



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETÍCIA FERNANDA BOSSA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR LINHAGENS DE
*ASPERGILLUS WELWITSCHIAE***

Londrina
2020

LETÍCIA FERNANDA BOSSA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR LINHAGENS DE
*ASPERGILLUS WELWITSCHIAE***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Londrina
2020

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

Bossa, Letícia Fernanda.

PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR LINHAGENS DE *Aspergillus welwitschiae* / Letícia Fernanda Bossa. - Londrina, 2020.
96 f. : il.

Orientador: Daniele Sartori.

Coorientador: Maria Helena Pelegrinelli Fungaro.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Fungo filamentosos - Tese. 2. Ácido orgânico - Tese. 3. Fermentação - Tese. 4. Mutantes - Tese. I. Sartori, Daniele. II. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 66

LETÍCIA FERNANDA BOSSA

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR LINHAGENS DE
*ASPERGILLUS WELWITSCHIAE***

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dr^a. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

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

Prof^a. Dr^a. Fabiana Guillen M. Gasparin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, família e amigos.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

A Capes pelo auxílio concedido.

A Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori pela orientação, apoio e confiança.

À banca de avaliação deste trabalho.

Ao técnico de laboratório, Nelson Janeiro Rodriguez, por todo auxílio prestado no desenvolvimento experimental desse trabalho.

Aos meus pais, Luiz e Elidia, e minha irmã Lilian, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

A todos os meus amigos e em especial ao meu namorado Miguel, por me fortalecerem em momentos difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização e concretização desse trabalho. Meu respeito e gratidão.

BOSSA, Letícia Fernanda. **Produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus welwitschiae***. 2020. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O ácido cítrico (AC), um intermediário do ciclo de Krebs, é encontrado principalmente em frutas cítricas, contudo, também pode ser produzido por microrganismos. Alguns microrganismos se destacam por acumular grandes quantidades de AC, entre estes estão os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Para a produção de AC na indústria biotecnológica, a espécie amplamente utilizada é *Aspergillus niger*, pertencente a seção *Nigri*. Assim como *A. niger*, outras espécies da seção *Nigri*, como *Aspergillus welwitschiae*, possuem potencial para a produção de enzimas hidrolíticas e ácidos orgânicos. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi selecionar e avaliar as melhores condições para produção de AC pelas linhagens de *A. welwitschiae* e obter mutantes. Inicialmente, um total de 24 linhagens de *A. welwitschiae*, isoladas de alho, foram avaliadas quanto à produção de AC em meio Foster. Todas as linhagens produziram AC, no entanto, as linhagens UEL As 20.290 e UEL As 15.262 apresentaram Índice de produção de ácido cítrico significativos, sendo 2,21 e 2,19 respectivamente. Ambas linhagens, foram selecionadas para avaliação dos melhores parâmetros abióticos (temperatura e pH). A melhor condição obtida para produção de AC por ambas as linhagens foi a 35° C e pH 4,2. A partir de linhagens e parâmetros abióticos selecionados, foi realizado cultivo submerso em meio de Prescott e Dunn e a produção de AC foi quantificada e identificada por três metodologias. A linhagem UEL As 20.290, produziu 5,48 g/L, a maior quantidade de AC com 7 dias de fermentação enquanto UEL As 15.262 produziu 10,02 g/L com 10 dias. A linhagem UEL As 15.262 foi selecionada para a obtenção de mutantes para a produção de AC. Posteriormente, duas linhagens mutantes selecionadas produziram maior quantidade de AC com 10 dias de cultivo submerso. Para UEL As 15.262/35 a produção de AC aumentou em 57,48% enquanto para UEL As 15.262/50 houve um acréscimo de 31,74%. Através deste estudo, foi possível selecionar as condições abióticas e linhagens de *A. welwitschiae* produtoras de ácido cítrico, sendo que com a obtenção de mutantes foi possível aumentar a produção do metabólito em 57,48% com relação a linhagem selvagem.

Palavras-chave: fungo filamentosos. Ácido orgânico. Fermentação. Mutantes.

BOSSA, Letícia Fernanda. **Citric Acid Production by *Aspergillus welwitschiae* strains**. 2020. 93 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Citric acid (CA), an intermediate in the Krebs Cycle, is found mainly in citrus fruits, however, it can also be produced by microorganisms. Some microorganisms stand out for accumulating large amounts of CA, among these are the fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. For the production of CA in the biotechnology industry, the widely used species is *Aspergillus niger*, belonging to the *Nigri* section. However, other species in the *Nigri* section, such as *Aspergillus welwitschiae*, have potential for the production of hydrolytic enzymes and organic acids. In this sense, the objective of this study was to select and evaluate the best conditions for the production of CA by *A. welwitschiae* strains and to obtain mutants. Initially, a total of 24 strains of *A. welwitschiae*, isolated from garlic, were evaluated for the production of CA in Foster medium. All strains produced CA, however, the strains UEL As 20.290 and UEL As 15.262 showed significant citric acid production index, being 2.21 and 2.19 respectively. Both strains were selected to evaluate the best abiotic parameters (temperature and pH). The best condition obtained for CA production by both strains was at 35° C and pH 4.2. Based on selected abiotic lines and parameters, submerged cultivation was performed in Prescott and Dunn's medium and CA production was quantified and identified by three methodologies. The UEL As 20.290 strain produced 5.48 g/L, the highest amount of CA with 7 days of fermentation while UEL As 15.262 produced 10.02 g/L with 10 days. The UEL As 15.262 strain was selected to obtain mutants for the production of CA. Subsequently, two selected mutant strains produced a greater amount of CA with 10 days of submerged culture. For UEL As 15.262/35 the production of AC increased by 57.48% while for UEL As 15.262/50 there was an increase of 31.74%. Through this study, it was possible to select the abiotic conditions and strains of *A. welwitschiae* that produce citric acid, and by obtaining mutants it was possible to increase the production of the metabolite by 57.48% in relation to the wild strain.

Keywords: Filamentous fungus. Organic acid. Fermentation. Mutants.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Sequência de reações do ciclo do ácido cítrico14

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Figure 1 - Kinetics of citric acid production in Foster (A) and Prescott and Dunn (B) medium by UEL As 15.262 and UEL As 20.290 strains under Submerged Fermentation. Citric acid concentration was determined by titration method46

Figure 2 - Survival Curve of *Aspergillus welwitschiae* UEL As 15.262 strain exposed to ultraviolet light (UV) for 60 minutes at 5 minutes intervals. The numbers on the points represent percentage of CFUs47

Figure 3 - Kinetics of citric acid production in Prescott and Dunn medium by UEL As 15.262 (wild), by UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50 (mutants) strains.....47

APÊNDICE

Figure 1 - Citric acid production by *Aspergillus welwitschiae* strains in Foster medium at 28 °C in 96 hours.....90

Figure 2 - Response surface of pH and temperature variation tests for UEL As 15.262 strain (A) and UEL As 20.290 strain (B) in Foster médium91

Figure 3 - HPLC detection and quantification of citric acid produced by strains under Submerged Fermentation in Prescott and Dunn medium. The retention time for citric acid was approximately 9.4 minutes. A) Citric acid standard (50 mg/L); B) UEL As 15.262 strain on the tenth day; C) UEL As 20.290 strain on the seventh day; D) UEL As 15.262/35 mutant strain on the tenth day E) UEL As 15.262/50 mutant strain on the tenth day92

Figure 4 - Citric acid production in different abiotic factors by UEL As 15.262 strain in Foster médium.....93

Figure 5 - Citric acid production in different abiotic factors by UEL As
20.290 strain in Foster médium.....93

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Aplicações industriais do ácido cítrico	16
Tabela 2 - Empresas brasileiras produtoras de ácido cítrico.....	17
Tabela 3 - Variações na produção de ácido cítrico por diferentes linhagens de <i>A. niger</i> e condições abióticas.....	19
Tabela 4 - Codificação das variáveis para delineamento de temperatura e pH em modelo fatorial	25

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Table 1 - Central Rotational Composite Design by <i>A. welwitschiae</i> strains	44
Table 2 - Production of citric acid by <i>Aspergillus welwitschiae</i> strains isolated from garlic	44
Table 3 - Production of citric, gluconic and oxalic acid by <i>Aspergillus welwitschiae</i> in eight and ten days of submerge fermentation	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	12
1.1.1	Objetivo Geral.....	12
1.1.2	Objetivos Específicos	12
2	DESENVOLVIMENTO	13
2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1.1	Aspectos Gerais do Ácido Cítrico	13
2.1.2	Produção de Ácido Cítrico	16
2.1.3	Principais Espécies de Aspergillus Produtores de Ácido Cítrico	20
2.1.4	Aspergillus Welwitschiae	22
2.1.5	Mutação Induzidas Por UV Welwitschiae	23
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.2.1	Material Biológico	24
2.2.2	Seleção de Linhagens de Aspergillus Welwitschiae Quanto à Produção de Ácido Cítrico	24
2.2.3	Seleção de Condições Abióticas Adequadas à Produção de Ácido Cítrico	25
2.2.4	Cinética da Produção de Ácido Cítrico Por Aspergillus Welwitschiae em Fermentação Submersa	25
2.2.5	Identificação e Quantificação de Ácido Cítrico	27
2.2.6	Seleção de Mutantes de A. Welwitschiae Para Produção de Ácido Cítrico	27
2.2.7	Cinética da Produção de Ácido Cítrico Pela Linhagem Selvagem e Mutante de Aspergillus Welwitschiae em Fermentação Submersa	28
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
2.3.1	Artigo Científico 1	28
2.3.2	Artigo Científico 2	48
2.3.3	Artigo Científico 3	61
3	CONCLUSÃO	76

REFERÊNCIAS.....77

APÊNDICES.....90

1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um intermediário fundamental do ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico. Este ácido orgânico é utilizado nos mais diversos segmentos industriais como produção de bebidas, conservas, geleias, doces e produtos lácteos. Dentre as suas diversas propriedades, este ácido pode ser utilizado como agente acidulante, flavorizante, tamponante, quelante de metais, emulsificante, antioxidante, entre outras finalidades.

Este ácido orgânico é encontrado em grandes quantidades em frutas cítricas, mas também é produzido por microrganismos. Desses últimos, alguns deles se destacam por permitir o acúmulo de grandes quantidades de ácido cítrico, como por exemplo os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo a espécie *Aspergillus niger*, a mais utilizada na indústria.

Com relação a produção de ácido cítrico, alguns fatores interferem no acúmulo deste produto como os fatores abióticos: as fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, aeração, oligoelementos e o método fermentativo utilizado para a produção. Além disso, o fator biótico, a linhagem de microrganismos utilizada, também é considerada de grande importância para a produção de ácido cítrico.

Aspergillus niger destaca-se na área biotecnológica por sua capacidade de produção de enzimas extracelulares, de compostos como antibióticos e outros ácidos orgânicos. Devido ao seu potencial produtivo e sua tradicional utilização industrial, algumas linhagens são reconhecidas com o *status* GRAS (Geralmente Reconhecida como Segura). Contudo, a espécie *A. niger* abriga também linhagens produtoras de micotoxinas.

Sabe-se da importância de se ter linhagens seguras para a produção dos mais diversos metabólitos. Visto que o ácido cítrico é um composto que possui as mais diversas aplicações, sua produção deve atender padrões de segurança para garantir uma utilização sem riscos à saúde humana. Além disso, poucas linhagens recebem o *status* GRAS, por esse motivo há a necessidade da disponibilização de novas linhagens produtoras de ácido cítrico.

A espécie *A. niger*, pertence a seção *Nigri*, a qual abriga espécies muito similares. Nesta seção, é encontrado um grupo de espécies morfológicamente indistinguíveis, denominadas de “agregado niger”, onde está abrigado *A. niger* e *A.*

welwitschiae (antigamente denominada *A. awamori*). Esta última, é muito utilizada industrialmente e que também contém linhagens produtoras de micotoxinas.

Relatos recentes demonstraram haver total associação entre produção de ocratoxina A e fumonisina B2 e a presença dos genes envolvidos em linhagens de *A. welwitschiae*. Entretanto, o mesmo não é totalmente válido para estes mesmos genes em algumas linhagens de *A. niger*, quanto à produção de fumonisina B2. Sabendo disso, Vanzela et al. (2020), identificaram e caracterizaram linhagens de *A. welwitschiae*, quanto ao potencial de produção de ambas as micotoxinas.

As linhagens de *A. welwitschiae* utilizadas nesse estudo, não contém os genes relacionados com a produção das micotoxinas citadas anteriormente. Assim, não haveria a necessidade de se realizar qualquer procedimento de edição gênica para torná-las seguras, acarretando na economia de custos. Ademais, parâmetros abióticos quanto à melhor produção de ácido cítrico foram selecionados e analisados, bem como a obtenção de linhagens mutantes para que ocorresse um acréscimo da produção.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Selecionar linhagens e parâmetros adequados à produção ácido cítrico, por linhagens de *A. welwitschiae* e obter mutantes.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar linhagens de *A. welwitschiae*, com melhor potencial à produção de ácido cítrico;
- Selecionar condições abióticas adequadas para produção de ácido cítrico;
- Quantificar a produção de ácido cítrico pelas linhagens selecionadas em fermentação submersa;
- Obter mutantes para produção de ácido cítrico e comparar a produção com a linhagem selvagem;

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Aspectos Gerais do Ácido Cítrico

A descoberta do ácido cítrico se deu pelo alquimista islâmico Abu Musa Jabir ibn Hayyan, no século oito depois de Cristo. Posteriormente, em 1784, o químico sueco Carl Wilhelm Scheele conseguiu isolar e cristalizar o ácido a partir do suco de limão. Somente em meados do século XIX, essa molécula teve a produção industrial iniciada na Inglaterra (SANTOS, 2005; FRANÇA, 2016; CIRIMINNA et al., 2017).

No ano de 1893, o botânico alemão Wehmer descobriu que o fungo *Citromyces* - atualmente denominado de *Penicillium* - conseguia acumular ácido cítrico em meio contendo açúcar e sais orgânicos (CIRIMINNA et al., 2017). O químico americano Currie, em 1916, verificou que algumas condições favoreciam a produção de ácido cítrico por linhagens de *A. niger*, tais como: cultivo em meio com alta concentração de açúcar, sais minerais e pH de 2,5 a 3,5 (COSTA, 2011; TONG et al., 2019).

Sua molécula, segundo a nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC em inglês), chama-se ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, de fórmula química $C_6H_8O_7$. É um ácido orgânico fraco, de peso molecular 192,13 g/mol, contendo três grupos funcionais de ácido carboxílico. Sua aparência é um sólido branco e cristalino (MAX et al., 2010; COSTA, 2011; SHOW et al., 2015; TONG et al., 2019).

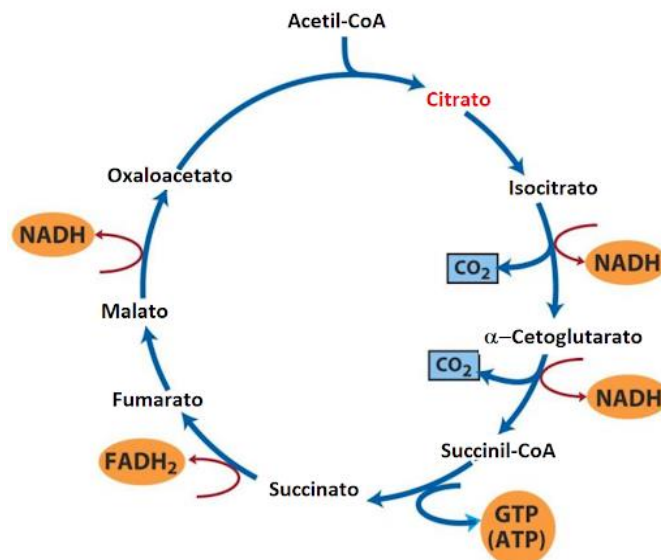
O ácido cítrico é um intermediário fundamental do Ciclo de Krebs, também chamado de ciclo do ácido tricarboxílico ou de ciclo do ácido cítrico (COSTA, 2011; NELSON e COX, 2011; VOET e VOET, 2013; AKRAM, 2014). Essa série de reações químicas, foram descobertas por Hans Krebs, em 1937 (PUNTEL, 2008).

O ciclo de Krebs é uma importante rota metabólica, pois é o ponto central do metabolismo de várias biomoléculas como carboidratos, proteínas e ácidos graxos. Compreende um total de oito reações, sendo que três delas são pontos de regulação (NELSON e COX, 2011, VOET e VOET, 2013; AKRAM, 2014; TONG et

al., 2019). A figura 1 ilustra os mecanismos regulatórios do ciclo de Krebs em eucariotos.

Os pontos de regulação do ciclo de Krebs, estão altamente relacionados ao acúmulo de produtos intermediários, dentre os quais o ácido cítrico. O primeiro ponto de regulação do ciclo, diretamente ligado ao acúmulo de ácido cítrico é realizado pela enzima *citrato sintase*, que catalisa a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato formando citrato. A atividade enzimática é estimulada pela adenosina difosfato (ADP), enquanto a inibição ocorre por retroalimentação negativa do produto (citrato), NADH e adenosina trifosfato (ATP) (SHEPHERD et al., 1969; SCAINI et al., 2011; AKRAM, 2014).

Figura 1: Sequência de reações do ciclo do ácido cítrico



Fonte: Nelson e Cox, 2011

Ainda não foi estabelecido o mecanismo sobre como ocorre o acúmulo de ácido cítrico no meio de cultivo, porém algumas hipóteses já foram relatadas. Segundo Wayman e Matthey (2000), existem evidências de pelo menos dois transportadores de glicose, sendo que este açúcar seria transportado para dentro da célula através de difusão passiva.

Além disso, em *A. niger* foi relatada a presença de uma invertase extracelular (KUBICEK-PRANZ et al., 1990). A entrada de glicose seria realizada neste caso a partir da hidrólise de sacarose, a principal fonte de carbono utilizada para produção de ácido cítrico (ANGUMEENAL AND VENKAPPAYYA, 2013).

Posteriormente, o oxaloacetato utilizado para a síntese deste ácido deve vir do citosol para a mitocôndria. Isso porque a enzima piruvato carboxilase se encontra no citosol, então o oxaloacetato é reduzido a malato, pela malato desidrogenase citosólica, entrando assim nas mitocôndrias através do antiporte malato-citrato (KUBICEK, 1988; BERCOVITZ et al. 1990; JAKLITSCH et al. 1991).

Outra hipótese explorada em *A. niger* está ligada com a exportação de citrato da mitocôndria. Neste caso o transportador de tricarboxilato compete diretamente com a enzima aconitase por citrato, sendo que, se as condições favorecerem sua atividade resultaria em uma maior exportação de citrato das mitocôndrias para o citosol (TORRES, 1994).

O próximo passo, dependente da formação de citrato, é a utilização do citrato pela *aconitase*, para produzir o isocitrato. Um importante detalhe da composição desta enzima é que ela possui um centro ferro-enxofre em seu sítio ativo, que atua tanto na ligação do substrato, quanto na catálise (NELSON e COX, 2011; VOET e VOET, 2013; AKRAM, 2014). Kubicek e Röhr, ao avaliarem os cofatores Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} , verificaram que a utilização do íon Cu^{2+} pela *aconitase*, favoreceu a produção de ácido cítrico, enquanto os outros dois íons diminuíram a produção (KUBICEK E RÖHR, 1985; ACOSTA, 1994; DIAS, 2018).

Posteriormente no segundo ponto de regulação está a enzima *isocitrato desidrogenase*, que efetua a descarboxilação do isocitrato, produzindo α -cetoglutarato e NADH. A atividade enzimática é regulada pela disponibilidade de ATP, íons cálcio (Ca^{+2}), ADP e adenosina monofosfato (AMP) (PAPANICOLAOU e AGGELIS, 2011; SILVA, 2016; SOUZA, 2016). Esta enzima utiliza o íon manganês (Mn^{+2}) como cofator, sendo que altas concentrações desse metal afetam negativamente o acúmulo de citrato (BOWES e MATTEY, 1979; SANTAMARIA, 2008; GUIMARÃES, I. M. S. R. G., 2015; KRONBAUER, 2019).

Assim como cofatores, diversos fatores bióticos e abióticos interferem no acúmulo do ácido cítrico e conseqüente desenvolvimento do ciclo de Krebs. A partir de informações acerca da produção de ácido cítrico por microrganismos, este produto passou a ser produzido e comercializado em grande escala, sendo aplicado em diversos segmentos industriais.

A aplicação industrial do ácido, atualmente atinge grande espectro, como: na produção de bebidas como agente acidulante, flavorizante, além de apresentar propriedades tamponantes; na produção de conservas como agente quelante de

metais; na produção de geleias e doces controlando o pH; na agricultura auxiliando na disponibilização de fósforo para as plantas; em produtos lácteos atuando como emulsificante, agente acidificante e antioxidante, entre outras finalidades, como pode ser observado na Tabela 1 (SOCCOL et al., 2006; PATEL, et al., 2017; VANDENBERGHE et al., 2017; TONG et al., 2019, NATARAJ et al., 2020).

Tabela 1: Aplicações industriais do ácido cítrico

Local de aplicação	Propriedades
Bebidas	Acidulante, flavorizante e estabilizador de pH
Alimentos	Emulsificante, acidificante, antioxidante
Indústria farmacêutica	Flavorizante; Preparações efervescentes; Agente tamponante; Na forma de citrato de potássio tem propriedades diuréticas; Na forma de citrato, pode quelar íons Ca^{+2} e atuar como anticoagulante sanguíneo
Biomedicina	Reticular fibras de proteínas ultrafinas
Produtos de limpeza	Em detergentes, quela íons Ca^{+2} e Mg^{+2} que confere dureza a água
Agricultura	Aumento da disponibilidade de fósforo para as plantas
Biorremediação	Agente quelante que sequestra metais pesados, incluindo isótopos radioativos, facilitando também a remoção de compostos orgânicos hidrofóbicos
Embalagens ecológicas	Reticular polióis para filmes biodegradáveis

Fonte: O próprio autor

2.1.2 Produção de Ácido Cítrico

O ácido cítrico é um dos metabólitos microbianos mais produzidos no mundo. Em 2018, mais de 2 milhões de toneladas de ácido cítrico foram produzidas pelo mercado global. Há previsões de que o mercado global de produção de ácido cítrico, atinja um volume de aproximadamente 3 milhões de toneladas até 2024, com uma taxa de crescimento de 4% durante o período de 2019-2024 (CISION, 2019; REUTERS, 2019).

Algumas empresas de destaque do mercado global de ácido cítrico e suas respectivas sedes são: Archer Daniels Midland (ADM) e Cargill dos Estados Unidos; Jungbunzlauer da Suíça; Tate & Lyle da Inglaterra; Cofco Biochemical (Anhui), Huangshi Xinghua Biochemical Co. Ltd, RZBC Group Co. Ltd. e Weifang Ensign

Industry Co., Ltd. da China; Gadot Biochemical Industries Ltd. de Israel; S.A. Citrique Belge N.V. da Bélgica (REUTERS, 2019; MARKETWATCH, 2019).

Algumas dessas grandes empresas produtoras de ácido cítrico apresentam unidades no Brasil. Em São Paulo estão localizadas as sedes da Cargill e da Tate & Lyle, sendo que a primeira ainda possui uma planta fabril na cidade de Uberlândia (MG), considerada a maior produtora de ácido cítrico no país (CARGILL, 2018). Paralelamente à produção multinacional, há indústrias brasileiras que produzem ácido cítrico competitivamente ao mercado mundial, como ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2: Empresas brasileiras produtoras de ácido cítrico

Empresas produtoras de ácido cítrico	Localização
Vertical Química Representações Ltda	São Paulo (SP)
Aksell Química Ltda	Indaiatuba (SP)
Branfertil Agro Industrial Ltda	Ribeirão Preto (SP)
Brasilquímica Indústria e Comércio Ltda	Batatais (SP)
Neon Comercial Ltda	São Paulo (SP)
Datsman Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda	Atibaia (SP)
Agrária Indústria e Comércio Ltda	Jardinópolis (SP)
Cadisa Indústria e Comércio Ltda	Diadema (SP)
Tecnosyn Tecnologia em Sínteses Ltda	Cajamar (SP)
Sweetmix Indústria, Comércio, Importação e Exportação Ltda	Sorocaba (SP)
JHF Comércio e Indústria de Produtos Químicos Ltda	Rio de Janeiro (RJ)
Saporiti do Brasil Ltda	Pinhais (PR)

Fonte: O próprio autor

O processo fermentativo é o mais utilizado na fabricação industrial de ácido cítrico, representando mais de 90% da produção mundial. Majoritariamente, são utilizados três métodos para a produção desse ácido: processo Koji, fermentação em superfície e fermentação submersa (DHILLON et al., 2011; COSTA, 2014; ADUDU et al., 2019).

O processo Koji, também conhecido como fermentação em estado sólido ou fermentação semi-sólida, pode ser definido com o processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. Neste caso, a água presente se encontra ligada à fase sólida (RAIMBAULT, 1998).

A fermentação submersa é o método mais utilizado pela indústria. Ela consiste no crescimento do microrganismo no meio de cultivo sobre agitação constante. Neste caldo fermentativo, encontra-se nutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismo e posterior produção do metabólito de interesse. A fermentação em superfície se difere da submersa por não conter a agitação durante o processo, assim o crescimento do microrganismo ocorre sobre a superfície do caldo fermentado (GIBBS et al., 2000).

Concomitante ao processo fermentativo, como dito anteriormente, fatores bióticos e abióticos adequados, são essenciais para a produção de ácido cítrico. Como fatores abióticos podem ser destacados fonte de carbono, pH, nitrogênio, fosfato, aeração, concentração de oligoelementos (DHILLON et al., 2011; OZDAL, & KURBANOGLU, 2019; ADUDU et al., 2019).

A fonte de carbono mais utilizada para produção de ácido cítrico é a sacarose ao invés da glicose, sendo que sua concentração pode variar de 10-22%. O pH inicial deve ser ácido, na faixa entre 2-4, para evitar a produção de outros ácidos orgânicos como o ácido oxálico e ácido glucônico (FOSTER, 1949; PAPAGIANNI, 2007; MAX et al., 2010).

As fontes de nitrogênio podem ser inorgânicas como ureia, ou orgânicas como extrato de levedura, sais de amônio e como fonte de fosfato o KH_2PO_4 (OZDAL, & KURBANOGLU, 2019). Oligoelementos como os metais ferro (Fe^{+2}), manganês (Mn^{+2}), zinco (Zn^{+2}) e cobre (Cu^{+2}) devem constituir o meio de cultivo em concentrações diminutas (ppm ou mg), sendo a fermentação conduzida em aerobiose (LOTFY et al., 2007).

Com relação ao fator biótico de principal influência na produção deste ácido, tem-se o microrganismo que será utilizado no processo. O ácido cítrico pode ser encontrado naturalmente em frutas cítricas, porém grande parte do composto é produzido através de fermentações utilizando microrganismos (OZDAL, & KURBANOGLU, 2019).

Alguns microrganismos se destacam na produção de ácido cítrico. Segundo Amato e colaboradores (2020), a produção desse metabólito pode ser realizada por diversos fungos e leveduras como *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *A. clavatus*, *Penicillium luteum*, *P. citrinum*, *Mucor piriformis*, *Candida guilliermondii*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Trichoderma viride*. Dentre os listados, o mais estudado

e utilizado na indústria é o *Aspergillus niger* (MAX et al, 2010; STEIGER et al., 2019; ROUKAS et al., 2020).

Tabela 3: Variações na produção de ácido cítrico por diferentes linhagens de *A.*

Microrganismo utilizado	Condições de cultivo	Produção de ácido cítrico	Temperatura	pH	Tempo de cultivo	Referência bibliográfica
<i>A. niger</i>	FS: Melaço de beterraba + peptona	64,40 g/L	30° C	6,0	7 dias	OZDAL & KURBANOGLU, 2019
<i>A. niger</i>	FS: Filtrado de farinha de milho + glucoamilase	173,2 g AC/L	35° C	2,1	3,5 dias	WANG et al., 2017
<i>A. niger</i>	FES: Bagaço de cana de açúcar	103 mg/L	25° C	-	4 dias	FRANÇA, 2016
<i>A. niger</i> CGMCC 5751	FS em biorreator: Meio de milho liquefeito + antimicina A	151,67 g AC/L	35° C	-	4 dias	WANG et al., 2015
<i>A. niger</i>	FS: Meio de Prescott e Dunn + peptona + (NH ₄) ₂ SO ₄	62,9 g/L/dia	30° C	-	1 dia	PASTORE et al., 2011
<i>A. niger</i> LPB BC	Sacarose (216g/L)	476,1 g AC /Kg de PC	30° C	5,5	4 dias	RODRIGUES, 2006
<i>A. niger</i> LPB B6 Mutada	FES: PC + mel de cana	616,5 g AC /Kg de PC				
<i>A. niger</i> 10v10	FS: Hidrolisado hemicelulósico + K ₄ [Fe(CN) ₆]	14,28 g AC/L	30° C	6,0	1 dia	SANTOS, 2005
<i>A. niger</i> ATCC 9642	FSS: Soro de leite + 15% de sacarose	106,5 g/L	30° C	3,0	16 dias	EL-HOLI and ALDELAIM, 2003

niger e condições abióticas.

*FS: Fermentação submersa; FES: Fermentação em estado sólido; PC: Farelo de Polpa Cítrica Peletizado; FSS: Fermentação submersa de superfície

Fonte: O próprio autor

Com a utilização de linhagens aptas ao acúmulo de ácido cítrico, bem como condições abióticas adequadas é possível a obtenção de quantidades significativas de AC. Diversas fontes de carbono já foram relatadas para produção, como em Wang et al. (2017) utilizando farinha de milho, obtiveram produção de 173,2 g/L de ácido cítrico. Com o melaço de beterraba foi possível produzir 64,40 g/L (OZDAL, & KURBANOGLU, 2019). Utilizando sacarose como fonte de carbono foi gerado 69,2 g/L/dia (PASTORE et al., 2011).

Por outro lado, outros estudos relatam menor produção de ácido cítrico, como 25,87 g/L (NASRIN et al., 2017); 8,85 g/L (MUNIZ et al., 2014); 11,24 g/L (ADUDU et al., 2019) e 10,8 g/L (KOLICHESKI E SOCCOL (1995). Os trabalhos citados utilizaram linhagens de *A. niger*, cujas condições bióticas podem variar em função do genótipo, além das variações abióticas citadas. A Tabela 3, demonstra a variação da produção de ácido cítrico, frente a diversas linhagens de *Aspergillus niger* e condições abióticas.

2.1.3 Principais Espécies de *Aspergillus* Produtores de Ácido Cítrico

Fungos filamentosos, como os do gênero *Aspergillus*, possuem grande importância econômica, pois são utilizados amplamente em fermentações na área biotecnológica para produção de várias enzimas extracelulares, antibióticos e ácidos orgânicos. Como exemplo, tem-se a produção dos ácidos cítrico e glucônico por *A. niger* e o ácido itacônico por *A. terreus* (AJALA et al., 2016; KRULL et al., 2017; ROUKAS et al., 2020).

O gênero *Aspergillus* está agrupado no filo *Ascomycota*, pertencente a classe *Eurotiomycetes*, dentro da ordem *Eurotiales* e da família *Aspergillaceae* (HOUBRAKEN & SAMSON, 2011; SAMSON et al., 2014). Morfologicamente algumas espécies do gênero apresenta conidióforos, ou seja, uma estrutura formada por uma haste que termina na forma de vesícula esférica sobre a qual se desenvolvem os conídios. As colônias podem exibir diferentes colorações como branco, amarelado, verde, marrom e preto dependendo da espécie (PITT et al., 2000)-

Com o auxílio de caracteres morfológicos e bioquímicos, juntamente com dados moleculares, a taxonomia polifásica, o gênero foi subdividido em seções, segundo semelhanças dos caracteres citados. Assim, a taxonomia do gênero e consequentemente seções estão sob constante atualização.

Uma das seções de grande importância econômica, é a seção *Nigri*, por abrigar espécies bastante utilizadas na indústria, como *A. niger*. A mais recente atualização envolvendo a seção *Nigri*, foi realizada por Samson et al. (2014). Os autores estabeleceram para o gênero *Aspergillus*, 20 seções e quatro subgêneros sendo eles *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes*.

Aspergillus seção *Nigri*, ficou abrigada no subgênero *Circumdati*. No entanto, após a atualização realizada por Samson et al (2014), novas espécies pertencentes à seção foram descritas, totalizando 28 espécies (SAMSON et al. 2014; FUNGARO et al. 2017; TSANG et al., 2018).

Pertencente à seção *Nigri*, existe um grupo de espécies com características morfológicas muito similares que são denominados de “agregado niger”, o qual se localiza as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus welwitschiae* (PERRONE et al., 2011; PALUMBO & O’KEEFFE, 2014; SAMSON et al. 2014; MASSI et al., 2016; SUSCA et al., 2016). *Aspergillus welwitschiae* é proveniente da reclassificação da espécie *Aspergillus awamori*, comumente utilizado na indústria biotecnológica para produção de enzimas (PERRONE et al., 2011; NISHIDA et al., 2018; ADEDEJI et al., 2019).

Em contraste, algumas espécies da seção *Nigri* e até mesmo do agregado niger, como é o caso de *A. niger* e *A. welwitschiae*, podem produzir micotoxinas. Essas últimas, são metabólitos secundários prejudiciais à saúde humana e animal. As duas principais micotoxinas produzidas por ambas espécies são a Ocratoxina A e Fumonisina B2 (ABARCA et al., 1994; FRISVAD et al., 2007).

As linhagens de *A. niger*, atualmente utilizadas em condições industriais, receberam o status GRAS (Generally Regarded as Safe) do inglês “Geralmente Reconhecida como Segura”, pelo órgão de fiscalização dos EUA o Food and Drug Administration (FDA) (NIELSEN et al., 2009; SUSCA et al., 2014).

É conhecido que o potencial de produção de ambas as micotoxinas é linhagem específica e embora ainda não seja elucidada a via de produção destas micotoxinas, Massi et al. (2016), desenvolveram um sistema de PCR multiplex associado à produção de ocratoxina A e fumonisina B2. Com este sistema, os autores conseguiram associar genótipo com produção de ambas as micotoxinas.

Nesta metodologia a associação é totalmente positiva para *A. welwitschiae*, ou seja, se a PCR multiplex acusar a presença dos genes, a linhagem é micotoxigênica, do contrário, se houver a ausência dos genes, é confirmada a não toxicidade para as duas micotoxinas. Já para as linhagens de *A. niger* a produção de fumonisina B2 essa associação não é 100% acertiva para Fumonisina B2 (MASSI et al., 2016).

Considerando que linhagens micotoxigênicas não podem ser industrialmente utilizadas devido ao seu risco a saúde, torna-se de grande importância identificar as

linhagens não produtoras de micotoxinas de *A. welwitschiae* aptas à produção de compostos de interesse industrial e desenvolvê-las para uso comercial.

2.1.4 *Aspergillus welwitschiae*

Como dito anteriormente, *Aspergillus welwitschiae* é o novo nome de reclassificação do antes nomeado *Aspergillus awamori*. Este último é relatado sendo um bom produtor de enzimas como: amilases (KARAM et al., 2017), β -glucosidase (NISHIDA et al., 2018), glucanases (LIU et al., 2020), além do seu papel como probiótico e de melhorar a digestão de carboidratos e proteínas (SALEH et al., 2017; ABD EL-MONEIM et al., 2019). Os produtos processados por ou contendo *A. awamori* foram reconhecidos como seguro pela Food and Drug Administration dos EUA (SALEH et al., 2017).

Dentre os estudos recentes com *A. welwitschiae*, há vários artigos que trazem a avaliação do potencial de produção das micotoxinas Ocratoxina A e Fumonisina B2, sendo que as linhagens do fungo foram isoladas das mais diferentes fontes como café, cacau, bulbos de cebolas, alho e diversos outros produtos (MASSI et al., 2014; GHERBAWY et al., 2015; VON HERTWIG, 2015; MASSI et al., 2016; SUSCA et al., 2016; VANZELA et al., 2020).

Outros estudos relatam a presença de *A. welwitschiae* no solo (PALUMBO E O'KEEFFE, 2014) e em ambientes internos (VARGA et al., 2014); como patógeno de sementes de mostarda (HANIF et al., 2016); como agente etiológico do Sisal (DUARTE et al., 2018).

As linhagens de *A. welwitschiae* utilizadas neste estudo, foram coletadas por Vanzela et al. (2020) em amostras de alho de doze estados brasileiros (Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Bahia, São Paulo, Amazonas, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Goiás, Paraíba e Minas Gerais). Foi realizado o isolamento, identificação e verificação do genótipo com relação a produção ou não de micotoxinas (VANZELA et al., 2020), sendo utilizadas somente as linhagens não micotoxigênicas para a produção de ácido cítrico.

2.1.5 Mutação Induzidas por UV

O termo mutação se refere a qualquer alteração no material genético que possa ser transmitida para novos indivíduos ou linhagens celulares, ou seja, seus descendentes ALBERTS et al. (1994). Os mutagênicos utilizados para seleção de novos microrganismos são divididos em químicos e físicos. Dentre os mutagênicos físicos podem ser encontradas as radiações ionizantes como os raios alfa, beta, gama e X. Além disso, existe o grupo das radiações não-ionizantes sendo seu principal representante a luz ultravioleta (UV) (RODRIGUES, 2006).

Os raios UV são facilmente absorvidos pelas purinas e pirimidinas, sendo que estas últimas após a exposição ficam mais reativas ou no estado excitado. A absorção máxima de UV pela molécula de DNA ocorre no comprimento de onda de 254 nm. (RODRIGUES, 2006). É conhecido que esta radiação possui efeitos genotóxicos que podem desencadear os seguintes processos: Produzir danos ao DNA, induzir mutações e causar o desenvolvimento de tumores (IKEHATA E ONO, 2011).

A genotoxicidade pode ser desenvolvida através da via indireta mediada por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Neste caso, a luz UV induz um estresse oxidativo nas células e a formação de EROs, sendo que estas últimas atacam o DNA e podem produzir danos nas bases nitrogenadas, formando por exemplo a 8-hidroxi guanina ou ainda podendo causar o rompimento das cadeias (KIELBASSA et al., 1997). Por outro lado, pela via direta, a luz UV produz danos específicos ao DNA, como dímeros de pirimidina, ou seja, duas bases de pirimidina são justapostas em conjunto na sequência nucleotídica do DNA através do mecanismo fotoquímico (MARKOVITSI et al., 2010; IKEHATA E ONO, 2011).

Nem todas as células possuem a mesma sensibilidade com relação a radiação UV. Para realização de mutação induzida por radiação UV em fungos, por exemplo, o tempo de exposição à radiação varia de acordo com a espécie do microrganismo. Para determinar o tempo de exposição a UV para o fungo é realizada a curva de sobrevivência. Nesta técnica pretende-se verificar a influência do tempo de exposição com a sobrevivência do microrganismo. Pelo fato de *A. niger*, por exemplo, possuir esporos de coloração escura, a proteção deste fungo contra UV é maior quando comparado com um fungo de coloração clara e por este motivo, o tempo de exposição a radiação precisa ser maior (RODRIGUES, 2006).

O processo de mutagênese com radiação UV foi realizado com o propósito de se obter linhagens melhoradas geneticamente. Assim, linhagens seguras quanto a produção de micotoxinas e melhoradas foram obtidas para serem avaliadas quanto a melhor produção de ácido cítrico.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Material Biológico

Um total de 24 linhagens de *A. welwitschiae*, isoladas de amostras de alho coletados em 12 estados brasileiros, foram utilizadas neste estudo. As linhagens foram previamente isoladas e identificadas por Vanzela et al. (2020) quanto ao genótipo limitante para a produção de Ocratoxina A e Fumonisina B₂.

2.2.2 Seleção de Linhagens de *A. Welwitschiae* Quanto à Produção de Ácido Cítrico

As linhagens de *A. welwitschiae* foram avaliadas quanto à produção de ácido cítrico (AC), em meio Foster (1949). O meio tem em sua composição (por litro): 5 g de glicose; 1 g de peptona; 1 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄; 15 g de ágar e 65 mL de solução de Verde de Bromocresol. Para a solução de Verde de Bromocresol tem-se: 0,5 g de verde de bromocresol; 7 mL de NaOH 0,1 N; completar o volume para 130 mL com água e armazenar em local escuro. O meio de cultivo teve seu pH ajustado para 5,0. Em cada placa foi vertido 20 mL de meio de cultivo. As linhagens foram inoculadas pontualmente em placas de Petri e incubadas a 28° C por 96 horas. Foi realizado um delineamento em blocos casualizados com 3 blocos e 3 réplicas para cada linhagem. Após esse período, a produção de AC foi avaliada de acordo com Hankin e Anagnostakis (1975) (com modificações), nas quais o Índice de Produção de Ácido Cítrico (CARI em inglês) é expresso medindo a relação entre o diâmetro do halo + colônia e o diâmetro do crescimento da colônia.

2.2.3 Seleção de Condições Abióticas Adequadas à Produção de Ácido Cítrico

Para a avaliação das condições abióticas em relação a produção de ácido cítrico, foram selecionadas as linhagens significativas quanto a produção. Foi realizado o inóculo no centro da placa de Petri, contendo meio de Foster (1949). A interferência da temperatura (28 °C a 42 °C) e pH (4,2 a 9,8) foram avaliadas conforme o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), ou seja, modelo fatorial 2² com adição de três pontos centrais e axiais, descrito na Tabela 4. As placas foram incubadas por 96 horas, com triplicatas para cada linhagem. Após o período de incubação, a produção de AC foi avaliada conforme Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações. Os dados gerados nos itens 2.2.2 e 2.2.3 foram analisados utilizando o programa R (R CORE TEAM, 2019).

Tabela 4: Codificação das variáveis para delineamento de temperatura e pH em modelo fatorial

Ensaio*	Variáveis decodificadas		Variáveis codificadas	
	Temperatura °C (X ₁)	pH (X ₂)	X ₁	X ₂
1	30	5	-1	-1
2	30	9	-1	1
3	35	7	0	0
4	35	7	0	0
5	35	7	0	0
6	40	5	1	-1
7	40	9	1	1
8	35	4,2	0	-1,4
9	35	9,8	0	1,4
10	28	7	-1,4	0
11	42	7	1,4	0

* Os ensaios foram aleatorizados

2.2.4 Cinética da Produção de Ácido Cítrico Por *A. welwitschiae* em Fermentação Submersa

Inicialmente uma suspensão de 10⁷ de conídios foi inoculada em erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultivo. As linhagens selecionadas no item 2.2.2 e os parâmetros abióticos do item 2.2.3, foram utilizados para avaliação da

cinética de produção do ácido cítrico, sob fermentação submersa em dois meios de cultura:

- Meio Foster (1949): Como descrito anteriormente, foi utilizado sem a adição de ágar e de Verde de bromocresol em sua composição;
- Meio de Prescott e Dunn com modificações (1959): Foi utilizado como descrito em Pastore et al. (2011). (Composição em g/L: 50 g de sacarose; 5 g de peptona; 5 g de sulfato de amônio; 1 g NH_4NO_3 ; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,23 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2% de ágar ao meio)

Para ambos meios de cultivos, a fermentação submersa ocorreu nas condições abióticas selecionadas em cultivo sólido, por meio do modelo fatorial (item 2.2.3). Assim, as condições de inóculo com os meios de Foster e Prescott e Dunn ocorreram nos seguintes parâmetros: temperatura de 35° C; pH 4; 10^7 conídios; 100 rpm por 8 dias de cultivo. Foram realizadas duplicatas experimentais para cada dia de cultivo, sendo que cada duplicata foi retirada no seu respectivo tempo de fermentação e o extrato bruto foi obtido por filtração, para posterior detecção e quantificação do ácido cítrico.

2.2.5 Identificação e Quantificação de Ácido Cítrico

A identificação e quantificação de ácido cítrico produzido pelas linhagens selecionadas, foi determinada por três métodos: Titulometria, Piridina-anidrido acético e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A avaliação de ácido cítrico foi realizada pela titulação de 10 mL da amostra com uma solução de NaOH 1 M contendo o indicador fenolftaleína segundo o protocolo do Instituto Adolfo Lutz (2008).

O ácido cítrico também foi estimado por espectrofotômetro, utilizando o 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 adicionado 5,70 mL de anidrido acético e incubado em banho-maria a 32° C \pm 0,25 por 30 min. A detecção do ácido cítrico foi determinada posteriormente 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 ácido cítrico

anidro 99,5% (Cinética Produtos Químicos). A identificação e quantificação do ácido cítrico pela piridina–anidrido acético foi realizada somente com amostras em que foi detectada maior produção de ácido cítrico por titulometria.

Outra forma de determinação de ácido cítrico foi por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O extrato bruto foi filtrado com membrana de 0,22 µm (Millex-GV, Merck). Ácidos orgânicos foram separados em coluna Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm (Biorad, USA) a 50° C, utilizando 5 mM de H₂SO₄ como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min e detectada por UV em A_{210nm} conforme o protocolo da Bio-Rad (BIO-RAD, 2012). A quantificação do ácido foi verificada com o auxílio da curva padrão nas concentrações de 20 mg/mL a 130 mg/mL, utilizando ácido cítrico anidro 99,5% (Cinética Produtos Químicos). Essa metodologia foi utilizada para a verificação da produção de ácido cítrico somente no melhor dia de cultivo submerso.

2.2.6 Seleção de Mutantes de *A. welwitschiae* Para Produção de Ácido Cítrico

A linhagem UEL As 15.262 foi a escolhida para se obter mutantes a partir da exposição a luz ultravioleta (UV), visto que ela é boa produtora tanto de enzimas quanto de ácido orgânico. Uma suspensão de esporos 10² conídios foi plaqueada em meio Foster e, em seguida, as placas de Petri contendo os conídios foram expostos à luz UV Ecolume 15W a uma distância de 62 cm.

O período de incubação foi realizado nos tempos de 15 a 60 minutos, com intervalos de 5 minutos, e posteriormente, as placas foram incubadas por 96 horas a 28°C. Durante as 96 horas de incubação, foi efetuada a contagem de colônias nos respectivos tempos, para verificação da curva de sobrevivência.

Concomitantemente, foram selecionados mutantes para a produção de ácido cítrico por meio da formação de halo com coloração amarela, decorrente da acidez do meio de cultivo. Os mutantes selecionados foram submetidos a avaliação da estabilidade da mutação. Foram avaliadas oito gerações em meio de Foster, com incubação de 96 horas a 28°C, com auxílio do Índice de produção de ácido cítrico.

2.2.7 Cinética da Produção de Ácido Cítrico Pela Linhagem Selvagem e Mutante de *A. welwitschiae* em Fermentação Submersa

A cinética de produção de ácido cítrico foi verificada a partir de fermentação submersa com o meio de Prescott e Dunn, durante 12 dias, em duplicata, conforme as condições estabelecidas no item 4.5: temperatura de 35° C; pH 4; concentração de 10⁷ conídios; 100 rpm por 12 dias de cultivo. O extrato bruto foi utilizado para identificação e quantificação de ácido cítrico segundo o item 2.2.5.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico:

Artigo 1: Citric Acid Production by *Aspergillus welwitschiae* strains

Artigo 2: Ácido cítrico: um enfoque molecular

Artigo 3: Resíduos agroindustriais para produção de produtos biotecnológicos

2.3.1 Artigo Científico 1

BOSSA, Leticia Fernanda. **Citric Acid Production by *Aspergillus welwitschiae* strains**. 2020. 19 pp. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

Citric Acid Production by *Aspergillus welwitschiae* strains

Abstract

Some microorganisms stand out for allowing the accumulation of large amounts of CA in the culture medium, such the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. In the biotechnology industry, for the production of CA, the widely used species is *Aspergillus niger*, belonging to the *Nigri* section. However, other species in the *Nigri* section, such as *Aspergillus welwitschiae*, have the potential to produce hydrolytic enzymes and organic acids. In this sense, the objective of this study was to select and evaluate the best conditions for CA production by *A. welwitschiae* strains and to obtain mutants. Initially, a total of 24 strains of *A. welwitschiae* were evaluated for CA production in the Foster medium. All strains produced CA, and the UEL As 20.290 and UEL As 15.262 strains showed significant Citric acid rate index (CARI), 2.21 ± 0.2 and 2.19 ± 0.23 , respectively. All strains produced CA, however, the strains UEL As 20.290 and UEL As 15.262 showed significant citric acid production index, being 2.21 and 2.19 respectively. Both strains were selected to evaluate the best abiotic

parameters (temperature and pH). The best condition obtained for CA production by both strains was at 35° C and pH 4.2. Based on selected abiotic lines and parameters, submerged cultivation was performed in Prescott and Dunn's medium and CA production was quantified and identified by three methodologies. The UEL As 20.290 strain produced 5.48 g/L, the highest amount of CA with 7 days of fermentation while UEL As 15.262 produced 10.02 g/L with 10 days. The UEL As 15.262 strain was selected to obtain mutants for the production of CA. Subsequently, two selected mutant strains produced a greater amount of CA with 10 days of submerged culture. For UEL As 15.262/35 the production of AC increased by 57.48% while for UEL As 15.262/50 there was an increase of 31.74%. Through this study, it was possible to select the abiotic conditions and strains of *A. welwitschiae* that produce citric acid, and by obtaining mutants it was possible to increase the production of the metabolite by 57.48% in relation to the wild strain.

Keywords: Filamentous fungus, organic acid, fermentation, mutants

1. INTRODUCTION

The citric acid is a compound found mainly in citrus fruits and can be produced by microorganisms. This molecule is used in various products in the beverage, food, pharmaceutical, fertilizer and other industries (SOCCOL et al., 2006; ABBAS et al., 2016; CIRIMINA et al., 2017). The submerged fermentative process is the most widely used in the industrial manufacture of citric acid, but this metabolite can be produced by three methods: Koji process, surface fermentation and submerged fermentation (DHILLON et al., 2011; COSTA, 2014; ADUDU et al., 2019).

Regarding the production of citric acid, some abiotic factors interfere with the accumulation of this product, such as sources of carbon and nitrogen, pH, temperature, aeration, trace elements and the fermentative method used for production. In addition, the biotic factor, the lineage of microorganisms used, is also considered of great importance for the production of citric acid (MAGALHÃES et al., 2019; ADUDU et al., 2019; OZDAL, & KURBANOGU, 2019).

Since the year 2000, successive growths have occurred in the citric acid market worldwide (SHOW et al., 2015). The production of this compound is carried out by some microorganisms, such as *Aspergillus* and *Penicillium*, and with

Aspergillus niger it is possible to obtain a greater production of this acid (MAX et al., 2010, AUTA et al., 2014).

Aspergillus niger has been standing out in the biotechnological area for its varied production of extracellular enzymes, compounds such as antibiotics and other organic acids. Due to its productive potential, some strains of this species have received the GRAS status (Generally Recognized as Safe), since the species hosts some mycotoxin-producing strains (NIELSEN et al., 2009; SUSCA et al., 2014).

The species *A. niger*, belongs to the section *Nigri*, which houses very similar species. In this section, we find a group of morphologically indistinguishable species, called “*niger* aggregate”, where *A. niger* and *A. welwitschiae* (formerly called *A. awamori*) are housed, also widely used industrially and also containing mycotoxin-producing strains (PERRONE et al., 2011; SAMSON et al. 2014; MASSI et al., 2016).

There is a need in the market for new strains of citric acid that do not produce toxins since the strain used by the industry is imported and at a high cost. Thus, this study investigated strains of *Aspergillus welwitschiae*, for the production of citric acid, verifying the best abiotic conditions and the genetic improvement of the strains.

MATERIAL AND METHODS

2.1 Biological material

A total of 24 *A. welwitschiae* strains isolated from garlic samples collected in 12 Brazilian states were used in this study. The strains were previously isolated and identified by Vanzela et al. (2020) as the limiting genotype for the production of Ochratoxin A and Fumonisin B2.

1.2 Selection of *A. welwitschiae* strains for citric acid production

The *A. welwitschiae* strains were evaluated for citric acid (CA) production from Foster medium (1949). The medium has in its composition (g/L): 5 g of glucose; 1 g peptone; 1 g of KH₂PO₄; 0.5 g MgSO₄; 15 g agar, 65 mL of Bromocresol Green solution and pH 5.0. For the Bromocresol Green solution, the composition is: 0.5 g bromocresol green; 7 mL 0.1 N NaOH; Make up to 130 mL with water and store in a dark place. The strains were inoculated punctually in Petri dishes and incubated at 28°C for 96 hours. The experimental design was carried out according to a

randomized block design with 3 blocks and 3 replicates for each strain. After this period, CA production was evaluated according to Hankin and Anagnostakis (1975) (with modifications), in which the Citric acid rate index (CARI) is expressed by measuring the relationship between halo + colony diameter and colony growth diameter.

2.3 Selection of suitable abiotic conditions for citric acid production

The strains with significant CARI were selected. The inoculum occurred in the center of the Petri dish, containing Foster medium (1949). The interference of temperature (28 °C to 42 °C) and pH (4.2 to 9.8) were evaluated according to the Central Rotational Composite Design (DCCR), that is, a factorial model 2^2 with the addition of three central points and axial points, described in Table 1. Plates were incubated for 96 hours with triplicates for each strain. After the incubation period, CA production was evaluated according to Hankin and Anagnostakis (1975), with modifications. The data generated in items 2.2 and 2.3 were analyzed using the R program (R CORE TEAM, 2019).

2.4 Kinetics of citric acid production by *A. welwitschiae* in submerged fermentation

Initially 10^7 conidia/mL was inoculated in 250 mL erlenmeyer flasks containing 25 mL of culture medium. The strains selected in items 2.2 and 2.3 were used to evaluate citric acid production kinetics under submerged fermentation in two culture media:

- Foster medium (1949): As previously described, it was used without the addition of Bromocresol Green solution and agar in its composition;
- Modified Prescott and Dunn medium (1959): Composition in g/L: 50 g sucrose; 5 g peptone; 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 g NH_4NO_3 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0.23 g MgSO_4 . 7 H_2O ; 0.2% agar;

For both medium, the submerged fermentation occurred under the abiotic conditions selected in solid culture (item 2.3). Thus, inoculum conditions with Foster and Prescott and Dunn occurred under the following conditions: temperature of 35

°C; pH 4; 10^7 conidia; 100 rpm for 8 days of cultivation. Experimental duplicates were performed for each day of cultivation, and each duplicate was removed at its respective fermentation time and the crude extract was obtained by filtration for subsequent detection and quantification of citric acid.

2.5 Identification and quantification of citric acid

Identification and quantification of citric acid production of selected strains submitted to kinetics, was determined by three methods: Titrometry, Pyridine-Acetic Anhydride and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The evaluation of citric acid was performed by titrating 10 mL of the sample with a 1M NaOH solution containing the phenolphthalein indicator according to the protocol of the Adolfo Lutz Institute (2008).

Citric acid was also estimated gravimetrically using the Pyridine-Acetic Anhydride method described by Marrier and Boulet (1958). To 1 mL of crude extract, 1.30 mL of pyridine was added and stirred rapidly. To this mixture was added 5.70 mL of acetic anhydride and incubated in a water bath at $32\text{ °C} \pm 0.25$ for 30 min. Detection of citric acid was determined after $A_{405\text{nm}}$. The quantification of the acid was verified with the aid of the standard curve at concentrations from 100 $\mu\text{g/mL}$ to 1000 $\mu\text{g/mL}$ using 99.5% anhydrous citric acid (Kinetic Chemicals).

Another form of citric acid determination was by High Performance Liquid Chromatography. The crude extract was filtered with 0.22 μm membrane (Millex-GV, Merck). Organic acids were separated on a 300 x 7.8 mm Aminex HPX-87H column (Biorad, USA) at 50 °C using 5 mM mobile phase H_2SO_4 at a flow rate of 0.6 mL/min and detected by UV at $A_{210\text{nm}}$ according to Bio-Rad protocol (BIO-RAD, 2012). Acid quantification was verified using the standard curve at concentrations of 5 mg/mL to 130 mg/mL using 99.5% anhydrous citric acid (Kinetic Chemicals). This methodology was used to verify citric acid production only on the best day of submerged cultivation. For the other acids, a standard concentration curve between 5 mg/mL to 100 mg/mL was performed using 99% gluconic acid (Sigma-Aldrich) and 98% oxalic acid (Acros Organics).

2.6 Obtaining and selection *A. welwitschiae* mutants

The UEL As 15.262 strain was chosen to obtain mutants from exposure to ultraviolet light (UV), as it is a good producer of both enzymes and organic acid. A spore suspension of 10^2 conidia was plated in Foster medium, and then the Petri dishes containing the conidia were exposed to 15W Ecolume UV light at a distance of 62 cm. The incubation period was performed at 15 to 60 minutes, with intervals of 5 minutes, and later, the plates were incubated for 96 hours at 28 °C. During the 96 hours of incubation, colony counts were performed at the respective times, to verify the survival curve. At the same time, mutant Colony Forming Unit (CFU) with higher citric acid (CARI) production were selected. The selected mutants were subjected to mutation stability assessment. Eight generations were evaluated in Foster medium, with incubation 96 hours at 28 °C, with the aid of Citric acid rate index.

2.7 Kinetics of citric acid production by wild and mutant *A. welwitschiae* strains

The kinetics of citric acid production was verified from submerged fermentation with Prescott and Dunn medium, in duplicate, according to the conditions established in item 2.4: temperature of 35 °C; pH 4; 10^7 conidia; 100 rpm for 12 days. The crude extract was used for identification and quantification of citric acid according to item 2.5.

3. RESULTS

3.1 Screening and selection of parameters for citric acid production by *A. welwitschiae* strains

Assays were performed with 24 strains of *A. welwitschiae* to verify the production of citric acid (CA) in medium described by Foster (1949). All strains evaluated were CA producers, but UEL As 20.290 and UEL As 15.262 presented significant Citric acid rate index (CARI), with 2.21 ± 0.23 and 2.19 ± 0.20 , respectively (Table 2). Regarding the diameter of the colonies there was no significant difference between the strains.

So, the UEL As 20.290 and UEL As 15.262 were selecting for further analysis. The CCRD of the UEL As 20.290 strain showed the higher citric acid production at 35 °C and pH 4.2 resulting in an CARI of 2.39, while the UEL As 15.262 strain the higher production of citric acid was at 40 °C and pH 5, with CARI 2.8. However, temperature of 40 °C would not be viable in the industry. Thus, for the UEL As 15.262 strain, the

temperature of 35 °C and pH 4.2 was also selected, where the CARI of 2.33 was found, and both strains can be evaluated under the same condition (Table 1).

3.2 Kinetics of citric acid production by *A. welwitschiae*

The UEL As 15.262 and UEL As 20.290 strains were cultivated according parameter selected in CCDR, in two culture medium, Foster and Prescott and Dunn under submerged fermentation for eight days.

In the Foster medium, for both strains, the production of citric acid reaches the highest concentration after 24 hours and remains constant until day five (Figure 1). The highest citric acid production was evaluated by titration (1.6 g/L for both strains), pyridine - acetic anhydride (UEL As 15.262: 0.029 g/L; UEL As 20.290: 0.038 g/L) and HPLC (below detection limit for both strains). The biomass range, from the first to the last day of cultivation, was 0.030 – 0.108 grams for the UEL As 15.262 and 0.030 – 0.066 grams for UEL As 20.290.

In the Prescott and Dunn medium the citric acid production, for both strains, began at the same day (day 1) however, the higher production was reached at eighth day for UEL As 15.262 and seventh day for UEL As 20.290 (Figure 1). The highest citric acid production was evaluated by titration (UEL As 15.262: 7.36 g/L; UEL As 20.290: 8.01 g/L), pyridine - acetic anhydride (UEL As 15.262: 4.93 g/L; UEL As 20.290: 4.23 g/L) and HPLC (UEL As 15.262: 5.61 g/L; UEL As 20.290: 5.48 g/L). The biomass range, from the first to the last day of cultivation, was 0.193 – 0.534 grams for the UEL As 15.262 and 0.193 – 0.467 grams for UEL As 20.290.

In order to increase the production of citric acid, the UEL As 15.262 strain was selected for obtain mutants, since according to previous group data, this strain has potential for enzyme production as well.

3.3 Selection of *A. welwitschiae* mutants for citric acid production

The survival curve of UEL As 15.262 to UV light showed that often 60 minutes, only 2.5% of the Colony Forming Units (CFUs) remained viable (Figure 2). The UEL As 15.262 mutants with the highest potential for citric acid production were obtained with UV light exposures within 35 to 50 minutes.

These mutants were selected for evaluation of mutation stability for 8 generations. The UEL As 15.262 mutants that were more stable were those obtained with UV light exposure for 35 and 50 minutes (UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50) with CARI of 2.66 and 1.95, respectively. So, both mutants (UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50) were selected to produce citric acid under submerged conditions in Prescott and Dunn medium.

3.4 Kinetic of the citric acid production by *A. welwitschiae* wild and mutants strains

The kinetics of citric acid production performed for 12 days showed that initial metabolite production occurred on the first day for the wild strain (UEL As 15.262) and mutants strains (UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50). The production of citric acid declined from day 11 for all strains analysed, but for UEL As 15.262/35 a less marked decline was observed (Figure 3).

The highest citric acid production for UEL As 15.262, UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50 occurred at tenth day. The quantification assessment for UEL As 15.262, UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50 by titration was 13.27 g/L, 16.01 g/L and 15.37 g/L, respectively. By the pyridine-acetic anhydride method, the amount of citric acid was 7.17 g/L, 14.87 g/L and 11.97 g/L for the strains UEL As 15.262, UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50, in that order.

Through HPLC, the detection of citric acid for UEL As 15.262, UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50 was 10.02 g/L, 15.78 g/L and 13.20 g/L, respectively. The range of biomass, from the first to the last day of cultivation, was 0.193 – 0.5144 grams for the UEL As 15.262; 0.106 – 0.506 grams for the UEL As 15.262/35 and 0.190 – 0.657 grams for UEL As 15.262/50.

In addition, during fermentation other acids were found in smaller quantities, being oxalic and gluconic acid, as illustrated in Table 3. For wild strains, production of oxalic acid (UEL As 15.262: 1.6 g/L; UEL As 20.290: 2.3 g/L) and gluconic acid (UEL As 15.262: 1.1 g/L; UEL As 20.290: 2.4 g/L) occurred until the eighth day of cultivation. When cultivation was carried out at ten days, the UEL As 15.262 (wild) and UEL As 15.262/35 (mutant) strain didn't produce either acid, but the UEL As 15.262/50 strain, produced both acids (oxalic: 1.3 g/L; gluconic: 1.6 g/L).

4. DISCUSSION

The production of citric acid in Foster medium is a screening used in some studies for the selection of strains with the best production potential of this acid (RODRIGUES et al. 2009; OZDAL AND KURBANOGLU 2018; CHALFON et al. 2019). In this study, the production of citric acid obtained by *Aspergillus welwitschiae* strains (UEL As 15.262 – CARI 2.19 and UEL As 20.290 – CARI 2.21), is similar to the CARI obtained by *A. niger* strains (RODRIGUES et al. 2009; OZDAL AND KURBANOGLU 2018).

The best combination of temperature and pH found for the most producing strains, UEL As 15.262 and UEL As 20.290, occurred at a temperature of 35 °C and pH 4.2. Works such as those by Wang et al. (2015 and 2017) and Yu et al. (2018) report the same production temperature using *A. niger* in submerged fermentation. Other temperatures, ranging from 25 °C to 55 °C, have already been reported for the production of citric acid (PASTORE et al., 2011; AUTA et al., 2014; PAPADAKI and MANTZOURIDOU, 2019).

Regarding the pH factor, studies show different optimization conditions, where the initial pH of the culture medium varies between 2.1 to 5 (LOTFY et al., 2007; FRISVAD et al., 2011; WANG et al., 2017; ADUDU et al., 2019). According to Max et al. (2010), the production of citric acid occurs at acidic pHs, this value being less than 2, reducing contamination by other microorganisms and inhibiting the production of other acids. The best pH for production used in this work was reported in the literature, as mentioned above.

For the verification of metabolite production in Submerged Fermentation, two media were selected. As Foster medium wasn't a good inducer for citric acid production, another culture medium was researched in the literature. In works such as those by Papagianni (2007), Max et al. (2010) and Show et al. (2015), it was described that the best carbon source for citric acid production would be sucrose in high concentrations.

As reported by Angumeenal and Venkappayya (2013), for the production of citric acid the following sugar sources are used: sucrose, glucose, fructose and lactose, with the highest production occurring with sucrose and the lowest with lactose. The highest production with sucrose is due to an extracellular invertase, found in *A. niger*, that rapidly hydrolyzes sugar at low pH (KUBICEK-PRANZ et al.,

1990). Therefore, the other medium tested was the Prescott and Dunn (1959), where a good production of citric acid was obtained, and the sugar source was sucrose.

The production of citric acid by submerged fermentation, varies according to the nutritional sources and microorganisms used and the works report very different values. In this study, the highest citric acid production was 10.02 g/L obtained by the UEL As 15.262 strain (wild) in ten days of cultivation.

In the work of Kolicheski and Soccol (1995), the production of 10.8 g/L in eight days of fermentation process was reported. In more recent studies, the largest production of citric acid occurred on the seventh day with 11.24 g/L, (ADUDU et al., 2019), 21.2 g/L in three days of cultivation (MIRGHANI et al., 2019) and 15.51 g/L in two days of fermentation (AYENI et al., 2019).

In all the mentioned works, (KOLICHESKI and SOCCOL, 1995; ADUDU et al., 2019; AYENI et al., 2019; MIRGHANI et al.; 2019) *Aspergillus niger* was used for the production of citric acid and the wide use of this species can be correlated with the good production of this organic acid.

In order to increase the production of citric acid, the UEL As 15.262 strain was selected for mutants obtention, since according to previous data, this strain has potential for enzyme production as well. The best mutants obtained were those with 35 and 50 minutes UV exposure. The acid yield obtained by these mutants was 15.78 g/L for UEL As 15.262/35 and 13.20 g/L for UEL As 15.262/50.

There are reports in works of varied citric acid production, with mutant obtained by different techniques: 86.1 g/L (IKRAM-UL et al., 2001), 42-50 g/L (IKRAM-UL et al., 2004), 70-80 g/L (HU et al., 2017), 130 g/L (RAJOKA et al., 2018), 130.8 g/L (ZHANG et al., 2019). From these results, it can be seen that the production of citric acid is also varied according to the carbon source used and the mutants generated in each work.

Regarding the production of other acids in the culture medium, in addition to citric acid, other articles reports that at 40 °C the production of oxalic acid is favored while the accumulation of citric acid decreases (SRIVASTA AND KAMAL, 1979; AMER et al., 1999). It has also been reported the synthesis of other acids can occur in small quantities such as succinic, malic and fumaric (IKRAM-UL et al., 2001; IKRAM-UL et al., 2004).

In the study by Niu et al. (2016), the strains showed production of gluconic and oxalic acids, in addition to citric acid. In this work, it was observed that the same

three acids were produced. However, with ten days of cultivation, the strains UEL As 15.262 and UEL As 15.262/35 did not produce oxalic and gluconic acids, while UEL As 15.262/50, decreased production. Among the strains mentioned, UEL As 15.262/35 was the one that obtained a cleaner chromatographic profile, indicating a lower production of other metabolites that were not of interest.

In conclusion, this paper reports that strains of *A. welwitschiae* have the potential to produce citric acid. The mutation process provided a powerful organism for the production of citric acid, the UEL As 15.262/35 strain, since it does not produce other acids such as gluconic and oxalic, obtaining the best chromatographic profile and increasing production by more than 50%. Further studies are needed to optimize other fermentative parameters and increase production.

REFERENCES

ABBAS, N.; SAFDAR, W.; ALI, S.; CHOUDHRY, S.; SANA ELAHI, S. Citric acid production from *Aspergillus niger* using Mango (*Mangifera indica L.*) and Sweet orange (*Citrus sinensis*) Peels as substrate. **International Journal of Scientific and Engineering Research**, vol. 7, nº 2, p. 868–872, 2016.

ADOLFO LUTZ INSTITUTE. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1ª ed. digital, p. 1020, 2008.

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**, vol. 19, p. 557-564, 2019.

AMER, R. A.; SALAMA, O. M.; BELEH, M. A. Production and purification of citric acid by *Aspergillus niger*. **Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 13, p. 57-60, 1999.

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

AUTA, H. S.; ABIDOYE, K. T.; TAHIR, H.; IBRAHIM, A. D.; ARANSIOLA, S. A. Citric acid production by *Aspergillus niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp. **International Scholarly Research Notices**, p. 1-8, 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**, vol. 13, nº 1, p. 88–96, 2019.

BIO-RAD. **Cromatography Aminex® HPLC Colluns**. Bulletin 6333, p. 1-4, 2012. Disponível em: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6333.pdf. Acesso em: 15 set. 2019.

CHALFOUN, S. M.; ANGÉLICO, C. L.; RESENDE, M. L. V.; MORAES, G. E. Selection of fungal isolates with potential for phosphate solubilization and formulation of inoculant for coffee crops. **Coffee Science**, Lavras, vol. 14, nº 3, p. 315 - 325, 2019.

CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, vol. 11, nº 1, 2017.

COSTA, L. M. A. S.; SOUZA, S. M. C.; ABREU, P. S.; BASTOS, C. V.; NASCIMENTO, M. N.; MALLETT, A. C. T. Citric acid production and citrate synthase genes in distinct strains of *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, vol. 13, nº. 22, p. 2220–2226, 2014.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. **Food Bioprocess Technology**, vol. 4, nº 4, p. 505–529, 2011.

FOSTER, J. W. Chemical activities of fungi. **Academic Press, Inc.**, New York, p. 1-648, 1949.

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**, vol. 6, nº 8, 2011.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HU, W.; LI, W.; CHEN, H.; LIU, J.; WANG, S.; CHEN J. Changes in transcript levels of starch hydrolysis genes and raising citric acid production via carbon ion irradiation mutagenesis of *Aspergillus niger*. **PLoS One**, vol. 12, nº 6, 2017.

IKRAM-UL, H; KHURSHID, S.; ALI, S.; ASHRAF, H.; QADEER, M. A.; RAJOKA, M. I. Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 17, nº 1, p. 35-37, 2001.

IKRAM-UL, H.; ALI, S.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. **Bioresource Technology**, vol. 93, nº 2, p. 125–130, 2004.

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**, vol. 13, nº. 2, 1995.

KUBICEK-PRANZ, E. M.; MOZELT, M.; RÖHR, M.; KUBICEK, C. P. Changes in the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, vol. 1033, nº 3, p. 250–255, 1990.

LOTFY, W.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, vol. 98, nº 18, p. 3470–3477, 2007.

MAGALHÃES, N.; CAVALCANTE, A. V.; ANDRADE, L. S.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G.; PESSOA, K. A. R. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, vol. 24, nº 1, p. 101-107, 2019.

MARRIER, J. R.; BOULET, M. Direct determination of citric acid in milk with an improved, pyridine acetic anhydride method. **Journal of Dairy Science**, vol. 41, nº 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**, vol. 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**, vol. 41, nº 4, p. 862–875, 2010.

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**, vol. 2, nº 1, p. 47–55, 2019.

NIELSEN, K.F., MOGENSEN, J.M., JOHANSEN, M., LARSEN, T.O., FRISVAD, J.C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 395, p. 1225–1242, 2009.

NIU, J.; ARENTSHORST, M.; NAIR, P. D. S.; DAI, Z.; BAKER, S. E.; FRISVAD, J. C.; NIELSEN, K. F.; PUNT, P. J.; RAM, A. F. J. Identification of a classical mutant in the industrial host *Aspergillus niger* by systems genetics: LaeA is required for citric acid production and regulates the formation of some secondary metabolites. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, vol. 6, nº 1, p. 193-204, 2016.

OZDAL, M., & KURBANOGU, E. B. Citric acid production by *Aspergillus niger* from AgroIndustrial ByProducts: Molasses and chicken feather peptone. **Waste and Biomass Valorization**, 2018.

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

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, vol. 25, nº 3, p. 244–263, 2007.

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**, vol. 13, nº 3, 2011.

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**, vol. 115, n° 11, p. 1138–1150, 2011.

RAJOKA, M. I.; NAWAZ, M.; MEHMOOD, M. A.; LIU, C. G.; RAHIMUDDIN, S. A.; IFTIKHAR, T. A semi-pilot-scale study to produce citric acid from hydrol using a mutant of *Aspergillus niger*. **Pakistan Journal of Botany**, vol. 50, n° 6, p. 2377-2383, 2018.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2019.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P.; TEODORO, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Improvement on citric acid production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LPB BC mutant using citric pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 158, n° 1, p. 72-87, 2009.

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

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.; VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 59, p. 426 – 435, 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**, vol. 8, n° 3, p. 271-283, 2015.

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

SRIVASTA, K.; KAMAL, S. Citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, vol. 19, p. 145–149, 1979.

SUSCA, A.; MORETTI, A.; STEA, G.; VILLANI, A.; HAIDUKOWSKI, M.; LOGRIECO, A.; MUNKVOLD, G. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. *International Journal of Food Microbiology*, v. 188, p. 75–82, 2014.

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.

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**, vol. 40, n° 6, p. 891–99, 2017.

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**, vol. 14, n° 1, p. 7, 2015.

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**, vol. 276–277, p. 1-9, 2018.

ZHANG, N.; JIANG, J. C.; YANG, J.; WEI, M.; ZHAO, J.; XU, H.; XIE, J. C.; TONG, Y. J.; YU, L. Citric acid production from acorn starch by Tannin Tolerance Mutant *Aspergillus niger* AA120. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 188, n° 1, p. 1–11, 2019.

Table 1: Central Rotational Composite Design by *A. welwitschiae* strains

Essay*	Variables		CARI **	
	Temperature (°C)	pH	UEL As 20.290	UEL As 15.262
1	30	5	2.13	2.02
2	30	9	1.26	1.2
3	35	7	1.47	1.48
4	35	7	1.48	1.56
5	35	7	1.53	1.45
6	40	5	2.18	2.8
7	40	9	1.25	1.49
8	35	4.2	2.39	2.33
9	35	9.8	1.16	1.13
10	28	7	1.61	1.59
11	42	7	2.12	2.14

*The essays were randomized.

**Citric acid rate index means obtained in triplicate essays with Petri dishes containing Foster medium incubated in different combinations for 96 hours. In bold are the best abiotic conditions in which the selected strains presented the highest CARI values.

Table 2: Production of citric acid by *Aspergillus welwitschiae* strains isolated from garlic

Strains	CARI ± SD*	Groups	Strains	CARI ± SD*	Groups
UEL As 20.290	2.21 ± 0.23	A	UEL As 6.136	1.61 ± 0.15	B
UEL As 15.262	2.19 ± 0.20	A	UEL As 28.430	1.57 ± 0.13	B
UEL As 11.225	1.84 ± 0.09	B	UEL As 34.462	1.57 ± 0.03	B
UEL As 1.05	1.83 ± 0.09	B	UEL As 27.397	1.56 ± 0.17	B
UEL As 12.233	1.72 ± 0.13	B	UEL As 28.422	1.54 ± 0.24	B
UEL As 6.144	1.72 ± 0.09	B	UEL As 26.365	1.54 ± 0.05	B
UEL As 25.348	1.69 ± 0.16	B	UEL As 12.247	1.53 ± 0.12	B
UEL As 29.432	1.69 ± 0.11	B	UEL As 32.459	1.52 ± 0.07	B
UEL As 28.245	1.68 ± 0.12	B	UEL As 7.200	1.52 ± 0.12	B
UEL As 2.14	1.67 ± 0.13	B	UEL As 28.411	1.51 ± 0.19	B
UEL As 27.405	1.66 ± 0.04	B	UEL As 24.323	1.50 ± 0.12	B
UEL As 7.182	1.62 ± 0.16	B	UEL As 11.228	1.50 ± 0.02	B

*CARI: Citric acid rate index; SD: Standard deviation. CARI means obtained in randomized block trials. Different letters indicate significant differences at 5% significance level according to Tukey's test. In bold are the strains selected for having the highest values of CARI. Analysis was performed in experimental triplicate and Petri dishes containing Foster medium were incubated at 28 °C for 96 hours.

Table 3: Production of citric, gluconic and oxalic acid by *Aspergillus welwitschiae* in eight and ten days of submerge fermentation

Fermentation Strain	8 days			10 days		
	CA*	GA**	OA***	CA*	GA**	OA***
UEL AS 20.290	5,48 g/L	2,4 g/L	2,3 g/L	-	-	-
UEL AS 15.262	5,61 g/L	1,1 g/L	1,6 g/L	10,02 g/L	-	-
UEL AS 15.262/35	-	-	-	15,78 g/L	-	-
UEL AS 15.262/50	-	-	-	13,20 g/L	1,3 g/L	1,6 g/L

*Citric acid; **Gluconic acid; ***Oxalic acid.

Production carried out in submerged fermentation with Prescott and Dunn medium. The quantification illustrated was performed using the High performance liquid chromatography methodology.

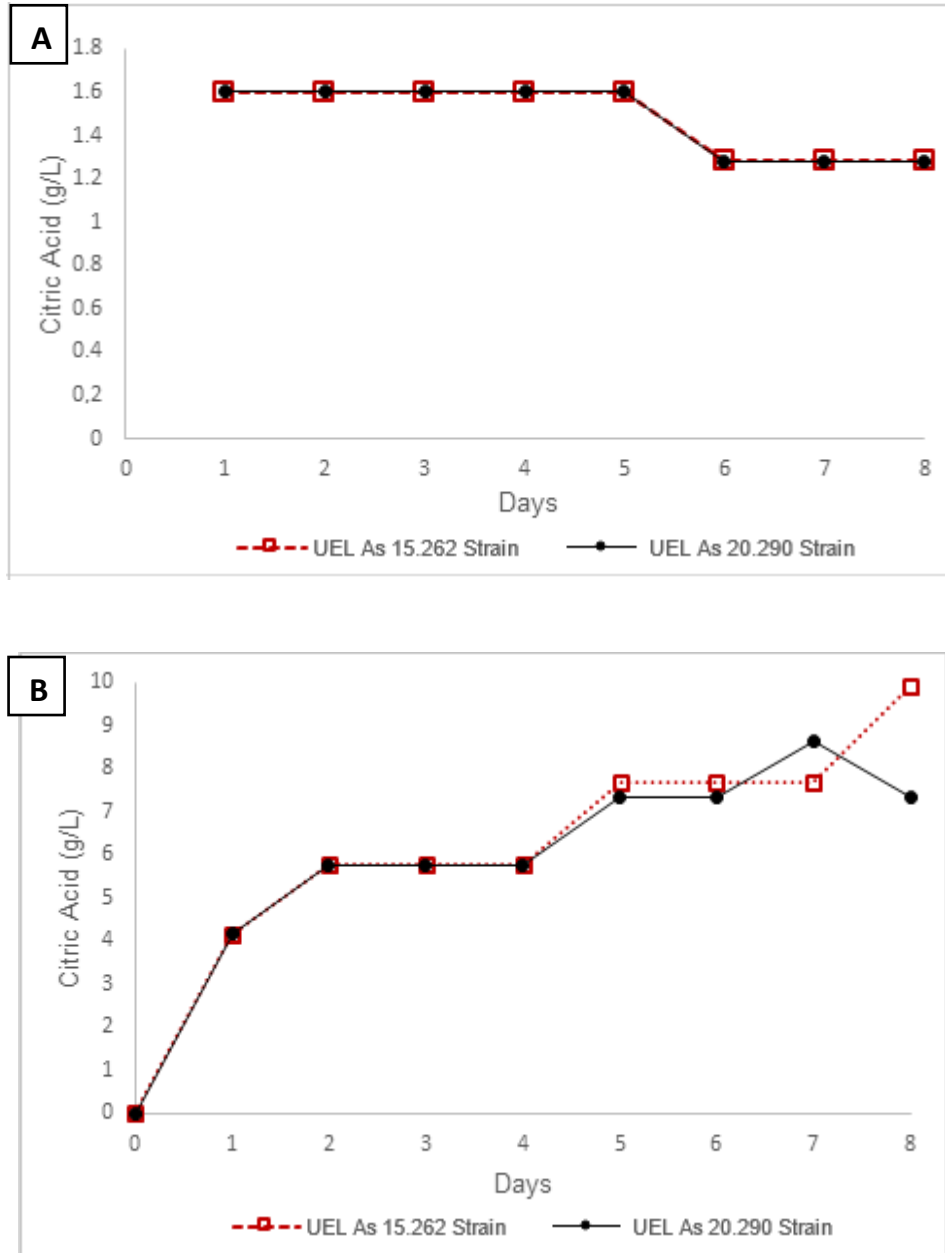


Figure 1: Kinetics of citric acid production in Foster **(A)** and Prescott and Dunn **(B)** medium by UEL As 15.262 and UEL As 20.290 strains under Submerged Fermentation. Citric acid concentration was determined by titration method.

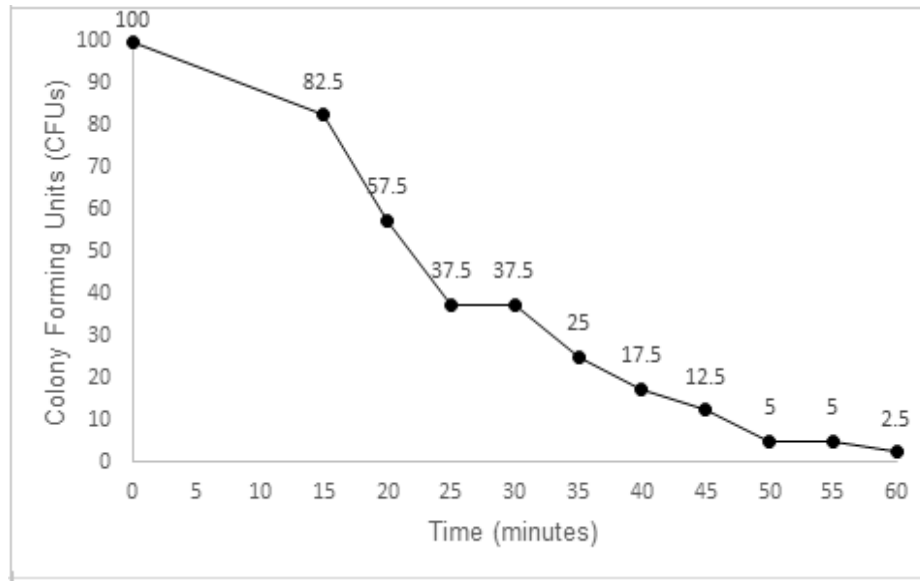


Figure 2: Survival curve of *Aspergillus welwitschiae* UEL As 15.262 strain exposed to ultraviolet light (UV). The numbers on the points represent percentage of CFUs.

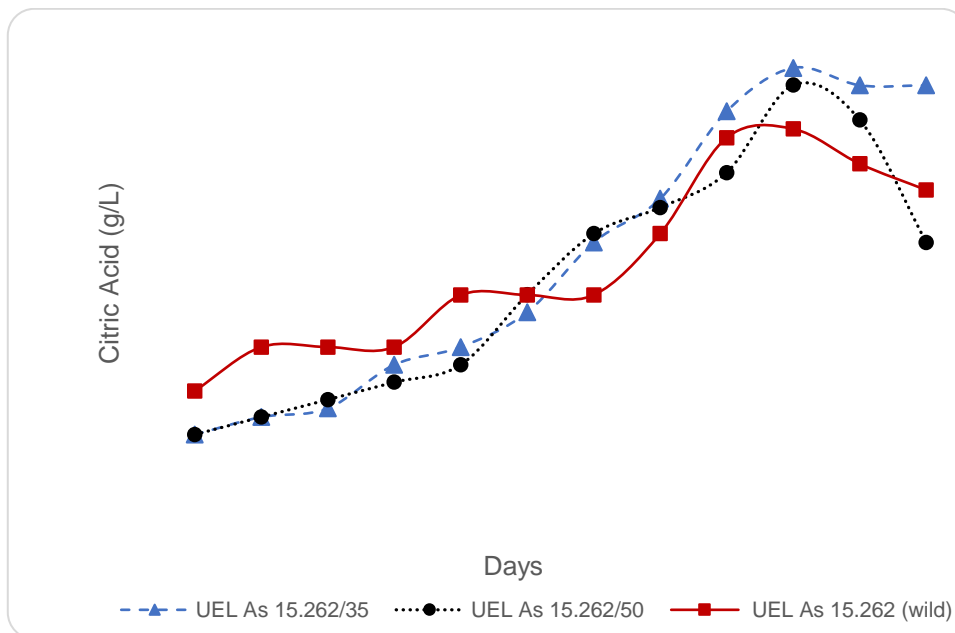


Figure 3: Kinetics of citric acid production in Prescott and Dunn medium by UEL As 15.262 (wild), by UEL As 15.262/35 and UEL As 15.262/50 (mutants) strains.

2.3.2 Artigo Científico 2

BOSSA, L. F.; SARTORI, D. Ácido cítrico: um enfoque molecular. Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 3 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: **Atena Editora**, cap. 18, p. 164-173, 2019.

Ácido cítrico: um enfoque molecular

Resumo

A molécula de ácido cítrico é um intermediário chave presente no ciclo do Ácido cítrico. Por ser amplamente utilizado em vários segmentos industriais, é um dos ácidos mais produzidos anualmente. Os fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente aqueles pertencentes à seção *Nigri*, apresentam uma grande importância industrial na produção de enzimas e ácidos orgânicos. A espécie *A. niger* é uma das mais estudadas com relação à produção e acúmulo de ácido cítrico, e também é a mais utilizada em processos biotecnológicos. Visto que, as primeiras reações do ciclo de Krebs e suas respectivas enzimas, interferem diretamente na regulação e produção do ácido orgânico, há estudos analisando os genes e seus respectivos produtos, que estão envolvidos na produção do ácido cítrico. Sendo assim, é citado nesse trabalho as enzimas *citrato sintase*, *isocitrato desidrogenase* e *aconitase* e os aspectos moleculares envolvendo as mesmas.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido cítrico, *Aspergillus*, *citrato sintase*, *isocitrato desidrogenase*, *aconitase*

Citric Acid: A Molecular Approach

Abstract

The citric acid molecule is a key intermediate present in the Citric Acid cycle. Because it is widely used in many industrial segments, it is one of the most produced acids. The fungi of the genus *Aspergillus*, especially those belonging to the Nigri section, are of great industrial importance in the production of enzymes and organic acids. The *A. niger* species is one of the most studied in relation to the production and accumulation of citric acid, and is also the most used in biotechnological processes. Since the first reactions of the Citric Acid cycle and their respective enzymes directly interfere in the regulation and production of the organic acid, there are studies analyzing the genes and their respective products, which are involved in the production of citric acid. Therefore, the enzymes citrate synthase, isocitrate dehydrogenase and aconitase and the molecular aspects involving them are mentioned in this work.

KEYWORDS: Citric acid, *Aspergillus*, *citrate synthase*, *isocitrate dehydrogenase*, *aconitase*

Propriedades gerais do acúmulo de Ácido cítrico

A molécula de ácido cítrico é um intermediário chave presente no processo de respiração aeróbica nos organismos. A nomenclatura oficial, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada, é ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico. Entre suas propriedades químicas, esse composto possui três grupamentos carboxílicos e apresenta uma estrutura cristalina na forma de sólido branco (MAX et al., 2010; COSTA, 2011; CIRIMINNA et al., 2017; TONG et al., 2019).

Pode ser encontrado naturalmente em frutas cítricas como lima, limão, abacaxi, entre outras. No entanto, desde meados do século XX, quando o pesquisador americano Currie verificou que a produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger* era favorecida em condições específicas, rapidamente foram surgindo diversas condições fermentativas para suprir o consumo de ácido pelo mercado (COSTA, 2011; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016; FRANÇA, 2016; CIRIMINNA et al., 2017; TONG et al., 2019).

Os mais variados segmentos como as indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica e cosméticos, utilizam o ácido cítrico na composição de seus produtos. Essa molécula pode ser empregada nas mais diversas formulações, por apresentar inúmeras propriedades, como agente acidulante, agente sequestrante, agente tamponante para controlar o pH, conservante, emulsionante, aromatizante e flavorizante (SOCCOL et al., 2006; COSTA, 2011; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014; CIRIMINNA et al., 2017; TONG et al., 2019).

Há descrito na literatura três metodologias para a produção dessa molécula orgânica utilizando microrganismos: o processo Koji, a fermentação em superfície e a fermentação submersa, sendo que esta última é a mais utilizada na indústria. Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, se destacam pela alta produtividade e pelo acúmulo desse ácido em condições adequadas, porém a espécie amplamente utilizada industrialmente tem sido *Aspergillus niger* (SANTOS, 2005; MAX et al., 2010; FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016; TONG et al., 2019).

O gênero *Aspergillus* e o acúmulo de ácido cítrico

O gênero *Aspergillus* possui grande número de seus representantes empregados em fermentações de larga escala, para a produção de compostos bioativos, ácidos orgânicos e enzimas. Este gênero, segundo os trabalhos de Houbraken et al., (2014) e Hubka et al., (2014) é composto de 20 seções e quatro subgêneros sendo eles *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes* (HOUBRAKEN et al., 2014; HUBKA et al., 2014; SAMSON, et al., 2014; PARK et al., 2017; FRISVAD et al., 2018; TONG et al., 2019).

Os fungos desse gênero que apresentam importância industrial, são em sua maioria pertencentes à seção *Nigri* (PARK et al., 2017). Esta seção, que atualmente possui 27 espécies (HOUBRAKEN et al., 2014; SAMSON et al., 2014; FUNGARO et al., 2017), se destaca por contar com linhagens que receberam o status GRAS (Generally Regarded as Safe), ou seja, que são seguras para serem utilizadas em condições industriais, como por exemplo *Aspergillus niger* (VARGA et al., 2011; PARK et al., 2017; FRISVAD et al., 2018).

A espécie *A. niger* é uma das mais estudadas com relação à produção e acúmulo de ácido cítrico. Muitos trabalhos são encontrados na literatura apresentando as diferentes otimizações para a produção deste composto orgânico, pois alguns fatores interferem de forma direta nesse processo (FOSTER, 1949; ACOSTA, 1994; COSTA, 2000; RODRIGUES, 2006; PASTORE et al., 2011).

Entre esses fatores podem ser citados: fonte de carbono, nitrogênio e fósforo; pH; aeração; concentração de oligoelementos e o microrganismo produtor (FOSTER, 1949; GREWAL et al., 1995; RODRIGUES, 2006; PAPAGIANNI, 2007; MAX et al., 2010; PASTORE et al., 2011). É conhecido que a fonte de carbono e de fósforo mais adequada para a produção do ácido cítrico, são a sacarose e o fósforo de potássio monobásico, respectivamente (FOSTER, 1949; GREWAL et al., 1995; RODRIGUES, 2006; PASTORE et al., 2011).

Com o passar dos anos e visando a sustentabilidade, variadas fontes de carbonos provenientes de resíduos agroindustriais, foram sendo avaliadas para produção de ácido cítrico utilizando *A. niger*. Como exemplos podem ser citados: filtrado de farinha de milho (WANG et al., 2017), bagaço de cana-de-açúcar (FRANÇA, 2016); polpa cítrica (RODRIGUES, 2006); soro de leite (EL-HOLI and ALDELAIMY 2003), entre outros.

O fungo *A. niger* é amplamente descrito na literatura para a produção de ácido cítrico (RODRIGUES, 2006; AUTA et al., 2014; HU et al., 2014; HU et al., 2016). Porém, outros *Aspergillus* pertencente à seção *Nigri* são relatados por possuir a capacidade de acumular esse ácido orgânico em quantidades significativa, como: *Aspergillus carbonarius* (WEYDA et al., 2014; YANG et al., 2015; YANG et al., 2017), *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus luchuensis* e *Aspergillus awamori*, este último reclassificado como *Aspergillus welwitschiae* (HONG et al., 2013; FUTAGAMI et al., 2015; TONG et al., 2019).

Aspectos moleculares envolvidos no acúmulo do ácido cítrico

As primeiras reações do ciclo do ácido cítrico e suas respectivas enzimas, interferem diretamente na regulação e produção do ácido cítrico. Tendo em mente a sua importância, estudos realizaram a análise dos genes e seus produtos que estão envolvidos na produção deste ácido orgânico (PEL et al., 2007; ANDERSEN et al., 2011).

Quanto ao acúmulo de ácido cítrico, é conhecido haver principal participação das três primeiras reações do ciclo do ácido cítrico. Estas reações são catalisadas pelas enzimas *citrato sintase*, *isocitrato desidrogenase* e *aconitase* (PAPAGIANNI, 2007; AKRAM, 2014).

Segundo informações do banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), para essas proteínas já foram depositadas sequências das mais variadas espécies fúngicas.

Aspectos moleculares da Citrato sintase

Para a formação do ácido cítrico, em sua forma de citrato, é necessário que a enzima citrato sintase realize a condensação do oxaloacetato com o acetil-CoA, na primeira reação do ciclo do ácido cítrico (AKRAM, 2014). Esta reação é considerada o primeiro ponto de regulação da via. Sua atividade é menor quando ocorre inibição por retroalimentação do seu produto, NADH e adenosina trifosfato (ATP). Em contrapartida, sua atividade é estimulada pela adenosina difosfato (ADP) (NELSON e COX, 2011; VOET e VOET, 2013; AKRAM, 2014).

Conforme descrito por Pel et al. (2007), a linhagem CBS 513.88 de *A. niger*, apresenta uma *citrato sintase* citosólica e três enzimas putativas na mitocôndria. Dentre as formas de *citrato sintases* descritas até o momento, a *citrato sintase* codificada pelo gene *citA*, tem sido melhor estudada. Em geral, a enzima *citrato sintase* codificada por *citA*, localizada na mitocôndria, possui três éxons e seis íntrons, e codifica uma proteína com 465 aminoácidos com um domínio conservado (RUIJTER et al., 2000; PEL et al. 2007; NCBI, 2019).

Ruijter et al. (2000), constataram que a enzima *citrato sintase* em *A. niger*, codificada pelo gene *citA*, apresenta massa molecular desnaturada da enzima de 48 kDa. Enquanto que, durante o procedimento de filtração em gel utilizado pelos pesquisadores, a massa molecular seria de aproximadamente 80 kDa, indicando que a enzima nativa teria o formato de um dímero (RUIJTER et al., 2000).

Outra informação relevante foi encontrada na porção C terminal da proteína codificada por *citA*, que contém uma sequência alvo peroxissomal (AKL) em duplicata. Essa mesma sequência alvo já foi verificada nos genes que codificam *citrato sintase* de *N. crassa* e *A. nidulans* (RUIJTER et al., 2000).

Murray e Hynes (2010), descreveram que *Aspergillus nidulans* possui um único gene *citA* que é capaz de codificar uma proteína com sequências de direcionamento mitocondriais e peroxissômicas. No entanto, estudos têm demonstrado que *A. nidulans* possui os genes que codificam tanto a *citrato sintase* como a *metilcitrato sintase*, genes *citA* e *mcsA*, respectivamente (PARK et al., 1997; BROCK et al., 2000; MURRAY and HYNES, 2010).

Com relação à enzima *metilcitrato sintase*, foi constatado que a mesma possui sua localização na mitocôndria e que esta enzima possui tanto ação de *citrato sintase* como de *metilcitrato sintase*, que é importante para o metabolismo de propionil-CoA, em microrganismos como *A. nidulans* e *A. fumigatus* (MURRAY and HYNES, 2010).

No mesmo estudo foi averiguado que a deleção de *citA*, implica em menor crescimento de *A. nidulans* em meios contendo glicose. Em contrapartida, a enzima *metilcitrato sintase* pode ser regulada em situações de indução por fontes carbono, e a atividade desta última pode substituir a enzima *citrato sintase* deletada. Essa teoria dos autores é sustentada pela incapacidade de obter um mutante duplo para *citrato* e *metilcitrato sintase* (MURRAY and HYNES, 2010).

Aspectos moleculares da Aconitase

A enzima *aconitase* é responsável pela conversão do citrato no intermediário isocitrato, na segunda reação do ciclo do Ácido Cítrico (AKRAM, 2014). Possui em sua estrutura um centro ferro-enxofre no seu sítio ativo. A atividade enzimática pode ser regulada por íons como Cu^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} , sendo que o primeiro favorece a maior produção de ácido cítrico, enquanto que os outros dois íons diminuem esse rendimento (KUBICEK E RÖHR, 1985; ACOSTA, 1994).

Oberegger et al. (2002), verificaram que em cepas de *A. nidulans* a influência do íon ferro sobre o gene *acoA*, que codifica a enzima *aconitase* é dependente de ferro como cofator, e que a regulação da enzima foi reprimida com a depleção de ferro. Discutiu-se também, que a homeostase de ferro pode sofrer regulação transcricional dependente de fator SREA ou pela expressão de um gene putativo que codifica uma *metaloredutase* contendo grupo heme, denominado *freA* (OBEREGGER et al., 2002).

Já Fazius et al. (2012), descreveram em *A. fumigatus* a presença de dois genes que codificam aconitases distintas em seu genoma, denominadas de *AcoA* e *AcoB*. Após a purificação da proteína obteve-se que a *aconitase AcoA*, apresenta 787 aminoácidos com uma sequência de importação mitocondrial de 33 aminoácidos, sendo essencial para o crescimento do fungo (FAZIUS et al., 2012).

A *aconitase AcoB* já foi descrita em *A. fumigatus* e *A. nidulans*, contendo apenas um íntron na sequência de importação mitocondrial. Um homólogo de *AcoB* presente no genoma de *Penicillium chrysogenum* mostrou 86% de identidade com *AcoB* de *A. fumigatus*, e esta segunda *aconitase* está relacionada com a via do α -aminoadipato (FAZIUS et al., 2012).

Além das duas aconitases citadas (*AcoA* e *AcoB*), uma terceira enzima *aconitase*, denominada de *AcoC* foi identificada no genoma de *A. fumigatus*, porém sem maiores informações até o momento. No entanto, em *A. niger* (CBS 513.88), é conhecido que a enzima *aconitase* possui sequência de 817 aminoácidos, com dois domínios conservados e oito éxons (FAZIUS et al., 2012; NCBI, 2019).

Aspectos moleculares da Isocitrato desidrogenase

A enzima *isocitrato desidrogenase* catalisa a terceira reação do ciclo do Ácido Cítrico onde ocorre a conversão de isocitrato a α -cetoglutarato. A reação catalisada por essa enzima é considerada o segundo ponto de regulação do ciclo. Em sua estrutura catalítica possui o íon manganês (Mn^{+2}) em seu sítio ativo, um dos íons que participam de sua regulação junto com o magnésio (Mg^{+2}) (BOWES e MATTEY, 1979; MEIXNER-MONORI et al., 1986). Adicionalmente, a enzima pode ser inibida por ATP, enquanto que íons cálcio (Ca^{+2}) juntamente com ADP estimulam sua atividade (NELSON e COX, 2011; VOET e VOET, 2013; AKRAM, 2014).

Segundo o estudo de Kirimura et al. (2002), as células eucarióticas possuem três enzimas *isocitrato desidrogenase* (ICDH), sendo que cada uma apresenta diferentes funções metabólicas com relação a especificidade do cofator e à sua localização celular (KIRIMURA et al., 2002).

Uma das ICDHs, a isoforma mitocondrial e específica para NAD^+ , é uma enzima alostérica em formato de octâmero, com sua regulação realizada por NADH e nucleotídeos de adenina, tornando-a uma enzima reguladora chave do ciclo do Ácido Cítrico (KIRIMURA et al., 2002).

As outras duas isoformas de ICDHs são específicas para $NADP^+$ e podem ser encontradas tanto no citosol, quanto na mitocôndria. São encontradas principalmente como homodímeros, sua regulação não é alostérica e sua regulação é dada principalmente em nível transcricional (KIRIMURA et al., 2002).

O gene que codifica a isocitrato desidrogenase (*icdA*) em *A. niger* CBS 513.88, o qual codifica uma das isoformas localizadas na mitocôndria, apresenta cinco éxons e 7 íntrons. O gene *icdA* codifica uma sequência de 385 aminoácidos, com um domínio conservado (NCBI, 2019).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, L. A. **Análise dos meios de cultura para a produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger***. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas (SP), Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1994.
- ADITIVOS & INGREDIENTES. **Ácido cítrico ou citrato de hidrogênio**. Aditivos & Ingredientes, p. 30-35, 2016. Disponível em: http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201604/2016040746833001460591974.pdf. Acesso em: 13 nov. 2018.
- AKRAM, M. **Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism**. Cell Biochemistry and Biophysics, vol. 68, nº 3, p. 475–478, 2014.
- ANDERSEN, M. R., et al. **Comparative genomics of citric acid producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme producing CBS 513.88**. Genome Research, vol. 21, nº 6, p. 885–897, 2011.
- AUTA, H. S.; ABIDOYE, K. T.; TAHIR, H.; IBRAHIM, A. D.; ARANSIOLA, S. A. **Citric acid production by *Aspergillus niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp**. International scholarly research notices, 2014.
- BOWES, I.; MATTEY, M. **The effect of manganese and magnesium ions on mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from *Aspergillus niger***. FEMS Microbiology Letters, vol. 6, nº 4, p. 219-222, 1979.
- BROCK, M.; FISCHER, R.; LINDER, D.; BUCKEL, W. **Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent**. Molecular Microbiology, vol. 35, nº 5, p. 961–973, 2000.
- CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. **Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product**. Chemistry Central Journal, vol. 11, nº 1, 2017.
- COSTA, F. A. A. **Estudo de otimização do meio de cultura para produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica***. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas (SP), 2000.
- COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase**. Tese de doutorado – Universidade Federal de Lavras (MG), 2011.

EL-HOLI, M. A.; AL-DELAIFY, K. S. **Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger***. African Journal of Biotechnology, vol. 2, nº 10, p. 356–359, 2003.

FAZIUS, F.; SHELEST, E.; GEBHARDT, P.; BROCK, M. **The fungal α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate**. Molecular Microbiology, vol. 86, nº 6, p. 1508–1530, 2012.

FOOD INGREDIENTES BRASIL. **Aplicações do ácido cítrico na indústria de alimentos**. Food Ingredientes Brasil, nº 30, p. 96-103, 2014. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/402.pdf>

FOSTER, J. W. **Chemical Activities of Fungi**. Academic Press, Inc., New York, p. 1-648, 1949.

FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, 2016.

FRISVAD, J. C.; MØLLER, L. L. H.; LARSEN, T. O.; KUMAR, R.; ARNAU, J. **Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei***. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 102, nº 22, p. 9481–9515, 2018.

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. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil**. Scientific Reports, vol. 7, nº 1, p. 1-9, 2017.

FUTAGAMI, T.; MORI, K.; WADA, S.; IDA, H.; KAJIWARA, Y.; TAKASHITA, H.; TASHIRO, K.; YAMADA, O.; OMORI, T.; KUHARA, S.; GOTO, M. **Transcriptomic analysis of temperature responses of *Aspergillus kawachii* during Barley koji production**. Applied and environmental microbiology, vol. 81, nº 4, 1353-1363, 2015.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. **Fungal production of citric acid**. Biotechnology Advances, vol. 13, nº 2, p. 209–234, 1995.

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, vol. 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, vol. 86, p. 199–249, 2014.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; KOLARÍK, A. et al. **Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov.** Mycologia: In press, 2014.

HU, W.; CHEN, J. H.; WANG, S. Y.; LIU, J.; SONG, Y.; WU, Q. F.; LI, W. J. **Changes in the physiological properties and kinetics of citric acid accumulation via carbon ion irradiation mutagenesis of *Aspergillus niger***. Journal of Zhejiang University Science B, vol. 17, n° 4, p. 262–270, 2016.

HU, W.; LIU, J.; CHEN, J. H.; WANG, S. Y.; LU, D.; WU, Q. H.; LI, W. J. **A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor**. Journal of Zhejiang University Science B, vol. 15, n° 11, p. 1006-1010, 2014.

KIRIMURA, K.; YODA, M.; KUMATANI, M.; ISHII, Y.; KINO, K.; USAMI, S. **Cloning and expression of *Aspergillus niger icdA* gene encoding mitochondrial NADP⁺-Specific isocitrate dehydrogenase**. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 93, n° 2, p. 136–144, 2002.

KUBICEK, C. P. AND ROHR, M. **Aconitase and citric acid fermentation by *Aspergillus niger***. Applied and Environmental Microbiology, vol. 50, n° 5, p. 1336-1338, 1985.

MAX, B.; SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. **Biotechnological production of citric acid**. Brazilian Journal of Microbiology, vol. 41, n° 4, p. 862–875, 2010.

MEIXNER-MONORI, B.; KUBICEK, C. P.; HARRER, W.; SCHREFERL, G.; ROHR, M. **NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger***. Biochemical Journal, vol. 236, n° 2, p. 549–57, 1986.

MURRAY, S. L. AND HYNES, M. J. **Metabolic and developmental effects resulting from deletion of the *citA* gene encoding citrate synthase in *Aspergillus nidulans*.** Eukaryotic Cell, vol. 9, nº 4, p. 656–666, 2010.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information.** 2019. < Erro! A referência de hiperlink não é válida.> Acesso em: 20 fev. 2019.

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

OBeregger, H.; Schoeser, M.; ZADRA, I.; Schrettl, M.; Parson, W.; Haas, H. **Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus Nidulans*.** Applied and Environmental Microbiology, vol. 68, nº 11, p. 5769–72, 2002.

PAPAGIANNI, M. **Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling.** Biotechnology Advances, vol. 25, nº 3, p. 244–63, 2007.

PARK, B. W.; HAN, K. H.; LEE, C. Y.; LEE, C. H.; MAENG, P. J. **Cloning and characterization of the *citA* gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans*.** Molecules and Cells, vol. 7, nº 2, p. 290–295, 1997.

PARK, H. S.; JUN, S. C.; HAN, K. H.; HONG, S. B.; YU, J. H. **Chapter Three - Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi.** Advances in Applied Microbiology, vol. 100, p. 161–202, 2017.

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, vol. 13, nº 3, 2011. doi:10.22409/engevista.v13i3.306.

PEL, H. J., et al. **Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88.** Nature Biotechnology, vol. 25, nº 2, p. 221–31, 2007.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica.** Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, p. 1-93, 2006.

RUIJTER, G. J. G.; PANNEMAN, H.; XU, D. B.; VISSER, J. **Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of *citA* overexpression on citric acid production.** FEMS Microbiology Letters, vol. 184, nº 1, p. 35–40, 2000.

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

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, p. 1-81, 2005.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. **New perspectives for citric acid production and application**. *Food Technology and Biotechnology*, vol. 44, nº 2, p. 141–149, 2006.

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*, vol. 18, 2019.

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, n. 1, p. 1-17, 2011.

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

WANG, B. LI, H.; ZHU1, L.; TAN, F.; LI1, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI1, 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*, vol. 40, nº 6, p. 891–99, 2017.

WEYDA, I.; LÜBECK, M.; AHRING, B. K.; LÜBECK, P. S. **Point mutation of the xylose reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in *Aspergillus carbonarius***. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 41, nº 4, p. 733-739, 2014.

YANG, L.; CHRISTAKOU, E.; VANG, J.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. **Overexpression of a C₄-dicarboxylate transporter is the key for rerouting citric acid to C₄-dicarboxylic acid production in *Aspergillus carbonarius***. *Microbial Cell Factories*, vol 16, nº 1, p. 43, 2017.

YANG, L.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. **Effects of heterologous expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase and phosphoenolpyruvate carboxylase on organic acid production in *Aspergillus carbonarius***. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 42, nº 11, p. 1533-1545, 2015.

2.3.3 Artigo Científico 3

BOSSA, L. F.; RIBEIRO, M. M.; MONTEIRO, J. P. S.; SARTORI, D. Resíduos agroindustriais para produção de produtos biotecnológicos. Agroecologia [recurso eletrônico]: caminho de preservação do meio ambiente / Organizador Cleberton Correia Santos. – Ponta Grossa, PR: **Atena Editora**, cap. 12, p. 123-135, 2019.

Resíduos agroindustriais para produção de produtos biotecnológicos

Resumo

O Brasil é um dos principais produtores agrícolas mundiais, e esse setor produz milhares de toneladas de resíduos que não são aproveitados pela indústria. Os resíduos podem gerar impactos ambientais se não forem tratados corretamente, além de representarem uma perda econômica associada a não reutilização desta matéria prima. Assim, os processos biotecnológicos por sua vez, podem utilizar esses resíduos agroindustriais para a geração de diversos tipos de produtos de interesse comercial como ácidos orgânicos, enzimas, pigmentos, cosméticos e medicamentos. Com a fermentação em estado sólido (FES), pode ocorrer a reutilização dos resíduos, um processo ecologicamente favorável, onde a matéria prima é de fácil acesso e de baixo custo e o produto gerado possui alto valor agregado. Para a bioconversão desses materiais, pode ser utilizado diversas espécies fúngicas, sendo que um dos principais microrganismos utilizados para a reutilização dos dejetos agroindustriais é o *Aspergillus niger*. A indústria faz uso de uma linhagem específica de *Aspergillus niger*, considerada segura pela Food and Drug Administration (FDA). Assim, este microrganismo pode ser aplicado para produzir produtos de diversos ramos industriais como no setor alimentício, saúde humana, cosmética e até mesmo em nutrição animal. Por fim, esta revisão busca mostrar, baseada em informações extraídas da literatura, o potencial da reutilização de resíduos da agroindústria associada aos tipos de fermentação e os principais microrganismos utilizados para produção dos produtos biotecnológicos com enfoque em dois produtos específicos: amilases e ácido cítrico.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduos agroindustriais; Fermentação; *Aspergillus*; Ácido cítrico, Amilase

Propriedades dos Processos Fermentativos e Utilização de Resíduos

A ampla diversidade de matérias primas encontradas nos resíduos agroindustriais, por serem de fácil acesso e baixo custo, podem ser reaproveitadas para a produção de um produto comercial utilizando três métodos fermentativos: Fermentação Submersa, Fermentação em Superfície e Fermentação em Estado Sólido, sendo que cada uma delas possui características particulares no processo (SHOW et al., 2015; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016).

O desempenho do processo fermentativo é afetado por fatores químicos como pH (THOMAS et al., 2013) e componentes do meio de cultivo (SOCCOL et al., 2017). Além disso, dentre os fatores físicos que afetam o processo estão a temperatura (KRISHNA, 2005), agitação e aeração (NAVES et al., 2010; SHOW et al., 2015). Visto que parâmetros físicos e químicos devem ser considerados, outra variável é a escolha do tipo de processo fermentativo, pois cada fermentação contém características que podem ser vantajosas ou desvantajosas.

A Fermentação Submersa é o tipo de processo fermentativo mais utilizado industrialmente. Dentre as vantagens deste processo, tem-se como destaque a purificação do produto é facilitada pela baixa concentração de partículas de substrato, as altas taxas de produção e rendimento, o menor risco de contaminação, menor necessidade de mão-de-obra para operação e requer espaço menor para produção (CASTRO et al., 2010; SHOW et al., 2015).

Algumas desvantagens, é que há necessidade de uma instalação sofisticada, elevando o custo com tecnologias e energia para o processo. Além disso, existe a preocupação de ser feito um controle rigoroso sobre a fermentação para evitar contaminantes e conseqüentemente a perda de lotes. Pode ocorrer também a formação de espuma durante o processo, mas pode ser resolvido utilizando um agente antiespumante (CASTRO et al., 2010; MENEGOL et al., 2016).

A Fermentação em Superfície foi o primeiro processo fermentativo utilizado para a produção em larga escala de um ácido orgânico com baixo custo, isso porque somente depois de algum tempo surgiu a Fermentação Submersa. Estima-se que sua introdução ocorreu por volta de 1920, porém uma descrição mais aprofundada deste método só foi publicada em 1950 (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016).

O processo é convencionalmente realizado em câmaras de fermentação, utilizando bandejas rasas, de aço inoxidável, alumínio ou polietileno, organizadas em prateleiras (BAUWELEERS et al., 2014; SHOW et al., 2015). Os parâmetros fermentativos como aeração, umidade, temperatura entre outros são regulados, pois o rendimento do processo é altamente influenciado por esses fatores (SOCCOL et al., 2006).

As vantagens deste processo fermentativo é que o mesmo pode ser utilizado em indústrias de pequena e média escala, porque requer menos esforço operacional, instalação e custo de energia. Uma das desvantagens é a preocupante contaminação por outros microrganismos (BAUWELEERS et al., 2014).

A designação Fermentação em Estado Sólido, Fermentação Semi-Sólida, ou ainda processo Koji, é destinado ao processo no qual ocorre o crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre (KAREEM et al. 2010). É muito utilizada para produção de diversos compostos de interesse industrial através do aproveitamento de resíduos ou subprodutos da agroindústria (COUTO et al., 2006).

Por esse motivo, a vantagem de utilizar os resíduos é que além de atuarem como fonte de carbono, atuam também como suporte para o crescimento dos microrganismos (SHOW et al., 2015). As desvantagens deste método é que há dificuldade de controlar os parâmetros de fermentação, alguns substratos podem não ser completamente acessíveis e a transferência de oxigênio pode ser dificultada de acordo com o substrato. (SANTOS et al., 2017).

Considerando que o Brasil é um grande produtor agrícola e que há grande geração de resíduos/subprodutos, a Fermentação em Estado Sólido se apresenta como uma alternativa para os resíduos, gerando substâncias de interesse econômico, como enzimas, ácidos orgânicos, aromas e pigmentos, por exemplo.

A economia brasileira tem sua base muito forte no setor da agricultura, sendo que boa parte do PIB (Produto Interno Bruto) é originado do agronegócio. As grandes safras de diversos alimentos produzidos em nosso país como café, milho, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas e cereais, geram elevadas quantidades de resíduos. Este fato, têm despertado o interesse de pesquisadores para sua utilização em processos biotecnológicos (FILHO et al., 2015).

Outra vertente que corrobora com a utilização de resíduos agroindustriais, é a relacionada com questões ambientais. Existe a busca constante por novas fontes

renováveis de energia, visando um modelo sustentável por meio da reutilização de materiais. Nesse cenário, os resíduos podem ser utilizados para a produção de novos materiais, produtos químicos e de energia (FILHO et al., 2015; MORAES et al., 2017).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), para o mês de maio de 2019, foi realizado o levantamento sistemático da produção agrícola, estabelecendo o *ranking* dos principais cultivares produzidos pelo país (IBGE, 2019). Muitos destes cultivares geram resíduos sólidos ou líquidos como cascas, bagaço, polpas, sementes, farelos e água de maceração, por exemplo.

A biomassa mais produzida no Brasil é a proveniente da cana-de-açúcar. O resíduo agroindustrial gerado no setor sucroalcooleiro, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar por exemplo, é resultado do processamento para a produção de açúcar e etanol (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2015; MORAES et al., 2017).

Os resíduos da agroindústria, como o citado acima, podem ser utilizados como fonte de nutrientes para os microrganismos no processo fermentativo. Ao final da fermentação, os mais diversos produtos podem ser obtidos como enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários, compostos aromáticos, óleos essenciais entre outros (FILHO et al., 2015).

Diversas espécies de microrganismos têm sido utilizadas na FES a partir de resíduos agroindustriais. Entretanto, os fungos possuem propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas favoráveis à utilização na FES para produzir enzimas, por exemplo (ZEN et al., 2014; SANTOS et al., 2018). Sabendo da importância dos fungos no processo Fermentativo em Estado Sólido, a seguir foi relatado quais fungos são preferencialmente utilizados para produção de produtos biotecnológicos.

Fungos e sua aplicação na indústria biotecnológica

Os fungos possuem uma série de aplicações industriais, estudos em Biotecnologia e Engenharia Genética vem possibilitando esses organismos a produção de seus metabólitos em larga escala. Atualmente vários produtos de origem fúngica são usados comercialmente como pesticidas biológicos, enzimas, pigmentos, vitaminas, etanol e ácidos orgânicos (SOUZA et al, 2015; ABREU, 2018).

Os fungos são utilizados na indústria alimentícia por produzirem

enzimas que estão presentes nos processos de panificação, fabricação de queijos, cervejas, vinhos, fermentados e bebidas alcoólicas (TAKAHASHI, et al., 2017). Podem contribuir na indústria farmacêutica com o desenvolvimento de alguns antibióticos (SOUZA et al., 2018), além disso, estão presentes em processos biodegradáveis (SOARES et al., 2011) e tratamentos biológicos de efluentes industriais (SANTOS et al., 2019) e na biotransformação (CORTEZ, et al., 2017).

Os fungos possuem um metabolismo diversamente alternativo, o qual pode ser dividido em duas categorias específicas. Os metabólitos primários são moléculas produzidas no decorrer do crescimento vegetativo enquanto que os metabólitos secundários, são sintetizados na fase estacionária do crescimento microbiano (SBRT, 2011; SOUZA et al, 2015).

Os fungos filamentos se desenvolvem em variados tipos de substratos, sendo utilizados em aplicações industriais, com a finalidade de produzir diversos tipos de produtos biotecnológicos (TAKAHASHI, 2017). Como exemplo, um dos principais produtos utilizados pela indústria de alimentos são os ácidos orgânicos, amplamente empregados nos processos alimentícios, essencialmente como acidulantes, entretanto podem ser utilizados também como agentes aromatizantes, conservantes e tampões (CARVALHO et al., 2005).

Entre os ácidos orgânicos, um dos compostos que se destaca por sua grande aplicabilidade é o ácido cítrico. Este ácido pode ser obtido pela utilização de frutas cítricas, além de apresentar um papel crucial no metabolismo de animais e humanos durante a geração de energia, a partir da degradação de alimentos. Entretanto, cerca de 95% do ácido cítrico comercializado mundialmente é gerado por fungos (COPETTI, 2019).

Todas as espécies conseguem sintetizar ácido cítrico, entretanto algumas espécies fúngicas produzem em quantidades elevadas, dentre as quais, algumas espécies dos os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. No entanto, a espécie mais utilizada para a produção de ácido cítrico tem sido *Aspergillus niger* (MAX et al., 2010; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016; PORRO & BRANDUARTI, 2017; WANG et al., 2017).

Outros tipos de ácidos podem ser produzidos por fungos em menor escala, entre eles podemos citar, o glucônico, itacônico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico e ácido oxálico (KUBICEK et al., 2011; MAGNUSON et al., 2004; STEIGER et al., 2013; PORRO et al., 2017).

Outros produtos biotecnológicos que podem ser obtidos via processo fermentativo com o uso de fungos filamentosos são as enzimas, pigmentos e vitaminas (SANTOS et al., 2012; DUFOSSÉ, 2016). Dentre os fungos utilizados em processos biotecnológicos, o mais empregado para produção de enzimas (SANTOS et al., 2012) e ácidos orgânicos (WANG et al., 2017) em diversos segmentos industriais é o gênero *Aspergillus*, como descrito no próximo tópico.

Fungos Filamentosos: O gênero Aspergillus e seção Nigri

As espécies que constituem o gênero *Aspergillus* apresentam grande distribuição ao redor do mundo. Uma das principais características desse gênero é a coloração das colônias, podendo apresentar diferentes tonalidades de verde, amarelo, branco, marrom, cinza e preto (FRISVAD, 2015; PARK et al., 2017).

Um dos aspectos de grande importância para sua classificação são as estruturas morfológicas. As espécies que compõem o gênero, tipicamente apresentam um estipe asseptada, que termina em uma vesícula, onde crescem as células conidiogênicas, que são responsáveis pela origem dos conídios. Estes últimos podem apresentar diferentes pigmentações e ornamentações (SAMSON et al., 2014).

O grupo *Aspergillus* pode ser subdividido em quatro subgêneros: *Circumdati*, *Aspergillus*, *Nidulantes* e *Fumigati*. Além dos subgêneros, são relatadas diversas seções e metabólitos secundários específicos para cada seção (GEISER et al., 2007; HOUBRAKEN et al., 2014; SAMSON et al., 2014).

Dento do subgênero *Circumdati*, a seção *Nigri* é uma das principais seções estudadas, por possuir grande diversidade de espécies que são muito utilizadas na biotecnologia, possuindo atualmente 27 espécies (HOUBRAKEN et al., 2014; FUNGARO et al., 2017).

Várias espécies da seção *Nigri* causam deterioração de alimentos, podendo produzir micotoxinas como ocratoxina A e fumonisina B2 (SOARES et al., 2013). Por outro lado, são espécies bastante requisitadas em diversos processos industriais para a produção de enzimas hidrolíticas, como amilases e/ou lipases, e ácidos orgânicos, tais como ácido glucônico e ácido cítrico (VARGA et al., 2011).

No entanto, dentre as espécies da seção *Nigri*, a mais utilizada em áreas biotecnológicas até o momento, é *Aspergillus niger*, devido ao seu elevado rendimento quanto à produção de enzimas extracelulares, a não toxicidade e patogenicidade, sendo considerada pela Food and Drug Administration (FDA) como GRAS - Geralmente Reconhecida Como Segura. (SCHUSTER et al., 2002; JIAO et al., 2018).

Esta espécie é também bastante versátil quanto à utilização de substrato, e possui algumas vantagens como a fácil manipulação e produção de grandes quantidades de produtos biotecnológicos (SHUESTER, 2002; PEL et al., 2007). As características citadas fazem com que *A. niger* seja muito utilizado em diversas áreas industriais como: no processamento de amido (TORRES et al., 2012), na alimentação animal (NASCIMENTO et al., 2018), na fabricação de cerveja e bebidas (OLIVEIRA et al., 2017), na indústria de papel e celulose (CAVALCANTI et al., 2018), além de produzir metabólitos bioativos, sendo incorporados em produtos fármacos (NASCIMENTO et al., 2015).

Devido à grande versatilidade que *A. niger* apresenta, muitos produtos biotecnológicos foram sintetizados via processos fermentativos. A seguir, foi realizado um enfoque em dois produtos biotecnológicos de grande importância: enzimas amilases e o ácido cítrico.

Produtos biotecnológicos: amilases e ácido cítrico

Enzimas amilolíticas

Em termos mundiais, Monteiro (2009) ressalta que o Brasil representa 3,7% do mercado internacional de enzimas. Além de ser o país mais expressivo da América Latina em relação à produção de enzimas amilolíticas. Segundo a Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products (AMFEP), atualmente são comercializadas em torno de 243 enzimas, das quais aproximadamente 19% são produzidas por *Aspergillus niger*. As enzimas amilolíticas são responsáveis por 25 a 33% da produção mundial (POLITZER & BON, 2006; MONTEIRO, 2009).

As enzimas amilolíticas, estão amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por animais, vegetais e principalmente por microrganismos. Esta

enzima é a responsável pela hidrólise do amido (CASTRO et al., 2011; CRUZ et al., 2015), e pertence a família glicosil hidrolases (GH), sendo que esta última é dividida em diversos grupos, dependendo de suas características enzimáticas (POLIZELI et al., 2016).

As nomenclaturas das enzimas amilolíticas propostas por Reddy et al. (2003) e Castro et al. (2011), correspondem com seu modo de ação. Os grupos de amilases foram categorizados em endoamilases, exoamilases, amilases desramificadoras e as transferases (GUPTA et al., 2003; ANTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; SANTOS et al., 2012).

Esta enzima apresenta grande importância biotecnológica, podendo ser aplicada em indústrias têxteis, detergentes, papel e celulose, panificação, bebidas destiladas, cervejas, cereais para alimentação, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (LUZ et al., 2016; SOCCOL et al., 2017; COELHO et al., 2018).

Diferentes tipos de substratos são utilizados para a produção de amilases. Dentre os substratos podem ser citados: resíduos de mandioca, batata doce, soja, café e amendoim; farelos de trigo e arroz; sementes de milho; e resíduos de frutas como uva, manga, laranja e abacaxi (MITCHELL et al., 2000; WISNIEWSKI et al., 2010; STROPARO et al., 2012. GUSMÃO et al., 2014; CRUZ et al., 2015).

Os principais produtores de enzimas amilolíticas são fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (PANDEY et al., 2005). Além de enzimas, os fungos são muito utilizados também para produção de ácidos orgânicos a partir de resíduos agroindustriais. Assim, o próximo tópico enfoca um dos ácidos mais utilizados industrialmente, o ácido cítrico.

Ácido cítrico

O ácido 2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxílico, mais conhecido como ácido cítrico, é um metabólito presente em todos os organismos que pode ser encontrado naturalmente em frutas cítricas (SHOW et al., 2015; CIRIMINNA et al., 2017). É um dos ácidos orgânicos mais produzidos no mundo anualmente, por meio de processo fermentativo. Algumas indústrias são grandes produtoras deste metabólito, porém a maior produção deste ácido é realizada pela China, responsável por mais de 50% da

produção global (DHILLON et al., 2013; ANGUMEENAL et al., 2013; SHOW et al., 2015).

Alguns microrganismos já foram listados como produtores de ácido cítrico em processos fermentativos, dentre eles podem ser citados fungos, bactérias e leveduras (CARVALHO et al., 2005; PASTORE et al., 2011). Entretanto, para a produção industrial de ácido cítrico o microrganismo amplamente utilizado é o fungo *Aspergillus niger* (SHOW et al., 2015).

Desde 1916 James Currie, um químico americano, verificou que algumas linhagens de *Aspergillus niger* excretavam quantidades significativas de ácido cítrico quando cultivadas sob condições específicas: meio com alta concentração de açúcar, sais minerais e pH entre 2,5 a 3,5. Isso levou a grande produção industrial deste ácido por via fermentativa, principalmente por processo submerso (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016).

Devido à grande demanda mundial de ácido cítrico, uma alternativa seria reduzir os custos de produção deste ácido utilizando os resíduos agroindustriais nos diferentes processos fermentativos. Autores como Soccol et al. (2006) e Show et al. (2015) descreveram algumas matérias primas utilizadas para produção de ácido cítrico: resíduos de cervejaria, bagaço de cana-de-açúcar, permeado de soro de leite, bagaço de mandioca, farelo de milho, casca de café, resíduos de abacaxi e laranja, entre outros (SOCCOL et al., 2006; SHOW et al., 2015).

O rendimento da produção de ácido cítrico com os mais diversos resíduos agroindustriais já foi citado por alguns autores. Aqueles que apresentaram bom rendimento de ácido cítrico, por exemplo, foram o filtrado de farinha de milho (173,2 g/L), meio de milho liquefeito (151,67 g/L) e a combinação de bagaço de cana com farelo de trigo (185 g/Kg) (JÚNIOR et al., 2017; WANG et al., 2017; WANG et al., 2015).

Devido as propriedades químicas que a molécula de ácido cítrico apresenta, este metabólito pode ser utilizado em diversos segmentos industriais. A maior parte da produção deste ácido é utilizada pela indústria de alimentos, um total de aproximadamente 70%. Pode ser utilizado como aditivo, por sua propriedade acidulante, agente quelante, tamponante e antioxidante (SOCCOL et al., 2006; MAJUMDER et al., 2010; ANGUMEENAL et al., 2013; ADITIVOS & INGREDIENTES, 2016).

Outros 12% da produção de ácido cítrico se destina a indústria farmacêutica e 18% para diversos outros setores como agricultura, detergentes, cosméticos e produtos de higiene (MAJUMDER et al. 2010; BAUWELEERS et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2019). Assim, pode ser verificada a importância deste ácido em diversos segmentos industriais e seus respectivos produtos, devido as suas mais diversas propriedades como: agente flavorizante, acidulante, emulsificante, antioxidante, tamponante, quelante de metais, anticoagulante entre outras funções.

Conclusão

Esta revisão foi direcionada para a obtenção de produtos biotecnológicos por meio de resíduos agroindustriais. Foi abordado o potencial da reutilização de resíduos da agroindústria associado à fermentação, por meio da utilização de microrganismos com o intuito de gerar um produto biotecnológico. Atualmente, o ácido cítrico é o ácido orgânico mais produzido no mundo, e a enzima amilase também é um produto com uma ampla gama de aplicações. Devido à grande demanda destes produtos, é de suma importância pesquisar novas linhagens microbianas que possam ser capazes de fermentar substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais, e proporcionar um processo de produção mais eficiente e sustentável.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos De Interesse: Aplicações Biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, vol. 21, nº 1, 2018.
- ADITIVOS & INGREDIENTES. Ácido cítrico ou citrato de hidrogênio. **Aditivos & Ingredientes**, p. 30-35, 2016.
- ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 50, nº 2, p. 367–370, 2013. doi:10.1016/j.lwt.2012.05.016
- ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, vol. 97, p. 1161-1166, 2006.
- BAUWELEERS, H. M. K.; DOMINIQUE R. G.; VAN PEIJ N. N. M. E. **Genes useful for the industrial production of citric acid**. Patente dos EUA, No. 8.637.280, 2014.
- CARVALHO, W.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, vol. 18, p. 70-76, 2005.
- CASTRO, A. M., CASTILHO, L. R., & FREIRE, D. M. G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, vol. 1, nº 4, p. 245–255, 2011. doi:10.1007/s13399-011-0023-1
- CASTRO, A. M.; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, vol. 33, nº 1, p. 181-188, 2010.
- CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, vol. 11, nº 1, 2017. doi:10.1186/s13065-017-0251-y.
- COELHO, G. D.; SOUSA, J. P.; LIMA, C. A.; LINS, S. A. S. Potencial de Fungos da Caatinga para Produção de Enzimas Amilolíticas. **Revista Saúde e Ciência Online**, vol. 7, nº 2, 502 p, 2018.
- COPETTI, M. V. Fungi as Industrial Producers of Food Ingredients. **Current Opinion in Food Science**, vol. 25, p. 52–56, 2019. Crossref, doi:10.1016/j.cofs.2019.02.006.
- CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial Catalítico de Lipases ligadas ao micélio de Fungos Filamentosos em Processos de Biotransformação. **Química Nova**, vol.40, nº 1, p.85-96, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160163>.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, vol. 76, nº 3, p. 291-302, 2006.
- CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **Journal of Health Sciences**, vol. 13, nº. 4, 2015. doi:10.17921/2447-8938.2011v13n4p%p.
- DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Industrial Crops and Products**, vol. 41, p. 78–84, 2013.
- DUFOSSÉ, L. Current and potential natural pigments from microorganisms (bacteria, yeasts, fungi, microalgae). In: Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. **Woodhead Publishing**, 1ª edição, cap. 16, p. 337-354, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00016-6>
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanco Energético Nacional**. Rio de Janeiro: EPE, 2015.

- FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol. 4, nº 1, p. 43–51, 2007.
- FILHO, W. B. N.; FRANCO, C. R. Potential Assessment of Waste Produced Through the Agro-Industrial Processing in Brazil. **Revista Virtual de Química**, vol. 7, nº. 6, p. 1968–1987, 2015. doi:10.5935/1984-6835.20150116.
- FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Chemodiversity in the Genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 99, nº 19, p. 7859–77, 2015. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s00253-015-6839-z.
- 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 labruscussp. nov.*, a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. **Scientific Reports**, vol. 7, nº 1, p. 1-9, 2017. doi:10.1038/s41598-017-06589-y.
- GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. The Current Status of Species Recognition and Identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, vol. 59, p. 1–10, 2007. DOI.org (Crossref), doi:10.3114/sim.2007.59.01.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 1599-1616, 2003.
- GUSMÃO, R. O.; FERRAZ, L. M.; RÉGO, A. P. B.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus spp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, vol. 10, nº 11, 2014. <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/2052>.
- HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, vol. 86, p. 199–249, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4.
- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola- maio 2019**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – SIDRA, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acessado em: 13/06/2019.
- JIAO, J.; GAI, Q. Y.; WANG, W.; ZANG, Y. P.; NIU, L. L.; FU, Y. J.; WANG, X. Remarkable enhancement of flavonoid production in a co-cultivation system of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures and immobilized *Aspergillus niger*. **Industrial Crops and Products**, vol. 112, p. 252-261, 2018.
- KAREEM, S. O.; AKPAN, I.; ALEBIOWU, O. O. Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. **Malaysian Journal of Microbiology**, vol 6, nº 2, p.161-165, 2010.
- KRISHNA, C. Solid-state fermentation system - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 25, p. 1-30, 2005.
- KUBICEK, C. P.; PUNT, P.; VISSER, J. Production of organic acids by filamentous fungi. In: Industrial applications. **Springer**, p. 215-234, 2011.
- LUZ, B. D. S.; BICAS, J. L.; SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z. Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco, Brasil. **Revista Multidisciplinar da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da Unigran - Interbio**, vol. 10, nº 1, p. 13-14, 2016.
- MAGALHÃES, N.; CAVALCANTE, A. V.; ANDRADE, L. S.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G.; PESSOA, K. A. R. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, vol. 24, nº 1, p. 101-107, 2019. <https://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522019167153>
- MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L. Organic acid production by filamentous fungi. In: **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine**. Springer, Boston, p. 307-340, 2004.
- MAJUMDER, L.; KHALIL, I.; MUNSHI, M.K.; ALAM, K.; RASHID, H.; BEGUM, R.; ALAM, N. Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. **European Journal of Biological Sciences**, vol. 2, nº 1, p. 1–8, 2010.

MAX, B.; SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 41, nº 4, p. 862–875, 2010. doi:10.1590/S1517-83822010000400005.

MENEGOL, D.; REIS, L.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Hidrólise enzimática de capim-elefante pelo complexo enzimático de *Penicillium echinulatum* produzido em cultivo em estado sólido e em cultivo submerso. **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC 2016**, p. 1-4, 2016.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, vol. 68, p. 61-138, 2000.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Processos Químicos. Goiânia**, vol.3, nº 5, p. 9-23, 2009. AMFEP. (2015). List of enzymes. Disponível a 19 de junho, 2019, em [http://www.amfep.org/sites/g/files/g412356/f/201505/Amfep List of Enzymes update May 2015.pdf](http://www.amfep.org/sites/g/files/g412356/f/201505/Amfep%20List%20of%20Enzymes%20update%20May%202015.pdf)

MORAES, S. L.; MASSOLA, C. P.; SACCOCCIO, E. M.; SILVA, D. P.; GUIMARÃES, Y. B. T. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT: Tecnologia e Inovação**, vol. 1, nº. 4, 2017. Disponível em: <http://revista.ipt.br/index.php/revistaIPT/article/view/37/33>.

NASCIMENTO, R. A. L.; ALVES, M. H. M. E.; FREITAS, J. H. E. S.; MANHKE, L. C.; LUNA, M. A. C.; SANTANA, K. V.; NASCIMENTO, A. E.; SILVA, C. A. A. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (ucp/wfcc 1261). **Revista e-xacta**, vol. 8, nº 1, p. 15-29, 2015.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, nº 11, p. 1-16, 2010.

OLIVEIRA, F. M. B.; LEITE, T. C. C.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; MOREIRA, K. A.; SENA, A. R. Purificação parcial de tanase produzida por *Aspergillus niger* URM 7131 sob fermentação submersa. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, vol. 7, nº 2, p.358-362, 2017.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1ª ed. **New Delhi: Asiatech Publishers, Inc**, p. 1-760, 2005.

PARK, H. S.; JUN, S. C.; HAN, K. H.; HONG, S. B.; YU, J. H. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances in Applied Microbiology- Elsevier**, vol. 100, p. 161–202, 2017. doi:10.1016/bs.aambs.2017.03.001.

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**, vol. 13, nº 3, 2011. doi:10.22409/engevista.v13i3.306.

PEL, H. J., et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, vol. 25, nº 2, p. 221–231, 2007. doi:10.1038/nbt1282

PORRO, D.; BRANDUARDI, P. Production of Organic Acids by Yeasts and Filamentous Fungi. In: **Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi - Springer**, p. 205-223, 2017.

REDDY, N.; NIMMAGADDA, A.; SAMBASIVA RAO, K. R. S. Na Overview of the Microbial α -amylase Family. **African Journal Biotechnology**. vol. 2, nº 12, p. 645-648, 2003.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, vol. 78, p. 141–173, 2014. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.004.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **Janus**, vol. 3, nº. 4, 2017.

SANTOS, G. E.; OLIVEIRA, P. C. C.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Uso de reator com fungos para tratamento de água residuária têxtil e viabilidade de reúso do efluente final em reúso macrointerno. **Revista DAE**, vol. 67, nº 217, p. 47–59, 2019. doi:10.4322/dae.2019.022.

SANTOS, L.; KOTOVICZ, V.; BARANA, A. C.; ALMEIDA, M. M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, vol. 6, nº 1, 2012. doi:10.3895/S1981-36862012000100004.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; SAMPAIO, G.; JUNIOR, A. C. R. B.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, vol. 4, nº. 2, p. 181–188, 2018. doi:10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188.

SBRT, **Biotecnologia na produção de alimentos-dossiê técnico**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. p. 1-32. 2011. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTY3Ng>.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.; VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol. 59, p. 426, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

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**, vol. 8, nº 3, p. 271-283, 2015. DOI: 10.1080/21553769.2015.1033653

SOARES, C. M. G.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas. **Portuguese Society for Microbiology Magazine**, p. 1-9, 2013.

SOARES, I. A., FLORES, A. C., MENDONÇA, M. M., BARCELOS, R. P., & BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 78, nº 2, p. 341-350, 2011.

SOCOL, C. R.; DA COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, vol. 1, nº 1, p. 52-71, 2017

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. **Food Technology and Biotechnology**. vol. 44, nº 2, p. 141–149, 2006.

SOUZA, F. R. A.; MUNIZ, C. B. O.; LIMA, C. A.; BORGES, E. M. E. S.; CAVALCANTE, L. E.; AMORIM, L. A. S.; QUEIROZ, J. C. F. Produção e avaliação de antibiótico obtido por fermentação semissólida pelo fungo *cda71*. **Revista Saúde & Ciência Online**, vol. 7, nº 2, p. 370-378, 2018.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. L. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; JUNIOR, A. P.; MAGALHÃES, P. O. A Biotechnology Perspective of Fungal Proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 46, nº 2, p. 337–46, 2015. doi:10.1590/S1517-838246220140359.

STEIGER, M. G.; BLUMHOFF, M. L.; MATTANOVICH, D.; SAUER, M. Biochemistry of microbial itaconic acid production. **Frontiers in Microbiology**, vol. 4, nº 23, p. 1-5, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00023

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, vol. 33, nº 6, p. 2267–2278, 2012. doi:10.5433/1679-0359.2012v33n6p2267.

TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida et al. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, vol. 9, nº 6, p. 2351-2382, 2017.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 81, p. 146-161, 2013.

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***, vol. 69, p. 1–17, 2011. doi:10.3114/sim.2011.69.01.

WANG, B. LI, H.; ZHU1, L.; TAN, F.; LI1, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI1, 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***, vol. 40, nº 6, p. 891–99, 2017. doi:10.1007/s00449-017-1753-7

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 CellFactories***, vol. 14, nº 1, p. 7, 2015. doi:10.1186/s12934-015-0190-z.

ZEN, C. K.; SILVA, K. P.; REINEHR, C.O.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Introdução da síntese de lipídios e proteínas por *Aspergillus niger*. ***Revista CIATEC-UPF***, vol.6, nº 2, p.40-47, 2014.

3. CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho relata que as linhagens de *A. welwitschiae* foram produtoras de ácido cítrico. O processo de mutação forneceu um organismo poderoso para a produção deste ácido, a linhagem UEL As 15.262/35, visto que ela não produz outros ácidos como glucônico e oxálico, sendo obtido o melhor perfil cromatográfico e com aumento de mais de 50% da produção. Mais estudos são necessários para otimizar outros parâmetros fermentativos e aumentar a produção.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L., BRAGULAT, M. R., CASTELLÁ G., CABAÑES, F. J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied Environmental and Microbiology**, p. 2650-2652. 1994.
- ABD EL-MONEIM, A.; SABIC, E. M. Beneficial effect of feeding olive pulp and *Aspergillus awamori* on productive performance, egg quality, serum/yolk cholesterol and oxidative status in laying Japanese quails. **Journal of Animal and Feed Sciences**, vol. 28, nº 1, p. 52–61, 2019.
- ACOSTA, L. A. **Análise dos meios de cultura para a produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger***. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas (SP), Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1994. Disponível em: <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/256588>. Acesso em: 14 nov. 2018.
- ADEDEJI, O. E.; EZEKIEL, O. O. Pretreatment of selected peels for Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: Purification and application in mango juice extraction. **Bioresource Technology Reports**, vol. 7, p. 100306, 2019.
- 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**, vol. 19, p. 557-564, 2019.
- AJALA, E. O.; AJALA, M. A.; OGUNNIYI, D. S.; SUNMONU, M. O. Kinetics of gluconic acid production and cell growth in a batch bioreactor by *Aspergillus niger* using breadfruit hydrolysate. **Journal of Food Process Engineering**, vol. 40, nº 3, 2017.
- AKRAM, M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell Biochemistry and Biophysics**, vol. 68, nº 3, p. 475–478, 2014.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K; WATSON, J.D. Molecular Biology of the Cell. 3ª edição. New York: **Garland Publishing**. 1994.

ALMEIDA, C. P.; ROCHA, J. C.; CARITÁ, J. S.; SOUZA, T. M. A.; SOUZA, P. V. S. Dossiê Técnico: Biotecnologia na Produção de Alimentos - Universidade de São Paulo – USP. **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**, 2011. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTY3Ng>

AMATO, A.; BECCI, A.; BEOLCHINI, F. Citric acid bioproduction: The technological Innovation change. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 40, nº 2, p. 199–212, 2020.

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

AUTA, H. S.; ABIDOYE, K. T.; TAHIR, H.; IBRAHIM, A. D.; ARANSIOLA, S. A. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Cultivated on *Parkia biglobosa* Fruit Pulp. **International Scholarly Research Notices**, p. 1-8, 2014.

BERCOVITZ, A.; PELEG, Y.; BATTAT, E.; ROKEM, J. S.; GOLDBERG, I. Localization of pyruvate carboxylase in organic acid producing *Aspergillus strains*. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 56, p. 1594–1597, 1990.

BIO-RAD. **Cromatography Aminex® HPLC Colluns**. Bulletin 6333, p. 1-4, 2012. Disponível em: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6333.pdf. Acesso em: 15 set. 2019.

BOWES, I.; MATTEY, M. The effect of manganese and magnesium ions on mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from *Aspergillus niger*. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 6, nº 4, p.219-222, 1979.

CARGILL. Acidulants and citrates supplier - Cargill North America. **Cargill**. Disponível em: <https://www.cargill.com/food-bev/na/citric-acid>. Acesso em: 13 nov. 2018.

CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; DELISI, R.; PAGLIARO, M. Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, vol. 11, nº 1, 2017.

CISION. **Markets, Research and Global Citric Acid Markets Report, 2011-2018 & 2019-2024**. 2019. Disponível em: <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-citric-acid-markets-report-2011-2018--2019-2024-300814817.html>. Acesso em: 15 de outubro de 2019

COSTA, L. M. A. S.; SOUZA, S. M. C.; ABREU, P. S.; BASTOS, C. V.; NASCIMENTO, M. N.; MALLETT, A. C. T. Citric Acid Production and Citrate Synthase Genes in Distinct Strains of *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, vol. 13, nº. 22, p. 2220–2226, 2014.

DIAS, M. **Comparação do perfil proteômico através da técnica de espectrometria de massas dos fungos *Aspergillus niger* e *Rhizopus microsporus* submetidos à estresse pela adição de cobre**. Tese de Doutorado - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2018.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 78–84, 2013.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. **Food Bioprocess Technology**, vol. 4, nº 4, p. 505–529, 2011.

DUARTE, E. A. A.; DAMASCENO, C. L.; OLIVEIRA, T. A. S.; BARBOSA, L. O. MARTINS, F. M.; SILVA, J. R. Q.; LIMA, T. E. F.; SILVA, R. M.; KATO, R. B.; BORTOLINI, D. E.; AZEVEDO, V.; GÓES-NETO, A.; SOARES, A. C. F. Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and not *A. niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, 2018.

EL-HOLI, M. A. AND AL-DELAIMY, K. S. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, vol. 2, nº 10, p. 356–359, 2003.

FOSTER, J. W. Chemical Activities of Fungi. **Academic Press, Inc.**, New York, p. 1-648, 1949.

FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, 2016.

FRIES, E. M. **Systema Mycologicum**. E. Mauritius, Gryphiswald, 1832.

FRISVAD, J. C.; MØLLER, L. L. H.; LARSEN, T. O.; KUMAR, R.; ARNAU, J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 102, nº 22, p. 9481–9515, 2018.

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, nº 23, p. 9727–9732, 2007.

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. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. **Scientific Reports**, vol. 7, nº 1, p. 1-9, 2017.

GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H. et al. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (Samson RA, Pitt JI, eds). **Plenum Press**, New York: 55–62, 1985.

GHERBAWY, Y.; ELHARIRY, H.; KOCSUBÉ, S.; BAHOBIAL, A.; DEEB, B. E. ALTALHI, A.; VARGA, J.; VÁGVÖLGYI, C. Molecular characterization of black *Aspergillus* species from onion and their potential for Ochratoxin A and Fumonisin B2 production. **Foodborne Pathogens and Disease**, vol. 12, nº 5, p. 414–23, 2015.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 20, p. 17-48, 2000.

GUIMARÃES, I. M. S. R. G. **Efeito do gênero sobre a distribuição tecidual de manganês em ratos tratados com dose neurotóxica desse metal**. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, 2015.

HANIF, K.; AKHTAR, N.; HAFEEZ, R. First report of *Aspergillus welwitschiae* as a postharvest pathogen of *Brassica campestris* seeds in Pakistan. **Journal of Plant Pathology**, nº 1, 2016.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.

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**, vol. 8, nº 5, 2013.

HOUBRAKEN, J. & SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1–51, 2011.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, vol. 86, p. 199–249, 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**, vol. 107, nº 1, p. 169–208, 2015.

IKEHATA, H.; ONO, T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. **Journal of Radiation Research**, vol. 52, nº 2, p. 115–125, 2011.

IKRAM-UL, H.; ALI, S.; QADEER, M. A.; IQBAL, J. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. **Bioresource Technology**, vol. 93, nº 2, p. 125–30, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1ª ed. digital, p. 1020, 2008.

JAKLITSCH, W. M.; KUBICEK, C. P.; SCRUTTON, M. C. Intracellular organisation of citrate production in *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 37, p. 823–827, 1991.

KARAM, E. A.; WAHAB, W. A. A.; SALEH, S. A. A.; HASSAN, M. E.; KANSOH, A. L.; ESAWY, M. A. Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 102, p. 694–703, 2017.

KIELBASSA, C.; ROZA, L.; EPE, B. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. **Carcinogenesis**, vol. 18, nº 4, p. 811–816, 1997.

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**, vol. 13, nº. 2, 1995.

KRONBAUER, M. **Aspectos comportamentais, bioquímicos e moleculares implicados no papel do magnésio nos distúrbios motores induzidos experimentalmente em ratos**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Maria (RS), 2019.

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**, vol. 101, p. 4063–4072, 2017.

KUBICEK, C. P. The role of the citric acid cycle in fungal organic acid fermentations. **Biochemical Society Symposia**, vol. 54, p. 113–126, 1988.

KUBICEK, C. P. AND ROHR, M. Aconitase and citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 50, nº 5, p. 1336-1338, 1985.

KUBICEK-PRANZ, E. M.; MOZELT, M.; RÖHR, M.; KUBICEK, C. P. Changes in the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, vol. 1033, nº 3, p. 250–255, 1990.

LIU, X.; JIANG, Z.; MA, S.; YAN, Q.; CHEN, Z.; LIU, H. High-Level production and characterization of a novel β -1,3-1,4-Glucanase from *Aspergillus awamori* and its potential application in the brewing industry. **Process Biochemistry**, 2020.

LOTFY, W.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, vol. 98, nº 18, p. 3470–3477, 2007.

MARKETWATCH. **Citric Acid Market 2019 Industry Demand, Share, Global Trend, Industry News, Business Growth, Top Key Players Update, Business Statistics and Research Methodology by Forecast to 2025**, 2019. Disponível em: <https://www.marketwatch.com/press-release/citric-acid-market-2019-industry-demand-share-global-trend-industry-news-business-growth-top-key-players-update-business-statistics-and-research-methodology-by-forecast-to-2025-2019-03-18>. Acesso em: 15 de outubro de 2019.

MARKOVITSI, D.; GUSTAVSSON, T.; BANYASZ, A. Absorption of UV radiation by DNA: spatial and temporal features. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, vol. 704, nº. 1-3, p. 21-28, 2010.

MARRIER, J. R.; BOULET, M. Direct determination of citric acid in milk with an improved, pyridine acetic anhydride method. **Journal of Dairy Science**, vol. 41, nº 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**, vol. 221, p. 19–28, 2016.

MASSI, F. P.; VIEIRA, K. M.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; FUNGARO, M. H. P. Tetraplex PCR reveals *Aspergillus welwitschiae* incidence in onion bulbs..In: **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014 Blucher Food Science Proceedings**, nº 1, vol.1. São Paulo: Editora Blucher, 2014.

MAX, B.; SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 41, nº 4, p. 862–875, 2010.

MEIXNER-MONORI, B.; KUBICEK, C. P.; HARRER, W.; SCHREFERL, G.; ROHR, M. NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the citric acid accumulating fungus *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**, vol. 236, nº 2, p. 549–57, 1986.

MIRGHANI, M. E. S. and AHMED KABBASHI, N. Production of citric acid from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* using submerged fermentation: **Biological and Natural Resources Engineering Journal**, vol. 2, nº 1, p. 47–55, 2019.

MUNIZ, M. C. S.; LIMA, B. F.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A. Seleção de amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de Pernambuco e produção de ácido cítrico por fermentação submersa. **E-xacta**: Editora UniBH, vol. 7, nº 2, p. 55-65, 2014.

NASRIN, S.; UNSARY, M. U.; ALAM, M. K. View of Optimization of Citric Acid Production by Substrate Selection Using Gamma Ray Induced Mutant Strain of *Aspergillus niger*. **Global Journal of Medical Research: Microbiology and Pathology**, vol. 17, nº 2, 2017.

NATARAJ, D.; REDDY, R.; REDDY, N. Crosslinking electrospun Poly (Vinyl) Alcohol fibers with citric acid to impart aqueous stability for medical applications. **European Polymer Journal**, vol. 124, 2020.

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

NIELSEN, K.F., MOGENSEN, J.M., JOHANSEN, M., LARSEN, T.O., FRISVAD, J.C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 395, p. 1225–1242, 2009.

NISHIDA, V. S.; OLIVEIRA, R. F.; BRUGNARI, T.; CORREA, R. C. G.; PERALTA, R. A.; CASTOLDI, R.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Immobilization of *Aspergillus awamori* β -Glucosidase on commercial gelatin: An inexpensive and efficient process. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 111, p. 1206–1213, 2018.

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

PALUMBO, J. D. & O'KEEFFE, T. L. Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 60, nº 2, p. 188–195, 2014.

PAPADAKI, E. and MANTZOURIDOU, F. T. Citric Acid Production from the Integration of Spanish-Style Green Olive Processing Wastewaters with White Grape Pomace by *Aspergillus Niger*. **Bioresource Technology**, vol. 280, p. 59–69, 2019.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, vol. 25, nº 3, p. 244–63, 2007.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 113, nº. 8, p. 1031-1051, 2011.

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**, vol. 13, nº 3, 2011.

PATEL, T.; PANDYA, H. Citric acid production fermentation process. **International Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education**, vol. 3, nº 2, p. 3983 – 3991, 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**, vol. 115, nº 11, p. 1138–1150, 2011.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, vol. 100, nº 2, p. 205–226, 2008.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Names in current use in the family *Trichocomaceae*. In: Names in current use in the family *Trichocomaceae*, *Cladoniaceae*, *Pinaceae*, and *Lemnaceae*. **Koeltz Scientific Books**, Königstein, Germany: 13–57, 1993.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. **Harwood Academic Publishers**, Amsterdam: 9–79, 2000.

PUNTEL, R. L. **Effect of Krebs Cycle intermediates on oxidative changes induced by different oxidant agents**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Maria (RS), 114 f, 2008.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol.1, nº 3, 1998.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. The genus *Aspergillus*. **Williams & Wilkins**, Baltimore, 1965.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2019.

REUTERS. **Citric Acid Market Analysis by Production, Demand Curve, Application, Trends, Manufactures, Competitive Landscape and Segment Forecasts 2019-2025**, 2019. Disponível em: <https://www.reuters.com/brandfeatures/venture-capital/article?id=78302>. Acesso em: 15 de outubro de 2019.

REVISTA-FI. Aplicações do ácido cítrico na indústria de alimentos. **Food Ingredientes Brasil**, nº 30, p. 96-103, 2014. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/402.pdf>

RODRIGUES. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, p. 1-93, 2006.

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.

SALEH, A. A.; GÁLIK, B.; ARPÁŠOVÁ, H.; CAPCAROVÁ, M.; KALAFOVÁ, A.; ŠIMKO, M.; JURÁČEK, M.; ROLINEC, M.; BÍRO, D.; ABUDABOS, A. Synergistic effect of feeding *Aspergillus awamori* in laying hens. **Italian Journal of Animal Science**, vol. 16, p. 132–139, 2017.

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

SANTAMARIA, A. B. Manganese exposure, essentiality & toxicity. **Indian Journal of Medical Research**, vol. 128, p. 484 - 500, 2008.

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. Dissertação de mestrado –Faculdade de Engenharia Química de Lorena, p. 1-81, 2005.

SCAINI, G.; ROCHI, N.; BENEDET, J.; FERREIRA, G. K.; TEODORAK, B. P.; COMIM, C. M.; CONSTANTINO, L. S.; VUOLO, F.; CONSTANTINO, L. C.; QUEVEDO, J.; STRECK, E. L.; DAL-PIZZOL, F. Inibição da atividade da citrato sintase cerebral em um modelo animal de sepse. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, vol. 23, nº 2, p. 158-163, 2011.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.109, nº 16, p. 6241–6246, 2012.

SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. **Biochemical Journal**., vol. 114, nº 3, p. 597-610, 1969.

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**, vol. 8, nº 3, p. 271-283, 2015.

SILVA, J. H. **Deficiência das enzimas do ciclo de Krebs**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal, 2016.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas. **Portuguese Society for Microbiology Magazine**, p.1-9, 2013.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; PANDEY, A. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**, vol. 44, nº 2, p. 141–149, 2006.

SOUZA, A. F. **Produção simultânea de bioemulsificante e lipídeos por *Candida lipolytica* UCP 0988 utilizando substratos agroindustriais**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

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**, vol. 52, p. 224–231, 2019.

SUSCA, A.; MORETTI, A.; STEA, G.; VILLANI, A.; HAIDUKOWSKI, M.; LOGRIECO, A.; MUNKVOLD, G. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 75–82, 2014.

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**, vol. 7, 2016.

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**, vol. 18, 2019.

TORRES, N. Modelling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger* I. Model definition and stability of the steady state. **Biotechnology Bioengineering**, vol. 44, p. 104–111, 1994.

TSANG, C. C.; TANG, J. Y. M.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, vol. 16, p. 197–210, 2018.

VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; CARVALHO, J. C.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Production and application of citric acid. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 557–575, 2017.

VAN DER STRAAT, L.; VERNOOIJ, M.; LAMMERS, M.; VAN DEN BERG, W.; SCHONEWILLE, T.; CORDEWENER, J.; VAN DER MEER, I.; KOOPS, A.; DE GRAAFF, L. H. Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*. **Microbial Cell Factories**, vol. 13, p. 1–9, 2014.

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

VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; BARANYI, N.; VÁGVÖLGYI, C.; DESPOT, D. J.; MAGYAR, D.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A.; KLARIĆ, M. S. Occurrence of black *Aspergilli* in indoor environments of six countries. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, vol. 65, nº 2, p. 219–23, 2014.

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

VON HERTWIG, A. M. ***Aspergillus* toxigênicos em café e cacau: incidência, produção de micotoxinas e discriminação molecular de espécies de *Aspergillus niger* por PCR em tempo real**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas (SP), 2015.

WANG, B. LI, H.; ZHU1, L.; TAN, F.; LI1, Y.; ZHANG, L.; DING, Z.; SHI1, 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**, vol. 40, nº 6, p. 891–99, 2017.

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**, vol. 14, nº 1, p. 7, 2015.

WAYMAN, F. M.; MATTEY, M. Simple diffusion is the primary mechanism for glucose uptake during the production phase of the *Aspergillus niger* citric acid process. **Biotechnology & Bioengineering**, vol. 67, p. 451–456, 2000.

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**, 2010.

APÊNDICE

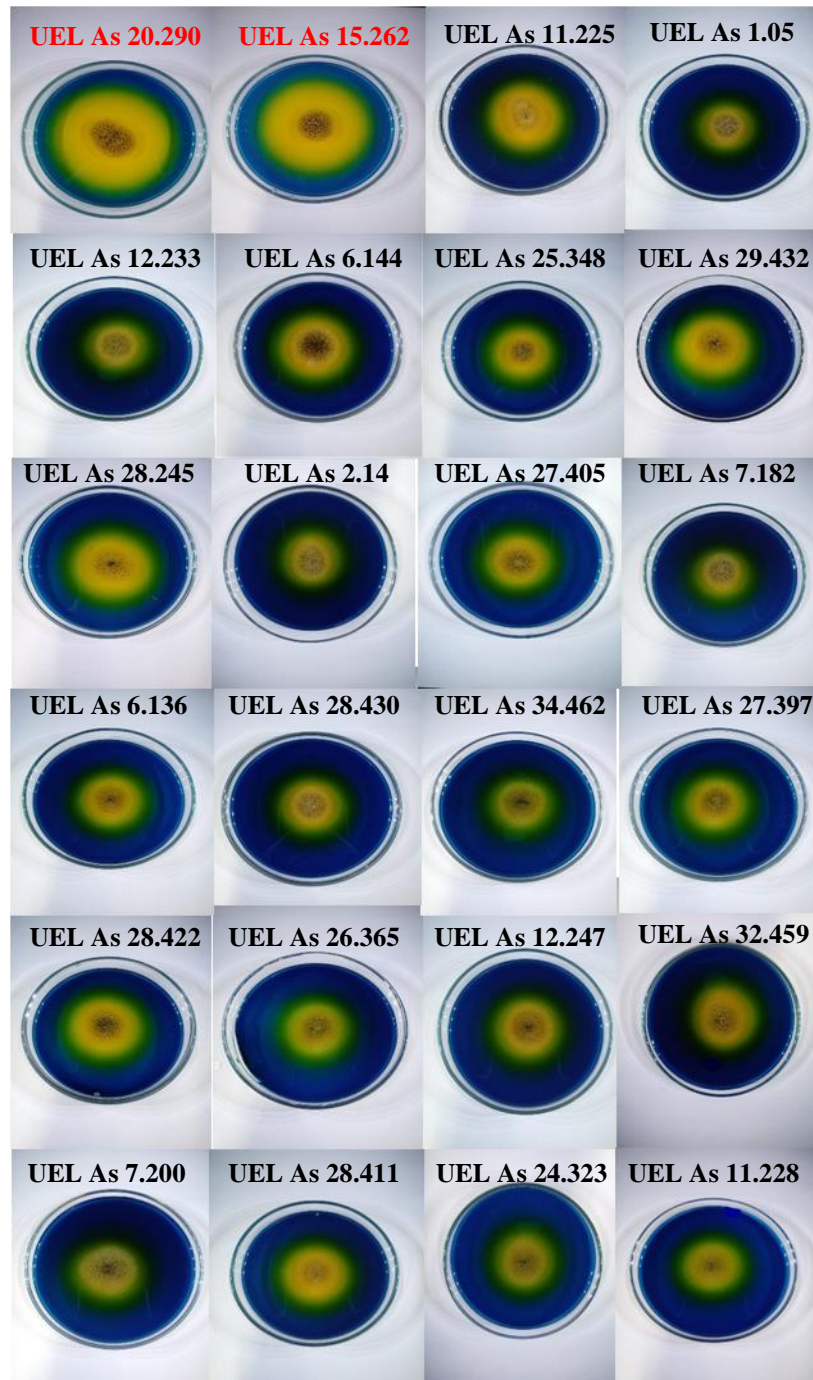


Figure 1: Citric acid production by *Aspergillus welwitschiae* strains in Foster medium at 28 °C in 96 hours

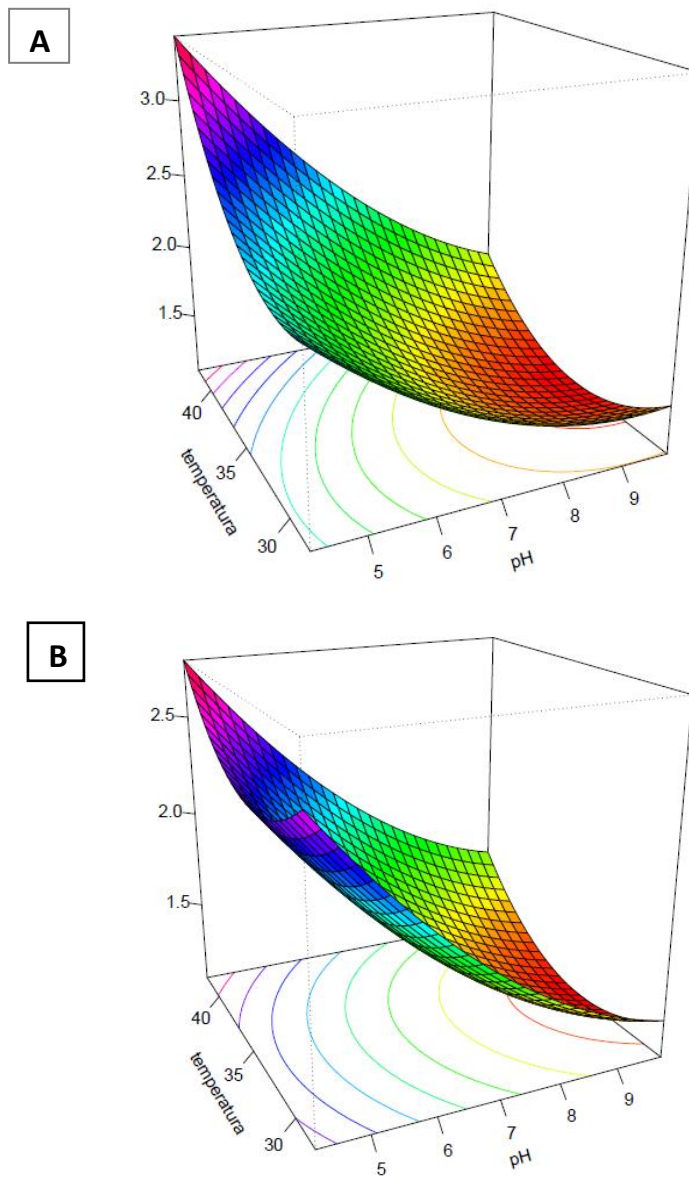


Figure 2: Response surface of pH and temperature variation tests for UEL As 15.262 strain (A) and UEL As 20.290 strain (B) in Foster medium

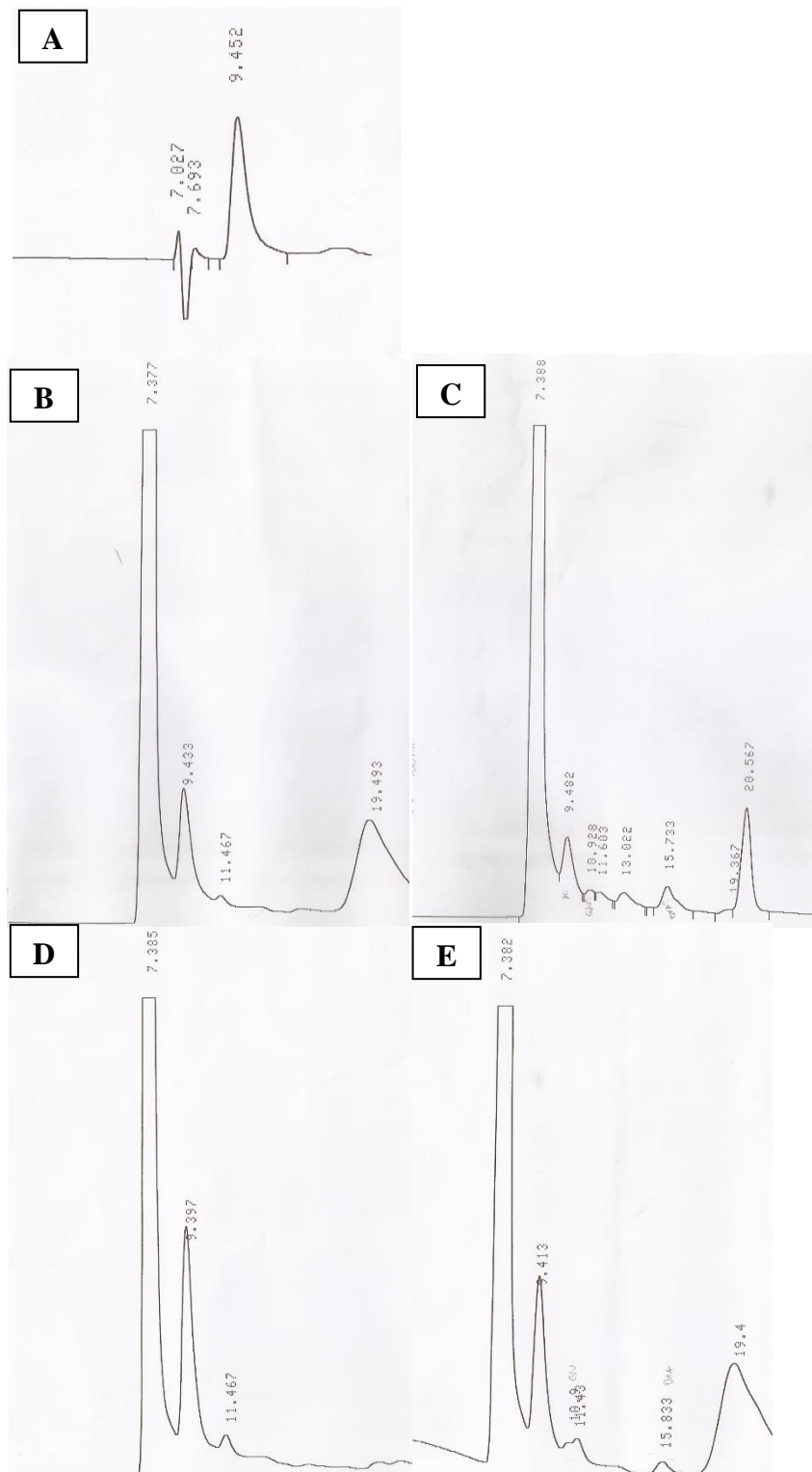


Figure 3: HPLC detection and quantification of citric acid produced by strains under Submerged Fermentation in Prescott and Dunn medium. The retention time for citric acid was approximately 9.4 minutes. **A)** Citric acid standard (50 mg/L); **B)** UEL As 15.262 strain on the tenth day; **C)** UEL As 20.290 strain on the seventh day; **D)** UEL As 15.262/35 mutant strain on the tenth day **E)** UEL As 15.262/50 mutant strain on the tenth day

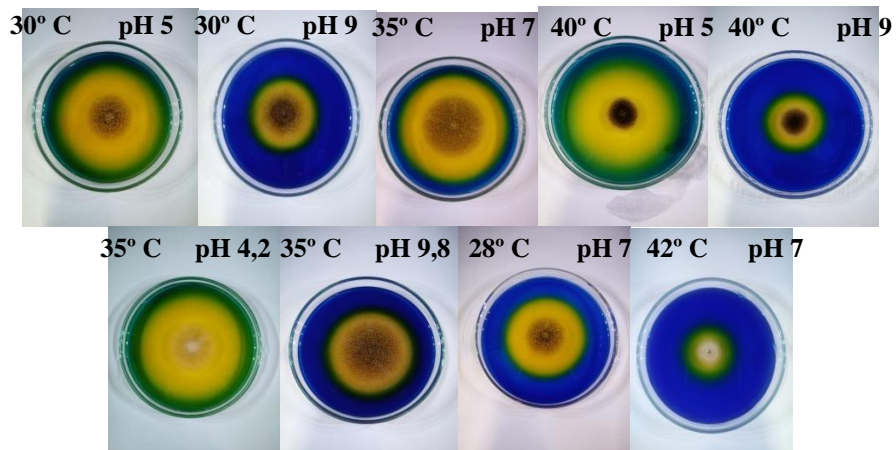


Figure 4: Citric acid production in different abiotic factors by UEL As 15.262 strain in Foster medium

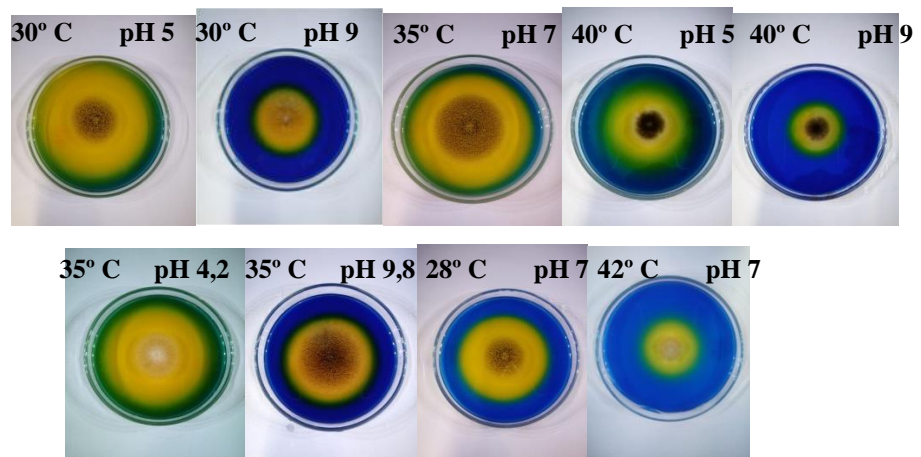


Figure 5: Citric acid production in different abiotic factors by UEL As 20.290 strain in Foster medium