode estar relacionado ao acúmulo de calor metabólico resultante da interrupção da agitação a partir de 24 horas do processo. É possível que os maiores títulos enzimáticos atingidos nesse ensaio tenham relação com o estresse gerado por esse aumento da temperatura. A produção de metabólitos em CES pode ser favorecida em condições de estresse para a população microbiana, como é o caso do aumento da temperatura para valores superiores ao adequado para o crescimento celular (Mitchell et al., 2006; Poletto et al., 2017). Segundo Poletto et al. (2017), a produção de pectinases foi favorecida em condições que limitaram o crescimento de *A. niger* em CES, principalmente relacionadas ao aumento de temperatura e restrição da transferência de oxigênio à população microbiana.

Nas 24 horas iniciais foram observadas temperaturas superiores nos ensaios E e A2 em comparação as outras condições, com valores máximos atingidos em 42 horas, de  $47^{\circ}\text{C}$  e  $46^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Esse aumento mais acentuado da temperatura no início dos processos possivelmente está relacionado à ausência de agitação do meio e às maiores concentrações de biomassa observadas no início desses ensaios (Figura 2A). Depois de atingido o pico no cultivo E, foi observada queda para valores em torno de  $30^{\circ}\text{C}$  ao final do processo. Por outro lado, em A2, apesar da agitação, foram observadas temperaturas mais altas, com queda para aproximadamente  $37^{\circ}\text{C}$  somente a partir de 90 horas. Esse

comportamento pode estar associado ao maior acúmulo de calor relacionado as maiores concentrações de biomassa observadas nesse ensaio em comparação às demais condições. O valor máximo de temperatura em A4 foi inferior ao obtido nos outros cultivos, de 42°C em 42 horas, com queda para valores próximos a 30°C entre 48 e 72 horas, seguido de aumento até 96 horas, quando foi atingido 36°C. Nesse caso, o perfil de temperaturas também pode ser relacionado ao perfil de biomassa, em que foi observado incremento após 72 horas. Os estudos de diferentes estratégias de agitação intermitente visam definir condições que facilitem o controle da temperatura durante os processos (Finkler et al., 2017). No presente trabalho, foi observada a influência da agitação sobre a variação da temperatura, especialmente em relação ao ensaio A3, onde a interrupção dos eventos de agitação em 24 horas contribuiu para um aumento acentuado da temperatura do meio. Entretanto, no biorreator utilizado, o controle de temperatura é realizado apenas em relação ao valor mínimo, não sendo possível avaliar os efeitos das estratégias de agitação como tentativa de controle do aumento da temperatura do meio durante o ensaio.

Na Figura 2D são apresentados os perfis de concentração de ART durante os cultivos. Pode ser observado o consumo de substrato menos acentuado nas 48 horas iniciais de A3, seguido redução de cerca de 200mg/gms entre 48 e 72 horas (Figura 2B). Nos outros ensaios, maior consumo foi observado nas primeiras 48 horas, sendo atingidos valores de ART próximos a 400 mg/gms nesse tempo de processo. Na condição E foi observada a redução mais acentuada da concentração de ART entre 48 e 72 horas, com valor residual em torno de 266 mg/gms. Apesar das maiores concentrações celulares, o consumo de substrato foi menor em A2, sendo atingido ART de 353 mg/gms ao final do cultivo. Em A4, por sua vez, foi observada a redução da concentração de substrato entre 72 e 96 horas, sendo determinado substrato residual de 267 mg/gms.

Para avaliar os efeitos das diferentes condições de agitação sobre o processo de obtenção de pectinases, os resultados foram compilados na Tabela 3, sendo comparados com a condição padrão (T2M2).

As concentrações iniciais de substrato, em torno de 665 mg/gms, foram semelhantes em todos os ensaios, tendo em vista a ausência de variações na composição do meio de cultivo. O maior consumo de substrato foi observado nos ensaios E (419,2 mg/gms) e A4 (395,8 mg/gms). Nos outros ensaios foram verificadas menores concentrações de substrato consumido, cerca de 300 mg/gms. Valores de umidade inicial foram semelhantes em todos os ensaios, em torno de 55%. Ao final dos ensaios, teor de umidade de 68,3% foi verificado no ensaio A2, maior valor entre as condições avaliadas. Em

relação à temperatura, valores semelhantes em torno de 46°C foram atingidos em todos os cultivos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resultados gerais obtidos em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com diferentes estratégias de agitação

	<b>T2M2</b>	<b>E</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
<b>S<sub>0</sub> (mg/gms)</b>	676,3 ± 15,3 <sup>a</sup>	685,6 ± 5,0 <sup>a</sup>	653,7 ± 4,6 <sup>a</sup>	646,8 ± 25,2 <sup>a</sup>	663,5 ± 14,1 <sup>a</sup>
<b>S<sub>cons</sub> (mg/gms)</b>	303,6 ± 23,6 <sup>b</sup>	419,2 ± 4,5 <sup>a</sup>	300,4 ± 13,1 <sup>b</sup>	314,2 ± 5,4 <sup>b</sup>	395,8 ± 11,2 <sup>a</sup>
<b>U<sub>i</sub> (%)</b>	54,4 ± 3,2 <sup>a</sup>	56,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	53,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	56,3 ± 2,1 <sup>a</sup>	54,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
<b>U<sub>f</sub> (%)</b>	62,4 ± 2,8 <sup>b</sup>	64,2 ± 0,1 <sup>ab</sup>	68,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	65,1 ± 1,0 <sup>ab</sup>	61,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>T (°C)</b>	46,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	46,0 ± 2,8 <sup>a</sup>	47,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	47,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	43,5 ± 2,1 <sup>a</sup>
<b>X<sub>max</sub> (mg/gms)</b>	218,3 ± 11,7 <sup>b</sup>	221,7 ± 7,5 <sup>b</sup>	319,7 ± 17,2 <sup>a</sup>	184,6 ± 14,4 <sup>b</sup>	189,4 ± 13,7 <sup>b</sup>
<b>t<sub>Xmax</sub> (h)</b>	66	48	72	48	96
<b>P<sub>max</sub> (U/gms)</b>	66,4 ± 1,91 <sup>c</sup>	39,7 ± 0,53 <sup>e</sup>	50,7 ± 1,1 <sup>d</sup>	99,7 ± 6,5 <sup>a</sup>	77,3 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>t<sub>Pmax</sub> (h)</b>	96	72	72	72	96
<b>Y<sub>P/X</sub> (U/mg)</b>	0,30 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,18 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,16 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,54 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>Y<sub>X/S</sub> (mg/mg)</b>	0,83 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>bc</sup>	1,45 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,04 <sup>cd</sup>	0,48 ± 0,05 <sup>d</sup>
<b>Y<sub>P/S</sub> (U/mg)</b>	0,22 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,23 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>p (U/gms/h)</b>	0,69 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>b</sup>

S<sub>0</sub> – Concentração inicial de açúcares redutores totais; S<sub>cons</sub> - açúcares redutores totais consumidos em 96 horas; U<sub>i</sub> – teor de umidade inicial; U<sub>f</sub> – teor de umidade final; T – temperatura máxima; X<sub>max</sub> – máxima concentração de biomassa; t<sub>X,max</sub> – tempo em que ocorreu X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – máxima atividade de pectinases totais; t<sub>P,max</sub> – tempo em que ocorreu P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – fator de produção específica; Y<sub>P/S</sub> – fator de conversão de substrato em produto; Y<sub>X/S</sub> – fator de conversão de substrato em células; p - produtividade. **T2M2** (padrão) - rotação por 5 minutos a cada 2 horas durante todo o cultivo; **E** - estático; **A2** - estático durante 24 horas iniciais e rotação por 5 minutos a cada 2 horas até o final do cultivo; **A3** - rotação por 5 minutos a cada 2 horas apenas nas 24 horas iniciais; **A4** - rotação por 5 minutos a cada 2 horas apenas nas 48 horas iniciais.

A partir dos valores de X<sub>max</sub>, pode-se concluir que a condição de agitação mais favorável ao crescimento celular foi observada no cultivo A2, com X<sub>max</sub> 319,7 mg/gms em 72 horas de ensaio. Esse valor é superior aos atingidos nos cultivos T2M2 (218,3 mg/gms), E (221,7 mg/gms), A3 (184,6 mg/gms) e A4 (189,4 mg/gms), em 66, 48, 48 e 96 horas, respectivamente (Tabela 3). Esse comportamento também foi descrito por Arora et al. (2017), que relataram melhores condições de crescimento celular de *Rhizopus oryzae* com a manutenção do biorreator de leito empacotado estático nas primeiras horas de ensaio. Ainda, segundo os autores, com a manutenção do reator sem agitação após esse período, foi observada a limitação do crescimento, assim como observado no presente estudo, no ensaio E (Figura 2A).

Em CES de fungos filamentosos, o perfil de desenvolvimento do micélio também pode afetar a mistura e prejudicar a transferência de oxigênio no interior do leito de meio. De acordo com as características do desenvolvimento fúngico, as hifas podem ser classificadas em hifas de superfície, de biofilme, penetrantes e aéreas (Sugai-Guérios et al., 2015). A manutenção do meio estático no início do cultivo A2 pode ter facilitado a formação de hifas aéreas, principais responsáveis pela captação de oxigênio, como descrito em Rahardjo et al. (2002). Em cultivos estáticos, as hifas aéreas podem facilmente se desenvolver nos espaços entre as partículas, diferentemente do que ocorre em cultivos com agitação, onde pode ser observada maior quantidade de hifas aderidas ao biofilme formado sobre as partículas sólidas, fato que pode ser prejudicial à transferência de oxigênio para a população microbiana (Schutyser *et al.*, 2003; Sugai-Guérios *et al.*, 2015). Após o período estático de 24 horas, as hifas podem ser resistentes a ponto de não serem afetadas pelo cisalhamento quando a agitação do meio é retomada, o que justificaria os melhores resultados em termos de crescimento celular obtidos em A2 (Arora et al., 2017; Schutyser et al., 2003).

Por outro lado, a agitação nas horas iniciais do cultivo pode ser extremamente prejudicial ao desenvolvimento das hifas e esses danos ao micélio fúngico podem desfavorecer o crescimento no decorrer do cultivo (Arora et al., 2017; Doriya e Kumar, 2018). Os resultados de biomassa obtidos em A3 estariam relacionados ao efeito negativo da agitação inicial aliado a uma possível limitação de oxigênio causada pela interrupção dos eventos de agitação após 24 horas de ensaio. Ao comparar A4 com T2M2, apesar de valores de  $X_{\max}$  semelhantes, o pico foi atingido tardiamente em A4, em 96 horas (Tabela 3). Isso também pode estar relacionado com as condições de transferência de calor e massa menos favoráveis nesse ensaio, decorrentes da manutenção do meio estático a partir das 48 horas do processo.

Apesar de o crescimento celular ter sido favorecido nas primeiras horas do ensaio, a condução do cultivo de forma estática (E) não favoreceu a produção de pectinases, sendo obtido o menor  $P_{\max}$  entre as condições avaliadas, de 39,7 U/gms em 72 horas de processo. No cultivo A2, mesmo com a obtenção de maior concentração celular, a produção de pectinases não foi favorecida, sendo observado  $P_{\max}$  de 50,7 U/gms em 72 horas. No ensaio A3 foi obtido o maior valor de  $P_{\max}$  (99,7 U/gms) entre todas as estratégias avaliadas nesse trabalho (Tabela 3). Como comentado anteriormente, e também relatado na literatura, as condições de estresse proporcionadas pela interrupção da agitação após as 24 horas iniciais do ensaio justificariam os resultados superiores em

termos de produção de pectinases nesse caso (Mitchell et al., 2006; Poletto et al., 2017). Além disso, o tempo de cultivo foi reduzido, uma vez que o pico foi atingido 24 horas antes quando comparado com T2M2. Entre as condições avaliadas, além de A3, apenas no ensaio A4 foi obtida atividade de pectinases superior a observada na condição de agitação anteriormente utilizada (T2M2), de 77,3 U/gms, embora sem redução no tempo de processo (96 horas).

Em relação aos parâmetros avaliativos do processo, valores de  $Y_{P/X}$  obtidos nos ensaios A3 (0,54 U/mg) e A4 (0,41 U/mg) foram superiores ao atingido em T2M2 (0,30 U/mg). Considerando os resultados superiores de concentração celular e inferiores de atividade enzimática, foram observados menores valores de  $Y_{P/X}$  nos ensaios E (0,18 U/mg) e A2 (0,16 U/mg). A condição de agitação reproduzida em A2 favoreceu o desenvolvimento fúngico, com maior valor de  $Y_{X/S}$  (1,45 mg/mg) sendo atingido nesse ensaio, seguido de T2M2 (0,83 mg/mg) e E (0,75 mg/mg). Valores de  $Y_{X/S}$  de 0,59 e 0,48 mg/mg foram verificados nos ensaios A3 e A4, respectivamente. Por outro lado, o maior fator de conversão de substrato em produto foi atingido em A3 (0,31 U/mg) e o inferior no ensaio E, de 0,09 U/mg. Valores de  $Y_{P/S}$  intermediários, entre 0,20 e 0,23 U/mg, foram determinados nos outros ensaios (Tabela 3).

Além da obtenção de maiores títulos enzimáticos, com o estudo de parâmetros operacionais almeja-se o aumento da produtividade enzimática pela redução do tempo de processo. Nesse sentido, novamente é dado destaque ao cultivo A3, com produtividade de 1,38 U/gms/h, o dobro do valor obtido no ensaio T2M2 (0,69 U/gms/h). Esse resultado está relacionado ao maior valor de  $P_{max}$  obtido nesse ensaio associado à redução de 24 horas no tempo de obtenção do pico, em 72 horas. Em A2 e A4 foram atingidas produtividades semelhantes a T2M2, de 0,70 e 0,80 U/gms/h, respectivamente. Apesar do valor de  $P_{max}$  ter sido atingido em 72 horas, foi observada menor produtividade no ensaio E (0,55 U/gms/h) (Tabela 3).

A partir dos resultados dos ensaios conduzidos com diferentes estratégias de agitação do biorreator de tambor rotativo, pode-se afirmar que, entre as condições avaliadas, a estratégia de agitação do meio apenas no início do processo se mostrou mais favorável em termos de produção de pectinases por *A niger*. Nesse sentido, foram obtidas maiores atividades enzimáticas nos ensaios A3 e A4, com agitação do meio nas primeiras 24 e 48 horas de processo, respectivamente. A seleção do período de tempo em que deve ser realizada a agitação é um fator importante para a obtenção de resultados favoráveis em cultivos com agitação intermitente (Arora et al., 2017; Schutyser et al., 2003).

Schutyser et al. (2003) propuseram um modelo para a simulação do movimento das partículas em CES de fungos filamentosos em biorreator de tambor rotativo considerando a resistência à tração das ligações das hifas. Os autores sugerem que a avaliação do tempo da primeira agitação é importante no sentido de impedir a formação de zonas compactadas de micélio que não são afetados com a posterior agitação, prejudicando as condições de mistura no decorrer do processo. Baseado nesse estudo, Finkler et al. (2017) avaliaram a agitação intermitente em diferentes intervalos de tempo de cultivos de *A. niger* em biorreator de leito empacotado (200 L) visando à produção de pectinases. Os autores confirmaram a importância da agitação no início do cultivo para reduzir a formação de zonas de de partículas estagnadas, sendo obtidos melhores resultados em termos de atividade enzimática com a realização de três eventos de agitação (8, 10 e 12 horas) em cultivo de 20 horas.

No presente trabalho, a manutenção de agitação apenas nas primeiras 24 horas foi a estratégia mais adequada, pois além de ser obtido o maior valor de atividade enzimática, o tempo de processo foi reduzido, aumentando a produtividade em comparação à condição de agitação padrão (ensaio T2M2). Além disso, a diminuição do tempo de ensaio e dos eventos de agitação em A3 pode ser uma alternativa para redução do consumo de energia envolvida no processo de obtenção de pectinases de *A. niger* em CES.

#### **4 CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nesse estudo mostram a influência que as variações do tamanho de partículas do substrato sólido, da massa de meio e das condições de agitação exercem sobre o processo de obtenção de pectinases por *A. niger* em CES conduzidos em biorreator de tambor rotativo.

Foram atingidas maiores atividade enzimáticas com o emprego de partículas de maior tamanho (1,0 - 2,8 mm). Com esse tamanho de partículas, a utilização de maior massa de meio (1800 g), apesar de não ter favorecido o crescimento celular, proporcionou a obtenção de maior título de pectinases entre as condições avaliadas.

Diferentes estratégias de agitação intermitente do biorreator de tambor rotativo causaram efeitos opostos em relação ao crescimento celular e a obtenção de pectinases. Manter o biorreator estático nas primeiras 24 horas de cultivo favoreceu o desenvolvimento fúngico, com maiores concentrações de biomassa atingidas nesse caso. Por outro lado, foi verificada a maior atividade enzimática no ensaio com agitação apenas

nas primeiras 24 horas de processo. Além disso, o tempo de obtenção do pico de atividade enzimática foi inferior em comparação à condição de agitação anteriormente utilizada, proporcionando aumento da produtividade enzimática.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a Universidade de Caxias do Sul (UCS) pelo apoio financeiro para este trabalho.

### REFERÊNCIAS

- Arntz, M.M.H.D., Otter, W.K. den, Briels, W.J., Bussmann, P.J.T., Beftink, H.H., Boom, R.M., 2008. granular mixing and segregation in a horizontal rotating drum: A simulation study on the impact of rotational speed and fill level. *AIChE J.* 54, 3133–3146. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Arora, S., Dubey, M., Singh, P., Rani, R., Ghosh, S., 2017. Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. *Process Biochem.* 61, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.009>
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S., Cantero, D., Webb, C., 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 164–169. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0893-4>
- Colla, E., Santos, L.O., Deamicis, K., Magagnin, G., Vendruscolo, M., Costa, J.A.V., 2017. Simultaneous production of amyloglucosidase and exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* in a rotating drum reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 627–637. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2237-y>
- Demir, H., Tari, C., 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Ind. Crops Prod.* 54, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.025>
- Díaz, A.B., De Ory, I., Caro, I., Blandino, A., 2009. Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. *Chem. Eng. Trans.* 17, 1041–1046. <https://doi.org/10.3303/CET0917174>

- Doriya, K., Kumar, D.S., 2018. Solid state fermentation of mixed substrate for L-asparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 138, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.024>
- Fernandes, P., Carvalho, F., 2017. Microbial Enzymes for the Food Industry, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press, pp. 513–544. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00019-4>
- Finkler, A.T.J., Biz, A., Pitol, L.O., Medina, B.S., Luithardt, H., Luz, L.F. de L., Krieger, N., Mitchell, D.A., 2017. Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 121, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.01.011>
- Fontana, R.C., Salvador, S., Da Silveira, M.M., 2005. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 371–377. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0004-0>
- Gasiorek, E., 2008. Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. *Chem. Pap.* 62, 141–146. <https://doi.org/10.2478/s11696-008-0003-5>
- Gassara, F., Ajila, C.M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Verma, M., Valero, J., 2013. Influence of aeration and agitation modes on solid-state fermentation of apple pomace waste by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols. *Int. J. Food Sci.* 48, 2119–2126. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12194>
- Ge, X., Vasco-Correa, J., Li, Y., 2017. Solid-State Fermentation Bioreactors and Fundamentals, in: Larroche, C.; Sanroman, M. A.; Du, G.; Pandey, A. (Eds.). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*, Elsevier, pp. 381–402. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00013-6>
- Gomes, E., da Silva, R., de Cassia Pereira, J., Ladino-Orjuela, G., 2018. Fungal Growth on Solid Substrates, in: Ashok Pandey, Christian Larroche, C.R.S. (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V., pp. 31–56. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00003-7>
- Guan, X., Zhou, Z., Li, J., Li, S., 2020. Establishment and verification of a model for the movement of pulverized sweet sorghum stalks in a rotary drum bioreactor by

- discrete element method. *Particuology* 51, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2019.09.002>
- John, J., Kaimal, K.K.S., Smith, M.L., Rahman, P.K.S.M., Chellam, P.V., 2020. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 1086–1099. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>
- Mahmoodi, M., Najafpour, G.D., Mohammadi, M., 2019. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101280>
- Maiorano, A.E., 1990. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- Malvessi, E., Silveira, M.M. da, 2004. Influence of medium composition and ph on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 693–702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500004>
- Manan, M.A., Webb, C., 2017. Design Aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *J. Appl. Biotechnol. Boeng.* 4, 511–532. <https://doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mitchell, D.A., Krieger, N., 2019. Solid-State Cultivation Bioreactors, in: A. Berenjian (ed.) (Ed.), *Essentials in Fermentation Technology*, Learning Materials in Biosciences. Springer Nature Switzerland AG, pp. 105–133. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_4)
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovič, M., 2006. *Solid-State Fermentation Bioreactors, Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 447p. <https://doi.org/10.1007/3-540-31286-2>
- Musoni, M., Destain, J., Thonart, P., Bahama, J.B., Delvigne, F., 2015. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: From traditional methods to engineered systems. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 19, 430–442.

- Nigam, P.S. nee', 2009. Production of Bioactive Secondary Metabolites, in: Nigam, P.S. nee', Pandey, A. (Eds.), *Biotechnology for agro industrial residues utilisation*. Springer Science+Business Media B.V., pp. 130–144. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>
- Nighojkar, A., Patidar, M.K., Nighojkar, S., 2019. Pectinases: Production and applications for fruit juice beverages, in: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), *Processing and Sustainability of Beverages*. Woodhead Publishing, pp. 235–273.
- Niyonzima, F.N., Veena, S.M., More, S.S., 2020. Industrial Production and Optimization of Microbial Enzymes, in: Arora, N.K., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore, pp. 115–135. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- Poletto, P., Polidoro, T.A., Zeni, M., Silveira, M.M. da, 2017. Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. *LWT - Food Sci. Technol.* 79, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018>
- Polidoro, T.A., Silveira, M.M., Gelain, L., 2009. Dispositivo de Tambor Rotativo. Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, MU8901075-2.
- Rahardjo, Y.S.P., Weber, F.J., Paul Le Comte, E., Tramper, J., Rinzema, A., 2002. Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 539–544. <https://doi.org/10.1002/bit.10222>
- Reginatto, C., Posso dos Santos, G., Costa Ramos, K., Borges Folle, A., Campos de Souza, B., Souza, D., Meneghel, L., Carra, S., Polidoro, T.A., Moura da Silveira, M., Valduga, E., Malvessi, E., 2022. Inoculation conditions improved the pectinase productivity in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 42, 102354. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102354>
- Reginatto, C., Rossi, C., Miglioranza, B.G., Santos, M., Meneghel, L., Moura, M., Malvessi, E., 2017. Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochem.* 58, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.018>

- Sandri, I.G., Lorenzoni, C.M.T., Fontana, R.C., da Silveira, M.M., 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 51, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.015>
- Sandri, I.G., Silveira, M.M. da, 2018. Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Schmidt, C.G., Furlong, E.B., 2012. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.* 123, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.081>
- Schutyser, M.A.I., De Pagter, P., Weber, F.J., Briels, W.J., Boom, R.M., Rinzema, A., 2003. Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: Experiments and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 503–513. <https://doi.org/10.1002/bit.10693>
- Shahryari, Z., Fazaalipoor, M.H., Shaabani, M.S., Ghasemi, Y., 2020. Production of fungal phytase in an innovative trickle bed bioreactor. *Waste Biomass Valori.* 11, 3273–3280. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00642-9>
- Shrestha, S., Rahman, M.S., Qin, W., 2021. New insights in pectinase production development and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 9069–9087. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- Singh, R.S., Singh, T., Pandey, A., 2019. Microbial Enzymes-An Overview, in: Singh, R.S., Singhania, R.R., Pandey, A., Christian Larroche (Eds.), *Biomass, Biofuels, Biochemicals. Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V., pp. 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7>
- Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M., 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 36–41. <https://doi.org/10.1007/BF00166845>
- Stuart, D.M., Mitchell, D.A., 2003. Mathematical model of heat transfer during solid-state fermentation in well-mixed rotating drum bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 1180–1192. <https://doi.org/10.1002/jctb.920>
- Stuart, D.M., Mitchell, D.A., Johns, M.R., Litster, J.D., 1999. Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their

effects on transport phenomena. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 383–391. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990520\)63:4<383::AID-BIT1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990520)63:4<383::AID-BIT1>3.0.CO;2-N)

Sugai-Guérios, M.H., Balmant, W., Jr, A.F., Krieger, N., Mitchell, D.A., 2015.

Modeling the Growth of Filamentous Fungi at the Particle Scale in Solid-State Fermentation Systems, in: Krull, R., Bley, T. (Eds.), *Filaments in Bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 127–141. <https://doi.org/10.1007/10>

Zabriskie, D.W., Humphrey, A.E., 1978. Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing. *AIChE J.* 24, 138–146. <https://doi.org/10.1002/aic.690240116>

### **4.3 Artigo 3: Subprodutos da indústria de sucos como indutores da produção de pectinases em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em meio sólido**

**RESUMO:** Subprodutos agroindustriais foram utilizados como indutores da produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivos em estado sólido conduzidos em frascos e biorreator de tambor rotativo. Foram avaliados, em meios baseados em farelo de trigo e sais nutrientes, os bagaços de maçã, tangerina, laranja, uva branca e roxa. Os resultados foram comparados com a utilização do meio padrão (PG), composto por farelo de trigo, pectina cítrica comercial, glicose e sais nutrientes. Na avaliação em frascos, maior atividade enzimática foi obtida com bagaço de maçã (59,5U/gms), seguido pelos bagaços de tangerina (46,0U/gms) e laranja (42,3U/gms). Assim, cultivos em biorreator foram conduzidos com bagaços de maçã (M) e frutas cítricas (mistura de bagaços de laranja e tangerina) (C) em comparação ao meio PG. Nesses ensaios, atividade de pectinases superior foi alcançada no ensaio M (83,4U/gms), seguido pelos ensaios PG (66,4U/gms) e C (38,6U/gms). A substituição de glicose e pectina cítrica comercial por bagaço de maçã resultou em aumento de atividade enzimática e, ainda, pode contribuir para a redução dos custos de obtenção de pectinases em escala industrial. Os resultados obtidos nesse estudo são promissores e indicam a possibilidade de utilização de bagaço de maçã para a produção de pectinases em cultivo em estado sólido.

**Palavras-chave:** pectinases; *Aspergillus niger*; biorreator de tambor rotativo; subprodutos agroindustriais; bagaços de frutas.

## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de desenvolvimento de tecnologias de menor impacto ambiental e o crescente interesse do mercado consumidor em produtos de origem natural são fatores que contribuem para o crescimento da biotecnologia industrial (Niyonzima et al., 2020; Pessôa et al., 2019). Aliado a isso, os processos que utilizam biocatalisadores podem ser conduzidos em condições operacionais mais brandas e com redução da geração de resíduos tóxicos e consumo de energia (Delgove et al., 2019). Os microrganismos são os biocatalisadores mais utilizados industrialmente, seja atuando de forma direta ou através de metabólitos produzidos por eles. Isso se deve a fatores como a grande diversidade de espécies, a independência de sazonalidade, a capacidade de secretarem grande quantidade e variedade de enzimas e metabolizarem diferentes moléculas complexas (Niyonzima et al., 2020; Pessôa et al., 2019). Uma das formas de produção industrial de metabólitos microbianos é o cultivo em estado sólido (CES). Nesses processos, a matriz sólida pode servir como suporte inerte para o crescimento do microrganismo e também atuar como substrato e fonte de nutrientes (Kumar et al., 2021; Nighojkar et al., 2019). Segundo (Yafetto, 2022), o número de pesquisas sobre CES aumentou exponencialmente entre os anos 1970 a 2020, indicando o interesse de pesquisadores e do setor industrial sobre esse tipo de processo.

A utilização de CES em processos microbianos industriais ganha destaque pela possibilidade de aproveitamento de subprodutos agroindustriais como substrato para a obtenção de produtos de interesse reduzindo os custos do processo (Kumar et al., 2021; Londoño-Hernandez et al., 2020; Marzo et al., 2019). Além disso, é uma forma de agregar valor a essas matérias-primas e diminuir os problemas ambientais relacionados à sua disposição (Jahan et al., 2017; Nighojkar et al., 2019). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estima que mais de 13% dos alimentos produzidos no mundo são perdidos nas etapas que antecedem o varejo (FAO 2020; Parfitt et al. 2021; UNEP 2021). Devido aos problemas ambientais e de saúde causados pelo manejo e disposição inadequados desses resíduos, muitas políticas públicas incentivam estratégias para a reutilização sustentável de subprodutos gerados nos processos agroindustriais. Entre os 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), o objetivo 12 tem como foco o consumo e produção sustentáveis. Nesse sentido, as empresas são incentivadas a adotar práticas que visem reduzir a geração de resíduos, empregando processos que contemplem a reutilização, reciclagem e reuso (United Nations, 2015). Uma das formas de

reaproveitamento de subprodutos gerados na agroindústria é sua utilização em CES microbianos para a obtenção de alimentos, biocombustíveis, enzimas, vitaminas, antibióticos, antioxidantes, biofertilizantes, biopesticidas, pigmentos, produtos para nutrição animal, entre outros (Sadh et al., 2018; Sharma et al., 2020).

A produção de enzimas é o principal tópico dos estudos que avaliam CES microbianos no reaproveitamento de resíduos agroindustriais, correspondendo a mais de 60% das pesquisas realizadas nas últimas 5 décadas (Yafetto, 2022). O interesse nesses biocatalisadores está relacionado às características que apresentam, como alta eficiência catalítica, especificidade de substratos, biodegradabilidade e não toxicidade (Patel et al., 2017; Thapa et al., 2019). As enzimas têm aplicação em uma vasta gama de processos industriais, como nas áreas alimentícia, farmacêutica, biotecnológica e de nutrição animal (Singh et al., 2019). Entre as enzimas utilizadas industrialmente destacam-se as pectinases ou enzimas pectinolíticas (Amin et al., 2019; Nighojkar et al., 2019). Esse complexo enzimático é responsável pela quebra de polissacarídeos pécnicos, como a pectina, sendo principalmente utilizado no processamento industrial de frutas (Amin et al., 2019; Patel et al., 2022).

As pectinases são, em sua grande maioria, enzimas induzidas, ou seja, é necessária a adição de uma fonte de indução no meio de cultivo para sua produção (Niu et al., 2017). O principal indutor utilizado é a pectina purificada, que pode ser também utilizada como fonte de carbono (Maldonado e Strasser de Saad, 1998). Uma das limitações da produção de pectinases em escala industrial é o alto custo do meio de cultivo, que pode corresponder até a 40% do custo de produção (Jahan et al., 2017). O emprego de pectina comercial, devido ao seu alto custo, pode inviabilizar economicamente o processo de obtenção dessas enzimas. Nesse sentido, muitos estudos buscam desenvolver meios de cultivo compostos por matérias-primas de baixo custo que contenham pectina em sua composição. Geralmente, são utilizados subprodutos agroindustriais, principalmente resíduos gerados pelas indústrias de alimentos e bebidas que são ricos em pectina (Mahmoodi et al., 2019). Esses subprodutos, como os bagaços gerados no processamento industrial de frutas, são materiais heterogêneos e podem ser compostos por cascas, polpas, sementes e caules. Por conterem pectina em sua composição, são alternativas para a substituição de pectina purificada comercial na produção de enzimas pectinolíticas (Joshi et al., 2006; Mahmoodi et al., 2019).

Muitos estudos que avaliam o emprego de resíduos de frutos para produção microbiana de enzimas utilizam apenas partes dos frutos, como casca ou polpa, que

geralmente são adquiridas em estabelecimentos comerciais (Dhillon et al., 2007; Díaz et al., 2012; Heerd et al., 2012; Maller et al., 2011; Ortiz et al., 2017; Ruiz et al., 2012; Satapathy et al., 2021). Esses materiais geralmente são higienizados, secos e moídos, podendo ser submetidos à outras etapas de pré-tratamento físicas e/ou químicas. Para a redução dos custos do processo e do consumo de energia e insumos, revela-se importante avaliar a utilização desses materiais da forma integral que é gerada no processo de obtenção dos sucos, tentando minimizar também as etapas de pré-tratamento realizadas. Nesse sentido, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em CES conduzidos em frascos e biorreator de tambor rotativo com meios de cultivo compostos por bagaços de frutas gerados no processamento industrial de sucos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismo**

A cepa de *Aspergillus niger* LB-02-SF utilizada nesse trabalho foi isolada por Sandri et al. (2013), pertence à coleção de culturas do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul (Caxias do Sul, Brasil) e está depositado na Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil) com o código INCQS 40371. O microrganismo é conservado em meio batata-dextrose-agar (BDA), a 4°C.

### **2.2 Subprodutos da produção de sucos**

Os subprodutos da indústria de sucos de frutas foram coletados logo após o processamento, não sendo submetidos, nas respectivas empresas, a etapas de separação e/ou secagem. Os bagaços de maçã (cedido por Naturasuc – Farroupilha/Brasil), de uva (cedido por Vinícola Nova Aliança – Flores da Cunha/Brasil) e de laranja e tangerina (cedidos por Tecnovin – Bento Gonçalves/Brasil) foram, posteriormente, submetidos à secagem em estufa com circulação de ar construída na UCS (Laboratório de Estudos do Sistema de Solo, Planta e Atmosfera e Metabolismo Vegetal - LESPA) a  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  até ser atingida massa constante. Na sequência, o material foi moído em liquidificador de uso doméstico (Xpert Series, Oster, EUA), sendo classificado quanto à granulometria e armazenado em sacos plásticos a  $-20^\circ\text{C}$ .

Os bagaços de maçã, laranja, tangerina e uva foram avaliados com relação ao teor de pectina de acordo com o método descrito por Zanella & Taranto (2015). Esse método

se baseia na extração da pectina dos bagaços utilizando água acidificada (pH 2,5) na proporção de 1:70 m/v, sob agitação recíproca de 650 rpm, a 80°C, por 120 minutos. Após a precipitação com etanol (95%) na razão de 1:2 v/v (sobrenadante/etanol), os precipitados foram filtrados e secos em estufa a 50°C até massa constante. O rendimento da extração, nesse trabalho considerado como teor de pectina presente nos bagaços (%), foi calculado pela razão entre a massa de pectina desidratada e a massa da matéria-prima (Zanella e Taranto, 2015). A análise de cinzas foi realizada por gravimetria no Laboratório de Enzimas e Biomassas (UCS), de acordo com metodologia NREL-TP-510-42621, utilizando aproximadamente 5 g de amostra de bagaço em estufa a 550°C, por 4 horas (Sluiter et al., 2008). O teor de nitrogênio total em cada bagaço foi determinado por Kjeldhal (ISO 1871:2009) no Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (UCS), utilizando fator de conversão nitrogênio total/proteína de 5,75.

### **2.3 Condições de cultivo**

Os cultivos preliminares foram conduzidos em triplicata, em frascos Becher de 800 mL, contendo 100 g de meio sólido úmido (gmu) (Fontana et al., 2005). Os frascos foram cobertos com uma fina manta de gaze e algodão hidrófobo e autoclavados a 1 atm por 20 minutos. Posteriormente, com a inoculação (suspensão de esporos -  $7 \times 10^7$  esporos/100gmu) e adição de água, umidade inicial do meio foi ajustada para aproximadamente 55%, sendo mantidos em estufa com atmosfera saturada em umidade (DeLeo, Brasil), a 30°C, por 96 horas. O biorreator de tambor rotativo utilizado neste trabalho foi projetado pela equipe do Laboratório de Bioprocessos, construído com a participação da Oficina de Vidros e Laboratório de Tecnologia e Pesquisa da UCS Polidoro et al. (2009) e descrito por Poletto et al. (2017), sendo concedida carta patente de modelo de utilidade MU 8901075-2 em maio de 2017. Os cultivos em biorreator foram conduzidos em triplicata, com 1800 gmu, temperatura do ar úmido a 30°C, fluxo específico de ar de 0,54 litro de ar por quilograma de meio úmido por minuto (LKgM) e agitação de 1rpm por 5 minutos, realizada em intervalos de 120 minutos (Poletto et al., 2017).

### **2.4 Meios de cultivo**

O meio de cultivo utilizado como base para a avaliação do emprego de bagaços de frutas na produção de pectinases foi definido por Fontana et al. (2005) e é composto por (g/100gmu): farelo de trigo, 36,6; pectina cítrica, 6,0; glicose, 10,0; solução salina, 30,6.

A solução de sais nutrientes (pH ajustado em 4,0) contém:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4,0;  $\text{MgSO}_4$ , 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,0;  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $6,3 \times 10^{-5}$ ;  $\text{ZnSO}_4$ ,  $6,2 \times 10^{-5}$ ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $1,0 \times 10^{-6}$ . Em todos os cultivos, apesar da variação dos demais componentes do meio, a concentração da solução salina foi mantida como no meio base.

Primeiramente foi avaliada a atividade de pectinases totais em 96 horas de ensaios em frascos conduzidos com diferentes meios de cultivo. Para o estudo dos efeitos da utilização dos bagaços, a massa de pectina e metade da massa de farelo de trigo foram substituídas por bagaço de fruta seco e moído no mesmo tamanho de partícula. Além disso, foram avaliados meios compostos somente por bagaços de frutas ou farelo de trigo. Em todos esses casos, foram testados meios com e sem adição de glicose. Nesses ensaios preliminares foram avaliadas então diferentes combinações de farelo de trigo (F), glicose (G), pectina cítrica (P), bagaços de maçã (M), laranja (L), tangerina (T), uva roxa (UR) e uva branca (UB). Num segundo momento, a partir dos resultados obtidos nesse teste preliminar, foram realizados ensaios em frascos com meios compostos por (g/100gmu): farelo de trigo, 18,3; bagaço de fruta, 24,3; solução salina, 30,6. Foi adicionada água para ajustar a massa de meio em 100 gmu e o teor de umidade inicial em aproximadamente 55%. Os perfis cinéticos desses ensaios conduzidos com bagaços de maçã (M), tangerina (T), laranja (L), uva roxa (UR) e uva branca (UB) foram comparados aos resultados obtidos com o meio base (PG). Finalmente, os meios de cultivo que proporcionaram a obtenção de maiores atividades enzimáticas foram empregados em cultivos em biorreator de tambor rotativo, conforme as condições descritas em 2.3.

## 2.5 Métodos analíticos e extração de compostos solúveis

A concentração celular foi determinada indiretamente a partir de dados obtidos por balanço de oxigênio, de acordo com o método proposto originalmente por Zabriskie e Humphrey (1978) para CSm e adaptado para CES por Maiorano (1990). Esse método se baseia na correlação entre a concentração celular no meio sólido com a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR), calculada a partir de valores de pressão parcial de oxigênio, medidos em oxímetro. Para os cultivos em frascos Becher, o método foi realizado de acordo com Fontana (2004) e descrito por Reginatto et al. (2022) e para os cultivos em biorreator de acordo com Poletto et al. (2017). Os valores do fator de conversão de oxigênio em células ( $Y_{GO}$ ) –  $0,092 \text{ g}_{\text{biomassa}}/\text{mmol O}_2$  – e do coeficiente de manutenção celular para o oxigênio ( $m_O$ ) –  $1,25 \text{ mmol O}_2/\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{h}$  – para *A. niger* LB-02-SF foram determinados por Poletto et al. (2017).

A amostragem nos cultivos em frascos Becher teve início com a retirada do frasco da estufa e imediatamente o conduzindo para o sistema de determinação de OUR (Fontana, 2004; Reginatto et al., 2022). Finalizado o procedimento, todo meio fermentado contido no Becher foi homogeneizado e uma porção foi utilizada para a determinação de umidade, a partir da secagem de 1 g da amostra úmida em estufa a 100°C até massa constante. Outra porção do meio fermentado foi utilizada para determinação da concentração de açúcares redutores totais, realizada a partir do método descrito por Fontana et al. (2005) para amostras sólidas, seguido de método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). Nos cultivos em biorreator, a amostragem foi realizada pela introdução de um tubo de vidro na tampa do equipamento, em condições estéreis, em capela de fluxo laminar. O conteúdo da amostra foi homogeneizado e o restante do procedimento foi realizado da mesma forma descrita para os ensaios em frascos.

Para a extração das enzimas, 1 g de amostra úmida foi suspenso em 10 mL água acidificada com HCl 2 mol/L (pH 4,0), em frascos Erlenmeyer de 250 mL, submetidos à agitação recíproca de 200 rpm por 15 minutos, a 20°C. Após este período, as suspensões obtidas foram centrifugadas e filtradas para remoção de sólidos em suspensão. A atividade de pectinases totais foi avaliada pelo método descrito por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi & Silveira (2004), que se baseia na medida da redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina em tampão acetato 0,05 mol/L submetida à ação das enzimas pectinolíticas produzidas. Neste caso, foi utilizada solução de pectina cítrica 0,9 % (m/v) e a viscosidade da mistura foi determinada em viscosímetro (modelo LDV-II+, Brookfield, EUA) a 60 rpm. Os valores de atividade enzimática, teor de umidade e ART foram determinados em duplicatas.

## **2.6 Parâmetros de avaliação do processo**

O fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ) relaciona a máxima atividade enzimática ( $P_{max}$ ) com a máxima concentração celular ( $X_{max}$ ) obtidas no processo. Os fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em células ( $Y_{X/S}$ ) foram calculados a partir da relação entre  $P_{max}$  e  $X_{max}$  obtidos no cultivo e o consumo de substrato até o momento de obtenção dos picos. A produtividade ( $p$ ) representa a concentração de produto formado por tempo de processo.

## **2.7 Análises estatísticas**

Os testes estatísticos foram realizados por análise de variância (*one-way ANOVA*)

e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa SPSS (versão 20.0).

### 3 RESULTADOS

O emprego de subprodutos agroindustriais como componentes do meio de cultivo para a produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em CES foi avaliado com cinco diferentes tipos de bagaços de frutas. Na Tabela 1 são mostrados os resultados da caracterização dos bagaços secos e moídos e também do farelo de trigo.

**Tabela 1** - Caracterização dos subprodutos agroindustriais utilizados no meio de produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivo em estado sólido.

	Subprodutos agroindustriais					
	Bagaço de maçã	Bagaço de tangerina	Bagaço de laranja	Bagaço de uva branca	Bagaço de uva roxa	Farelo de trigo
<b>Pectina (%)*</b>	11,1 <sup>a</sup> ± 1,31	12,7 <sup>a</sup> ± 0,22	10,7 <sup>a</sup> ± 2,16	4,7 <sup>c</sup> ± 0,27	5,3 <sup>b</sup> ± 0,28	ND**
<b>Cinzas (%)*</b>	2,58 <sup>d</sup> ± 0,05	3,82 <sup>b</sup> ± 0,02	3,79 <sup>b</sup> ± 0,01	5,63 <sup>a</sup> ± 0,07	3,17 <sup>c</sup> ± 0,00	ND**
<b>Nitrogênio total (%)*</b>	0,13	1,21	0,89	2,00	0,54	2,00

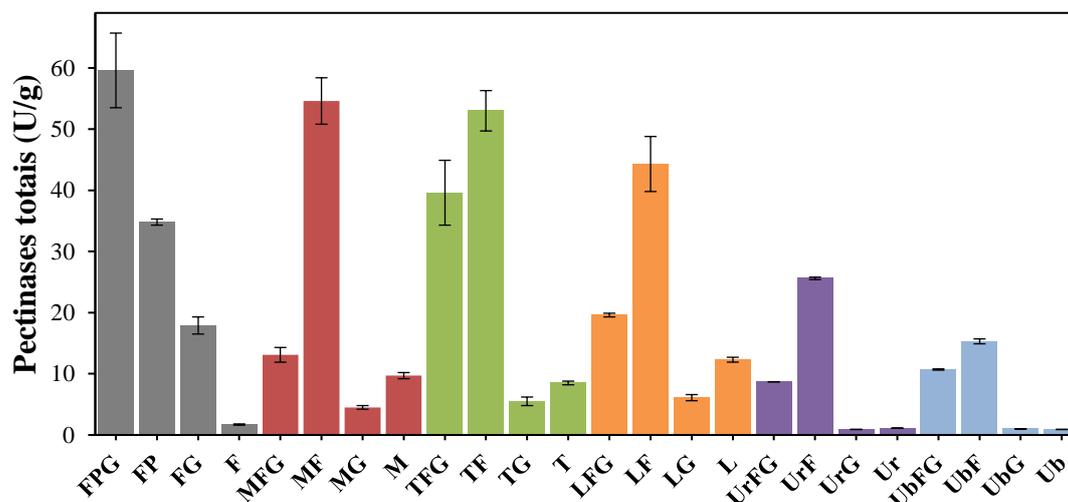
Os resultados representam médias (n=3) ± desvio padrão. Letras diferentes (a-d) indicam diferenças significativas entre as médias ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

Notas: \* base seca; \*\* ND – não determinado.

Na Tabela 1 podem ser observados valores semelhantes de teor de pectina para bagaços de maçã, tangerina e laranja, de 11,1, 12,7 e 10,7%, respectivamente. Valores inferiores foram verificados nos bagaços de uva branca (4,7%) e uva roxa (5,3%). Em relação ao teor de cinzas, maior valor foi observado no bagaço de uva branca (5,63%) e o menor no bagaço de maçã (2,58%). No caso do bagaço de uva roxa foi determinado teor de cinzas de 3,17% e nos bagaços de laranja e tangerina foram verificados valores estatisticamente semelhantes, em torno de 3,8%. Entre os valores apresentados na Tabela 1, o menor teor de nitrogênio total foi verificado para bagaço de maçã (0,13%) e o maior para bagaço de uva branca (2,0%). Nos demais bagaços avaliados foram verificados teores de nitrogênio total que variaram entre 0,53-1,21%. Para o farelo de trigo utilizado foi determinado teor de nitrogênio total de 2,0%.

Após a caracterização dos bagaços, foram conduzidos ensaios em frascos para a avaliação desses materiais como componentes do meio de cultivo visando à produção de pectinases em CES. Primeiramente foram avaliadas diferentes combinações de meios de cultivo variando as quantidades de farelo de trigo (F), glicose (G), pectina cítrica (P), bagaços de maçã (M), laranja (L), tangerina (T), uva roxa (UR) e uva branca (UB). Os

resultados de atividade de pectinases obtidos em 96 horas dos ensaios com diferentes meios de cultivo são mostrados na Figura 1.

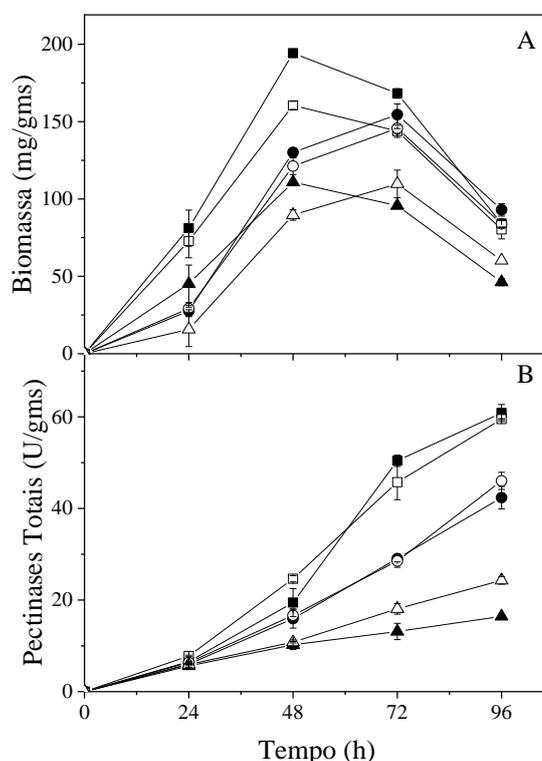


**Figura 1** - Atividade de pectinases totais em 96 horas de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF conduzidos em frascos com diferentes meios de cultivo. **FPG**: farelo de trigo, pectina e glicose; **FP**: farelo de trigo e pectina; **FG**: farelo de trigo e glicose; **F**: farelo de trigo; **MFG**: bagaço de maçã, farelo de trigo e glicose; **MF**: bagaço de maçã e farelo de trigo; **MG**: bagaço de maçã e glicose; **M**: bagaço de maçã; **TFG**: bagaço de tangerina, farelo de trigo e glicose; **TF**: bagaço de tangerina e farelo de trigo; **TG**: bagaço de tangerina e glicose; **T**: bagaço de tangerina; **LFG**: bagaço de laranja, farelo de trigo e glicose; **LF**: bagaço de laranja e farelo de trigo; **LG**: bagaço de laranja e glicose; **L**: bagaço de laranja; **UrFG**: bagaço de uva roxa, farelo de trigo e glicose; **UrF**: bagaço de uva roxa e farelo de trigo; **UrG**: bagaço de uva roxa e glicose; **Ur**: bagaço de uva roxa; **UbFG**: bagaço de uva branca, farelo de trigo e glicose; **UbF**: bagaço de uva branca e farelo de trigo; **UbG**: bagaço de uva branca e glicose; **Ub**: bagaço de uva branca.

Ao comparar os resultados de atividade enzimática para cada bagaço, pode ser observado que as maiores atividades de pectinases foram obtidas com o uso de meios compostos pela mistura do respectivo bagaço com farelo de trigo. Em todos os cultivos com os bagaços de frutas e farelo de trigo as maiores atividades de pectinases foram obtidas nos meios isentos de glicose. Por outro lado, no cultivo com meio composto por farelo de trigo e pectina, maior atividade enzimática foi atingida na presença de glicose (Figura 1).

A partir dos resultados mostrados na Figura 1, foram conduzidos ensaios em frascos com meios de cultivos compostos por farelo de trigo (18,3 g), bagaços de frutas (24,3 g) e solução de sais (30,6 mL). Nesses ensaios, a massa de pectina (6,0 g) e metade da massa de farelo (18,3 g) do meio padrão foram substituídas por bagaço moído no mesmo tamanho de partícula, correspondendo a 24,3 g de bagaço. Esses cultivos, denominados

ensaio M (bagaço de maçã), L (bagaço de laranja), T (bagaço de tangerina), UB (bagaço de uva branca) e UR (bagaço de uva roxa) foram conduzidos em comparação ao cultivo com meio padrão (PG), composto por farelo de trigo, pectina, glicose e sais. Os perfis cinéticos obtidos nesses ensaios são mostrados na Figura 2.



**Figura 2** - Variação de biomassa [A] e atividade de pectinases totais [B] em função do tempo de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em frascos com meios de cultivo a base de farelo de trigo e diferentes fontes de carbono e indutor. (■) PG: pectina cítrica comercial e glicose; (□) M: bagaço de maçã; (●) L: bagaço de laranja; (○) T: bagaço de tangerina; (▲) UB: bagaço de uva branca; (△) UR: bagaço de uva roxa.

Na Figura 2A podem ser observados os perfis de variação da biomassa em função do tempo de cultivos com diferentes composições de meio de cultivo. As maiores concentrações celulares foram obtidas no cultivo com meio padrão, com pico atingido em 48 horas de processo. Perfis semelhantes foram verificados nos ensaios M e UB, com concentração celular máxima também atingida em 48 horas, entretanto, em valores inferiores. Os picos de biomassa foram obtidos em 72 horas nos ensaios com bagaços de laranja, tangerina e uva roxa.

Em relação à produção de pectinases, podem ser observados perfis semelhantes em todos os ensaios, com picos atingidos em 96 horas de processo, entretanto, com valores distintos (Figura 2B). Valores inferiores de atividade enzimática ao longo do tempo foram

verificados nos ensaios com bagaços de uva, com atividades máximas em torno de 15 e 25 U/gms atingidas em UB e UR, respectivamente. Com o emprego de bagaços de laranja e tangerina, não foram observadas diferenças entre os valores de atividade durante o processo, sendo atingida atividade pectinolítica máxima em torno de 45 U/gms nesses ensaios. No ensaio M foi atingida maior atividade pectinolítica em comparação aos valores obtidos nos ensaios com os outros bagaços e em valor semelhante ao verificado na condição padrão, em torno de 60 U/gms (Figura 2B).

Na Tabela 2, são apresentados os resultados gerais dos cultivos em frascos com diferentes fontes de carbono e indutor enzimático.

**Tabela 2** - Resultados gerais obtidos em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em frascos, com diferentes fontes de carbono e indutor

	<b>PG</b>	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>UB</b>	<b>UR</b>
<b>S<sub>0</sub></b> (mg/gms)	649,6 <sup>a</sup> ± 27,3	513,1 <sup>b</sup> ± 25,0	387,6 <sup>c</sup> ± 8,35	419,5 <sup>c</sup> ± 2,25	372,2 <sup>c</sup> ± 2,47	390,1 <sup>c</sup> ± 3,62
<b>S<sub>cons</sub></b> (mg/gms)	452,9 <sup>a</sup> ± 37,4	277,2 <sup>b</sup> ± 38,1	226,6 <sup>b</sup> ± 9,12	241,2 <sup>b</sup> ± 11,1	221,0 <sup>b</sup> ± 3,82	230,0 <sup>b</sup> ± 2,27
<b>X<sub>max</sub></b> (mg/gms)	194,3 <sup>a</sup> ± 1,71	160,5 <sup>b</sup> ± 2,62	154,5 <sup>b</sup> ± 6,91	145,7 <sup>b</sup> ± 5,88	110,9 <sup>c</sup> ± 0,15	109,8 <sup>c</sup> ± 8,88
<b>t<sub>Xmax</sub></b> (h)	48	48	72	72	48	72
<b>P<sub>max</sub></b> (U/gms)	60,9 <sup>a</sup> ± 1,85	59,5 <sup>a</sup> ± 1,10	42,3 <sup>b</sup> ± 2,45	46,0 <sup>b</sup> ± 1,87	16,4 <sup>d</sup> ± 0,2	24,3 <sup>c</sup> ± 0,83
<b>t<sub>Pmax</sub></b> (h)	96	96	96	96	96	96
<b>Y<sub>P/X</sub></b> (U/mg)	0,31 <sup>ab</sup> ± 0,01	0,37 <sup>a</sup> ± 0,01	0,27 <sup>bc</sup> ± 0,03	0,32 <sup>ab</sup> ± 0,03	0,15 <sup>d</sup> ± 0,0	0,22 <sup>cd</sup> ± 0,03
<b>Y<sub>X/S</sub></b> (mg/mg)	0,43 <sup>b</sup> ± 0,03	0,58 <sup>ab</sup> ± 0,07	0,68 <sup>a</sup> ± 0,05	0,60 <sup>ab</sup> ± 0,05	0,50 <sup>ab</sup> ± 0,01	0,47 <sup>b</sup> ± 0,04
<b>Y<sub>P/S</sub></b> (U/mg)	0,13 <sup>bc</sup> ± 0,01	0,21 <sup>a</sup> ± 0,03	0,18 <sup>ab</sup> ± 0,01	0,19 <sup>a</sup> ± 0,00	0,07 <sup>d</sup> ± 0,01	0,10 <sup>cd</sup> ± 0,01
<b>P</b> (U/gms/h)	0,63 <sup>a</sup> ± 0,02	0,62 <sup>a</sup> ± 0,00	0,44 <sup>b</sup> ± 0,03	0,48 <sup>b</sup> ± 0,02	0,17 <sup>d</sup> ± 0,00	0,25 <sup>c</sup> ± 0,01

S<sub>0</sub> – Concentração inicial de açúcares redutores totais; S<sub>cons</sub> - açúcares redutores totais consumidos em 96 horas; X<sub>max</sub> – máxima concentração de biomassa; t<sub>X,max</sub> – tempo em que ocorreu X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – máxima atividade de pectinases totais; t<sub>P,max</sub> – tempo em que ocorreu P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – fator de produção específica; Y<sub>P/S</sub> – fator de conversão de substrato em produto; Y<sub>X/S</sub> – fator de conversão de substrato em células; p - produtividade. **PG** – farelo de trigo, sais nutrientes, pectina e glicose; **M** – farelo de trigo, sais nutrientes e bagaço de maçã; **L** – farelo de trigo, sais nutrientes e bagaço de laranja; **T** – farelo de trigo, sais nutrientes e bagaço de tangerina; **UB** – farelo de trigo, sais nutrientes e bagaço de uva branca; **UR** – farelo de trigo, sais nutrientes e bagaço de uva roxa. Teor de umidade inicial médio: 65,13 ± 1,59%; Teor de umidade final médio: 74,02 ± 2,25%. Os resultados representam médias (n=3) ± desvio padrão. Letras diferentes (a-d) indicam diferenças significativas entre as médias (p < 0,05, teste de Tukey).

O consumo de substrato nos ensaios com bagaços foi semelhante, com valores de  $S_{\text{cons}}$  entre 221 e 277 mg/gms nos ensaios M, L, T, UB e UR. Maior consumo de substrato foi atingido em PG, cerca de 450 mg/gms, assim como o maior valor de  $X_{\text{max}}$ , de 194,3 mg/gms. Os valores de  $X_{\text{max}}$  atingidos nos ensaios M, L e T, entre 145 e 169 mg/gms, foram estatisticamente semelhantes e superiores aos obtidos nos ensaios UB e UR, cerca de 110 mg/gms. Além de não ter favorecido o crescimento celular, atividades enzimáticas inferiores foram obtidas com a utilização de bagaços de uva em relação às verificadas nas outras condições, com  $P_{\text{max}}$  de 16,4 U/gms em UB e de 24,3 U/gms em UR. Nos ensaios T e L foram determinados valores semelhantes de  $P_{\text{max}}$ , de 42,3 U/gms e 46 U/gms, respectivamente. Com a utilização de bagaço de maçã foi atingido  $P_{\text{max}}$  de 59,5 U/gms, semelhante ao obtido no cultivo PG (60,9 U/gms) e superior aos valores alcançados com o emprego dos outros bagaços.

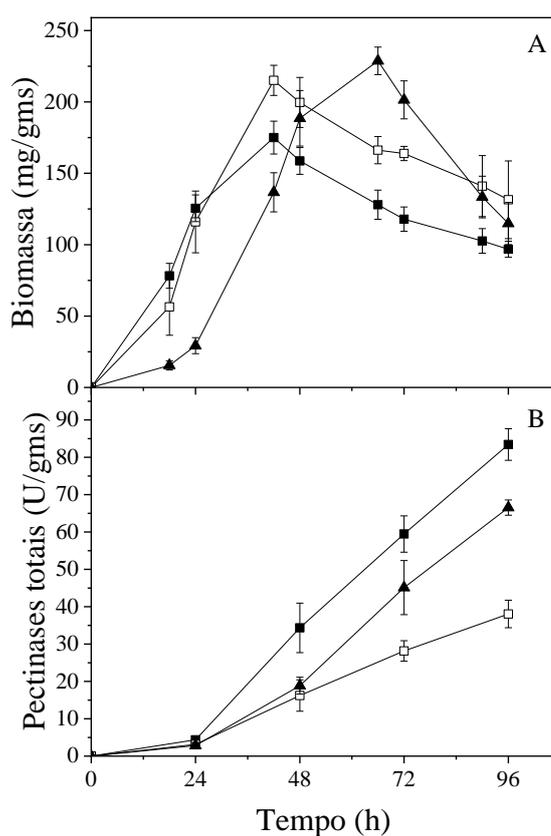
Na Tabela 2 também podem ser comparados os parâmetros de avaliação determinados nos cultivos com diferentes composições de meio. De forma geral, os resultados do ensaio M se destacam em relação aos demais, com obtenção de  $Y_{P/X}$  (0,37 U/mg) e  $Y_{P/S}$  (0,21 U/mg) superiores aos verificados no cultivo padrão, de 0,31 e 0,13 U/mg, respectivamente. Além disso, produtividade enzimática semelhante foi atingida nesses ensaios, em torno de 0,62 U/gms/h (Tabela 2).

A partir dessa avaliação inicial, pode-se concluir que o emprego de bagaço de maçã foi o que mais favoreceu a produção de pectinases por *A. niger* em CES, seguido pelos bagaços de tangerina e laranja. Dessa forma, na sequência do estudo, foram conduzidos em biorreator com a utilização de bagaço de maçã e bagaço de cítricos (mistura de laranja e tangerina). O meio empregado no cultivo M era composto de farelo de trigo (329,4 g), solução salina (550,8 mL) e bagaço de maçã (437,4 g). O meio utilizado no cultivo C era composto por farelo de trigo, solução de sais e uma mistura de bagaços de frutas cítricas laranja (218,7 g) e tangerina (218,7 g). Também foi conduzido em biorreator o cultivo PG, meio padrão. Na Figura 3 são mostrados os perfis cinéticos dos cultivos realizados em biorreator de tambor rotativo com diferentes indutores enzimáticos.

Foram observados perfis de concentração celular diferentes nos ensaios com bagaços de fruta em comparação ao controle, como pode ser verificado na Figura 3A. Nos ensaios M e C as concentrações de biomassa foram superiores nas primeiras horas de processo, atingindo os picos em 42 horas com posterior redução dos valores de biomassa até o final dos cultivos. Por outro lado, no ensaio PG foi verificado um perfil

de aumento da biomassa menos acentuado no início do processo, com pico atingido em 66 horas.

Na Figura 3B podem ser observados perfis de atividade enzimática semelhantes nas três condições avaliadas, com os picos atingidos em 96 horas. Valores de atividade de pectinases superiores aos observados no ensaio PG foram verificados no cultivo M a partir de 48 horas de ensaio. Por outro lado, no ensaio com bagaços de frutas cítricas, foram atingidos os menores valores de pectinases totais entre os meios testados.



**Figura 3** - Variação da concentração celular [A] e atividade de pectinases totais [B] em função do tempo de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF conduzidos em biorreator de tambor rotativo com meios de cultivo a base de farelo de trigo e diferentes fontes de carbono e indutor. (▲) PG: pectina cítrica comercial e glicose; (■) M: bagaço de maçã; (□) C: bagaço de frutas cítricas (laranja e tangerina).

Na Tabela 3 são mostrados os resultados gerais dos cultivos em biorreator de tambor rotativo com diferentes composições de meio de cultivo.

Em relação aos teores de umidade no início e no final dos ensaios, não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores determinados dos três diferentes cultivos (Tabela 3). Por outro lado, concentrações de ART iniciais foram estatisticamente diferentes, com maior valor observado no cultivo PG (676,3 mg/gms), seguido pelo

cultivo M (547,2 mg/gms) e C (436,9 mg/gms). O menor consumo de substrato foi verificado no cultivo C, com  $S_{\text{cons}}$  de apenas 202,1 mg/gms, enquanto nos ensaios PG e M os valores foram semelhantes e superiores a 300 mg/gms.

As concentrações celulares máximas foram atingidas em 42 horas nos cultivos com bagaços e em 66 horas no ensaio PG. O valor de  $X_{\text{max}}$  do cultivo M (175 mg/gms) foi inferior aos valores obtidos nos ensaios PG e C, em torno de 218 mg/gms. Por outro lado, a maior atividade de pectinases obtida, 83,4 U/gms, foi verificada em 96 horas do ensaio M. Os picos de atividade enzimática também foram observados em 96 horas em PG (66,8 U/gms) e em C (38,6 U/gms). Devido a maior atividade pectinolítica em M, maiores valores de  $Y_{P/X}$  (0,47 U/mg) e produtividade enzimática (0,87 U/gms/h) foram atingidos nesse ensaio. O maior valor de  $Y_{X/S}$  foi verificado no ensaio C (1,6 mg/mg) e os valores de  $Y_{P/S}$  foram estatisticamente semelhantes nas três condições, em torno de 0,2 U/mg (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resultados gerais obtidos em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de tambor rotativo, com diferentes fontes de carbono e indutor

	PG	M	C
$U_i$ (%)	54,39 ± 3,24 <sup>a</sup>	55,85 ± 4,06 <sup>a</sup>	62,23 ± 1,71 <sup>a</sup>
$U_f$ (%)	62,40 ± 2,77 <sup>b</sup>	70,18 ± 3,39 <sup>a</sup>	71,535 ± 1,063 <sup>a</sup>
$S_0$ (mg/gms)	676,33 ± 15,31 <sup>a</sup>	547,20 ± 21,6 <sup>b</sup>	436,90 ± 12,07 <sup>c</sup>
$S_{\text{cons}}$ (mg/gms)	303,6 ± 23,6 <sup>a</sup>	351,3 ± 28,4 <sup>a</sup>	202,1 ± 25,5 <sup>b</sup>
$X_{\text{max}}$ (mg/gms)	218,32 ± 11,72 <sup>a</sup>	175,00 ± 11,53 <sup>b</sup>	218,18 ± 12,90 <sup>a</sup>
$t_{X_{\text{max}}}$ (h)	66	42	42
$P_{\text{max}}$ (U/gms)	66,4 ± 1,91 <sup>b</sup>	83,42 ± 4,23 <sup>a</sup>	38,6 ± 5,05 <sup>c</sup>
$t_{P_{\text{max}}}$ (h)	96	96	96
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,3047 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,4708 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,1779 ± 0,03 <sup>c</sup>
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0,8323 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,9074 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,6083 ± 0,01 <sup>a</sup>
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,2191 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,2379 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,1941 ± 0,05 <sup>a</sup>
$p$ (U/gms/h)	0,6910 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,8690 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,4021 ± 0,05 <sup>c</sup>

$U_i$  – teor de umidade inicial;  $U_f$  – teor de umidade final;  $S_0$  – Concentração inicial de açúcares redutores totais;  $S_{\text{cons}}$  – açúcares redutores totais consumidos em 96 horas;  $X_{\text{max}}$  – máxima concentração de biomassa;  $t_{X_{\text{max}}}$  – tempo em que ocorreu  $X_{\text{max}}$ ;  $P_{\text{max}}$  – máxima atividade de pectinases totais;  $t_{P_{\text{max}}}$  – tempo em que ocorreu  $P_{\text{max}}$ ;  $Y_{P/X}$  – fator de produção específica;  $Y_{P/S}$  – fator de conversão de substrato em produto;  $Y_{X/S}$  – fator de conversão de substrato em células;  $p$  – produtividade. **PG** – farelo de trigo, sais nutrientes, pectina e glicose; **M** – farelo de trigo, sais nutrientes e bagaço de maçã; **C** – farelo de trigo, sais nutrientes e bagaço de frutas cítricas (laranja e tangerina). Os resultados representam médias (n=3) ± desvio padrão. Letras diferentes (a-c) indicam diferenças significativas entre as médias ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

#### 4 DISCUSSÃO

O emprego de subprodutos agroindustriais como componentes do meio de cultivo para a produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF foi avaliado em CES visando reduzir os custos de produção dessas enzimas sem redução da produtividade enzimática. Os bagaços de frutas utilizados foram obtidos de indústrias de sucos e utilizados após etapas de secagem e moagem. Em relação à produção de enzimas pectinolíticas, é dado destaque para o teor de pectina presente na matéria-prima, visto que, as pectinases são enzimas induzidas pela presença de substâncias pécticas no meio de cultivo (Alazi et al., 2016; Niu et al., 2017). Os teores de pectina verificados nos bagaços testados nesse trabalho (Tabela 1) estão de acordo com os valores relatados na literatura, que variam em uma ampla faixa que pode corresponder até mais de 30% da massa seca do material (Cui et al., 2021; Mao et al., 2019; Morales-Contreras et al., 2020; Ortiz et al., 2017). Essa variação pode estar relacionada a fatores como o tipo e forma de cultivo do fruto, a etapas de processamento industrial que foi submetido, as condições de armazenamento e os processos de secagem e moagem (Grohmann e Bothast, 1994). Além disso, os diferentes métodos de determinação dos teores de pectina podem influenciar o rendimento da extração, contribuindo para a variação dos valores relatados nos estudos (Cui et al., 2021; Mao et al., 2019; Nighojkar et al., 2019).

Na etapa inicial foram testadas diferentes combinações de meio de cultivo com o emprego de bagaços (Figura 1). As maiores atividades enzimáticas foram atingidas com meios isentos de glicose e compostos por mistura de farelo de trigo e cada tipo de bagaço (Meios MF, TF, LF, UBF e URF). Por outro lado, nos ensaios com com pectina comercial e farelo de trigo, maior atividade foi verificada com a presença de glicose no meio (Ensaio FPG). Nos meios compostos por bagaços, a alta concentração de substrato resultante da adição de glicose e do açúcar naturalmente presente nesses materiais pode ter causado um efeito de repressão catabólica e, com isso, menores atividades foram atingidas nos ensaios com glicose. A repressão da produção de pectinases relacionada ao aumento da concentração de glicose foi relatada para *A. niger* LB-02-SF em cultivos em CSm e em CES, utilizando pectina cítrica comercial como indutor (Reginatto et al., 2017; Sandri e Silveira, 2018).

As maiores atividades de pectinases foram obtidas com os meios compostos de mistura de farelo de trigo com bagaço de fruta em comparação aos meios formulados apenas com bagaços. O emprego de farelo de trigo como componente do meio de cultivo para produção de diferentes enzimas é comumente relatado na literatura (Demir e Tari,

2014). O farelo de trigo pode ser usado como substrato e fonte de nutrientes e, além disso, esse material também atua como suporte para o crescimento microbiano em CES (Stuedler et al., 2019; Teles et al., 2019). Essa matéria-prima é comumente utilizada para a produção de pectinases por fungos filamentosos, geralmente em combinação com outros substratos e fontes de indução, como resíduos de frutas ou pectina comercial (Abbasi et al., 2011; Ortiz et al., 2017; Poletto et al., 2017; Reginatto et al., 2022; Sandri e Silveira, 2018; Teles et al., 2019).

Considerando os ensaios em frascos com meios compostos por farelo e bagaços, atividades enzimáticas inferiores foram atingidas com a utilização de bagaços de uva (Figura 2). Esse fato pode estar relacionado aos teores de pectina inferiores verificados nos bagaços de uva branca e roxa (Tabela 1). Nos cultivos em frascos e em biorreator de tambor rotativo, atividades enzimáticas superiores foram obtidas com o emprego de bagaço de maçã em comparação aos bagaços de frutas cítricas (Figuras 2B e 3B). Diferente do observado por Ortiz et al. (2017) que, em CES de fungos do gênero *Aspergillus*, relataram maiores atividades enzimáticas com a utilização de cascas de laranja em comparação a utilização de bagaço de maçã como indutores da produção de pectinases em meios de cultivo baseados em farelo de trigo. Os autores relacionaram os resultados com teores de pectina inferiores que foram verificados nos bagaços de maçã (0,85% m/m) em relação aos resíduos de cascas de laranja (4,4% m/m). Satapathy et al. (2021) testaram diferentes subprodutos agroindustriais como substrato em cultivos de fermentação de superfície estática líquida de *Aspergillus parvisclerotigenus* visando a produção de pectinases. Foram observadas atividades enzimáticas superiores com o emprego de bagaço de maçã em comparação com a utilização de outros materiais, como casca de frutas cítricas, casca de banana, casca de café e bagaço de cana. Os autores atribuíram o resultado ao maior teor de pectina presente no bagaço de maçã e a presença de outros nutrientes como proteínas, carboidratos, minerais e polifenóis antioxidantes nessa matéria-prima.

No presente trabalho, como os teores de pectina foram estatisticamente semelhantes nos bagaços de maçã e cítricos (Tabela 1), sugere-se que a diferença entre os valores de atividade pectinolítica obtidos pode ter relação com a composição química dos diferentes subprodutos utilizados, como por exemplo, em relação aos teores de nitrogênio, de açúcares e a presença de diferentes polissacarídeos em cada tipo de bagaço. Na composição do bagaço de maçã, menor teor de nitrogênio foi determinado, sendo 85 e 90% inferior aos valores verificados nos bagaços de laranja e tangerina, respectivamente

(Tabela 1). Hours et al. (1988) e Joshi et al. (2006) relataram a necessidade de suplementação de nitrogênio em meios compostos por bagaços de maçã para obtenção de pectinases em CES por fungos do gênero *Aspergillus*. No presente estudo, no meio padrão, além do nitrogênio presente no farelo de trigo, também é adicionado sulfato de amônio (solução de sais) para suplementação desse nutriente. Nos meios compostos por bagaços também foi adicionado sulfato de amônio, entretanto, pela substituição de parte do farelo de trigo por bagaços, o teor de nitrogênio variou de acordo com o bagaço empregado.

Da mesma forma, maiores valores de  $S_0$  foram verificados no ensaio M em comparação aos valores observados nos ensaios com bagaços de frutas cítricas, nos ensaios em frascos e em biorreator (Tabelas 2 e 3). Essas variações de teores de nitrogênio e ART alteraram a relação C:N, fator que pode afetar o crescimento celular e a produção de pectinases (Demir et al., 2012; Ortiz et al., 2017; Taşkin e Eltem, 2008). No presente estudo, nos cultivos com bagaço de maçã, pela maior concentração de açúcares (Tabelas 2 e 3) e menor concentração de nitrogênio (Tabela 1), em comparação com os ensaios com frutas cítricas, o aumento da relação C:N pode ter favorecido a produção de pectinases no meio M, apesar da presença de quantidade semelhante de pectina nesses casos. Taşkin & Eltem (2008) testaram diferentes relações C:N em cultivos de *Aspergillus foetidus* para a produção de enzimas pectinolíticas em meio sólido composto de uma mistura entre farelo de trigo e polpa de beterraba. Foi observado aumento de mais de 50% da atividade de poligalacturonases com o aumento da relação C:N de 28:1 para 31:1, sendo também relatada a redução da produção das enzimas associada à diminuição dessa proporção até 10:1.

Esses resultados podem também estar relacionados com as características da pectina presente nesses materiais. Resultados diferentes em termos de atividade enzimática e de composição do complexo pectinolítico formado são relatados quando comparadas pectinas de fontes cítricas ou de maçã, independente se de fontes naturais ou a partir de reagentes comerciais (Cordeiro e Martins, 2009; Dartora et al., 2002; Jain et al., 1990). Dartora et al. (2002) testaram diferentes pectinas comerciais como indutores da formação de pectinases em CES de *A. niger* e relataram atividade superior de endopoligalacturonases com a utilização de pectina de maçã em comparação com pectina de origem cítrica. Os autores relacionaram os resultados obtidos com a variação das características estruturais das substâncias pécticas, uma vez que esses polissacarídeos são

constituídos de diferentes monômeros e podem apresentar variados tipos de ramificações e graus de esterificação.

Nos ensaios em biorreator de tambor rotativo, a utilização de bagaço de maçã também proporcionou atividade enzimática superior em comparação ao valor atingido com meio composto por pectina cítrica e glicose (Figura 3B e Tabela 3). Além da maior atividade pectinolítica, a substituição desses reagentes comerciais por bagaço de maçã pode reduzir o custo do meio de cultivo de produção de pectinases. Esse fato contribui para que a aplicação desse tipo de processo em escala industrial se torne vantajosa no aspecto econômico, uma vez que, segundo Jahan et al. (2017), o meio de cultivo pode ser corresponder a até 40% do custo total da produção dessas enzimas. Também é importante ressaltar que esses resultados foram atingidos com a utilização do material de forma integral que foi gerado na indústria, apenas passando por processos de secagem e moagem, sem qualquer etapa de lavagem ou outro pré-tratamento físico/químico. Esse fato também contribui para a redução dos custos operacionais e consumo de insumos e energia que podem encarecer o processo. Aliado a vantagem econômica, o uso desse material nesse tipo de bioprocessos, também está alinhado com as políticas públicas que tem como objetivo o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis com redução de resíduos (United Nations, 2015). Em função do processamento industrial de maçã são geradas em torno de 4 milhões de toneladas de bagaço de maçã por ano no mundo, sendo que a maior parte desse material é descartado em aterros sanitários (Costa et al., 2022; Gołebiewska et al., 2022). Assim, o emprego desse subproduto na produção industrial de pectinases é uma das formas de agregar valor a esse material e contribuir para reduzir os problemas ambientais relacionados à sua disposição.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam a possibilidade de utilização de subprodutos gerados no processamento industrial de sucos como indutores da produção de pectinases em CES de *A. niger* LB-02-SF em frascos e em biorreator de tambor rotativo. É dado destaque para o bagaço de maçã, que pode ser uma alternativa de baixo custo para a substituição de reagentes comerciais na composição do meio de cultivo sólido, principalmente visando a aplicação industrial desse processo.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

(FAPERGS) e a Universidade de Caxias do Sul (UCS) pelo apoio financeiro para este trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Abbasi, H., Mortazavipoor, S.R., Setudeh, M., 2011. Polygalacturonase (PG) production by fungal strains using agro-industrial bioproduct in solid state fermentation. *Chem. Eng. Res. Bull.* 15, 1–5.
- Alazi, E., Niu, J., Kowalczyk, J.E., Peng, M., Aguilar Pontes, M.V., van Kan, J.A.L., Visser, J., de Vries, R.P., Ram, A.F.J., 2016. The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of d-galacturonic acid from pectin. *FEBS Lett.* 590, 1804–1815. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12211>
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M., 2019. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., 2009. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29, 135–141. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612009000100021>
- Costa, J.M., Ampese, L.C., Domenico, H. Di, Sganzerla, W.G., Foster-Carneiro, T., 2022. Apple pomace biorefinery: Integrated approaches for the production of bioenergy, biochemicals, and value-added products – An updated review. *J. Environ. Chem. Eng.* 10, 108358.
- Cui, J., Zhao, C., Feng, L., Han, Y., Du, H., Xiao, H., 2021. Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* 110, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.077>
- Dartora, A.B., Bertolin, T.E., Bilibio, D., Silveira, M.M., Costa, J.A.V., 2002. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endopolygalacturonase by solid state fermentation. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 57, 666–670. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-7-820>
- Delgove, M.A.F., Laurent, A.B., Woodley, J.M., De Wildeman, S.M.A., Bernaerts, K. V., van der Meer, Y., 2019. A Prospective Life Cycle Assessment (LCA) of Monomer Synthesis: Comparison of Biocatalytic and Oxidative Chemistry. *ChemSusChem* 12, 1349–1360. <https://doi.org/10.1002/cssc.201900007>

- Demir, H., Nihan, G., Tari, C., Heerd, D., Lahore, M.F., 2012. Optimization of the process parameters for the utilization of orange peel to produce polygalacturonase by solid-state fermentation from an *Aspergillus sojae* mutant strain. *Turk. J. Biol.* 36, 394–404. <https://doi.org/10.3906/biy-1104-23>
- Demir, H., Tari, C., 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Ind. Crops Prod.* 54, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.025>
- Dhillon, S.S., Gill, R.K., Gill, S.S., Singh, M., 2007. Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*. *Int. J. Environ. Stud.* 61, 199–210. <https://doi.org/10.1080/0020723032000143346>
- Díaz, A.B., De Ory, I., Caro, I., Blandino, A., 2012. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food Bioprod. Process.* 90, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.12.003>
- FAO - Food and Agricultural Organization of the Nations. (2020). Percentage of food loss by region. Disponível (online) <https://www.fao.org/sustainable-development-goals/indicators/1231/en/> (acesso em 10/08/2022).
- Fontana, R.C., 2004. Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Fontana, R.C., Salvador, S., Da Silveira, M.M., 2005. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 371–377. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0004-0>
- Gołebiewska, E., Kalinowska, M., Yildiz, G., 2022. Sustainable use of apple pomace (AP) in different industrial sectors. *Materials* 15, 1788.
- Grohmann, K., Bothast, R.J., 1994. Pectin-Rich Residues Generated by Processing of Citrus Fruits, Apples, and Sugar Beets, in: Overend, R.P., Baker, J.O., Himmel, M.E. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, pp. 372–390. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0566.ch019>
- Heerd, D., Yegin, S., Tari, C., Fernandez-Lahore, M., 2012. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: A comparative study. *Food Bioprod. Process.* 90, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.08.003>

- Hours, R.A., Voget, C.E., Ertola, R.J., 1988. Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biol. Wastes* 23, 221–228. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(88\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0269-7483(88)90036-5)
- ISO1871:2009, 2009. Food and feed products - General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method, International Organization for Standardization.
- Jahan, N., Shahid, F., Aman, A., Mujahid, T.Y., Qader, S.A.U., 2017. Utilization of agro waste pectin for the production of industrially important polygalacturonase. *Heliyon* 3, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00330>
- Jain, S., Durand, H., Tiraby, G., 1990. Production of extracellular pectinase enzymes by a mutant (Pol6) of *Penicillium occitanis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 308–312. <https://doi.org/10.1007/BF00170048>
- Joshi, V.K., Parmar, M., Rana, N.S., 2006. Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 253–256.
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A.K., Singhania, R.R., 2021. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresour. Technol.* 323, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- Londoño-Hernandez, L., Ruiz, H.A., Toro, C.R., Ascacio-Valdes, A., Rodriguez-Herrera, R., Aguilera-Carbo, A., Tubio, G., Pico, G., Prado-Barragan, A., Gutierrez-Sanchez, G., Aguilar, C.N., 2020. Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes, in: Arora, N.K., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries. Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore, pp. 87–113. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- Mahmoodi, M., Najafpour, G.D., Mohammadi, M., 2019. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101280>
- Maiorano, A.E., 1990. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

- Maldonado, M.C., Strasser de Saad, A.M., 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 20, 34–38. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900470>
- Maller, A., Damásio, A.R.L., Silva, T.M. da, Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M. de L.T. de M., 2011. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. Enzyme Res. 2011, 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/289206>
- Malvessi, E., Silveira, M.M. da, 2004. Influence of medium composition and ph on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Braz. Arch. Biol. Technol. 47, 693–702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500004>
- Mao, G., Wu, D., Wei, C., Tao, W., Ye, X., Linhardt, R.J., Or, C., Chen, S., 2019. Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste : Targeting rhamnogalacturonan I. Trends Food Sci. Technol. 94, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.001>
- Marzo, C., Díaz, A.B., Caro, I., Blandino, A., 2019. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. Waste Manag. Res. 37, 149–156. <https://doi.org/10.1177/0734242X18798699>
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Morales-Contreras, B.E., Wicker, L., Rosas-Flores, W., Contreras-Esquivel, J.C., Gallegos-Infante, J.A., Reyes-Jaquez, D., Morales-Castro, J., 2020. Apple pomace from variety “Blanca de Asturias” as sustainable source of pectin: Composition, rheological, and thermal properties. LWT - Food Sci. Technol. 117, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108641>
- Nighojkar, A., Patidar, M.K., Nighojkar, S., 2019. Pectinases: Production and applications for fruit juice beverages, in: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), Processing and Sustainability of Beverages. Woodhead Publishing, pp. 235–273.
- Niu, J., Alazi, E., Reid, I.D., Arentshorst, M., Punt, P.J., Visser, J., Tsang, A., Ram, A.F.J., 2017. An evolutionarily conserved transcriptional activator-repressor module controls expression of genes for D-Galacturonic acid utilization in *Aspergillus niger*. Genetics 205, 169–183. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.194050>

- Niyonzima, F.N., Veena, S.M., More, S.S., 2020. Industrial Production and Optimization of Microbial Enzymes, in: Arora, N.K., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries. Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore, pp. 115–135. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- Ortiz, G.E., Ponce-Mora, M.C., Nosedá, D.G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M.C., Gil, G.P., Blasco, M., Albertó, E.O., 2017. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44, 197–211. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>
- Parfitt, J., Croker, T., Brockhaus, A., 2021. Global Food Loss and Waste in Primary Production : A Reassessment of Its Scale and Significance. *Sustainability* 13, 12087.
- Patel, A.K., Singhania, R.R., Pandey, A., 2017. Production , Purification , and Application of Microbial Enzymes, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press, pp. 13–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>
- Patel, V.B., Chatterjee, S., Dhoble, A.S., 2022. A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support. *J. Food Sci.* 87, 3338–3354. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16233>
- Pessôa, M.G., Vespermann, K.A.C., Paulino, B.N., Barcelos, M.C.S., 2019. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 37, 319–339. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.007>
- Poletto, P., Polidoro, T.A., Zeni, M., Silveira, M.M. da, 2017. Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. *LWT - Food Sci. Technol.* 79, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018>
- Polidoro, T.A., Silveira, M.M., Gelain, L., 2009. Dispositivo de Tambor Rotativo. Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, MU8901075-2.
- Reginato, C., Posso dos Santos, G., Costa Ramos, K., Borges Folle, A., Campos de Souza, B., Souza, D., Meneghel, L., Carra, S., Polidoro, T.A., Moura da Silveira, M., Valduga, E., Malvessi, E., 2022. Inoculation conditions improved the pectinase productivity in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivation.

- Biocatal. Agric. Biotechnol. 42, 102354. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102354>
- Reginato, C., Rossi, C., Miglioranza, B.G., Santos, M., Meneghel, L., Moura, M., Malvessi, E., 2017. Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochem.* 58, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.018>
- Ruiz, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J.C., Aguilar, C.N., 2012. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 65, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.007>
- Sadh, P.K., Duhan, S., Duhan, J.S., 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Sandri, I.G., Lorenzoni, C.M.T., Fontana, R.C., da Silveira, M.M., 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 51, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.015>
- Sandri, I.G., Silveira, M.M. da, 2018. Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Satapathy, S., Soren, J.P., Mondal, K.C., Pradhan, C., Sahoo, S.L., Thatoi, H., 2021. Industrially relevant pectinase production from *Aspergillus parvisclerotigenus* KX928754 using apple pomace as the promising substrate. *J. Taibah Univ. Sci.* 15, 347–356. <https://doi.org/10.1080/16583655.2021.1978833>
- Sharma, P., Gaur, V.K., Kim, S., Pandey, A., 2020. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. *Bioresour. Technol.* 299, 122580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122580>
- Singh, R.S., Singh, T., Pandey, A., 2019. Microbial Enzymes-An Overview, in: Singh, R.S., Singhanian, R.R., Pandey, A., Christian Larroche (Eds.), *Biomass, Biofuels, Biochemicals. Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V., pp. 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7>

- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Ash in Biomass, National Renewable Energy Laboratory - Technical Report NREL/TP-510-42622.
- Stuedler, S., Werner, A., Walther, T., 2019. It Is the Mix that Matters : Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 169, 51–81. [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_85](https://doi.org/10.1007/10_2019_85)
- Taşkın, E., Eltem, R., 2008. The enhancement of polygalacturonase and polymethylgalacturonase production on solid-state conditions by *Aspergillus foetidus*. *Food Biotechnol.* 22, 203–217. <https://doi.org/10.1080/08905430802262533>
- Teles, A.S.C., Chávez, D.W.H., Oliveira, R.A., Bon, E.P.S., Terzi, S.C., Souza, E.F., Gottschalk, L.M.F., Tonon, R. V, 2019. Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Res. Int.* 120, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.083>
- Thapa, S., Li, H., Ohair, J., Bhatti, S., Chi, F., Kamal, C., Nasr, A., Johnson, T., 2019. Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Mol. Biotechnol.* 61, 579–601. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>
- UNEP - United Nations Environment Programme. (2021). Food Waste Index Report 2021. Disponível (online) <https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021> (acesso em 19/06/2022).
- United Nations. (2015). Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Disponível (online) <https://sdgs.un.org/2030agenda> (acesso em 19/06/2022).
- Yafetto, L., 2022. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020 : A review and bibliometric analysis. *Heliyon* 8, e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- Zabriskie, D.W., Humphrey, A.E., 1978. Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing. *AIChE J.* 24, 138–146. <https://doi.org/10.1002/aic.690240116>
- Zanella, K., Taranto, O.P., 2015. Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from “pera” sweet

orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *J. Food Eng.* 166, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.033>

## 5 DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foram testadas diferentes condições de processo que influenciaram o crescimento de *A. niger* LB-02-SF e a produção de pectinases em cultivos em estado sólido. Em todas as etapas do estudo foram definidas condições que proporcionaram aumento da atividade de pectinases e/ou da produtividade enzimática.

Os resultados atingidos em cada nova estratégia avaliada foram comparados com os resultados obtidos em cultivos conduzidos nas condições definidas anteriormente em trabalhos do grupo de pesquisa. Podem ser observadas diferenças nos valores de atividade de pectinases totais se comparados os resultados atingidos na condição padrão do presente estudo com resultados de trabalhos anteriores do grupo. Esse fato pode estar relacionado à variação dos componentes do meio de cultivo, como a pectina cítrica comercial e o farelo de trigo. Foram realizados testes comparativos com a pectina cítrica utilizada neste trabalho e a utilizada em trabalhos anteriores (dados não mostrados), em que foi observado que o tipo e a fonte de pectina podem influenciar os resultados de produção de pectinases quando empregada no meio de cultivo e também como substrato no método de análise de determinação da atividade enzimática. Dessa forma, optou-se por comparar os resultados alcançados em cada etapa deste trabalho apenas com os valores de atividade atingidos nos ensaios padrão também conduzidos neste trabalho.

A avaliação do tipo e tamanho de inóculo mostrou que esse parâmetro exerce influência sobre a cinética do processo de obtenção de pectinases em CES. A redução da concentração de esporos de  $7 \times 10^7$  esporos/100gmu para  $7 \times 10^4$  esporos/100gmu proporcionou aumento da atividade enzimática, sem alteração do tempo de processo. Com o emprego de inóculo vegetativo sólido foi observada redução de 24 horas do tempo de processo e obtenção de atividade enzimática semelhante ao valor atingido na condição padrão. Ao testar a inoculação a partir de cultura vegetativa líquida foi verificada a maior atividade de pectinases entre todos os ensaios realizados neste trabalho, sem redução no tempo de obtenção do pico. As estratégias de inoculação definidas nessa etapa do estudo, além de terem proporcionado aumento da produtividade enzimática, são alternativas que podem reduzir os problemas relacionados à dificuldade de preparo do inóculo de fungos filamentosos em escala industrial.

A variação do tamanho das partículas de farelo de trigo e da massa de meio utilizada foi responsável pela variação no volume de ocupação do biorreator de tambor rotativo. Essas mudanças proporcionaram a obtenção de diferentes resultados em termos de

crescimento celular e atividade enzimática. Maior atividade de pectinases totais foi atingida com maior tamanho de partículas. Esse resultado pode estar relacionado com possível menor compactação do meio, que pode ter favorecido o crescimento celular entre as partículas do suporte sólido. Além disso, nos ensaios com menores partículas, as maiores concentrações de substrato no meio podem ter causado um efeito de repressão catabólica. Entre os ensaios com partículas maiores, foi obtida maior atividade enzimática com a utilização de maior massa de meio, resultando em volume de ocupação em torno de 62%, o maior entre os testados. Esse resultado pode estar relacionado ao estresse resultante das condições de mistura e transferência de oxigênio menos favoráveis identificadas em cultivos com maior volume de ocupação do biorreator de tambor rotativo. As diferentes estratégias de agitação intermitente do biorreator também influenciaram o crescimento celular e a produção das enzimas por *A. niger* LB-02-SF. Foram atingidos os melhores resultados em termos de produtividade enzimática no ensaio com agitação de 1 rpm por 5 minutos a cada duas horas realizada apenas nas primeiras 24 horas de processo. Nesse caso, além da obtenção de maior valor de atividade enzimática, o tempo de cultivo foi reduzido. Aliado a isso, essa estratégia de agitação pode ser uma alternativa para reduzir o consumo de energia durante o processo, uma vez que o biorreator é mantido estático durante a maior parte do tempo.

Os meios de cultivo compostos por subprodutos do processamento industrial de sucos foram testados em cultivos em frascos e biorreator de tambor rotativo. Em todos os casos foi verificada a capacidade de indução da produção de pectinases, com destaque para a utilização de bagaço de maçã. Em cultivo em biorreator de tambor rotativo com meio composto por mistura de bagaço de maçã, farelo de trigo e solução de sais nutrientes, foi atingida atividade de pectinases totais superior em comparação ao meio padrão. Esse resultado indica a possibilidade de substituição de reagentes comerciais, como pectina e glicose, por esse subproduto de menor custo. Dessa forma, pode ser reduzido o custo do meio de cultivo para a produção de enzimas pectinolíticas, contribuindo para que a aplicação desse processo seja economicamente viável em uma aplicação em escala industrial. Além disso, é uma forma de agregar valor a esse subproduto gerado em grande quantidade em indústrias de alimentos e reduzir os problemas ambientais causados pela disposição desse material.

## 6 CONCLUSÕES

O processo de obtenção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF foi avaliado em CES conduzidos em frascos e em biorreator de tambor rotativo em escala de bancada, sendo identificada a influência da variação dos fatores testados sobre o crescimento celular e a produção das enzimas.

A partir dos resultados obtidos, pode ser concluído que:

- As condições de inóculo exercem forte influência no processo de obtenção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em cultivos conduzidos em frascos e em biorreator de tambor rotativo em escala de bancada. As três condições de inóculo de *A. niger* definidas nos ensaios em biorreator de tambor rotativo - suspensão de esporos ( $7 \times 10^4$  esporos/100gmu), inóculo vegetativo sólido (100 gmu) e líquido (10% v/m) - proporcionaram aumento da produtividade em pectinases em comparação à estratégia de inoculação padrão.

- No ensaio com a utilização de partículas de farelo de trigo de maior tamanho (1,0 - 2,8 mm) e com o emprego de maior massa de meio úmido (1800 g), resultando em volume de ocupação do biorreator de tambor rotativo em torno de 62%, foi atingido o maior título de pectinases entre as condições avaliadas nessa etapa do estudo.

- Entre as estratégias de agitação intermitente avaliadas, a manutenção do biorreator de tambor rotativo estático nas 24 horas iniciais de cultivo favoreceu o crescimento celular. Por outro lado, foi verificada a maior atividade enzimática no ensaio com agitação (1 rpm por 5 minutos a cada 120 minutos) apenas nas primeiras 24 horas de processo. Além disso, nesse ensaio, o tempo de obtenção do pico de atividade enzimática foi inferior em comparação ao verificado na condição de agitação padrão, proporcionando aumento da produtividade enzimática.

- Os subprodutos da produção industrial de sucos testados em ensaios em frascos atuaram como indutores da produção de pectinases por *A. niger*. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas em meios compostos por farelo de trigo, solução de sais nutrientes e o respectivo bagaço. Entre as condições avaliadas, o emprego de bagaço de maçã favoreceu a produção de pectinases nos ensaios em frascos, com resultados de atividade enzimática superiores em comparação à utilização de bagaços de laranja, tangerina, uva branca e roxa. Da mesma forma, nos ensaios em biorreator, o emprego de meio com bagaço de maçã proporcionou a obtenção de atividade pectinolítica superior ao meio padrão, composto por farelo de trigo, pectina, glicose e sais. Os resultados indicam

a possibilidade de substituição de glicose e pectina comerciais por bagaço de maçã seco e moído para a produção de pectinases em CES.

## **7 PERSPECTIVAS**

Como perspectivas para a continuidade deste trabalho, sugere-se, primeiramente, avaliação dos efeitos da combinação das condições definidas em cada etapa do estudo sobre a cinética do processo de obtenção de pectinases.

Em relação à etapa de inoculação, podem ainda ser testados outros tempos e meios para crescimento do inóculo vegetativo líquido, assim como outras proporções de inoculação, visando à diminuição do tempo de processo sem redução da atividade enzimática.

Da mesma forma, outros tempos de agitação intermitente podem ser testados em combinação com variações da aeração ao longo do cultivo.

A utilização de bagaço de maçã pode ser avaliada sem que esse material seja submetido a processos de secagem e moagem, buscando a redução de etapas que podem encarecer o processo.

Além disso, podem ser testadas variações da concentração dos componentes da solução de sais nutrientes e avaliada a produção de outros tipos de enzimas que possam ser induzidas em meios compostos por bagaço de maçã.

Por fim, revela-se importante que seja realizada uma avaliação técnico-econômica para verificar a possibilidade de redução do custo de obtenção de pectinases nas condições definidas neste trabalho.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, H., Mortazavipoor, S.R., Setudeh, M., 2011. Polygalacturonase (PG) production by fungal strains using agro-industrial bioproduct in solid state fermentation. *Chem. Eng. Res. Bull.* 15, 1–5.
- Abdullah, R., Farooq, I., Kaleem, A., Iqtedar, M., Iftikhar, T., 2018. Pectinase production from *Aspergillus niger* IBT-7 using solid state fermentation. *Bangladesh J. Bot.* 47, 473–478. <https://doi.org/10.3329/bjb.v47i3.38714>
- Abitrigo - Associação Brasileira da Indústria do Trigo, 2020. Estimativa de moagem de trigo no Brasil. Disponível (online) <http://www.abitrigo.com.br/wp-content/uploads/2020/05/2-ABITRIGO-MOAGEM-2019.pdf> (acesso em 28/08/2020).
- Adeleke, A.J., Odunfa, S.A., Olanbiwonninu, A., Mojisola, C.O., 2012. Production of cellulase and pectinase from orange peels by fungi. *Nat. Scie.* 10, 107–112.
- Ahmed, I., Zia, M.A., Hussain, M.A., Akram, Z., Naveed, M.T., Nowrouzi, A., 2016. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 9, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>
- Ahmed, J., Thakur, A., Goyal, A., 2021. Emerging trends on the role of recombinant pectinolytic enzymes in industries- an overview. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 38, 102200. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102200>
- Alam, M.Z., Bari, M.N., Muyibi, S.A., Jamal, P., Al-Mamun, A., 2011. Development of culture inoculum for scale-up production of citric acid from oil palm empty fruit bunches by *Aspergillus niger*. *Procedia Environ. Sci.* 8, 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.062>
- Alazi, E., Niu, J., Kowalczyk, J.E., Peng, M., Aguilar Pontes, M.V., van Kan, J.A.L., Visser, J., de Vries, R.P., Ram, A.F.J., 2016. The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of d-galacturonic acid from pectin. *FEBS Lett.* 590, 1804–1815. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12211>
- Ali, S., Asad-ur-Rehman, Ehsan, A., Ikram-ul-Haq, Iqbal, J., 2003. Effect of vegetative inoculum on submerged citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Pak. J. Biol. Sci.* 6, 334–335.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L., 1998. Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochem.* 33, 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(97\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(97)00046-0)
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M., 2019. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>

- Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Chaulagain, B.P., LakshmiPriya, T., 2017. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. *Hindawi - Biomed Res. Int.* 2017, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2017/2195808>
- Anvari, M., Khayati, G., 2014. The effect of citrus pulp type on pectinase production in solid-state fermentation: Process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *J. Biosci. Biotechnol.* 3, 227–233.
- Arntz, M.M.H.D., Otter, W.K. den, Briels, W.J., Bussmann, P.J.T., Beeftink, H.H., Boom, R.M., 2008. granular mixing and segregation in a horizontal rotating drum: A simulation study on the impact of rotational speed and fill level. *AIChE J.* 54, 3133–3146. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Arora, S., Dubey, M., Singh, P., Rani, R., Ghosh, S., 2017. Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. *Process Biochem.* 61, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.009>
- Arora, S., Rani, R., Ghosh, S., 2018. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 269, 16–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>
- Ashok, A., Doriya, K., Rao, D.R.M., Kumar, D.S., 2017. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>
- Assamoi, A.A., Delvigne, F., Aldric, J.-M., Destain, J., Thonart, P., 2008. Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12, 111–118. <https://doi.org/10.1385/ABAB:108:1-3:737>
- Ayala-Zavala, J.F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., González-Aguilar, G.A., 2010. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: Looking for integral exploitation. *J. Food Sci.* 75, 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x>
- Barman, S., Sit, N., Badwaik, L.S., Deka, S.C., 2014. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *J. Food Sci. Technol.* 52, 3579–3589. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1413-8>
- BCC Research (2021). Global markets for enzymes in industrial applications. Disponível (online) <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html> (acesso em 10/08/2022).
- Berovič, M., Ostroveršnik, H., 1997. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *J. Biotechnol.* 53, 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(96\)01661-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(96)01661-6)

- Bezawada, P., Raju, K.J., 2018. Screening of pectinolytic fungi and optimization of process parameters using guava peel powder as substrate under solid state fermentation. *Int. J. Eng. Sci.* 7, 43–47.
- Bianchi, V.L.D., Moraes, I.O., Capalbo, D.M.F., 2001. Fermentação em estado sólido, in: Schmidell, W.; Lima, V.A., Aquarone, E.; Borzani, W. (Eds.), *Biotecnologia Industrial*. Edgard Blucher Ltda., São Paulo, pp. 247–276.
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S., Cantero, D., Webb, C., 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 164–169. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0893-4>
- Bon, E.P.S., Costa, R.B., Silva, M.V.A., Ferreira-Leitão, V.S., Freitas, S.P., Ferrara, M.A., 2008. Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil., in: Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L. (Eds.), *Enzimas Em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio. Interciência, Rio de Janeiro, pp. 463–488.
- Boratyński, F., Szczepańska, E., Grudniewska, A., Gniłka, R., Olejniczak, T., 2018. Improving of hydrolases biosynthesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. *Sci. Rep.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28412-y>
- Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A., 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.* 26, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.020>
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente - MMA Publicações. (2012). Plano Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível (online) [https://www.slu.df.gov.br/wp-content/uploads/2017/12/plano\\_nacional\\_residuos\\_solidos.pdf](https://www.slu.df.gov.br/wp-content/uploads/2017/12/plano_nacional_residuos_solidos.pdf) (acesso em 14/02/2021).
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. (2014). Resolução RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014. Disponível (online) [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0053\\_07\\_10\\_2014.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0053_07_10_2014.pdf) (acesso em 10/06/2020).
- Brasil. Diário Oficial da União. (2010). Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível (online) [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato\\_2007-2010/2010/lei/112305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato_2007-2010/2010/lei/112305.htm) (acesso em 14/02/2021).
- Castro, A.M. de, López, J.A., dos Reis Castilho, L., Freire, D.M.G., 2014. Techno-economic analysis of a bioprocess for the production of multienzyme solutions from the cake of babassu industrial processing: Evaluation of five different inoculum propagation strategies. *Biomass Convers. Biorefinery* 4, 237–247. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0106-2>
- Castro, A.M. de, Teixeira, M.M.P., Carvalho, D.F., Freire, D.M.G., Castilho, L.D.R., 2011. Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. *Enzyme Res.* 2011, 1–9. <https://doi.org/10.4061/2011/457392>

- Chan, S.Y., Choo, W.S., Young, D.J., Loh, X.J., 2017. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydr. Polym.* 161, 118–139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>
- Chilakamarry, C.R., Mimi Sakinah, A.M., Zularisam, A.W., Sirohi, R., Khilji, I.A., Ahmad, N., Pandey, A., 2022. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresour. Technol.* 343, 126065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>
- CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2022. PIB do Agronegócio cresceu abaixo das projeções. Disponível (online) <https://cnabrasil.org.br/publicacoes/pib-do-agronegocio-cresceu-abaixo-das-projecoes> (acesso em 07/07/2022).
- Colla, E., Santos, L.O., Deamici, K., Magagnin, G., Vendruscolo, M., Costa, J.A.V., 2017. Simultaneous production of amyloglucosidase and exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* in a rotating drum reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 627–637. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2237-y>
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., 2009. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29, 135–141. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612009000100021>
- Costa, J.M., Ampese, L.C., Domenico, H. Di, Sganzerla, W.G., Foster-Carneiro, T., 2022. Apple pomace biorefinery: Integrated approaches for the production of bioenergy, biochemicals, and value-added products – An updated review. *J. Environ. Chem. Eng.* 10, 108358.
- Couto, S.R., Sanromán, M.Á., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *J. Food Eng.* 76, 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.05.022>
- Cui, J., Zhao, C., Feng, L., Han, Y., Du, H., Xiao, H., 2021. Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties. *Trends Food Sci. Technol.* 110, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.077>
- Dartora, A.B., Bertolin, T.E., Bilibio, D., Silveira, M.M., Costa, J.A.V., 2002. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endo-polygalacturonase by solid state fermentation. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 57, 666–670. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-7-820>
- de Reu, J.C., Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Nout, M.J.R., 1993. Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 261–265. <https://doi.org/10.1007/BF00170377>
- Delgove, M.A.F., Laurent, A.B., Woodley, J.M., De Wildeman, S.M.A., Bernaerts, K. V., van der Meer, Y., 2019. A Prospective Life Cycle Assessment (LCA) of Monomer Synthesis: Comparison of Biocatalytic and Oxidative Chemistry. *ChemSusChem* 12, 1349–1360. <https://doi.org/10.1002/cssc.201900007>

- Demir, H., Nihan, G., Tari, C., Heerd, D., Lahore, M.F., 2012. Optimization of the process parameters for the utilization of orange peel to produce polygalacturonase by solid-state fermentation from an *Aspergillus sojae* mutant strain. *Turk. J. Biol.* 36, 394–404. <https://doi.org/10.3906/biy-1104-23>
- Demir, H., Tari, C., 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Ind. Crops Prod.* 54, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.025>
- Dhillon, S.S., Gill, R.K., Gill, S.S., Singh, M., 2007. Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*. *Int. J. Environ. Stud.* 61, 199–210. <https://doi.org/10.1080/0020723032000143346>
- Díaz, A.B., De Ory, I., Caro, I., Blandino, A., 2012. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food Bioprod. Process.* 90, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.12.003>
- Díaz, A.B., De Ory, I., Caro, I., Blandino, A., 2009. Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. *Chem. Eng. Trans.* 17, 1041–1046. <https://doi.org/10.3303/CET0917174>
- Dobrev, G.T., Pishtiyski, I.G., Stanchev, V.S., Mircheva, R., 2007. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresour. Technol.* 98, 2671–2678. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.022>
- Doriya, K., Kumar, D.S., 2018. Solid state fermentation of mixed substrate for L-asparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 138, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.024>
- Ezeilo, U.R., Lee, C.T., Huyop, F., Zakaria, I.I., Wahab, R.A., 2019. Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. *J. Environ. Manage.* 243, 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.113>
- FAO - Food and Agricultural Organization of the Nations. (2020). Percentage of food loss by region. Disponível (online) <https://www.fao.org/sustainable-development-goals/indicators/1231/en/> (acesso em 10/08/2022).
- Farinas, C.S., 2015. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 52, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>
- Favela-torres, E., Volke-sepúlveda, T., Viniegra-gonzález, G., 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Sci. Biotechnol.* 44, 221–227.

- Fawole, O.B., Odunfa, S.A., 2003. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 223–227.  
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00094-5)
- Fernandes, P., Carvalho, F., 2017. Microbial Enzymes for the Food Industry, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press, pp. 513–544.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00019-4>
- Finkler, A.T.J., Biz, A., Pitol, L.O., Medina, B.S., Luithardt, H., Luz, L.F. de L., Krieger, N., Mitchell, D.A., 2017. Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 121, 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.01.011>
- Fontana, R.C., 2004. Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Fontana, R.C., Salvador, S., Da Silveira, M.M., 2005. Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 371–377. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0004-0>
- Fung, C.J., Mitchell, D.A., 1995. Baffles increase performance of solid-state fermentation in rotating drum bioreactors. *Biotechnol. Tech.* 9, 295–298.
- Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., Mahajan, R., 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech* 6, 1–13.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0371-4>
- Gasiorek, E., 2008. Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. *Chem. Pap.* 62, 141–146. <https://doi.org/10.2478/s11696-008-0003-5>
- Gassara, F., Ajila, C.M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Verma, M., Valero, J., 2013. Influence of aeration and agitation modes on solid-state fermentation of apple pomace waste by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols. *Int. J. Food Sci.* 48, 2119–2126. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12194>
- Ge, X., Vasco-Correa, J., Li, Y., 2017. Solid-State Fermentation Bioreactors and Fundamentals, in: Larroche, C.; Sanroman, M. A.; Du, G.; Pandey, A. (Eds.). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*, Elsevier, pp. 381–402. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00013-6>
- Gervais, P., Molin, P., 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 13, 85–101. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00122-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00122-5)
- Gołebiewska, E., Kalinowska, M., Yildiz, G., 2022. Sustainable use of apple pomace (AP) in different industrial sectors. *Materials* 15, 1788.

- Gomes, E., da Silva, R., de Cassia Pereira, J., Ladino-Orjuela, G., 2018. Fungal Growth on Solid Substrates, in: Ashok Pandey, Christian Larroche, C.R.S. (Eds.), Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier B.V., pp. 31–56. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00003-7>
- Grohmann, K., Bothast, R.J., 1994. Pectin-Rich Residues Generated by Processing of Citrus Fruits, Apples, and Sugar Beets, in: Overend, R.P., Baker, J.O., Himmel, M.E. (Eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. American Chemical Society, Washington, pp. 372–390. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0566.ch019>
- Guan, X., Zhou, Z., Li, J., Li, S., 2020. Establishment and verification of a model for the movement of pulverized sweet sorghum stalks in a rotary drum bioreactor by discrete element method. *Particuology* 51, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2019.09.002>
- Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., 2007. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 313–318. <https://doi.org/10.1002/jctb>
- Güzel, M., Akpınar, Ö., 2019. Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. *Food Bioprod. Process.* 115, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.03.009>
- Handa, S., Sharma, N., Pathania, S., 2016. Multiple parameter optimization for maximization of pectinase production by *Rhizopus* sp. C4 under solid state fermentation. *Fermentation* 2, 10. <https://doi.org/10.3390/fermentation2020010>
- Hang, Y.D., Woodams, E.E., 1994. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. *LWT - Food Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1006/fstl.1994.1038>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Scheller, H.V., 2010. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* 153, 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Heerd, D., Yegin, S., Tari, C., Fernandez-Lahore, M., 2012. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: A comparative study. *Food Bioprod. Process.* 90, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.08.003>
- Hendges, D.H., Montanari, Q., Malvessi, E., Silveira, M.M. da, 2011. Production and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid-state fermentation in double-surface bioreactor. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, 253–258.
- Hölker, U., Lenz, J., 2005. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.006>
- Hours, R.A., Voget, C.E., Ertola, R.J., 1988. Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biol. Wastes* 23, 221–228. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(88\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0269-7483(88)90036-5)

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2022). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível (online) <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. (acesso em 07/09/2022).
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2020). Produção Agrícola Municipal. Tabela 5457 - Área plantada ou destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias e permanentes. Disponível (online) <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457> (acesso em 07/09/2022).
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2018). Produção Agrícola Municipal. Tabela 5457 - Área plantada ou destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias e permanentes. Disponível (online) <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado> (acesso em 20/05/2020).
- ISO1871:2009, 2009. Food and feed products - General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method, International Organization for Standardization.
- Jacob, N., 2009. Pectinolytic Enzymes, in: Nigam, P.S.N., Pandey, A. (Eds.), *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Springer Science+Business Media B.V, pp. 383–396.
- Jahan, N., Shahid, F., Aman, A., Mujahid, T.Y., Qader, S.A.U., 2017. Utilization of agro waste pectin for the production of industrially important polygalacturonase. *Heliyon* 3, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00330>
- Jain, S., Durand, H., Tiraby, G., 1990. Production of extracellular pectinase enzymes by a mutant (Pol6) of *Penicillium occitanis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 308–312. <https://doi.org/10.1007/BF00170048>
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40, 2931–2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
- Jegannathan, K.R., Nielsen, P.H., 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production-a literature review. *J. Clean. Prod.* 42, 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.11.005>
- John, I., Muthukumar, K., Arunagiri, A., 2017. A review on the potential of citrus waste for D-Limonene, pectin, and bioethanol production. *Int. J. Green Energy* 14, 599–612. <https://doi.org/10.1080/15435075.2017.1307753>
- John, J., Kaimal, K.K.S., Smith, M.L., Rahman, P.K.S.M., Chellam, P.V., 2020. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 1086–1099. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>
- Joshi, V.K., Parmar, M., Rana, N.S., 2006. Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 253–256.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 215–227.

- Krishania, M., Sindhu, R., Binod, P., Ahluwalia, V., Kumar, V., Sangwan, R.S., Pandey, A., 2018. Design of Bioreactors in Solid-State Fermentation, in: Ashok Pandey, Christian Larroche, C.R.S. (Ed.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V., pp. 83–96. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00005-0>
- Krishna, C., 2005. Solid-state fermentation systems - An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 1–30. <https://doi.org/10.1080/07388550590925383>
- Kumar, S., Sharma, H.K., Sarkar, B.C., 2011. Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). *Food Sci. Biotechnol.* 20, 1289–1298. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0178-3>
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A.K., Singhanian, R.R., 2021. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresour. Technol.* 323, 124566. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- Kumar, Y.S., Kumar, P.V., Reddy, O.V.S., 2012. Pectinase production from mango peel using *Aspergillus foetidus* and its Application in processing of mango juice. *Food Biotechnol.* 26, 107–123. <https://doi.org/10.1080/08905436.2012.670830>
- Lee, Y.H., Tsao, G.T., 1979. Dissolved Oxygen Electrodes. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 13, 35–86. [https://doi.org/10.1007/3540094687\\_6](https://doi.org/10.1007/3540094687_6)
- Lima, U.E., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W., 2001. *Biocnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 593 p.
- Liu, X., Kokare, C., 2017. Microbial Enzymes of Use in Industry, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press, pp. 267–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Londoño-Hernandez, L., Ruiz, H.A., Toro, C.R., Ascacio-Valdes, A., Rodriguez-Herrera, R., Aguilera-Carbo, A., Tubio, G., Pico, G., Prado-Barragan, A., Gutierrez-Sanchez, G., Aguilar, C.N., 2020. Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes, in: Arora, N.K., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore, pp. 87–113. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiartman, S., Ramakrishna, S. V., 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 258–265. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90083-3)
- Lonsane, B.K., Saucedo-castaneda, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., Krishnaiah, M.M., 1992. Review systems strategies for solid state fermentation. *Process Biochem.* 27, 259–273.

- Lopez-Ramirez, N., Volke-Sepulveda, T., Gaime-Perraud, I., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., 2018. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. *Bioresour. Technol.* 265, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.015>
- Maciel, M.H.C., Herculano, P.N., Porto, T.S., Teixeira, M.F.S., Moreira, K.A., de Souza-Motta, C.M., 2011. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 2469–2475. <https://doi.org/10.5897/AJB10.096>
- Mahmoodi, M., Najafpour, G.D., Mohammadi, M., 2019. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 21, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101280>
- Maiorano, A.E., 1990. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- Maldonado, M.C., Strasser de Saad, A.M., 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 34–38. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900470>
- Maller, A., Damásio, A.R.L., Silva, T.M. da, Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M. de L.T. de M., 2011. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enzyme Res.* 2011, 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/289206>
- Malvessi, E., Silveira, M.M. da, 2004. Influence of medium composition and ph on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 693–702. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500004>
- Mamma, D., Kourtoglou, E., Christakopoulos, P., 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresour. Technol.* 99, 2373–2383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.018>
- Manan, M.A., Webb, C., 2017. Design Aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. *J. Appl. Biotechnol. Boeng.* 4, 511–532. <https://doi.org/10.15406/jabb.2017.04.00094>
- Mao, G., Wu, D., Wei, C., Tao, W., Ye, X., Linhardt, R.J., Or, C., Chen, S., 2019. Reconsidering conventional and innovative methods for pectin extraction from fruit and vegetable waste : Targeting rhamnogalacturonan I. *Trends Food Sci. Technol.* 94, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.001>
- Martínez-Trujillo, A., Aranda, J.S., Gómez-Sánchez, C., Trejo-Aguilar, B., Guillermo, Aguilar-Osorio, 2009. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes*

- fp-500 and their modulation by pH and carbon source. *Braz. J. Microbiol.* 40, 40–47.  
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100006>
- Martínez-Trujillo, A., Arreguín-Rangel, L., García-Rivero, M., Aguilar-Osorio, G., 2011. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 202–209. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03096.x>
- Martins, E.S., Silva, D., Da Silva, R., Gomes, E., 2002. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem.* 37, 949–954. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00300-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00300-4)
- Martins, L.C., Monteiro, C.C., Semedo, P.M., Sá-correia, I., 2020. Valorisation of pectin-rich agro-industrial residues by yeasts: potential and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 6527–6547.
- Marzo, C., Díaz, A.B., Caro, I., Blandino, A., 2019. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Manag. Res.* 37, 149–156. <https://doi.org/10.1177/0734242X18798699>
- Mello, M.C.S. de, Gomes D'Amato Villardi, H., Ferreira Young, A., Luiz Pellegrini Pessoa, F., Medeiros Salgado, A., 2017. Life cycle assessment of biodiesel produced by the methylic-alkaline and ethylic-enzymatic routes. *Fuel* 208, 329–336.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.07.014>
- Meneghel, L., Reis, G.P., Reginatto, C., Malvessi, E., Da Silveira, M.M., 2014. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. *Process Biochem.* 49, 1800–1807.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.021>
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Minjares-Carranco, A., Trejo-Aguilar, B.A., Aguilar, G., Viniegra-González, G., 1997. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00212-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00212-8)
- Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N., 2006a. Introduction to Solid-State Fermentation Bioreactors, in: A.Mitchell, D., Krieger, N., Berovič, M. (Eds.), *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 33–44.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., 2019. Solid-State Cultivation Bioreactors, in: A. Berenjian (ed.) (Ed.), *Essentials in Fermentation Technology, Learning Materials in Biosciences*. Springer Nature Switzerland AG, pp. 105–133. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_4)

- Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovič, M., 2006b. Solid-State Fermentation Bioreactors, Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 447p. <https://doi.org/10.1007/3-540-31286-2>
- Mitchell, D.A., Luana Oliveira Pitol, Biz, A., Finkler, A.T.J., Jr., L.F. de L.L., Krieger, N., 2019. Design and Operation of a Pilot-Scale Packed-Bed Bioreactor for the Production of Enzymes by Solid-State Fermentation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 1–40. <https://doi.org/10.1007/10>
- Mitchell, D.A., Meien, O.F. von, Luz Jr, L.F.L., Berovič, M., 2006c. Substrate, Air, and Thermodynamic Parameters for SSF Bioreactor Models, in: David A.Mitchell, Krieger, N., Berovič, M. (Eds.), *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 265–278.
- Mitchell, D.A., Stuart, D.M., Hardin, M.T., Krieger, N., 2006d. Group III: Rotating-Drum and Stirred-Drum Bioreactors, in: Mitchell, D.A., Krieger, N., Berovič, M. (Eds.), *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 95–114.
- Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Morales-Contreras, B.E., Wicker, L., Rosas-Flores, W., Contreras-Esquivel, J.C., Gallegos-Infante, J.A., Reyes-Jaquez, D., Morales-Castro, J., 2020. Apple pomace from variety “Blanca de Asturias” as sustainable source of pectin: Composition, rheological, and thermal properties. *LWT - Food Sci. Technol.* 117, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108641>
- Mrudula, S., Anitharaj, R., 2011. Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Glob. J. Biotechnol. Biochem.* 6, 64–71.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., Petrusan, J., Van Droogenbroeck, B., Elst, K., Sforza, S., 2016. Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chem.* 201, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.012>
- Musoni, M., Destain, J., Thonart, P., Bahama, J.B., Delvigne, F., 2015. Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: From traditional methods to engineered systems. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 19, 430–442.
- Nagai, S., 1979. Mass and energy balances for microbial growth kinetics 49–83. [https://doi.org/10.1007/3-540-08990-x\\_22](https://doi.org/10.1007/3-540-08990-x_22)
- Nigam, P., Singh, D., 1994. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *J. Basic Microbiol.* 34, 405–423. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620340607>

- Nigam, P.S. nee', 2009. Production of Bioactive Secondary Metabolites, in: Nigam, P.S. nee', Pandey, A. (Eds.), *Biotechnology for agro industrial residues utilisation*. Springer Science+Business Media B.V., pp. 130–144. <https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>
- Nighojkar, A., Patidar, M.K., Nighojkar, S., 2019. Pectinases: Production and applications for fruit juice beverages, in: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), *Processing and Sustainability of Beverages*. Woodhead Publishing, pp. 235–273.
- Niu, J., Alazi, E., Reid, I.D., Arentshorst, M., Punt, P.J., Visser, J., Tsang, A., Ram, A.F.J., 2017. An evolutionarily conserved transcriptional activator-repressor module controls expression of genes for D-Galacturonic acid utilization in *Aspergillus niger*. *Genetics* 205, 169–183. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.194050>
- Niyonzima, F.N., Veena, S.M., More, S.S., 2020. Industrial Production and Optimization of Microbial Enzymes, in: Arora, N.K., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore, pp. 115–135. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- Ooi, C.K., Rasit, N., Abdullah, W.R.W., 2021. Optimization of protease from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation utilizing shrimp shell substrate. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11, 14809–14824. <https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1480914824>
- Ortiz, G.E., Ponce-Mora, M.C., Nosedá, D.G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M.C., Gil, G.P., Blasco, M., Albertó, E.O., 2017. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44, 197–211. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>
- Pandey, A., 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 27, 109–117. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(92\)80017-W](https://doi.org/10.1016/0032-9592(92)80017-W)
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P., 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77, 149–162.
- Papadaskalopoulou, C., Sotiropoulos, A., Novacovic, J., Barabouti, E., Mai, S., Malamis, D., Kekos, D., Loizidou, M., 2019. Comparative life cycle assessment of a waste to ethanol biorefinery system versus conventional waste management methods. *Resour. Conserv. Recycl.* 149, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.05.006>
- Papagianni, M., Moo-Young, M., 2002. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: Fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochem.* 37, 1271–1278. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00002-X)
- Parfitt, J., Croker, T., Brockhaus, A., 2021. Global Food Loss and Waste in Primary Production : A Reassessment of Its Scale and Significance. *Sustainability* 13, 12087.

- Patel, A.K., Singhanian, R.R., Pandey, A., 2017. Production , Purification , and Application of Microbial Enzymes, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press, pp. 13–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00002-9>
- Patel, H., Gupte, A., Gupte, S., 2009. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources* 4, 268–284. <https://doi.org/10.15376/biores.4.1.268-284>
- Patel, V.B., Chatterjee, S., Dhoble, A.S., 2022. A review on pectinase properties, application in juice clarification, and membranes as immobilization support. *J. Food Sci.* 87, 3338–3354. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16233>
- Patidar, M.K., Nighojkar, S., Kumar, A., Nighojkar, A., 2018. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. *3 Biotech* 8, 199. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1220-4>
- Patidar, M.K., Nighojkar, S., Kumar, A., Nighojkar, A., 2016. Papaya peel valorization for production of acidic pectin methylesterase by *Aspergillus tubingensis* and its application for fruit juice clarification. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 6, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.008>
- Patil, S.R., Dayanand, A., 2006. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresour. Technol.* 97, 2340–2344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.025>
- Pessôa, M.G., Vespermann, K.A.C., Paulino, B.N., Barcelos, M.C.S., 2019. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 37, 319–339. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.007>
- Phutela, U., Dhuna, V., Sandhu, S., Chadha, B.S., 2005. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Braz. J. Microbiol.* 36, 63–69. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000100013>
- Pitol, L.O., Biz, A., Mallmann, E., Krieger, N., Mitchell, D.A., 2016. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Chem. Eng. J.* 283, 1009–1018.
- Poletto, P., 2015. Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. Tese de Doutorado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Poletto, P., Polidoro, T.A., Zeni, M., Silveira, M.M. da, 2017. Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. *LWT - Food Sci. Technol.* 79, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018>

- Polidoro, T.A., 2009. Desenvolvimento de biorreator de tambor rotativo em escala de bancada. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Polidoro, T.A., Silveira, M.M., Gelain, L., 2009. Dispositivo de Tambor Rotativo. Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, MU8901075-2.
- Radha, A., Sneha, R., Kiruthiga, R., Priyadharshini, P., Prabhu, N., 2019. A Review on production of polygalacturonase using various organisms and its applications. *Asian J. Biotechnol. Bioresour. Technol.* 5, 1–12. <https://doi.org/10.9734/ajb2t/2019/v5i330063>
- Rahardjo, Y.S.P., Weber, F.J., Paul Le Comte, E., Tramper, J., Rinzema, A., 2002. Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 539–544. <https://doi.org/10.1002/bit.10222>
- Ramesh, A., Devi, P.H., Chattopadhyay, S., Kavitha, M., 2020. Commercial Applications of Microbial Enzymes, in: KumarArora, N., Mishra, J., Mishra, V. (Eds.), *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries. Microorganisms for Sustainability.* Springer, Singapore, pp. 137–184. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5>
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S.B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A., Rebello, S., Pandey, A., 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol. Biotechnol.* 56, 16–30. <https://doi.org/10.17113 /ftb.56.01.18.5491>
- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E.M., Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2017. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 16, 381–394. <https://doi.org/10.1007 /s11157-017-9437-y>
- Reginatto, C., Posso dos Santos, G., Costa Ramos, K., Borges Folle, A., Campos de Souza, B., Souza, D., Meneghel, L., Carra, S., Polidoro, T.A., Moura da Silveira, M., Valduga, E., Malvessi, E., 2022. Inoculation conditions improved the pectinase productivity in *Aspergillus niger* LB-02-SF solid-state cultivation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 42, 102354. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102354>
- Reginatto, C., Rossi, C., Miglioranza, B.G., Santos, M., Meneghel, L., Moura, M., Malvessi, E., 2017. Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochem.* 58, 1–8. <https://doi.org/10.1016 /j.procbio.2017.04.018>
- Rocha, J.C. da, Araújo, J. da S., Paiva, W.K.V. de, Ribeiro, E.S.S., Padilha, C.E. de A., Assis, C.F. de, Santos, E.S. dos, Macêdo, G.R. de, Sousa Junior, F.C. de, 2020. Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 30, 101876. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101876>
- Roubouts, E.M., Pilnik, W., 1980. Pectic enzymes, in: Rose, A.H. (Ed.), *Economic Microbiology.* Academic Press, London, pp. 227–282.

- Ruiz, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J.C., Aguilar, C.N., 2012. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 65, 90–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.007>
- Sabu, A., Pandey, A., Jaafar Daud, M., Szakacs, G., 2005. Tamarind seed powder and palm kernel cake: Two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Bioresour. Technol.* 96, 1223–1228.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.11.002>
- Sadh, P.K., Duhan, S., Duhan, J.S., 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresour. Bioprocess.* 5, 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Sagar, N.A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E.M., Lobo, M.G., 2018. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and possible utilization. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 512–531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Samreen, P., Mangipudi, M., Grover, S., Rajan, C., Sibi, G., 2019. Production of Pectinases and Pectinolytic Enzymes: Microorganisms, Cultural Conditions and Substrates. *Adv. Appl. Microbiol.* 14, 53–59. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2019.14.555884>
- Sandri, I.G., Lorenzoni, C.M.T., Fontana, R.C., da Silveira, M.M., 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Sci. Technol.* 51, 469–475.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.015>
- Sandri, I.G., Silveira, M.M. da, 2018. Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages* 4, 1–10.  
<https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Satapathy, S., Rout, J.R., Kerry, R.G., Thatoi, H., Sahoo, S.L., 2020. Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. *Front. Nutr.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>
- Satapathy, S., Soren, J.P., Mondal, K.C., Pradhan, C., Sahoo, S.L., Thatoi, H., 2021. Industrially relevant pectinase production from *Aspergillus parvisclerotigenus* KX928754 using apple pomace as the promising substrate. *J. Taibah Univ. Sci.* 15, 347–356.  
<https://doi.org/10.1080/16583655.2021.1978833>
- Schmidell, W., Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., 2001. *Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 593p.
- Schmidt, C.G., Furlong, E.B., 2012. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.* 123, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.081>

- Schutyser, M.A.I., De Pagter, P., Weber, F.J., Briels, W.J., Boom, R.M., Rinzema, A., 2003. Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: Experiments and modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 503–513. <https://doi.org/10.1002/bit.10693>
- Sethi, B.K., Nanda, P.K., Sahoo, S., 2016. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. *3 Biotech* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0353-y>
- Shahryari, Z., Fazelipour, M.H., Shaabani, M.S., Ghasemi, Y., 2020. Production of fungal phytase in an innovative trickle bed bioreactor. *Waste Biomass Valori.* 11, 3273–3280. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00642-9>
- Shanmugavel, M., Vasantharaj, S., Yazhmozhi, A., Bhavsar, P., Aswin, P., Felshia, C., Mani, U., Ranganathan, B., Gnanamani, A., 2018. A study on pectinases from *Aspergillus tamarii*: Toward greener approach for cotton bioscouring and phytopigments processing. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 15, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.013>
- Sharma, H.P., Patel, H., Sugandha, 2017. Enzymatic added extraction and clarification of fruit juices—A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 1215–1227. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>
- Sharma, N., Rathore, M., Sharma, M., 2013. Microbial pectinase: Sources, characterization and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 45–60. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>
- Sharma, P., Gaur, V.K., Kim, S., Pandey, A., 2020. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. *Bioresour. Technol.* 299, 122580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122580>
- Shet, A.R., Desai, S.V., Achappa, S., 2018. Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. *Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci.* 4, 337–348. <https://doi.org/10.26479/2018.0403.30>
- Shrestha, S., Rahman, M.S., Qin, W., 2021. New insights in pectinase production development and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 9069–9087. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- Silva, D., Tokuioshi, K., Martins, E.D.S., Da Silva, R., Gomes, E., 2005. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochem.* 40, 2885–2889. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.008>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P.K., 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Singh, R., Singh, R.K., 2015. Role of Enzymes in Fruit juices Clarification during Processing : A review. *Int. J. Biol. Technology* 6, 1–12.

- Singh, R.S., Singh, T., Pandey, A., 2019. Microbial Enzymes-An Overview, in: Singh, R.S., Singhania, R.R., Pandey, A., Christian Larroche (Eds.), Biomass, Biofuels, Biochemicals. Advances in Enzyme Technology. Elsevier B.V., pp. 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7>
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Ash in Biomass, National Renewable Energy Laboratory - Technical Report NREL/TP-510-42622.
- Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M., 1993. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 36–41. <https://doi.org/10.1007/BF00166845>
- Stuedler, S., Werner, A., Walther, T., 2019. It Is the Mix that Matters : Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 169, 51–81. [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_85](https://doi.org/10.1007/10_2019_85)
- Stuart, D.M., Mitchell, D.A., 2003. Mathematical model of heat transfer during solid-state fermentation in well-mixed rotating drum bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 1180–1192. <https://doi.org/10.1002/jctb.920>
- Stuart, D.M., Mitchell, D.A., Johns, M.R., Litster, J.D., 1999. Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 383–391. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990520\)63:4<383::AID-BIT1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990520)63:4<383::AID-BIT1>3.0.CO;2-N)
- Sugai-Guérios, M.H., Balmant, W., Jr, A.F., Krieger, N., Mitchell, D.A., 2015. Modeling the Growth of Filamentous Fungi at the Particle Scale in Solid-State Fermentation Systems, in: Krull, R., Bley, T. (Eds.), Filaments in Bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer International Publishing Switzerland, pp. 127–141. <https://doi.org/10.1007/10>
- Tapre, A.R., Jain, R.K., 2014. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *Int. Food Res. J.* 21, 447–453.

- Taşkin, E., Eltem, R., 2008. The enhancement of polygalacturonase and polymethylgalacturonase production on solid-state conditions by *Aspergillus foetidus*. *Food Biotechnol.* 22, 203–217. <https://doi.org/10.1080/08905430802262533>
- Teixeira, M.F.S., Filho, J.L.L., Durán, N., 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Braz. J. Microbiol.* 31, 286–290.
- Teles, A.S.C., Chávez, D.W.H., Oliveira, R.A., Bon, E.P.S., Terzi, S.C., Souza, E.F., Gottschalk, L.M.F., Tonon, R. V, 2019. Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Res. Int.* 120, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.083>
- Thapa, S., Li, H., Ohair, J., Bhatti, S., Chi, F., Kamal, C., Nasr, A., Johnson, T., 2019. Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Mol. Biotechnol.* 61, 579–601. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 81, 146–161. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Ueda, S., Fujio, Y., Lim, J.Y., 1982. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. *J. Appl. Biochem* 4, 524–532.
- Uenojo, M., Pastore, M., 2007. Pectinases. *Alkaliphiles* 30, 207–217. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-33374-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-540-33374-6_11)
- Ul Haq, I., Nawaz, A., Asad-Ur-Rehman, 2015. Optimization of inoculum volume, fermentation medium and aeration rate for the production of glucose oxidase by uv mutant strain of *Aspergillus niger* AN-14. *Pak. J. Bot.* 47, 329–332.
- UNEP - United Nations Environment Programme. (2021). Food Waste Index Report 2021. Disponível (online) <https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021> (acesso em 19/06/2022).
- United Nations. (2015). Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Disponível (online) <https://sdgs.un.org/2030agenda> (acesso em 19/06/2022).
- Viniegra-González, G., 1997. Solid state fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring, in: Roussos, S., Lonsane, B.K., Raimbault, M., G., Viniegra-Gonzalez (Eds.), *Advances in Solid State Fermentation*. Springer Science+ Business Media Dordrecht, Dordrecht, pp. 5–22. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-0661-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0661-2_2)
- Vitolo, M., 2020. Brief review on enzyme activity. *World J. Pharm. Res.* 9, 60–76. <https://doi.org/10.20959/wjpr20202-16660>
- Wong, L.Y., Saad, W.Z., Mohamad, R., Tahir, P.M., 2017. Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of

retting kenaf. *Ind. Crops Prod.* 97, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.019>

Yafetto, L., 2022. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020 : A review and bibliometric analysis. *Heliyon* 8, e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

Zabriskie, D.W., Humphrey, A.E., 1978. Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing. *AIChE J.* 24, 138–146. <https://doi.org/10.1002/aic.690240116>

Zanella, K., Taranto, O.P., 2015. Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from “pera” sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *J. Food Eng.* 166, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.033>

## **9 ANEXOS**

### **9.1 Anexo 1 - Descrição de metodologias**

#### **9.1.1 Cultivo em frascos**

Os cultivos preliminares foram conduzidos em frascos Becher de 800 mL (90 mm de diâmetro x 175 mm de altura), contendo 100 g de meio sólido. Os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos ou com inóculo vegetativo de *A. niger*. A homogeneização do meio de cultivo após a inoculação foi realizada por revolvimento manual do leito em recipiente aberto no interior da câmara de fluxo laminar. Os frascos foram cobertos com uma manta esterilizada de gaze e algodão hidrófobo e mantidos em estufa (DeLeo, Brasil), a 30°C, em atmosfera saturada em umidade, por 96 horas (Fontana et al., 2005).

#### **9.1.2 Cultivo em biorreator de tambor rotativo**

O biorreator de tambor rotativo utilizado neste trabalho foi projetado pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Bioprocessos e construído na Oficina de Vidros e Laboratório de Tecnologia e Pesquisa da UCS (Polidoro, 2009; Polidoro *et al.*, 2009), sendo concedida carta patente de modelo de utilidade MU 8901075-2 em maio de 2017. Este sistema é constituído de um tubo cilíndrico de acrílico (140 mm de diâmetro x 400 mm de comprimento), com tampas de nylon em suas extremidades, apoiado horizontalmente sobre um suporte provido de roletes, que permite a rotação do tambor em diferentes frequências e períodos de rotação. Nesse sistema, o ar umidificado e aquecido é injetado no interior do tambor rotativo e é distribuído por um difusor linear perpendicular ao eixo central do reator. Uma válvula estabilizadora de pressão na saída do sistema garante pressão positiva no interior do tambor rotativo, prevenindo contaminações. O gás efluente do sistema, após a passagem pela válvula estabilizadora de pressão, atravessa um compartimento preenchido com sílica para remoção de umidade. Na sequência, o fluxo de gás atinge um eletrodo polarográfico conectado a um oxímetro (modelo DM-4P, Digimed, Brasil) que registra a fração molar de oxigênio no gás efluente do sistema. A agitação do biorreator é realizada por um motor de corrente contínua com velocidade de rotação variável. O sistema inclui, ainda, instrumentos acoplados para a medição de temperatura e fluxo de ar, além de um dispositivo na tampa do reator para coleta asséptica de amostras, que foram coletadas em capela de fluxo laminar, a cada 24 horas com auxílio de um tubo de vidro esterilizado (Poletto, 2015; Polidoro, 2009; Polidoro et al., 2009).

### 9.1.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada indiretamente a partir de dados obtidos por balanço de oxigênio, de acordo com o método proposto originalmente por Zabriskie & Humphrey (1978) e adaptado para cultivos em estado sólido por Maiorano (Maiorano, 1990). Esse método se baseia na correlação da concentração celular no meio sólido com a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR - do inglês, Oxygen Uptake Rate).

A determinação da demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) para os ensaios em frascos foi realizada de acordo com Fontana (2004). Na execução da técnica, os frascos Becher foram retirados da estufa de incubação e imediatamente colocados em banho à mesma temperatura. Ao frasco foi acoplada uma rolha que continha uma mangueira plástica através do qual os gases presentes no espaço vazio puderam ser circulados com o auxílio de uma bomba peristáltica, em circuito fechado, retornando ao frasco. Em um ponto do circuito, foi colocado o eletrodo polarográfico do oxímetro (modelo DM-4P, Digimed, Brasil), previamente calibrado nas condições de temperatura, pressão e umidade do ambiente. As medidas de pressão parcial foram realizadas a cada 30 segundos, por um período de 10 minutos. Assim, à medida que o oxigênio foi convertido em gás carbônico, devido à respiração microbiana, valores decrescentes de pressão parcial de oxigênio foram medidos, sendo possível calcular a massa de oxigênio, em mmol, consumida a cada instante da determinação a partir da Equação 1 (Lee e Tsao, 1979):

$$O_{2c} = \frac{(p_{O_2,i} - p_{O_2,t}) \cdot V_g}{R \cdot T} \cdot 1000 \quad (1)$$

Onde,  $O_{2c}$  representa o oxigênio consumido (mmol),  $p_{O_2,i}$  é a pressão parcial de oxigênio inicial (atm),  $p_{O_2,t}$  é a pressão parcial de oxigênio no tempo  $t$  (atm),  $V_g$  é o volume da fase gasosa do sistema (L),  $R$  é a constante dos gases (0,082 atm.L/mol.K) e  $T$  é a temperatura (K).

A partir da variação desses valores em função do tempo de análise é possível calcular a OUR para cada ponto de amostragem, através da Equação 2:

$$OUR = \frac{dO_{2c}/dt}{M} \quad (2)$$

Onde, OUR é a demanda de oxigênio pelo cultivo (mmol/gms/h),  $dO_{2c}/dt$  é a velocidade de consumo de oxigênio e  $M$  é a massa de meio seco no reator (gms).

Nos ensaios em biorreator de tambor rotativo, a determinação de OUR, descrita em Poletto et al. (2017), foi realizada a partir da determinação do fluxo de gás e das pressões parciais de oxigênio na entrada e na saída do sistema. O fluxo de ar que entra no sistema é medido em L/h e convertido para mol/h conforme a Equação 3:

$$F_n = \frac{P \cdot F_v}{R \cdot T} \quad (3)$$

Onde,  $F_n$  é a vazão de ar em base molar (mol/h),  $P$  é a pressão parcial do sistema,  $F_v$  é a vazão volumétrica dos gases (L/h),  $R$  é a constante dos gases (0,082 atm.L/mol.K) e  $T$  é a temperatura (K).

A partir da fração de oxigênio no ar ( $Y_{O_2}$  no ar = 0,209), é calculada a vazão molar de  $O_2$  na entrada do sistema conforme a Equação 4:

$$F_{O_{2,e}} = F_n \cdot Y_{O_{2,e}} \quad (4)$$

Onde,  $F_{O_{2,e}}$  é a vazão em base molar de oxigênio na entrada do biorreator (mol/h),  $F_n$  é a vazão de ar em base molar (mol/h) e  $Y_{O_{2,e}}$  é a fração molar de oxigênio no ar.

O quociente respiratório para o cultivo é considerado igual a 1, ou seja, para cada 1 mol de  $O_2$  consumido é produzido 1 mol de  $CO_2$ . Com isso, considera-se que a vazão de entrada no biorreator é igual à vazão de saída e determina-se a vazão de saída em base molar de oxigênio conforme representado na Equação 5:

$$F_{O_{2,s}} = F_n \cdot Y_{O_{2,s}} \quad (5)$$

Onde,  $F_{O_{2,s}}$  é a vazão em base molar de oxigênio na saída do biorreator (mol/h),  $F_n$  é a vazão de ar em base molar (mol/h) e  $Y_{O_{2,s}}$  é a fração molar de oxigênio no ar de saída do biorreator.

A partir dos dados obtidos, foi calculada a demanda de oxigênio (OUR) pelo cultivo ao longo dos ensaios em biorreator de tambor rotativo, conforme a Equação 6 adaptada de Lee & Tsao (1979):

$$OUR = \frac{F_{O_{2,e}} - F_{O_{2,s}}}{M} \quad (6)$$

Onde, OUR é a demanda de oxigênio pelo cultivo (mmol/gms/h),  $F_{O_{2,e}}$  é a vazão em base molar de oxigênio na entrada do biorreator (mol/h),  $F_{O_{2,s}}$  é a vazão em base molar

de oxigênio na saída do biorreator (mol/h) e M é a massa de meio seco no interior do biorreator (gms).

Após a determinação de OUR nos ensaios em frascos (Equação 2) e em biorreator (Equação 6), a estimativa das concentrações celulares obtidas nos cultivos em meio sólido foi, então, realizada de maneira indireta a partir dos dados de balanço de oxigênio, conforme Nagai (1979)(Equação 7):

$$\text{OUR} = \frac{1}{Y_{GO}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_O \cdot X \quad (7)$$

Onde, OUR é a demanda de O<sub>2</sub> pelo cultivo (mmol/gms/h), Y<sub>GO</sub> é o fator de conversão de oxigênio em células (g/mmol), dx/dt é a velocidade instantânea de crescimento (g/g/h), m<sub>O</sub> é o coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (mmol/g/h) e X é a concentração de biomassa fúngica (g/gms).

O fator de conversão de oxigênio em células (Y<sub>GO</sub>) – 0,092 g/mmol – e o coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (m<sub>O</sub>) – 1,25 mmol/g/h – para *A. niger* LB-02-SF determinados por Poletto (2015) foram utilizados no presente trabalho para a determinação indireta da concentração celular.

A integração da Equação 7 leva a nova expressão (Equação 8), de acordo com o método proposto por Zabriskie & Humphrey (1978) e adaptado por Maiorano (1990).

$$X_n = \frac{Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2}\right) (\text{OUR}_n + \text{OUR}_{n-1}) + [1 - m_O \cdot Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2}\right)] X_{n-1}}{1 + m_O \cdot Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2}\right)} \quad (8)$$

Onde, X<sub>n</sub> é a concentração de biomassa fúngica no final do intervalo de tempo considerado (g/gms), Y<sub>GO</sub> é o fator de conversão de oxigênio em células (g/mmol), Δt é o intervalo de tempo entre duas medições (h), OUR<sub>n</sub> é a demanda de O<sub>2</sub> no final do intervalo de tempo considerado (mmol/gms/h), OUR<sub>n-1</sub> é a demanda de O<sub>2</sub> no início do intervalo de tempo considerado (mmol/gms/h), m<sub>O</sub> é o coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (mmol/g/h) e X<sub>n-1</sub> é a concentração de biomassa fúngica no início do intervalo de tempo considerado (g/gms). Na estimativa do crescimento, cada ponto de análise de consumo foi utilizado, sendo que o primeiro valor da concentração celular foi estimado no inóculo. Os dados de concentração celular foram expressos em mg de biomassa por g de matéria seca (mg/gms).

#### **9.1.4 Coleta e tratamento de amostras**

Nos cultivos em frascos, a amostragem foi realizada em diferentes períodos dependendo da condição avaliada. Ao ser retirado da estufa, o frasco foi imediatamente conduzido para o sistema de determinação de OUR conforme descrito no item 9.1.3. Após o procedimento, o teor de umidade foi determinado a partir de 1 g da amostra homogeneizada e submetida a secagem em estufa (100°C) até massa constante. Após serem resfriadas em dessecador, as amostras foram pesadas e a umidade determinada. Outra parte da amostra homogeneizada foi utilizada para a extração das enzimas e o restante conservado em refrigeração para posterior determinação da concentração de açúcares redutores totais (item 9.1.5).

Nos ensaios em biorreator de tambor rotativo a amostragem foi realizada a cada 24 horas, com a introdução de um tubo de vidro, em condições estéreis, em capela de fluxo laminar. A cada retirada, o valor de massa seca da amostra foi descontado da massa total para a realização dos cálculos de concentração celular. Os valores de pressão parcial de oxigênio no ar, determinados no oxímetro em diferentes tempos de cultivo, foram utilizados para a determinação indireta da concentração celular, conforme descrito no item 9.1.3. Durante a amostragem também foi ajustada a vazão de ar na entrada do reator e verificada a temperatura no interior do leito. Após a retirada da amostra, foram seguidos os mesmos protocolos utilizados nos ensaios em frascos.

#### **9.1.5 Determinação de açúcares redutores totais (ART)**

A concentração de substrato foi determinada pela medida de açúcares redutores totais em meio sólido, como descrito por Fontana (2004). Inicialmente, 0,7 g de meio úmido foi tratado com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 mol/L a 100°C por 30 minutos, buscando promover a hidrólise dos açúcares presentes na amostra. Após resfriamento, 3 gotas de fenolftaleína foram adicionadas e em seguida, a suspensão obtida foi neutralizada pela titulação com NaOH 4mol/L e então tratadas com soluções de ferrocianeto de potássio (150 g/L) e sulfato cúprico (300 g/L) a fim de promover a desproteínização e clarificação. O material foi, então, filtrado e os açúcares redutores totais quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras filtradas foram determinadas através de uma curva de calibração construída com soluções de glicose entre 100 e 1000 mg/L. Os valores de absorbância das amostras foram medidos em espectrofotômetro (PG Instrument, EUA) a 545 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicose por g de matéria seca (mg/gms).

### 9.1.6 Determinação da atividade de pectinases totais

A atividade de pectinases foi avaliada pelo método descrito por Maiorano (Maiorano, 1990), modificado por Malvessi & Silveira (2004). Este método é baseado na medida da redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina submetida à ação do extrato enzimático. Em trabalhos anteriores do grupo (Fontana et al., 2005; Malvessi e Silveira, 2004), este método foi relacionado à quantificação da atividade de endopoligalacturonases, considerando-se o papel predominante desta enzima na redução da viscosidade da solução de pectina. Entretanto, tendo em vista que a hidrólise do polissacarídeo depende da ação do conjunto de enzimas do complexo pectinolítico, os resultados da análise, no presente trabalho, foram referidos como pectinases totais (Meneghel et al., 2014; Poletto et al., 2017; Reginatto et al., 2017).

No presente trabalho, a solução padrão de pectina foi preparada pela dissolução de 0,9 g de pectina em 100 mL de solução tampão acetato - ácido acético 0,05 mol/L pH 4,0 e mantida sob agitação por cerca de 12 horas. O tampão foi preparado a partir de três soluções (quantidades para 100 mL de água destilada): solução A – 3 g de ácido acético (P.A.); solução B – 6,38 g de acetato de sódio (3H<sub>2</sub>O); solução C – 10 g de benzoato de sódio. As três soluções foram misturadas, sendo 73,6 mL da solução A, 26,4 mL da solução B e 2,5 mL da solução C. completando-se o volume para 1000 mL com água destilada.

Inicialmente são adicionados 3,2 mL de extrato enzimático diluído a um tubo de ensaio que é adicionado a um banho termostático na temperatura de 30°C. Após ambientação das amostras, são adicionados 14,8 mL da solução de pectina 0,9% (m/v). Esta mistura é mantida nessas condições, a 30°C, por 30 minutos. Após este período, é realizada a determinação da viscosidade da mistura em viscosímetro (modelo LDV-II+, Brookfield, EUA) a 60 rpm. Um branco de cada amostra é preparado com a inativação da solução enzimática diluída em banho a 100°C, por 30 minutos, e submetido ao mesmo procedimento das amostras.

De posse dos valores de viscosidade da amostra ativa e da inativada, é possível calcular o percentual de redução de viscosidade (A) pela relação apresentada na equação 9.

$$A (\%) = \frac{\text{visc. amostra inativada} - \text{visc. amostra}}{\text{visc. amostra inativada}} \times 100 \quad (9)$$

A relação entre o percentual de redução de viscosidade e a atividade de pectinases é obtida a partir de uma curva padrão construída a partir de uma série de diluições (entre 1:1 e 1:500) do extrato enzimático obtido nos cultivos. As diferentes diluições são analisadas quanto à redução de viscosidade e, com os valores obtidos, são construídas curvas relacionando a redução de viscosidade (A) com o logaritmo decimal do inverso das diluições, representando uma proporção da concentração de enzimas. Uma unidade (U) de pectinase foi definida como a quantidade de enzima (abscissa) que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas. Os demais valores de unidades de pectinases foram calculados proporcionalmente e uma nova curva, então, foi construída, relacionando a redução de viscosidade com o logaritmo decimal do número de unidades de pectinases. A partir do ajuste linear desta curva, foram obtidos os coeficientes utilizados para o cálculo da atividade enzimática, de acordo com a Equação 10.

$$P = \frac{10^{\left(\frac{A-a}{b}\right)} \cdot \text{dil} \cdot f_d}{v} \quad (10)$$

Onde, P é atividade de pectinases totais (U/gms), A é a redução de viscosidade (%), a é o coeficiente linear da curva de calibração, b é o coeficiente angular da curva de calibração, dil é a diluição da preparação enzimática, v é o volume de preparação enzimática utilizado na análise (mL) e  $f_d$  é o fator de diluição na extração (mL/gms).

### 9.1.7 Parâmetros de avaliação do processo

- Fator de produção específica:

O fator de produção específica relaciona a máxima atividade enzimática com a máxima concentração celular no processo e foi calculado de acordo com a Equação 11.

$$Y_{P/X} = \frac{P_{\max}}{X_{\max}} \quad (11)$$

Onde,  $Y_{P/X}$  é o fator de produção específica (U/mg),  $P_{\max}$  é a máxima atividade enzimática obtida no processo (U/gms) e  $X_{\max}$  é a máxima concentração celular obtida no processo (mg/gms).

- Fator de conversão de substrato em produto:

O fator de conversão de substrato em produto, calculado pela Equação 12, relaciona a máxima produção de pectinases com o consumo de substrato.

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\max}}{S_{\text{cons}}} \quad (12)$$

Onde,  $Y_{P/S}$  é o fator de conversão de substrato em enzimas (U/mg),  $P_{\max}$  é a máxima atividade enzimática obtida no processo (U/gms) e  $S_{\text{cons}}$  é a concentração de substrato consumida até o momento de obtenção de  $P_{\max}$  (mg/gms).

- Fator de conversão de substrato em células:

O fator de conversão de substrato em células (Equação 13) relaciona a máxima concentração celular com o consumo de substrato.

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\max}}{S_{\text{cons}}} \quad (13)$$

Onde,  $Y_{X/S}$  é o fator de conversão de substrato em células (mg/mg),  $X_{\max}$  é a máxima concentração celular obtida no cultivo (mg/gms) e  $S_{\text{cons}}$  é a concentração de substrato consumida o momento de obtenção de  $X_{\max}$  (mg/gms).

- Produtividade:

A produtividade representa a concentração de produto formado por tempo de processo e foi calculada pela Equação 14.

$$p = \frac{P_{\max}}{t} \quad (14)$$

Onde,  $p$  é a produtividade (U/gms/h),  $P_{\max}$  é a atividade enzimática máxima no processo (U/gms) e  $t_{P_{\max}}$  é o tempo de processo em que ocorreu  $P_{\max}$  (h).