

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

VIRGÍNIA SANCHES COELHO DE OLIVEIRA TRINDADE

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Botryosphaeria ribis* EC-01 EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Apucarana
2021**

VIRGÍNIA SANCHES COELHO DE OLIVEIRA TRINDADE

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Botryosphaeria ribis* EC-01 EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**CITRIC ACID PRODUCTION BY *Botryosphaeria ribis* EC-01 IN SUBMERSE
FERMENTATION USING AGROINDUSTRIAL WASTE**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof^a Dr^a Milena Martins Andrade

Coorientador: Prof^a Dr^a Lilian Tatiani
Dusman Tonin

APUCARANA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Apucarana**



VIRGINIA SANCHES COELHO DE OLIVEIRA TRINDADE

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR BOTRYOSPHERIA RIBIS EC-01 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Desenvolvimento De Processos.

Data de aprovação: 25 de Maio de 2021

Prof.a Caroline Casagrande Sipoli, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Halison Correia Golias, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Lilian Tatiani Dusman Tonin, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/05/2021.

Ao meu Deus, Autor do meu destino e da
minha fé, Lâmpada para os meus pés e Luz
para os meus caminhos, Socorro presente na
angústia.

A Ele toda honra e glória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me guiar e conduzir até aqui, colocando as pessoas certas no meu caminho;

Agradeço às minhas orientadoras Milena Martins Andrade e Lilian Tatiani Dusman Tonin por seus ricos ensinamentos, pela amizade, paciência e dedicação;

Aos meus queridos amigos da UTFPR, Ana, Bruno, Danielli, Lucas, Mariane e Sirlei, que me fizeram rir em qualquer situação. Vocês foram pacientes para me ensinar quando eu mais precisei, e sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui;

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, que foram essenciais para o meu desenvolvimento acadêmico, pelas inúmeras contribuições ao meu trabalho;

A toda equipe de profissionais da UTFPR por gerir com êxito toda a estrutura da universidade proporcionando um ambiente agradável para pesquisa;

Agradeço especialmente ao LAMAP – Laboratório Multiuso de Apoio à Pesquisa de Câmpus Apucarana, onde a pesquisa pode ser desenvolvida;

Aos alunos Anelize e Guilherme pela ajuda nos laboratórios;

À CAPES pela bolsa concedida e pelo incentivo à pesquisa e a ciência;

Ao Davi, meu amor, que alegra meus dias e me incentiva e me apoia a ser melhor a cada dia, por me lembrar constantemente de confiar e descansar no Senhor;

Ao meu irmão Rodrigo, que me faz raiva, mas também me faz rir;

Aos meus pais, Christiano e Mônica, que são meu maior exemplo de amor e sabedoria, por terem me ensinado o valor do conhecimento, por sempre acreditarem e investirem nos meus sonhos.

RESUMO

O ácido cítrico é amplamente utilizado em diversos processos industriais, principalmente nas indústrias alimentícias por ser biodegradável, solúvel em água, atóxico, antioxidante, acidulante e flavorizante. Atualmente, sua produção industrial é realizada por via fermentativa utilizando o fungo filamentosos *Aspergillus niger* e melão de cana como substrato. Entretanto, a crescente demanda industrial por este ácido faz com que novas rotas de produção mais viáveis sejam traçadas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de ácido cítrico pelo fungo filamentosos *Botryosphaeria ribis* EC-01, utilizando os resíduos agroindustriais malte, extrato de levedura, torta de soja, glicerol e melão de cana. Não existe relatos na literatura que explore a capacidade de *B. ribis* EC-01 na produção de ácido cítrico. Após a seleção das variáveis que influenciaram positivamente a produção deste ácido, planejamentos fatoriais 2^3 composto central rotacional foram desenvolvidos. O ácido cítrico foi quantificado por método espectrofotométrico, utilizando-se ácido tricloroacético, anidrido acético e piridina a 420 nm, 37 °C e 30 min. A torta de soja e o melão de cana aumentaram a produção de ácido cítrico por *B. ribis* EC-01, alcançando 5,75 mg mL⁻¹, com 14 % (m/v) de torta de soja em 24 h, e 3,41 mg mL⁻¹ com 14 % (m/v) de melão de cana no tempo de 120 h. Um planejamento fatorial, considerando tempo (20 – 120 h) e as concentrações de torta de soja e de melão de cana (0 – 20 % m/v), foi avaliado, sendo que este primeiro modelo foi preditivo. A partir das respostas obtidas, um segundo planejamento fatorial foi desenvolvido, utilizando-se tempo (13 – 63 h), torta de soja (15 – 25 %, m/v) e melão de cana (20 – 40 %, m/v). As condições ótimas de produção de ácido cítrico por *B. ribis* EC-01 foram determinadas ($R^2 = 0,85$) e os valores ótimos de tempo, torta de soja e melão de cana foram de 13 h, 25 % (m/v) e 35 % (m/v), respectivamente. O modelo foi validado, obtendo-se valor de 10,01 ± 0,07 mg mL⁻¹ de ácido cítrico, o que está bem próximo ao valor predito de 11,79 mg mL⁻¹. Os resultados mostraram que o fungo filamentosos *B. ribis* EC-01 possui potencial de produção de ácido cítrico por fermentação submersa utilizando os resíduos agroindustriais torta de soja e melão de cana em tempos bem inferiores aos relatados pela literatura, o que torna o processo viável economicamente.

Palavras-chave: Biotecnologia, Planejamento fatorial, Torta de soja, Melão de cana, Fungos filamentosos.

ABSTRACT

Citric acid is used in many industrial processes, being mostly used in the food industry, due to its biodegradable, water-soluble, non-toxic, antioxidant, acidulating and flavoring properties. Currently, its industrial production is carried out by fermentation using filamentous fungus *Aspergillus niger* and sugarcane molasses as substrate. However, the increasing industrial demand for this acid requires the development of more efficient of production routes. This study aimed to evaluate the citric acid production by filamentous fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01 using agroindustrial residues such as malt, yeast extract, soybean cake, glycerol and sugarcane molasses. There are no reports in the literature that explores the capacity of *B. ribis* EC-01 for the production of citric acid. After selecting the variables that positively influenced the production of this acid, 2³ rotational central composite designs were developed. Citric acid was quantified by spectrophotometric method using trichloroacetic acid, acetic anhydride and pyridine at 420nm and 37°C for 30 min. Soybean cake and sugarcane molasses enhanced the production of citric acid by *B. ribis* EC-01, reaching 5,75 mg mL⁻¹, with 14 % (w/v) soybean cake in 24 h, and 3,41 mg mL⁻¹ with 14 % (w/v) sugarcane molasses in the period of 120 h. A factorial design, considering time (20 - 120 h) and the concentrations of soybean cake and sugarcane molasses (0 - 20 % w/v), was evaluated, and this first model was predictive. From the responses obtained, a second factorial design was developed using time (13 – 63 h), soybean cake (15 - 25 %, w/v) and sugarcane molasses (20 - 40 %, w/v). The optimal conditions for the production of citric acid by *B. ribis* EC-01 were determined ($R^2 = 0.85$) and the optimal values for time, soybean cake and sugarcane molasses were 13 h, 25 % (w/v) and 35 % (w/v), respectively. The model was validated obtaining citric acid production of 10.01 ± 0.07 mg mL⁻¹ of, which is very close to the predicted value of 11.79 mg mL⁻¹. The results showed that *B. ribis* EC-01 filamentous fungus has potential to produce citric acid by submerged fermentation using soybean cake and sugarcane molasses agroindustrial residues at times shorter than those reported in the literature, which makes the process economically viable.

Keywords: Biotechnology, Factorial design, Soybean cake, Sugarcane molasses, Filamentous fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido cítrico	16
Figura 2 – Visão geral do catabolismo	17
Figura 3 – Ciclo do ácido cítrico.....	18
Figura 4 – <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 crescido em BDA após 5 dias de cultivo a 28°C.....	35
Figura 5 – Amostras após a centrifugação.....	37
Figura 6 – Frascos em agitador orbital no momento da fermentação para produção de ácido cítrico.....	39
Figura 7 – Frascos após a conclusão da fermentação.....	39
Figura 8 – Filtração de um frasco após a interrupção da fermentação.....	40
Figura 9 – Curva de Calibração para determinar a concentração de ácido cítrico..	41
Figura 10 – Produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria. ribis</i> EC-01 em fermentação submersa utilizando torta de soja como substrato.....	44
Figura 11 – Produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em fermentação submersa utilizando melação de cana como substrato.....	46
Figura 12 – Produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em fermentação submersa utilizando o malte como substrato.....	48
Figura 13 – Superfície de resposta para a produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Planejamento I.....	50
Figura 14 – Superfície de resposta para a produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Planejamento II.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações do ácido cítrico.....	19
Tabela 2 – Levantamento bibliográfico sobre a produção microbológica de ácido cítrico.....	23
Tabela 3 – Meio BDA.....	34
Tabela 4 – Substratos utilizados na fermentação submersa para produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria. ribis</i> EC-01.....	36
Tabela 5 – Níveis de variação para os fatores do planejamento 2 ³ composto central rotacional para avaliação da produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Planejamento I.....	37
Tabela 6 – Níveis de variação para os fatores do planejamento 2 ³ composto central rotacional para avaliação da produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Planejamento II.....	38
Tabela 7 – Composição centesimal (g 100g ⁻¹) da torta de soja.....	43
Tabela 8 – Produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em fermentação submersa utilizando torta de soja como substrato.....	43
Tabela 9 – Composição do Melaço de Cana (%).....	45
Tabela 10 – Composição do Malte (%).....	47
Tabela 11 – Planejamento composto central rotacional para avaliação da produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Planejamento I.....	49
Tabela 12 – Análise de variância (ANOVA) para a produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01.....	50
Tabela 13 – Planejamento composto central rotacional para avaliação da produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 – Planejamento II.....	51
Tabela 14 – Análise de variância (ANOVA) para a produção de ácido cítrico por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido cítrico
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
BDA	Batata Detroxé Agar
CO₂	Dióxido de carbono
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSub	Fermentação Submersa
GenBank	Banco de dados genéticos
h	Horas
ML	melaço de cana
MT	Malte
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido
RPM	Rotações por minuto
TCA	Ácido Tricloroacético
TS	Torta de Soja
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	13
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 – O Gênero <i>Botryosphaeria</i>	15
2.2 – Ácido Cítrico	15
2.3 – Aplicações Do Ácido Cítrico	18
2.4 – Produção De Ácido Cítrico	20
2.5 – Resíduos Agroindustriais	26
2.5.1 – Resíduos Da Cana-De-Açúcar	26
2.5.2 – Resíduos Da Soja	27
2.5.3 – Resíduos De Cerveja	28
2.5.4 – Resíduos Da Produção De Biodiesel	28
2.5.5 – Outros Resíduos	29
2.6 – Meios Sintéticos	31
2.7 – Tempo De Fermentação	31
3 – OBJETIVOS	33
3.1 – Objetivo Geral	33
3.2 – Objetivos Específicos	33
4 – METODOLOGIA	34
4.1 – Materiais	34
4.1.1 – Torta De Soja	34
4.1.2 – Glicerol	34
4.1.3 – Malte	34
4.1.4 – Extrato De Levedura	34
4.1.5 – Melaço de Cana	34
4.1.6 – Meio De Cultivo	34
4.2 – Metodologia Experimental	35

4.2.1 – Micro-Organismo.....	35
4.2.2 – Seleção Das Variáveis Que Influenciam A Produção De Ácido Cítrico Por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	35
4.2.3 – Planejamento Fatorial E Análise Por Superfície De Resposta (MSR) Para A Produção De Ácido Cítrico Por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	37
4.2.3.1 – <i>Planejamento fatorial composto central rotacional I</i>	37
4.2.3.2 – <i>Planejamento fatorial composto central rotacional II</i>	38
4.2.4 – Determinação Da Concentração De Ácido Cítrico	40
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 – Seleção Das Variáveis Que Influenciam A Produção De Ácido Cítrico Por <i>Botryosphaeria Ribis</i> Ec-01	41
5.1.1 –Glicerol.....	41
5.1.2 –Extrato De Levadura	42
5.1.3 – Torta De Soja.....	43
5.1.4 – Melaço De Cana	45
5.1.5 – Malte	47
5.2 – Otimização Da Produção De Ácido Cítrico Por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta.....	48
5.2.1 – Planejamento composto central rotacional I	48
5.2.2 – Planejamento composto central rotacional II	50
6 – CONCLUSÃO	54
7 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....	55
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia é um campo de extrema importância para o desenvolvimento da sociedade. Processos como produção de adubos, tratamento de efluentes, produção de medicamentos, panificação, produção de queijos e bebidas, como cerveja e vinho, não seriam possíveis sem a ação microbiológica. Os microrganismos são capazes de transformar e produzir inúmeras substâncias fundamentais nos mais diversos processos industriais (COPETTI, 2019; DEMAIN, 2000; SAGRILLO et al., 2015)

O ácido cítrico (AC) é uma das substâncias obtidas através da ação de micro-organismos. Ele é um ácido orgânico fraco muito utilizado nas indústrias alimentícias, pois é biodegradável, solúvel em água, não tóxico, antioxidante, acidulante, flavorizante, pode atuar como agente tamponador, conservante e impede o escurecimento de certos alimentos. Ele também é utilizado em indústrias farmacêuticas, de produtos de limpeza e até mesmo para o tratamento de efluentes (KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019; NANGARE et al., 2021 ; VARGAS; MEDINA, 2012; ZHANG et al., 2016).

No início de seu processo produtivo o AC era isolado do limão (BEROVIC; LEGISA, 2007; SACKETT, 2014; VARGAS; MEDINA, 2012). Atualmente sua produção industrial é majoritariamente realizada por via fermentativa utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* e o melaço de cana ou beterraba, amido e hidrolisado de amido como fontes de carbono (KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019)

Outros micro-organismos como *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* (WEST, 2013), *Candida lipolytica* (RANE; SIMS, 1993), *Yarrowia lipolytica* (IMANDI et al., 2008; KAMZOLOVA; MORGUNOV, 2017; PAPANIKOLAOU et al., 2002; RYWIŃSKA et al., 2011), *Trichoderma viride* (EKELEME et al., 2018), *Saccharomycopsis lipolytica* (MADDOX; KINGSTON, 1983) também são capazes de acumular AC, mas o *A. niger* segue como a opção mais vantajosa devido a sua alta taxa de produtividade e capacidade de produção em diferentes substratos (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; DHILLON et al., 2011; KUDZAI, AJAY; AMBIKA, 2016; SAWANT et al., 2018). Contudo, com a crescente demanda industrial por AC, faz-se necessário o estudo de novas rotas de produção, utilizando diferentes micro-organismos e substratos.

Os fungos filamentosos são caracterizados por sua capacidade de produzir compostos com diversas aplicações tais como enzimas, ácidos orgânicos e metabólitos secundários (ADRIO; DEMAIN, 2003; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020; WÖSTEN, 2019). O fungo filamentoso *Botryosphaeria ribis* EC-01 é um fitopatógeno estudado devido à sua capacidade de produção de enzimas como lipases e lacases (ANDRADE et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; MESSIAS et al., 2009). Porém, na literatura não se encontram relatos que explorem o potencial de produção de AC por este micro-organismo.

Logo, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de produção de AC utilizando o fungo *B. ribis* EC-01 por fermentação submersa (FSub) utilizando como substratos diferentes resíduos agroindustriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Gênero *Botryosphaeria*

O gênero *Botryosphaeria* foi amplamente estudado devido a sua fitopatogenicidade, pois são capazes de afetar praticamente todas as plantas lenhosas e são amplamente distribuídos em regiões de clima temperado e tropical (SALDANHA et al., 2007).

A doença associada a família Botryosphaeriaceae, conhecida como seca-dos-ramos, é caracterizada por lesões e cancrios nas extremidades da haste principal, nos galhos, ramos e nos pontos de inserção, que podem acarretar o secamento dos ramos e, em casos mais extremos, a morte da planta. Condições de estresse hídricos ou biológico deixam a planta mais suscetível aos efeitos supracitados (BRASIL, 2002; COLTURATO, 2009; SLIPPERS et al., 2017).

Fungos são potenciais produtores de enzimas, que podem ser amplamente utilizadas em diversos processos industriais (GEOFFRY; ACHUR, 2018; MESSIAS, 2008; WÖSTEN, 2019). Nesse contexto o potencial de produção enzimática do gênero *Botryosphaeria* tem sido avaliado em diversos estudos (BARBOSA; DEKKER; ST. HARDY, 1996; VASCONCELOS et al., 2000). A espécie *B. rhodina* se destacou na produção de lacase (SALDANHA et al., 2007; SRIVASTAVA et al., 2013), enquanto o ascomiceto *B. ribis* EC-01 apresentou uma alta eficiência para produção de lipase (ANDRADE et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; MESSIAS et al., 2009).

2.2. Ácido Cítrico

O ácido cítrico (AC), 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico, é um ácido orgânico carboxílico presente em abundância nos organismos vivos. Ele é responsável pelo sabor ácido das frutas cítricas, como limões e laranjas, e está envolvido em diversos processos metabólicos dos seres vivos. A Figura 1 mostra a fórmula estrutural do AC (ESKIN; HOEHN, 2015; MCMURRY, 2016; VOET; VOET, 2013).

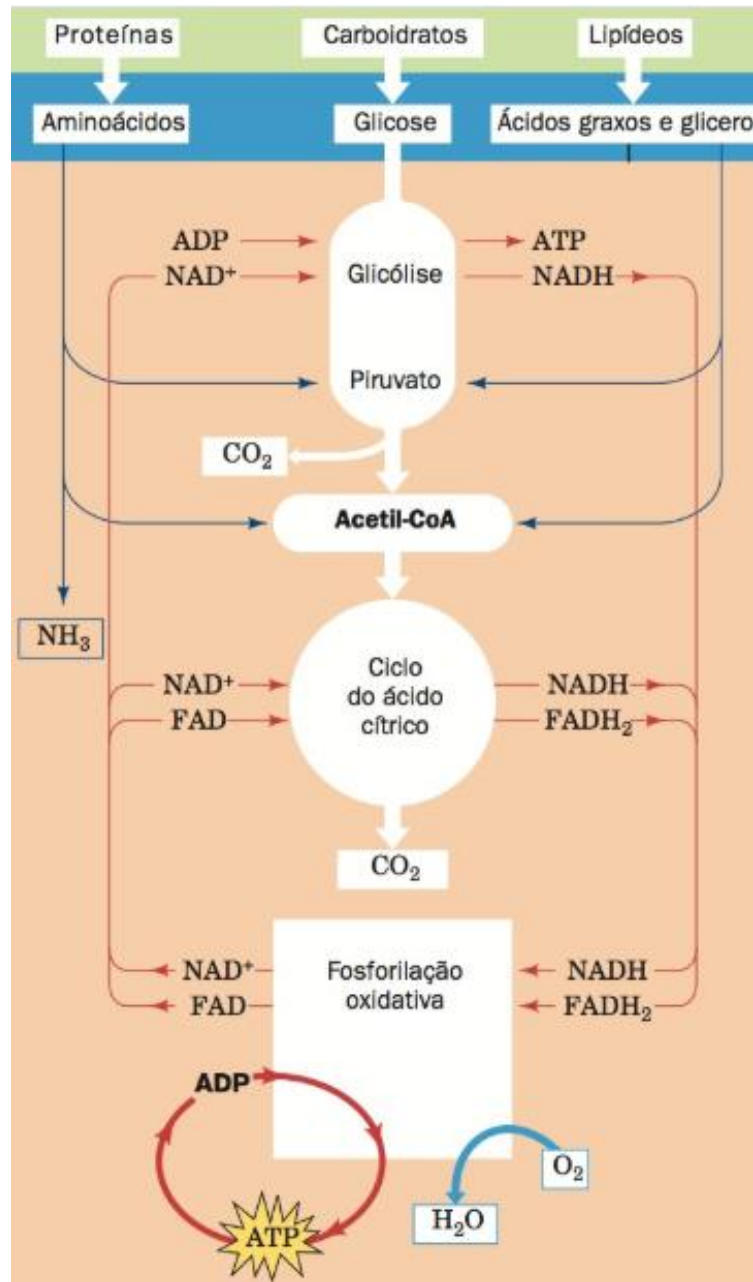
Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido cítrico



Fonte: MCMURRY (2016)

O ciclo do AC é um circuito fechado de reações que compõe o terceiro estágio do catabolismo. O ácido pirúvico, proveniente da quebra da glicose, glicólise, é metabolizado em Acetil Coenzima A (Acetil-CoA) na presença de oxigênio. A Acetil-CoA entra no ciclo do AC por meio da adição ao oxaloacetato em uma reação aldólica para formar o citrato. Após uma série de reações o ciclo do AC se completa com a formação do oxaloacetato pela oxidação do (S)-malato. O ciclo produz duas moléculas de CO₂ e a redução das coenzimas NAD⁺ e FAD, que devem ser reoxidadas através de uma cadeia de transporte de elétrons. O processo descrito pode ser observado na Figura 2 (MCMURRY, 2016; RODWELL et al., 2017; VOET e VOET, 2013).

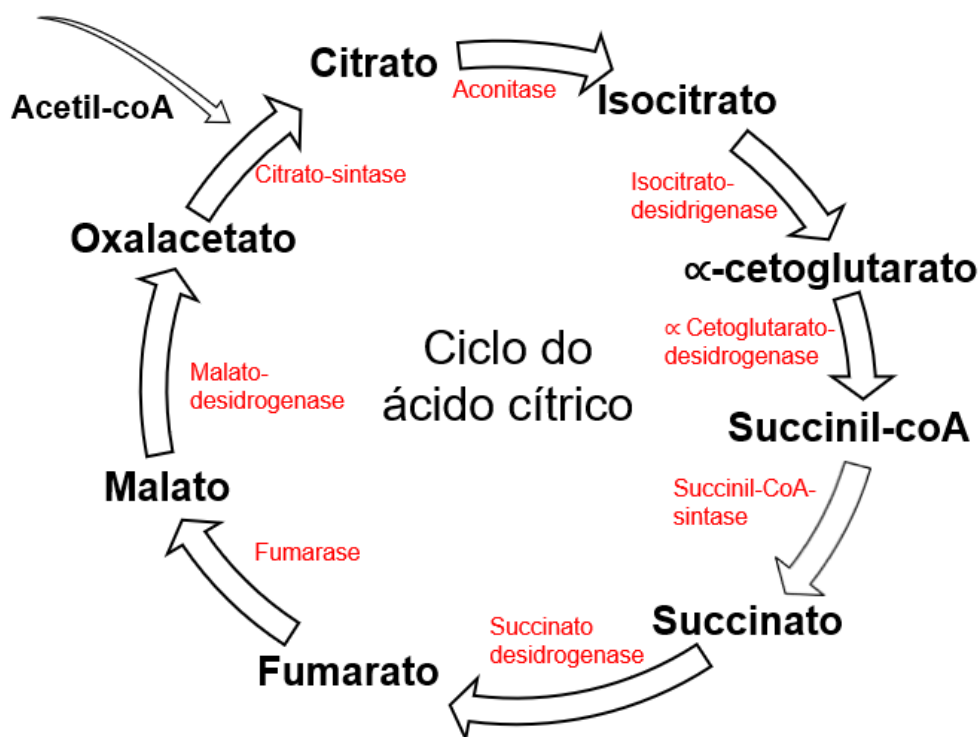
Figura 2: Visão geral do catabolismo



Fonte: VOET e VOET (2013)

A glicólise acontece no citoplasma celular e o ciclo do AC, também conhecido como ciclo de Krebs, ocorre na mitocôndria. A Figura 3 mostra com mais detalhes as reações que ocorrem no ciclo do AC, permitindo seu acúmulo por certos micro-organismos (MAX et al., 2010).

Figura 3: Ciclo do ácido cítrico



Fonte: Autoria própria (2020)

Além de ser extremamente importante para o metabolismo dos organismos vivos, o AC também é amplamente utilizado em diversos setores industriais.

2.3. Aplicações Do Ácido Cítrico

O AC é um aditivo alimentar (INS 330) (BRASIL, 2019) amplamente utilizado, podendo ser empregado como acidulante, flavorizante, antioxidante, conservante ou agente tamponador na produção de refrigerantes, sucos, sorvetes, balas. Com a alta demanda, a indústria alimentícia consome cerca de 75 % da produção mundial de AC (IHS MARKIT, 2020; KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019; MUÑOZ-VILLA et al., 2014; SAWANT et al., 2018). O AC também é utilizado na conservação de frutos, atuando no controle de doenças microbianas, como maçã e caju que são muito suscetíveis à infecção pós colheita por *Rhizopus*, *Colletotrichum* e *Penicillium*, e na inibição de enzimas que causam o escurecimento dos frutos (BERRY; SARGENT, 2011; DUANGMAL et al., 2017; GOYENECHE et al., 2014; SANCHÍS et al., 2016).

O setor de indústrias químicas demanda cerca de 15 % da produção de AC, sendo utilizado em metalúrgicas, indústrias têxteis, e também na produção de

produtos de limpeza (KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019; SHOW et al., 2015; SAWANT et al., 2018; MUÑOZ-VILLA et al., 2014). Diversos estudos mostram a eficácia do seu uso no tratamento de efluentes contendo metais pesados, devido sua capacidade de complexar metais como ferro e cobre. A característica atóxica do AC tem sido um ponto positivo no desenvolvimento de novas técnicas ecológicas de tratamentos de efluentes (DI PALMA MECOZZI, 2007; IHS MARKIT, 2020; MENG et al., 2020).

Os 10 % restantes são destinados a indústrias farmacêuticas e de cosméticos, nas quais o AC pode ser utilizado como flavorizante, antioxidante, anticoagulante e agente tamponador (KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019; NANGARE et al., 2021; SAWANT et al., 2018; SHOW et al., 2015; SOCCOL et al., 2006).

O AC também é utilizado como suplemento para alimentação animal. Estudos mostram sua eficácia para ações antimicrobianas, anti-inflamatórias e nutricionais (DAI et al., 2018; FERREIRA et al., 2020; KHAJEPOUR; HOSSEINI, 2012; SWAGGERTY et al., 2020; ZHAO et al., 2019).

Diante das inúmeras aplicações que o AC possui, a Tabela 1 mostra um levantamento bibliográfico sobre suas aplicações em diferentes setores industriais.

Tabela 1 – Aplicações do ácido cítrico

Aplicação	Uso	Referência
Nutrição animal	Suplemento alimentar para o crescimento de leitões	(FERREIRA et al., 2020)
	Suplemento alimentar em farinha de peixe para baleias	(KHAJEPOUR; HOSSEINI, 2012)
	Suplemento alimentar para melhorar o sistema imunológico de aves	(SWAGGERTY et al., 2020)
	Suplemento alimentar anti-inflamatório para peixes	(DAI et al., 2018; ZHAO et al., 2019)
Alimentação	Inibição enzimática para prevenção de escurecimento de frutos	(DUANGMAL et al., 2017)
	Controle microbiano em ostras cruas	(MAHMOUD, 2014)
	Melhoria da qualidade de filés de robalo	(QIU et al., 2014)
	Inibição enzimática para prevenção de escurecimento e controle microbiano em caquis	(SANCHÍS et al., 2016)
Tratamento de efluentes	Agente quelante na mobilização de metais pesados em sedimentos marítimos	(DI PALMA; MECOZZI, 2007)
	Lixiviação de baterias de lítio para recuperação de Li, Co, Ni e Mn	(MENG et al., 2020)
	Agente quelante na extração de metais pesados em lodo industrial e municipal	(WANG et al., 2015)

	Inibidor de incrustação de fosfato e cálcio ecologicamente correto	(ZHANG et al., 2016)
Medicina	Agente protetor contra lesão hepática	(KIM et al., 2019)
	Síntese de nanopartículas para aplicações médicas	(NATARAJ; REDDY; REDDY, 2020)
	Agente retardador para a degeneração óssea	(WANG et al., 2019)
	Agente reticulante de filmes de hidrogel de carboximetilcelulose sódica e hidroxipropilmetilcelulose para ser usado na cicatrização de feridas	(DHARMALINGAM; ANANDALAKSHMI, 2019)
Indústria Farmacêutica	Solvente eutético para dissolver medicamentos pouco solúveis em água	(GUINET; PACCOU; HÉDOUX, 2020)
	Agente reticulante na preparação de filme de hidrogel de carboximetilcelulose e poli (óxido de etileno) para liberação controlada de fármacos	(KANAFI; RAHMAN; ROSDI, 2019)
	Promove o aumento da espessura epidérmica em peles fotoenvelhecidas	(BERNSTEIN et al., 1997; DITRE et al., 1996)
Indústria de Cosméticos	Agente modificador na fabricação de nanopartículas de amido para melhoria da estabilidade térmica e hidrofobicidade para aplicação na indústria de cosméticos	(MISKEEN et al., 2021)
	Conservante na estabilidade térmica da extração da C-ficocianina, um pigmento azul encontrado em cianobactéria que pode ser utilizado como corante natural em cosméticos	(PAN-UTAI; KAHAPANA; IAMTHAM, 2018)
	Agente reticulante para melhoria de embalagens produzidas com colágeno bovino	(ANDONEGI; DE LA CABA; GUERRERO, 2020)
Indústria Química	Catalisador homogêneo para pré-tratamento de bagaço de cana para melhor conversão de açúcar	(GOMES et al., 2020)
	Agente reticulante para melhoria de propriedades mecânicas e redução de absorção de água em fibra de banana e trigo	(NATARAJ et al., 2018)

Fonte: Autoria Própria (2021)

2.4. Produção De Ácido Cítrico

O AC foi primeiramente isolado a partir do suco de limão, em 1784, por Karl Wilhelm Scheele, mas a sua comercialização foi ocorrer somente em 1826, na Inglaterra por John e Edmund Sturge, e para sua produção também eram utilizados limões importados da Itália. Em 1893 Carl Wehmer estudou o acúmulo de AC pela fermentação do fungo *Penicillium glaucum* em um meio de cultura contendo sacarose. A produção microbiológica só atingiu uma escala industrial nos Estados Unidos em 1923, após a descoberta do potencial de produção do fungo *A. niger* por

James N. Currie, em 1917 (BEROVIC; LEGISA, 2007; CURRIE, 1917; GREWAL; KALRA, 1995; MAX et al., 2010; SACKETT, 2014; VARGAS; MEDINA, 2012).

Atualmente, o método tradicional de extração por meio de frutas cítricas ainda é utilizado em alguns países como Grécia e México, no entanto sua produção não é significativa. A fermentação utilizando-se micro-organismos, principalmente o *A. niger*, se tornou a rota de produção mais econômica, sendo responsável por cerca de 99% da produção mundial (BEROVIC; LEGISA, 2007; COPETTI, 2019; KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019; MUÑOZ-VILLA et al., 2014; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são caracterizados por sua patogenicidade em plantas e animais. Em humanos imunossuprimidos o *Aspergillus* sp. pode causar a aspergilose, uma infecção grave que afeta os pulmões (SALES, 2009). No entanto, esse fungo possui grande importância comercial, sendo utilizado na produção de enzimas, ácidos orgânicos e outros metabólitos secundários (COPETTI, 2019; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020; WÖSTEN, 2019).

Micro-organismos como *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* (WEST, 2013), *Candida lipolytica* (RANE; SIMS, 1993) *Yarrowia lipolytica* (IMANDI et al., 2008; KAMZOLOVA; MORGUNOV, 2017; PAPANIKOLAOU et al., 2002; RYWIŃSKA et al., 2011), *Trichoderma viride* (EKELEME et al., 2018) e *Saccharomycopsis lipolytica* (MADDOX; KINGSTON, 1983) são capazes de acumular AC. No entanto o *A. niger* é o micro-organismo mais utilizado na sua produção devido à sua facilidade de manuseio e alta produtividade em diversas matérias primas. O *A. niger* também produz outros tipos de ácidos orgânicos e enzimas como amilase, celulase, pectinase e lipase (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; COPETTI, 2019; MUÑOZ-VILLA et al., 2014; PAPANIKOLAOU et al., 2002; TROIANO; ORSAT; DUMONT, 2020).

A produção de AC pode ocorrer por fermentação submersa (FSub) e fermentação em estado sólido (FES). A produção por FSub é a mais utilizada industrialmente devido ao seu baixo custo, baixo risco de contaminação e alta produtividade, porém o processo deve ser controlado precisamente, pois esse método é muito influenciado por fatores como temperatura, pH e concentração dos substratos. A FES se caracteriza por sua simplicidade na produção, uma vez que

o substrato funciona tanto como fonte de nutrientes quanto como suporte para o micro-organismo, logo resíduos agroindustriais, como bagaços e cascas de frutas, têm um alto potencial de utilização nesse processo. Assim como no processo de FSub, a FES também apresenta como vantagem o baixo custo e a alta produtividade, além do baixo consumo de energia, no entanto esse processo apresenta dificuldades para produção em larga escala (GREWAL; KALRA, 1995; KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019; SAWANT et al., 2018; SHOW et al., 2015).

No que tange aos substratos utilizados na produção de AC, o melaço de cana é o substrato mais utilizado industrialmente (KIRIMURA; YOSHIOKA, 2019). O melaço de cana é um subproduto da indústria do açúcar amplamente utilizado em processos fermentativos como fonte de carbono, devido a sua composição rica em açúcares, como sacarose, glicose e frutose (TECLU et al., 2009).

O agronegócio é extremamente importante para a economia brasileira, correspondendo a 21,4 % do PIB do país em 2019. O Brasil é o pioneiro na produção e exportação de produtos como soja, açúcar, café e suco de laranja (BRASIL, 2021). Neste cenário o Brasil também se mostra um potencial produtor de resíduos agroindustriais. Um dos grandes desafios ambientais da atualidade é a gestão adequada dos resíduos gerados em diferentes processos industriais. Logo, diversos estudos têm avaliado o potencial de utilização de resíduos agroindustriais como substratos na produção de AC em FSub e FES.

A Tabela 2 mostra a produção de AC utilizando FSub e FES com fungos filamentosos e leveduras em diferentes substratos. A unidade de produção dos estudos presentes na Tabela 2 é expressa em quantidade de AC produzida por quantidade de substrato utilizado.

Tabela 2 – Levantamento Bibliográfico sobre a produção microbiológica de ácido cítrico

Micro-organismo	Substrato	FES	FSub	Tempo (h)	Eficiência	Unidade	Referência	
Fungo Filamentoso	<i>A. niger</i>		x	96	12,30	g L ⁻¹	(HANG et al., 1977)	
	<i>A. niger</i>		x	336	19,00	g L ⁻¹	(ROUKAS; KOTZEKIDOU, 1986)	
	<i>A. niger</i>		x	168	72,00	g L ⁻¹	(ISLAM; BEGUM; CHOUDHURY, 1986)	
	<i>A. niger</i>	Bagaço de maçã	x	120	90,00	g Kg ⁻¹	(HANG; WOODAMS, 1986)	
	<i>A. niger</i>	Casca de Kiwi	x	96	100,00	g Kg ⁻¹	(HANG; LUH; WOODAMS)	
	<i>A. niger</i>	Resíduo de soja	x	264	51	g Kg ⁻¹	(KHARE; JHA; GANDHI, 1995)	
	<i>A. niger</i>	Bagaço de cana			48,70			
	<i>A. niger</i>	Bagaço de Mandioca	x	120	88,00	g Kg ⁻¹	(VANDENBERGHE; SOCCOL; PANDEY, 2000)	
		Casca de café			12,70			
	<i>A. niger</i>	Melaço de cana tratado		x	168	96,10	g L ⁻¹	(IKRAM-UL et al., 2004)
	<i>A. niger</i>	Bagaço de mandioca	x	144	269,00	g Kg ⁻¹	(PRADO et al., 2005)	
	<i>A. niger</i>	Melaço de cana tratado			98,08			
		Melaço de beterraba tratado		x	152	113,50	g L ⁻¹	(LOTFY; GHANEM; EL-HELOW, 2007)
	<i>A. niger</i>	Bagaço de cana tratado	x	120	137,60	g Kg ⁻¹	(KHOSRAVI-DARANI; ZOGHI, 2008)	
	<i>A. niger</i>	Cachos vazios de dendê	x	144	337,94	g Kg ⁻¹	(BARI et al., 2009)	
	<i>A. niger</i>	Resíduo de abacaxi	x	120	60,61	g Kg ⁻¹	(KAREEM; AKPAN; ALEBIOWU)	
	<i>A. niger</i>	Melaço de cana e abóbora		x	312	14,86	g L ⁻¹	(MAJUMDER et al., 2010)
	<i>A. niger</i>	Cachos vazios de dendê	x	168	367,40	g Kg ⁻¹	(ALAM et al., 2011)	
		Bagaço de maçã	x			128,00		
		Resíduo da cerveja	x		72	14,00	g Kg ⁻¹	
<i>A. niger</i>	Turfa	x			31,60		(DHILLON et al., 2011)	
	Lodo de filtração de maçã		x	96	9,00	g L ⁻¹		
	Soro do leite		x		6,50			

<i>A. niger</i>	Meio sintético Prescott & Dunn enriquecido	x	24	62,90	g L ⁻¹	(PASTORE; HASAN; ZEMPULSKI, 2011)
<i>A. niger</i>	Casca de laranja	x	85	193,20	g Kg ⁻¹	(TORRADO et al., 2011)
<i>A. niger</i>	Xarope de tâmara	x	144	56,70	g L ⁻¹	(MOSTAFA; ALAMRI, 2012)
<i>A. niger</i>	Torta de tunge com Glicerol	x	168	350,00	g Kg ⁻¹	(SCHNEIDER et al., 2014)
<i>A. niger</i>	Casca de mandioca	x	84	88,73	g L ⁻¹	(ADEOYE; LATEEF; GUEGUIM-KANA, 2015)
<i>A. niger</i>	Melaço de cana tratado	x	168	14,17	g L ⁻¹	(IQBAL et al., 2015)
<i>A. niger</i>	Mandioca e água residual de produção de ácido cítrico	x	60	142,40	g L ⁻¹	(XU et al., 2016)
<i>A. niger</i>	Casca de banana	x	192	51,68	g L ⁻¹	(ABBAS et al., 2016)
<i>A. niger</i>	Extrato de arroz	x	120	14,40	g L ⁻¹	(KUDZAI; AJAY; AMBIKA, 2016)
	Extrato de Batata	x	96	1,47	g L ⁻¹	
<i>A. niger</i>	Palha de milho		192	100,04	g L ⁻¹	(ZHOU; MENG; BAO, 2017)
<i>A. niger</i>	Casca de batata e torta de soja	x	144	0,40453 0,2976	g L ⁻¹	(MAKUT; EKELEME, 2018)
<i>T. viride</i>	Glicose e Torta de soja	x	144	15,17	g L ⁻¹	(EKELEME et al., 2018)
<i>A. niger</i>	Melaço de beterraba e peptona de penas de galinha	x	168	68,80	g L ⁻¹	(OZDAL; BASARA, 2019)
<i>A. niger</i>	soro de queijo	x	240	2,379	g L ⁻¹	(MAGALHÃES et al., 2019)
<i>A. niger</i>	Casca de Mandioca	x	48	1,82	g L ⁻¹	(AJALA et al., 2020)
<i>A. niger</i>	Casca de Batata-Doce	x	168	3,22	g L ⁻¹	(ABOYEJI et al., 2020)
<i>A. niger</i>	Casca de romã seca	x	192	278,50	g Kg ⁻¹	(ROUKAS; KOTZEKIDOU, 2020)
<i>A. niger</i>	Casca de banana	x	48	124,00	g Kg ⁻¹	(CHYSIRICHOTE, 2020)

Levedura	<i>C. lipolytica</i>	Meio sintético de glicose	x	128	78,50	g L ⁻¹	(RANE; SIMS, 1993)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glicerol	x	110	35,00	g L ⁻¹	(PAPANIKOLAOU et al., 2002)
	<i>Y. lipolytica</i>	Resíduo de Abacaxi	x	144	202,35	g Kg ⁻¹	(IMANDI et al., 2008)
	<i>Y. lipolytica</i>	Glicerol	x	550	97,80	g L ⁻¹	(RYWIŃSKA et al., 2011)
	<i>C. parapsilosis</i>	Glicerol bruto de biodiesel de soja	x	168	11,30	g L ⁻¹	(WEST, 2013)
	<i>C. guilliermondii</i>				10,40		
	<i>Y. lipolytica</i>	Meio sintético de glicose	x	144	85,00	g L ⁻¹	(KAMZOLOVA; MORGUNOV, 2017)
	<i>S. cerevisiae</i>	Meio sintético e Glicose			0,105		
	<i>C. tropicalis</i>	Meio sintético e Nitrato de sódio	x	168	0,132	g L ⁻¹	(AFOLABI, ADEYEMO e BALOGUN, 2018)
	<i>P. guilliermondii</i>				0,115		
	<i>Y. lipolytica</i>	Glicerol	x	144	75,90	g L ⁻¹	(RZECHONEK et al., 2019)
	<i>Y. lipolytica</i>	Resíduos de moagem de milho	x	552	38,00	g L ⁻¹	(CAVALLO et al., 2020)
<i>Y. lipolytica</i>	Meio sintético de Glicose, frutose e sacarose	x	144	129,00	g L ⁻¹	(ZYWICKA et al., 2020)	

Fonte: Autoria Própria (2021)

Como é possível observar, a grande maioria dos estudos encontrados foca na produção de AC por meio do *A. niger* como micro-organismo produtor. Existe uma grande variedade de estudos que exploram o potencial de utilização de resíduos agroindustriais como substratos para o desenvolvimento de novos processos de produção de AC. Os resultados mostram que os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substratos na produção de AC.

2.5. Resíduos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais usados como substrato no presente estudo foram a torta de soja (TS), glicerol, malte (MT), extrato de levedura, e melação de cana (ML). Logo, a pesquisa bibliográfica foi realizada com enfoque nos resíduos citados.

Os resíduos TS e glicerol foram escolhidos pois já foram utilizados como substratos em FSub para a produção da enzima lipase pelo fungo filamentosso *Botryosphaeria ribis* no estudo de Andrade (2013).

Os resíduos MT e extrato de levedura foram escolhidos com base nos dados levantados na literatura e devido a sua ampla disponibilidade, uma vez o mercado cervejeiro brasileiro vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Em 2019 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) registrou 1209 cervejarias (MAPA, 2018) no Brasil.

O ML foi escolhido devido a sua ampla utilização para a produção de AC na indústria e na literatura.

2.5.1. Resíduos Da Cana-de-açúcar

O ML foi utilizado em estudos que buscavam otimizar a produção de AC pelo micro-organismo *A. niger* através da mutação do mesmo (IKRAM-UL et al., 2004; IQBAL et al., 2015; ISLAM; BEGUM; CHOUDHURY, 1986; LOTFY; GHANEM; EL-HELOW, 2007; MAJUMDER et al., 2010). A escolha deste substrato e do *A. niger* nestas condições é muito comum, pois são as mesmas usadas industrialmente na produção de AC. Logo, a busca é focada nas melhorias dos processos já existentes.

Em estudos onde o ML é usado como substrato, o micro-organismo *A. niger* sofre algum tipo de mutação, seja por raios gama (ISLAM; BEGUM; CHOUDHURY, 1986; MAJUMDER et al., 2010) ou radiação ultravioleta (IKRAM-UL et al., 2004; IQBAL et al., 2015; LOTFY; GHANEM; EL-HELOW, 2007).

Ikram-UL et al (2004) e Lotfy, Ghanem e Elhelow (2007) se destacaram por seu alto rendimento de 96,10 e 98,08 gramas de AC produzido por litro de substrato (g L^{-1}) respectivamente. Majumder et al (2010) e Iqbal et al (2015) alcançaram resultados menores de $14,86 \text{ g L}^{-1}$ e $14,17 \text{ g L}^{-1}$. O estudo de Majumder et al (2010) destaca-se por mostrar que a junção de substratos pode favorecer o processo, uma vez que o ML, usado como único substrato, forneceu uma produção de $4,88 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que a partir da mistura deste com o melão de abóbora foi obtida uma produtividade de $14,86 \text{ g L}^{-1}$.

Na produção de AC por FES o bagaço de cana foi utilizado como substrato nos estudos de Vandenberghe et al (2000) e Khosravi-Darani e Zoghi (2008). Vandenberghe et al (2000) compararam o potencial de produção de AC de três resíduos agroindustriais, os bagaços de cana e de mandioca e a casca de café, atingindo uma produção de AC máxima de 48,70 gramas de AC por quilo de substrato (g Kg^{-1}), $88,00 \text{ g Kg}^{-1}$ e $12,70 \text{ g Kg}^{-1}$, respectivamente, com o fungo *A. niger*. A alta produtividade do bagaço de mandioca nesse estudo, em comparação com os outros substratos, pode ser explicada pela presença de componentes como cálcio, fósforo, e vitamina B₂.

Khosravi-Darani e Zoghi (2008) também utilizaram o fungo *A. niger* como micro-organismo produtor e seu estudo comparou a produção de AC com o bagaço de cana pré-tratado (ácido, alcalino ou ureia) com o não tratado. O pré-tratamento com ureia se mostrou a opção mais eficaz, obtendo uma produção de $137,60 \text{ g Kg}^{-1}$ em escala laboratorial. Após obtidas as condições ótimas de produção o experimento foi repetido em escala utilizando um biorreator de 20 L, nessas condições a produção máxima de AC foi de $82,38 \text{ g Kg}^{-1}$.

2.5.2. Resíduo De Soja

A soja possui diversas aplicações industriais, portanto, os estudos levantados exploram diferentes tipos de produtos e resíduos. A torta de soja (TS) é um subproduto da indústria de óleo, proveniente da moagem dos grãos, sua composição é rica em aminoácidos e carboidratos (UZUN; PÜTÜN; PÜTÜN, 2006).

Ekeleme et al (2018) incorporaram a TS à glicose e obtiveram uma produção de AC de $15,17 \text{ g L}^{-1}$ por FSub utilizando o fungo *T. viride*. Esse estudo mostrou que concentrações elevadas de açúcar podem diminuir a produção de AC gerando uma

quantidade indesejada de açúcares residuais. Makut e Ekeleme (2018) utilizaram cascas de batata como substrato e TS como fonte suplementar de nitrogênio. Foram utilizados como micro-organismos os fungos *A. niger* e *T. viride*, em FSub, obtendo uma taxa máxima de produção de AC de 0,40 g L⁻¹ e 0,29 g L⁻¹, respectivamente.

Khare, Jha e Gandhi (1995) analisaram o potencial de utilização do resíduo Okara, um subproduto da indústria de leite de soja e tofu, como substrato. Novamente o micro-organismo *A. niger* foi utilizado em FES com produção de 5,10 g de AC para cada 100g de substrato (51 g Kg⁻¹).

2.5.3. Resíduo De Cerveja

Oitenta por cento dos resíduos gerados em cervejarias são provenientes da extração dos grãos de malte para a produção do mosto. Sua composição é rica em fibras e proteínas (MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014; SKEND; HARASYM; GALANAKIS, 2018). Na biotecnologia, o malte residual pode ser bioconvertido pelo fungo medicinal *Hericium erinaceus* (WOLTERS et al., 2016), na produção de ácido láctico (LIGUORI et al., 2015) e lipídios (PATEL et al., 2018).

O resíduo de cerveja foi utilizado como substrato para a produção de AC por FES no estudo de Dhillon et al. (2011) atingindo uma produção de 14,00 g Kg⁻¹. Roukas e Kotzekidou (1986) e Hang et al. (1977) realizaram a produção de AC com resíduo cervejeiro em FSub atingindo uma produção de 19,00 g L⁻¹ e 12,30 g L⁻¹, respectivamente. Todos os estudos utilizaram o fungo filamentosso *A. niger* como micro-organismo produtor (DHILLON et al., 2011; HANG et al., 1977; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 1986).

2.5.4. Resíduos Da Produção De Biodiesel

O glicerol (C₃H₈O₃), também conhecido como glicerina, é um subproduto gerado em larga escala na produção de biodiesel. Alguns estudos apontam o glicerol como fonte de carbono para espécies de fungos filamentosos, como *A. niger*, *B. rhodina* MAMB-05 e *B. ribis* EC-01, na produção de enzimas e ácido oxálico (ANDRADE et al., 2013; ANDRÉ et al., 2010; MESSIAS et al., 2009). Estudos demonstram que o glicerol se mostrou um substrato eficaz e muito utilizado para a fermentação de AC com a levedura *Y. lipolytica* (IMANDI et al., 2008; PAPANIKOLAOU et al., 2002; RYWIŃSKA et al., 2011; RZETCHONEK et al., 2019).

Os estudos de Papanikolaou et al (2002), Rywińska et al (2011) e Rzechonek et al (2019) utilizaram a levedura *Y. lipolytica*, em Fsub, e alcançaram produções máximas de 35,00 g L⁻¹, 97,80 g L⁻¹ e 75,90 g L⁻¹, respectivamente (PAPANIKOLAOU et al., 2002; RYWIŃSKA et al., 2011). O glicerol também foi utilizado como em FSub por West (2013) utilizando diferentes espécies de *Candida*. Esse foi o único estudo encontrado que utiliza as leveduras *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* como micro-organismos produtores. A produção máxima de AC obtida foi de 11,3 g L⁻¹ e 10,4 g L⁻¹ respectivamente. As espécies *C. catenulata*, *C. tropicalis* e *C. rugosa* também foram testadas, porém suas taxas de produção não foram satisfatórias (WEST, 2013).

Em FES o glicerol foi utilizado como fonte adicional de carbono para a torta de tunge no estudo de Schneider et al (2014). A adição de 20 % de glicerol no substrato proporcionou a produção de 350 g L⁻¹. Esse estudo também mostrou que o excesso de substrato pode atrapalhar o metabolismo do fungo, uma vez que as taxas de produções mais baixas foram obtidas com adição de 40 % de glicerol (SCHNEIDER et al., 2014). O efeito negativo na produção de AC causado pelo excesso de glicerol também foi observado por Chatzifragkou et al. (2011), que avaliaram a capacidade de conversão do glicerol em metabólitos com valor agregado em quinze micro-organismos diferentes (CHATZIFRAGKOU et al., 2011).

2.5.5. Outros Resíduos

Dentre os relatos na literatura com resíduos agroindustriais, os resíduos da mandioca se destacaram tanto pela produção quanto pela frequência de estudos em que eles são utilizados. A casca e o bagaço, resíduo gerado no processo de extração do amido de mandioca, são ricos em fibras e carbono, logo, podem ser utilizados como substratos na produção de AC (PONDJA; PERSSON; MATSINHE, 2017; VANDENBERGHE; SOCCOL; PANDEY, 2000).

Os resíduos de mandioca se mostraram eficazes como substrato na produção de AC tanto em FES quanto em FSub, obtendo valores de produção maiores do que os resíduos da cana-de-açúcar, como apontado por Vandenberghe et al (2000) onde o bagaço de cana tingiu uma produção de 48,70 g Kg⁻¹ e o bagaço de mandioca produziu 88,00 g Kg⁻¹. Prado et al (2005) avaliaram o uso do *A niger* e do bagaço de mandioca como substrato em escala semi-piloto comparando a eficiência de dois tipos de biorreatores. O reator de tambor horizontal obteve a melhor produção, 269,00 g

Kg⁻¹ em 144 h. O reator de bandeja forneceu uma produção de 263,00 g Kg⁻¹ após 120 h, mostrando-se mais vantajoso em termos de custos e economia de energia.

Em FSub, Adeoye, Lateef e Gueguim-Kana (2015) também mostraram que a casca que mandioca pode ser equiparada ao ML na produção de AC. Nesse estudo, a produção de AC por cepas de *A niger* geneticamente modificadas por radiação ultravioleta foi de 88,70 g L⁻¹, resultado similar aos estudos que utilizam o ML como substrato. Já Ajala et al (2020), utilizaram o fungo *A. niger* sem modificação e, obtiveram produção máxima de 1,82 g L⁻¹ em FSub após 48 h e 4,9 g L⁻¹ por FES após 96 h.

Xu et al (2016) propuseram uma produção mais limpa de AC ao reincorporar os efluentes da própria produção de AC por *A. niger* novamente no processo. O efluente foi tratado por meio de digestão anaeróbia, purificação de ar e eletrodialise e após o tratamento, o efluente foi usado como água na produção de AC, com uma produção média de 142,40 g L⁻¹. Para fins de comparação, o mesmo processo fermentativo foi realizado com a água da torneira, com produção média de 141,60 g L⁻¹. Este estudo apresentou os maiores valores de produção de AC em FSub presentes na Tabela 2

Dentre os outros resíduos encontrados no levantamento bibliográfico destacam-se o melaço de beterraba (LOTFY; GHANEM; EL-HELOW, 2007), melaço de abóbora (MAJUMDER et al., 2010), resíduos de maçã (DHILLON et al., 2011; HANG; WOODAMS, 1986), resíduos do leite (DHILLON et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2019), xarope de tâmara (MOSTAFA; ALAMRI, 2012) extrato de arroz (KUDZAI; AJAY; AMBIKA, 2016), resíduos de batata (ABOYEJI et al., 2020; KUDZAI; AJAY; AMBIKA, 2016; MAKUT; EKELEME, 2018), resíduos de milho (CAVALLO et al., 2020; ZHOU, MENG; BAO, 2017), melaço de beterraba e peptona de penas de galinha (OZDAL; BASARA, 2019), casca de café (VANDENBERGHE; SOCCOL; PANDEY, 2000), cachos vazios de dendê (ALAM et al., 2011; BARI et al., 2009), resíduos de abacaxi (IMANDI et al., 2008; KAREEM; AKPAN; ALEBIOWU), casca de laranja (TORRADO et al., 2011), turfa (DHILLON et al., 2011), torta de tunge (SCHNEIDER et al., 2014), casca de romã (ROUKAS e KOTZEKIDOU, 2020), casca de kiwi (HANG, LUH e WOODAMS), e casca de banana (ABBAS et al., 2016; CHYSIRICHOTE, 2020). A diversidade de estudos mostra que diferentes resíduos agroindustriais podem ser utilizados como substratos na fermentação de AC.

2.6. Meios Sintéticos

Os meios sintéticos também são utilizados quando se pretende a otimização de produção. Pastore, Hasan e Zempulski (2011) suplementaram o meio sintético de Prescott e Dunn com fontes de nitrogênio (uréia, peptona e sulfato de amônio) e sacarose a fim de se avaliar a influência da composição do substrato na produção de AC. O estudo mostrou que a associação de fontes de nitrogênio no substrato aumenta o rendimento do processo fermentativo.

Kamzolova e Morgunov (2017) também estudaram os efeitos da disponibilidade de nutrientes na produção de ac pela levedura *Y. lipolytica*. Diferente do estudo de Pastore, Hasan e Zempulski (2011), a deficiência de nitrogênio no cultivo da *Y. lipolytica* favoreceu o acúmulo de AC.

O estudo de Rane e Sims (1993) escolheu a levedura *C. lipolytica* como micro-organismo mais adequado para a produção de AC, dentre as leveduras *C. guilliermondii* e *Y. lipolytica*. Para a produção foi utilizado meios sintéticos com diferentes concentrações de glicose e com limitação da quantidade disponível de nitrogênio. A produtividade obtida nesse estudo foi de 78,50 g L⁻¹ em um meio contendo 150,00 g L⁻¹ de glicose mostrando que o aumento da concentração de glicose e da taxa de C/N a produção de AC é favorecida

Zywicka et al. (2020) utilizaram o meio sintético para comparar o potencial de produção de AC entre a levedura *Y. lipolytica* imobilizada ou livre. As leveduras imobilizadas em celulose bacteriana apresentaram um potencial de produção maior do que as leveduras livres.

Afolabi, Adeyemo e Balogun (2018) estudaram diversos isolados de leveduras na produção de AC e diversas fontes sintéticas de carbono e nitrogênio. Máximo de produção 105,00 mg L⁻¹ (0,105 g L⁻¹) foi obtido quando a levedura *S. cerevisiae* e meio sintético com glicose foram utilizados. O uso do meio sintético nesse estudo evidencia que o micro-organismo utilizado não possui uma capacidade de acúmulo de AC significativa.

2.7. Tempo De Fermentação

Os tempos de fermentação variaram consideravelmente, sendo os tempos mais comuns os de 168 h, utilizado em sete estudos com o *A. niger* (ABOYEJI et al., 2020; ALAM et al., 2011; IKRAM-UL et al., 2004; IQBAL et al., 2015; ISLAM; BEGUM;

CHOUDHURY, 1986; OZDAL; BASARA, 2019; SCHNEIDER et al., 2014), um com a levedura *C. parapsilosis* (WEST, 2013) e um com as leveduras *S. cerevisiae*, *C. tropicalis* e *P. guilliermondii* (AFOLABI; ADEYEMO; BALOGUN, 2018), e 144 h, utilizado em quatro estudos com *A. niger* (BARI et al., 2009; MAKUT; EKELEME, 2018; MOSTAFA; ALAMRI, 2012; PRADO et al., 2005) e quatro com a levedura *Y. lipolytica* (IMANDI et al., 2008; KAMZOLOVA; MORGUNOV, 2017; RZETCHONEK et al., 2019; ZYWICKA et al., 2020).

Considerando que até o presente momento não há nenhum registro na literatura sobre o potencial de produção de AC pelo fungo filamentoso *B. ribis* EC-01 e considerando também que fungos filamentosos apresentam alta capacidade de acúmulo de AC e produção enzimática (COPETTI, 2019; DEMAIN, 2000; WÖSTEN, 2019), o presente trabalho visa avaliar o potencial de produção de AC utilizando este micro-organismo cultivado em diferentes substratos provenientes de resíduos agroindustriais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em fermentação submersa utilizando diferentes substratos provenientes de resíduos agroindustriais.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a produção de ácido cítrico por *B. ribis* EC-01 utilizando melaço de cana, torta de soja, glicerol, malte e levedura por fermentação submersa adicionando-se somente água destilada;
- Determinar a concentração de ácido cítrico por espectrofotometria;
- Avaliar as condições que influenciaram a produção de ácido cítrico por *B. ribis* EC-01;
- Otimizar a produção de ácido cítrico utilizando planejamentos fatoriais e metodologia de superfície de resposta;
- Validar o modelo de produção proposto.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

4.1.1 Torta De Soja

A torta de soja foi gentilmente doada pela IMCOPA - IMPORTAÇÃO, EXPORTAÇÃO E INDÚSTRIA DE OLEOS S.A (Cambé-PR, Brasil).

4.1.2 Glicerol

O glicerol residual proveniente da produção de biodiesel foi fornecido pela BSBIOS – INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE BIODIESEL SUL BRASIL S/A (Marialva – PR, Brasil).

4.1.3 Malte

O Malte residual proveniente do processo de produção artesanal de cerveja foi gentilmente doado pela professora Lilian T. Dusman Tonin.

4.1.4 Extrato De Levedura

A levedura residual proveniente do processo de produção artesanal de cerveja foi gentilmente doada pela professora Lilian T. Dusman Tonin.

4.1.5 Melaço De Cana

O melaço de cana foi gentilmente doado pela COOPERATIVA AGROINDUSTRIAL VALE DO IVAÍ LTDA – COOPerval (Jandaia do Sul – PR, Brasil).

4.1.6 Meio De Cultivo

O meio de cultivo utilizado rotineiramente no decorrer dos experimentos foi o meio BDA (Batata Dextrose Agar), descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Meio BDA

Batata	20,0 g
Dextrose	2,0 g
Agar	1,5 g
Água Destilada	100,0 mL

Fonte: Autoria própria (2020)

4.2 Metodologia Experimental

4.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi o fungo filamentoso *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) que foi transferido do meio de manutenção (BDA a 4 °C) para placas de Petri contendo meio BDA com auxílio de uma alça microbiológica esterilizada. As placas foram incubadas em estufa a 28° C durante 5 dias. O micro-organismo após crescimento é mostrado na Figura 4.

Figura 4- *Botryosphaeria ribis* EC-01 crescido em BDA após 5 dias de cultivo a 28°C



Fonte: Autoria própria (2020)

4.2.2 Seleção Das Variáveis Que Influenciam A Produção De Ácido Cítrico Por *Botryosphaeria ribis* EC-01

Após o crescimento do micro-organismo, o preparo do inóculo foi realizado com seis esferas de 0,7 cm de diâmetro, totalmente colonizadas pelas hifas do fungo, transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50,0 mL de meio líquido composto por diferentes concentrações de TS, glicerol, MT, extrato de levedura e ML em água destilada, conforme descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Substratos utilizados na fermentação submersa para produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01

Substratos	Proporção (m/v)
Torta de Soja	1 %
	2 %
	4 %
	10 %
	12 %
	14 %
Glicerol	0,50 %
	1 %
	2 %
Malte	10 %
	12 %
	14 %
Levedura	10 %
	12 %
	14 %
Melaço de cana	10 %
	12 %
	14 %

Fonte: Autoria própria (2020)

Os cultivos foram mantidos sob agitação de 180 rpm a 28°C durante 7 dias. Em intervalos de tempo de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, 4,0 mL do cultivo foram pipetados de cada frasco. As amostras pipetadas foram centrifugadas por 15 minutos a 5000 rpm e armazenados a 4 °C até a quantificação de produção de AC. Esse procedimento foi realizado para analisar a produção de AC ao longo do tempo. A Figura 5 mostra o aspecto das amostras após a centrifugação.

Figura 5 – Amostras após a centrifugação



Fonte: Autoria própria (2020)

4.2.3 Planejamento Fatorial E Análise Por Metodologia De Superfície De Resposta (MSR) Para A Produção De Ácido Cítrico Por *Botryosphaeria ribis* EC-01

Após a seleção das variáveis que influenciaram positivamente na produção de ácido por *B ribis* EC-01, os parâmetros para o melhoramento da produção foram estudados por dois planejamentos estatísticos, do tipo fatorial 2^k , com k fatores ou variáveis, todos com dois níveis.

4.2.3.1 Planejamento fatorial composto central rotacional I

Um planejamento fatorial 2^3 composto central rotacional ($\pm\alpha$, com $\alpha = (2^k)^{1/4}$) totalizando 17 experimentos foi desenvolvido, avaliando-se tempo (X_1) e as concentrações de TS (X_2) e ML (X_3) de acordo com Tabela 5, que indica os níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1) e também os axiais ($\pm 1,68$). O meio nutriente foi composto por água destilada e os fatores (X_1 - X_3).

Tabela 5 – Níveis de variação para os fatores do planejamento 2^3 composto central rotacional para avaliação da produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Planejamento I

Fatores	Níveis reais e codificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X_1 tempo (h)	23	43	72	101	121
X_2 torta soja (% m/v)	0	4	10	16	20
X_3 melação de cana (% m/v)	0	4	10	16	20

Fonte: Autoria própria (2021).

4.2.3.2 Planejamento fatorial composto central rotaciona II

Um segundo planejamento 2^3 foi desenvolvido baseado nos resultados obtidos com o Planejamento I, totalizando 17 experimentos. A Tabela 6 apresenta os níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1) e os axiais ($\pm 1,68$). Os fatores estudados também foram tempo (X_1) e as concentrações de TS (X_2) e ML (X_3).

Tabela 6 – Níveis de variação para os fatores do planejamento 2^3 composto central rotacional para avaliação da produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Planejamento II

Fatores	Níveis reais e codificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X_1 tempo (h)	13	23	37	51	61
X_2 torta soja (% m/v)	15	17	20	23	25
X_3 melação de cana (% m/v)	20	24	30	36	40

Fonte: Autoria própria (2021).

Os resultados experimentais dos planejamentos fatoriais desenvolvidos foram ajustados em uma equação polinomial (1) pela técnica de regressão múltipla, onde Y é a resposta preditiva de produção de AC e é uma variável dependente, x_i e x_j são variáveis independentes codificadas e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são coeficientes constantes (BARROS NETO; SCARMINIO, BRUNS, 2010).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=j}^k \beta_{ii} x_i x_j + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

As equações polinomiais quadráticas (equação 2 e 3) foram ajustadas para correlacionar os parâmetros estudados. Os coeficientes de regressão (R^2) foram utilizados para expressar a qualidade do ajuste dos modelos e a significância estatística foi determinada pelo teste-F.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 10 % de significância para o Planejamento I e 5 % de significância para o Planejamento II, utilizando o programa STATISTICA Version 7.0®.

Os frascos Erlenmeyer foram mantidos sob agitação de 130 rpm a 28°C, (Figura 6). Em tempos estabelecidos pelos planejamentos, os frascos (Figura 7) foram filtrados a vácuo (Figura 8) e o conteúdo de cada frasco foi centrifugado (5000 rpm/15 minutos) e armazenado a 4 °C até utilização.

Figura 6 – Frascos em agitador orbital no momento da fermentação para produção de ácido cítrico



Fonte: Autoria Própria (2020)

Figura 7 – Frascos após a conclusão da fermentação



Fonte: Autoria Própria (2020)

Figura 8 – Filtração de um frasco após a interrupção da fermentação



Fonte: Autoria Própria (2020)

4.2.4 Determinação Da Concentração De Ácido Cítrico

A análise da concentração de AC foi realizada por meio de espectrofotometria segundo a metodologia proposta por Marier e Boulete (1958). A metodologia consiste na formação de cor amarela quando pequenas quantidades de AC estão em presença de ácido tricloroacético (TCA), anidrido acético e piridina. Essa reação é conhecida como reação de Furth-Herrmann.

Em tubos de ensaios foram adicionados 1,0 mL das amostras, adequadamente diluídas com 5 % de TCA, seguido por 1,3 mL de piridina. Os tubos foram agitados manualmente, seguido da adição de 5,7 mL de anidrido acético. Os tubos foram imediatamente fechados, agitados e colocados em banho maria a 37 °C durante 30 minutos. Para a realização do branco, utilizou-se 1,0 mL de TCA a 5 % em substituição da amostra.

Findados os 30 minutos, os conteúdos dos tubos foram vertidos em cubetas de polipropileno para a leitura no espectrofotômetro (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis) a 420 nm.

A concentração de AC presente nas amostras foi determinada por uma curva de calibração padrão que correlaciona a absorbância obtida com a concentração conhecida de AC variando entre 0,05 e 1,5 mg mL⁻¹. A curva foi construída nas mesmas condições, substituindo-se 1,0 mL das amostras pelas soluções de AC preparadas.

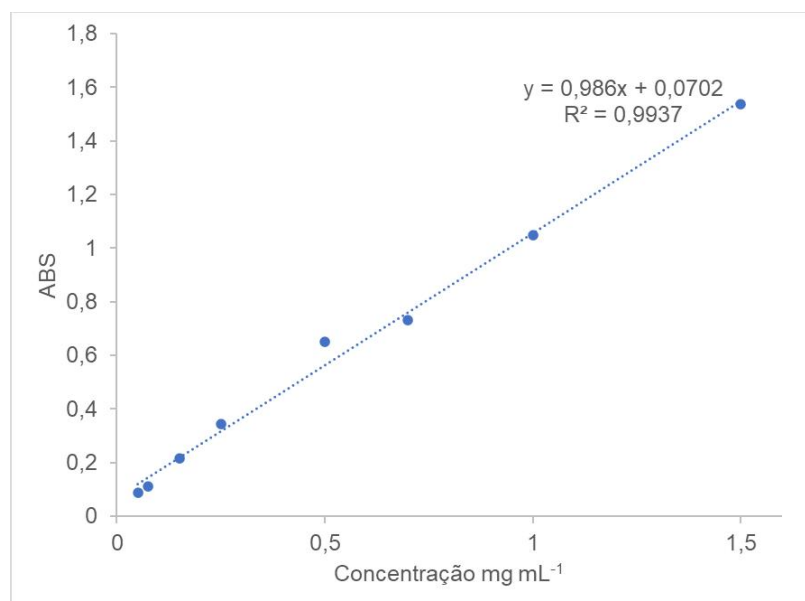
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção das Variáveis que Influenciam a Produção de Ácido Cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01

O levantamento bibliográfico realizado mostrou que não existem estudos que explorem o uso do fungo filamentososo *B. ribis* EC-01 como micro-organismo produtor de AC. Por isso foi necessário realizar as fermentações com diferentes tempos e substratos para selecionar as variáveis que influenciaram positivamente no processo para a posterior otimização de produção através do planejamento fatorial experimental.

A curva de calibração para determinação da concentração de AC pode ser observada na Figura 9, a qual forneceu a equação da reta $y = 0,986x + 0,0702$ (R^2 de 0,9937).

Figura 9 – Curva de Calibração para determinar a concentração de ácido cítrico



Fonte: Autoria própria (2020)

5.1.1 Glicerol

Os resultados obtidos mostraram que o glicerol não foi um substrato adequado para produção de AC por *B. ribis* EC-01. As análises realizadas para as fermentações de 24 h a 168 h apresentaram valores abaixo do limite de detecção. Apesar de se mostrar um substrato eficiente na produção de AC através da levedura *Y. lipolytica*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*

A levedura *Y. lipolytica* e o glicerol foram utilizados por Rywinska et al. (2011) no qual a produção foi realizada em um reator quimiostato de tanque agitado de 5L, e a melhor produção, de 97,80 g L⁻¹, foi obtida a uma taxa de diluição de 0,01 h⁻¹ em um meio contendo 200 g L⁻¹ de glicerol em um volume de trabalho de 2L por 550 h contínuas. Rzecchonek et al., (2019) alcançaram a produção, de 75,90 g L⁻¹ após 144 h, em um biorreator por batelada com agitação de 5L e com volume de trabalho de 2L, contendo 5 meios de produção com 150 g L⁻¹ de glicerol. Papanikolaou, Muniglia et al. (2002) realizam o estudo com 31,00 g L⁻¹ de glicerol bruto atingindo uma produção de 35,00 g L⁻¹.

As leveduras *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* foram utilizadas por West (2013) que obteve uma produção máxima, de 11,3 g L⁻¹ e 10,40 g L⁻¹ respectivamente, após 168 h, realizada com 60g L⁻¹ de glicerol bruto.

Cremonese (2012) relatou um aumento no rendimento da produção de AC em fermentação sólida após a adição de diferentes proporções, 10 %, 20 % e 40 %, de glicerol na torta de mamona e de tunge. O rendimento ótimo de 35 % foi obtido com a adição de 20 % de glicerol na torta de mamona. A produção de lipase também foi afetada positivamente pela adição do glicerol.

5.1.2 Extrato De Levedura

O extrato de levedura, assim como o glicerol, não se mostrou um substrato eficiente para a produção de AC. A maioria das análises para as fermentações de 24 h a 168 h ficaram abaixo do limite de detecção. A maior taxa de produção de AC analisada para esse substrato foi de 0,13 mg de AC por mL de extrato de levedura, obtida após 168 h de fermentação e utilizando uma concentração de 14 % (m/v) de substrato.

O extrato de levedura é o segundo subproduto mais abundante gerado no processo de fabricação de cerveja e sua composição é rica em proteínas (MATHIAS; MELLO; SÉRVULO, 2014; PULIGUNDLA; MOK; PARK, 2020; SKEND; HARASYM; GALANAKIS, 2018). Na biotecnologia, o extrato de levedura pode ser utilizado como fonte de nitrogênio para aumentar as taxas de produção de etanol (DEESUTH et al., 2014) e na produção de ácido succínico (JIANG et al., 2010) e ácido láctico (PEJIN et al., 2019).

5.1.3. Torta De Soja

A composição da TS é rica em aminoácidos e carboidratos, como pode ser observada na Tabela 7. Este substrato tem sido estudado na produção de enzimas por ser boa fonte de carbono e nitrogênio (ANDRADE, 2013; HE; TAN, 2006; LIU; ZHANG, 2011; UZUN; PÜTÜN; PÜTÜN, 2006; VARGAS, 2004).

Tabela 7 – Composição centesimal (g 100g⁻¹) da torta de soja

Torta de soja	Carboidratos	Lipídeos	Proteínas	Cinzas	Umidade
	30,7	0,74	49,38	6,18	13

Fonte: Adaptado de Andrade (2013)

O primeiro teste fermentativo utilizando o substrato TS na produção de AC por *B. ribis* EC-01 foi realizado com as proporções de 1, 2 e 4 % (m/v) (TS- 1 %, 2 % e 4 %). Os valores encontrados nessas condições são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em fermentação submersa utilizando torta de soja como substrato.

Substrato	Proporção (m/v)	24 h	72 h	120 h	168 h
		Ácido cítrico mg mL ⁻¹			
Torta de Soja	1 %	0,17±0,0081	0,41±0,0460		0,43±0,0721
	2 %	0,46±0,0166	0,21±0,0157	0,44±0,0815	0,50±0,0561
	4 %	0,95±0,0208	0,93±0,1110		0,93±0,0537

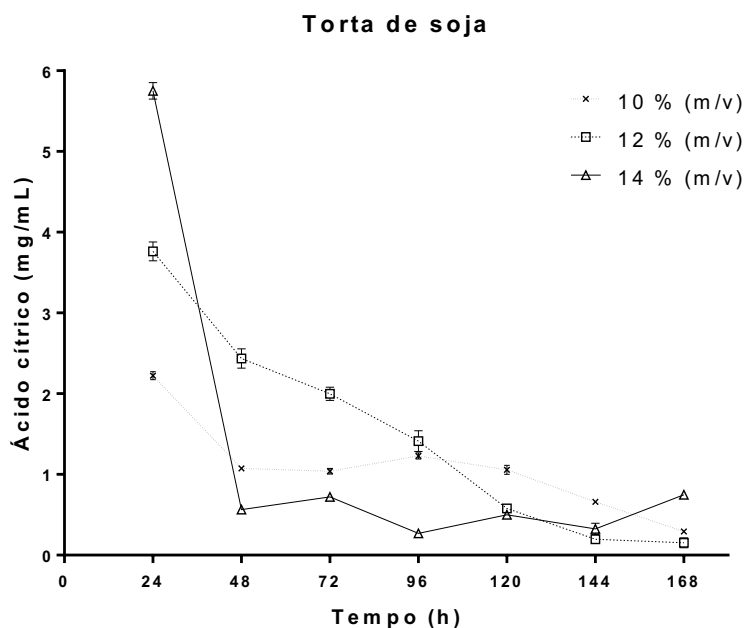
Fonte: Autoria Própria (2020)

As taxas de acúmulo de AC com o uso da TS foram melhores do que as encontradas utilizando o glicerol e o extrato de levedura. A melhor produção analisada foi de 0,95 ± 0,0208 mg mL⁻¹, para TS-4 % em 24 h. Os valores positivos estimularam uma nova fermentação com proporções maiores de TS de 10 %, 12 % e 14 % (m/v).

Os resultados obtidos na produção de ácido com a TS a 10 %, 12 % e 14 % (m/v) são demonstrados na Figura 10. Os resultados de produção de AC por *B. ribis* EC-01 obtidos com o substrato TS na concentração de 10 a 14 % (m/v) variaram de 0,15 a 5,75 mg mL⁻¹. Como pode ser observado, os melhores resultados foram obtidos com 24 h de fermentação para todas as proporções. A fermentação utilizando TS-14 %, apesar de apresentar o melhor resultado de produção entre todos os substratos, com 5,75 mg mL⁻¹ após 24 h, exibiu a maior queda na taxa de produção após 48 h. A fermentação utilizando TS-12 % também obteve um decaimento de produção

acentuado após 48 h, enquanto a fermentação utilizando TS-10 %, apesar de também decair, apresentou a produção mais estável das 3 proporções.

Figura 10 – Produção de ácido cítrico por *Botryosphaeri ribis* EC-01 em fermentação submersa utilizando torta de soja como substrato



Fonte: Autoria própria (2020)

O tempo que proporcionou a maior produção de AC foi de 24 h. Este tempo também foi apontado no estudo de Pastore, Hasan e Zempulski, (2011) no qual foram avaliadas a influência de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose na produção de AC, mostrando que concentrações dos substratos são extremamente importantes para garantir as condições metabólicas do micro-organismos e atingir altos níveis de produção de AC. As concentrações de fontes de carbono podem variar de 10-14 % (XU et al., 1989) enquanto as concentrações de fontes de nitrogênio variam entre 0,1 g L⁻¹ e 0,4 g L⁻¹. Concentrações acima dessa faixa podem acarretar no crescimento exagerado do fungo e a diminuição do acúmulo de AC (SOCCOL et al., 2006). Isso pode explicar o decaimento da produção para o TS 14 % e TS 12 %, uma vez que o substrato em abundância pode ter ocasionado o crescimento excessivo do fungo, seguido por uma degradação do AC produzido.

Apesar de não ser possível fazer uma comparação direta entre os resultados obtidos e os estudos levantados, já que que não foram encontrados estudos que

utilizem a TS como único substrato, pode-se dizer que os resultados obtidos após 24 h se mostraram dentro do esperado. A TS pode ser utilizada como um substrato ou suplemento eficiente na produção de AC como fonte de carbono e nitrogênio para diferentes micro-organismos.

Na literatura, a TS foi avaliada como uma fonte suplementar de nitrogênio em fermentação submersa com cascas de batata como substrato, utilizando, em comparação, os fungos *A. niger* e *T. viride* por Makut e Ekeleme (2018), obtendo uma taxa máxima de produção de AC de 404,53 mg L⁻¹ (0,40453 mg mL⁻¹) após 144 h com o fungo *A. niger*.

Outro estudo de Ekeleme et al (2018) utilizou a TS juntamente com a glicose para se obter uma produção de AC de 15,17 mg mL⁻¹ através da fermentação submersa utilizando o fungo o *T. viride* após 144 h, esse estudo mostrou que concentração elevadas de açúcar podem diminuir a produção de AC gerando uma quantidade indesejada de açúcares residuais (EKELEME et al., 2018).

Outros subprodutos oriundos da indústria de soja também foram estudados. Khare; Jha; Gandhi (1995) utilizou o resíduo okara, subproduto da indústria de leite de soja e tofu, como substrato na produção de AC por fermentação sólida com o *A. niger*, obtendo uma eficiência de produção de 5,10 g 100g⁻¹ de substrato.

5.1.4 Melaço De Cana

A composição do ML é rica em carboidratos, como sacarose, glicose e frutose, como pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Composição do Melaço de Cana (%)

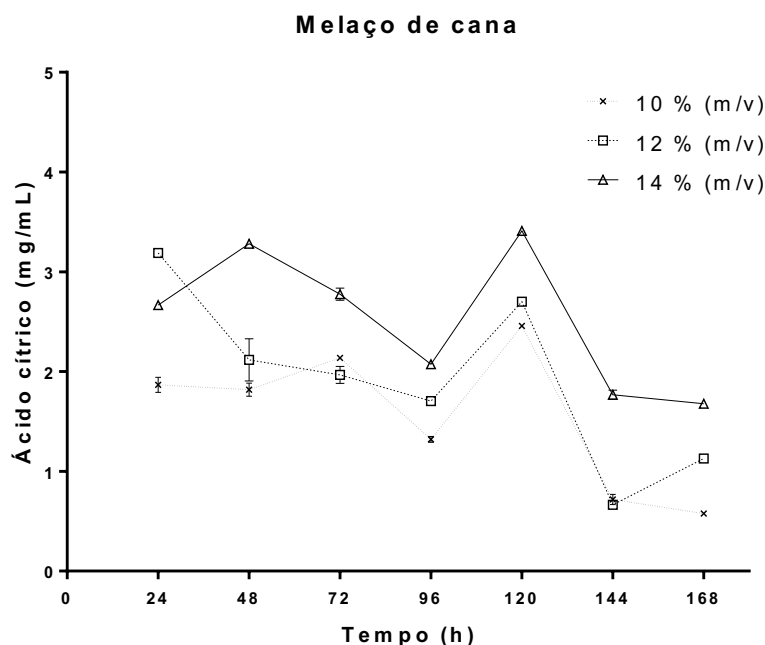
	Componente	Taxa (%)
Melaço de Cana	Água	20
	Sacarose	35
	Glicose	7
	Frutose	9
	Outros Carboidratos	4
	Outras substâncias	12,9
	Cinza	12

FONTE: Adaptado de Teclu (2009)

O ML foi utilizado como substrato para a produção de AC nas concentrações de 10 %, 12 % e 14 % (m/v). As análises realizadas para esse substrato nessas condições são mostradas na Figura 11. Os resultados de produção de AC obtidos com a utilização do ML variaram entre 0,57 e 3,41 mg mL⁻¹. As fermentações após 120 h apresentaram as melhores taxas de produção, para as 3 concentrações (ML 10 %, 12 % e 14 %), sendo que a concentração de ML-14 % estimulou a produção máxima de AC por *B. ribis* EC-01 alcançando 3,41 mg mL⁻¹.

Lotfy, Ghanem e El-Helow (2007) avaliaram o consumo do substrato ML ao longo do tempo de fermentação de cepas mutantes de *A. niger*. Após aproximadamente 72 h a observou-se o aumento na produção de AC e a diminuição do açúcar total presente no meio, a produção máxima de AC foi obtida após 152 h, quando o açúcar foi completamente consumido. Ikram-UI, Ali et al (2004) também obtiveram resultados ótimos em tempo de fermentação similares. Pelos resultados obtidos estima-se que o consumo total do substrato pelo *B. ribis* EC-01 ocorreu após 120 h.

Figura 11 - Produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em fermentação submersa utilizando melaço de cana como substrato



Fonte: Autoria própria (2020)

Os valores obtidos no presente estudo ainda se encontram abaixo da maioria dos valores obtidos na literatura através da fermentação do fungo *A. niger*, como pode

ser observado na Tabela 2. No entanto, na maioria dos estudos são empregados substratos otimizados e micro-organismos selecionados por mutação. Por conseguinte, estima-se um aumento considerável na produção após a otimização do processo, uma vez que o ML é um substrato muito utilizado como fonte de carbono.

5.1.5 Malte

A composição do malte (MT) é rica em proteínas e é uma fonte de nitrogênio, como pode ser observado na Tabela 10.

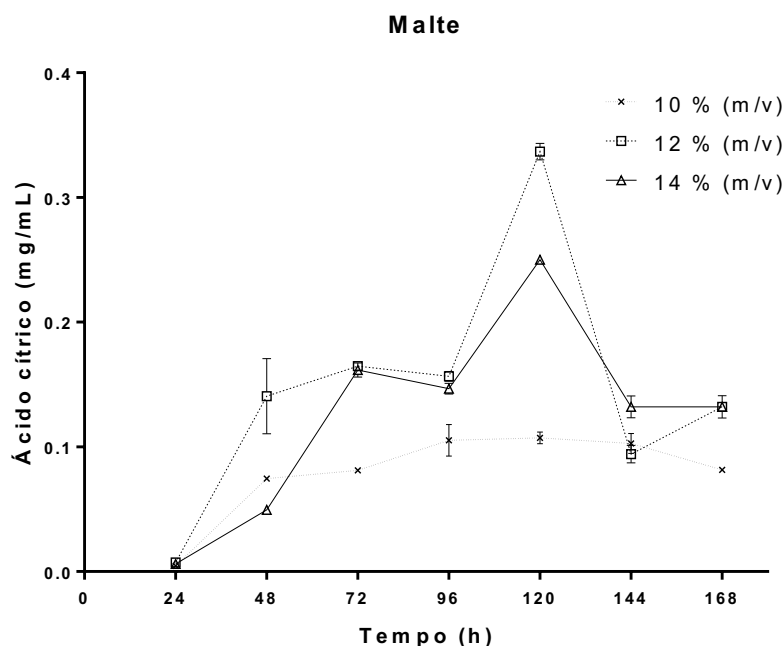
Tabela 10 - Composição do Malte (%)

Malte	Proteínas	Lipídios	Extrato livre de nitrogênio	Celulose	Material inorgânico
	28	8,2	41	17,5	5,3

Fonte: Adaptado de Skend; Harasym e Galanakis (2018)

O malte (MT) foi utilizado nas concentrações de 10, 12 e 14 % (m/v). As análises realizadas para esse substrato nessas condições são mostradas na Figura 12. A produção de AC utilizando o MT como substrato obteve resultados consideravelmente menores do que a TS e o ML, variando entre 0,004 e 0,34 mg mL⁻¹. As fermentações no tempo de 120 h apresentaram as melhores taxas de produção, para as 3 concentrações (MT 10 %, 12 % e 14 %), sendo que a fermentação utilizando MT-12 % obteve a produção máxima de 0,34 mg mL⁻¹. Os tempos ótimos de fermentação do MT foram os mesmos obtidos pelo ML, com o consumo máximo de substrato obtido no tempo de 120 h de FSub. No entanto, a composição ou concentração do substrato não foi suficiente para garantir taxas de produções adequadas de AC, possivelmente porque a disponibilidade de nitrogênio era consideravelmente maior do que a de carbono.

Figura 12- Produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em fermentação submersa utilizando o malte como substrato



Fonte: Autoria própria (2020)

Para a produção de AC, os grãos gastos de cervejarias foram usados como substratos em FSub pelo micro-organismo *A. niger* no estudo de Hang, Splittstosser et al. (1977), com uma taxa de produção máxima de 12,30 g L⁻¹. Roukas e Kotzekidou (1986) atingiram uma produção de AC de 19.00 g L⁻¹ em FSub com o micro-organismo *A. niger*, enquanto Dhillon, Brar et al. (2011) obtiveram uma produção de 14,00 g Kg⁻¹ por FES.

Levando em consideração os resultados obtidos na literatura, o MT não se mostrou um substrato adequado para ser utilizado isoladamente na produção de AC pelo *B. ribis* EC-01.

5.2. Otimização da Produção de Ácido Cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 Utilizando Metodologia de Superfície de Resposta

5.2.1. Planejamento composto central rotacional I

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos no primeiro planejamento 2³ desenvolvido. A produção de AC variou de 0,9530 a 6,217 mg mL⁻¹ dependendo do tempo e composição do meio.

Tabela 11 – Planejamento composto central rotacional para para avaliação da produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Planejamento I

Experimento	Variáveis codificadas			Respostas (mg mL ⁻¹)	
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	-1	-1	-1	2,366	
2	-1	-1	1	4,925	
3	-1	1	-1	3,776	
4	-1	1	1	6,217	
5	1	-1	-1	0,9530	
6	1	-1	1	3,899	
7	1	1	-1	1,862	
8	1	1	1	5,169	
9	-1,68	0	0	4,305	
10	1,68	0	0	2,541	
11	0	-1,68	0	2,090	
12	0	1,68	0	3,975	
13	0	0	-1,68	0,9553	
14	0	0	1,68	5,488	
15 (C)	0	0	0	2,852	
16 (C)	0	0	0	2,975	
17 (C)	0	0	0	2,708	
Variáveis	Níveis reais e codificados				
	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
X ₁ , Tempo (h)	23	43	72	101	121
X ₂ , torta soja (% m/v)	0	4	10	16	20
X ₃ , melão de cana (% m/v)	0	4	10	16	20

Fonte: Autoria própria (2021).

A equação reduzida preditiva para a produção de AC de acordo com os resultados obtidos no Planejamento I está descrita abaixo. Nesta equação todos os termos mostrados são significativos ($p \leq 0,1$).

$$\text{Ácido cítrico (mg mL}^{-1}\text{)} = 2,82 - 0,613 X_1 + 0,293X_1^2 + 0,590X_2 + 0,155X_2^2 + 1,38X_3 + 0,222X_3^2 + 0,157X_1X_3 \quad (2)$$

De acordo com este modelo, menores tempos de fermentação melhoram a produção de AC por *B. ribis* EC-01. Na Tabela 12 é possível verificar que o modelo é confiável e estatisticamente significativo ($p \leq 0,1$), exibindo $R^2 = 0,98$ e $F_{cal} > F_{tab}$ para o modelo e $F_{cal} < F_{tab}$ para a falta de ajuste.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01

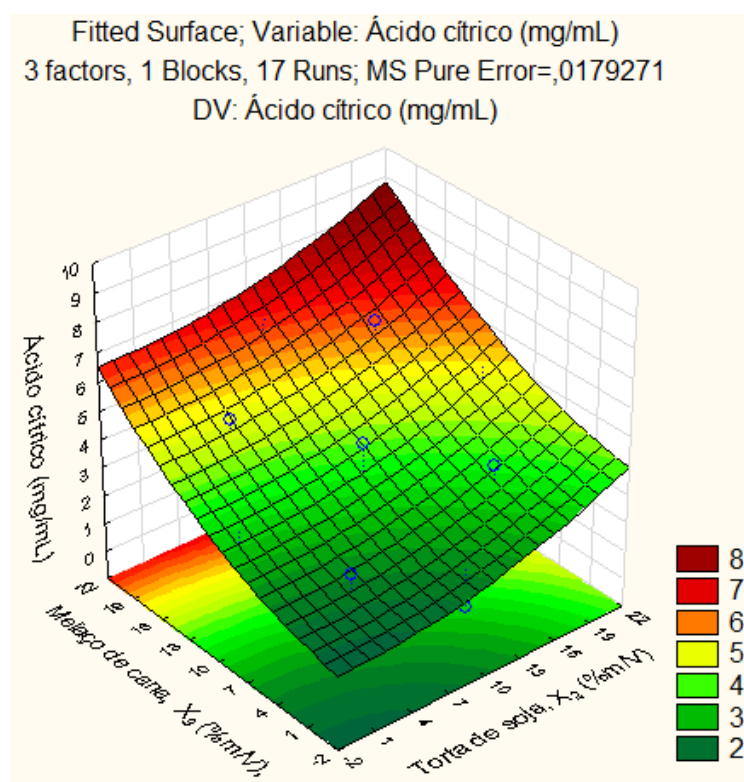
Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F _{calc}	F _{list}
mg mL ⁻¹	Regressão	37,37701	7	5,33957	^a 68,7	2,51
	Resíduo	0,69919	9	0,077687		
	Falta ajuste	0,66334	7	0,094762	^b 5,29	9,35
	Erro puro	0,03585	2	0,017925		
	Total	38,07620	16			

$R^2=0,98$; ^aF 90 %7,9; ^bF 90 %7,2

Fonte: Autoria própria (2021).

Este modelo preditivo também aponta que o aumento das concentrações de TS e ML favorecem a produção de AC como pode ser verificado na Figura 13.

Figura 13 - Superfície de resposta para a produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Planejamento I



Fonte: Autoria Própria (2021)

5.2.2. Planejamento composto central rotacional II.

Baseado nos resultados obtidos no Planejamento I, um novo planejamento fatorial 2³ foi desenvolvido utilizando-se novos níveis de variação para melhorar a curva da superfície de resposta em direção à máxima produção de AC. A Tabela 13

apresenta os resultados de produção de AC deste segundo planejamento que variou de 5,780 a 11,64 mg mL⁻¹ dependendo do tempo e composição do meio.

Tabela 13 – Planejamento composto central rotacional para avaliação da produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Planejamento II

Experimento	Variáveis codificadas			Respostas (mg mL ⁻¹)	
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	-1	-1	-1	5,760	
2	-1	-1	1	8,145	
3	-1	1	-1	8,869	
4	-1	1	1	11,08	
5	1	-1	-1	5,993	
6	1	-1	1	10,52	
7	1	1	-1	6,842	
8	1	1	1	7,952	
9	-1,68	0	0	9,868	
10	1,68	0	0	11,64	
11	0	-1,68	0	7,451	
12	0	1,68	0	9,805	
13	0	0	-1,68	5,888	
14	0	0	1,68	9,190	
15 (C)	0	0	0	8,995	
16 (C)	0	0	0	9,257	
17 (C)	0	0	0	9,579	
Variáveis	Níveis reais e codificados				
	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
X ₁ , Tempo (h)	13	23	37	51	61
X ₂ , torta soja (% m/v)	15	17	20	23	25
X ₃ , melaço de cana (% m/v)	20	24	30	36	40

Fonte: Autoria própria (2021).

A equação reduzida do modelo calculado para a produção de AC está descrita abaixo. Neste modelo a variável tempo (X₁) não foi significativa, entretanto, a interação desta variável com a concentração de TS (X₂) foi. Os termos significativos (p ≤ 0,05) são mostrados nesta equação.

$$\begin{aligned} \text{Ácido cítrico (mg mL}^{-1}\text{)} = & 9,77 + 0,61X_2 - 0,51X_2^2 + 1,16X_3 - 0,90X_3^2 - \\ & 0,97X_1X_2 - 0,45X_2X_3 \end{aligned} \quad (3)$$

Na Tabela 14 é possível verificar que o modelo é confiável e estatisticamente significativo (p ≤ 0,05), com R² = 0,85 e F_{cal} > F_{tab} para o modelo e F_{cal} < F_{tab} para a falta de ajuste.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01

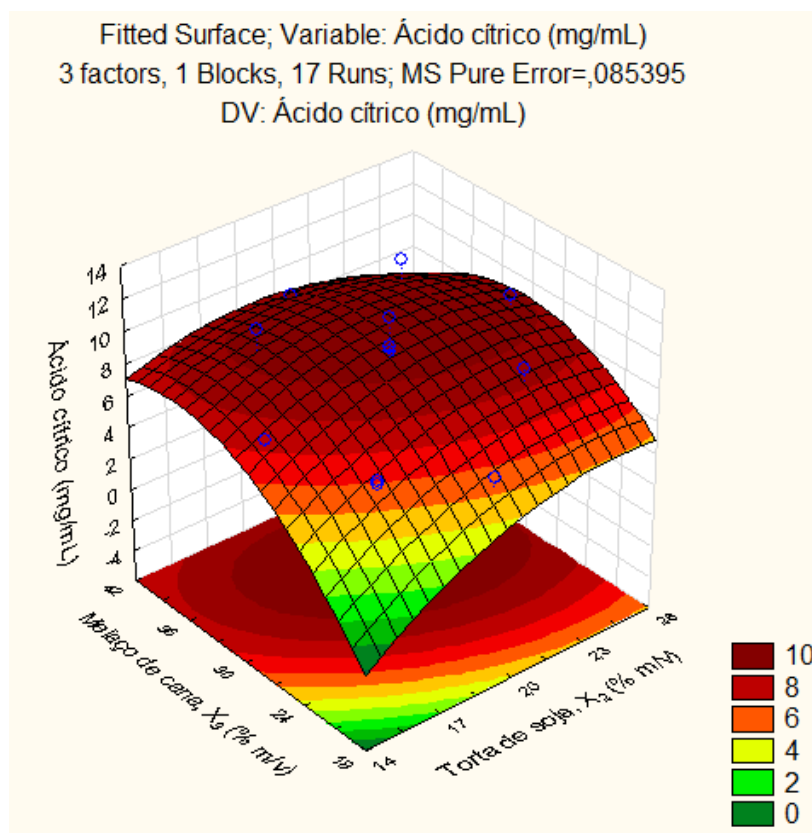
Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F _{calc}	F _{list}
mg mL ⁻¹	Regressão	43,595	6	7,266	^a 9,327	3,22
	Resíduo	7,787	10	0,779		
	Falta ajuste	7,616	8	0,952	^b 11,07	19,37
	Erro puro	0,171	2	0,086		
	Total	51,382	16			

R²=0,85; ^aF 95 %6,10; ^bF 95 %8,2

Fonte: Autoria própria (2021).

De acordo com a curva tridimensional (Figura 14), a produção máxima AC por *B. ribis* EC-01 estimada pelo modelo foi 11,79 mg mL⁻¹, quando tempo e as concentrações de TS e ML foram de 13 h, 25 % (m/v) e 35 % (m/v), respectivamente. A validação experimental do modelo foi executada nas condições estabelecidas, utilizando somente água destilada, obtendo-se valores de 10,01± 0,07 mg mL⁻¹, que está bem próximo ao predito pelo modelo.

Figura 14 - Superfície de resposta para a produção de ácido cítrico por *Botryosphaeria ribis* EC-01 – Planejamento II



Fonte: Autoria Própria

O planejamento experimental também foi utilizado para otimização de produção de AC em diversos estudos. No estudo de Adeoye, Lateef e Gueguim-Kana (2015) o tempo e a concentração do substrato casca de mandioca também foram analisados, juntamente com o tamanho do inóculo e pH do meio em um planejamento de 2^4 . Nesse estudo o rendimento inicial de AC era de $1,93 \text{ mg mL}^{-1}$ e após a mutação genética do *A. niger* por radiação UV e a otimização através da MSR o rendimento de AC produzido foi de $88,73 \text{ mg mL}^{-1}$, aumentando a produção em 45,97 vezes;

Pastore, Hasan e Zempulski (2011) utilizou um planejamento 2^4 para avaliar a influência dos níveis de ureia, peptona, sulfato de amônio e sacarose, em FSub com o *A. niger* em meio sintético. O planejamento indicou que a associação de fontes de nitrogênio no meio proporciona rendimentos melhores.

Com a levedura *Y. lipolytica* e em FES o estudo de Imandi et. al (2008) realizou um planejamento que indicou que as variáveis extrato da levedura, o teor de umidade do substrato, e as concentrações de KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 foram variáveis que influenciaram no processo produtivo.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o fungo filamentosso *Botryosphaeria ribis* EC-01 atinge um melhor rendimento na produção ácido cítrico em fermentação submersa com torta de soja ou melaço de cana como substratos, em água destilada sem adição de outros nutrientes. Os substratos torta de soja e melaço de cana combinados apresentaram um aumento significativo na produção. O tempo e as concentrações de torta de soja e melaço de cana foram as variáveis que mais influenciaram no aumento da produção de ácido cítrico. Os substratos glicerol, extrato de levedura e malte não se mostraram eficientes.

Por meio do segundo planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta (MSR) foi possível aumentar a produção em duas vezes. A condição ótima de produção foi obtida utilizando 25 % (m/v) de torta de soja e 35 % (m/v) de melaço de cana, sob agitação de 130 rpm a 28°C, em 13 h. A validação do modelo confirmou que essas condições eram adequadas, uma vez que o valor de $10,01 \pm 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de ácido cítrico obtidos na validação ficaram próximos do valor predito de $11,79 \text{ mg mL}^{-1}$.

Uma das vantagens do processo descrito é o tempo de fermentação necessário para a produção de ácido cítrico. Os tempos de fermentação mais comuns encontrados na literatura foram de 168 e 144 h. No entanto, o fungo filamentosso *B. ribis* EC-01, após sua fase de crescimento em meio BDA de 5 dias, apresenta uma produção de ácido cítrico em apenas 13 h. A redução do tempo fermentativo pode acarretar uma economia significativa no processo.

Outra economia descrita no processo está na escolha dos substratos utilizados. Tanto a torta de soja quanto o melaço são resíduos ou subprodutos agroindustriais presentes em grande quantidade no Brasil e de fácil aquisição, logo, sua utilização em processos fermentativos se torna uma opção viável para o emprego deste tipo de subproduto.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho foi precursor na produção de ácido cítrico pelo micro-organismo *Botryosphaeria ribis* EC-01 em fermentação submersa, obtendo bons resultados apesar do processo fermentativo simplificado. Na literatura, encontram-se relatos de que fatores como pH, mutação dos micro-organismos, presença de metais podem afetar significativamente a produção de ácido cítrico. Desta forma, sugere-se como futuros trabalhos:

- Aumentar a produção ácido cítrico através da análise de outras variáveis pertinentes ao processo como pH do meio e presença de metais;
- Estudar o consumo de açúcar ao longo do processo fermentativo;
- Avaliar outras fontes de carbono e nitrogênio como substratos provenientes de resíduos ou subprodutos da agroindústria como sementes;
- Extrair e purificar o ácido cítrico obtido no processo;
- Testar a produção em um fermentador.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, N.; Safdar, W.; Ali S.; Choudhry S.; Ilah S. Citric Acid Production from *Aspergillus niger* using Banana Peel. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 7, p. 1580-1583, 2016.

ABOYEJI, O. O.; OLOKE, J. K.; ARINKOOLA, A. O.; OKE, M. A.; ISHOLA, M. M. Optimization of media components and fermentation conditions for citric acid production from sweet potato peel starch hydrolysate by *Aspergillus niger*. **Scientific African**, v. 10, 2020.

ADEOYE, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2015.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, p. 191-199, 2003.

AFOLABI, F. T.; ADEYEMO, S. M.; BALOGUN, H. O. Fermentation Conditions and Process Optimization of Citric Acid Production by Yeasts. **The International Journal of Biotechnology**, Ibadan, Nigeria, v. 7, p. 51-63, 2018.

AJALA, A. S.; ADEOYE, A. O.; OLANIYAN, S. A. OLANIYAN, S. A.; FASONYIN, O. T. A study on effect of fermentation conditions on citric acid production from cassava peels. **Scientific African**, v. 8, 2020.

ALAM, M. Z. et al. Development of culture inoculum for scale-up production of citric acid from oil palm empty fruit bunches by *Aspergillus niger*. **Procedia Environmental Sciences**, v. 8, p. 396-402, 2011.

ANDONEGI, M.; DE LA CABA, K.; GUERRERO, P. Effect of citric acid on collagen sheets processed by compression. **Food Hydrocolloids**, 2020.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER, R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B.; ZAMINELLI, T.; OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean and Castorbean Meals: Optimization, Immobilization, and Application for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013.

ANDRADE, M. M. Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações. **UEL - Universidade Estadual de Londrina**, p. 215, 2013.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I. MESSIAS, J. M.; DALL'ANTONIA, L. H. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean Meal Supplemented with Amino Acids, and Some Physicochemical Properties of the Enzyme. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*. v.16, n.3, p. 169-177, 2014.

ANDRÉ et al. Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into o added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, Athenas, Grécia, v. 31, p. 407–416, 2010.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, Tamilnadu, India, v. 50, p. 367-370, 2013.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; ST. HARDY, G. E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 93-96, 1996.

BARI, N.; ALAM, Z.; MUYIBI, S. A. JAMAL, P.; ABDULLAH-AL-MAMUN.; Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3113–3120, 2009.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BERNSTEIN, E. F.; UNDERHILL, C. B.; LAKKAKORPI, J.; DITRE, C. M.; UITTO, J.; YU, R. J. Citric acid increases viable epidermal thickness and glycosaminoglycan content of sun-damaged skin. **Dermatologic Surgery**, v. 23, p. 689-694, 1997.

BEROVIC, M.; LEGISA, M. Citric acid production. **Biotechnology Annual Review**, 2007.

BERRY, A. D.; SARGENT, S. A. Cashew apple and nut (*Anacardium occidentale* L.). In: YAHIA, E. M. **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits** Elsevier , 2011. p. 414-423. ISBN 9781845697341.

BRASIL, G. D. **IN 42-2002 - Nomes de pragas. — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília, p. 134. 2002.

BRASIL, G. D. Resolução - RDC Nº 281- Autoriza o uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em diversas categorias de alimentos. **Ministério da Saúde**, Brasília , v. 83, 2019.

BRASIL, G. D. **Agropecuária brasileira em números**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, p. 1-13. 2021.

CAVALLO, E.; NOBILE, M.; CERRUTTI, P.; FORESTI, M. L. Exploring the production of citric acid with *Yarrowia lipolytica* using corn wet milling products as alternative low-cost fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, 2020. ISSN 1873295X.

CHATZIFRAGKOU, A.; MAKRI, A.; BELKA, A.; BELLOU, S.; MAVROU, M.; MASTORIDOU, M.; MYSTRIOTI, P.; ONJARO, G.; AGGELIS, G.; PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, p. 1097-1108, 2011.

CHYSIRICHOTE, T. Valorization of Banana Peel for Citric Acid Production under Solid State Fermentation with *Aspergillus niger*. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 34, p. 49-57, 2020.

COLTURATO, A. B. Epidemiologia e Manejo Da Seca De Ponteiro De Corymbia Citriodora (Botryosphaeria Ribis/ Dothyorella Sp.). **Universidade Estadual Paulista - UNESP**, 2009.

COPETTI, M. V. Fungi as industrial producers of food ingredients. **Food Science**, 2019. ISSN 22147993.

CREMONESE, E. B. Aproveitamento de subproduto oleoquímicos para produção de ácidos orgânicos a partir de *Aspergillus niger*. **Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC**, Santa Cruz do Sul, 2012. 79.

CURRIE, J. N. The citric acid fermentation os *Aspergillus niger*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 31, p. 15-37, 1917.

DAI, J.; LI, Y.; YANG, P.; LIU, Y.; CHEN, Z.; OU, W.; AI, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; MAI, K.; C, P.; LIU, Y.; CHEN, Z.; OU, W.; AI, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; MAI, K. Citric acid as a functional supplement in diets for juvenile turbot, *Scophthalmus*

maximus L.: Effects on phosphorus discharge, growth performance, and intestinal health. **Aquaculture**, v. 495, p. 643-653, 2018.

DEESUTH, O.; LAOPAIBOON, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, L. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplementation and aeration. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 95-102, 2014.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p.26-31, 2000.

DHARMALINGAM, K.; ANANDALAKSHMI, R. Fabrication, characterization and drug loading efficiency of citric acid crosslinked NaCMC-HPMC hydrogel films for wound healing drug delivery applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 815-829, 2019.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, 2011.

DI PALMA, L.; MECOZZI, . Heavy metals mobilization from harbour sediments using EDTA and citric acid as chelating agents. **Journal of Hazardous Materials**, 2007.

DITRE, C. M.; GRIFFIN, T. D.; MURPHY, G. F.; SUEKI, H.; TELEGAN, B.; JOHNSON, W. C.; YU, R. J.; VAN SCOTT, E. J. Effects of α -hydroxy acids on photoaged skin: A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 34, p. 187-195, 1996.

DUANGMAL, K.; WORAPOTPISUT, C.; ROMPOSA, N.; KATEMAKE, P. Uneven enzymatic browning on fresh-cut apple and its measurement. **Acta Horticulturae**, 2017.

EKELEME, I K.; MAKUT. M. D.; ADOGA, M. P.; TSAKU, P. A.; NKENE, I. H.; OTI, V. B. Production of Citric Acid by *Trichoderma viride* Isolated from Soil in Keffi, Nigeria Using Glucose Enhanced Substrates. **South Asian Journal of Research in Microbiology**, 2018.

ESKIN, N. A. M.; HOEHN, E. Frutas e vegetais. In: ESKIN, M.; SHAHID, F. **Bioquímica de alimentos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 45-114.

FERREIRA, J. L.; WATANABE, P. H.; MENDONÇA, I. B.; NOGUEIRA, B. D.; FERREIRA, A. C.S.; NEPOMUCENO, R. C.; PASCOAL, L. A.F.; ALMEIDA, J. M.S.; GUERRA, R. R.; TREVISAN, M. T.S.; SILVA, I. N.G.; FREITAS, E. R. Calcium anacardate and citric acid as growth promoters for weaned piglets. **Livestock Science**, v. 238, 2020.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018.

GOMES, M. G.; GURGEL, L. V. A.; BAFFI, M. A.; PASQUINI, D. Pretreatment of sugarcane bagasse using citric acid and its use in enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 157, p. 332-341, 2020. ISSN 18790682.

GOYENECHÉ, R.; AGÜERO, M. V.; C, SARA; DI SCALA, K. Application of citric acid and mild heat shock to minimally processed sliced radish: Color evaluation. **Postharvest Biology and Technology**, 2014.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 209-234, 1995.

GUINET, Y.; PACCOU, L.; HÉDOUX, A. Analysis of xylitol – citric acid system forming deep eutectic solvent: Application for dissolving poorly water-soluble drugs. A combination of calorimetric and Raman investigations. **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, 2020.

HANG, Y. D.; SPLITTSTOESSER, D. F.; WOODAMS, E. E.; SHERMAN, R. M. Citric acid fermentation of brewery waste. **Journal of Food Science**, 1977.

HANG, Y. D.; LUH, B. S.; WOODAMS, E. E. Microbial Production of Citric Acid by Solid State Fermentation of Kiwifruit Peel. **Journal of Food Science**, 1987, v. 52, p. 226-227.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Solid state fermentation of apple pomace. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 2, p. 283-287, 1986.

HE, Y. Q.; TAN, T.-W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, 2006.

IHS MARKIT. **Chemical Economics Handbook**. IHS Markit , 2020.

IKRAM-UL, H.; ALI, S.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. **Bioresource Technology**, Lahoe, Pakistan, v. 93, p. 125-130, 2004.

IMANDI, S. B.; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; BANDARU, S. R.; GARAPATI, H. R. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4445–4450, 2008.

IQBAL, J.; HAQ, I. U.; JAVED, M. M.; HAMEED, U.; KHAN, A. M.; PARVEEN, N.; KHAN, T. S. Isolation of *Aspergillus niger* Strains from Soil and their Screening and Optimization for Enhanced Citric Acid Production Using Cane Molasses as Carbon Source. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, Lahore, Pakistan, v. 4, p. 128-137, 2015.

ISLAM, M. S.; BEGUM, R.; CHOUDHURY, N. Semi-pilot scale production of citric acid in cane molasses by gamma-ray induced mutants of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, Dhaka, Bangladesh, v. 8, p. 469-471, 1986.

JIANG, M.; CHEN, K.; LIU, Z.; WEI, P.; YING, H.; CHANG, H. Succinic acid production by actinobacillus succinogenes using spent brewer's yeast hydrolysate as a nitrogen source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 244–254, 2010.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. G. Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 433-440, 2017.

KANAFI, N. M.; RAHMAN, N. A.; ROSDI, N. H. Citric acid cross-linking of highly porous carboxymethyl cellulose/poly(ethylene oxide) composite hydrogel films for controlled release applications. **Materials Today: Proceedings**, v. 7, p. 721-731, 2019.

KAREEM, S. O.; AKPAN, I.; ALEBIOWU, O. O. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. **Malaysian Journal of Microbiology**. ISSN 2231-7538.

KHAJEPOUR, F.; HOSSEINI, S. A. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. **Animal Feed Science and Technology**, 2012. ISSN 03778401.

KHARE, S. K.; JHA, K.; GANDHI, A. P. Citric acid production from Okara (soy-residue) by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, 1995. ISSN 09608524.

KHOSRAVI-DARANI, K.; ZOGHI, A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: Experimental design for citric acid production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6986–6993, 2008.

KIM, S. K.; KANG, S. W.; JIN, S. A.; BAN, J. Y.; HONG, S. J.; PARK, M. S.. Protective Effect of Citric Acid Against Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in Sprague-Dawley Rats. **Transplantation Proceedings**, v. 51, 2019.

KIRIMURA, K.; YOSHIOKA, I. Citric Acid. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**. 3. ed. 2019. Cap. 3, p. 158-165.

KUDZAI, C. T.; AJAY, K.; AMBIKA, P. Citric acid production by *Aspergillus niger* using different substrates. **Malaysian Journal of Microbiology**, 2016.

KUMAR, C. G. Bioprospecting for secondary metabolites of family Botryosphaeriaceae from a biotechnological perspective. In: GUPTA, V. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. 1. ed. Elsevier, 2020. Cap. 16, p. 167-286.

LIGUORI, R.; SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; IONATA, E.; MARCOLONGO, L.; FARACO, V. SELECTION OF THE Strain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and Its Application to Brewers' Spent Grain Conversion into Lactic Acid. **BioMed Research International**, 2015.

LIU, J.; ZHANG, Y. Optimisation of lipase production by a mutant of *Candida antarctica* DSM-3855 using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 695 - 701, 2011. ISSN 09505423.

LOTFY, W. A.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, Alexandria, Egypt , v. 98, 2007. ISSN 09608524.

MADDOX, I. S.; KINGSTON, P. J. Use of immobilized cells of the yeast, *Saccharomycopsis lipolytica*, for the production of citric acid. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 795-798, 1983.

MAGALHÃES, N.; CAVALCANTE, A. V.; ANDRADE, L. S.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G.; PESSOA, K.A. R. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, p. 101-107, 2019.

MAHMOUD, B. S. M. The efficacy of grape seed extract, citric acid and lactic acid on the inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in shucked oysters. **Food Control**, 2014.

MAJUMDER, L. KHALIL, I.; KAMRUZZAMAN, M. M; ALAM, K.; BEGUM, R.; ALAM, N. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Molasses and Pumpkin as Substrates. **European Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 1-8, 2010.

MAKUT, M.; EKELEME, I. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* Using Hydrolysed Potato Peels Substrate. **Asian Journal of Advances in Agricultural Research**, Keffi, Nigeria, 2018. ISSN 2456-8864.

MAPA - Ministério da Agricultura, ANUÁRIO DA CERVEJA NO BRASIL 2018 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Governo do Brasil**, 2018.

MARIER, J. R.; BOULET, J. Direct Determination of Citric Acid in Milk with an Improved Pyridine-Acetic Anhydride Method. **Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 12, p. 1683-1692, 1958. ISSN 00220302.

MATHIAS, T. R. D. S.; MELLO, P. P. M. D.; SÉRVULO, E. F. C. Solid wastes in brewing process: A review. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 5, 2014.

MAX, B.; SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 862-875, 2010.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. 3. ed. São Paulo: Learning, Cengage, 2016.

MENG, F. LIU, Q.; KIM, R.; WANG, J.; LIU, G.; GHAREMAN, A. Selective recovery of valuable metals from industrial waste lithium-ion batteries using citric acid under reductive conditions: Leaching optimization and kinetic analysis. **Hydrometallurgy**, 2020.

MESSIAS, J. M. Produção de Lipases por *Botryosphaeria ribis* em Diferentes Fontes de Carbono. **Universidade Estadual de Londrina UEL**, Londrina, p. 229, 2008.

MESSIAS, J. M.; DA COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 426-431, 2009.

MISKEEN, S.; HONG, J. S.; CHOI, H. D.; KIM, J. Y. Fabrication of citric acid-modified starch nanoparticles to improve their thermal stability and hydrophobicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, 2021.

MOSTAFA, Y. S.; ALAMRI, S. A. Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 241-246, 2012.

MUÑOZ-VILLA, A.; SÁENZ-GALINDO, A.; LÓPEZ-LÓPEZ, L.; CANTÚ-SIFUENTES, L.; BARAJAS-BERMÚDEZ, L. Ácido Cítrico: Compuesto Interesante Citric Acid: Interesting Compound. **Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila**, v. 6, 2014.

NANGARE, S.; VISPUTE, Y.; TADE, R.; DUGAM, S.; PATIL, P. Pharmaceutical applications of citric acid. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-23, 2021.

NATARAJ, D.; SAKKARA, S.; HN, M.; REDDY, N. Properties and applications of citric acid crosslinked banana fibre-wheat gluten films. **Industrial Crops and Products**, 2018.

NATARAJ, D.; REDDY, R.; REDDY, N. Crosslinking electrospun poly (vinyl) alcohol fibers with citric acid to impart aqueous stability for medical applications. **European Polymer Journal**, 2020. ISSN 00143057

OZDAL, M.; BASARA, E. K. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, p. 631-640, 2019.

PAN-UTAI, W.; KAHAPANA, W.; IAMTHAM, S. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira* (*Spirulina*) and its thermal stability with citric acid. **Journal of Applied Phycology**, p. 231-242, 2018.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, 2002.

PASTORE, N. S.; HASAN, S. M.; ZEMPULSKI, D. A. Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger*. Avaliação de Diferentes Fontes de Nitrogênio E de Concentração de Sacarose. **Engevista**, 2011.

- PATEL, A.; MIKES, F.; BÜHLER, S.; MATSAKAS, L. Valorization of Brewers' Spent Grain for the Production of Lipids by Oleaginous Yeast. **Molecules**, 2018.
- PEJIN, J.; RADOSAVLJEVIĆ, M.; KOCIĆ-TANACKOV, S.; MARKOVIĆ, R.; DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A.; MOJOVIĆ, L. Use of spent brewer's yeast in L-(+) lactic acid fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, 2019.
- PONDJA, J. E. A.; PERSSON, K. M.; MATSINHE, N. P. The Potential Use of Cassava Peel for Treatment of Mine Water in Mozambique. **Journal of Environmental Protection**, v. 8, p. 277-289, 2017.
- PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; RODRÍGUES-LEÓN, J. A.; SOCCOL, C. R. Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 547-555, 2005.
- PULIGUNDLA, P.; MOK, ; PARK, S. Advances in the valorization of spent brewer's yeast. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2020.
- QIU, X.; CHEN, S.; LIU, G.; YANG, Q. Quality enhancement in the Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets stored at 4 °C by chitosan coating incorporated with citric acid or licorice extract. **Food Chemistry**, 2014.
- RANE, K. D.; SIMS, K. A. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 646-651, 1993.
- RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30. ed. Porto Alegre: Artmed , 2017.
- ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Production of Citric Acid from Brewery Wastes by Surface Fermentation Using *Aspergillus niger*. **Journal of Food Science**, 1986.
- ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13105-13113, 2020.
- RYWIŃSKA, A.; JUSZCZYK, P.; WOJTATOWICZ, M.; RYMOWICZ, W. Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biotechnology**, 2011.
- RZETCHONEK, D. A.; DOBROWOLSKI, A.; RYMOWICZ, W.; MIROŃCZUK, A. M. Aseptic production of citric and isocitric acid from crude glycerol by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, 2019.
- SACKETT, D. **Citric Acid: Occurrence, Biochemistry, Applications and Processing**. New York : Nova Science, 2014.

SAGRILLO, F. S.; DIAS, F. R. F.; TOLENTINO, N. M. C.; OLIVEIRA, V. G. **Processos Produtivos em Biotecnologia**. 1a Edição. ed. São Paulo : Érica , 2015.

SALDANHA, R. L.; GARCIA, J. E.; DEKKER, R. F. H.; VILAS-BOAS, L. A.; BARBOSA, A. M. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2007.

SALES, M. D. P. U. Aspergilose: do diagnóstico ao tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, 2009.

SANCHÍS, E.; GONZÁLEZ, S.; GHIDELLI, C.; SHETH, C. C.; MATEOS, M.; PALOU, L.; PÉREZ-GAGO, M. B. Browning inhibition and microbial control in fresh-cut persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Rojo Brillante) by apple pectin-based edible coatings. **Postharvest Biology and Technology**, 2016.

SAWANT, O.; MAHALE, S.; RAMCHANDRAN, V.; NAGARAJ, G.; BANKAR, A. Fungal Citric acid production using waste materials: A mini-review. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, 2018.

SCHNEIDER, M.; ZIMMER, G. F.; CREMONESE, E. B; SCHNEIDER, R.; CORBELLINI, V. A. By-products from the biodiesel chain as a substrate to citric acid production by solid-state fermentation. **Waste Management & Research**, v. 32, p. 653–660, 2014.

SHOW, P. L.; OLADELE, K. O.; SIEW, Q. Y.; AZIZ ZAKRY, F. A.; LAN, J. C. W.; LING, T. C. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, 2015.

SKEND, A.; HARASYM, ; GALANAKIS, C. M. Recovery of high added-value compounds from brewing and distillate processing by-products. In: GALANAKIS, C. M. **Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products**. 1. ed. Chania, Grécia: Woodhead Publishing, 2018. Cap. 7, p. 352.

SLIPPERS, B.; CROUS, P. W.; JAMI, F.; GROENEWALD, J. Z.; WINGFIELD, M. J. Diversity in the Botryosphaerales: Looking back, looking forward. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 307-321, 2017.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**, 2006.

SRIVASTAVA, P.; ANDERSEN, P. C.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L.; SRIVASTAVA, M.; HARMON, P. F. Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic enzyme production in *Botryosphaeria* isolates. **Crop Protection**, 2013

SWAGGERTY, C. L.; HE, H.; GENOVESE, K. J.; CALLAWAY, T. R.; KOGUT, M. H.; PIVA, A.; GRILLI, E. A microencapsulated feed additive containing organic acids,

thymol, and vanillin increases in vitro functional activity of peripheral blood leukocytes from broiler chicks. **Poultry Science**, 2020.

TECLU, D.; TIVCHEV, G.; LAING, M.; WALLIS, M. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1157-1165, 2009.

TORRADO, A. M.; CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 394-409, 2011.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2020. ISSN 18790690.

UZUN, B. B.; PÜTÜN, A. E.; PÜTÜN, E. Fast pyrolysis of soybean cake: Product yields and compositions. **Bioresource Technology**, 2006. ISSN 09608524.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.

VARGAS, D. A.; MEDINA, J. V. **Citric Acid: Synthesis, Properties and Applications**. New York : Nova Science , 2012.

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Universidade Regional Integrada -URI. Erechim , p. 88. 2004.

VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry**, 2000.

VIEIRA, M. V. C. F **Otimização da produção de lipases utilizando óleo de *Passiflora edulis***. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, p. 34. 2019.

VOET , D.; VOET , J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre : Artmed , 2013.

WANG , X.; CHEN, J.; YAN, X.; WANG, X.; ZHANG, J.; HUANG, J.; ZHAO, J. Heavy metal chemical extraction from industrial and municipal mixed sludge by ultrasound-assisted citric acid. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2015.

WANG, S.; XU, C.; YU, S.; WU, X.; JIE, Z.; DAI, H. Citric acid enhances the physical properties, cytocompatibility and osteogenesis of magnesium calcium phosphate cement. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, 2019.

WEST, T. P. Citric acid production by *Candida* species grown on a soy-based crude glycerol. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2013.

WOLTERS, N.; SCHABRONATH, C.; SCHEMBECKER, G.; MERZ, J. Efficient conversion of pretreated brewer's spent grain and wheat bran by submerged cultivation of *Hericium erinaceus*, v. 222, p. 123-129, 2016.

WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, 2019. ISSN 18790429.

XU, D. B.; MADRID, C. P.; RÖHR, M.; KUBICEK, C. P. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1989.

XU, J.; SU, X. F.; BAO, J. W.; ZHANG, H. J.; ZENG, X.; TANG, L.; WANG, K.; ZHANG, J. H.; CHEN, X. S.; MAO, Z. G. A novel cleaner production process of citric acid by recycling its treated wastewater. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 645-653, 2016.

ZHANG, Y. L.; ZHAO, C. X.; LIU, X. D.; LI, W.; WANG, J. L.; HU, Z. G. Application of poly(aspartic acid-citric acid) copolymer compound inhibitor as an effective and environmental agent against calcium phosphate in cooling water systems. **Journal of Applied Research and Technology**, v. 14, p. 425-433, 2016.

ZHAO, S.; CHEN, Z.; ZHENG, J.; DAI, J.; OU, W.; XU, W.; AI, Q.; ZHANG, W.; NIU, J.; MAI, K.; ZHANG, Y. Citric acid mitigates soybean meal induced inflammatory response and tight junction disruption by altering TLR signal transduction in the intestine of turbot, *Scophthalmus maximus* L. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, p. 181-187, 2019.

ZHOU, P. P.; MENG, J.; BAO, J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 563-572, 2017.

ZYWICKA, A.; JUNKKA, A.; CIECHOLEWSKA-JUŚKO, D.; MIGDAL, P.; CZAJKOWSKA, J. FIJAŁKOWSKI, K. Significant enhancement of citric acid production by *Yarrowia lipolytica* immobilized in bacterial cellulose-based carrier. **Journal of Biotechnology**, v. 321, p. 13-22, 2020.