



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÂMARIS CRISTINE LANDGRAF

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
LINHAGENS DE *ASPERGILLUS WELWITSCHIAE* A PARTIR
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Londrina
2021

DÂMARIS CRISTINE LANDGRAF

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
LINHAGENS DE *ASPERGILLUS WELWITSCHIAE* A PARTIR
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Profª Drª Daniele Sartori

Londrina
2021

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

L256 Landgraf, Dâmaris Cristine .
POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR LINHAGENS DE *Aspergillus welwitschiae* A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS / Dâmaris Cristine Landgraf . - Londrina, 2021.
51 f. : il.

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

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

CDU 66

DÂMARIS CRISTINE LANDGRAF

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
LINHAGENS DE *ASPERGILLUS WELWITSCHIAE* A PARTIR
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Cristiani Baldo da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Rezende
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 02 de agosto de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo milagre que é a minha vida e por sempre me fazer crer que tudo é possível.

A Prof^a. Dr^a Daniele Sartori pela maravilhosa orientação e principalmente pelo apoio durante todas as etapas.

A Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

A banca examinadora, pela disposição.

Aos meus pais Lucinéia Galassi Landgraf e Wander Landgraf, pela educação e por sempre cuidarem de mim com amor e carinho.

Ao meu irmão Lucas Landgraf por sempre estar ao meu lado me fazendo rir.

Aos amigos que conquistei no mestrado, em especial a Jaquellyne Bitencourt Moraes Duarte da Silva, que esteve comigo desde o início, me ajudando e apoiando. E a minha colega de laboratório Taynara Romero Batistela, com quem pude aprender muito.

Por fim agradeço ao meu namorado Rafael Motoki Bertho, que nos momentos mais difíceis sempre esteve ao meu lado, me motivando e incentivando a nunca desistir.

Dedico este trabalho a minha mãe, meu maior exemplo de perseverança, que sempre me incentivou a perseguir meus sonhos. Esta conquista também é sua, obrigada por tudo!

LANDGRAF, Dâmaris Cristine. **Potencial de produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae* a partir de resíduos agroindustriais.** 2021. 50 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A quantidade de resíduos agroindustriais reflete em um grande impacto ambiental e esse fato requer a elaboração de estratégias de reaproveitamento. Resíduos podem ser utilizados como matéria prima para obtenção de novos produtos, entre eles, o ácido cítrico (AC), que possui um amplo espectro de aplicação. No setor industrial, a maioria do AC é obtida por processos fermentativos utilizando *Aspergillus niger*. *Aspergillus welwitschiae* também se destaca quanto ao potencial de produção de AC, e linhagens mutantes vêm sendo obtidas e avaliadas quanto ao potencial produtor deste ácido. O presente estudo, avaliou o potencial de produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* selvagem e mutantes, a partir de resíduos agroindustriais. Inicialmente foram avaliadas as linhagens de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 (selvagem) e UELAs 15.262/35 (mutante), utilizando como substrato resíduos de cana-de-açúcar com solução nutritiva. Sob tais condições houve maior produção de AC (0,47 g/L) por *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35, no quinto dia de fermentação. O mesmo processo fermentativo foi conduzido sem solução nutritiva, sendo obtida a maior produção de AC (0,64 g/L) no terceiro dia de fermentação por *A. welwitschiae* UELAs 15.262. Os demais processos fermentativos foram obtidos com mistura de resíduos de cana-de-açúcar com laranja e cana-de-açúcar com malte. A maior produção de AC (0,5 g/L) obtida no terceiro dia de fermentação, a partir dos resíduos de cana-de-açúcar com malte ocorreu por ambas linhagens de *A. welwitschiae*, enquanto que a partir de resíduos de cana-de-açúcar com laranja, ocorreu a produção de AC (0,29 g/L) somente por *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35. O resíduo de cana-de-açúcar foi o melhor substrato para produção de AC. No entanto, a linhagem mutante UELAs 15.262/35 sob tais condições, não proporcionou maior produção de AC. Sendo assim, outras três linhagens mutantes de *A. welwitschiae* foram avaliadas sob as mesmas condições e *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30 apresentou maior potencial produtor de AC (1,0 g/L) em resíduo de cana-de-açúcar, no primeiro dia de fermentação. A quantidade de açúcares redutores diminuiu ao longo na fermentação com resíduo de cana-de-açúcar e solução nutritiva, o mesmo aconteceu nos processos com a mistura de resíduos de laranja e de malte. Já na fermentação com resíduo de cana-de-açúcar os açúcares redutores aumentaram com o passar dos dias. As atividades de celulasas foram detectadas em maiores quantidades nos últimos dias do processo fermentativo, com exceção de *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30 e UELAs 15.262/50, cuja maior atividade de celulasas foi encontrado no primeiro dia de fermentação. Foi possível concluir que a linhagem de UELAs 15.262/30 apresentou melhor potencial de produção de AC a partir de resíduo de cana-de-açúcar. Esses resultados demonstraram o potencial de produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: *aspergillus welwitschiae*; ácido cítrico; resíduos agroindustriais; resíduo de cana-de-açúcar.

LANDGRAF, Dâmaris Cristine. **Potential for production of citric acid by *Aspergillus welwitschiae* strains from agro-industrial residues.** 2021. 50 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The number of agro-industrial residues reflects a great environmental impact and this fact requires the elaboration of reuse strategies. Residues can be used as raw material to obtain new products, including citric acid (CA), which has a wide spectrum of application. In the industrial sector, most of the CA is obtained by fermentation processes using *Aspergillus niger*. *Aspergillus welwitschiae* also stands out for its potential to produce CA, and mutant strains have been obtained and evaluated for its potential to produce this acid. The present study evaluated the potential of CA production by wild and mutant *A. welwitschiae* strains from agro-industrial residues. Initially, the strains of *A. welwitschiae* UELAs 15.262 (wild) and UELAs 15.262/35 (mutant) were evaluated, using sugarcane residues with nutrient solution as substrate. Under these conditions there was a higher CA production (0.47 g/L) by *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35, on the fifth day of fermentation. The same fermentation process was carried out without nutrient solution, with the highest CA production (0.64 g/L) being obtained on the third day of fermentation by *A. welwitschiae* UELAs 15.262. The other fermentation processes were obtained by mixing sugarcane with orange and sugarcane with malt residues. The highest CA production (0.5 g/L) obtained on the third day of fermentation, from sugarcane residues with malt occurred by both strains of *A. welwitschiae*, while from sugarcane residues. of sugar with orange, CA (0.29 g/L) was produced only by *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35. Sugarcane residue was the best substrate for CA production. However, the mutant strain UELAs 15.262/35 under such conditions, did not provide greater CA production. Thus, three other mutant strains of *A. welwitschiae* were evaluated under the same conditions and *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30 had the highest CA producer potential (1.0 g/L) in sugarcane residue, in the first fermentation day. The amount of reducing sugars decreased along the fermentation with sugarcane residue and nutrient solution, the same happened in the processes with the mixture of orange and malt residues. In the fermentation with sugarcane residue, the reducing sugars increased over the days. Cellulase activities were detected in greater amounts in the last days of the fermentation process, with the exception of *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30 and UELAs 15.262/50, whereof the highest cellulase activity was found on the first day of fermentation. It was possible to conclude that the strain of UELAs 15.262/30 presented the best potential for producing CA from sugarcane residue. These results demonstrate the potential of CA production by *A. welwitschiae* strains from agro-industrial residues.

Key words: *aspergillus welwitschiae*; citric acid; agro-industrial residues; sugarcane residue.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Produtos gerados a partir do processamento da cana-de-açúcar e seus derivados18
- Figura 2** - Processamento da laranja para a obtenção de suco de laranja e seus resíduos sólidos20
- Figura 3** - Etapas do processo de malteação22
- Figura 4** - Etapas do processamento industrial da cerveja23
- Figura 5** - Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduos agroindustriais. (A) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar meio Prescott e Dunn. (B) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar. (C) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de cana-de-açúcar e malte. (D) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar e resíduo de laranja. (E) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar32
- Figura 6** - (A) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar meio Prescott e Dunn. (B) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar. (C) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e malte. (D) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e resíduo de laranja. (E) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar35
- Figura 7** - (A) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar meio Prescott e Dunn. (B) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar. (C) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e malte. (D) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e resíduo de laranja. (E) Processo

fermentativo com linhagens de <i>A. welwitschiae</i> em resíduo de cana-de-açúcar	38
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS – ASPECTOS ECONÔMICOS	16
3.2	ASPECTOS GERAIS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA	17
3.3	ASPECTOS GERAIS DA INDÚSTRIA DE SUCO LARANJA.....	20
3.4	ASPECTOS GERAIS DA INDÚSTRIA DE CERVEJA	22
3.5	CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	25
3.6	<i>ASPERGILLUS</i> SP. PRODUTORES DE ÁCIDO CÍTRICO	25
4	METODOLOGIA	28
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	28
4.2	PREPARO DOS RESÍDUOS DE CANA-DE-AÇÚCAR, LARANJA E MALTE	28
4.3	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR <i>A. WELWITSCHIAE</i> EM RESÍDUO DE CANHA-DE-AÇÚCAR	28
4.3.1	PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR <i>A. WELWITSCHIAE</i> EM RESÍDUOS DE CANHA-DE-AÇÚCAR, LARANJA E MALTE	29
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE AC PRODUZIDO POR LINHAGENS DE <i>A. WELWITSCHIAE</i> ..	30
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	30
4.6	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE CELULASES PRODUZIDAS POR <i>A.</i> <i>WELWITSCHIAE</i> EM FERMENTAÇÃO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	SELEÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E LINHAGENS DE <i>A.</i> <i>WELWITSCHIAE</i> PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	32
5.2	RELAÇÃO ENTRE AÇÚCARES REDUTORES, PRODUÇÃO DE CELULASES E ÁCIDO CÍTRICO POR LINHAGENS DE <i>A. WELWITSCHIAE</i>	36
6	CONCLUSÕES	41

REFERÊNCIAS	42
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

O processamento de produtos agrícolas gera inevitavelmente grandes quantidades de resíduos. A gestão atual de resíduos agroindustriais está voltada à valorização dos resíduos integrando-os numa cadeia de reaproveitamento fechando um ciclo produtivo, denominado atualmente de economia circular. Dentre os resíduos agroindustriais destacam-se o bagaço de cana-de-açúcar, casca de laranja e bagaço de malte, que podem ser utilizados como matéria prima para obtenção de novos produtos.

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea cultivada em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. O expressivo cultivo no Brasil é atribuído à alta produção alcançada. Os principais produtos do processamento da cana-de-açúcar são o açúcar e o álcool, que são obtidos através de uma série de etapas. A grande produção brasileira de açúcar e álcool remete simultaneamente a maior quantidade de resíduos produzidos. Os principais resíduos gerados são, o bagaço da cana-de-açúcar, a vinhaça, a torta de filtro e as cinzas das caldeiras.

Um outro resíduo agroindustrial importante é a casca da laranja. A cadeia produtiva de laranja é um importante setor da economia agroindustrial, que conseqüentemente movimenta grande quantidade de resíduos de casca de laranja. A indústria cítrica contribui na geração de resíduos, descartando entre 50-60% do peso total da fruta.

Na indústria cervejeira, o malte, é dos constituintes mais importantes. Considerando as quantidades de resíduos do processamento do malte e da fabricação da cerveja, seu uso no desenvolvimento de produtos contribui para uma economia circular valiosa.

Frente a alta quantidade de resíduos da agroindústria, ao grande impacto ambiental causado por tais resíduos e a disponibilidade de matéria orgânica presente nestes resíduos, estratégias têm sido desenvolvidas para o reaproveitamento desse material. Dentre as estratégias, está a utilização desses, como substrato em sistemas de fermentação, produzindo ou melhorando a produção de compostos como enzimas e ácidos orgânicos.

O AC é aplicado em diversos segmentos industriais, tais como, o setor alimentício, cosmético, farmacêutico, ambiental entre outros. Nos sistemas fermentativos o AC tem sido produzido em sua maioria por *Aspergillus niger*. No entanto, algumas outras espécies/linhagens, como *Aspergillus welwitschiae*, muito similar a *A. niger*, também possuem um potencial de produção de AC. Como alternativa, ainda têm sido utilizadas linhagens mutantes para aumentar a produção de AC.

Adicionalmente à utilização de linhagens selecionadas à produção de AC e às fontes nutricionais adequadas, parâmetros como temperatura e pH, contribuem para o sucesso do sistema fermentativo e conseqüente maior quantidade de AC.

Sendo assim a produção de AC realizada por linhagens mutantes de *A. welwitschiae* que apresentem um potencial de produção deste metabólito e ausência de produção de micotoxinas, a partir de resíduos agroindustriais, oferece uma alternativa viável e segura quanto ao processo de fermentação e obtenção de ácido cítrico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae* utilizando como substrato resíduos de cana-de-açúcar, laranja e malte.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir ácido cítrico por *Aspergillus welwitschiae* por fermentação em estado sólido, utilizando como substrato resíduo de cana-de-açúcar, laranja e malte.
- Determinar a atividade de *celulases* produzidas por *Aspergillus welwitschiae* nos diferentes substratos utilizados.
- Quantificar os açúcares redutores residuais nos extratos livres de células obtidos dos cultivos de fermentação em estado sólido.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS – ASPECTOS ECONÔMICOS

Segundo o Plano Nacional de Resíduos Sólidos (2019), os setores da e agroindústria, produziram em 2015 aproximadamente 640 milhões de toneladas de resíduos orgânicos, dos quais 59,7 % foram gerados na região Sudeste, sendo 49,3 % em São Paulo, 24,8 % Centro-Oeste, 7,9 % Nordeste, 6,7 % Sul e 0,9 % na região Norte. Dentre as culturas que geram os principais resíduos agroindustriais, podemos citar aquelas que utilizam a cana-de-açúcar (97,56 %), a laranja (0,86 %), a mandioca (0,40 %) entre outros (1,17 A%) (PNRS, 2019).

No estado de São Paulo, a produção de laranja, apresenta safras superiores a 13 milhões de toneladas. Estima-se que 6,5 milhões de toneladas de resíduos sólidos sejam gerados no Estado. Por sua vez, a cana de açúcar constitui a principal cultura temporária produzida, ultrapassando a marca de 330 milhões de toneladas colhidas anualmente (PERS, 2020). Os resíduos orgânicos podem ser utilizados para obtenção de subprodutos, ou são descartados diretamente no meio ambiente, atividade que pode contribuir para a poluição ambiental (RICARDINO; SOUZA; NETO, 2020; VELOSO et al., 2020).

Uma das alternativas para evitar o descarte inadequado de resíduos agroindustriais é a sua utilização como matéria-prima para a obtenção de produtos de valor agregado, o que contribuirá além de contribuir com a minimização de graves problemas ambientais (DIAZ; BLANDINO; CARO, 2018; NG et al., 2020). A grande maioria dos resíduos agroindustriais e subprodutos são de natureza lignocelulósica, e essa composição pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos e conseqüentemente a produção de enzimas, pigmentos, ácidos orgânicos, frutooligossacarídeos entre outros metabólitos (DHILLON et al., 2011b; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015; LEITE et al., 2019; ROSA et al., 2019; WERLE et al., 2020;).

Os materiais lignocelulósicos são usados como matéria-prima para processos e obtenção de produtos agroindustriais, possibilitando a cogeração de energia oriunda da queima desses materiais, matéria-prima para polímeros renováveis, celulose e

seus derivados, lignina e seus derivados, açúcares de celulose (glicose) e hemicelulose (xilose) (JÚNIOR, 2020).

A biotecnologia oferece diversas ferramentas adequadas para conversão dos resíduos agroindustriais em matéria-prima possibilitando a produção de compostos de valor agregado, como por exemplo a fermentação em estado sólido, um processo biotecnológico de baixo impacto ambiental e baixo custo que pode utilizar resíduos agroindustriais (SOCCOL et al., 2017).

Resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz, têm sido estudados para o reaproveitamento como matéria-prima para processos fermentativos em estado sólido, em razão da alta biodegradabilidade e fonte de nutrientes, reduzindo custos de produção e o impacto ambiental (RAVINDRAN et al., 2018; SADH; DUHAN; DUHAN, 2018; NAIDU; SIDDIQUI; IDRIS, 2020).

Visando contribuir com a redução de custos na cadeia produtiva e com o impacto ambiental causado pela geração do grande volume de resíduos orgânicos, a obtenção de produtos, a partir dos resíduos orgânicos como matéria-prima, é uma das estratégias de fomentar a economia circular (VON, 2018).

3.2 ASPECTOS GERAIS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

A cana-de-açúcar pertence à família *Poaceae*, do gênero *Saccharum* spp., é uma gramínea cultivada inicialmente na Ásia e Índia e foi introduzida no Brasil na época colonial, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país (FURTADO; SCANDIFFIO; CORTEZ, 2011; PANDEY e SINGH, 2020).

O expressivo cultivo da cana-de-açúcar no Brasil é atribuído à alta produção de açúcar e álcool. Para a produção de cana-de-açúcar, o clima brasileiro possibilita o plantio em dois períodos. Quando plantada em setembro-outubro, ocorre o rápido desenvolvimento entre os meses de novembro a abril. O segundo período de plantio ocorre entre janeiro e março com desenvolvimento de abril a outubro. A cada 5 anos de plantio, a cultura da cana-de-açúcar deve ser replantada, para que um novo ciclo se inicie (MACEDO et al., 2005; REZENDE e RICHARDSON, 2015).

A colheita da cana-de-açúcar tem início com o corte do caule. Embora sejam empregadas colheitadeiras mecânicas ainda são contratados trabalhadores responsáveis pela colheita manual. Esta primeira etapa tem a finalidade de obtenção

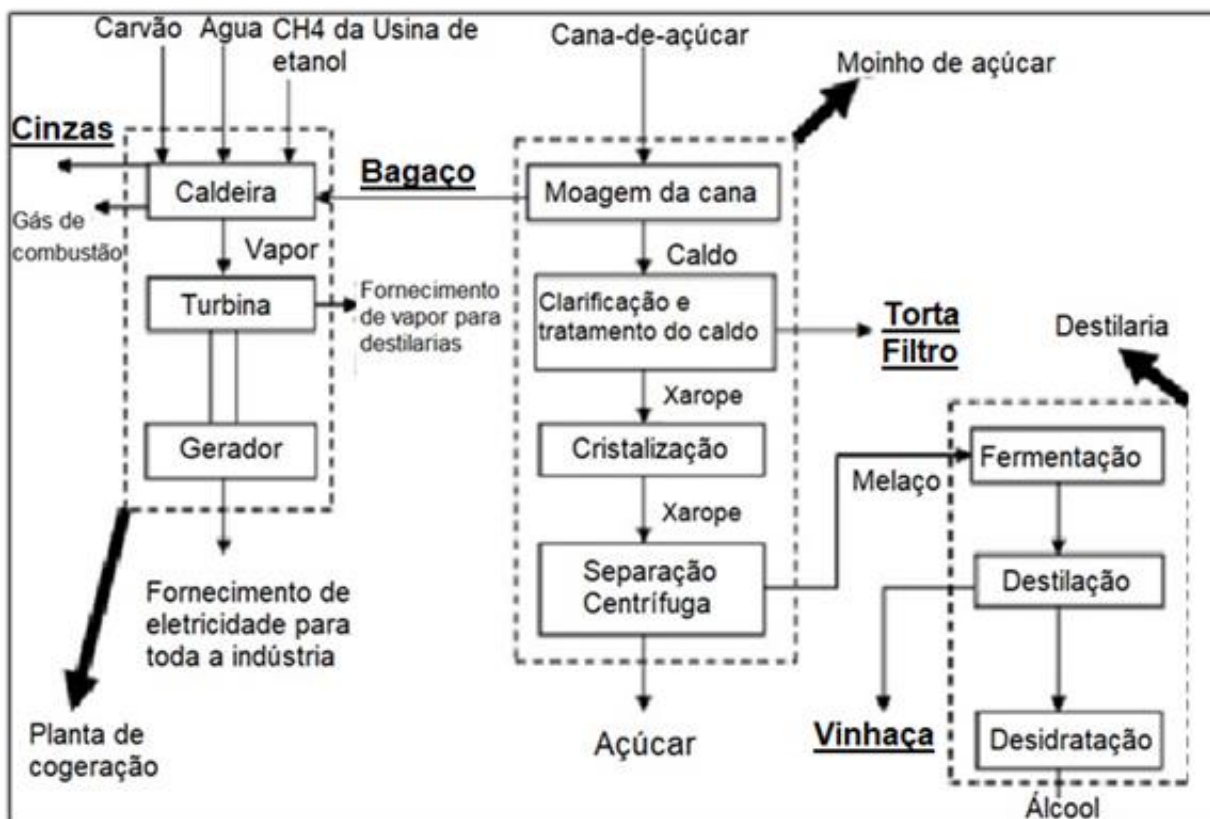
de fragmentos, que são levados de imediato às usinas de açúcar. Nas usinas, a cana-de-açúcar é processada a fim de obter dois produtos principais, o açúcar e o álcool (JENA e POGGI, 2013).

Nas usinas, a cana-de-açúcar inicialmente é lavada para retirada de impurezas e submetida a moagem para extração de um caldo. Para aumentar o rendimento da extração e obtenção do açúcar, a cana-de-açúcar fragmentada e moída passa por sucessivas lavagens com água. O resíduo fibroso resultante da moagem é denominado bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço é comumente utilizado nas caldeiras para queima e produção de energia. O resíduo obtido desta queima se chama cinza de caldeira (CHAUHAN; CHAUDHARY; KUMAR, 2011; SANTOS et al., 2019).

O caldo obtido da moagem pode ser levado para produção de açúcar ou etanol. Para produção de açúcar, o caldo passa por etapas de tratamento, que incluem ações físicas e químicas (CAVALCANTE, 2012). Um aquecimento é obrigatório para que ocorram reações químicas. O caldo aquecido passa por decantadores ou clarificadores, que separam as impurezas. Nesta etapa é obtido o resíduo chamado torta filtro. O caldo clarificado é concentrado em evaporadores para cristalização da sacarose, cuja solução residual deste processo se chama melaço. Os cristais obtidos são secos e resfriados para serem armazenados e comercializados (CHAUHAN; CHAUDHARY; KUMAR, 2011; SANTOS et al., 2019)

A produção do etanol é realizada tanto a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, quanto de misturas de caldo e melaço. A fermentação é realizada por leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* e o tempo médio de fermentação é de 6 a 10 horas. O caldo fermentado segue para as destilarias para produção de etanol. Neste processo é obtida a vinhaça, um resíduo composto por água, matéria orgânica e minerais, principalmente potássio, além de açúcares e outros elementos, que segue para a destilação fracionada e obtenção do etanol. O etanol hidratado pode ser armazenado como o último produto ou pode ser enviado para a coluna de desidratação (CHAUHAN; CHAUDHARY; KUMAR, 2011; ROSA; MARTINS, 2013; BIZZO et al., 2014; SANTOS et al., 2019). A Figura 1 ilustra os produtos gerados a partir do processamento da cana-de-açúcar.

Figura 1 - Produtos gerados a partir do processamento da cana-de-açúcar e seus derivados



Fonte: Traduzido de Chauhan et al., (2011).

A grande produção brasileira de açúcar e álcool remete simultaneamente a maior quantidade de resíduos produzidos durante o processamento da cana-de-açúcar. Os principais resíduos gerados são, o bagaço da cana-de-açúcar, a vinhaça, a torta de filtro e as cinzas das caldeiras (CHAUHAN; CHAUDHARY; KUMAR, 2011; CHANDEL et al., 2012;)

O bagaço de cana-de-açúcar, gerado na etapa de moagem, descarta para cada tonelada de cana-de-açúcar, 140 kg de bagaço (PIPPON et al., 2011). O bagaço é composto por 45-50 % de celulose, 25-30 % de hemiceluloses e 25 % lignina. A composição do bagaço pode sofrer variações devido a fatores como, localização, variedade da cultura, composição química do solo, fertilizantes, condições climáticas e o tipo de moagem adotada (PARAMESWARAN, 2009; KARP et al., 2013; BIZZO et al., 2014).

A vinhaça obtida na etapa de destilação possui uma taxa de produção aproximada de 12 a 15 mil litros de vinhaça a cada mil litros de etanol produzido (CONAB, 2018) e inclui em sua composição cerca de 82 % de água, 11 % de cinzas,

6 % de proteína, 1 % de carboidratos, além de conter nutrientes como, nitrogênio (até 4,2 g / L), fósforo (até 3,0 g / L) e potássio (até 17,5 g / L) (AHMED et al., 2013)

A torta do filtro é um resíduo obtido do processo de filtração do caldo da cana-de-açúcar durante a produção de açúcar e álcool. A composição da torta filtro é de 4-14 % cera, lipídios e resinas, 15-30 % de fibra, 1-15 % de açúcares, 5-15 % de proteínas, 9-20 % de cinzas, 4-10 % de SiO₂, 1-4 % de CaO, 1-3 % P₂O₅, 0,5-1,5 % de MgO. A quantidade de torta filtro produzida por tonelada de cana-de-açúcar chega a 24 kg (SOUZA et al., 2012; SANTOS et al., 2019).

A cinza de caldeira, rica em potássio, cálcio e manganês, é obtida da queima do bagaço da cana-de-açúcar. É estimado que a queima de 1 tonelada de bagaço pode gerar aproximadamente 25 – 40 kg de cinza de bagaço (CANELLAS et al., 2003; MODESTO et al., 2009; SALES e LIMA, 2010).

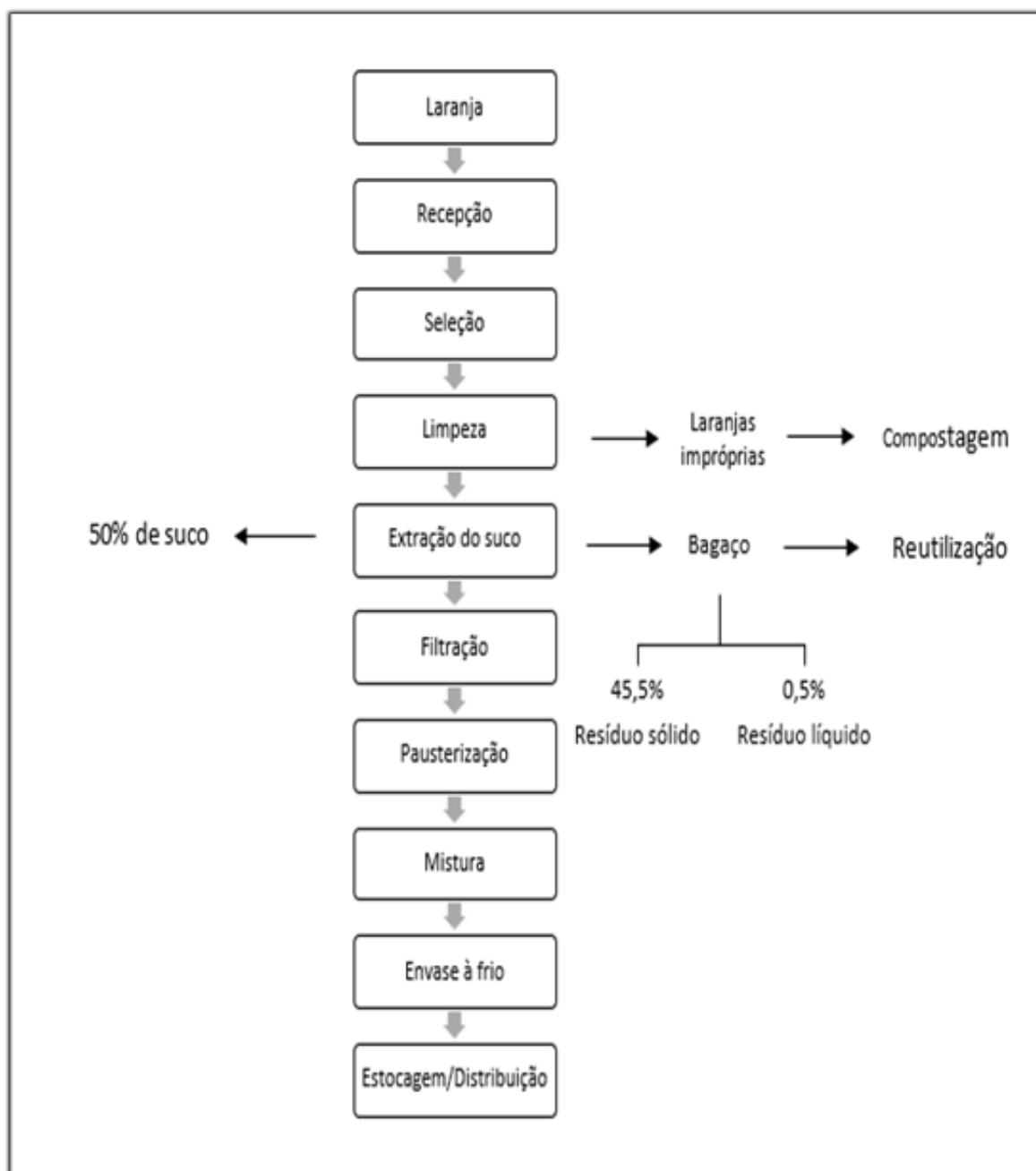
3.3 ASPECTOS GERAIS DA INDÚSTRIA DE SUCO LARANJA

A laranja é um fruto que pertence à família *Rutaceae* e ao o gênero *Citrus*, que inclui quatro espécies principais: *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus maxima* Burm. Merr, *Citrus medica* L. e *Citrus micrantha* Wester (NICOLOSI et al., 2000; BARKLEY et al., 2006; CURK et al., 2014).

No Brasil, no ano de 2018, a produção de laranja foi estimada em 17,3 milhões de toneladas, enquanto a produção de suco de laranja foi estimada em 1,2 milhões de toneladas. O Brasil responde por três quartos das exportações globais de suco de laranja (USDA, 2018; BIER, MEDEIROS, SOCCOL, 2017).

A laranja é uma fruta cítrica consumida em grandes quantidades na forma natural, descascada e na forma de suco. O suco de laranja se destaca no setor da economia agroindustrial (DOMINGOS et al., 2019). Os principais resíduos do processamento da laranja para produção de suco, são, as sementes, polpa e casca, que abrangem aproximadamente 50 % do peso da fruta, conforme apresentado na Figura 2 (REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE, 2012; CRIZEL et al., 2013).

Figura 2 - Processamento da laranja para obtenção de suco de laranja e seus resíduos sólidos



Fonte: REZZADORI; BENEDETTI; AMANTE (2012).

O resíduo de casca de laranja é um resíduo quimicamente complexo e altamente biodegradável, que contém uma grande variedade de compostos valiosos, incluindo açúcares fermentáveis, polímeros de carboidratos, flavonoides, polifenóis e óleos essenciais, propiciando a valorização da matéria-prima como fonte renovável de produtos químicos de alto valor agregado (REZZADORI et al., 2012; ESTEBAN; LADERO, 2018).

Na indústria de suco de laranja, a fruta in natura passa por diferentes processos, dentre os quais a extração do suco, é um dos mais importantes. A polpa cítrica é a fração sólida, que corresponde a cerca de 50 % da fruta, obtido após a compressão das frutas. A fruta cítrica gera um resíduo que contém cerca de 60-65 % de casca, 30-35 % de tecidos internos, 0-10 % de sementes que possuem altos níveis de açúcares solúveis, pectina, proteínas, hemiceluloses e fibras de celulose (AWAN et al., 2013; CYPRIANO, SILVA, TASIC, 2017).

Algumas das principais maneiras de gerenciar esses resíduos incluem a utilização como ração para gado, compostagem, incineração ou aterro (COMA et al., 2017), sendo necessárias ações para o reaproveitamento dos resíduos gerados durante o processamento das laranjas. O aproveitamento dos resíduos da indústria, pode ser uma importante fonte econômica, devido ao alto teor de compostos ativos presentes em sua composição, tendo o potencial de ser utilizada em seguimentos como, a indústria farmacêutica, biomédica, produtos alimentícios, embalagens e cosméticos (MAHATO et al, 2018; LEITES, MENEGOTTO, CRISTINA, 2021).

3.4 ASPECTOS GERAIS DA INDÚSTRIA DE CERVEJA

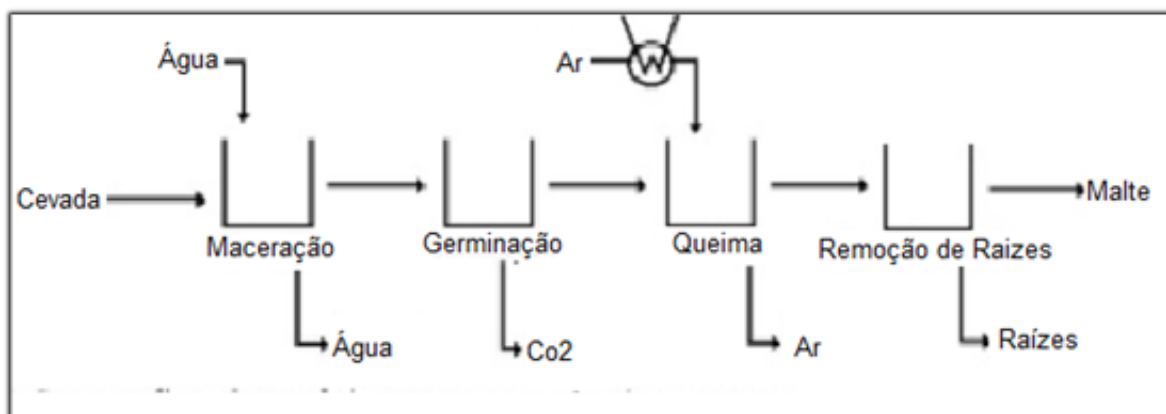
A cevada (*Hordeum vulgare*) é uma das 31 espécies do gênero *Hordeum*, dentro das *Triticeae*, a tribo da família das gramíneas (*Poaceae*) à qual o trigo (*Triticum aestivum*) e o centeio (*Secale cereale*) também pertencem. O grão de cevada é muito utilizado para o processo de maltagem, por ser economicamente mais favorável, graças ao aumento na produção de cervejas artesanais, que utilizam uma proporção maior de malte de cevada para produção do malte (JUSTE et al., 2014; BOND et al., 2015).

Em 2018, a produção de cevada ocupou a quarta posição na lista mundial de cereais com uma área colhida de 48 milhões de hectares que alcançou 140 milhões de toneladas de grãos (DRAKOPOULOS et al., 2021).

O processo de produção da cerveja envolve três reações bioquímicas principais: ativação enzimática do grão de cevada durante a germinação, degradação do amido em açúcares fermentáveis e a fermentação alcoólica realizada por leveduras *Saccharomyces* com formação de etanol e CO₂ (PESCARI et al., 2018). A maltagem é o processo pelo qual a semente de cevada é submetida a germinação

por vários dias e em seguida essas sementes germinadas são aquecidas com o objetivo de estabilizar a atividade de enzimas, processo demonstrado na Figura 3 (QUEK et al., 2019).

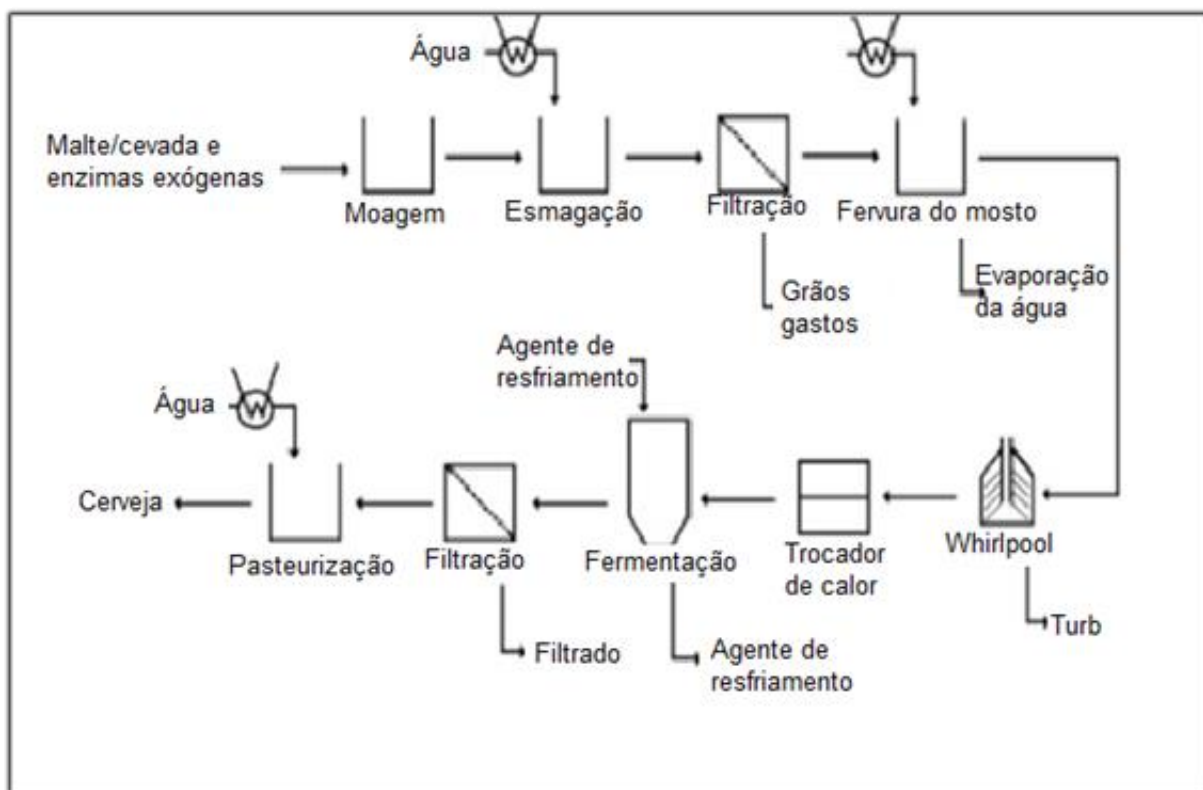
Figura 3 - Etapas do Processo de malteação



Fonte: Traduzido de DONKELAAR et al., 2016.

Já o processo de produção de cervejas propriamente dito, inclui as seguintes etapas principais: maltagem, moagem, maceração, fermentação, maturação, filtração, clarificação ou pasteurização e embalagem (PESCARI et al., 2018), como descrito na Figura 4.

Figura 4 - Etapas do processamento industrial da cerveja



Fonte: Traduzido de DONKELAAR et al., 2016.

Durante todas as etapas de produção da cerveja, várias enzimas são ativadas, incluindo *proteases*, *amilases* e *β -glucanases*. Algumas proteínas são degradadas pelas *proteases* do malte em aminoácidos e peptídeos, que fornecem uma fonte de nitrogênio para a levedura de cerveja. A temperatura no processo de maceração, pode afetar as características da bebida, como a estabilidade da espuma e a fermentabilidade, pois a temperatura tem influência sobre o grau de degradação da proteína. Após a filtração, o mosto é fervido para a coagulação de proteínas, desativação das enzimas do malte e a extração dos componentes do lúpulo (LIMURE e SATO, 2013).

Dentre os principais resíduos da indústria cervejeira podemos citar os resíduos resultantes da utilização dos grãos de cevada, gerado a partir do processo de filtração e atinge cerca de 41 % da produção de resíduos de cerveja e 31 % de materiais de malte (NIGAM, 2017; GARCIA-GARCIA et al., 2019). Para cada 100 litros de cerveja produzida cerca de 20 quilos de resíduos de grãos são produzidos.

3.5 CARACTERÍSTICAS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

O ácido cítrico (2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxílico), um ácido orgânico que possui ampla utilização nas indústrias alimentícias e farmacêuticas devido à segurança, alta solubilidade em água e propriedades quelantes e tamponantes (WERPY et al., 2004; SOCCOL et al., 2006; DHILLON et al., 2011a; ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2013; YIN et al., 2015; WANG et al., 2020).

Em vista da alta demanda de AC, a procura de substratos de custo reduzido para a produção AC é muito grande. Neste contexto, alguns estudos avaliaram a produção deste ácido a partir de diferentes resíduos, sendo eles, resíduos de frutas, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de grãos, casca de batata doce, resíduos da casca de laranja entre outros (KUMAR et al., 2003; DHILLON et al., 2011b; PAPADAKI e MANTZOURIDOU, 2019; ABOYEJI et al., 2020).

O AC foi inicialmente isolado do suco de limão, e posteriormente sua produção foi realizada por linhagens de *A. niger*, (PAPAGIANNI, 2007). Atualmente, o AC é produzido principalmente em sistemas de fermentação submersa e em menor proporção em fermentação em estado sólido por *A. niger* (WANG et al., 2017).

Diversos microrganismos, incluindo bactérias e fungos, tem sido utilizado para a produção de AC. O processo de produção industrial mais amplamente utilizado é o cultivo submerso, utilizando amido ou sacarose como fonte nutricional (CHEN E NIELSEN, 2016; DEZAM et al., 2017).

No entanto, a indústria vem buscando tecnologias de menor custo para aumentar a competitividade e condições adversas de mercado. Uma redução de custo, sob esta perspectiva, pode ser alcançada ao serem utilizados substratos, como diferentes resíduos agroindustriais (DHILLON et al., 2011b).

3.6 *Aspergillus* sp. PRODUTORES DE ÁCIDO CÍTRICO

Os fungos do gênero *Aspergillus* são de grande importância no âmbito biotecnológico. Muitas espécies são usadas na indústria, para produzir enzimas, como *amilases* ou *lipases*, e ácidos orgânicos, como AC por processos fermentativos (KRULL et al., 2017; ROUKAS et al., 2020).

O gênero *Aspergillus* é constituído por mais de 300 espécies (VIDAL-ACUÑA et al., 2019), sendo divididas em quatro subgêneros: *Aspergillus Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*, distribuídos em 20 seções, cuja características morfológicas podem apresentar conídios unisseriados ou bisseriados (SAMSON et al., 2014; HUBKA et al., 2015).

Aspergillus section *Nigri*, pertence ao subgênero *Circumdati*, que abriga aproximadamente 32 espécies (HOUBRAKEN et al., 2020). Nesta seção é descrito um grupo de espécies com características muito similares e algumas espécies até mesmo morfológicamente indistinguíveis, denominado de “agregado *niger*”, sendo composto de um total de 10 espécies (SAMSON et al., 2014; D’HOOGE et al., 2019).

A espécie *A. niger* pertence ao agregado *niger* assim como *A. welwitschiae* (FRISVAD et al., 2007; FUNGARO et al., 2017), foram relatadas na literatura como boas produtoras de AC (BOSSA, 2020; FERNANDES, 2021). No entanto, ambas as espécies abrigam linhagens produtoras das micotoxinas ocratoxina A e fumonisina B2 (ABARCA et al., 1994; FRISVAD et al., 2007). Estudos tem mostrado que a produção de ambas as micotoxinas está associada à presença de alguns genes constituintes das vias de biossíntese dessas micotoxinas (MASSI et al., 2016). Estes estudos demonstraram que a associação entre a presença destes genes e a produção de ocratoxina A e/ou fumonisina B2 ocorre em todas linhagens estudadas de *A. welwitschiae*, enquanto que em *A. niger* a associação não ocorre em todas linhagens estudadas (FRISVAD et al., 2011; PALUMBO e O’KEEFFE, 2013; MASSI et al., 2016).

As linhagens de *A. welwitschiae* utilizadas por Bossa (2020) e Fernandes (2021), não continham os genes relacionados com a produção das micotoxinas citadas anteriormente, sendo seguras quanto a produção de metabólitos. Neste sentido, utilizar linhagens de *A. welwitschiae*, que não apresentam genes associados à produção de ocratoxina A e ou fumonisina B2, mas que apresentem maior potencial de produção de ácido cítrico apresenta vantagens quanto à segurança de obtenção do produto.

Como método alternativo à obtenção de quantidades superiores de AC, a mutação de linhagens selvagens previamente selecionadas tem contribuído com o sucesso do processo fermentativo (RUGSASEEL et al., 1993; SARANGBIN et al., 1999; LEE; LIM, 2003; LOLFY et al., 2007; ADEOYE et al., 2015; STEIGER et al., 2019).

Linhagens mutantes obtidas por exposição à radiação ultravioleta foram empregadas em processos fermentativos e proporcionaram melhoria na produção de metabólitos, incluindo ácido cítrico (IKRAM-UL et al., 2004; VASANTHABHARATHI et al., 2013; LATEEF et al., 2015).

No trabalho de Hamissa (1992), obteve 31 linhagens mutantes de *A. niger*, com o uso de radiação ultravioleta. Dentre os mutantes obtidos, uma linhagem foi capaz de aumentar em 32,13% a produção de AC. Já Rugsassel et al., (1993), ao obter 8 linhagens mutantes de *A. niger*, selecionaram uma linhagem mutante com capacidade superior de produção de AC (48 g/L) a partir de amido solúvel.

Outro estudo que teve como objetivo utilizar a radiação ultravioleta para obtenção de linhagens mutantes, foi o de Adeoye (2015), que obteve a linhagem mutante de *A. niger* FOU 1₁₀, sendo avaliada em substrato hidrolisado de mandioca, que proporcionou uma produção de 9,4 g/L de AC, sendo superior a linhagem selvagem de *A. niger*, (1,93 g/L).

No estudo de Ikram-UI et al., (2004), também foi obtida uma linhagem mutante de *A. niger* (GCMC-7), onde após 168 horas de fermentação em melaço de cana pré-tratado, com ferrocianeto de potássio (15% p / v, carboidratos) e meio de Vogel, apresentou produção de AC de $96,1 \pm 1,5$ g/L.

Bossa (2020), ao utilizar duas linhagens mutantes de *A. welwitschiae*, sob fermentação submersa, obteve 5,48 g/L (em 7 dias) e 10,02 g/L (em 10 dias) de AC. Desta forma, o uso de linhagens selecionadas e associadas a resíduos agroindustriais para a produção de AC, poderá proporcionar a redução de custos e contribuir significativamente com a diminuição do impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos na natureza.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram utilizadas linhagens de *A. welwitschiae*, a linhagem selvagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 isolada do alho brasileiro, por Vanzela et al., (2020), e as linhagens mutantes *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30, *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 (Patente BR 102021 0091371)., *A. welwitschiae* UELAs 15.262/50 e *A. welwitschiae* UELAs 15.262/55, obtidas por Bossa (2020). As linhagens utilizadas neste estudo foram previamente selecionadas para a produção de AC.

4.2 PREPARO DOS RESÍDUOS DE CANA-DE-AÇÚCAR, LARANJA E MALTE

O resíduo cana-de-açúcar foi triturado em liquidificador industrial para obtenção de partículas com tamanhos reduzidos e homogêneos, que posteriormente foi armazenado em embalagem hermética.

O resíduo da laranja foi separado manualmente e as cascas foram separadas das demais partes da laranja (restos de suco, endocarpo e sementes). E em seguida o material foi distribuído em bandejas e seco a 50°C. Após a secagem completa, o material foi triturado com moinho analítico A10 Basic 23 (IKA® Werke, IKA A10), e peneirado com peneira granulométrica de 0,59 mm (Solotest, abnt 30, Tyler 80) e armazenado em embalagens herméticas.

O resíduo de malte foi coletado e imediatamente distribuído em bandejas e seco a 50 °C. Após a secagem o material foi armazenado em embalagens herméticas.

4.3. PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *A. welwitschiae* EM RESÍDUO DE CANA-DE-AÇÚCAR

As linhagens de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 e UELAs 15.262/35, foram previamente cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) por 3 dias a 28 °C. Em seguida, foi preparada uma suspensão de 10⁷ conídios/mL em solução de água destilada e Tween 80 0,5%.

Foram preparados frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 1,4 g de bagaço de cana-de-açúcar e 3,0 mL de água destilada e 1,0 mL de meio Prescott & Dunn (Sacarose 10 g/L; 5 g/L de peptona, 24 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, q.s.p água destilada, pH 4,0). Cada frasco foi inoculado com 10^7 conídios/mL de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 ou *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35. O experimento foi realizado em triplicata experimental.

Em seguida, os frascos foram incubados a 37°C por 6 dias e a cada 48 horas o sistema foi umedecido com 500 µL de água destilada conforme Torrado et al. (2011). A cada 24 horas uma triplicata de cada linhagem foi utilizada para obtenção do extrato bruto. A interrupção do cultivo foi realizada pela adição de 30 mL de água destilada ao sistema fermentativo, seguida homogeneização a 25°C por 1 hora. Posteriormente foi feita filtração do sistema fermentativo com papel filtro qualitativo, para obtenção do extrato bruto e determinação de AC, açúcares redutores e atividade de *celulases*.

4.3.1 Produção de Ácido Cítrico por *A. welwitschiae* em Resíduos de Cana-de-açúcar, Laranja e Malte

Inicialmente foi utilizado o resíduo de cana-de-açúcar em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 1,4 g de bagaço de cana-de-açúcar (100%) e 4,0 mL de água destilada. Um total de 10^7 conídios das linhagens de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 ou UELAs 15.262/35, foi inoculado em triplicatas e cada replica foi coletada a cada 24 horas, como descrito no item 4.2.

Sob as mesmas condições descritas acima foi realizada a produção de AC, utilizando como substrato resíduo de cana-de-açúcar e de malte, na proporção de 50% de cada resíduo. O sistema de fermentação foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 50 mL, com adição de 4,0 mL de água destilada. As linhagens de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 e UELAs 15.262/35 foram analisadas com a retirada de uma parcela das triplicatas de cada linhagem a cada 24 horas, como descrito no item 4.2.

Da mesma forma, a produção de AC foi avaliada a partir de resíduos de cana-de-açúcar e de laranja, na proporção de 50% de cada resíduo. O sistema de fermentação foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 50 mL com adição de 4,0 mL de água destilada, no período de 4 dias, analisando uma parcela das triplicatas de cada linhagem a cada 24 horas, descritos no item 4.2.

Por fim, foi avaliada a produção de AC com 1,4 gramas de bagaço de cana-de-açúcar e 4,0 mL de água destilada, nas mesmas condições descritas no item 4.2, utilizando a linhagem *A. welwitschiae* UELAs 15.262 e linhagens mutantes de *A. welwitschiae*, sendo, *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30, *A. welwitschiae* UELAs 15.262/50 e *A. welwitschiae* UELAs 15.262/55.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE AC PRODUZIDO POR LINHAGENS DE *A. welwitschiae*

A quantificação de AC foi realizada pelo método de piridina-anidrido acético como descrito por Marrier e Boulet (1958). A 1 mL do extrato bruto, foram adicionados 1,30 mL de piridina e agitou-se rapidamente. A esta mistura foram adicionadas 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 AC foi determinada posteriormente em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22) a $A_{405\text{ nm}}$. A quantificação do ácido foi verificada com o auxílio da curva padrão nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$ utilizando AC anidro 99,5%, onde foi obtida a seguinte equação da reta: $y = 0,002x + 0,0206$.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Os açúcares redutores foram quantificados com auxílio do agente oxidante, o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Foi adicionado 1 mL do reagente DNS a 1 mL de extrato bruto. A mistura foi incubada em banho-maria a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,25$ durante 10 minutos e analisada a $A_{540\text{ nm}}$ (MILLER, 1958).

Para a obtenção da curva padrão de glicose, foram preparadas soluções de glicose com concentrações de 0,1 a 1,0 mg/mL, sendo retirada uma alíquota de 1 mL das diferentes concentrações, seguida da adição de 1 mL de solução DNS e analisada a $A_{540\text{ nm}}$. A seguinte equação da reta foi obtida ($y = 2,186x - 0,1206$, $R^2: 0,991$).

4.6 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE *CELULASES* PRODUZIDAS POR *A. welwitschiae* EM FERMENTAÇÃO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A atividade de *celulases* foi determinada de acordo com a metodologia de Periyasamy et al. (2017). O sistema de incubação consistiu na mistura de 0,5 mL de tampão citrato 50 mM pH 5,0, que continha Carboximetilcelulose (CMCase) 1% (m/v) com adição de 0,5 mL de extrato bruto. O sistema foi mantido a 50 °C durante 10 minutos e interrompido pela adição de 1 mL de DNS, que foi submetido à fervura em banho-maria por mais 10 minutos, e analisado a $A_{540\text{ nm}}$ em espectrofotômetro.

Com as absorvâncias e equação da reta ($y = 1,335x - 0,0491$, $R^2: 0,987$), a atividade de *celulases* foi obtida com o cálculo:

$$\frac{U}{mL} = \frac{[glicose]ug}{180} * \frac{1}{0,5} * \frac{1}{10} \quad (1)$$

Onde: 180 = peso molecular da glicose.

0,5 = é equivalente ao volume de extrato bruto enzimático obtido.

10 = é equivalente ao tempo de incubação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E LINHAGENS DE *A. welwitschiae* PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

É conhecido que a maior produção de AC é dependente de diversos parâmetros, como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, entre outros, os quais associados a linhagens específicas de microrganismos, previamente selecionadas, proporcionam o sucesso do processo fermentativo (SHULER; KARGI, 2002; LOTFY, GHANEM, HELOW, 2007; AJALA et al., 2020; JIN et al., 2021).

Dentre as espécies/linhagens aptas à maior produção de AC, está *A. niger* (SOCCOL et al., 2006; MAX et al., 2010; HU et al., 2019). Morfologicamente indistinguível de *A. niger*, tem-se *A. welwitschiae* (HONG et al., 2013). Ambas as espécies foram relatadas como potenciais produtoras de ocratoxina A e ou fumonisina B2 (ABARCA et al., 1994; FRISVAD et al., 2007). No entanto, estudos tem demonstrado que a associação entre genótipo negativo e potencial para produção de tais micotoxinas é totalmente aplicável para *A. welwitschiae* (MASSI et al., 2016). Neste sentido, dentre as linhagens de *A. welwitschiae* não produtoras de tais micotoxinas e identificadas por Vanzela et al. (2020), foi selecionada por Bossa (2020), a linhagem UELAs 15.262, como a melhor produtora de ácido cítrico.

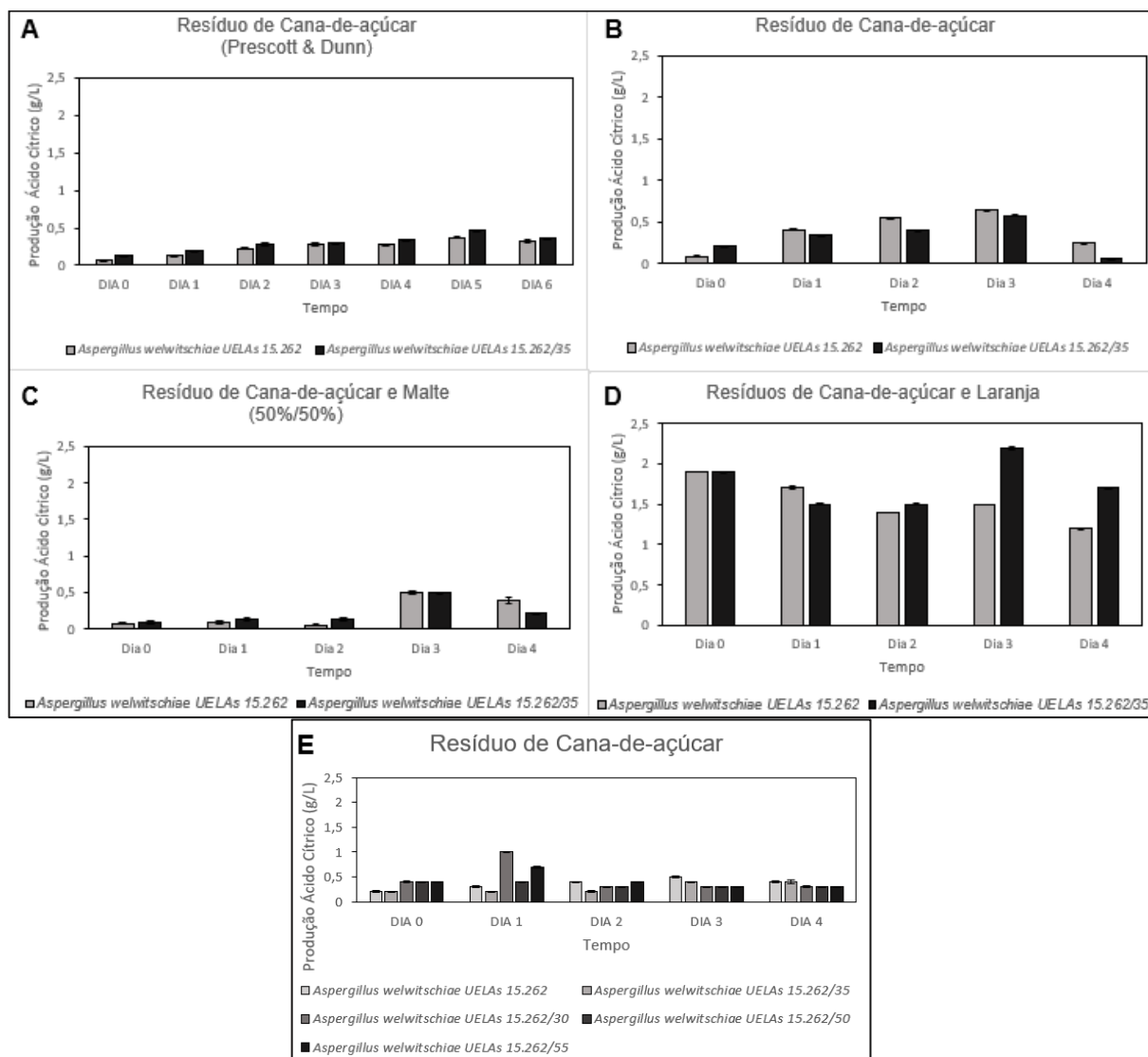
Uma das estratégias utilizadas para obter melhor produção de AC, é a obtenção de linhagens mutantes (HAMISSA, 1992; RUGSASSEL et al, 1993; SARANGBIN, 1999 ADEOYE, 2015). Bossa (2020), a partir de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 (selvagem), selecionou linhagens mutantes para maior produção de AC, dentre as quais a linhagem mutante UELAs 15.262/35 (Patente BR 102021 0091371), se destacou quanto a produção de AC sob fermentação submersa.

Com o intuito de disponibilizar novas linhagens aptas e seguras para a produção de AC, associadas a utilização de fontes nutricionais alternativas e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, neste trabalho foi avaliado a produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 e UELAs 15.262/35.

Usando os mesmos parâmetros estabelecidos por Bossa (2020), e utilizando bagaço de cana-de-açúcar e meio Prescott e Dunn como solução nutriente inicial, foi observado aumento da produção de AC até o quinto dia de fermentação, por ambas

as linhagens, seguido de queda da produção de AC no sexto dia (Fig. 5, A). A maior produção de AC por ambas as linhagens ocorreu no quinto dia de fermentação, sendo detectada maior quantidade de AC por *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35 ($0,47 \pm 0,003$ g/L).

Figura 5 - Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduos agroindustriais. (A) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar meio Prescott e Dunn. (B) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar. (C) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de cana-de-açúcar e malte. (D) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar e resíduo de laranja. (E) Produção de AC por linhagens de *A. welwitschiae* a partir de resíduo de cana-de-açúcar.



Fonte: o próprio autor

A fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens, dentre as quais a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substrato, diminuindo o custo do processo. Por outro lado, dentre as desvantagens deste tipo de fermentação, encontra-se o menor controle quanto a possíveis contaminações, principalmente quando o processo fermentativo é realizado com fungos filamentosos, em grande escala e por longos períodos de tempo. Uma das estratégias que contribuem com a

minimização de tais desvantagens é realizar o processo fermentativo durante curtos períodos de tempo.

Neste sentido, ao retirar a solução nutriente inicial (Prescott e Dunn) do processo fermentativo (com bagaço de cana-de-açúcar), foi detectado maior produção de AC por ambas as linhagens de *A. welwitschiae* no terceiro dia de fermentação (Fig. 5, B). No entanto, em contraste à fermentação que fez uso de solução nutriente inicial (Fig. 5, A), houve maior produção de AC pela linhagem selvagem de *A. welwitschiae* UELAs 15.262 ($0,64 \pm 0,01$ g/L) (Fig. 5, B).

A ausência de nutrientes iniciais (solução nutriente) que favorecem a manutenção e proliferação celular, provavelmente desencadeou mecanismos de secreção de enzimas, como por exemplo o grupo das *celulases*, passíveis de degradar o substrato disponível, e proporcionar produção antecipada de AC.

Considerando que a maioria dos resíduos agroindustriais são compostos em parte por celulose (LEITE et al., 2019; LEITE et al., 2021), em diferentes quantidades e cuja desorganização dessa estrutura pode ser realizada por *celulases* secretadas pelas linhagens em estudo, foi avaliado a produção de AC a partir de misturas de resíduos agroindustriais como resíduos de laranja e de malte.

A mistura de bagaço de cana-de-açúcar e malte, proporcionou a ambas as linhagens de *A. welwitschiae* maior produção de AC ($0,5 \pm 0,02$ g/L) no terceiro dia de fermentação, seguido de posterior queda da produção de AC no quarto dia (Fig. 5, C). Em contraste, a mistura bagaço de cana-de-açúcar e laranja, permitiu produção de AC ($0,29 \pm 0,02$ g/L) somente por *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35, também no terceiro dia de fermentação (Fig. 5, D). É importante ressaltar que o resíduo de laranja já é um resíduo que contém AC presente na fruta (TURAN et al., 2019; OZTURK et al., 2019; ANTICONA et al., 2020).

Os dados obtidos neste estudo, demonstraram que o melhor substrato para produção de AC foi o resíduo de cana-de-açúcar. Em contraste ao estudo de Bossa (2020), neste estudo a linhagem selvagem de *A. welwitschiae* apresentou maior potencial de produção de AC. Devido a versatilidade metabólica de uma linhagem frente ao tipo substrato disponível, foram avaliados a produção de AC a partir de cana-de-açúcar por outras linhagens mutantes de *A. welwitschiae*, obtidas por Bossa (2020).

Sob as mesmas condições, houve maior produção de AC pelas linhagens *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30 ($1,0 \pm 0,01$ g/L) e *A. welwitschiae* UELAs 15.262/55

($0,7 \pm 0,02$ g/L), no primeiro dia de fermentação (Fig. 5, E). A linhagem de *A. welwitschiae* UELAs 15.262/50, assim como *A. welwitschiae* UELAs 15.262/35, nestas condições não apresentou produção de AC superior à linhagem selvagem (Fig. 5, E).

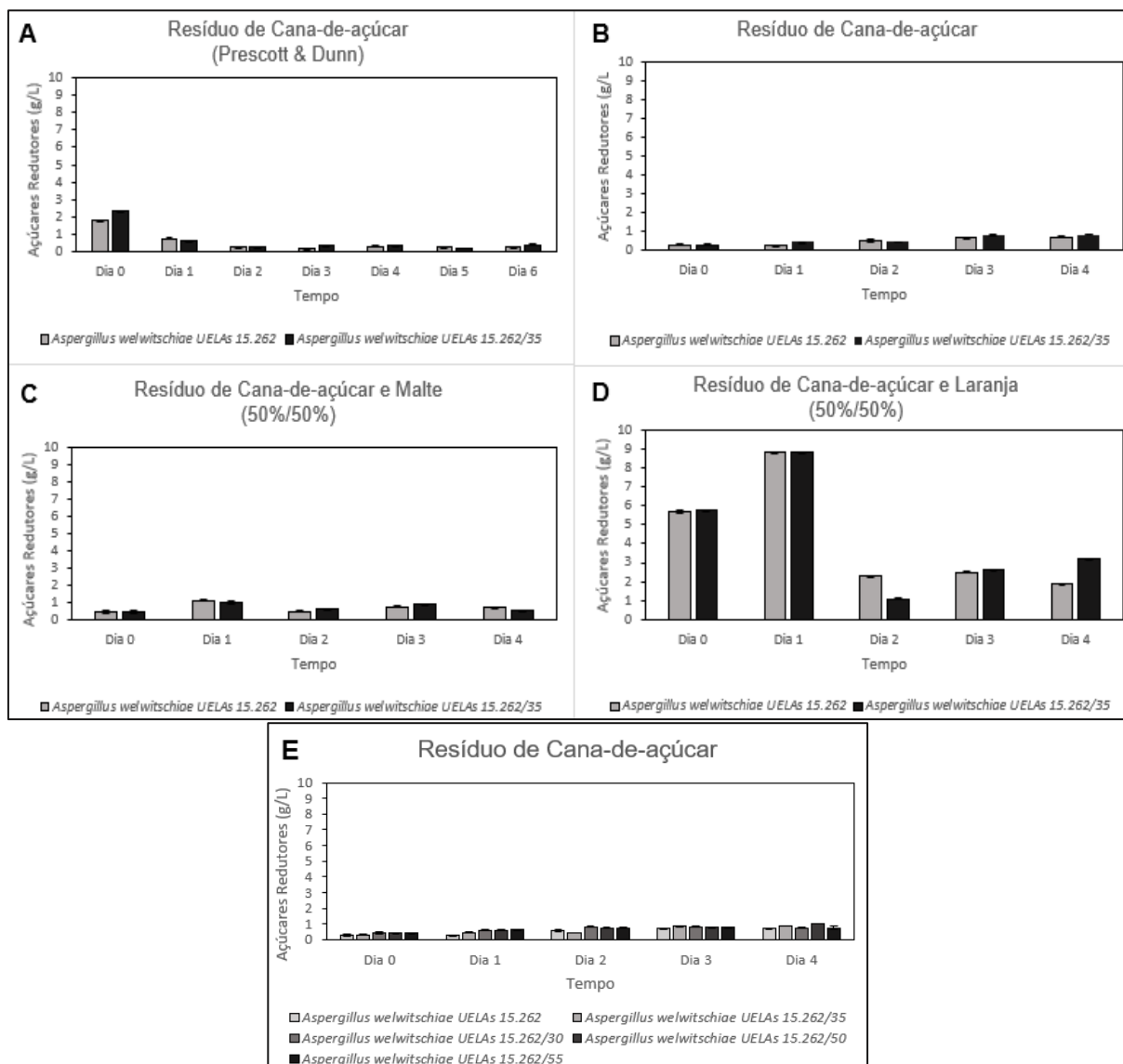
Assim como em diversos estudos, a seleção de linhagens mutantes tem sido boa estratégia para aumentar a produção de AC (HAMISSA, 1992; Rugsassel et al, 1993; SARANGBIN, 1999; IKRAM-UL et al., 2004; ADEOYE, 2015). Diante dos parâmetros utilizados neste estudo, a linhagem mutante de *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30 foi selecionada como melhor produtora de AC ($1,0 \pm 0,01$ g/L) em resíduo de cana-de-açúcar, em curto período de tempo (1 dia de fermentação).

5.2 RELAÇÃO ENTRE AÇÚCARES REDUTORES, PRODUÇÃO DE *CELULASES* E ÁCIDO CÍTRICO POR LINHAGENS DE *A. welwitschiae*

O melhor aproveitamento do processo fermentativo para produção de AC é altamente relacionado com a disponibilidade de substratos ricos em açúcares (ADHAM, 2002; CEVRIMLI, KARIPTAS, e CIFTCI, 2009; ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2013). Resíduos agroindustriais com quantidades elevadas de açúcares constituem alternativas de baixo custo para produção de AC.

A maior quantidade de açúcares redutores ao utilizar solução nutriente inicial (Prescott e Dunn) com resíduo de cana-de-açúcar, foi detectado no dia zero por ambas as linhagens de *A. welwitschiae* (UELAs 15.262 ($1,8 \pm 0,01$ g/L) e UELAs 15.262/35 ($2,4 \pm 0,02$ g/L), seguido por queda da quantidade de açúcares redutores no demais dias (Fig. 6, A). O meio de cultura Prescott e Dunn apresenta sacarose em sua constituição (PRESCOTT & DUNN, 1959). Alguns dados relatam ser a sacarose o açúcar preferencial utilizado por microrganismos para produção de AC (VANDENBERGHE et al., 1999; YIN et al., 2017; SUN et al., 2018).

Figura 6 – (A) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar meio Prescott e Dunn. (B) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar. (C) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e malte. (D) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e resíduo de laranja. (E) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar.



Fonte: o próprio autor

Por outro lado, ao utilizar resíduo de cana-de-açúcar sem solução nutritiva inicial, foi observado quantidades reduzidas de açúcares redutores nos primeiros dias do processo fermentativo ($0,30 \pm 0,06$ g/L e $0,31 \pm 0,03$ g/L) e quantidades maiores principalmente nos dias 3 ($0,70 \pm 0,01$ g/L e $0,86 \pm 0,03$ g/L) e dia 4 ($0,72 \pm 0,02$ g/L e $0,84 \pm 0,01$ g/L) (Fig. 6, B). No entanto, a maior produção de AC por ambas linhagens de *A. welwitschiae* ocorreu no terceiro dia do processo fermentativo (Fig. 5, B). O resíduo de cana é rico em celulose, mas ainda apresenta

pequena proporção de sacarose em sua composição (BARRERA et al., 2016; ALLIERI et al., 2019).

Já no processo fermentativo cujo substrato foi a mistura de resíduos de cana-de-açúcar e de malte, foi detectado maiores quantidades de açúcares redutores no primeiro dia de fermentação por ambas as linhagens de *A. welwitschiae* ($1,13 \pm 0,04$ g/L e $0,99 \pm 0,06$ g/L) (Fig. 6, C), seguido de menor quantidade nos demais dias do processo fermentativo. Este fato ocorre devido a composição do resíduo de malte, que apresenta amido, oligossacarídeos e açúcares simples como a glicose e frutose, resultantes do processo de malteação, e havendo predomínio de glicose (ALMENDINGER, 2020; RICE et al., 2020). A produção de AC pelas linhagens de *A. welwitschiae* no terceiro dia de fermentação (Fig. 5, C) e a quantidade de açúcares redutores detectados neste mesmo dia (Fig. 6, C), demonstra haver provável utilização dos açúcares redutores.

Resultado similar foi observado ao detectar açúcares redutores no processo fermentativo, cujo substrato foi constituído pela mistura de resíduos de cana-de-açúcar e laranja. A maior quantidade de açúcares redutores foi detectada no primeiro dia de fermentação por ambas as linhagens de *A. welwitschiae*, seguido de detecção de quantidades inferiores nos demais dias (Fig. 6, D). O resíduo de laranja apresenta grandes quantidades de açúcares como glicose, frutose e sacarose. No entanto, *A. welwitschiae* UELAs 15.262 provavelmente utilizou os açúcares redutores para outras vias metabólicas distintas da produção de AC.

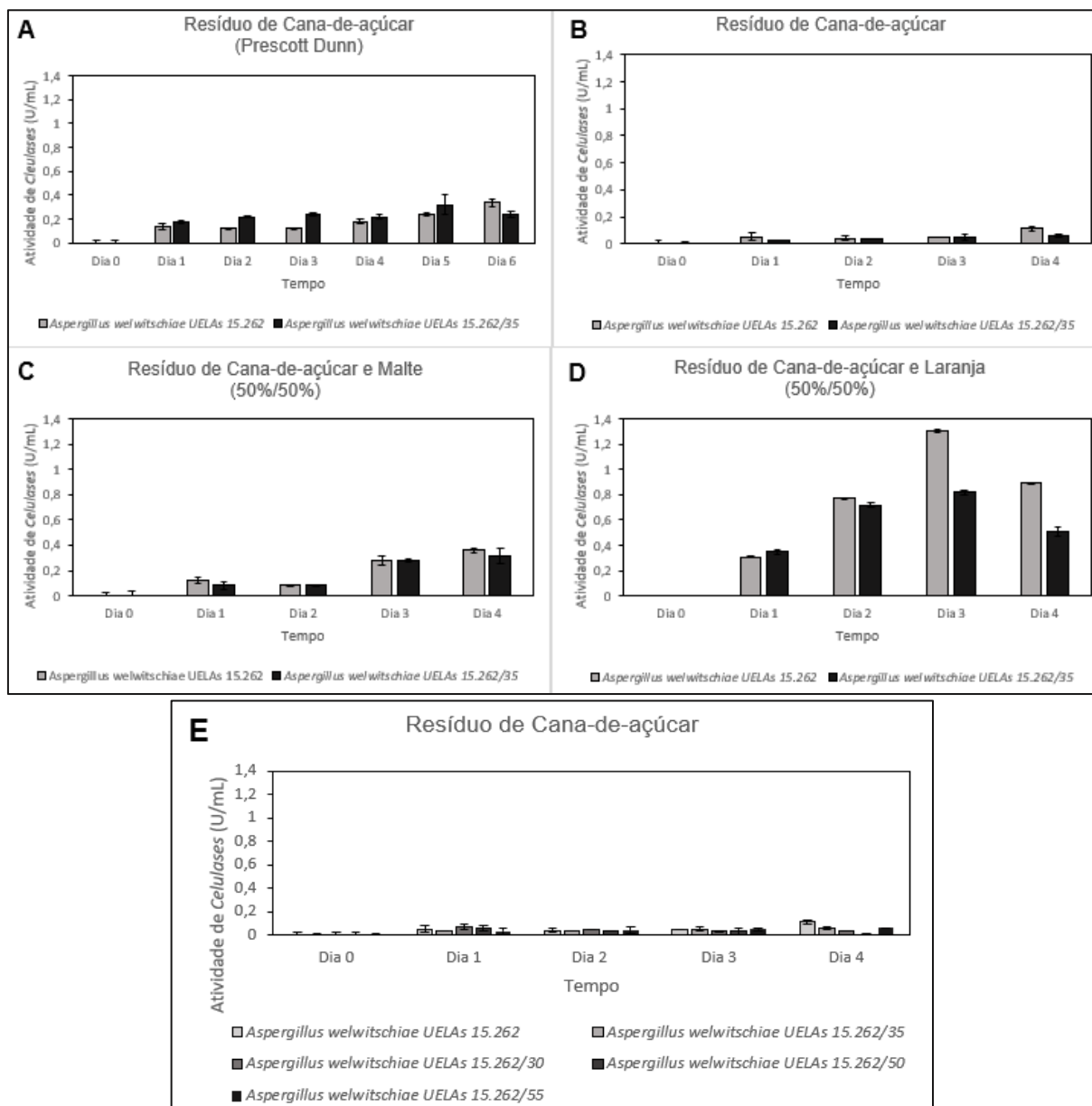
A quantidade de açúcares redutores detectadas no processo fermentativo utilizando como substrato resíduo de cana-de-açúcar e as linhagens mutantes *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30, UELAs 15.262/50 e UELAs 15.262/55, foi similar ao processo fermentativo com as linhagens *A. welwitschiae* UELAs 15.262 e 15.262/35, havendo provável preferência por sacarose (Fig. 6, E). A avaliação da quantidade de açúcares redutores demonstrou que as linhagens de *A. welwitschiae*, bem como linhagens já disponibilizadas para produção de AC, utilizam preferencialmente sacarose como fonte nutricional.

A dinâmica de liberação de açúcares simples como fonte nutricional, mesmo não sendo o nutriente preferencial para produção de AC, é dependente principalmente do tipo de resíduo agroindustrial e do aparato enzimático do microrganismo utilizado. A grande maioria dos resíduos agroindustriais apresentam

celulose, hemicelulose e lignina em sua composição (CYPRIANO, SILVA, TASIC, 2017; LEITE et al., 2019; OUTEIRINO et al, 2019; JÚNIOR, 2020).

Foi demonstrado que a maioria das linhagens de *A. welwitschiae* deste estudo, sob as diversas condições de fermentação, apresentaram maior atividade de *celulases* nos últimos dias do processo fermentativo (Fig. 7 A-E). As linhagens de *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30 e UELAs 15.262/50, a maior produção destas enzimas ocorreu no primeiro dia de fermentação em resíduo de cana-de-açúcar, provavelmente devido à escassez de nutrientes neste processo fermentativo. Este resultado está de acordo com a versatilidade dos microrganismos em ativar o aparato enzimático a fim de disponibilizar nutrientes para manutenção metabólica a partir de substratos diversos como os resíduos agroindustriais.

Figura 7 - (A) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar meio Prescott e Dunn. (B) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar. (C) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e malte. (D) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar e resíduo de laranja. (E) Processo fermentativo com linhagens de *A. welwitschiae* em resíduo de cana-de-açúcar.



Fonte: o próprio autor

6 CONCLUSÕES

As linhagens de *A. welwitschiae* utilizadas no estudo apresentaram potencial produtor de AC em todos os resíduos agroindustriais utilizados, porém o resíduo de cana-de-açúcar foi o melhor substrato.

A partir do resíduo de cana-de-açúcar sem solução nutriente inicial, foi obtida a maior produção de AC por *A. welwitschiae* UELAs 15.262, com 3 dias de fermentação.

Dentre todas as linhagens de *A. welwitschiae*, a linhagem mutante de *A. welwitschiae* UELAs 15.262/30, apresentou maior aptidão para produção de AC a partir de resíduo de cana-de-açúcar, com um dia de fermentação.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, 1994.
- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; & CABAÑES, F. J. Impact of some environmental factors on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 10-16, 2019.
- ABOYEJI, 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. p. 00554, 2020.
- ADHAM, N. Z. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 97-100, 2002.
- ADEOYE, A. O.; LATEEF, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 568-574, 2015.
- AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.
- AHMED, O.; SULIEMAN, A. M. E.; ELHARDALLOU, S. B. Physicochemical, chemical and microbiological characteristics of vinasse, A by-product from ethanol industry. **American Journal of Biochemistry**, v. 3, n. 3, p. 80-83, 2013.
- AJALA, A. S.; ADEOYE, A. O.; OLANIYAN, S. A.; FASONYIN, O. T. A study on effect of fermentation conditions on citric acid production from cassava peels. **Scientific African**, v. 8, p. 396, 2020.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K; WATSON, J.D. Molecular Biology of the Cell. 3rd Edition. **Garland Publishing**, 1994.
- ALLIERI, M. A.; HERNÁNDEZ, E. M.; REZA, O. A.; MOLINA, M. M.; FLORES, L. A. M.; RUIZ, E. P.; ZERMENO, E. L.; MOLINA, A. R.; POY, M. E.; ABURTO, J. Techno-economic analysis and life cycle assessment for energy generation from sugarcane bagasse: Case study for a sugar mill in Mexico. **Food and Bioprocess Processing**, v. 118, p. 281-292, 2019.
- ALMENDINGER, M.; ROHN, S.; PLEISSNER, D. Malt and beer-related by-products as potential antioxidant skin-lightening agents for cosmetics. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, p. 100282, 2020.

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

AMOAHA, J.; OGURA, K.; SCHMETZ, Q.; KONDO, A.; OGINO, C. Co-fermentation of xylose and glucose from ionic liquid pretreated sugar cane bagasse for bioethanol production using engineered xylose assimilating yeast. **Biomass and Bioenergy**, v. 128, p.105-283, 2019.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 367-370, 2013.

APAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244-263, 2007.

ANTICONA, M.; BLESA, J.; FRIGOLA, A.; ESTEVE, M. J. High Biological Value Compounds Extraction from Citrus Waste with Non-Conventional Methods. **Foods**, v. 9, p. 811, 2020.

AWAN, A. T.; TSUKAMOTO, J.; TASIC, L. Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation. **RSC Advances**, v. 3, p. 25071 – 25078, 2013.

BARROS, L.B.; BRASIL, Y.L.; SILVA, A.F.; ANDRADE, L.H.; AMARAL, M.C. Potassium recovery from vinasse by integrated electrodialysis – precipitation process: Effect of the electrolyte solutions. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.8. p. 5, 104238, 2020.

BARKLEY, N. A.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and applied genetics**, v. 112, p. 1519-1531, 2006.

BARRERA, I.; AMEZCUA-ALLIERI, M. A.; ESTUPIÑAN, L.; MARTÍNEZ, T.; ABURTO, J. Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and blue agave bagasses. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 107, p. 91-101, 2016.

BIER, M. C. K.; MEDEIROS, A. B. P.; KIMPE, N; SOCCOL, C. R. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 168-176, 2019.

BIZZO, W.A.; LENÇO, P.C.; CARVALHO, D.J.; VEIGA, J.P.S. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.29, p. 589 – 603, 2014.

BOND, J.; CAPEHART, T.; ALLEN, E.; KIM, G. Boutique brews, barley, and the balance sheet: changes in malt barley industrial use require an updated forecasting approach. **Boutique brews, barley, and the balance sheet: changes in malt barley industrial use require an updated forecasting approach**. p. 18-23, 2015.

BOSSA, L. F. **Produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae***. 2020. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; SQUINA, F.M. Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 123-129, 2013.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G.P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E.; SANTOS, G. A. Propriedades químicas de um cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhiço e adição de vinhaça por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, n. 5, p. 935-944, 2003.

CEVRIMLI, B. S.; KARIPTAS, E.; CIFTCI, H. Effects of fermentation conditions on citric acid production from beet molasses by *Aspergillus niger*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, p. 3211-3218, 2009.

CRIZEL, T.M.; JABLONSKI, A.; RIOS, A.O.; RECH, R.; FLÔRES, S.H. Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer. **LWT – Food Science Technology**, v. 53, p. 9-14, 2013.

CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S.; CARVALHO, W.; SINGH, O.V. Sugarcane bagasse and leaves: Foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11-20, 2012.

CHAUHAN, M. K.; CHAUDHARY, S.; KUMAR, S. Life cycle assessment of sugar industry: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 15, p. 3445-3453, 2011.

COMA, M.; MARTINEZ-HERNANDEZ, E.; ABELN, F.; RAIKOVA, S.; DONNELLY, J.; ARNOT, T. C.; ALLEN, M.; HONG, D. D.; CHUCK, C. J. Organic waste as a sustainable feedstock for platform chemicals. **Faraday Discussions**, v. 202, p. 175-195, 2017.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, 2018. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana> >. Acesso em: 3 de agosto de 2021.

CURK, F.; ANCILLO, G.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: analysis of chromosome 2. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-19, 2014.

CYPRIANO, D. Z.; SILVA, L. L.; TASIC, L. High value-added products from the orange juice industry waste. **Waste Management**. v. 79, p. 71-78, 2018.

DEZAM, A. P. G., VASCONCELLOS, V. M., LACAVA, P. T., & FARINAS, C. S. Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282-287, 2017.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Screening of Agro-industrial Wastes for Citric Acid Bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 Through Solid State Fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Wiley Online Library, v. 93, n. 7, p. 1560–1567, 2011.a

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; 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. 89-92, 2011. b

DIAZ, A. B.; BLANDINO, A.; CARO, I. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 52–64, 2018.

DRAKOPOULOS, D.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; LOGRIECO, A. F.; VOGELGSANG, S. Raised concerns about the safety of barley grains and straw: A Swiss survey reveals a high diversity of mycotoxins and other fungal metabolites. **Food Control**. v. 125, 2021.

DOMINGOS, I.; FERREIRA, J.; CRUZ-LOPES, L.; ESTEVES, B. Polyurethane foams from liquefied orange peel wastes. **Food Bioproducts Process.**, v. 115. p. 223-229, 2019.

DONKELAAR, L. H. G.; MOSTERT, J.; ZISOPOULOS, F. K.; BOOM, R. M.; GOOT, A. V. D. The use of enzymes for beer brewing: Thermodynamic comparison on resource use. **Energy**. v. 115, p. 519-527, 2016.

ESTEBAN, J.; LADERO, M. Food waste as a source of value-added chemicals and materials: a biorefinery perspective. **International Journal of Food Science & Technology**., v. 53, p. 1-14, 2018.

FARIA-SILVA, C.; ASCENSO, A.; COSTA, A. M.; MARTO, J.; CARVALHEIRO, M.; RIBEIRO, H. M.; SIMÕES, S. Feeding the skin: a new trend in food and cosmetics convergence. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

FERNANDES, T. A. B. **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.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R. A.; LARSEN, T. O.; THRANE, U. Fumonisin B2 Production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9727–9732, 2007.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O.; THRANE, U.; MEIJER, M.; VARGA, J.; SAMSON, R. A.; NIELSEN, K. F. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 2-7, 2011.

FUNGARO, M. H. P.; FERRANTI, L. S.; MASSI, F. P.; SILVA, J. J.; SARTORI, D.; TANIWAKI, M. H.; FRISVAD, J. C.; IAMANAKA, B. T. *Aspergillus labruscus* sp. a new species of *Aspergillus* section Nigri discovered in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

FURTADO, A. T.; SCANDIFFIO, M. I. G.; CORTEZ, L. A. B. The Brazilian sugarcane innovation system. **Energy Policy**, v. 39, n. 1, p. 156-166, 2011.

GARCIA, M. V.; PARUSSOLO, G.; MORO, C. B.; BERNARDI, A. O.; COPETTI, M. V. Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergillus* isolated. **Food Microbiology**, v. 73, p. 93-98, 2018.

GARCÍA-LOR, A.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287, p. 77-94, 2012.

GARCIA-GARCIA, G.; STONE, J.; RAHIMIFARD, S. Opportunities for waste valorisation in the food industry—A case study with four UK food manufacturers. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 1339-1356, 2019.

HAMISSA, F. A.; EL-ABYAD, M. S.; ABDU, A.; GAD, A. S. Raising potent UV mutants of *Aspergillus niger* van Tieghem for citric acid production from beet molasses. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 209-213, 1992.

HONG, S. B.; LEE, M.; KIM, D. H.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; PERRONE, G.; GOMI, K.; YAMADA, O.; MACHIDA, M.; HOUBRAKEN, J.; Samson, R. A. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. **Plos One**, v. 8, p. 63769, 2013.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P. de; 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, W. J.; YANG, H. Q.; CHEN, J. H. Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 103, p. 201-209, 2019.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; KOLAŘÍK, M.; JURJEVIĆ, Ž.; PETERSON, S. W. Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. **Mycologia**, v. 107, p. 169-208, 2015.

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

JENA, S. D.; POGGI, M. Harvest planning in the Brazilian sugar cane industry via mixed integer programming. **European Journal of Operational Research**, v. 230, n. 2, p. 374-384, 2013.

JIN, S.; SUN, F.; HU, Z.; LIU, L.; LI, J.; DU, G.; LI, Y.; SHI, G.; CHEN, J. Improving *Aspergillus niger* seed preparation and citric acid production by morphology controlling-based semicontinuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 174, p. 108102, 2021.

JÚNIOR, S. V. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Uma abordagem sustentável. **EMBRAPA**, 2020.

JUSTE, A.; MALFLIET, S.; WAUD, M.; CRAUWELS, S.; DE, COOMAN, L.; AERTS, G.; MARSH, T. L.; RUYTERS, S.; WILLEMS, K.; BUSSCHAERT, P.; LIEVENS, B. Bacterial community dynamics during industrial malting, with an emphasis on lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 39, p. 39-46, 2014.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial *xylanases*: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1219-1227, 2012.

KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, R. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane Bagasse: A review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, n. 4, p. 679-689, 2013.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of *cellulases* and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.

KRULL, S.; HEVEKERL, A.; KUENZ, A.; PRÜBE, U. Process development of itaconic acid production by a natural wild type strain of *Aspergillus terreus* to reach industrially relevant final titers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 4063–4072, 2017.

KHOODARUTH, A. Optimisation of a cogenerated energy systems: the cane biomass flexi-factory case study. **Energy Procedia**, v.62, p. 656-665, 2014.

KUMAR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Utilization of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1725-1729, 2003.

KUMAR, V.; CHOPRA, A. K. Effects of sugarcane pressmud on agronomical characteristics of hybrid cultivar of eggplant (*Solanum melongena L.*) under field conditions. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v.5, n. 2, p.149-162, 2016.

LATEEF, A.; ADELERE, I. A.; GUEGUIM-KANA, E. B.; ASAFA, T. B.; BEUKES, L. S. Green synthesis of silver nanoparticles using keratinase obtained from a strain of *Bacillus safensis* LAU 13. **International Nano Letters**, v. 5, p. 29-35, 2015.

LEE, K. J.; LIM, J. Y. Optimized conditions for high erythritol production by *Penicillium* sp. KJ-UV29, mutant of *Penicillium* sp. KJ81. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 173-178, 2003.

LEITE, P.; SILVA, C.; SALGADO, J. M.; BELO, I. Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 315-322, 2019.

LEITES, L. C.; MENEGOTTO, P. J.; CRISITNA, T. I. Influence of the incorporation form of waste from the production of orange juice in the properties of cassava starch-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 117, p. 106-130, 2021.

LIMURE, T.; SATO, K. Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. **Food Research International**. v. 54, p. 1013-1020, 2013.

LOTFY, W. A.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3464-3469, 2007.

MACEDO, I. D. C. Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e sua sustentabilidade. **São Paulo: Berlendis e Vertecchia**, 2005.

MAHATO, N.; M.; SHARMA, K.; SINHA, M.; CHO, M. H. Citrus waste derived natural pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 307-316, 2018.

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.

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determinations of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, p. 426-428, 1958.

MODESTO, P. T.; SCABORA, M. H.; COLODRO, G.; MALTONI, K. L.; CASSIOLATO, A. M. R. Alterações em Algumas Propriedades de um Latossolo Degradado com uso de Lodo de Esgoto e Resíduos Orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.5, p.1489-1498, 2009.

MORAES, B.S.; JUNQUEIRA, T.L.; PAVANELLO, L.G.; CAVALETT, O.; MANTELATTO, P.E.; BONOMI A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825-835, 2014.

MORAN-AGUILAR, M. G.; COSTA-TRIGO, I.; SANTOYO, C.; DOMÍNGUEZ, J. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Production of *cellulases* and *xylanases* in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 172, p. 108060, 2021.

NAIDU, Y.; SIDDIQUI, Y.; IDRIS, A. S. Comprehensive studies on optimization of lignohemicellulolytic enzymes by indigenous white rot hymenomycetes under solid-state cultivation using agro-industrial wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 259, p. 110056, 2020.

NG, H.S.; KEE, P.E.; YIM, H.S.; CHEN, P.-T.; WEI, Y.-H.; CHI-WEN LAN. J. Recent advances on the sustainable approaches for conversion and reutilization of food wastes to valuable bioproducts. **Bioresource Technology**, v. 302, 2020.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; & TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

NIGAM, P. S. An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. **Waste Management**, v. 62, p. 255-261, 2017

OUTEIRIÑO, D.; COSTA-TRIGO, I.; PAZ, A.; DEIVE, F.J.; RODRÍGUEZ, A.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biorefining brewery spent grain polysaccharides through biotuning of ionic liquids. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 265-274, 2019.

OZTURK, B.; WINTERBURN, J.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, p. 107298, 2019.

PALUMBO, J. D.; O'KEEFFE, T. L. Multiplex PCR analysis of fumonisin biosynthetic genes in fumonisin-non producing *Aspergillus niger* and *A. awamori* strains. **Mycologia**, v. 105, p. 277-284, 2013.

PEL, H. J.; DE WINDE, J. H.; ARCHER, D. B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; TURNER, G.; RONALD P. V.; RICHARD A.; ANDERSEN, M. R.; BENDTSEN, J. D.; BENEN, J. A. E.; BERG, M. V. D.; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M. X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G. J.; DEBETS, A. J. M.; DEKKER, P.; DIJCK, P. W. M. V.; DIJK, A. V.; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A. J. M.; D'ENFERT, C.; GEYSENS, S.; GOOSEN, C.; GROOT, G. S. P.; GROOT, P. W. J.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; HOMBERGH, J. P. T. W. V.; HONDEL, C. A. M. J. J. V.; HEIJDEN, R. T. J. M. V.; KAAIJ, R. M. V.; KLIS, F. M.; KOOLS, H. J.; KUBICEK, C. P.; KUYK, P. A. V.; LAUBER, J.; LU, X.; MAAREL, M. J. E. C. V.; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M. A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S. G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; PEIJ, N. N. M. E. V.; RAM, A. F. J.; RINAS, U.; ROUBOS, J. A.; SAGT, C. M. J.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VARGA, J.; VERVECKEN, W.; VONDERVOORT, P. J. J.; WEDLER, H.; WÖSTEN, H. A. B.; ZENG, A.; OOOYEN, A. J. J. V.; VISSER, J.; STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 221-231, 2007.

PANDEY, V. C.; PATEL, D.; MAITI, D.; SINGH, D. P. Case studies of perennial grasses: Phytoremediation (holistic approach). **Phytoremediation Potential of Perennial Grasses**. Elsevier, p. 337-349, 2020.

PAPADAKI, E.; MANTZOURIDOU F. T. H. Citric acid production from the integration of Spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 59-69, 2019.

PARAMESWARAN, B. Sugarcane bagasse. **Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilization, Springer Netherlands**, p. 239-252, 2009.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S.; Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.

PESCARI, X.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S.; SANCHÍS, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**. v. 103, p. 121-129, 2018.

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, p. 53-63, 2017.

PIPPO, W. A.; LUENGO, C.A.; ALBERTERIS, L.A.M.; GARZONE, P.; CORNACCHI, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste Biomass Valorization**, v. 2, p. 1-16, 2011.

PNRS. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. Disponível em: <http://consultaspublicas.mma.gov.br/planares/wp-content/uploads/2020/07/Plano-Nacional-de-Res%C3%ADduos-S%C3%B3lidos-Consulta-P%C3%ABlica.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2021.

PRAJAPATI, B. P.; JANA, U. K.; SURYAWANSHI, R. K.; KANGO, N. Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 152, p. 653-663, 2020.

PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. D. **Industrial Microbiology**, 3rd ed. New York McGraw-Hill, 1959.

QI, B.; CHEN, X.; WAN, Y. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4875-4883, 2010.

QUEK, W. P.; YU, W.; TAO, K.; FOX, G. P.; GILBERT, R. G. Starch structure-property relations as a function of barley germination times. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 1125-1132, 2019.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, p.93, 2018.

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S.; AMANTE, E. R. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. **Food Bioproducts Processing**, v. 90, p. 606-614, 2012.

REZENDE, M. L.; RICHARDSON, J. W. Economic feasibility of sugar and ethanol production in Brazil under alternative future prices outlook. **Agricultural Systems**, v. 138, p. 77-87, 2015.

RICARDINO, I. E. F.; SOUZA, M. N. C.; NETO, I. F. S. Vantagens e possibilidades do reaproveitamento de resíduos agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**. v. 1, n. 8, 2020.

RICE, T.; SAHIN, A. W.; HEITMANN, M.; LYNCH, K. M.; JACOB, F.; ARENDT, E. K.; COFFEY, A. Application of mannitol producing *Leuconostoc citreum* TR116 to reduce sugar content of barley, oat and wheat malt-based worts. **Food Microbiology**, v. 90, p. 103464, 2020.

ROSA, O. L.; GALLEGOS, A. C. F.; MARQUEZ, D. M.; NOBRE, C.; ESQUIVEL, C.; AGUILAR, C. N. Frutooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 139-146, 2019.

ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Pomegranate peel waste: A new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 131105-131113, 2020.

RUGSASEEL, S.; KIRIMURA, K.; USAMI, S. Selection of mutants of *Aspergillus niger* showing enhanced productivity of citric acid from starch in shaking culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 226-228, 1993.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2018.

SARANGBIN, S.; WATANAPOKASIN, Y. Yam bean starch: a novel substrate for citric acid production by the protease-negative mutant strain of *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 219-224, 1999.

SHALINI R.; GUPTA D.K. Utilization of pomace from apple processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 365-371, 2010

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, p.271–283, 2015.

SALES, A.; LIMA, S. A. Use of Brazilian sugarcane bagasse ash in concrete as sand replacement. **Waste Management**, v.30, n. 6, p.1114-1122, 2010.

SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, L. B.; DE LIRA, T. S., TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of *cellulases* by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.17, p.1-6, 2019.

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, F.; RABELO, S.; DE MATOS, M.; EICHLER, P. Sugarcane Biorefinery, **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. Academic Press, p.1 – 289, 2019.

SARANGBIN, S.; WATANAPOKASIN, Y. Yam bean starch: a novel substrate for citric acid production by the protease-negative mutant strain of *Aspergillus niger*. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p.219-224, 1999.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: basic concepts**. Upper Saddle River: Prentice Hall. 2002.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44. n. 2. p. 141-149, 2006.

SOCCOL, C. R.; DA COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. Recent

developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52-71, 2017.

SOUZA, S. P.; DE ÁVILA, M. T.; PACCA, S. Life cycle assessment of sugarcane ethanol and palm oil biodiesel joint production. **Biomass and Bioenergy**, v. 44, p.7079, 2012.

STEIGER, M. G.; RASSINGER, A.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *Aspergillus niger*. **Metabolic Engineering**, v. 52, p. 224-231, 2019.

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, p. 1029-1038, 2018.

TURAN, V.; SCHRÖDER, P.; BILEN, S.; INSAM, H.; JUÁREZ, M. F. D. Co-inoculation effect of *Rhizobium* and *Achillea millefolium* L. oil extracts on growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soil microbial-chemical properties. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.

USDA, United States Department of Agriculture **Citrus: World Markets and Trade**. Foreign Agricultural Service, Washington, p. 13, 2018.

UNREAN, P. Optimized feeding schemes of simultaneous saccharification and fermentation process for high lactic acid titer from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 660-666, 2018.

VANDENBERGHE, L. P.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Microbial production of citric acid. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, p. 263-276, 1999.

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**, p. 1-9, 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*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1-17, 2011.

VASANTHABHARATHI, V.; SAJITHA, N.; JAYALAKSHMI, S. Citric acid production from UV mutated estuarine *Aspergillus niger*. **Advances in Biological Research**, v. 7, p. 89-94, 2013.

VELOSO, M. C. R. A.; PIRES, M. R.; VILLELA, L. S.; SCATOLINO, M. V.; PROTÁSSIO, T. P.; MENDES, L. M.; JÚNIOR, J. B. G. Potential destination of Brazilian cocoa agro-industrial wastes for production of materials with high added value. **Waste Management**. v. 118, p. 36-44, 2020.

VIDAL-ACUÑA, M. R.; RUIZ, M.; TORRES, M. J.; AZNAR, J. Prevalence and in vitro antifungal susceptibility of cryptic species of the genus *Aspergillus* isolated in clinical samples. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 37, p. 296-300, 2019.

VON, B, J. Bioeconomy: the global trend and its implications for sustainability and food security. **Global Food Security**, v. 19, p. 81, 2018.

WANG, B.; LI, H.; ZHU, L.; TAN, F.; LI, Y.; ZHANG, L.; 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, p. 891-899, 2017.

WANG, J.; 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, p. 119315, 2020.

WARD, O. P.; QIN, W. M.; DHANJOON, J.; YE, J.; SINGH, A. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 58, p. 1-75, 2005.

WERPY, T.; PETERSEN, G.; ADEN, A. **Top Value-Added Chemicals from Biomass Department of Energy**, Washington, DC, p. 31 – 33, 2004.

WERLE, L. B.; ABAIDE, E. R.; FELIN, T. H.; KUHN, K. R.; TRES, M. V.; ZABOT, G. L.; KUHN, R. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Gibberellic acid production from *Gibberella fujikuroi* using agro-industrial residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 25, p. 101608, 2020.

YIN, X.; LI, J.; SHIN, H. D.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: advances and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 830-841, 2015.

YIN, X.; SHIN, H. D.; LI, J.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. Comparative genomics and transcriptome analysis of *Aspergillus niger* and metabolic engineering for citrate production. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-16, 2017.

ZHAO, Y.; CHEN, M.; ZHAO, Z.; YU, S. The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens. **Food Chemistry**, v. 185, p. 112-118, 2015.