



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THAYSA AMÉLIA BORTOLOTI FERNANDES

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR  
*ASPERGILLUS WELWITSCHIAE* EM RESÍDUO DE  
LARANJA**

---

Londrina  
2021

THAYSA AMÉLIA BORTOLOTI FERNANDES

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR  
*ASPERGILLUS WELWITSCHIAE* EM RESÍDUO DE  
LARANJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Sartor

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de  
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F363 Fernandes, Thaysa Amlélia Bortoloti Fernandes.  
Potencial de produção de ácido cítrico por *Aspergillus welwitschiae* em resíduos de laranja / Thaysa Amlélia Bortoloti Fernandes Fernandes. - Londrina, 2021. 58 f. : il.

Orientador: Daniele Sartori Sartori.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021. Inclui bibliografia.

1. Ácido cítrico - Tese. 2. Resíduo de laranja - Tese. 3. *Aspergillus* - Tese. 4. *Aspergillus welwitschiae* - Tese. I. Sartori, Daniele Sartori. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

THAYSA AMÉLIA BORTOLOTI FERNANDES

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR  
*ASPERGILLUS WELWITSCHIAE* EM RESÍDUO DE  
LARANJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Daniele Sartori  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Marcelo Melo Rodrigues  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Cristiani Baldo da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 01 de março de 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela oportunidade de cursar este mestrado, pelas bênçãos, cuidado e amparo a todo instante.

A minha Mãe, Michella Bortoloti, que está sempre ao meu lado, me incentivando, amando e aconselhando.

A minha orientadora Prof. Daniele Sartori por toda paciência, pelas correções e constante orientação neste trabalho, agradeço por todos os conselhos e ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE) da Universidade Estadual de Londrina por todos os ensinamentos ao longo da minha trajetória na universidade.

A empresa Natú por ter cedido o resíduo de laranja.

Aos amigos e colegas de laboratório, que partilham da dor e da delícia em benefício da pesquisa, que estiveram comigo ao longo dessa trajetória.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuiu com este trabalho.

“We can beat them, for ever and ever  
*Then we could be heroes, just for one day*”

(David Bowie)

FERNANDES, Thaysa Amélia Bortoloti. **Potencial de produção de ácido cítrico por *Aspergillus welwitschiae* em resíduos de laranja.** 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores globais de frutas cítricas, sendo a laranja responsável por 82% do total da safra industrializada. Em 2020, o Brasil produziu 15,7 toneladas de laranja, as quais são destinadas à extração industrial de sucos cítricos. Aproximadamente 60% do peso das frutas cítricas correspondem a resíduos como bagaço, casca e sementes, os quais são gerados em grandes quantidades, e apresentam alto valor nutricional para processos biotecnológicos necessitando ser destinados a local adequado. O ácido cítrico é um ácido orgânico amplamente utilizado na indústria, devido a características como conservante, antioxidante e estabilizante, e pode ser obtido por processo Fermentativo em Estado Sólido por linhagens do gênero *Aspergillus*. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae*, linhagem selvagem UELAs 15.262 e linhagem mutante UELAs 15.262/35 em resíduo de laranja. O resíduo de laranja foi coletado, processado e utilizado como substrato na Fermentação em Estado Sólido. Utilizou-se 107 conídios/mL de cada linhagem de *A. welwitschiae*, em meio Prescott & Dunn (pH 4,0) a 37 °C. A cinética da produção de ácido cítrico foi avaliada ao longo de dez dias, sendo que, a cada dois dias o extrato bruto foi analisado quanto a quantidade de ácido cítrico, açúcares totais, açúcares redutores e atividade celulásica. A produção de ácido cítrico pela linhagem UELAs 15.262 foi constante ao longo dos dez dias. A linhagem UELAs 15.262/35 produziu a maior quantidade de ácido cítrico a partir do quarto dia ( $4,88 \pm 0,33$  g/L) de fermentação. A utilização de açúcares totais foi maior a partir do quarto dia, correspondendo a 71,9% e 72,1% de açúcar utilizado pelas linhagens UELAs 15.262 e UELAs 15.262/35, respectivamente. Os açúcares redutores foram utilizados a partir do segundo dia de fermentação. A produção de celulasas foi detectada a partir do sexto dia de fermentação para a linhagem UEL As 15.262 (0,62 U/mL) e UELAs 15.262/35 (1,22 U/mL). Em conclusão, *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 apresentou maior potencial para produção de ácido cítrico em resíduo de laranja, com produção de ácido cítrico cerca de 50% maior em relação a *A. welwitschiae* UELAs 15.262.

**Palavras-chave:** ácido cítrico; resíduo de laranja; *aspergillus*; *aspergillus welwitschiae*.

FERNANDES, Thaysa Amélia Bortoloti Fernandes. **Potential for citric acid production by *Aspergillus welwitschiae* in orange waste.** 2021. 58 p. Dissertation (Master in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Brazil is one of the largest global producers of citrus fruits, with orange accounting for 82% of the total industrialized harvest. In 2020, Brazil produced 15,7 tons of oranges, which are destined for the industrial extraction of citrus juices. Approximately 60% of the weight of citrus fruits corresponds to wastes such as bagasse, peel and seeds, which are generated in large quantities, and have a high nutritional value for biotechnological processes that must be disposed of in appropriate place. Citric acid is an organic acid widely used in industry, due to characteristics such as preservative, antioxidant and stabilizer, and can be obtained by the Fermentative process in Solid State by strains of the genus *Aspergillus*. In view of this, the objective was to evaluate the production potential of citric acid from *Aspergillus welwitschiae* UELAs 15.262 wild strains and *Aspergillus welwitschiae* UELAs 15.262/35 mutant strain in orange waste. The orange waste was collected, processed and used as a substrate in Solid State Fermentation. Used 107 conidia/mL of *A. welwitschiae* strain UELAs 15.262 or UELAs 15.262/35 in Prescott & Dunn medium (pH 4.0) and incubation at 37 °C. The kinetics of citric acid production occurred over ten days, and every two days the crude extract was analyzed for the amount of citric acid, total sugars, reducing sugars and cellulose activity. The production of citric acid by the UELAs 15.262 strain was constant throughout the ten days. The UELAs 15.262/35 strain produced the highest amount of citric acid from the fourth day ( $4,88 \pm 0,33$  g/L) of fermentation. The use of total sugars was greater from the fourth day on, corresponding to 71,9% and 72,1% of sugar used by the strains UELAs 15.262 and UELAs 15.262/35, respectively. Reducing sugars were used from the second day of fermentation. The production of cellulases was detected from the sixth day of fermentation for the line UEL As 15.262 (0,62 U/mL) and UELAs 15.262/35 (1.22 U/mL). In conclusion, the *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 showed greater potential for the production of citric acid in orange waste, with production of citric acid about 50% higher compared to the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain.

**Keywords:** citric acid; orange waste; *aspergillus*; *aspergillus welwitschiae*.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>Figura 1</b> | Ciclo do Ácido Cítrico .....14  |
| <b>Figura 2</b> | Estrutura morfológica de <i>Aspergillus</i> .....19   |
| <b>Figura 3</b> | Cinética da produção de ácido cítrico a partir de resíduos de laranja, por <i>A. welwitschiae</i> . (A) Quantidade de ácido cítrico por linhagens de <i>A. welwitschiae</i> . (B) Quantidade de açúcares totais por linhagens de <i>A. welwitschiae</i> . (C) Quantidade de açúcares redutores por linhagens de <i>A. welwitschiae</i> . (D) atividade celulásica por linhagens de <i>A. welwitschiae</i> .....32 |
| <b>Figura 4</b> | Cinética da produção de ácido cítrico a partir de resíduos de laranja, por <i>A. welwitschiae</i> . (A) Quantidade de ácido cítrico por linhagens de <i>A. welwitschiae</i> . (B) Quantidade de açúcares totais por linhagens de <i>A. welwitschiae</i> . (C) Quantidade de açúcares redutores por linhagens de <i>A. welwitschiae</i> .....34  |

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>10</b> |
| 2.1      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 10        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>13</b> |
| 3.1      | ASPECTOS GERAIS DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....  | 11        |
| 3.2      | ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO .....   | 13        |
| 3.2.1    | Processos Fermentativos Para Produção De Ácido Cítrico.....                                | 15        |
| 3.3      | O GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i> .....  | 18        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b> .....   | <b>22</b> |
| 4.1      | MATERIAL BIOLÓGICO.....  | 22        |
| 4.2      | OBTENÇÃO E PREPARO DO RESÍDUO DE LARANJA .....   | 22        |
| 4.2.1    | Determinação De Açúcares Totais E Redutores .....  | 23        |
| 4.2.2    | Determinação De Ácido Cítrico .....  | 23        |
| 4.3      | CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR <i>A. WELWITSCHIAE</i> .....                     | 23        |
| 4.3.1    | Determinação Da Atividade Celulósica.....  | 24        |
| 4.4      | CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR <i>A. WELWITSCHIAE</i><br>DURANTE 96 HORAS ..... | 24        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....   | <b>25</b> |
| 5.1      | ARTIGO CIENTÍFICO .....  | 26        |
| <b>6</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | <b>43</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>44</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem sua economia voltada fortemente para a agricultura, sendo um dos principais países produtores de grãos e frutas cítricas. Laranjas, limões e tangerinas representam aproximadamente 98% de toda a safra industrializada, sendo as laranjas as mais relevantes, com aproximadamente 82% do total. As frutas cítricas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, para produção de geleias, extração de sucos, de fibras, de óleos essenciais e outros compostos. A produção industrial gera toneladas de resíduos, os quais requerem destinação adequada a fim de contribuir com a diminuição da poluição ambiental.

Os resíduos agroindustriais são ricos em compostos orgânicos, os quais geralmente são fontes de açúcares e de nitrogênio. Tal característica favorece a utilização destes resíduos como substratos em processos fermentativos para obtenção de novos compostos. A Fermentação em Estado Sólido é um dos processos mais utilizados no aproveitamento de resíduos sólidos e diferentes microrganismos, sejam bactérias, fungos ou leveduras, são capazes de sintetizar diversos compostos de alto valor agregado. Dentre os compostos que podem ser produzidos pelo processo fermentativo, tem-se o ácido cítrico.

O ácido cítrico é um ácido orgânico, intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs), amplamente utilizado na indústria de alimentos e bebidas, e na indústria de produtos farmacêuticos e cosméticos. A aplicação industrial deste ácido é voltada como agente acidulante, conservante, emulsificante e aromatizante. A obtenção do ácido cítrico pode ocorrer a partir de frutas cítricas e também de microrganismos.

Os fungos apresentam enorme interesse biotecnológico, pois a partir de seu metabolismo é possível obter diversos compostos que podem ser comercializados e utilizados na indústria, como a produção de enzimas, ácidos orgânicos, polissacarídeos, pigmentos e outros. Fungos do gênero *Aspergillus*, em especial o *Aspergillus niger*, são os principais fungos utilizados para a produção industrial de ácido cítrico. Similar a esta linhagem, tem-se o *Aspergillus welwitschiae*, também potencial produtor de enzimas e ácidos orgânicos, no entanto ambas as linhagens são potenciais produtores de micotoxinas.

Portanto, um processo biotecnológico deve considerar a obtenção de linhagens de *Aspergillus* potenciais produtoras de ácido cítrico, seguras quanto a ausência de produção de micotoxinas e seus possíveis mutantes, os quais podem ser obtidos por técnicas de mutação aleatória ou direcionada e tem potencial para aumentar a produção de substâncias de interesse, em menor tempo, e de forma segura.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar o potencial de produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae*, a partir de resíduos de laranja.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e processar o resíduo de laranja.
- Selecionar as melhores condições abióticas para produção de ácido cítrico pelas linhagens de *Aspergillus welwitschiae* pelo processo Fermentativo em Estado Sólido, utilizando resíduo de laranja processado como substrato.
- Quantificar o ácido cítrico, açúcares totais e redutores, e verificar a atividade de celulases durante o processo fermentativo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O Brasil possui uma das mais importantes economias baseadas na agricultura. O país é atualmente um importante produtor e exportador de suco de laranja, açúcar, café, cana-de-açúcar, etanol, tabaco, e o segundo maior produtor de soja, milho, frutas (SOUSA; CORREIA, 2010; ESTADOS UNIDOS, 2017).

A produção mundial de frutas cítricas tem crescido continuamente nas últimas décadas, sendo o Brasil, Espanha, Itália, os Estados Unidos e a China os principais produtores, representando mais de dois terços da produção global (RIVAS et al., 2008). Laranjas, limões, toranjas e tangerinas representam aproximadamente 98% de toda a safra industrializada, sendo as laranjas as mais relevantes, quanto à produção, com aproximadamente 82% do total (MARÍN et al. 2007).

A produção de frutas destinada à extração industrial de sucos cítricos proporciona grandes quantidades de resíduos, e o destino desse material representa um grande problema ambiental (RIVAS et al., 2008; PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007). Uma das alternativas para o uso dos resíduos agroindustriais é a aplicação como substrato em bioprocessos. Essa prática aliada a microrganismos selecionados, possibilita a produção de compostos bioativos, promovendo o crescimento de indústrias secundárias, além de contribuir com melhorias à poluição do meio ambiente (SANTOS, 2006).

Aliado ao valor dos resíduos agroindustriais, estão as substâncias agregadas aos resíduos, que são encontrados na biomassa agrícola como, caules, palhas, folhas, raízes, cascas, sementes e bagaço de vegetais (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; ALEXANDRINO et al., 2007; ROSA et al., 2011). Dentre os diversos resíduos agroindustriais, os resíduos resultantes da produção de sucos cítricos, como o suco de laranja, são fontes de vários compostos bioativos, como açúcares solúveis e insolúveis, fibras, ácidos orgânicos, aminoácidos e proteínas, minerais, óleos e lipídios, flavonóides e vitaminas (LÓPEZ et al., 2004; SHIRAHIGUE; ANTONINI, 2020).

De acordo com dados divulgados pelo “United States Department of Agriculture” (USDA) (2020) na safra 2018/2019, a produção global de laranja atingiu 7,94 milhões de toneladas, com aumento de 31% em relação à safra de 2017/2018.

O Brasil contribui com 76% do comércio mundial de suco de laranja, consolidando-se como o mais importante fornecedor global desse produto. Além disso, conta com aproximadamente 12 mil produtores de laranja, espalhados por mais de 800 mil hectares, cultivando 165 milhões de árvores (KALAKI; NEVES, 2017).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu 17,6 milhões de toneladas de laranja na safra de 2019, com aumento de 5,6% em relação à safra anterior. Na safra de 2020, houve uma diminuição na produção brasileira, que ainda assim, atingiu 15,7 toneladas de laranja.

Cerca de 45% a 60% do peso das frutas cítricas correspondem a resíduos como bagaço, casca e sementes. Nesse sentido, os resíduos sólidos do processamento cítrico industrial correspondem a aproximadamente 50% da massa original de frutas, que consistem principalmente na casca (casca amarela externa, epicarpo, mais a casca esponjosa branca interna, mesocarpo), membranas e sementes (LEITÃO et al., 2010).

A composição química da casca de laranja obtida na indústria de sucos cítricos, como resíduo do processo de extração, apresenta em média 13,2% de açúcares, 3,0% de lipídeos, 7,8% de proteínas, 3,0% de cinzas, 23,1% de celulose, 10,7% de hemicelulose, 4,2% de lignina, 3,7% de amido, 4,50% de flavonóides, 32,7% de pectinas e 4,35% de outros compostos como ácidos orgânicos (ácidos cítrico, málico e oxálico, que podem representar cerca de 1% em peso da casca) e vitaminas, como a vitamina C (MANIN et al., 2007; RIVAS et al., 2008; LEITÃO et al., 2010).

No Brasil, a polpa cítrica desidratada geralmente é destinada a alimentação do gado na forma de pellet. A casca da laranja e o resíduo de polpa podem ser utilizados para fins alimentícios, como fertilizantes orgânicos, em compostagem, como fonte de fibras e pectinas, como compostos com atividade antioxidante, como fonte de enzimas e produção de bioetanol (CARVALHO, 1992; ALEXANDRINO et al., 2007).

Diversos estudos tem utilizado resíduos de laranja como substrato em processos fermentativos para a produção de diferentes substâncias como ácidos orgânicos e enzimas. Dentre os estudos que utilizam os resíduos da indústria de sucos de laranja, tem-se a produção de ácido elágico e compostos fenólicos (SEPÚLVEDA et al., 2020), ácido D-lático (BUSTAMANTE et al., 2019), ácido láctico (RICCI et al., 2019), pectinases (GIESE; DEKKER; BARBOSA, 2008, MRUDULA; ANITHARAJ, 2011) e ácido cítrico (ZAFIRIS et al., 1994; TORRADO, 2011).

### 3.2 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

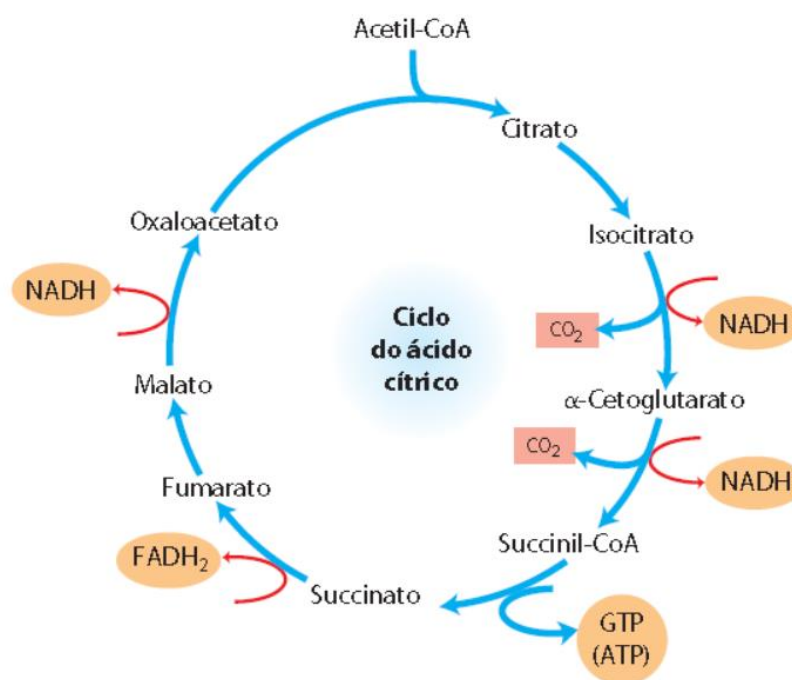
Ácido cítrico ou citrato de hidrogênio, de nome oficial ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, é um ácido orgânico tricarboxílico fraco, que está presente na maioria das frutas cítricas, como o limão e a laranja. O ácido cítrico puro é incolor, facilmente solúvel em água, apresenta peso molecular de 192,12 g/mol, ponto de fusão de 153 °C, é biodegradável, econômico e seguro (CARVALHO, 2005; ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; SHETTY, 2015; UZAH; AKANI; ODU, 2020). No quesito ambiental, o ácido é rapidamente degradado em sistemas de esgoto, solo e em águas superficiais, não apresenta riscos para o ambiente ou à saúde humana (OECD, 2001; DHILLON, et al. 2011; CIRIMINNA et al., 2017).

É um intermediário fundamental do Ciclo de Krebs, postulado primeiramente por Hans Krebs em 1937, também chamado de “Ciclo do Ácido Tricarboxílico” ou de “Ciclo do Ácido Cítrico” (GREWAL; KALRA, 1995; NELSON; COX, 2011; ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

O início do ciclo ocorre com uma reação catalisada pela enzima citrato sintase através da condensação de uma molécula de acetil-coenzima A com uma molécula de oxaloacetato, formando o citrato (Fig. 1). Após uma sequência de sete reações, o citrato é convertido a oxaloacetato liberando duas moléculas de CO<sub>2</sub>, regenerando uma molécula de oxaloacetato, promovendo o ganho energético de três moléculas de NADH, uma molécula de FADH<sub>2</sub> e um nucleotídeo trifosfatado (ATP) (KUBICEK; ROHR, 1985; BEROVIC; LEGISA, 2007; NELSON; COX, 2011; TONG et al., 2019).

Das oito reações, três delas são pontos de regulação do ciclo do ácido cítrico. O primeiro ponto de regulação do ciclo ocorre com a citrato sintase quando o suprimento de energia celular é alto, a enzima é inibida por quantidades elevadas de ATP, acetil-coenzima A e NADH. Os outros dois pontos de regulação envolvem as enzimas isocitrato-desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase (SCAINI et al., 2011; NELSON; COX, 2011).

**Figura 1 – Ciclo do Ácido Cítrico**



**Fonte:** Nelson; Cox, 2011.

Os principais produtores e consumidores globais de ácido cítrico são a China, Europa Ocidental e os Estados Unidos, sendo que a China contribui com 70% da produção global de ácido cítrico (WANG et al., 2019). Em 2015, a produção mundial de ácido cítrico foi maior que um milhão de toneladas (CAMARGO et al., 2019).

Tecnologias para a produção de ácido cítrico têm sido estudadas, e a utilização de processos fermentativos é uma alternativa para alcançar a produção de ácido cítrico em quantidades que supram a demanda

comercial (AMATTO; BECI; BEOLCHINI, 2020; UZAH; AKANI; ODU, 2020). A demanda por produção de ácido cítrico por processo fermentativo tem aumentado, e avalia-se que a produção mundial anual de ácido cítrico em 2020 seja de 2 milhões de toneladas (HU et al., 2018; AMATO; BECI; BEOLCHINI, 2020).

A alta demanda de ácido cítrico se deve às diversas aplicações deste ácido. Dentre as quais, nas indústrias farmacêuticas, na composição de produtos de higiene pessoal, cosméticos e anticoagulantes, na indústria alimentícia, na produção de bebidas, como conservante, emulsificantes, antioxidantes, tamponantes e estabilizantes e ainda bastante utilizado na indústria ambiental, em processos de remediação ambiental (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; CIRIMINNA et al., 2017; UZAH; AKANI; ODU, 2020).

Um dos principais processos para a produção de ácido cítrico, é por via fermentativa, a qual pode utilizar diversos tipos de substratos, como óleo de canola (GOOD et al., 1985), bagaço de mandioca (PRADO et al., 2005), resíduos de laranja (RIVAS et al., 2008), uva (HANG; WOODAMS, 1986), casca de kiwi (HANG; LUH; WOODAMS, 1987), resíduos de cervejaria (HANG et al., 1977), dentre outros.

### 3.2.1 Processos Fermentativos Para Produção de Ácido Cítrico

Os processos fermentativos podem ser realizados por três tipos: Fermentação Submersa, Fermentação em Superfície e Fermentação em Estado Sólido (ACOSTA, 1994; BEROVIC; LEGISA, 2007; SHOW et al. 2015; AMATTO; BECI; BEOLCHINI, 2020).

A Fermentação Submersa é caracterizada pelo crescimento do microrganismo em meio de cultura líquido, como melaço e caldos, (GIBBS et al., 2000; SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012; BEHERA, 2020). Pastore, Hasan e Zempulski (2011) utilizaram Fermentação Submersa com meio de Prescott & Dunn e *A. niger* para produzir ácido cítrico. Constataram que o uso de peptona associado ao uso do sulfato de amônio para o meio sintético apresentou melhor produção (62,9 g/L.dia de ácido cítrico) sob as condições estudadas.

Bossa (2020) selecionou e avaliou a produção de ácido cítrico por *A. welwitschiae* isolado de alho brasileiro, por Fermentação Submersa, além

de obter linhagens mutantes para a produção de ácido cítrico. A autora selecionou duas linhagens de *A. welwitschiae*, UELAs 20.290 e UELAs 15.262, que produziram 5,48 g/L (em 7 dias) e 10,02 g/L (em 10 dias) de ácido cítrico, respectivamente. Por apresentar satisfatória produção de ácido cítrico, a linhagem UELAs 15.262 foi selecionada para obtenção de linhagens mutantes induzidas por luz ultravioleta, a qual (linhagem UELAs 15.262/35) a produção de ácido cítrico foi incrementada em 57,48% em relação a linhagem selvagem.

A Fermentação em Superfície foi introduzida em 1919 por Societé des Produits Organique, na Bélgica, e ainda é um processo utilizado, pois requer instalações mais simples, baixo investimento, menor custo de energia com sistema de refrigeração e aquecimento (ACOSTA, 1994; BEROVIC; LEGISA, 2007).

O processo de Fermentação em Superfície é realizado em câmeras de fermentação com bandejas (de alumínio, aço ou polietileno) organizadas em prateleiras. O microrganismo se desenvolve formando uma película na superfície do substrato, que pode ser sólido ou líquido, como melão de beterraba e farelo de trigo (BEHERA, 2020). O sistema requer suprimento de oxigênio ao micélio, assim a circulação de ar passa pela superfície a fim de manter a umidade e temperatura controlada, uma vez que grande quantidade de calor é gerado durante o processo (DHILLON et al., 2011).

Drysdale e McKay (1995) utilizaram *A. niger* ATCC 9142 sob Fermentação em Superfície, com sacarose como substrato, e obtiveram 18 g/L de ácido cítrico após 24 dias. Em condições de fermentação semelhantes utilizado inulina como substrato, a produção de ácido cítrico foi de 14 g/L. Ao realizar uma modificação da fermentação, com circulação de ar sobre a superfície do meio, os autores obtiveram melhor quantidade de ácido cítrico, resultando em 42 g/L também após 24 dias de incubação.

A Fermentação em Estado Sólido promove o crescimento de microrganismos em substratos sólidos e úmidos, na ausência de água livre. O substrato sólido atua como suporte físico, fornece nutrientes e retém a água, atendendo aos requisitos do crescimento de microrganismo (BARRINGTON; KIM, 2008). A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (PINTO et al., 2005).

Diferentes substratos podem ser utilizados na Fermentação em Estado Sólido, como o melão de cana-de-açúcar e milho (SHETTY, 2015), melão de beterraba (ROUKAS, 1991), extrato de alfarroba (AUTA et al., 2014), bagaço de maçã (SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002), e outros.

O uso de resíduos agroindustriais em processos Fermentativos no Estado Sólido é favorável pois, além de minimizar os problemas ambientais relacionado ao descarte de resíduos, é economicamente viável, uma vez que os resíduos cítricos apresentam alta quantidade de carboidratos, atuando como fontes de carbono e energia para o crescimento de microrganismos, tornando-os atraentes para a produção de ácido cítrico (TORRADO et al., 2011; SEPÚLVEDA et al., 2020).

Aliado ao uso de resíduos agroindustriais como fontes de carbono à produção de ácido cítrico, ainda há necessidade de uma combinação específica de condições como a disponibilidade de íons hidrogênio e oxigênio dissolvidos e oligoelementos (metais e fosfato), que influenciam o desempenho da fermentação (KRUPAVATHI; MANGALA, 2015).

Diferentes espécies de microrganismos (fungos, leveduras e bactérias) podem ser utilizadas para a produção de ácido cítrico no processo fermentativo. Estudos acerca da produção de ácido cítrico envolvem principalmente fungos e leveduras como do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, *Trichoderma* e *Arthrobacter* (ANGUMEENAL et al., 2003; SHOW et al., 2015; AMATTO; BECI; BEOLCHINI, 2020).

Outras espécies do gênero *Aspergillus* foram relatadas como boas produtoras de ácido cítrico: *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fenicis*, *A. fonsecalus*, *A. fumaricus*, *A. luchensis*, *A. saitoi* e *A. usumii* (BEROVIC; LEGISA, 2007; PAGANINI et al., 2007).

Tran, Sly e Mitchell (1998) utilizaram *A. foetidus* ACM 3996 e três linhagens de *A. niger* ACM 4992 (ATCC 9142), ACM 4993 (ATCC 10577) e ACM 4994 (ATCC 12846) para produzir ácido cítrico por Fermentação em Estado Sólido a partir de resíduos de abacaxi. *A. niger* ACM 4992 produziu a maior quantidade de ácido cítrico, totalizando em 19,4 g de ácido cítrico por 100 g de resíduo de abacaxi seco fermentado em condições ideais, representando um rendimento de 0,74 g ácido cítrico/g de açúcar consumido.

Dhillon et al. (2011) estudaram diferentes resíduos agroindustriais sólidos (bagaço de maçã, resíduos cítricos, grãos usados da cervejaria) como substratos para Fermentação em Estado Sólido, e também diferentes resíduos líquidos (lodo de ultrafiltração de bagaço de maçã, lactossoro, água da indústria de amido, lodo secundário municipal) como substrato para Fermentação Submersa, para avaliar o potencial de produção de ácido cítrico com *A. niger* NRRL 567 e NRRL 2001. Dentre todos os substratos sólidos utilizados, o bagaço de maçã seco foi o melhor substrato para a produção de ácido cítrico com a obtenção de 66,0 e 61,0 g/kg de substrato por *A. niger* NRRL 567 e *A. niger* NRRL 2001, respectivamente, em 72 horas de fermentação.

Roukas e Kotzekidou (2020) avaliaram a produção de ácido cítrico utilizando resíduos de cascas de romã, secas e não secas, como substrato para a fermentação em estado sólido, por *A. niger* B60. Os autores obtiveram 278,5 g/kg de ácido cítrico com cascas de romã secas, e 306,8 g/Kg de ácido cítrico com cascas de romã não secas.

Zafar et al. (2020) utilizaram casca de amendoim, casca de laranja e uma mistura de ambos os resíduos na proporção de 50%:50% como substrato para a Fermentação Em Estado Sólido por *Rhizopus stolonifer* e *A. niger*. A maior produção de ácido cítrico (7,6 g/L), foi obtido com a utilização de 25 g de casca de laranja, a 30 °C, pH 5,5, após 48 horas.

### 3.3O GÊNERO *Aspergillus*

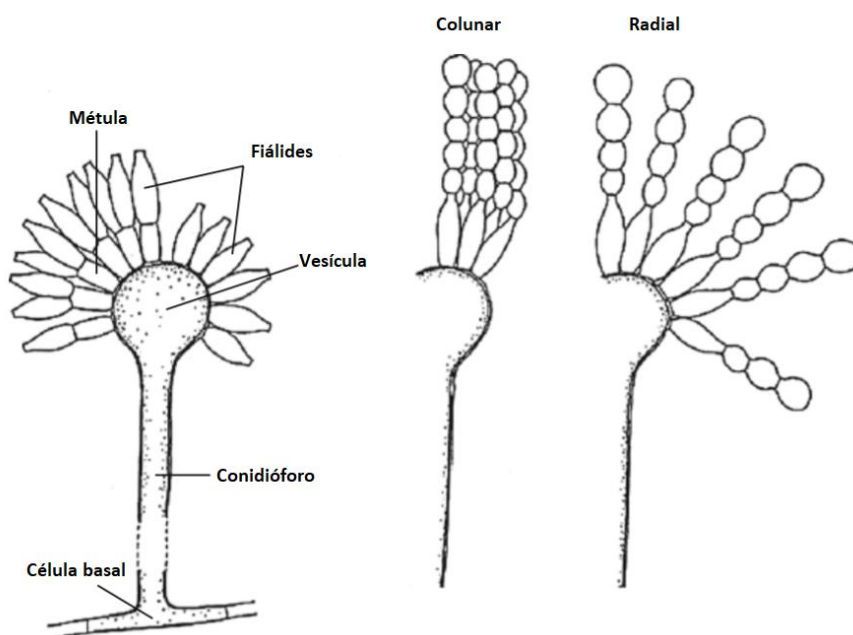
Dentre as espécies de fungos utilizadas com maior frequência no campo da biotecnologia para produção de diversos metabólitos, são as espécies do gênero *Aspergillus*. Há ocorrência destas espécies em todo o mundo e são capazes de se desenvolver em uma vasta variedade de substratos. São conhecidas por deteriorar alimentos, algumas por produzir micotoxinas e frequentemente são relatados como patógenos humanos e animais (BEHERA, 2020; SAMSON et al., 2014).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são anamórficos, pertencem ao reino Fungi, filo *Ascomycota*, ordem *Eurotiales*, família *Aspergillaceae*, classe *Eurotiomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae* e gênero *Aspergillus*. Houbraken et al. (2014) e Hubka et al. (2014) apresentaram 4 subgêneros: *Aspergillus*,

*Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*, além de 20 seções para o gênero *Aspergillus* (SAMSON et al., 2014).

Esse gênero possui uma estrutura denominada de conidióforos, usualmente aseptado, sendo formada por uma haste que termina na forma de vesícula esférica, a qual é a base para o crescimento de fiálides, que são as estruturas onde se formam os conídios (esporos assexuados) (Fig. 2). Além disso, as colônias podem exibir diferentes colorações como branco, amarelado, verde, marrom e preto dependendo da espécie (WAINWRIGHT, 1995; KLICH, 2002).

**Figura 2** – Estrutura morfológica de *Aspergillus*.



**Fonte:** Adaptado de Guarro; Xavier; Severo (2009).

Os *Aspergillus* negros (*Aspergillus* seção *Nigri*) contempla espécies que são muito utilizados na indústria de fermentação para produzir enzimas, como amilases e lipases, e ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ácido glucônico. São considerados um dos grupos mais difíceis de serem classificados e identificados (VARGA et al., 2011; HOUBRAKEN et al., 2014; UPTON et al., 2020). Em alguns casos, estas espécies de *Aspergillus* section *Nigri* são

morfologicamente indistinguíveis (VARGA et al., 2011; SUSCA et al., 2016). Dentre as espécies desta seção, tem-se *A. niger*, muito utilizado na indústria e *A. awamori*, que em 2013, um grupo distinto de isolados foi renomeado a *A. welwitschiae* (HONG et al., 2013), sendo assim descrita como uma espécie estritamente relacionada à espécie *A. niger* (PALUMBO; O'KEEFFE, 2013).

A maioria dos isolados de *A. welwitschiae*, assim de *A. niger*, produzem fumonisina B2 e ocasionalmente ocratoxina A (FRISVAD et al., 2011; PALUMBO; O'KEEFFE; MCGARVEY, 2011). Por outro lado, tem-se linhagens de ambas as espécies, utilizadas industrialmente para a produção de enzimas como *amiloglucosidase*, *alfa-amilase* e *protease* (CUI et al., 1998), *amilases* (PRAKASHAM et al., 2007), *inulinase* (MANIN et al., 2017), *xilanases* e *pectinases* (BOTELLA et al., 2007) e *celulases* (ZUNIGA et al., 2011; ALVES et al., 2020).

A produção de ácido cítrico por fungos do gênero *Aspergillus* é relatada por diferentes métodos e substratos (ADHAM, 2002; DAMIREL et al., 2005; DHILLON et al., 2011; BETIKU; ADESINA, 2013; OLESIUK et al., 2014; YU et al., 2018; ABOYEJI et al., 2020; NAKAMURA, et al, 2020).

Embora a produção de citrato por *A. niger* tem sido objeto de estudo há anos, o mecanismo de regulação e consequente acúmulo de ácido cítrico, ainda não é totalmente compreendido. Sabe-se que *A. niger*, é capaz de acumular e secretar ácido cítrico na presença de altas concentrações de nutrientes como açúcares e na presença de baixos níveis de ferro, zinco, cobre, manganês, fósforo, magnésio, potássio, nitrogênio e fosfato (PASTORE; HASAN; ZEMPULSKI, 2011; ODONI et al., 2019).

Diversos estudos tem sido desenvolvidos com o intuito de contribuir com a elucidação de quais tipos de açúcares contribuem com a maior produção de citrato pelos microrganismos e como ocorre efetivamente os mecanismos de acúmulo e exportação do citrato (TORRES, 1994; KARAFFA; KUBICEK, 2003; PAPAGIANNI, 2007).

Uma das estratégias que tem contribuído com o maior acúmulo de ácido cítrico é a utilização de linhagens específicas de microrganismos, com características genéticas favoráveis, como duplicação de genes envolvidos no ciclo de Krebs (PEL et al., 2007; BEHERA, 2020; KADOOKA et al., 2020), por exemplo. Ainda, tem-se como estratégia ao maior acúmulo de ácido cítrico o

melhoramento de linhagens. O estudo de Steiger et al. (2019) dedicou-se à superexpressão de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do citrato por *A. niger*, obtendo linhagens com maior potencial de produção e acúmulo deste ácido.

Uma outra alternativa, bastante utilizada com a finalidade de melhorar a produção de ácido cítrico por determinadas linhagens, é através de mutações aleatórias. Os estudos de Gardner; James; Rubbo (1956), Millis et al. (1963), Rodrigues et al. (2008), Hu et al. (2014), Wu et al. (2017), Zhang et al. (2019), obtiveram linhagens mutantes que foram capazes de produzir ácido cítrico em maiores quantidades que linhagens selvagens, sob condições pré-estabelecidas. Neste sentido, a utilização de linhagens com características genéticas favoráveis aliadas à utilização de resíduos agroindustriais para a produção de ácido cítrico, é de grande interesse.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens de *A. welwitschiae*, a linhagem selvagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 proveniente de alho brasileiro, Vanzela et al. (2020), e a linhagem mutante *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35, obtida por Bossa, L.F. (2020) (dados não publicados). As linhagens utilizadas neste estudo foram previamente selecionadas para a produção de ácido cítrico sob fermentação submersa.

### 4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DO RESÍDUO DE LARANJA

O resíduo da laranja foi fornecido pela empresa Natú, com sede em Londrina/PR, que fabrica sucos de frutas. O resíduo de laranja foi coletado, imediatamente processado e utilizado como substrato para produção de ácido cítrico. Inicialmente foi separada manualmente a casca das demais partes da laranja (restos de suco, endocarpo e sementes). O material foi distribuído em bandeja e submetido ao processo de secagem em 50 °C. Após a secagem completa, o material foi triturado com moinho analítico A10 Basic 23 (IKA® Werke, IKA A10), peneirado com peneira granulométrica de 0,59 mm (Solotest, abnt 30, Tyler 80) e armazenado em embalagens herméticas.

O resíduo de laranja processado foi submetido à avaliação da interferência de seus componentes por temperatura, tempo e pressão, via autoclave. Nesta etapa, o resíduo foi analisado antes e depois de ser submetido a autoclave por 15 minutos, 121 °C a 1 atm. O resíduo de laranja, tanto o resíduo não submetido, quanto o resíduo submetido à autoclave, foram avaliados quanto à quantidade de ácido cítrico, açúcares totais e redutores. Para a realização dessas análises, o extrato bruto obtido a partir do resíduo da laranja foi utilizado pela adição de 30 mL de água destilada a 1,4 g do resíduo processado, seguido de repouso por 1 hora e filtração a vácuo com papel filtro qualitativo.

#### 4.2.1 Determinação de Açúcares Totais e Redutores

A determinação de açúcares totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Fenol sulfúrico, com 1 mL do extrato bruto, segundo Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glucose de 20 a 100 µg/mL.

Para determinação quantitativa de açúcares redutores utilizou-se o método espectrofotométrico de Somogyi Nelson, com 1 mL do extrato bruto, como descrito por Somogyi (1954) e Nelson (1944), utilizando curva padrão de glucose nas concentrações de 20 a 100 µg/mL.

#### 4.2.2 Determinação de Ácido Cítrico

A quantificação de ácido cítrico foi realizada pelo método de piridina-anidrido acético como descrito por Marrier e Boulet (1958). A 1 mL do extrato bruto, foi adicionado 1,30 mL de piridina e agitou-se rapidamente. A esta mistura foi adicionada 5,70 mL de anidrido acético e incubado em banho-Maria a  $32 \text{ }^{\circ} \text{C} \pm 0,25$  por 30 min. A detecção do ácido cítrico foi determinada posteriormente em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22) a 405 nm. A quantificação do ácido foi verificada com o auxílio da curva padrão nas concentrações de 100 µg/mL a 1000 µg/mL, utilizando ácido cítrico anidro 99,5 % (Cinética Produtos Químicos).

### 4.3 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *A. welwitschiae*

As cepas de *Aspergillus welwitschiae* foram previamente cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias a 28 °C. Em seguida, foi preparada uma suspensão de  $10^7$  conídios/mL em solução de água destilada e Tween 80 0,5%, utilizada como inóculo. A cinética da Fermentação em Estado Sólido foi realizada em triplicata experimental com as linhagens UELAs 15.262 e UELAs 15.262/35, por um período de 10 dias.

Inicialmente foram preparados frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 1,4 g de substrato (resíduo de laranja, item 4.2), 3,0 mL de água destilada e 1,0 mL de meio Prescott & Dunn (Sacarose 10 g/L; 5 g/L de peptona,

5 g/L de sulfato de amônio, 1 g/L de nitrato de amônio, 1 g/L de fosfato de monopotássio, 0,23 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, pH 4,0) e foi inoculado com uma suspensão a  $10^7$  conídios/mL de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 ou *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 e a mistura foi inoculada nos frascos Erlenmeyer contendo o resíduo de laranja. Em seguida, os frascos foram incubados a 35 °C por 10 dias.

A cada 48 horas o sistema foi umedecido com 500 µL de água destilada conforme Torrado et al. (2011). A cada dois dias uma parcela de cada linhagem foi analisada por meio da coleta do extrato bruto de cada linhagem, obtido pela adição de 30 mL de água destilada, seguida homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 1 hora. Após, foi feita a filtração a vácuo com papel filtro qualitativo e posterior determinação de ácido cítrico, açúcares totais e redutores e atividade celulásica.

#### 4.3.1 Determinação da atividade celulásica

A atividade celulásica foi determinada de acordo com a metodologia de Periyasamy et al. (2017), em que foram utilizados 0,5 mL do extrato bruto.

#### 4.4 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *A. welwitschiae* DURANTE 96 HORAS

Após a cinética de produção de ácido cítrico por um período de 10 dias, a avaliação da produção de ácido cítrico foi realizada através de uma nova cinética por um período de 96 horas, com as linhagens de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 e UELAs 15.262/35 como descrito no item 4.3, analisando uma parcela de cada linhagem a cada 24 horas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico a ser submetido a revista “*Journal Preparative Biochemistry & Biotechnology*”:

Artigo 1: “Potential for citric acid production by *Aspergillus welwitschiae* in orange waste”.

## 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

### Abstract

Citric acid is an organic acid widely used in the food and pharmaceutical industry, acting as a preservative, emulsifier, antioxidant and others. Citric acid is industrially obtained by microbial fermentation, using filamentous fungi of genera *Aspergillus*. Citric acid is also naturally produced by citrus fruits, whose production has consistently increased in recent decades. Orange is the main citrus fruit produced and used for juice production, resulting in large amount of residues rich in organic matter. The purpose of this study was to evaluate the potential for production of citric acid by wild *Aspergillus welwitschiae* UELAs 15.262 and mutante *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strains in orange waste. Orange waste was collected, processed and used as a substrate in Solid State Fermentation with  $10^7$  conidia/mL of *A. welwitschiae* UELAs 15.262 or UELAs 15.262/35 strain. Substrate was added with Prescott & Dunn médium (pH 4.0) and incubation at 37 °C. The production of citric acid by the strains *A. welwitschiae* UELAs 15.262 was constant throughout the ten days. The *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain reached the highest amount of citric acid at fourth day ( $4.88 \pm 0.33$  g/L) of fermentation, same time for the maximum use of total sugars, of 71.9% and 72.1% of sugar by the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 and UELAs 15.262/35 strains, respectively. Reducing sugars were used from the second day of fermentation. The production of *cellulases* was detected from the sixth day of fermentation for the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain (0.62 U/mL) and *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 (1.22 U/mL). In conclusion, the *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain showed greater potential for the production of citric acid in orange residue, producing up to 50% more citric acid compared to the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain.

**Keywords:** Citric acid. Orange waste. *Aspergillus welwitschiae*.

### 1 Introduction

The global production of citrus fruits has grown continuously in the last decades, with Brazil, Spain, Italy, the United States and China being the main producers, representing more than two thirds of the global production (1). Oranges, lemons, grapefruits and tangerines represent approximately 98% of the entire industrialized harvest, with oranges being the most relevant with approximately 82% of the total (2).

The production of citrus fruits for the industrial extraction of citrus juices provides large amounts of residues, since about 50% of the original weight of the fruits corresponds to the solid residues of juice processing (1, 3, 4).

These residues, such as orange juice, are the source of several compounds such as soluble and insoluble sugars, fibers, organic acids, amino acids and proteins, minerals, oils and lipids, flavonoids and vitamins (5, 6).

The use of these residues for the production of citric acid is favorable from an economic as well as an environmental point of view, as it helps to reduce environmental pollution, since the residues must be sent to an appropriate place, which meets the standards established in environmental legislation (3, 7).

Citric acid or hydrogen citrate, officially known as 2-hydroxy-1,2,3-propanotricarboxylic acid, is a weak organic tricarboxylic acid, which is present in most citrus fruits, such as lemon and orange (8, 9, 10, 11).

The high demand for citric acid is due to the various applications of this acid, such as pharmaceutical industries, personal hygiene products, cosmetics and anticoagulants, food industry, beverages, preservative, emulsifiers, antioxidants, buffering and stabilizers and still widely used in the environmental industry, in processes of environmental remediation (9, 11, 12).

One of the main processes for the production of citric acid is through fermentation, which can use different types of substrates, such as canola oil (13), cassava bagasse (14), orange waste (1), grape (15), kiwi peel (16), brewery waste (17), and others.

Large amounts of agro-industrial waste are generated from the processing of agricultural raw materials. The use of these wastes for the production of citric acid is favorable from an economic as well can helps to reduce environmental pollution (3, 7).

Studies on the production of citric acid mainly involve fungi and yeasts such as *Aspergillus niger*, *Penicillium luteum*, *P. citrinum*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Trichoderma viride* and *Arthrobacter parafineus* (9, 18, 19). In addition to *Aspergillus niger*, other species of *Aspergillus* have been reported to be good producers of citric acid: *A. welwitschiae* (11), *A. foetidus* (20), *A. fenicis* (21), *A. luchensis* (22).

The most used technique to improve citric acid producing strains has been through the induction of mutations in parental strains using mutagenesis (23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

In view of the industrial demand for citric acid and the biotechnological enhancement of several agro-industrial waste, the present study aims to evaluate the potential for production of citric acid by wild *Aspergillus welwitschiae* UELAs 15.262

strain and mutant *Aspergillus welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain in orange waste processed, by Solid State Fermentation.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Biological Material**

In this study, two strains of *Aspergillus welwitschiae* were used, UELAs 15.262 wild strain from Brazilian garlic (31) and UELAs 15.262/35 mutant strain (unpublished data). The strains used in this study were previously selected for the production of citric acid under submerged fermentation.

### **2.2 Obtaining and preparing orange waste**

Orange juice waste was provided by the Natú company, based in Londrina/PR, which manufactures fruit. The orange waste was collected, immediately processed and used as a substrate for the production of citric acid by *A. welwitschiae* UELAs 15.262 wild strain and UELAs 15.262/35 mutant strain. Initially, the peel with the albedo was manually separated from the other parts of the orange waste (juice, endocarp and seeds). The material was distributed in a tray and maintained at 50 °C until complete drying.

After complete drying, the dried material was dried material with an analytical mill A10 Basic 23 (IKA® Werke, IKA A10), sieved with a 0.59 mm granulometric sieve (Solotest, abnt 30, Tyler 80) and stored in airtight packaging.

The processed orange waste was subjected to an evaluation of the interference of its components by temperature, time and pressure by autoclave. In this step, the waste was analyzed before and after being subjected to an autoclave for 15 minutes, 121 °C at 1 atm. Both orange waste, waste not submitted or waste submitted to the autoclave, were evaluated for the amount of citric acid, total and reducing sugars. To carry out these analyzes, the crude extract obtained from the orange waste was used by adding 30 mL of distilled water to 1.4 g of processed residue, followed by resting for 1 hour and vacuum filtration with qualitative filter paper.

#### **2.2.1 Determination of total and reducing sugars**

The determination of total sugars was done by the sulfuric phenol spectrophotometric method, with 1 mL of the crude extract, according to Dubois et al. (32), using a standard glucose curve of 20 to 100 µg/mL.

For quantitative determination of reducing sugars, the Somogyi Nelson spectrophotometric method was used, with 1 mL of the crude extract, as described by Somogyi (33) and Nelson (34), using a standard glucose curve in concentrations of 20 to 100 µg/mL.

### 2.2.2 Determination of Citric Acid

The quantification of citric acid was evaluated by the pyridine-acetic anhydride method as described by Marrier; Boulet (35). To 1 mL of the crude extract, 1.30 mL of pyridine was added and stirred rapidly. To this mixture, 5.70 ml of acetic anhydride was added and incubated in a water bath at 32 ° C ± 0.25 for 30 min. The detection of citric acid was later determined in a spectrophotometer (Biochrom Libra S22) at A405 nm. The acid quantification was verified based on the standard curve in the concentrations of 100 µg/mL to 1000 µg/mL, using 99.5 % anhydrous citric acid (Chemical Products Kinetics).

### 2.3 Kinetics of citric acid production by *A. welwitschiae*

The strains of *Aspergillus welwitschiae* were previously cultivated on potato dextrose agar (BDA) for 7 days at 28 °C. Afterwards, a suspension of 107 conidia/mL was prepared in a solution of distilled water and 0.5 % Tween 80, used as an inoculum. The kinetics of Solid State Fermentation was performed in an experimental triplicate with the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 and *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strains, for a period of 10 days.

Initially 50 mL Erlenmeyer flasks were prepared containing 1.4 g of substrate (orange waste, item 2.2), 3.0 mL of distilled water and 1.0 mL of Prescott & Dunn medium (10 g/L sucrose; 5 g/L peptone, 5 g/L ammonium sulfate, 1 g/L ammonium nitrate, 1 g/L Monopotassium fosfate, 0.23 g/L Magnesium sulfate heptahydrate, pH 4.0) and inoculated with a suspension of 107 conidia/mL of *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain or *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain and the mixture was inoculated in the Erlenmeyer flasks containing the orange waste. Then, the flasks were incubated in BOD at 35 °C for 10 days.

Every 48 hours the cultures were moistened with 500  $\mu$ L of distilled water (36) and every two days an experimental triplicate of each strain was analyzed by collecting the crude extract of each strain, obtained by adding 30 mL of distilled water, followed by homogenization and incubation at room temperature for 1 hour. Afterwards, vacuum filtration was performed with qualitative filter paper and later determination of citric acid, total and reducing sugars and cellulosic activity.

### *2.3.1 Determination of cellulosic activity*

Cellulosic activity was determined according to the methodology of Periyasamy et al. (37) in which 0.5 mL of the crude extract was used.

### *2.4 Kinetics of citric acid production by A. welwitschiae for four days*

In order to obtain a more detailed view of the citric acid production kinetics, the citric acid production evaluation was carried out for a period of 96 hours, with *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain and UELAs 15.262/35 strain as described in item 2.3, analyzing an experimental triplicate of each strain every 24 hours.

## **3 Results**

### *3.1 Kinetics of citric acid production by Aspergillus welwitschiae*

The initial amount of citric acid, total and reducing sugars in the orange residue was  $1.57 \pm 0.09$  g/L,  $8.81 \pm 0.21$  g/L and  $10.26 \pm 0.72$  g/L, respectively. After the sterilization process, the quantity obtained of citric acid and total sugars was  $3.17 \pm 0.06$  g/L and  $8.40 \pm 0.13$  g/L, respectively, while the concentration of reducing sugars was  $10.03 \pm 0.52$  g/L.

The production of citric acid by both *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strains and *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain was detected during 10 days. The production of citric acid by the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain was constant until the tenth day of fermentation.

Citric acid was present in cultures of *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strains and *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 from day 0 until the day 10, increasing in relation to baseline levels (day 0) for *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain, and reducing the citric acid concentrations in relation to baseline levels for *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain.

As for the *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain, there was a higher production of citric acid from the fourth day ( $4.88 \pm 0.33$  g/L) until the tenth day ( $5.20 \pm 0.04$  g/L) of fermentation (Fig 1, A). The production of citric acid by *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain was 38.3% higher than *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain on the fourth day, 23.6%, 54% and 53.8% on the sixth, eighth and tenth days, respectively.

Regarding the amount of total and reducing sugars, both strains used the two sources of sugars (Fig. 1, B). The total sugars were used in greater quantity by both strains from the fourth day of fermentation (*A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain –  $2.47 \pm 0.20$  g/L and *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain –  $2.45 \pm 0.21$  g/L, corresponding 71.9% and 72.1% of sugar used, respectively).

As for reducing sugars, both strains were used from the second day of fermentation (Fig. 1, C). However, on the fourth day of fermentation it was detected  $4.65 \pm 0.71$  g/L, consequently 54.7% of use of this sugar source by *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain, while for strain UELAs 15.262/35,  $1.44 \pm 0.44$  g/L and 86.5% use of reducing sugars.

Cellulases activity was detected from the fourth day of fermentation ( $0.62$  U/mL), with a gradual increase until the tenth day ( $0.85$  U/mL) by the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain (Fig. 1, D), at cellulosic activity of the *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain was detected from the sixth day ( $1.22$  U/mL) reaching  $1.15$  U/mL on the tenth day.

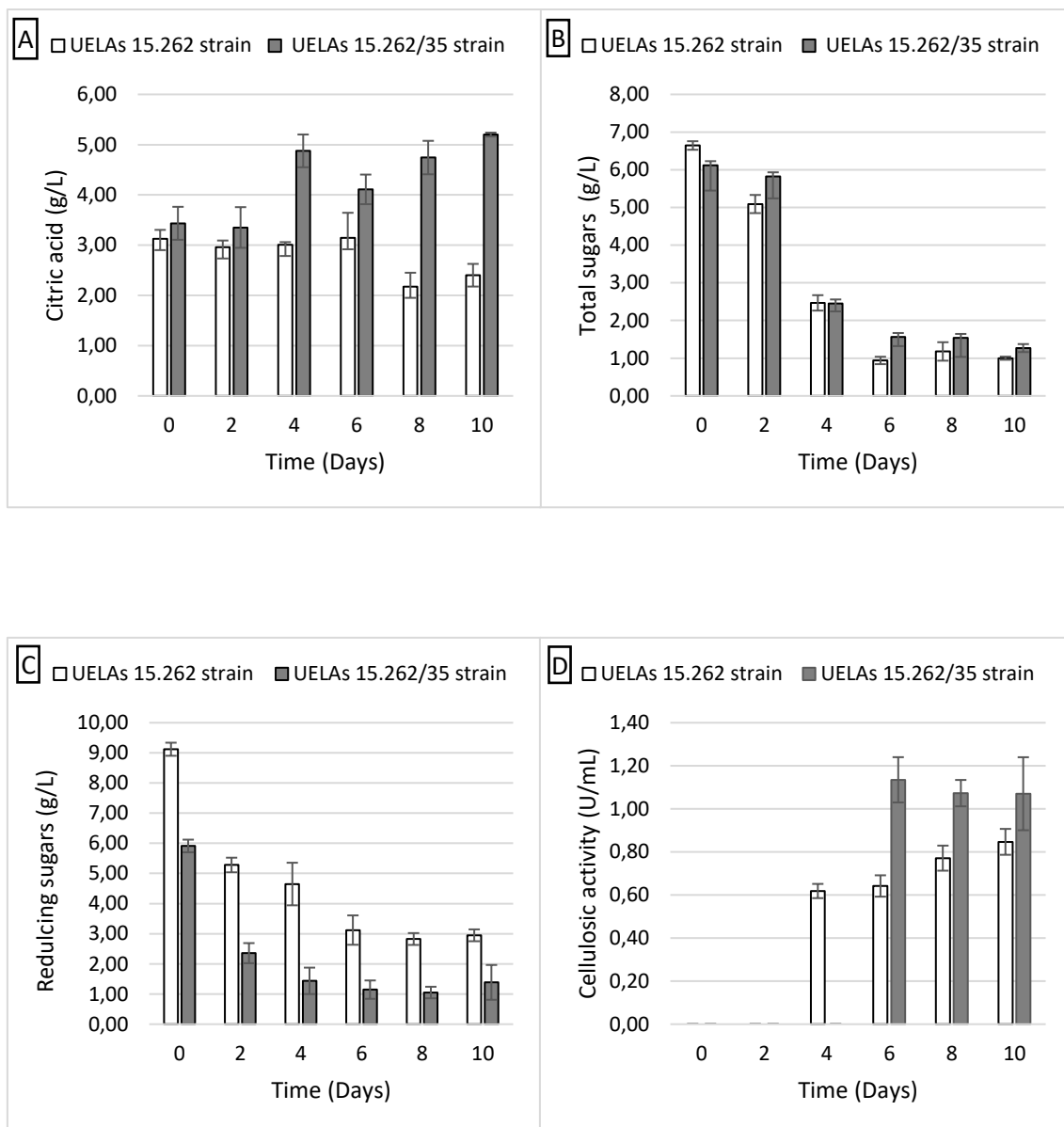


Figure 1 - Kinetics of citric acid production from orange waste, by *A. welwitschiae*. (A) Amount of citric acid by *A. welwitschiae* strains. (B) Quantity of total sugars by *A. welwitschiae* strains. (C) Amount of reducing sugars by *A. welwitschiae* strains. (D) cellulosic activity by *A. welwitschiae* strains.

### 3.2 Kinetics of the production of citric acid during 4 days

Due to the fact that the highest production of citric acid was initially detected on the fourth day of fermentation by *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain, the fermentation process was carried out with the evaluation of the production of citric acid, total sugars and reducers every 24 hours.

As reported in the previous item 3.1, the production of citric acid by *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain remained constant throughout the fermentation process (Fig. 2, A). However, for the *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain, the highest amount of citric acid ( $5.29 \pm 0.49$  g/L) was detected in the shortest fermentation period, with 72 hours, being constant until the fourth day of fermentation. The production of citric acid by this strain remained about 50 % higher than the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain.

As for total sugars, there was a greater use of total sugar by the *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain (83,5 %) over 96 hours compared to the *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain (50,3 %) (Fig. 2, B). However, the use of reducing sugars was higher for *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain (91,2 %) in relation to *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain (61,2 %), over the 96 hours (Fig. 2, C).

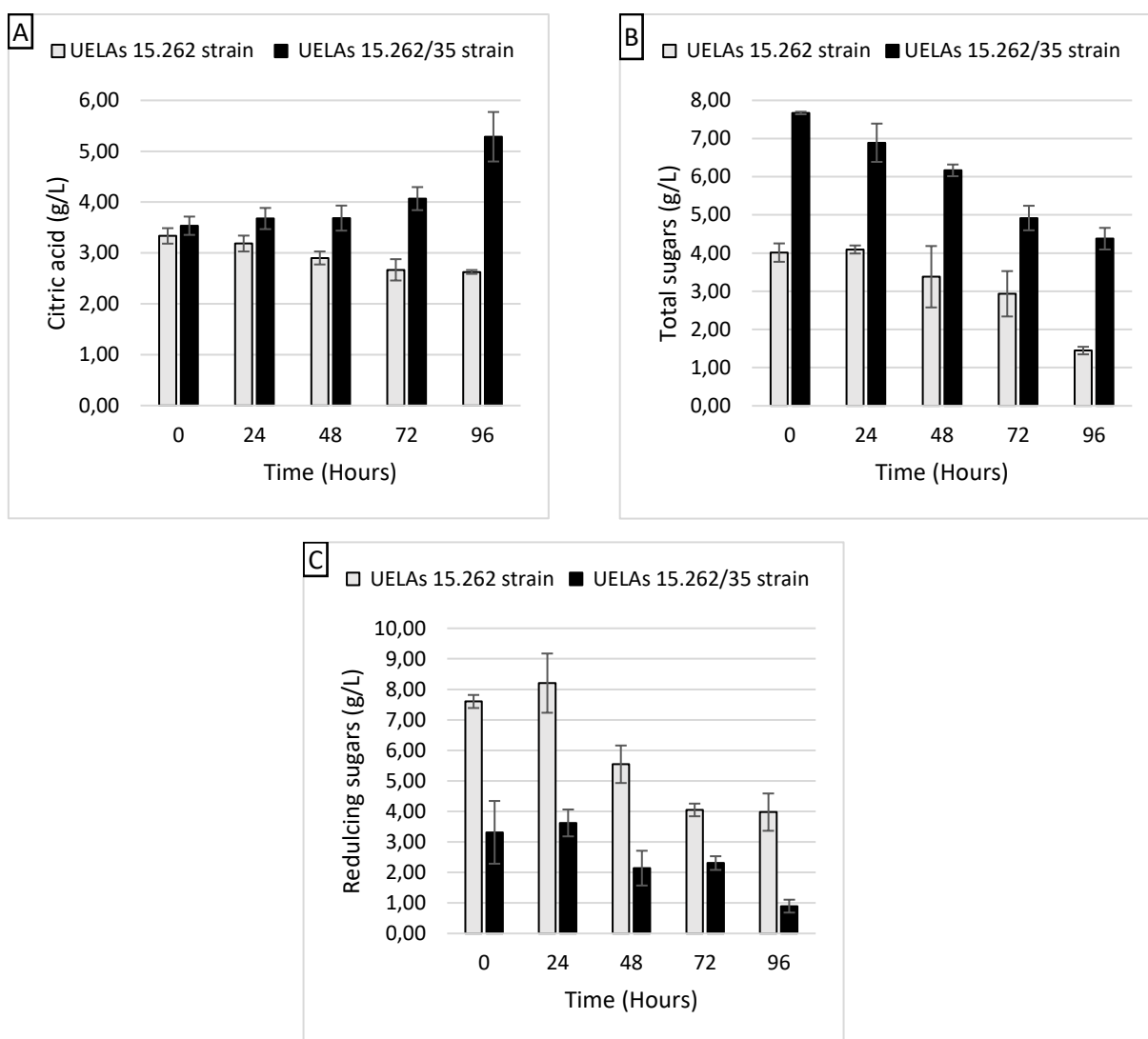


Figure 2 - Kinetics of citric acid production from orange waste by *A. welwitschiae*. (A) Amount of citric acid by *A. welwitschiae* strains. (B) Quantity of total sugars by *A. welwitschiae* strains. (C) Amount of reducing sugars by *A. welwitschiae* strains.

#### 4 Discussion

Production of Citric Acid (CA) by *Aspergillus* species is dependent on several factors, among which species and strains, availability of nutrients and parameters related to the fermentation process (9, 12, 40, 41).

Among the best CA producers are *A. niger* strains (18, 42). Studies have shown that increased production of CA by certain strains is a consequence of the duplication of genes such as citrate synthase (43). On the other hand, some strains of *A. niger* are potential producers of fumonisin B2 and/or ochratoxin A (44, 45).

Strategies related to increased production of CA by specific strains that do not produce mycotoxins is the use of mutant strains. Similar to the *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain, other authors also used mutant strains for the production of CA (46,47, 48, 49, 50). According to the production of CA by *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain, the mutants strains provide an amount greater than approximately 30% to 50% of the production of CA, in relation to wild strains.

*A. welwitschiae* previously called *A. awamori* (51, 52, 53) is morphologically indistinguishable from *A. niger* and strains of this species, although they may be potential producers of fumonisin B2 and ochratoxin A, have shown good production of enzymes and organic acids (53, 54, 55).

Along with the strains, the highest production of CA is obtained under the availability and specificity of some nutrients and associated abiotic factors (56, 57, 58). It is known that the greatest production of CA occurs with the availability of substrates rich in sugars (9, 19, 59). In this sense, the production of CA from waste rich in sugar is an alternative to cost reduction, as well as to the contribution to the environmental impact provided by the disposal of this waste.

The orange residue has a large amount of sugars such as glucose, fructose and sucrose, in addition to some organic acids such as CA itself (60, 61, 62, 63). This composition makes this residue favorable to the production of CA. And in fact, the higher production of CA on the fourth day of fermentation, is in accordance with the utilized of approximately 72% of total sugar and 86% of reducing sugar, probably being utilized for the production of CA by *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35. However, *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain provided the lowest production of CA, combined with the reduced use of reducing sugars (54.7%) may have favored the accumulation of other organic acids. Study demonstrated that less use of sugars provided the accumulation of oxalic acid with a consequent decrease in the accumulation of CA (64).

One of the ways used by fungi for the release of reducing sugars is the release of cellulolytic enzymes (65, 66, 67). The increase in the activity of *cellulases* of *A. welwitschiae* UELAs 15.262 strain was observed only on the fourth day of fermentation, due to the amount of nutrients that could be readily used, coming from both the orange residue and the culture medium (starter), allowing the initial development of *A. welwitschiae*.

Abiotic conditions for the production of *cellulases* vary between authors. Sulyman et al. (68) report an optimal production of 87.69 U/mL with a pH

between 4-5 and a temperature of 40 °C. In Xue et al. (69) cellulosic activity was higher than 6.28 U/mL, at a temperature of 30 °C.

In the study by Alves et al. (70), using *A. japonicus*, the activities of total *cellulase* on paper and endoglucanases were 1.241 U/mL and 2.569 U/mL, respectively, values very close to those found in this study. In addition, the same author reports that the best pH obtained for the production of the enzyme was 4.0 and a temperature from 30 °C to 50 °C, conditions also used by the present work.

The use of nutrients combined with the production of CA is highly related to the production time of this acid. Several studies have shown that production of CA from waste for up to four days of fermentation (65, 71, 72, 73, 74,). The higher production of AC ( $5.29 \pm 0.49$  g/L) by *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain, from orange residues on the fourth day of solid fermentation, is favorable for contributing to cost reduction and control of the fermentation process. In contrast, other studies have shown CA production later (55, 75, 76), which can lead to disadvantages in obtaining CA by species of *Aspergillus* section *Nigri*, such as *A. niger* and *A. welwitschiae*.

Among the different types of fermentation processes, the use of Solid State Fermentation (SSF) proposes to improve the cost-benefit ratio of the process using solid waste as a substrate (77). The use of SSF has been an alternative for the production of citric acid using by-products and agro-industrial residues (78), as well as the use of orange residues for the production of citric acid and others compounds (1, 39, 79, 80).

The strains of *A. welwitschiae* studied showed potential for the production of citric acid by Solid State Fermentation using orange residue as a substrate. The mutant strain of *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 strain was the one that showed characteristics favorable to the higher production of CA in orange waste, in a shorter time (72 hours), reaching a production of up to 50% higher than the wild strain *A. welwitschiae* UELAS 15.262 strain.

## **References**

- (1) RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J. M. 2008. Submerged citric acid fermentation on Orange peel autohydrolysate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, (56), 2360-2387.
- (2) MARÍN, F. R.; RIVAS, C. S.; GARCÍA, O. B.; CASTILLO, J.; ALVAREZ, J. A. P. 2007. Byproducts from diferentes citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, (100), 736-741.

- (3) PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. 2007. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, 2 (7).
- (4) LEITÃO, V. F.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. 2010. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. *Waste Biomass Valor*, 1 (65), 76, 2010.
- (5) LOPÉZ, J. F.; GINÉS, J. M. F.; CARBONELL, L. A.; SENDRA, A.; BARBERÁ, E. S.; ALVAREZ, J. A. P. 2004. Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science & Technology*, (15), 176-185.
- (6) SHIRAHIGUE, L. D.; ANTONINI, S. R. C. 2020. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. *Ciência Rural*, Santa Maria, 50 (4).
- (7) ALI, S. R.; ANWAR, Z.; IRSHAD, M.; MUKHTAR, S. 2019. Bio-synthesis of citric acid from single and co-culture-based fermentation technology using agro-wastes. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, (9) 52-62.
- (8) CARVALHO, V.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. 2005. Aditivos alimentares produzidos por via Fermentativa parte I: ácidos orgânicos. *Revista Analytica*, (18).
- (9) ANGUMEENAL A.; KAMALAKANNAN P.; PRABHU H.J.; VENKAPPAYYA D. 2003. Effect of transition metal cations on the production of citric acid using mixed cultures of *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *Journal Indian Chemistry Society*, (80), 903–906.
- (10) SHETTY, V. Production and optimizations of citric acid by *Aspergillus niger* using molasses and corncob. 2015. *International Journal of Pharmacy and Phamaceutical Sciences*, (7), 5 ed.
- (11) UZAH, G., A.; AKANI, N., P.; ODU, N. N. 2020. Screening of *Aspergillus* and *Candida* species with utmost potencial to synthesize citric acid. *Journal of Advances in Microbiology*, 20 (7), 10-18.
- (12) CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO F.; DELISI R.; PAGLIARO M. 2017. Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chemical Central Journal*, 22 (11).
- (13) GOOD, D. W.; DRONIUK, R.; LAWFORDE, G. R.; FEIN, J. E. 1985. Isolation and characterization of a *Saccharomycopsis lipolytica* mutant showing increased production of citric acid from canola oil. *Canadian Journal of Microbiology*, (31), 436-440.
- (14) PRADO, F. C.; VANDENBERGH, L. P.S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; LEÓN, J. A. R.; SOCCOL, C. R. 2005. Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Wngineering*, 22 (04), 547-555.
- (15) HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. 1986. Utilization of grape pomace for citric acid production by solid state fermentation. *American Journal Enology and Viticulture*, 37(1), 141-142.
- (16) HANG, Y. D.; LUH, B. S.; WOODAMS, E. E. 1987. Microbial production of citric acid of Solid-State Fermentation of Kiwifruit peel. *Journal of Food Science*, 52 (1).
- (17) HANG, Y. D.; SPLITTSTOESSER, D. F.; WOODAMS, E. E.; SHERMAN, R. M. 1977. Citric acid fermentation of brewery waste. *Journal os Food Science*, 42(2).

- (18) SHOW, P. L.; OLADELE, K. O.; SIEW, Q. Y.; ZAKRY, F. A. A.; LAN, J. C. W.; LING, T. C. 2015. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*, 8 (3), 271–283.
- (19) AMATTO, A.; BECCI, A.; BOLCHINI, F. 2020. Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40 (2).
- (20) TRAN, C. T.; MITCHELL, D. A. 1995. Pineapple waste - a novel substrate for citric acid production by solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 17 (10), 1107–1110.
- (21) SWAIN, M. R.; RAY, R. C.; PATRA, J. K. Citric acid: microbial production and applications in food and pharmaceutical industries. In: *Citric acid*, VARGAS et al., Nova Science Publishers, 2011.
- (22) KADOOKA, C.; NAKAMURA, E.; MORI, K.; OKUTSU, K.; YOSHIZAKI, Y.; TAKAMINE, K.; GOTO, M.; TAMAKI, H.; FUTAGAMI, T. 2020. LaeA Controls Citric Acid Production through Regulation of the Citrate Exporter-Encoding *cexA* Gene in *Aspergillus luchuensis* mut. *Kawachii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86 (5).
- (23) PARVEZ, S.; RAJOKA, M.I.; AHMED, M. N.; LAFIT, F.; SHARID, R.; MALIK, K. A. 1998. Citric Acid Production from Sugar Cane Molasses by 2-Deoxyglucose-Resistant Mutant Strain of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 43(1), 59-62.
- (24) LOTFY, W., GHANEM, K., ELHELOW, E. 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*, 98 (18), 3464–3469.
- (25) NIGAM, P. S.; PANDEY, A. 2009. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*. Springer Science & Business Media.
- (26) JAVED, S.; ASGHER, M.; SHEIKH, M.A.; NAWAZ, H. 2010. Strain improvement through uv and chemical mutagenesis for enhanced citric acid production in molasses-based solid state fermentation. *Food Biotechnology*, 24(2), 165–179.
- (27) MARESMAS, B. G.; CASTILHO, B. G.; FERNANDEZ, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; RODRIGUES, M. F. A. 2010. Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* ipt-301 to improve the production of  $\beta$ -fructofuranosidase. *Brazilian Journal of Microbiology*, (41)186-195.
- (28) ARCHER, D. B.; MACKENZI, D. A.; JEENES, D. J. 2001. Genetic engineering: yeasts and filamentous fungi. In: RATLEDGE, C.; KRISTIENSEN, B. *Basic Biotechnology*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, p. 95-126.
- (29) ADEOYE, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM, E. B. 2015. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4).
- (30) OZDAL, M., & KURBANOGU, E. B. 2019. Citric acid production by *Aspergillus niger* from AgroIndustrial By Products: Molasses and chicken feather peptone. *Waste and Biomass Valorization*.
- (31) VANZELA, D. O. A.; MASSI, F. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D. 2020. Isolation and identification of *Aspergillus* section *Nigri*, and genotype associated with Ochratoxin A and Fumonisin B2 production in garlic marketed in Brazil. *Current Microbiology*.
- (32) DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. REBERS, P. A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method determination of sugars and substances. *Anal. Chem.* (23) 350-356.

- (33) SOMOGYI, M. 1954. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 160-161.
- (34) NELSON, Norton. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, (153), 375-380.
- (35) MARRIER, J. R.; BOULET, M. 1958. Direct determination of citric acid in milk with an improved, pyridine acetic anhydride method. *Journal of Dairy Science*, 41(12), 1683–1692.
- (36) TORRADO, A. M.; CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRIGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J. M. 2011. Citric acid production from orange peel wastes by Solid State Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, (42), 394-409.
- (37) PERIYASAMY, K.; SANTHALEMBRI, L.; MORTHA, G.; AUROUSSEAU, M.; GUILLET, A.; DALLERAC, D.; SIVANESAN, S. 2017. Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 through solid-state fermentation. *Arabian Journal of Science and Engineering*, 42(1), 53-63.
- (40) MAX, B; SALGADO, J. M.; RODRIGUEZ, N.; CORTES, S.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J. M. 2010. Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 862–875.
- (41) ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. 2020. 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*.
- (42) PAPAGIANINI, M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, (25), 244-263.
- (43) PEL, H. J., et al. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25 (2), 221–31.
- (44) FRISVAD, J.C. et al. 2001. Formation of Sclerotia and Production of Indoloterpenes from black strap molasses. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, (17), 35-37.
- (45) ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABÂNES, F. J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, (86), 33–49.
- (46) MIYAMOTO, A.; KADOOKA, C.; MORI, K.; TAGAWA, Y.; OKUTSU, K.; YOSHIZAKI, Y.; TAKAMINE, K.; GOTO, M.; TAMAKI, H.; FUTAGAMI, T. 2020. Sirtuin SirD is involved in  $\alpha$ -amylase activity and citric acid production in *Aspergillus luchuensis* mut. kawachii during a solid-state fermentation process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129 (4), 454-466.
- (47) ZHANG, Y.; OUYANG, L.; NAN, Y.; CHU, J. 2019. Efficient gene deletion and replacement in *Aspergillus niger* by modified in vivo CRISPR/Cas9 systems. *Bioresour Bioprocess*, 6(4).
- (48) ZHENG, X.; ZHENG, P.; ZHANG, K.; CAIRNS, T. C.; MEYER, V.; SUN, J.; MA, Y. 2019. 5S rRNA promoter for guide RNA expression. enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*. *ACS Synthetic Biology*, 8 (7),1568–1574.
- (49) SUN, X.; WU, H.; ZHAO, G.; LI, Z.; WU, X.; LIU, H.; ZHENG, Z. 2018. Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by chsC gene silencing. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41 (7),1029–1038.
- (50) HAQ, I.; KHURSHID, S.; ALI, S.; ASHRAF, H.; QADEER, M. A.; RAJOKA, M. I. 2001. Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17 (35).

- (51) PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L. 2014. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 60 (2), 188–195.
- (52) SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUB\_E, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies In Mycology*, (78), 141–173.
- (53) PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*, 115 (11), 1138–1150.
- (54) JOKHIO, M. A.; NAQVI, H. A.; YASMIN, A.; CHANNA, N.; QURESHI, A. S.; KHUSHK, I. 2020. Starch hydrolyzing enzyme production from *Aspergillus niger* EFRL-FC-024 using molasses as carbon source. *Pure and Applied Biology*, 10 (1) 262-271.
- (55) MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P. 2016. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. *International Journal of Food Microbiology*, (221), 19–28.
- (56) KUBICEK, C. P.; ROHR, M.; REHM, H. J. 1985. Citric acid. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 3 (4), 331–367.
- (57) ROHR, M.; KUBICEK, C. P. 1981. Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, (16), 34–37.
- (58) MATTEY, M.; BOWES, I. 1978. Citrate regulation of NADP $\beta$ -specific isocitrate dehydrogenase of *Aspergillus niger* [proceedings]. *Biochemical Society Transactions*, 6(6), 1224–1226.
- (59) BARRINGTON, S.; Kim, J. W. 2009. Response surface optimization of médium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. *Bioresource Technology*, (99), 368–377.
- (60) SANTOS, L. S. C.; MOTA, P. S. C.; REBOUÇAS, S. S.; NASCIMENTO, M. M.; SANTOS, A. G. 2020. Produção e caracterização física e química do bioetanol a partir de resíduos de biomassa da banana *Musa acuminata*, laranja *Citrus sinensis* e maracujá *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, 7 (16), 525–535.
- (61) SILVA, L. A. S.; DE OLIVEIRA, V. C.; MENDES, F. B. 2020. Principais aplicações dos resíduos da laranja e sua importância industrial. *Revista Artigos*, (22).
- (62) CYPRIANO, D. Z. Biomassa de casca de laranja industrial como fonte de bioetanol e produtos de alto valor agregado. Dissertação de mestrado - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2015.
- (63) GROHAMANN, K.; CAMERON, G.; BUSLIG, B. 1995. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, 54(2), 129-141.
- (64) PASTORE, N. S.; HASAN, S. M.; ZEMPULSKI, D. A. 2011. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. *Engevista*, 13 (3), 149-159.
- (65) PIRES, G. B.; VASCONSELOS, P. G.; AMBROZIM, F. M.; PINHEIRO, I. R. 2020. Comparative study of cellulase production, varying cultivation conditions in Solid State Fermentation. *Brazilian Journal of Development*, 6 (11), 93305–93315.

- (66) PRAJAPATI, B. P.; SURYAWANSHI, R. K.; AGRAWAL, S.; GHOSH, M.; KANGO, N. 2018. Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. *Bioresource Technology*, 733–740.
- (67) MRUDULA, S.; ANITHARAJ, R. 2011. Pectinases production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using Orange peel as substrate. *Global Journal of Biotechnology Biochemistry*, 6 (2), 64-71.
- (68) SULYMAN, A. O.; IGUNNU, A.; MALOMO, S. O. 2020. Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on arachis hypogaea shells. *Heliyon*, 6 (12), 1-10.
- (69) XUE, D.; YAO, D.; SUKUMARAN, R. K.; YOU, X.; WEI, Z.; GONG, C. 2020. Tandem integration of aerobic fungal cellulase production, lignocellulose substrate saccharification and anaerobic ethanol fermentation by a modified gas lift bioreactor. *Bioresource Technology*.
- (70) ALVES, R. O.; DE OLIVEIRA, R. L.; SANTOS, A. F. M. S.; PORTO, T. S. 2020. Produção de celulases por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. *Revista Geama*, 6 (1), 44–50.
- (71) AYENI, A. O.; DARAMOLA, M. O.; TAIWO, O.; OLANREWaju, O. I.; OYEKUNLE, D. T.; SEKOAI, P. T.; ELEHINAFE, F. B. 2019. Production of citric acid from the fermentation of pineapple waste by *Aspergillus niger*. *The Open Chemical Engineering Journal*, 13 (1), 88–96.
- (72) MIRGHANI, M. E. S.; KABBASHI, N. A. 2019. Production of citric acid from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* using submerged fermentation. *Biological and Natural Resources Engineering Journal*, 2 (1), 47–55.
- (73) WANG, L.; ZHANG, J.; CAO, Z.; WANG, Y.; GAO, Q.; ZHANG, J.; WANG, D. 2015. Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories*, 14 (1), 7.
- (74) WANG, B.; LI, H.; ZHU, L.; TAN, F.; LI, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. 2017. High-Efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40 (6), 891–99
- (75) ADUDU, J. A.; AREKEMASE, S. O.; ABDULWALIYU, I.; BATARI, M. L.; RAPLONG, H. H.; ARONIMO, B. D.; SANI, Y. 2019. Production of citric acid from corn stalk through submerged fermentation using *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Sciences*, (19), 557-564.
- (76) KOLICHESKI, M. B.; SOCCOL, C. R. 1995. Optimization of medium and culture conditions in citric acid production by submerged fermentation. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 13 (2).
- (77) MANTZOURIDOU, F. T.; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. 2015. Yeast flavour production by Solid State Fermentation of orange peel waste. *Biochemical Engineering Journal*, (101), 1–8.
- (78) PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LAROCHE, C. 2008. Part 1: general and fundamental aspects of SSF-Introduction. In: Pandey, Soccol, C.R.; Laroche, C. *Current Development in Solid State Fermentation*, Springer Science Business Media, LLC, New York, 3-12.
- (79) ZAFIRIS, G. A.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. 1994. Fermentation of Orange Processing Wastes for Citric Acid Production. *Journal of Science Food Agriculture*, 65 (1), 17- 120.

(80) KUFORJI, O.; KUBOYE, A. O. 2011. Orange and pineapple waste as potential substrates for CA production. *International Journal of Plant Biology*, 1(1).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As linhagens de *A. welwitschiae* estudadas apresentam potencial para produção de ácido cítrico em resíduo de laranja, sendo *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 a linhagem que apresentou potencial para maior produção de ácido cítrico ( $5,29 \pm 0,49$  g/L de ácido cítrico em quatro dias).

## REFERENCIAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABÂNES, F. J. Taxonomy and significance of black *aspergilli*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, p. 33–49, 2004.
- 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.
- ACOSTA, L. A. **Análise dos meios de cultura para a produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger***. 87 f. 1994. Tese (Faculdade de Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- ADEOYE, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM, E. B. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, 2015.
- ADHAM, N. Z. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses médium. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 97–100, 2002.
- ADUDU, J. A.; AREKEMASE, S. O.; ABDULWALIYU, I.; BATARI, M. L.; RAPLONG, H. H.; ARONIMO, B. D.; SANI, Y. Production of citric acid from corn stalk through submerged fermentation using *Aspergillus niger*. **Journal of Applied Sciences**, v. 19, p. 557-564, 2019.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulósicas por *Pleurotus ostreatus* (Jack; Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.
- ALI, S. R.; ANWAR, Z.; IRSHAD, M.; MUKHTAR, S. Bio-synthesis of citric acid from single and co-culture-based fermentation technology using agro-wastes. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, p. 52-62, 2016.
- ALVES, M. C. **Utilização de resíduos de processamento de café (*Coffea arábica* L.) e de maracujá (*Passiflora edulis* Sims. *F. flavicarpa* Deg.) como substratos na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger***. 125 f. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Universidade Federal de Lavras, 2015.
- ALVES, R. O.; DE OLIVEIRA, R. L.; SANTOS, A. F. M. S.; PORTO, T. S. Produção de celulasas por *Aspergillus japonicus* URM5620 e *Aspergillus niger* URM5741 por diferentes processos fermentativos utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. **Revista Geama**, v. 6, n. 1, p. 44–50, 2020.

AMATTO, A.; BECCI, A.; BOLCHINI, F. Citric acid bioproduction: the technological innovation change. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n.2, 2020.

ANGUMEENAL A.; KAMALAKANNAN P.; PRABHU H.J.; VENKAPPAYYA D. Effect of transition metal cations on the production of citric acid using mixed cultures of *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. **Journal Indian Chemistry Society**, n. 80, p. 903–906, 2003.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 50, 2013.

ARCHER, D. B.; MACKENZI, D. A.; JEENES, D. J. Genetic engineering: yeasts and filamentous fungi. In: RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, p. 95-126, 2001.

AUTA, H. S.; ABIDOYE, K. T.; TAHIR, H.; IBRAHIM, A. D.; ARANSIOLA, A. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Cultivated on *Parkia biglobosa* Fruit Pulp. **International Scholarly Research Notices**, 2014.

AYENI, A. O.; DARAMOLA, M. O.; TAIWO, O.; OLANREWaju, O. I.; OYEKUNLE, D. T.; SEKOAI, P. T.; ELEHINAFE, F. B. Production of citric acid from the fermentation of pineapple waste by *Aspergillus niger*. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 13, n 1, p. 88–96, 2019.

BARRINGTON, S.; KIM, J. W. Response surface optimization of médium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. **Bioresourse Technology**, v.99, p. 368–377, 2009.

BEHERA, B. C. Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 727-749, 2020.

BEROVIC, M.; LEGISA, M. Citric acid production. **Biotechnology Annual Review**, v. 13, 2007.

BETIKU, E.; ADESINA, O. A. Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate. **Biomass And Bioenergy**, v. 5, n. 5, p. 350-354, 2013.

BOSSA, L. **Produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae***. 96 f. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. *Xylanase* and *pectinase* production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 98-101, 2007.

BUSTAMANTE, D.; TORTAJADA, M.; RAMÓN, D.; ROJAS, A. Production of D-lactic acid by fermentation of Orange peel waste hydrolysate by Lactic Acid Bacteria. **Fermentation**, n. 6, v. 1, 2019.

CAMARGO, B. R.; BRAGA, S. C.; PACHECO, T. F.; MENDES, T. D.; SALUM, T. F. C.; GONÇALVES, S. B.; DAMASCO, M. C. T. Produção de ácido cítrico por fungos filamentosos a partir de glicerina bruta, coproduto do biodiesel. In: **7º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel**, Florianópolis, 2019.

CARVALHO, F. C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.22, n.12, 1992.

CARVALHO, V.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via Fermentativa parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, n. 18, 2005.

CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO F.; DELISI R.; PAGLIARO M. Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemical Central Journal**, v. 22, n. 11, 2017.

CUI, Y. Q. et al. Influence of fermentation conditions and scale on the Submerged Fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 23, p. 157–167, 1998.

CYPRIANO, D. Z. **Biomassa de casca de laranja industrial como fonte de bioetanol e produtos de alto valor agregado**. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

DAMIRIEL, G.; YAYKASLI, K. O.; YASAR, A. The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. **Food Chemistry**, v. 89, p. 393–396, 2005.

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**, v. 54, p. 83-92, 2011.

DRYSDALE, C. R.; MCKAY, A. M. Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 252-254, 1995.

DUBOIS, N. et al. Colorimetric method determination of sugars and substances. **Analytical Chemistry**, v. 23, p. 350-356, 1956.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **USDA agricultural projections to 2026**. Washington, 2017. (Long-term projections report OCE-2017-1). Disponível em:

<[https://www.usda.gov/oce/commodity/projections/USDA\\_Agricultural\\_Projections\\_to\\_2026.pdf](https://www.usda.gov/oce/commodity/projections/USDA_Agricultural_Projections_to_2026.pdf)>. Acesso em: 2020.

FRISVAD, J.C. et al. Formation of Sclerotia and Production of Indoloterpenes from black strap molasses. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 35-37, 2011.

GARDNER, J. F.; JAMES, L. V.; RUBBO, S. D. Production of Citric Acid by Mutants of *Aspergillus niger*. **The Journal of General Microbiology**, v. 14, p.228-237, 1956.

GARRO; J.; XAVIER, M. O.; SEVERO, L. C. Differences and Similarities Amongst Pathogenic *Aspergillus* Species. **Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention**, p. 7-32, 2009.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, n. 20, v.1, p. 17–48, 2000.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Orange bagasse as substrate for the production of pectinase and laccase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in submerged and solid state fermentation. **BioResources**, n. 3, v. 2, p. 355-345, 2008.

GOOD, D. W.; DRONIUK, R.; LAWFORD, G. R.; FEIN, J. E. Isolation and characterization of a *Saccharomycopsis lipolytica* mutant showing increased production of citric acid from canola oil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 436-440, 1985.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, n. 13, v. 2, p. 209–234, 1995.

GROHAMANN, K.; CAMERON, G.; BUSLIG, B. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 2, p. 129-141, 1995.

HANG, Y. D.; LUH, B. S.; WOODAMS, E. E. Microbial production of citric acid of Solid State Fermentation of Kiwifruit peel. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 1, 1987.

HANG, Y. D.; SPLITTSTOESSER, D. F.; WOODAMS, E. E.; SHERMAN, R. M. Citric acid fermentation of brewery waste. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 2, 1977.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Utilization of grape pomace for citric acid production by Solid State Fermentation. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 37, n. 1, p. 141-142, 1986.

HAQ, I.; KHURSHID, S.; ALI, S.; ASHRAF, H.; QADEER, M. A.; RAJOKA, M. I. Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 35, 2001.

HONG, S. B. et al. *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. **PloS One**, v. 8, n. 5, 2013.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v. 86, p. 199–249, 2014.

HU, W.; LI, Q.; YANG, H. CHEN, J. Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.

HU, W.; LIU, J.; CHEN, J. H.; WANG, S.; LU, D.; WU, Q.; LI, W. A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor. **Biomed & Biotechnology**, v. 15, n. 11, p. 1006-1010, 2014.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; KOLARÍK, A.; PETERSON, S. W. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. **Mycologia**, v. 107, n<sup>o</sup> 1, p. 169–208, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal, 2018**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=destaques>>. Acessado em: abril, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - dezembro 2020**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acessado em: janeiro, 2021.

JOKHIO, M. A.; NAQVI, H. A.; YASMIN, A.; CHANNA, N.; QURESHI, A. S.; KHUSHK, I. Starch hydrolyzing enzyme production from *Aspergillus niger* EFRL-FC-024 using molasses as carbon source. **Pure and Applied Biology**, v. 10, n. 1, p. 262-271, 2020.

KADOOKA, C.; NAKAMURA, E.; MORI, K.; OKUTSU, K.; YOSHIZAKI, Y.; TAKAMINE, K.; GOTO, M.; TAMAKI, H.; FUTAGAMI, T. LaeA Controls Citric Acid Production through Regulation of the Citrate Exporter-Encoding *cexA* Gene in *Aspergillus luchuensis* mut. *Kawachii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 5, 2020.

KALAKI, R. B.; NEVES, M. F. Plano estratégico para o sistema agroindustrial citrícola brasileiro. **Gestão & Produção**, São Carlos, v. 24, n. 2, p. 338-354, 2017.

KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 189-196, 2003.

KLICH, M. A. Relation of plant water potential at flowering to subsequent cottonseed infection by *Aspergillus flavus*. **Phytopatology**, v. 77, p. 739-741, 1987.

KOLICHESKI, M. B.; SOCCOL, C. R. Optimization of medium and culture conditions in citric acid production by submerged fermentation. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 13, n. 2, 1995.

KRUPAVATHI, M.; MANGALA, D. S. Production of citric acid – a short review. **International Journal of Development Research**, v. 5, n. 04, p. 4002-4006, 2015.

KUBICEK, C. P.; ROHR, M.; REHM, H. J. Citric acid. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 331–367, 1985.

KUFORIJ, O. O.; KUBOYE, A. O. ODUNFA, S. A. Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production. **International Journal of Plant Biology**, v. 1, 4 ed., 2010.

LAUFERBER, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, n. 87, p. 167-198, 2003.

LEITÃO, V. F.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L., MOLINARI, H. B. C.; BON, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Valor**, v. 1, n. 65, p.76, 2010.

LOPÉZ, J. F.; GINÉS, J. M. F.; CARBONELL, L. A.; SENDRA, A.; BARBERÁ, E. S.; ALVAREZ, J. A. P. Application of functional citrus by-products to meat products. **Trends in Food Science & Technology**, n. 15, p. 176-185, 2004.

LOTFY, W., GHANEM, K., ELHELOW, E. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, 98 (18), 3464–3469, 2007.

LOTFY, W., GHANEM, K., ELHELOW, E. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, p. 3464–3469, 2007.

MANIN, L. P.; RAMALHO, L. D. N.; PERALTA, R. M.; BAZANELLA, G. C. S. Produção de inulinase por *Aspergillus awamori*. In: **Encontro Internacional de Produção científica**, UNICESUMAR, Centro Universitário de Maringá, 2017.

MANTZOURIDOU, F. T.; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. Yeast flavour production by Solid State Fermentation of orange peel waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 1–8, 2015.

MANTZOURIDOU, F. T.; PARASKEVOPOULOU, A.; LALOU, S. Yeast flavour production by Solid State Fermentation of orange peel waste. *Biochemical Engineering Journal*, (101), 1–8, 2015.

MARESMA, B. G.; CASTILHO, B. G.; FERNANDEZ, R. C.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E.; RODRIGUES, M. F. A. Mutagenesis of *Aspergillus oryzae* ipt-301 to improve the production of b- fructofuranosidase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 186-195, 2010.

MARÍN, F. R.; RIVAS, C. S.; GARCÍA, O. B.; CASTILLO, J.; ALVAREZ, J. A. P. By-products from diferentes citrus processes as a source of customized functional fibres. **Food Chemistry**, v. 100, p. 736-741, 2007.

MARRIER, J. R.; BOULET, M. 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.

MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, M. H. P. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 19–28, 2016.

MATTEY, M.; BOWES, I. Citrate regulation of NADPp-specific isocitrate dehydrogenase of *Aspergillus niger* [proceedings]. **Biochemical Society Transactions**, v. 6, n. 6, p.1224–1226, 1978.

MAX, B; SALGADO, J. M.; RODRIGUEZ, N.; CORTES, S.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 862–875, 2010.

MILLIS, N. F.; TRUMPY, B. H.; PALMER, B. M. The Effect of Lipids on Citric Acid Production by na *Aspergillus niger* Mutant. **The Journal of General Microbiology**, v. 30, p. 365-379, 1963.

MIRGHANI, M. E. S.; KABBASHI, N. A. Production of citric acid from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* using submerged fermentation. **Biological and Natural Resources Engineering Journal**, v. 2, n. 1, p. 47–55, 2019.

MIYAMOTO, A.; KADOOKA, C.; MORI, K.; TAGAWA, Y.; OKUTSU, K.; YOSHIZAKI, Y.; TAKAMINE, K.; GOTO, M.; TAMAKI, H.; FUTAGAMI, T. Sirtuin SirD is involved in  $\alpha$ -amylase activity and citric acid production in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* during a solid-state fermentation process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 4, p. 454-466, 2020.

MRUDULA, S.; ANITHARAJ, R. Pectinases production in solis state fermentation by *Aspergillus niger* usinf Orange peel as substrate. **Global Journal of Biotechnology Biochemistry**, n. 6, v. 2, p. 64-71, 2011.

NAKAMURA, E.; KADOOKA, C.; OKUTSU, K.; YOSHIZAKI, Y.; TAKAMINE, K.; GOTO, M.; TAMAKI, H.; FUTAHAMI, T. Citrate exporter enhances both extracellular and intracellular citric acid accumulation in the koji fungi *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* and *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NELSON, Norton. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NIGAM, P. S.; PANDEY, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues. **Springer Science & Business Media**, 2009.

ODONI, D.; VILAR, M. V.; GAAL, M. P.; SCHONEWILLE, T.; SANTOS, V. A. P. M.; RAMOS, J. A. T.; DIEZ, M. S.; SCHAAP, P. J. *Aspergillus niger* citrate exporter revealed by comparison of two alternative citrate producing conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v.366, 2019.

OLESIUK, A. K.; WAWRZYNIAK, U. E.; CIOSEL, P.; WROBLEWS, W. Electrochemical monitoring of citric acid production by *Aspergillus niger*. **Analytica Chimica Acta**, 2014.

Organisation for Economic Co-operation and Development Citric acid (OECD). **Citric acid**, CAS No: 77-92-9. Paris, França, 2001. Disponível em: <<https://hvpchemicals.oecd.org/ui/handler.axd?id=ff78c453-36c1-430d-9034-63e15899d24b>>. Acessado em: janeiro 2021.

OZDAL, M., & KURBANOGLU, E. B. Citric acid production by *Aspergillus niger* from AgroIndustrial By Products: Molasses and chicken feather peptone. **Waste and Biomass Valorization**, 2019.

PALUMBO, J. D. & O'KEEFFE, T. L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 188–195, 2013.

PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L.; MCGARVEY, J. A. Incidence of Fumonisin B2 Production within *Aspergillus* section *Nigri* Populations Isolated from California Raisins. **Journal of Food Protection**, n. 4, v. 74, p. 672-675, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LAROCHE, C. Part 1: general and fundamentals aspects of SSF-Introduction. In: Pandey, Soccol, C.R.; Laroche, C. **Current Development in Solid State Fermentation**, Springer Science Business Media, LLC, New York, p. 3-12, 2008.

PAPAGIANINI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, n25, p. 244-263, 2007.

PARVEZ, S.; RAJOKA, M.I.; AHMED, M. N.; LAFIT, F.; SHARID, R.; MALIK, K. A. Citric Acid Production from Sugar Cane Molasses by 2-Deoxyglucose-Resistant Mutant Strain of *Aspergillus niger*. **Folia Microbiological**, v. 43, n. 1, p. 59-62, 1998.

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**, v. 13, n. 3, p. 149-159, 2011.

PEL, H. J., et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–31, 2007.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 7, 2007.

PERIYASAMY, K.; SANTHALEMBRI, L.; MORTHA, G.; AUROUSSEAU, M.; GUILLET, A.; DALLERAC, D.; SIVANESAN, S. Production, partial purification and characterization of enzyme cocktail from *Trichoderma citrinoviride* AUKAR04 through solid-state fermentation. **Arabian Journal of Science and Engineering**, v. 42, n. 1, p. 53-63, 2017.

PERRONE, G.; STEA, G.; EPIFANI, F.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 11, p. 1138–1150, 2011.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, A. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico Embrapa**, Fortaleza, 2005.

PIRES, G. B.; VASCONSELOS, P. G.; AMBROZIM, F. M.; PINHEIRO, I. R. Comparative study of *cellulase* production, varying cultivation conditions in Solid State Fermentation. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 93305–93315, 2020.

PRADO, F. C.; VANDENBERGH, L. P.S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; LEÓN, J. A. R.; 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, n. 04, p. 547-555, 2005.

PRAJAPATI, B. P.; SURYAWANSHI, R. K.; AGRAWAL, S.; GHOSH, M.; KANGO, N. Characterization of *cellulase* from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55

for generation of fermentable sugars from agricultural residues. **Bioresource Technology**, p. 733–740, 2018.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; SARMA, P. N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **Journal of Applied Microbiology**, 2007.

RICCI, A.; DIAZ, A.; CARO, I.; BERNINI, V.; GALAVERNA, G.; LAZZI, C.; BLANDINO, A. Orange peel: from by-product to resource through lactic acid fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

RIVAS, B.; TORRADO, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on Orange peel autohydrolysate. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 2360-2387, 2008.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; TEODORO, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. Improvement on Citric Acid Production in Solid-state Fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC Mutant Using Citric Pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 72–87, 2009.

ROHR, M.; KUBICEK, C. P. Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 16, p. 34–37, 1981.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P.S.; SANTELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: **II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA**, Foz do Iguaçu, 2011.

ROUKAS, T. Production of citric acid from beet molasses by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Journal of food Science**, v. 56, n. 3, p. 878-880, 1991.

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**, 2020.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUB\_E, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies In Mycology**, v. 78, p. 141–173, 2014.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da Fermentação Semi-Sólida em biotecnologia. **Revista de Pesquisa Científica Janus**, Lorena, ano 3, n. 4, 2006.

SANTOS, L. S. C.; MOTA, P. S. C.; REBOUÇAS, S. S.; NASCIMENTO, M. M.; SANTOS, A. G. Produção e caracterização física e química do bioetanol a partir de resíduos de biomassa da banana *Musa acuminata*, laranja *Citrus*

- sinensis e maracujá *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, n. 16, p. 525–535, 2020.
- SCAINI, G.; ROCHI, N.; BENEDET, J.; FERREIRA, G. K.; TEODORAK, B. P.; COMIM, C. M.; CONSTANTINO, L. S.; VUOLO, F.; CONSTANTINO, C.C.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L.; PIZZOL, F. Inibição da atividade da citrato sintase cerebral em um modelo animal de sepse. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 158-163, 2011.
- SEPÚLVEDA, L.; ALCALÁ, E. L.; FIGUEIROA, J. J. B.; VALDÉS, J. A. A.; GENISHEVA, Z.; AGUILAR, C.; TEIXEIRA, J. Ellagic acid production using polyphenols from orange peel waste by Submerged Fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.43, p. 1-7, 2020.
- SHETTY, V. Production and optimizations of citric acid by *Aspergillus niger* using molasses and corncob. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, 5 ed., 2015.
- SHIRAHIGUE, L. D.; ANTONINI, S. R. C. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 50, n. 4, 2020.
- SHOJAOSADATI, S. A.; BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Bioprocess Biochemistry**, v. 37, p. 909-914, 2002.
- SHOW, P. L.; OLADELE, K. O.; SIEW, Q. Y.; ZAKRY, F. A. A.; LAN, J. C. W.; LING, T. C. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2015.
- SILVA, L. A. S.; DE OLIVEIRA, V. C.; MENDES, F. B. Principais aplicações dos resíduos da laranja e sua importância industrial. **Revista Artigos**, v. 22, 2020.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, p. 160-161, 1954.
- SOUSA, B. A. A.; CORREIA, R. T. P. Biotechnological Reuse of Fruit Residues as a Rational Strategy for Agro-industrial Resources. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 5, n. 2, 2010.
- STEIGER, M. G.; RASSINGER, A.; MATATNOVICH, D.; SAUER, M. Engineering of the citrate export protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. **Metabolic Engineering**, v. 52, p. 224-231, 2019.
- SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and Submerged Fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480- 486, 2012.
- SULYMAN, A. O.; IGUNNU, A.; MALOMO, S. O. Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on arachis hypogaea shells. **Heliyon**, v. 6, n. 12, p. 1-10, 2020.

SUN, X.; WU, H.; ZHAO, G.; LI, Z.; WU, X.; LIU, H.; ZHENG, Z. Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by chsC gene silencing. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 7, p. 1029–1038, 2018.

SUSCA, A.; PROCTOR, R. H.; MORELLI, M.; HAIDUKOWSKI, M.; GALLO, A.; LOGRIECO, A. F.; MORETTI, A. Variation in Fumonisin and Ochratoxin Production Associated with Differences in Biosynthetic Gene Content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* Isolates from Multiple Crop and Geographic Origins. *Frontiers in Microbiology*, 2016.

SWAIN, M. R.; RAY, R. C.; PATRA, J. K. Citric acid: microbial production and applications in food and pharmaceutical industries. In: **Citric acid**, VARGAS et al., Nova Science Publishers, 2011.

TONG, Z.; ZHENG, X.; TONG, Y.; SHI, Y. C.; SUN, J. Systems metabolic engineering for citric acid production by *Aspergillus niger* in the post-genomic era. **Microbial Cell Factories**, v. 18, 2019.

TORRADO, A. M.; CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRIGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMINGUEZ, J. M. Citric acid production from orange peel wastes by Solid State Fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 394-409, 2011.

TORRES, N. V. Modeling Approach to Control of Carbohydrate Metabolism During Citric Acid Accumulation by *Aspergillus niger*: II. Sensitivity Analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 112-118, 1994.

TRAN, C. T.; SLY, L. I.; MITCHELL, D. A. Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 399-404, 1998.

UPTON, D.; MASON, S. J. M.; WOOD, A. J. In silico Evolution of *Aspergillus niger* organic acid production suggests strategies for switching acid output. **Biotechnology Biofuels**, n. 13, v. 27, 2020.

USDA - United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and Trade**, jan/2020. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acessado em: abril, 2020.

UZAH, G., A.; AKANI, N., P.; ODU, N. N. Screening of *Aspergillus* and *Candida* species with utmost potential to synthesize citric acid. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 10-18, 2020.

VANZELA, D. O. A.; MASSI, F. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D. Isolation and identification of *Aspergillus* section *Nigri*, and genotype associated with Ochratoxin A and Fumonisin B2 production in garlic marketed in Brazil. **Current Microbiology**, 2020.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. **Fungal Biodiversity Centre**, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands. 2011.

WAINWRIGHT, M. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. **Acribia**, Zaragoza, p. 228, 1995.

WANG, B.; LI, H.; ZHU, L.; TAN, F.; LI, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI, G. High-Efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 6, p. 891–99, 2017.

WANG, J.; AVVAL, S. H. M.; CUI, Z.; LI, Y.; CAO, L.; LU, Z. Techno-economic analysis and environmental impact assessment of citric acid production through different recovery methods. **Journal of Cleaner Production**, v. 249, 2019.

WANG, L.; ZHANG, J.; CAO, Z.; WANG, Y.; GAO, Q.; ZHANG, J.; WANG, D. Inhibition of oxidative phosphorylation for enhancing citric acid production by *Aspergillus niger*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n 1, p. 7, 2015.

WU, X.; LIU, Q.; DENG, Y.; LI, J.; CHEN, X.; GU, Y.; LV, X.; ZHENG, Z.; JIANG, S.; LI, X. Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 25–34, 2017.

XUE, D.; YAO, D.; SUKUMARAN, R. K.; YOU, X.; WEI, Z.; GONG, C. Tandem integration of aerobic fungal *cellulase* production, lignocellulose substrate saccharification and anaerobic ethanol fermentation by a modified gas lift bioreactor. **Bioresource Technology**, 2020.

YU, B.; ZHANG, X.; SUN, W.; XI, X.; ZHAO, N.; HUANG, Z.; YING, Z.; LIU, L.; LIU, D.; NIU, H.; WU, J.; ZHUANG, W.; ZHU, C.; CHEN, Y.; YING, H. Continuous citric acid production in repeated-fed batch fermentation by *Aspergillus niger* immobilized on a new porous foam. **Journal of Biotechnology**, 2018.

ZAFAR, M.; ARSHAD, F.; FAIZI, S.; ANWAR, Z.; IMRAN, M.; MEHMOOD, R. T. HPLC based characterization of citric acid produced from indigenous fungal strain through single and Co - Culture fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, 2020.

ZAFIRIS, G. A.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Fermentation of Orange Processing Wastes for Citric Acid Production. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 65, n. 1, p. 17- 120, 1994.

ZHANG, Y.; OUYANG, L.; NAN, Y.; CHU, J. Efficient gene deletion and replacement in *Aspergillus niger* by modified in vivo CRISPR/Cas9 systems. **Bioresour Bioprocess**, v. 6, n. 4, 2019.

ZHENG, X.; ZHENG, P.; ZHANG, K.; CAIRNS, T. C.; MEYER, V.; SUN, J.; MA, Y. 5S rRNA promoter for guide RNA expression. enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 7, p. 1568–1574, 2019.

ZUNIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de *celulases* por *Aspergillus niger* por Fermentação Em Estado Sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, 2011.