



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente



HILÉIA CAMARGO RIBEIRO FRANÇA

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

ARARAS

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente



HILÉIA CAMARGO RIBEIRO FRANÇA

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 apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente - Centro de Ciências Agrárias/UFSCar para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

ARARAS

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F814p

França, Hiléia Camargo Ribeiro
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 / Hiléia Camargo Ribeiro França. -- São
Carlos : UFSCar, 2016.
96 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Cultivo em estado sólido. 2. Bagaço de cana-de-
açúcar. 3. Vinhaça. 4. Consórcio microbiano. 5. Ácido
cítrico. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Hiléia Camargo Ribeiro França, realizada em 28/03/2016:

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
UFSCar

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar

Dedico este trabalho ao meu pai, maior exemplo de perseverança na busca do conhecimento e que apesar das dificuldades, soube transmitir toda sua sabedoria, amor e apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me mostrar o caminho principalmente nas horas incertas.

Aos meus pais Mario Ribeiro “no coração” e Nanci Rodrigues de Camargo, pela paciência e sabedoria. Por acreditarem em minha capacidade e estarem sempre comigo, guiando meus passos com imenso amor e carinho.

Ao meu marido Carlos Renato Mendes França, por ser tão especial, sempre ao meu lado, com muito amor e carinho. Pelo seu inestimável apoio, fazendo-me sorrir até nos momentos mais difíceis, deixando minha vida mais doce e feliz.

À oportunidade dada pelo meu orientador Reinaldo Gaspar Bastos, simplesmente incrível, sempre muito paciente e presente, tornando este trabalho leve e agradável. Um exemplo extraordinário de profissional.

Ao Luiz Felipe Arjonilla de Mattos pelos milhares de socorros prestados, pela amizade e boas pizzas.

A todos do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC), em especial a Gabriela Silveira, Maria Paula Volpi, Carolina Codato, Luis Carlos Andreatto, Ernestina Gabone, Afra Vital e Cláudia Rossi pela amizade, ajuda e descontração.

Ao programa de pós-graduação pela chance e ao financiamento da CAPES, que tornou possível minha dedicação exclusiva a esta pesquisa.

A todos que passaram pela minha vida, em especial minha linda e inesquecível Dhara que me proporcionou momentos de imensa felicidade, ensinando-me muito sobre o amor e carinho, e aos que persistem nela e contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
1. INTRODUÇÃO.....	08
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Cultivo em estado sólido.....	12
3.2 Subprodutos da indústria sucroalcooleira.....	14
3.3 Micro-organismos.....	16
3.4 Uso de consórcios microbianos em processos biotecnológicos.....	18
3.5 Produção microbiana de ácido cítrico.....	20
3.6 Fermentação etanólica.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Inóculo.....	28
4.2 Bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça.....	29
4.3 Ensaio preliminares com partículas de bagaço de cana-de-açúcar submersas.....	30
4.4 Ensaio com bagaço de cana-de-açúcar em biorreator tipo coluna de leito fixo.....	32
4.5 Ensaio de fermentação etanólica do extrato fúngico.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Ensaio preliminares de produção de ácido cítrico a partir de partículas de bagaço de cana-de-açúcar submersas.....	35
5.2 Ensaio em biorreator tipo coluna de leito fixo.....	39
5.2.1 Cultivo em estado sólido de <i>Aspergillus niger</i> em bagaço de cana de açúcar.....	39
5.2.2 Cultivo em estado sólido de <i>Trichoderma reesei</i> em bagaço de cana de açúcar.....	48
5.2.3 Cultivo em estado sólido do consórcio de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma reesei</i> em bagaço de cana de açúcar.....	52
5.2.4 Análise de parâmetros de processo no cultivo em estado sólido de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma reesei</i> em bagaço de cana de açúcar.....	57
5.3 Ensaio de fermentação etanólica do extrato fúngico.....	59

6. CONCLUSÕES.....	68
7. SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9. ANEXO.....	78

RESUMO

O cultivo em estado sólido (CES) caracteriza-se pelo crescimento microbiano em suportes sólidos, muitas vezes subprodutos agroindustriais, em condições próximas da ausência de água livre. Ácido cítrico e etanol são importantes bioprodutos comerciais utilizados em vários setores industriais, os quais poderiam ser obtidos agregando o CES de fungos a partir de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça, com posterior fermentação, minimizando o custo de sua produção com o aproveitamento de dois subprodutos industriais. O consórcio de fungos apresenta vantagens sobre as culturas isoladas, destacando-se no melhor aproveitamento dos substratos devido à complementação enzimática, principalmente em termos de hidrolases. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o CES de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* isoladamente para a produção de ácido cítrico a partir de bagaço de cana-de-açúcar impregnado com soluções distintas (sacarose e vinhaça), assim como o consórcio destes fungos, seguido de fermentação etanólica do extrato fúngico por leveduras. As etapas experimentais desta dissertação compreendem o cultivo de *A. niger* para produção de ácido cítrico a partir de partículas de bagaço de cana-de-açúcar submersas; CES de *A. niger* e *T. reesei* isoladamente e consorciados utilizando como soluções impregnantes água deionizada com e sem sacarose e vinhaça bruta e pré-tratada com hidrólise ácida; fermentação etanólica do extrato fúngico por *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados indicam a viabilidade do cultivo de *Aspergillus niger* em partículas de bagaço de cana-de-açúcar submersas com produção de ácido cítrico em meio com adição de sacarose. O CES deste fungo a partir de bagaço de cana-de-açúcar levou a uma produção máxima de 103 mg L⁻¹ de ácido cítrico em 4 dias sem adição de sacarose ao meio sólido. Da mesma forma, *Trichoderma reesei* apresentou crescimento em bagaço de cana-de-açúcar, com destaque para a produção de ácido cítrico em torno de 67 mg L⁻¹ com vinhaça bruta em 1 dia. A produção específica de 2,51 mg g⁻¹h⁻¹ em termos de ácido cítrico foi obtida com o consórcio fúngico, superior ao obtido empregando os dois fungos isoladamente. Os ensaios de fermentação etanólica por *Saccharomyces cerevisiae* a partir do extrato fúngico obtido pelo CES indicaram que é viável a obtenção de um segundo bioproduto, com destaque para o elevado rendimento de glicose em etanol para a condição de extrato obtido a partir de *T. reesei* sem sacarose em 5 dias. Os resultados da pesquisa indicaram a viabilidade no aproveitamento de dois subprodutos importantes do setor sucroenergético via consórcios microbianos por CES, possibilitando um campo de pesquisas interessante devido aos seus diversos aspectos científicos e regionais.

Palavras-chave: cultivo em estado sólido, bagaço de cana-de-açúcar, vinhaça, consórcio microbiano, ácido cítrico, etanol

ABSTRACT

Solid-state cultivation (SSC) are characterized by microbial growth on solid supports, often agroindustrial by-products, in conditions of absence of free water. Citric acid and ethanol are important commercial bioproducts used in various industrial sectors, which could be obtained by SSC of fungi from bagasse sugarcane and vinasse, with subsequent fermentation, minimizing the cost of production with the use two industrial byproducts. Fungi consortium has advantages over the isolated cultures, highlighting the best use of substrates due to enzyme supplementation, especially in terms of hydrolases. In this sense, the aim of this research was to evaluate the SSC of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* alone for the production of citric acid from sugarcane bagasse impregnated with different solutions (sucrose and vinasse) and the consortium of these fungi followed by ethanol fermentation of fungal yeast extract. The experimental steps set up the cultivation of *A. niger* for production of citric acid from submerged particles of sugarcane bagasse; SSC of *A. niger* and *T. reesei* alone and mixed using as impregnating with and without sucrose solution and vinasse pretreated with acid hydrolysis; ethanol fermentation of fungal extract by *Saccharomyces cerevisiae*. Results indicate the feasibility of *Aspergillus niger* growth on submerged particles of sugarcane bagasse for citric acid production in medium with addition of sucrose. SSC of this fungus from sugarcane bagasse resulted in 103 mg L⁻¹ of citric acid content in 4 days without addition of sucrose to the solid medium. Similarly, SSC of *Trichoderma reesei* in sugarcane bagasse leads citric acid production around 67 mg L⁻¹ with raw vinasse in the first growth day. Specific production of 2.51 mg g⁻¹ h⁻¹ in terms of citric acid was obtained from the fungal consortium higher than that obtained using the two fungi alone. Ethanol fermentation tests by *Saccharomyces cerevisiae* from the fungal extract obtained by the SSC indicated that it is feasible to obtain a second bioproduct, especially high yield of glucose into ethanol to extract condition obtained from *T. reesei* without sucrose in 5 days. Results suggests the viability in the use of two important by-products of the sugarcane industry via microbial consortium by SSC, leading an interesting research field with various scientific and regional aspects.

Key-words: solid-state cultivation, sugarcane bagasse, vinasse, microbial consortium, citric acid, ethanol

1. INTRODUÇÃO

O processo conhecido como “cultivo em estado sólido” (CES), “fermentação em estado sólido” ou ainda “fermentação semi-sólida” refere-se ao crescimento microbiano em suportes sólidos em condições próximas à ausência de água livre, ou seja, similares à ocorrência principalmente de fungos na natureza (PANDEY, 2003). Este processo tem apresentado um potencial tecnológico considerável na indústria química, alimentícia, farmacêutica e agrícola por requerer pouca energia, baixa produção de resíduos, ser ambientalmente correto utilizando diversos resíduos agroindustriais como substrato e apresentar vantagens em relação à fermentação submersa como a obtenção de produtos mais concentrados e um maior rendimento em alguns metabólitos (GUTIÉRREZ-CORREA; VILLENA, 2003).

Dentre os diversos micro-organismos que podem ser cultivados a partir de suportes sólidos, de fato, os fungos filamentosos se destacam devido as suas características fisiológicas e bioquímicas, sendo os Phycomycetes (*Mucor* e *Rhizopus*), Ascomycetes (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*), Basidiomycetes (*Polysporus*) e Hyphomicetes (*Dreschlera monoceras*) as classes mais estudadas (PANDEY, 1992; MENEZES et al., 1995; HASAN et al. 2003).

Dados da literatura fomentam que consórcios fúngicos apresentam vantagens em relação ao uso de culturas únicas, pois utilizam melhor o substrato levando a um maior rendimento, são mais adaptados e resistentes a contaminações por outros micro-organismos devido a interações sinérgicas que ocorrem entre eles (AHAMED; VERMETTE, 2008). Nesse sentido, a associação entre os fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* é conhecida para a produção de enzimas hidrolíticas. Entretanto, há uma lacuna no conhecimento sobre este consórcio na geração de outros bioprodutos como ácido cítrico por cultivo em estado sólido, no qual *A. niger* é um dos fungos filamentosos mais utilizados em termos industriais (KUMAR et al., 2003; STOILOVA; GARGOVA; KRASTANOV, 2005).

O ácido cítrico é um importante produto comercial, utilizado principalmente pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (VANDENBERGHE et al., 2000; KHOSRAVI-DARANI; ZOGHI, 2008). Sua produção global é acima de

1,7 milhão de toneladas/ano, ocorrendo um aumento anual de 5% na sua demanda, o que torna necessário o desenvolvimento de novos processos de obtenção desta molécula (DHILLON et al., 2013).

Apesar de a maior parte do ácido cítrico ser produzido por *A. niger* em fermentação submersa, processos utilizando o cultivo em estado sólido vem ganhando destaque e a utilização de resíduos agroindustriais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado eficiente em pesquisas (PANDEY et al., 2000).

O bagaço de cana-de-açúcar representa uma matriz praticamente inerte, sendo necessário impregná-lo e umidificá-lo com uma solução nutriente para os processos em estado sólido (KUMAR et al., 2003). A vinhaça, um dos principais subprodutos da indústria sucroalcooleira, pode ser considerada como solução nutriente, minimizando o custo de produção e aproveitando dois subprodutos gerados na mesma plataforma industrial. Não foram encontrados na literatura, trabalhos que utilizem águas residuárias agroindustriais como solução nutriente para impregnar matrizes sólidas.

Os produtos obtidos por CES geralmente são separados de um extrato que pode ser aquoso ou obtido a partir de solventes orgânicos. Considerando o efeito de hidrolases fúngicas no bagaço de cana-de-açúcar, há uma liberação de glicose neste extrato, sendo que outros produtos poderiam ser gerados a partir desta fonte de carbono. Nesse sentido, o etanol de segunda geração pode ser definido como o produto obtido pela fermentação etanólica de materiais lignocelulósicos, o qual poderia otimizar em cerca de 30% a 50% a produção de deste biocombustível, minimizando os impactos ambientais causados pela geração de bagaço (SILVA, 2012). Uma das dificuldades desta tecnologia é a degradação de celulose, principal componente da biomassa vegetal responsável pela geração de grande parte das hexoses. Sendo assim, pode-se considerar a hidrólise enzimática da celulose por fungos, principalmente pelo *Trichoderma reesei*, reconhecidamente capaz de produzir diversas celulasas extra-celulares, as quais seriam excretadas pelos micro-organismos durante a produção de ácido cítrico por CES, dispondo no meio pentoses e hexoses que podem ser convertidas em etanol por leveduras.

Neste sentido, o presente trabalho avaliou a produção de ácido cítrico através do consórcio de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* em cultivo em

estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e outras soluções e a posterior introdução de leveduras para produção de etanol, buscando desta forma a geração de dois bioprodutos em um mesmo sistema de cultivo.

2. OBJETIVOS

Avaliar a produção de ácido cítrico por cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* e consórcio destes em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com soluções distintas, avaliando ainda a viabilidade de obtenção de etanol por leveduras a partir do hidrolisado microbiano obtido.

Objetivos específicos

- Obter e caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar e a vinhaça obtidos do setor sucroalcooleiro da região de Araras;
- Montar um sistema de cultivo em estado sólido em biorreatores tipo coluna de leito fixo contendo bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar o cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* isoladamente e utilizando um inóculo consorciando ambos micro-organismos, com avaliação das soluções impregnantes, perfis de glicose, ácido cítrico e produtividade;
- Selecionar a condição de cultivo em estado sólido que permita a maior produtividade específica de ácido cítrico e liberação de glicose no extrato fúngico;
- Avaliar a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir do extrato fúngico obtido via cultivo em estado sólido com bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar a viabilidade técnica do processo de obtenção conjunta de ácido cítrico e etanol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultivo em estado sólido

O cultivo em estado sólido (CES) tem se destacado em vários bioprocessos por necessitar de baixo investimento e consumo de energia, além de reaproveitar resíduos agroindustriais (PRADO et al., 2004; COUTO e SANROMÁN, 2006; SINGHANIA et al., 2009). Este processo pode ser definido como o crescimento de micro-organismos em uma matriz sólida na ausência ou quase ausência de água livre. O suporte sólido pode ser um material natural ou inerte com umidade suficiente para o desenvolvimento microbiano (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SINGHANIA et al., 2009).

Estes processos diferem-se dos cultivos microbianos submersos (CS) pela quantidade de água livre presente no meio. Apesar da ocorrência muito antiga, os CES foram pouco estudados durante o desenvolvimento da biotecnologia industrial nos anos 1940, possivelmente devido à descoberta da penicilina que ocorreu em CS. Após ser muito negligenciado, o CES voltou a receber atenção dos pesquisadores em 1970 com a produção de micotoxinas e atualmente vem apresentando resultados promissores no desenvolvimento de vários processos biotecnológicos (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; GUTIÉRREZ-CORREA; VILLENA, 2003; PANDEY, 2003). Nesse sentido, os CES apresentam diversas vantagens quando comparados com os cultivos microbianos submersos. Como vantagens biológicas são citadas a baixa demanda de água, utilização de substratos insolúveis em água e fontes de carbono pouco usuais, muitas vezes resíduos, além da similaridade com o ambiente natural de muitos fungos filamentosos. Em relação ao processo destaca-se a elevada produtividade volumétrica, devido à alta concentração obtida, facilitada recuperação de produtos em muitos casos e reduzidas exigências energéticas. No entanto, estes sistemas podem apresentar alguns problemas como a ocorrência de gradientes de temperatura, umidade, oxigênio e nutrientes. Além disso, estes processos apresentam desvantagens tais como a utilização apenas de micro-organismos que se desenvolvam em baixos níveis de umidade e atividade de água, dificuldades na medida e controle dos parâmetros, necessidade de elevadas concentrações de inóculo, em muitos

casos a exigência de pré-tratamento do suporte sólido e, por consequência de todos estes aspectos, dificuldades no escalonamento do processo (OOIJKAAS et al., 2000; GUTIÉRREZ-CORREA; VILLENA, 2003).

Diversos aspectos devem ser levados em consideração para o desenvolvimento de bioprocessos por CES, tais como a seleção adequada de micro-organismos, o suporte sólido e substrato a ser utilizado, a otimização dos parâmetros envolvidos no processo, assim como a recuperação e purificação do bioproduto (PANDEY, 2003).

O desenvolvimento de micro-organismos em estado sólido pode ser caracterizado pelo crescimento em biofilme ou por adesão em superfícies (GUTIÉRREZ-CORREA; VILLENA, 2003). Assim, diversos micro-organismos podem ser utilizados no processo, embora exista uma facilidade maior para fungos filamentosos, devido a menor disponibilidade e atividade de água do meio sólido. A adesão microbiana nos suportes sólidos ocorre devido a uma classe de proteínas de baixa massa molar, conhecidas como hidrofobinas, produzidas principalmente por ascomicetos, basidiomicetos e zigomicetos, (WESSELS 1996; LINDER et al. 2005).

Outro aspecto fundamental é a seleção do suporte mais adequado, sendo que o material sólido não solúvel pode ser natural, contendo fonte de carbono que será consumida, ou um suporte inerte impregnado de solução nutriente (OOIJKAAS et al. 2000). Estas matrizes sólidas podem variar na sua composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água (DURAND 2003). Como materiais inertes usados como suportes para os CES são reportados o poliuretano, poliestireno, nylon, alumina, amberlite entre outros. Por outro lado, com relação aos suportes naturais tem-se despertado o interesse no aproveitamento de resíduos agrícolas e agroindustriais, tais como farelos de trigo, soja, arroz e bagaço de cana-de-açúcar (PANDEY et al., 2000; OOIJKAAS et al., 2000; SABU et al., 2001). Neste caso, além de serem fontes de carbono de baixo custo, a sua utilização minimiza os problemas ambientais destes subprodutos.

Outra questão relevante é a otimização de parâmetros na busca de maiores produtividades e rendimentos, como tamanho e geometria das partículas sólidas, umidade, pH, temperatura, idade e tamanho do inóculo,

presença de contaminantes e inibidores, além da suplementação de nutrientes ao meio de cultivo (PANDEY, 2003).

O cultivo em estado sólido apresenta um futuro promissor e, embora testado principalmente em escala laboratorial, pode ser aplicado na indústria, para a geração de produtos de valor agregado, como metabólitos secundários, biossurfactantes, biocombustível, ácidos orgânicos, enzimas entre outros, fornecendo também serviços de biorremediação e biodegradação com a utilização de resíduos agro-industriais (SINGHANIA et al., 2009).

3.2 Subprodutos da indústria sucroalcooleira

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo com aproximadamente 652 milhões de toneladas por ano, as quais são destinadas principalmente à produção de açúcar e álcool (CONAB, 2013; MAPA, 2014). O bagaço é o resíduo resultante da extração do caldo da cana-de-açúcar, sendo que, para cada tonelada de cana, obtém-se em média 280 kg de bagaço, gerando assim aproximadamente 2,32 milhões de toneladas destes subproduto por ano no Brasil (SUN et al., 2004; MAZUTTI et al., 2006).

Constituído basicamente de 50% de celulose, 30% de açúcares e 2,5% de cinzas, o bagaço é deixado no campo para a decomposição por micro-organismos ou é utilizado na produção de energia alimentando as caldeiras industriais (MAZUTTI et al., 2006; CORTEZ et al. 2008), apesar da sua citada aplicação como suporte para cultivos em estado sólido (KUMAR et al., 2003). Sendo assim, uma alternativa promissora para o seu uso na obtenção de produtos de interesse comercial com maior valor agregado, gerando outra fonte de renda para os produtores e minimiza o impacto ambiental da queima ou simples disposição no solo. Entretanto o sucesso destes aproveitamentos biotecnológicos dependem do desenvolvimento e estudo de técnicas atrativas e viáveis em escala industrial (PANDEY et al., 2000).

A complexa estrutura e a composição do bagaço de cana-de-açúcar o torna resistente à bioconversão, sendo necessário em muitos casos um pré-tratamento para aumentar a digestibilidade da biomassa, solubilizando e/ou degradando parcialmente a lignina e a hemicelulose, fazendo com que a celulose se torne mais acessível ao ataque microbiano (CHANDEL et al., 2012). Nesse

sentido, diversos métodos de pré-tratamento são encontrados na literatura, físicos (moagem, diminuindo o tamanho das partículas), químicos (ácidos e alcalinos), físico-químicos (auto-hidrólise), biológicos (utilização de micro-organismos) (CHANDEL et al., 2012). A escolha do método está intimamente relacionada ao rendimento, consumo de energia e insumos, segurança, geração de compostos inibidores aos microrganismos e enzimas utilizadas na bioprodução, custo dos reagentes e reaproveitamento dos mesmos (NASCIMENTO, 2011). Comparando os pré-tratamentos encontrados, o método químico alcalino exibe um maior rendimento, enquanto o biológico apresenta um menor custo e consumo de energia (PANDEY; SOCCOL; NIGAM; SOCCOL, 2000; KHOSRAVI-DARANI; ZOGHI, 2008; CHANDEL et al., 2012).

Por outro lado, o uso como suporte para CES de fungos filamentosos não exige etapas de pré-tratamento mais rígidas, uma vez que estes microrganismos usualmente apresentam a habilidade de sintetizarem hidrolases capazes de permitirem o aproveitamento dos polissacarídeos estruturais do bagaço.

A vinhaça é um subproduto da indústria alcooleira que representa um grave problema ambiental, devido ao grande volume gerado e alta demanda biológica de oxigênio (NAVARRO; SEPÚLVEDA; RUBIO, 2000; MADEJÓN et al., 2001). Para cada litro de etanol produzido, é formado aproximadamente 10 a 15 litros de vinhaça, totalizando aproximadamente 354,6 milhões de litros por ano deste resíduo no Brasil (MARIANO et al., 2009; CONAB, 2013).

Sua composição química é variável, mas geralmente a vinhaça apresenta coloração clara, consistindo basicamente de 93% de água e 7% de sólidos orgânicos e minerais, possui alta turbidez, pH baixo, altos níveis de matéria orgânica, potássio e cálcio e quantidades moderadas de nitrogênio e fósforo (MARIANO et al., 2009).

Vários destinos podem ser empregados para minimizar o impacto causado pela vinhaça. A compostagem é um exemplo muito comum, onde a reciclagem da matéria orgânica dos resíduos atenua déficits dos mesmos em culturas (MADEJÓN et al., 2001). Sua concentração e incineração também são relatados, mas esta técnica apresenta custo elevado, além de causar poluição atmosférica (NAVARRO; SEPÚLVEDA; RUBIO, 2000).

A aplicação direta da vinhaça no solo é outra forma de utilizá-la, por ser uma fonte de compostos nitrogenados, principalmente de potássio, sua aplicação em quantidades adequadas pode trazer benefícios à agricultura além da economia em fertilizantes (PARNAUDEAU et al., 2008). A dosagem permitida de vinhaça no solo é calculada através de legislações específicas, pois seu uso exagerado afeta a qualidade da cana, além de contaminar águas subterrâneas, alterar a atividade microbiana, biomassa e química do solo (PAULINO et al., 2002; MARIANO et al., 2009).

Devido a capacidade limitada das técnicas atuais e dos solos em receber vinhaça, tecnologias alternativas são necessárias. Pesquisas relatam que sua reciclagem em biorreatores ou utilização como fonte de energia para micro-organismos são destinos promissores, ocorrendo um aumento da atividade microbiana na biodegradação de poluentes e para produção de diversos compostos de interesse comercial (MARIANO et al., 2009).

3.3 Micro-organismos

Diversos micro-organismos podem ser cultivados em suportes sólidos. No entanto, os fungos filamentosos possuem a melhor capacidade de crescer nestas condições devido às suas características fisiológicas e bioquímicas (PANDEY et al., 2000). Sendo assim, dentre as classes mais estudadas podemos citar Phycomycetes (*Mucor* e *Rhizopus*), Ascomycetes (*Aspergillus* e *Penicillium*) e Basidiomycetes (*Polysporus*) (PANDEY, 1992) e Hyphomycetes (*Drechslera monoceras*) (MENEZES et al., 1995; HASAN et al, 2003).

Nesse sentido, gênero da ordem Eurotiales, os *Aspergillus* são saprófitos anamorfos, e compreendem entre 260 e 837 espécies, com aproximadamente dez diferentes gêneros teleomorfos (KRIJGSHELD et al., 2011; LEEUWEN et al., 2011). São os fungos mais abundantes no mundo e são encontrados em diversos tipos de substrato. Não são seletivos, crescem em ambientes e condições abióticas de pouca umidade e resistem a temperaturas de 6 – 55°C (KRIJGSHELD et al., 2011). O sucesso do gênero também está ligado à sua dispersão efetiva, no qual seus esporos são estruturas predominantes no ar, sendo dispersos a grandes distâncias (BENNET, 2010).

Pesquisas indicam que algumas espécies deste gênero podem ser patógenos de plantas, ou causar aspergilose em animais e humanos com o sistema imune comprometido (PITT, 1994; BRANKHAGE, 2005; PAWAR et al., 2008;).

Espécies de *Aspergillus* secretam uma grande quantidade de enzimas como amilases, xilanases e pectinases além de diversos metabólitos como ácidos orgânicos, tornando espécies como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae* e *A. terreus*, atrativas no desenvolvimento de bioprocessos (MEYER et al. 2011).

O *Aspergillus niger* é uma das espécies mais utilizadas na biotecnologia industrial em cultivos submersos e estado sólido devido a sua eficiente produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos, com destaque para a produção de ácido cítrico (KUMAR et al., 2003; ANDERSEN et al., 2011) .O ácido cítrico é um importante produto comercial, com uma produção global acima de um milhão de toneladas/ano (KHOSRAVI-DARANI; ZOGHI, 2008). A maior parte do ácido cítrico é produzido por *Aspergillus niger* em fermentação submersa utilizando meios com amido ou sacarose. A indústria de alimentos é a maior consumidora de ácido cítrico, perfazendo quase 70% do total produzido, seguido da farmacêutica. Há ainda um aumento anual de aproximadamente 4% na demanda deste bioproduto, o que implica na busca pelo desenvolvimento de novos processos. Apesar da principal via de obtenção do ácido cítrico ser cultivo microbiano submerso, vem sendo proposto o uso de processos de cultivo em estado sólido e, nesse sentido, resíduos agroindustriais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar vêm sendo amplamente citado (KUMAR et al., 2003; ANDERSEN et al., 2011).

O gênero *Trichoderma* consiste em ascomicetos pertencentes à classe dos hifomicetos, ordem Hypocreales, fungos saprófitos comumente encontrados no solo (ROIGERS et al., 1991). Compreendem fungos de vida livre e no ambiente são capazes de interagir com as plantas através de suas folhas e raízes. São fortes colonizadores, invasivos e competitivos devido à grande diversidade estrutural e biológica das enzimas e compostos orgânicos que produzem (REINO et al., 2008).

As espécies deste gênero são conhecidas pela excreção de diversos metabólitos secundários e enzimas como: polissacarases, toxinas, antibióticos, antraquinonas, pironas simples, trichodermamidas, viridinas, viridiofunginas, quitinases, celulasas, hemicelulasas entre muitos outros (GAMS; BISSET, 1998; REINO et al., 2008). Como consequência, várias espécies de *Trichoderma* são utilizadas na produção comercial de diversas enzimas, com aplicações em diversos ramos da indústria, além de sua utilização no biocontrole de fungos patógenos de plantas e biorremediação (SAMUELS, 1996; RAMOS 2002). Nesse sentido, várias espécies de *Trichoderma* têm sido utilizadas na produção comercial de diversas destas enzimas, com aplicações nas indústrias têxtil e de alimentos. Uma das espécies mais estudadas é o *Trichoderma reesei*, fungo que se destaca na produção de celulasas a partir de vários materiais celulósicos, entre eles, resíduos agro-industriais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e milho (WEN; LIAO; CHEN, 2005)

Com base no mecanismo de produção de celulasas, Yang et al. (2004) estudaram o consórcio de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* na decomposição de palha de arroz. Os autores reportam que a combinação de *Aspergillus* e *Trichoderma* foi adequada para cultivo neste tipo de material composto por celulose e hemicelulose, uma vez que os fungos apresentam atividades complementares dos diferentes tipos de celulasas.

3.4 Uso de consórcios microbianos em processos biotecnológicos

Culturas mistas são caracterizadas pela utilização de dois ou mais micro-organismos a partir de um determinado substrato. Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação a culturas únicas como um maior rendimento em produto devido a melhor utilização do substrato e maior resistência a contaminações e oscilações do meio devido às relações sinérgicas que estabelecem entre si (YANG et al., 2004).

Há relatos que na natureza micro-organismos lignocelulolíticos interagem em culturas mistas para degradar celulose, sem ocorrer a competição por nutrientes, pois são parceiros compatíveis (BAYER; LAMED, 1992). Muitos processos industriais utilizam consórcios microbianos para a bioconversão de

alimentos e resíduos domésticos e agro-indústriais e na produção de antibióticos, enzimas, utilizando principalmente fungos filamentosos, pois produzem mais enzimas do que culturas de leveduras e bactérias (AHAMED; VERMETTE, 2008).

Um exemplo conhecido de culturas mistas em processos biotecnológicos é a utilização de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na produção de celulases. Este complexo de enzimas é composto por endoglucanases, beta-glicosidades e celobiohidrolases, que atuam em conjunto para converter os carboidratos complexos presentes na biomassa lignocelulolítica em glicose (MADAMWAR; PATEL, 1992; AHAMED; VERMETTE, 2008).

Yang et al. (2004) observaram que este consórcio produz quantidades substanciais de celulases e isto ocorre devido à combinação de seus metabolismos, onde *T. reesei* produz os três componentes da enzima, entretanto apresenta baixa atividade de beta-glicosidade, mas em compensação *A. niger* possui alta atividade de beta-glicosidade e baixas atividades dos outros dois componentes, ou seja, são fungos complementares.

Outros exemplos empregando culturas mistas para um maior rendimento ocorrem na produção de etanol, ácido acético, enriquecimento vitamínico de alimentos fermentados, na produção de enzimas como amilase, inulinase, xilanases entre outras (YANG et al., 2004; PANT; ADHOLEYA, 2007; AHAMED; VERMETTE, 2008; CUI et al. 2015; KAHIL; HASSAN, 2015;).

Cui et al. (2015) relata que o consórcio de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ficuum* apresentou os melhores resultados na degradação de resíduos de vinagre. Liberando 108,01% a mais de açúcar redutor no meio em comparação com o controle, um aumento de 432,08% e 243,88% na atividade de xilanase e endoglucanase respectivamente, se comparado com as culturas puras de *A. niger* e *P. chrysosporium*, que levou a uma queda na quantidade de celulose, hemicelulose e lignina de 17,11%, 68,61% e 14,44% respectivamente.

Madamwar e Patel (1992) realizaram um experimento em resíduos lignocelulolíticos em estado sólido utilizando *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* isolados e em consórcio para a produção de endoglucanase, exoglucanase

e beta-glicosidase, obtendo em todos os experimentos quantidades superiores destas celulasas nos consórcios, se comparados às culturas isoladas.

Ahamed e Vermette (2008) constataram que o consórcio de *T. reesei* e *A. niger* consumiu 89,4% da celulose do meio, 10,1% a mais que a monocultura de *A. niger*. Yang et al. (2004) observaram que o consórcio entre estas espécies degradou 28,05% da palha de arroz, caindo para 5% na monocultura.

3.5 Produção microbiana de ácido cítrico

Os ácidos carboxílicos, geralmente conhecidos como ácidos orgânicos, apresentam diversas aplicações na indústria química e de alimentos. Muitos destes são obtidos a partir de matérias-primas renováveis por cultivos microbianos. Este tipo de produção em larga escala já vem sendo dedicada para ácido cítrico, láctico, D-glucônico, itacônico e 2-ceto-L-glucônico (LÓPEZ-GARZÓN; STRAATHOF, 2014).

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-propano-1,2,3-ácido tricarboxílico), intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), foi isolado inicialmente em 1784, por Carl Scheele a partir do suco de limão. A primeira produção ocorreu na Inglaterra em 1826 a partir de limões italianos. O ácido cítrico foi sintetizado a partir de glicerol por Grimoux e Adams em 1880 e depois por dicloroacetona. Diversas outras rotas sintéticas utilizando diferentes matérias-primas foram utilizadas, mas com o aumento da sua importância comercial, ocorreu gradualmente a substituição destes processos por outros que utilizavam fungos, já que o produto final tinha valor menor que a matéria-prima (TORRADO et al., 2011).

Em 1893, Wehmer descreveu a produção de ácido cítrico como resultado do metabolismo de *Penicillium glaucum*. Vários micro-organismos demonstraram produzir ácido cítrico como *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. nidulans*, *A. fonsecaeus*, *A. luchensis*, *A. phoenicus*, *A. wentii*, *A.saitoi*, *A. flavus*, *Absidia sp.*, *Acremonium sp.*, *Botrytis sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Mucor piriformis*, *Penicillium janthinellum*, *P. restrictum*, *Talaromyces sp.*, *Trichoderma viride* e *Ustilina vulgar*. Mas somente em 1917 Currie descobriu que algumas cepas de *Aspergillus niger* produziam grandes quantidades do bioproduto sob condições de pH entre 2,5-3,5, estabelecendo a base da produção industrial de ácido cítrico

que foi patenteada pela Pfizer em 1923 nos Estados Unidos. (PAPAGIANNI, 2007; TORRADO et al., 2011).

Diversas linhagens de leveduras também foram reconhecidas como grandes produtoras de ácido cítrico a partir de alcanos e carboidratos, sendo muito utilizadas comercialmente entre os anos de 1960 a 1970. Entre elas podemos citar a *Hansenula*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Torula*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia* e *Cândida*, sendo as espécies *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. catenula*, e *C. intermedia* as mais utilizadas industrialmente. Entretanto além de alcanos e hidratos de carbono possuem um custo razoável, as fermentações por leveduras produzem grandes quantidades de ácido isocítrico, um subproduto indesejado (MATTEY, 1999).

O *Aspergillus niger* continua sendo o principal micro-organismo utilizado na produção industrial de ácido cítrico, que ocorre principalmente por cultivo aeróbio submerso (ANASTASSIADIS; AIVASIDIS; WANDREY, 2002; BARRINGTON; KIM, 2008). Algumas estirpes específicas tem um rendimento superior a 70% do rendimento máximo teórico da fonte de carbono, considerando 0,8 mol de carbono (ácido cítrico) ou 0,18 mol de carbono (biomassa) por mol de carbono consumido via sacarose (PAPAGIANNI, 2007).

Os substratos mais utilizados são a beterraba e melaço de cana-de-açúcar (ADHAM, 2002; ROUKAS, 1991). Entretanto, sua alta demanda tem implicado no emprego de novos processos, mais econômicos e sustentáveis, como a utilização de resíduos agroindustriais em cultivo em estado sólido, dentre eles o bagaço de cana-de-açúcar, que oferece inúmeras vantagens em relação às técnicas convencionais, pois além de reduzir os custos de produção e impactos ambientais, oferece uma extração mais eficiente do produto (KUMAR et al., 2003; KHOSRAVI-DARANI; ZOGHI, 2008; DHILLON et al., 2013).

Por ser um produto obtido por processos microbianos conduzidos com baixo pH, o ácido cítrico pode ser recuperado do meio de cultivo pela separação da biomassa geralmente por filtração, seguido da adição de hidróxido de cálcio, levando a precipitação de citrato de cálcio e remoção de água e impurezas (WAITES et al., 2001). O precipitado é filtrado e acidificado com ácido sulfúrico, sendo obtido ácido cítrico solúvel, o qual é posteriormente cristalizado, além de sulfato de cálcio hidratado (gipsita ou “pedra de gesso”) (LÓPEZ-GARZÓN; STRAATHOF, 2014).

Atualmente, o ácido cítrico é o segundo metabólito microbiano mais produzido no mundo, perdendo apenas para o etanol, sendo estimado em mais de 1,7 milhões de toneladas/ano, com um aumento anual em sua demanda de 5%, e valor de mercado ultrapassando 2 bilhões de dólares por ano (DHILLON et al., 2013).

Suas propriedades o tornam um produto multifuncional, cerca de 70% de sua produção total é utilizada na indústria alimentícia como acidificante e no melhoramento do sabor de alimentos e bebidas, seguida pela indústria farmacêutica que utiliza cerca de 12% do bioproduto na síntese de biopolímeros, e 18% são utilizados para outras aplicações como aditivos detergentes, cosméticos, produtos de higiene pessoal, na agricultura para a biorremediação de metais pesados no solo (VANDENBERGHE et al., 2000; KAMZOLOVA et al., 2003; KARAFFA; KUBICEK, 2003; SOCCOL; VANDENBERGHE; RODRIGUES, 2006; EL-BONDKLY, 2006; DHILLON et al., 2011) .

3.7 Fermentação etanólica

O aumento da demanda energética causada pelo crescente desenvolvimento econômico mundial gerou a necessidade de encontrar novas fontes de energia (SILVA, 2012). Neste contexto, o bioetanol destaca-se por ser um recurso renovável, apresentar baixo custo, grande abundância de matéria-prima e ser um combustível ambientalmente correto (CINELLI, 2012; SCHEUFELE et al., 2012).

Inicialmente a produção de etanol era apenas vinculada às bebidas alcoólicas e alimentos, sendo que posteriormente suas aplicações se estenderam às indústrias farmacêutica, de perfumes e cosméticos, fabricação de corantes e vernizes, materiais explosivos, materiais plásticos, além da sua aplicação como matéria-prima de produtos da química fina (CRUEGER; CRUEGER, 1993). A sua produção vem sendo estimulada nos últimos anos tanto no Brasil e em vários países do mundo por se tratar de um combustível limpo e de origem renovável (SILVA-FILHO, 2003). Nesse sentido, o Pró-álcool (Programa Nacional do Álcool) de 1975 possibilitou grande expansão da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, com o objetivo de estimular a produção do etanol,

atendendo as necessidades dos mercados interno e externo. Porém, na década de 1990 o preço do petróleo ficou reduzido, tornando o etanol um combustível pouco competitivo tanto para o consumidor quanto para o produtor, aliado ainda ao atrativo preço do açúcar no mercado internacional. Como a distribuição geográfica brasileira possibilita a produção de cana-de-açúcar e seus derivados em um amplo espaço, atualmente o Brasil vive uma nova expansão dos canaviais com o objetivo de oferecer etanol em grande escala como combustível alternativo. (FRANCISCHINI, 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo sendo obtido via processos fermentativos a partir da cana-de-açúcar (TRENNEPOHL, 2010). Entretanto, estudos indicam a possibilidade de expansão desta produção em cerca de 30% e 50%, reduzindo os impactos ambientais mediante a produção do chamado “etanol de segunda geração”, (SOARES; ROSSELL, 2007; MEKALA, 2008; SILVA, 2012).

Atualmente, o etanol é em sua quase totalidade produzido apenas a partir de matérias-primas sacarinas ou amiláceas (cana-de-açúcar, milho, trigo), com os açúcares prontamente disponíveis, sendo chamado de etanol de primeira geração. Nesse sentido, o gênero *Saccharomyces*, pertencente ao grupo dos ascomicetos, é composto por leveduras muito estudadas, onde o representante mais conhecido é a *Saccharomyces cerevisiae*, micro-organismo mais utilizado na produção do etanol de primeira geração, além de ser muito utilizada na indústria farmacêutica para a obtenção de lepirudina e na panificação (BAYER; LAMED, 1992; MART; HAHN-HÄGERDAL; JÖNSSON, 2002). Esta levedura é uma fermentadora muito eficiente, utilizando glicose ou sacarose como substrato e consegue suprir suas necessidades energéticas pela formação de ATP gerado na fermentação. É considerado um dos micro-organismos mais versáteis, com crescimento numa faixa ampla de pH e apresentando elevada tolerância ao etanol e inibidores em relação aos demais micro-organismos, sendo uma ótima escolha para conduzir reações de oxidação-redução. Entretanto, é importante salientar que este gênero de leveduras consegue metabolizar principalmente hexoses, possuindo pouca eficiência na assimilação e consumo de pentoses (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Etanol de segunda geração refere-se ao produto obtido a partir de material lignocelulósico, caso de resíduos e subprodutos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar. Estes materiais são caracterizados por serem abundantes, renováveis, potenciais para produção de biocombustíveis, sem comprometimento da segurança alimentar, além de serem fundamentais na redução dos impactos ambientais. A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem e, no caso de resíduos e subprodutos agroindustriais, também do processamento, da região, idade e período do ano no momento da colheita e do material. Os principais componentes do material lignocelulósico são a celulose e a hemicelulose, constituindo estruturas fibrosas infiltradas por outra estrutura formada por alcoóis aromáticos conhecida como lignina, ocorrendo ainda a existência de cinzas e outros componentes classificados como extrativos em pequenas quantidades. Nesse sentido, a principal dificuldade desta técnica está associada a degradação da celulose, principal componente da biomassa vegetal. Sua degradação natural é muito lenta e a produção de celulasas possui um alto custo, cerca de 40% do valor total do bioetanol de segunda geração, que inviabiliza sua produção em larga escala (CHAMPAGNE, 2008; BASSO, 2010; DELABONA, 2011; SCHEUFELE et al., 2012).

Para a conversão da celulose e da hemicelulose destes materiais em seus açúcares constituintes, o mecanismo mais estudado é a hidrólise ácida (SUN; CHENG, 2005; SOARES; ROSSEL, 2007). Esse processo pode utilizar ácidos concentrados ou diluídos, sendo obtidos como produtos principais destas reações químicas hidrolíticas as hexoses (glicose, galactose e manose), pentoses (xilose e arabinose), lignina, ácido acético, metanol, em proporções variáveis dependendo da matéria prima. No entanto, os principais problemas da hidrólise ácida estão relacionados à formação de componentes inibidores da fermentação. Nesse sentido, glicose e xilose sob altas pressões e temperaturas são degradadas a 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, respectivamente, e caso não sejam removidos, podem levar a inibição microbiana quando os hidrolisados forem usados como meio de cultivo em bioconversões. Sendo assim, etapas de remoção química, física ou biológica desses compostos inibidores têm sido empregadas visando melhorar os rendimentos nos bioprocessos posteriores. Neste contexto, tratamentos químicos podem ser

realizados através do ajuste de pH com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NaOH , causando uma precipitação dos componentes tóxicos. A rotoevaporação também é empregada como um método físico de detoxicação, promovendo uma diminuição na concentração de ácido acético, furfural e vanilina. Por outro lado, métodos biológicos através de enzimas lignolíticas são empregas, além do uso de *Trichoderma reesei*, que tem sido relatado por degradar ácido acético, furfural e derivados de ácido benzóico. Apesar de toda esta gama de técnicas, de fato, a geração de inibidores na hidrólise ácida do material lignocelulósico ainda é um problema a ser contornado na busca de maiores rendimentos e produtividade para o etanol de segunda geração.

Um outro ponto que deve ser salientado é a obtenção de pentoses a partir da hidrólise deste tipo de material. Bactérias e leveduras fermentam pentoses, entretanto, seu desenvolvimento é prejudicado devido à baixa concentração desse tipo açúcar, resultando em baixas velocidades de conversão, que não são interessantes industrialmente. As principais espécies de leveduras que fermentam xilose são *Pichia stipitis*, *Pachysolen tanophilus*, *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida guilliermondii*, *Candida blankii*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces/Dekkera naardenensis*, *Pichia segobiensis*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces polimorpha* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Contudo, devido à pouca tolerância ao etanol e aos compostos gerados durante a etapa de pré-tratamento e hidrólise da hemicelulose, a utilização destas espécies é muito limitada. Além disso, a presença de hexoses como manose, galactose e glicose em hidrolisados hemicelulósicos pode promover uma diminuição na utilização de xilose por preferência metabólica, atuando ainda como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose.

Leveduras do gênero *Dekkera* tem se mostrado resistentes a grandes mudanças de temperatura e pH, obtendo energia em condições limitadas de oxigênio quando comparadas com *S. cerevisiae*, demonstrando um grande potencial em processos industriais que utilizam fontes renováveis para a produção de etanol.

A hidrólise enzimática de material lignocelulósico é um processo muito estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias que levariam à perda de rendimento, ausência de formação de

produtos secundários e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007). Geralmente, o processo de hidrólise enzimática apresenta vantagens associadas à obtenção de rendimentos superiores a 0,85 g glicose/g celulose, sob temperaturas moderadas (40-50°C) e pressão atmosférica. Entretanto, aspectos operacionais relacionados ao elevado tempo de processo (48-72h), desativações catalíticas por inibição da atividade enzimática, bem como do elevado custo das enzimas, têm acarretado incertezas quanto à viabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática no contexto da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. A taxa de hidrólise enzimática tende a decrescer com o aumento da concentração de carboidratos (xilose, glicose e celobiose) e de etanol no meio reacional, visto que estes compostos, a partir de determinadas concentrações, promovem inibição da atividade enzimática. Além disso, verifica-se que a glicose exerce maior influência sobre a inibição enzimática em comparação com o etanol, bem como existe sinergia entre estes compostos no fenômeno (BAUDEL, 2011). Saad Gonçalves (2011) realizaram uma avaliação econômica da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com os autores, na época do estudo, o preço mínimo de venda do etanol foi estimado em cerca de R\$ 7 por litro, o que o torna inviável economicamente, sendo fundamental o investimento nas etapas de hidrólise para aumento do rendimento.

A otimização e redução de custos do etanol obtido a partir destas matérias-primas pode estar na utilização de micro-organismos capazes de sintetizar enzimas hidrolíticas como celulasas (DELABONA, 2011; FERREIRA; MAIOR, 2011).

As celulasas são enzimas complexas com extensas aplicações industriais (BHATIA et al., 2002). Começaram a ser produzidas comercialmente em 1980, como aditivo para ração para ruminantes, em alimentos para melhorar as propriedades sensoriais de massas, promover a clarificação de sucos de frutas e vinhos e manter as propriedades do produto final. Nas indústrias têxteis foram introduzidas nos processos de biopolimento e bioestalagem, no branqueamento de papel e em lavanderias para remover sujeiras e aumentar o brilho e maciez dos tecidos e para o tratamento de resíduos (BONFIM et al.,

2010; KAHIL; HASSAN, 2015). Em 1990 representavam mais 20% do mercado mundial de enzimas juntamente com as hemicelulases (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

As celulases podem ser produzidas por diversos fungos e bactérias, com destaque para os fungos, que produzem complexos celulolíticos completos e em grandes quantidades (BONFIM et al., 2010).

A hidrólise enzimática da celulose envolve três tipos de celulases que trabalham em sinergia: endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase. A endoglucanase cliva aleatoriamente as cadeias de celulose em polímeros menores, que são quebrados pela exoglucanase em fragmentos de celobiose, catalisados pela β -glicosidase liberando glicose no meio (CAI et al. 1999; LYND et al. 2002).

Os micro-organismos com maior capacidade de produção de celulases pertencem ao gênero *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Humicola* (LYND et al. 2002). Sendo o *Trichoderma reesei* o mais eficiente na degradação de celulose, seguido por espécies de *Aspergillus* como o *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. phoenicis* (GUTIERREZ-CORREA; TENGARDY, 1997; WEN; LIAO; CHEN, 2005; NOOR EL-DEEN; SHATA; FARID, 2013).

Estudos destacam uma eficiência superior na degradação de celulose por consórcios de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. Isto ocorre por serem fungos complementares, onde o *T. reesei* apesar de produzir as três celulases essenciais à degradação de celulose, apresenta baixa produção de β -glicosidase, ao contrário do *A. niger* que possui maior atividade de β -glicosidase que o *T. reesei* e menor produção das outras duas celulases, completado assim com maior eficiência a degradação da celulose (MADAMWAR; PATEL, 1992; GUTIERREZ-CORREA; TENGARDY, 1997; YANG et al., 2004; PENSUPA et al., 2013).

Neste contexto, torna-se importante avaliar a viabilidade da fermentação etanólica do extrato fúngico posterior ao cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar usando diferentes soluções umidificantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Inóculo

As cepas de *Trichoderma reesei* foram cedidas pelo Dr. Itamar Soares de Melo da Embrapa Meio Ambiente (Acordo de Transferência de Material UFSCar EMBRAPA - Processo ProPq/UFSCar23112.004123/2014-61), enquanto que *Aspergillus niger* CCT 4355 pertence ao banco de cepas do LAMAM/CCA/UFSCar. Ambas foram mantidas em meio sintético a 4°C, conforme metodologia proposta por Kumar et al. (2003), no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC/DTAiSER) do Centro de Ciências Agrárias (UFSCar) da Universidade federal de São Carlos (UFSCar) em Araras/SP. O referido meio sintético foi composto por 20% (em massa) de sacarose, 0,25% nitrato de amônia, 0,1% fosfato de potássio, 0,025% sulfato de magnésio e 0,004% de sulfato de cobre.

T. reesei e *A. niger* foram propagados por sete dias em Erlenmeyers em meio sintético, a suspensão de esporos foi caracterizada em termos de carbono e nitrogênio total em analisador TOC-LCPN SHIMADZU® para de padronizar o inóculo, sendo utilizando a mesma concentração de *T. reesei* e *A. niger* nos experimentos, em termos de carbono.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 foi gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Sandra Regina Ceccato-Antonini do LAMAM/CCA/UFSCar, sendo mantida em *slants* de YEPD a 4°C (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) e propagada no meio de cultivo YEPD líquido contendo 10 g L⁻¹ extrato de levedura, 20 g L⁻¹ peptona e 20 g L⁻¹ glicose, em agitador orbital a 30°C e 150 rpm até a fase exponencial (YANG et al., 2004). A quantidade celular foi padronizada por unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹).

4.2 Bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça

O bagaço de cana-de-açúcar e a vinhaça utilizados nos experimentos foram coletados em uma indústria sucroalcooleira situada na região de Araras/SP. A caracterização físico-química e acondicionamento foi realizado no LABMAC/CCA/UFSCar.

As partículas de bagaço de cana-de-açúcar foram classificadas através de um conjunto de peneiras TYLER, sendo selecionadas aquelas retidas nas peneiras MESH 14 e 28, correspondendo a faixa de diâmetro médio de 1,17 e 0,59 mm, as quais foram posteriormente esterilizadas em sacos de polipropileno.

A vinhaça foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos e sofreu dois tratamentos distintos, no experimento inicial foi utilizado a vinhaça pré-tratada por hidrólise ácida (BONINI, 2012), com o pH ajustado e para o segundo ensaio a vinhaça encontrava-se em seu estado bruto.

Amostras de vinhaça bruta e hidrolisada foram caracterizadas em termos de pH por potenciometria, glicose pelo método enzimático glicose oxidase-peroxidase (kit LABORLAB®) após hidrólise ácida, ácido cítrico por reação colorimétrica com piridina e anidrido acético através do kit comercial da IN VITRO®, carbono e nitrogênio total pelo Analisador de Carbono e Nitrogênio SHIMADZU® TOC-LCPN.

O método enzimático glicose oxidase-peroxidase consiste na oxidação da glicose pela glicose oxidase formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com 4-aminofenazona e 4-hidroxibenzoato, sob ação catalisadora da peroxidase formando uma coloração vermelha, onde a intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. O kit fornece uma solução padrão de glicose (1 g L^{-1}) e uma solução reagente contendo a glicose oxidase, peroxidase, 4-aminofenazona, tampão fosfatos pH 7,0 e 4-hidroxibenzoato.

A reação colorimétrica do ácido cítrico baseia-se na formação de uma cor amarelada através da reação do ácido cítrico com o anidrido acético e piridina.

A quantificação no TOC-LCPN é feita por um analisador de gases em infravermelho (NDIR) com limite de detecção de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ presente no próprio equipamento que detecta a absorvância do CO_2 a um comprimento de onda

específico no espectro infravermelho. No caso do nitrogênio total a técnica envolve decomposição térmica e detecção por quimioluminescência.

4.3 Ensaio preliminares com partículas de bagaço de cana-de-açúcar submersas

A fim de verificar a viabilidade do cultivo *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar, foram realizados ensaios preliminares em triplicata em Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de água deionizada ou água deionizada com sacarose (fase líquida predominante *bulk*) com partículas de bagaço (meio heterogêneo) e uma suspensão de esporos correspondendo a 10% do volume total (Figura 1). Os frascos foram mantidos a 200 rpm e 32°C em incubadora TECNAL® TE-420, sendo que as amostras foram retiradas com 4 e 7 dias de cultivo, tempo este selecionado através de trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (BASTOS et al., 2015).

Desta forma, avaliou-se diferentes concentrações iniciais de sacarose em água deionizada (ausência, 1, 2 e 4% massa/volume), onde a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar adicionada foi ajustada com o intuito de manter a concentração de carbono total inicial constante (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de bagaço de cana-de-açúcar adicionada nos meios com diferentes concentrações de sacarose.

Sacarose (% massa/volume)	Quantidade de bagaço (g)
4	6,72
2	7,56
1	7,98

Figura 1. Cultivo heterogêneo de *Aspergillus niger* em meio contendo sacarose e partículas de bagaço de cana-de-açúcar



As amostras no início do experimento e com 4 e 7 dias de cultivo foram analisadas quanto ao seu pH por potenciometria, glicose (após hidrólise ácida) pelo método enzimático glicose oxidase-peroxidase (kit LABORLAB[®]), ácido cítrico por reação colorimétrica com piridina e anidrido acético através do kit comercial da IN VITRO[®], carbono e nitrogênio total pelo Analisador de Carbono e Nitrogênio SHIMADZU[®] TOC-LCPN, sendo estimada a biomassa fúngica pela quantidade de nitrogênio total.

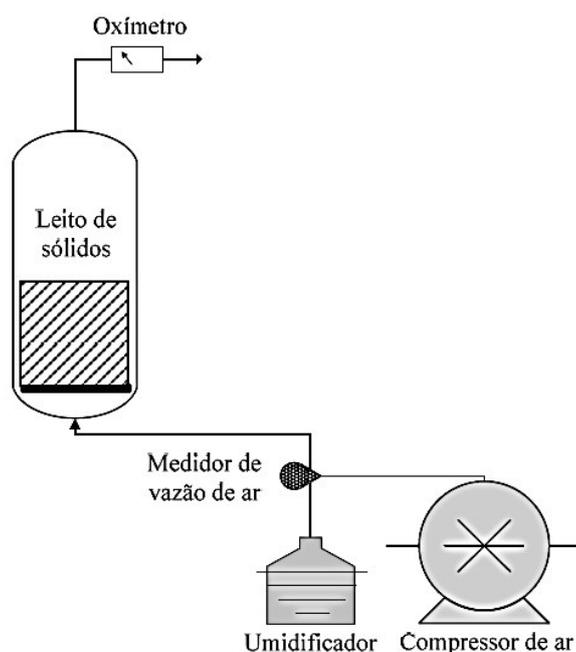
A quantificação de carbono fundamenta-se na oxidação do material orgânico da amostra a 720°C em presença de atmosfera oxidante (ar sintético) catalisada por alumina e platina, transformando o material em CO₂ e uma mistura de gases incluindo aqueles compostos de nitrogênio.

As partículas de bagaço de cana-de-açúcar foram analisadas em microscópio MOTIC[®] BA 210 TL equipado com câmera de vídeo Moticam de 2 Mega pixels, com o auxílio do software MOTIC IMAGE 2.0 Plus.

4.4 Ensaio com bagaço de cana-de-açúcar em biorreator tipo coluna de leito fixo

Os ensaios foram conduzidos em biorreator tipo coluna de leito fixo convencionais (sistema de aeração ascendente) de 30 mm de diâmetro e 200 mm de altura máxima, em sistema experimental conforme ilustrado na Figura 2. As colunas foram preenchidas até 6 cm de altura de leito com partículas selecionadas de bagaço de cana-de-açúcar (correspondendo a 6 g de bagaço seco) com umidade inicial de 80 % (base úmida). O aparato experimental apresentou colunas de leito fixo conduzidas em batelada com contínua entrada de ar previamente saturado de água por umidificador, mantidas em estufa a 25°C. Neste contexto, foram realizados três ensaios com uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* e um consórcio contendo os dois fungos, tendo como solução impregnante das partículas, água deionizada com e sem adição de sacarose, vinhaça bruta e pré-tratada por hidrólise ácida (BONINI, 2012).

Figura 2. Esquema de um biorreator de coluna de leito fixo utilizado nos experimentos (adaptado de BASTOS et al. 2014).



No decorrer dos experimentos, a vazão de ar foi monitorada e mantida em $0,2 \text{ L h}^{-1}$ (BASTOS et al. 2014). Para avaliação da cinética do cultivo durante os 7 dias de amostragem, as colunas foram retiradas diariamente para análise do meio sólido e do extrato fúngico. No meio sólido foi determinada umidade através da massa seca por gravimetria. O extrato fúngico foi obtido com água deionizada na proporção de 1:15 (sólido-solvente), sendo posteriormente adicionado a mesma quantidade de acetona. Cada estágio durou 45 minutos em agitador orbital a 100 rpm e 28°C , de acordo com as condições adaptadas de Khoshav-Darani e Zhoghi (2008) e otimizadas por nosso grupo de pesquisa (BASTOS et al. 2014).

O extrato fúngico bruto obtido de cada análise teve seu pH caracterizado por potenciometria. O teor de glicose foi determinado pelo método enzimático glicose oxidase – peroxidase (kit LABORLAB), ácido cítrico por reação colorimétrica com piridina e anidrido acético usando kit comercial da IN VITRO® e balanço de carbono e nitrogênio em Analisador de Carbono e Nitrogênio SHIMADZU® TOC-LCPN, conforme descrito no item 4.3.

A produtividade (Prod) em ácido cítrico foi calculada para os ensaios de CES em colunas considerando a concentração máxima obtida no tempo considerado. A velocidade específica de produção de ácido cítrico (μP) foi calculada através da relação entre a Prod e a quantidade de biomassa realizada considerando a fórmula elementar $\text{CH}_{1,72}\text{O}_{0,55}\text{N}_{0,17}$ destes fungos conforme reportado por Nielsen et al. (2003) e concentração de nitrogênio total determinada no SHIMADZU® TOC-LCPN.

4.5 Ensaios de fermentação etanólica do extrato fúngico

O meio de cultura YEPD líquido contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 em tubos tipo “Falcon” de 15 mL foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos, sendo ressuspensos em solução salina ($8,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl) para lavagem das células, sendo que a concentração celular utilizada foi em torno de $5 \cdot 10^7$ células por mL.

O extrato fúngico bruto foi obtido a partir dos ensaios em biorreator tipo

coluna de leito fixo conforme item 4.4, sendo selecionado o tempo de batelada onde ocorria a maior liberação e disponibilidade de glicose no meio. Neste caso, a extração ocorreu apenas com água deionizada na proporção de 1:15 em agitador orbital a 100 rpm, 28°C por 90 minutos, sendo posteriormente filtrado em membrana tipo Milipore® com diâmetro de poro 0,45 µm para eliminação de resíduos fúngicos e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em um primeiro momento foi utilizado um extrato bruto obtido no CES em colunas com *Trichoderma reesei* sem sacarose.

O ensaio fermentativo ocorreu em triplicata em Erlenmeyers de 50 mL com 10 mL de extrato (meio de cultivo) contendo a suspensão de *S. cerevisiae* a 100 rpm e 27°C na incubadora TECNAL® TE-420. As amostras foram retiradas com 24 e 48 horas de fermentação e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para obtenção do sobrenadante.

Para estes ensaios foram monitorados o pH por potenciometria e o teor de glicose pelo método enzimático glicose oxidase – peroxidase (kit LABORLAB®). O etanol produzido foi estimado em densímetro Anton-Paar portátil DMA 35 e determinado por cromatografia em fase gasosa em GC-2010 Plus SHIMADZU® com coluna Modelo Stabilwax – DA (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio preliminares de produção de ácido cítrico a partir de partículas de bagaço de cana-de-açúcar submersas

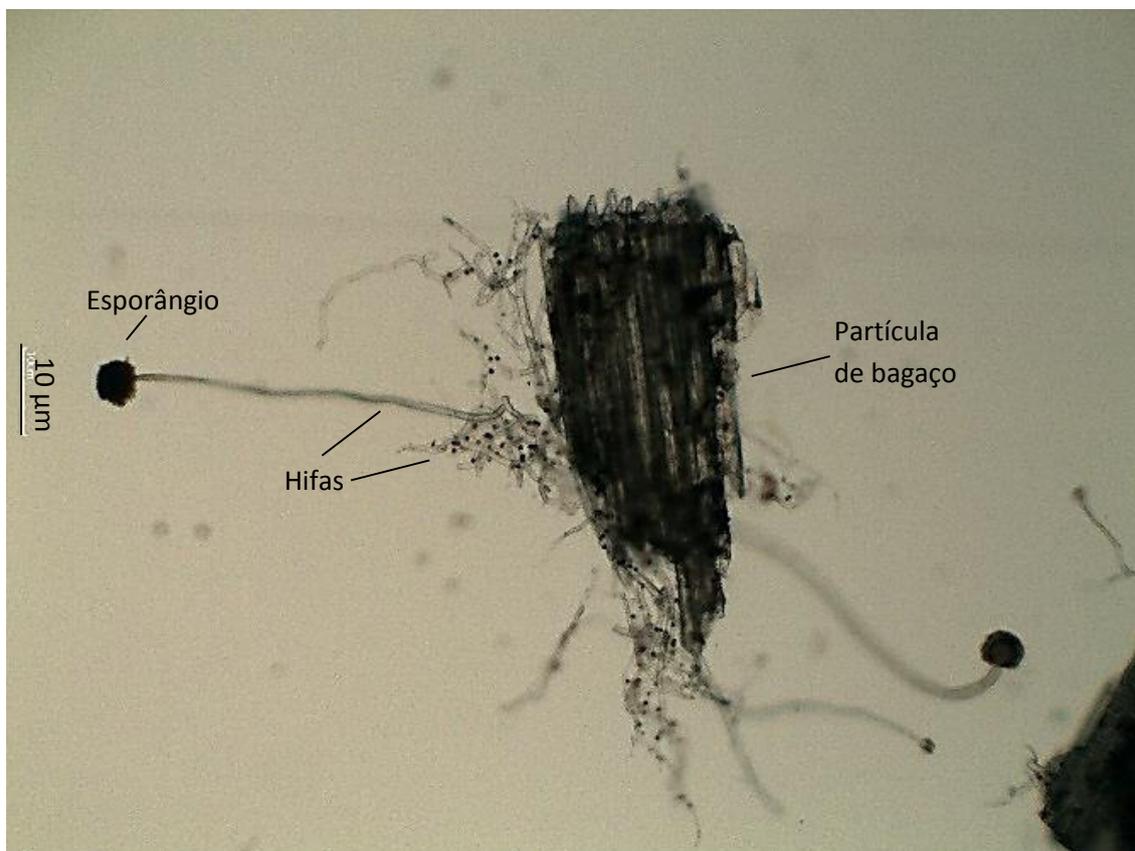
Os ensaios preliminares envolvendo o cultivo de *Aspergillus niger* em partículas de bagaço de cana-de-açúcar submerso foram conduzidos para avaliar a real viabilidade de crescimento destes fungos a partir neste suporte sólido. Apesar da literatura citar o uso do bagaço como suporte para crescimento microbiano em estado sólido, não existem relatos a respeito de cultivos visando a produção de metabólitos a partir de partículas de bagaço submersas numa fase líquida predominante *bulk*, contendo ou não outros substratos. Assim, os ensaios iniciais compreenderam o cultivo heterogêneo de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar submerso em meio com sacarose visando a produção de ácido cítrico (Figura 3).

Nesse sentido, a Figura 4 apresenta a fotografia de uma partícula de bagaço de cana-de-açúcar durante os ensaios, onde pode-se visualizar o crescimento fúngico na superfície das partículas. A geração de ácido cítrico depende principalmente do tipo e concentração da fonte de carbono, limitação em termos de nitrogênio e fósforo, pH, aeração, concentração de elementos traços e morfologia do micro-organismo produtor (PAPAGIANNI, 2007). Sendo assim, verifica-se um modelo de crescimento tanto nas partículas como na fase líquida, o que pode levar a uma maior produção de ácido cítrico do que em cultivos puramente submersos ou em estado sólido.

Figura 3: Fotografia do ensaio de cultivo heterogêneo de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar.



Figura 4: Fotografia de uma partícula de bagaço de cana-de-açúcar durante o cultivo de *Aspergillus niger* (a escala na esquerda da foto indica 10 μm)



Considerando que os ensaios apresentavam as mesmas quantidades de carbono inicial, regulado pela quantidade de bagaço submerso, sugere-se na Figura 4A que nos frascos com 1% de sacarose o crescimento foi sustentado pelo consumo do carbono das partículas. Estes resultados são corroborados com a Figura 4B, onde verifica-se que a glicose disponível foi praticamente consumida nos primeiros 4 dias, mas o crescimento fúngico prosseguiu até o sétimo dia de ensaio. Apesar de caracterizar-se como um sistema heterogêneo, ou seja, presença de fenômenos biológicos em mais de uma fase, os resultados indicam que a mistura mostrou-se eficiente, permitindo um contato do fungo com as partículas sólidas. Além disso, a maior quantidade de água no meio comparada com CES pode ter facilitado a hidrólise dos polissacarídeos estruturais do bagaço.

A Figura 5C apresenta os perfis de ácido cítrico durante os cultivos nas diferentes concentrações de sacarose. Como a produção de ácido cítrico não é totalmente vinculada ao crescimento, houve um pico de produção deste metabólito em 4 dias de cultivo, apesar da manutenção do crescimento até 7 dias. O valor máximo superou 900 mg L^{-1} para a condição com 1% de sacarose no meio líquido. De acordo com Kumar et al. (2003), a produção de ácido cítrico a partir do cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* fica em torno de 20 g por 100 g de meio sólido. Entretanto, fica difícil a comparação destes resultados por tratar-se de processos que, apesar da utilização de bagaço de cana-de-açúcar, são distintos na sua definição. Suzuki et al. (1996), produziram em torno de 80 g L^{-1} de ácido cítrico diretamente a partir de amido de milho e batata. Novamente, é complicada a avaliação dos resultados por tratar-se de uma fonte de carbono distinta e utilizada em quantidades muito superiores. Sendo assim, apesar da produção final menor, deve-se considerar o aproveitamento de resíduos agroindustriais e a economia de fontes de carbono mais prontamente disponíveis.

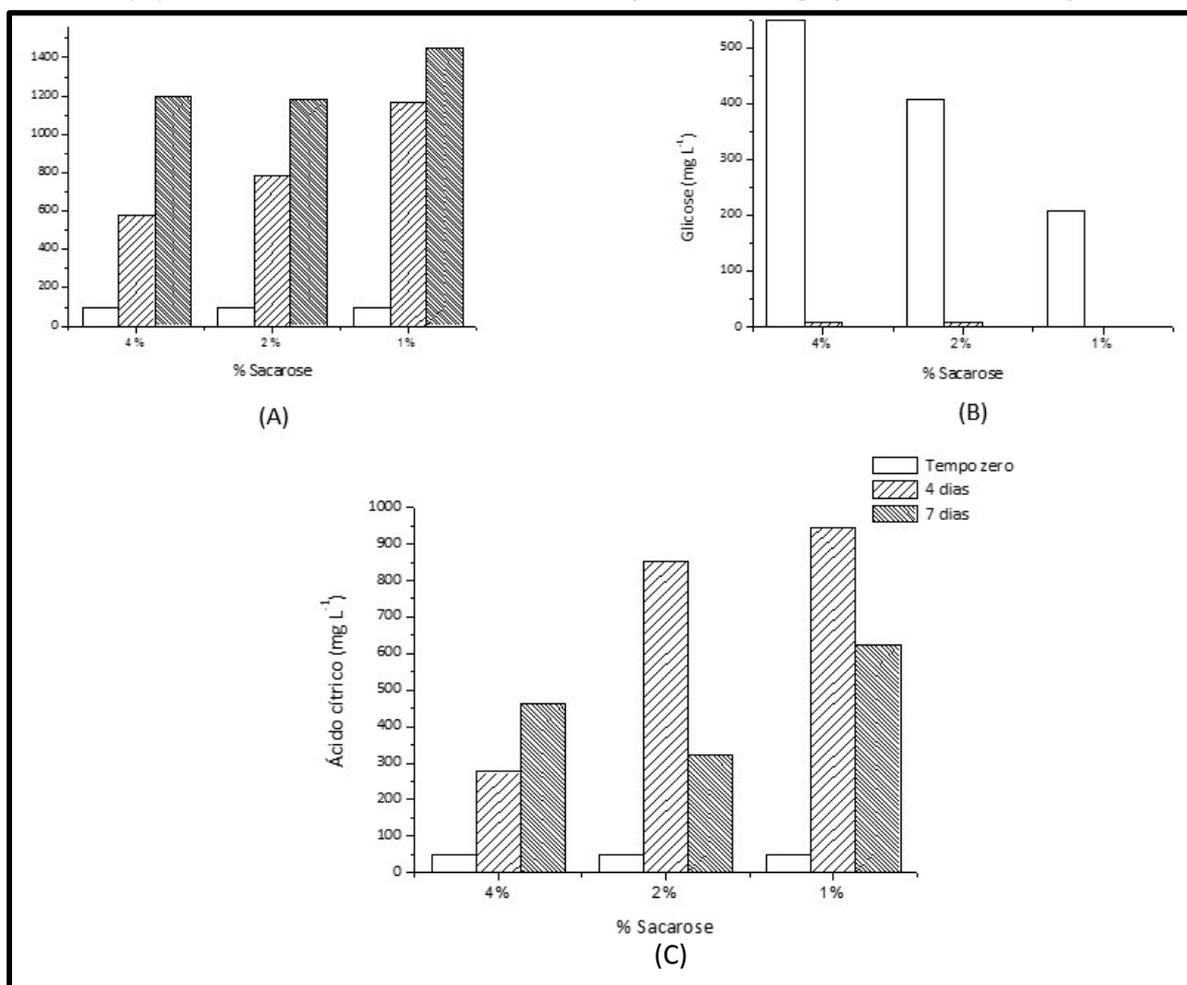
Em geral, apenas os açúcares simples levam a produção de ácido cítrico com elevado rendimento, uma vez que os polissacarídeos precisam ser hidrolisados. Esta hidrólise torna-se lenta devido à baixa atividade das hidrolases fúngicas no pH normalmente ácido exigido para o processo (ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2013). Por conta disto, o fato dos experimentos terem sido

conduzidos em pH próximo a 5, o qual se manteve neste patamar durante os 7 dias, pode ter prejudicado a produção final de ácido cítrico, embora tenha sustentado o crescimento microbiano a partir dos polissacarídeos estruturais do bagaço de cana-de-açúcar.

A partir destes experimentos, pode-se selecionar a concentração de 1% de sacarose onde ocorreu o melhor crescimento fúngico e produção de ácido cítrico, seguindo como base para os próximos ensaios em biorreatores tipo coluna de leito fixo. Neste caso, destaca-se a concentração de 1% de sacarose.

Desta forma, os resultados indicaram que é viável o cultivo de *Aspergillus niger* em partículas de bagaço de cana-de-açúcar insolúveis e submersas, ou seja, com grande quantidade de água disponível, havendo produção de ácido cítrico nessas condições.

Figura 5. Perfis de crescimento de *Aspergillus niger* (A), glicose (B) e ácido cítrico (C) na fase *bulk* durante o cultivo a partir de bagaço de cana-de-açúcar.



Ensaio em biorreator tipo coluna de leito fixo

5.2.1 Cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* em bagaço de cana de açúcar

Os experimentos em biorreator tipo coluna de leito fixo foram conduzidos primeiramente com inóculo apenas composto por suspensão de *Aspergillus niger* (Figura 6). De acordo com as Figuras 7 e 8, verificou-se que a maior produção de ácido cítrico ocorreu com 4 dias de cultivo ($103,45 \text{ mg L}^{-1}$), para condição sem adição de sacarose. Como a medida da evolução da biomassa nos CES é complexa devido à dificuldade de separação das células do suporte sólido, o ácido cítrico sendo um produto parcialmente vinculado ao crescimento pode apenas indicar o desenvolvimento fúngico. Atualmente, este micro-organismo é o utilizado na produção industrial de ácido cítrico, principalmente em cultivos submersos a partir de meios contendo sacarose (VANDENBERGHE et al., 1999). Mesmo assim, o resultado sugere uma elevada produção, havendo provavelmente a hidrólise de parte dos constituintes estruturais do bagaço com posterior síntese de ácido cítrico, já que não haviam açúcares exógenos nesta condição. Por outro lado, quando as partículas foram impregnadas com vinhaça bruta ou hidrolisada não houve produção considerável de ácido cítrico, o que pode indicar que os fungos não conseguiram converter a matéria orgânica de alta massa molar nas condições de CES.

As Figuras 9 e 10 apresentam os perfis de glicose durante o CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com e sem adição de sacarose e impregnados com vinhaça bruta e hidrolisada, respectivamente. De acordo com os resultados, nos ensaios com adição de sacarose percebe-se um pico de glicose nas primeiras horas, indicando uma possível hidrólise deste dissacarídeo gerando unidades monoméricas, seguido de um consumo praticamente constante até 7 dias. Um efeito similar ocorreu para a condição com vinhaça hidrolisada, que além do pico de glicose nas primeiras horas apresenta um segundo pico com 5 dias, seguido de um consumo constante. De fato, a vinhaça hidrolisada apresentava um teor de glicose de 623 mg L^{-1} (tabela 2), enquanto a vinhaça bruta cerca de 69 mg L^{-1} . Isto pode então ter se refletido em uma maior

produção de biomassa nesta condição, mas com pouca conversão em ácido cítrico. Por outro lado, este comportamento não foi constatado para os ensaios sem adição de sacarose e com vinhaça bruta, havendo em ambos, após aproximadamente dois dias, uma manutenção no teor de glicose (estado *pseudo-estacionário*) devido ao consumo e formação a partir da hidrólise dos polissacarídeos estruturais. Estes perfis de glicose são corroborados por Oliveira et al. (2012), os quais sugeriram este comportamento devido ao baixo conteúdo de monossacarídeos naturalmente presentes no bagaço de cana-de-açúcar e na vinhaça bruta.

Figura 6. Fotografia dos experimentos de cultivo em estado sólido em biorreator tipo coluna de leito fixo



Figura 7. Perfis de ácido cítrico no extrato fúngico durante o CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com (○) e sem adição de sacarose (□)

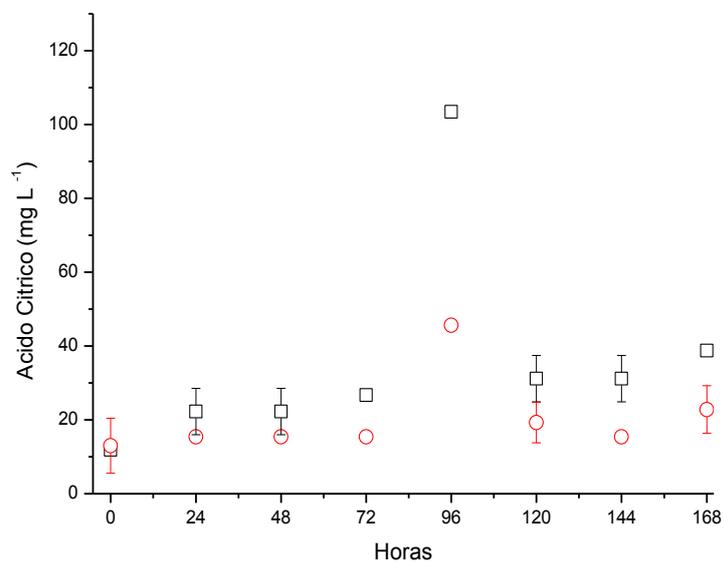


Figura 8. Perfis de ácido cítrico no extrato fúngico durante o CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□)

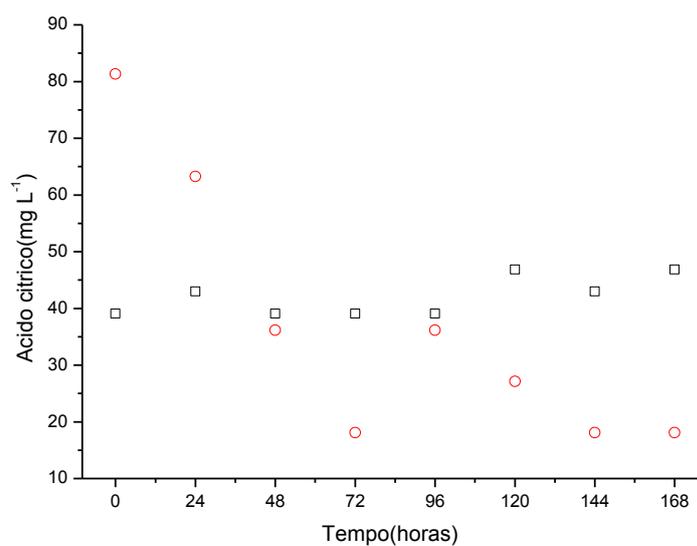


Figura 9. Perfis de glicose no extrato fúngico durante o CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com (○) e sem adição de sacarose (□)

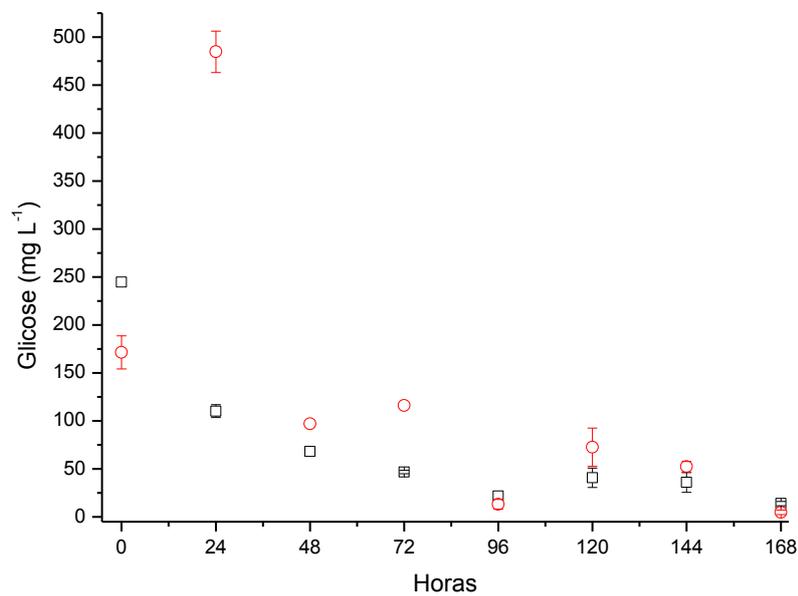


Figura 10. Perfis de glicose no extrato fúngico durante o CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□).

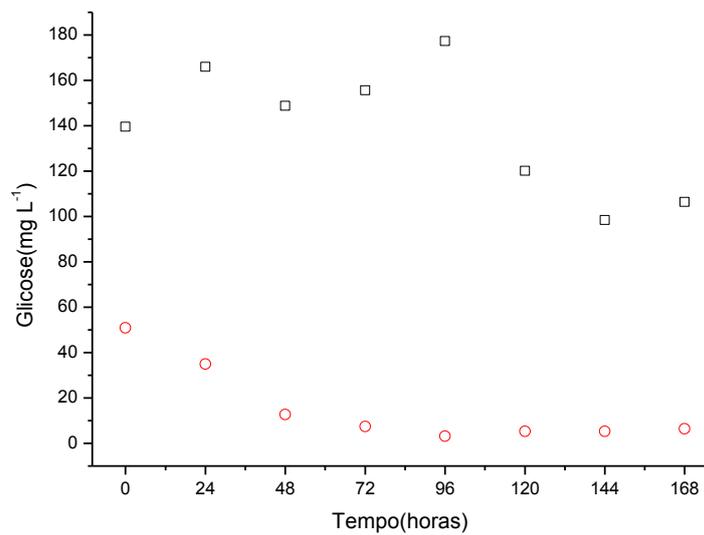


Tabela 2. Composição vinhaça bruta e hidrolisada

	Vinhaça bruta	Vinhaça hidrolisada
pH	3,85	3
TOC mg L⁻¹	8642	4477
Nitrogênio mg L⁻¹	317,8	198,7
Glicose mg L⁻¹	69	623

Segundo Papagianni, (2007), a produção de ácido cítrico depende do controle de parâmetros importantes como disponibilidade de carbono, nitrogênio, umidade e faixa ótima de pH. Nesse sentido, a Figura 11 apresenta os perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), umidade do meio sólido e pH do extrato fúngico obtido para CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com e sem a adição de sacarose. Os resultados indicam um balanço de carbono e nitrogênio no extrato fúngico, uma vez que os substratos foram convertidos em metabólitos, como ácido cítrico, computados na determinação de TOC. Isto também foi verificado para a condição de CES com bagaço impregnado com vinhaça (Figura 12).

Os perfis de TN indicam um valor baixo para a condição com vinhaça bruta em relação aos demais experimentos, provavelmente devido a menor disponibilidade deste nutriente nesta condição. Para todos os casos o teor de umidade do meio sólido apresentou discreta elevação durante os cultivos, mantendo as características de ausência de livre que definem os CES (BASTOS et al., 2014). Este aumento de umidade nestes cultivos geralmente indicam a produção de água metabólica e crescimento fúngico mais intenso. De acordo com Lekanda e Pérez-Correa (2004), o balanço de massa de água nos cultivos em estado sólido pode ser descrito pela Eq. 5.1:

$$\frac{dX_W}{dt} = R_W - E + \frac{F_w}{M_S} - \frac{W_P}{M_S} - \frac{X_W}{M_S} \frac{dM_S}{dt} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

Onde, R_W é taxa de produção de água metabólica [g_{água}/g_{meio sólido}.h]; E representa a perda de água por evaporação [g_{água}/g_{meio sólido}.h]; F_w é a quantidade adicionada por meio sólido; W_P é a quantidade de água perdida no fundo da coluna; M_S é a massa de meio sólido. Considerando que bagaço de cana-de-

açúcar é o suporte sólido, não há adição de água durante o processo e as perdas por evaporação são desprezíveis devido à condensação na coluna, temos que:

$$\frac{dX_w}{dt} = R_w - \frac{X_w}{M_s} \frac{dM_s}{dt} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

Sendo assim, considerando o balanço de massa de água proposto pelas equações descritas, até o segundo dia de experimento tem-se uma umidade praticamente constante para ambas condições, porque, devido à degradação de parte do bagaço para disponibilização de glicose, houve consumo de água na hidrólise e produção de água devido ao metabolismo respiratório dos fungos. Desta forma, o termo de reação da Eq. 5.2 foram similares, não havendo acúmulo considerável ($\frac{dX_w}{dt}$). Após este período, termo de produção (R_w) ficou um pouco superior devido ao crescimento microbiano mais intenso e a degradação do meio sólido, elevando o teor de umidade praticamente, com destaca para o cultivo sem adição de sacarose. De acordo com Delabona et al. (2013), umidade elevada no meio sólido pode ser inconveniente porque leva a redução da porosidade do leito de partículas e, conseqüentemente, uma limitação de transferência de oxigênio. Além disso, o CES é, por definição, o crescimento microbiano em matrizes sólidas em condições próximas da ausência de água livre (PANDEY, 2003). Sendo assim, se a umidade no meio sólido varia muito de forma a termos nos tempos finais de cultivos uma tendência de acúmulo de água do meio, estariam sendo alteradas as características físicas do CES, gerando um sistema híbrido entre estado sólido e submerso, com prejuízos para a transferência de massa. Entretanto, como neste trabalho os resultados apontam para umidades máximas de 85%, valor abaixo da capacidade máxima de absorção de água das partículas, fica garantida ausência de água livre no sistema e a produção de ácido cítrico pode ser atribuída a um crescimento em estado sólido.

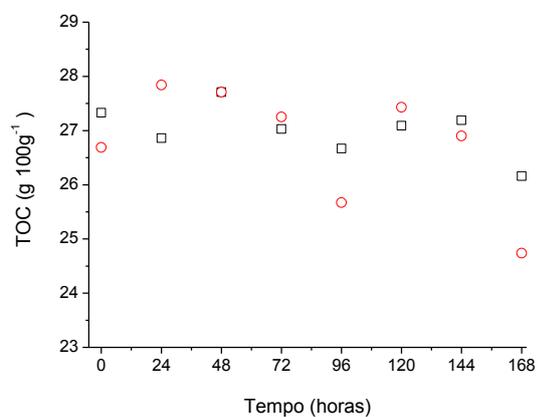
Com relação ao pH, verifica-se que nos ensaios com adição de sacarose houve um decréscimo do valor nas primeiras horas, mantendo-se em torno de 4,3. Por outro lado, o pH do extrato bruto manteve-se próximo de 5 durante todo o período amostral nos ensaios sem adição de sacarose, valor este mais adequado para crescimento fúngico, o que pode ter influenciado também na maior produção de ácido cítrico, ocorrendo o mesmo para a condição com

vinhaça hidrolisada, onde o pH permaneceu em torno de 4,7. De uma maneira geral, não houve variação considerável deste parâmetro

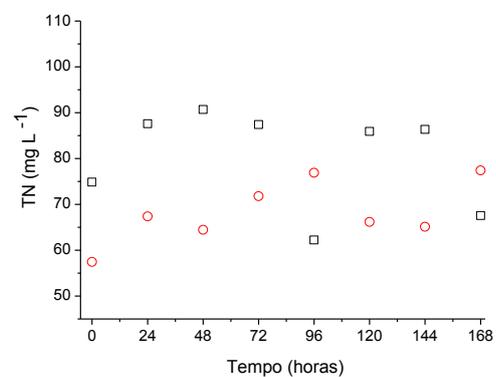
Um outro ponto que deve ser salientado é que os ensaios não ocorrem em condições axênicas e que, apesar da ocorrência de contaminação bacteriana ser bem menos expressiva do que nos processos submersos devido à menor disponibilidade de água, esta não pode ser descartada. Assim, tal contaminação pode ter sido mais expressiva na condição com sacarose no meio, levando a uma redução no pH devido a uma produção de outros ácidos orgânicos, os quais são produtos comuns da redução fermentativa do piruvato por bactérias.

Neste contexto, os resultados indicam a viabilidade da produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em colunas de leito fixo com bagaço de cana-de-açúcar como suporte natural nas condições experimentais, ou seja, sem a adição de outras fontes de carbono ou nutrientes.

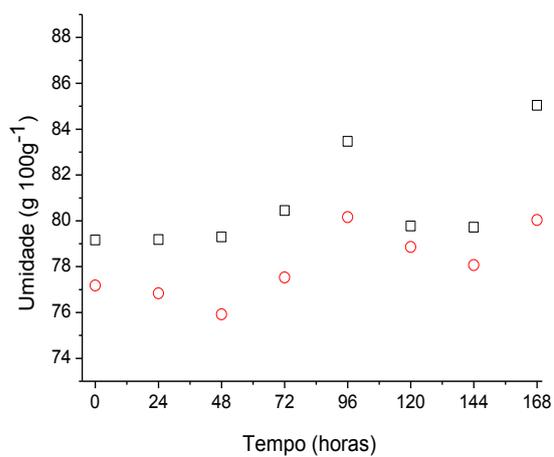
Figura 11. Perfis de carbono orgânico total (A), nitrogênio total (B), umidade do meio sólido (C) e pH do extrato fúngico (D) durante o CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com e (○) sem adição de sacarose (□)



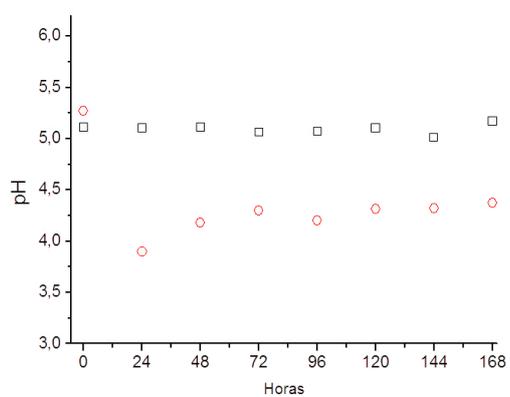
(A)



(B)

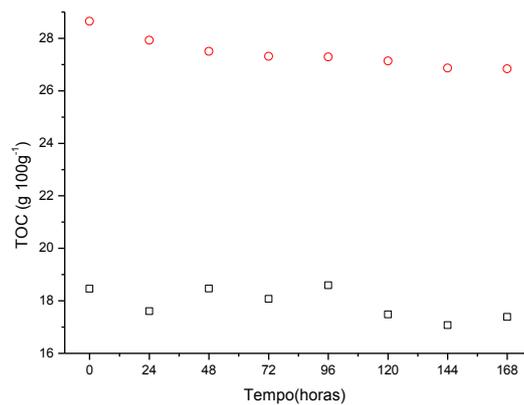


(C)

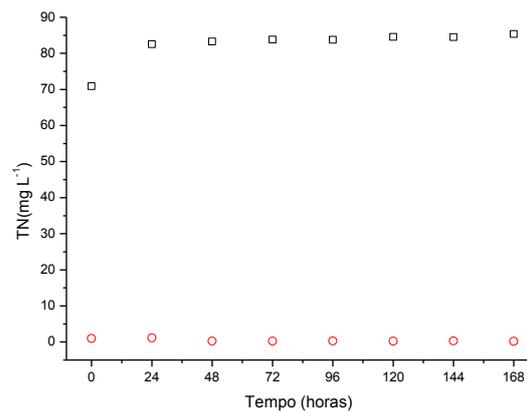


(D)

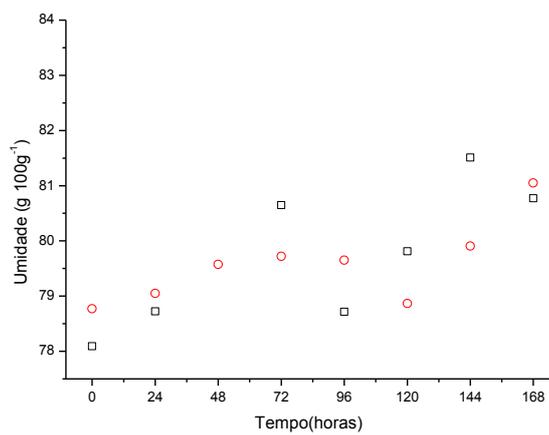
Figura 12. Perfis de carbono orgânico total (A), nitrogênio total (B), umidade do meio sólido (C) e pH do extrato fúngico (D) durante o CES de *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□).



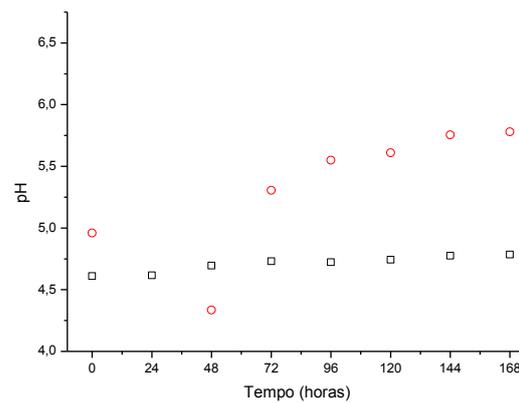
(A)



(B)



(C)



(D)

5.2.2 Cultivo em estado sólido de *Trichoderma reesei* em bagaço de cana de açúcar

Nos ensaios realizados com *Trichoderma reesei* nas colunas de leito fixo com bagaço de cana-de-açúcar verificou-se que a concentração máxima de ácido cítrico foi inferior aos ensaios com *Aspergillus niger* ($66,93 \text{ mg L}^{-1}$), embora tenha ocorrido logo no primeiro dia de cultivo e para a condição com vinhaça bruta como solução impregnante (Figuras 13 e 14). De uma maneira geral, de acordo com os perfis de glicose, o substrato foi consumido nas primeiras 72 horas, mantendo-se constante a partir destes fungos com exceção à condição de vinhaça hidrolisada. Neste caso, como a vinhaça bruta apresenta uma quantidade inferior de glicose disponível, há a necessidade dos fungos hidrolisarem os carboidratos estruturais do bagaço de cana-de-açúcar, com manutenção dos teores de glicose no extrato.

Os resultados indicam que nos ensaios com o *T. reesei* foram liberadas quantidades de glicose superiores no meio em comparação com *A. niger*. Isto ocorre devido à grande diversidade estrutural e biológica do *T. reesei*, reconhecido pela produção de diversas enzimas hidrolíticas, principalmente de celulasas (REINO et al. 2008; SCHEUFELE et al. 2012).

Figura 13. Perfis de ácido cítrico no extrato durante o CES de *T. reesei* em bagaço de cana-de-açúcar com (○) e sem adição de sacarose (□)

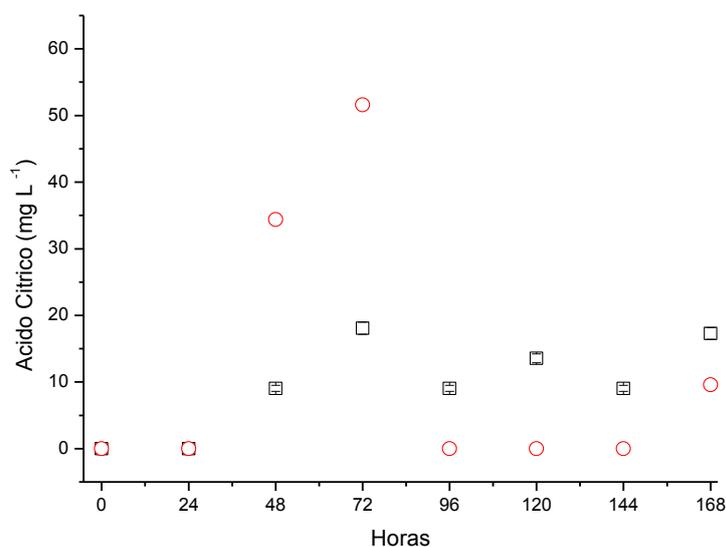


Figura 14. Perfis de ácido cítrico no extrato durante o CES de *T. reesei* em bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□)

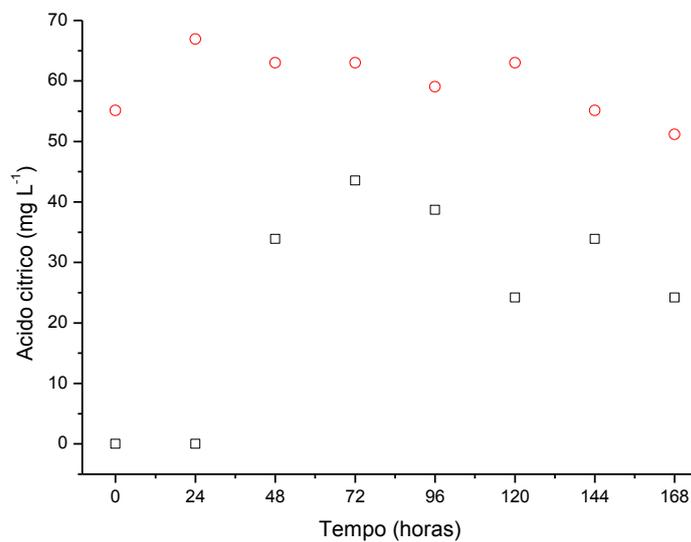


Figura 15. Perfis de glicose no extrato durante o CES de *T. reesei* em bagaço de cana-de-açúcar com (○) e sem adição de sacarose (□)

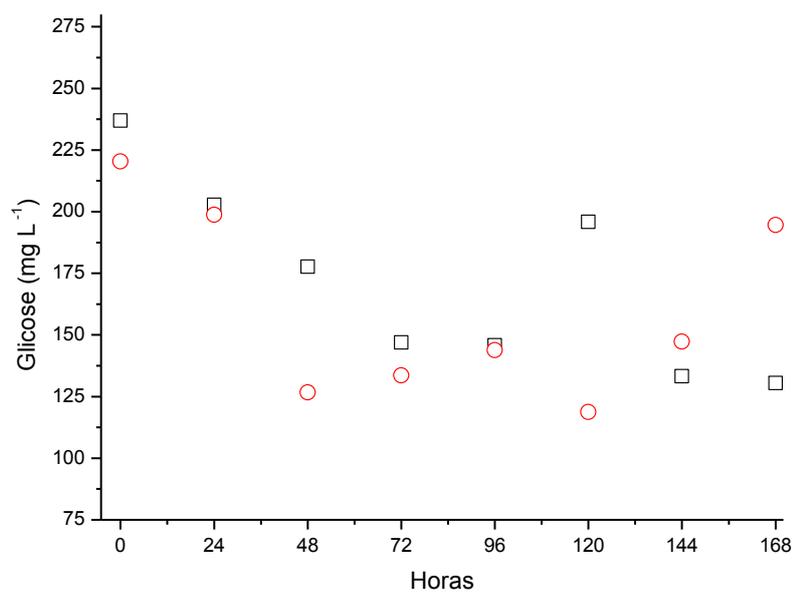
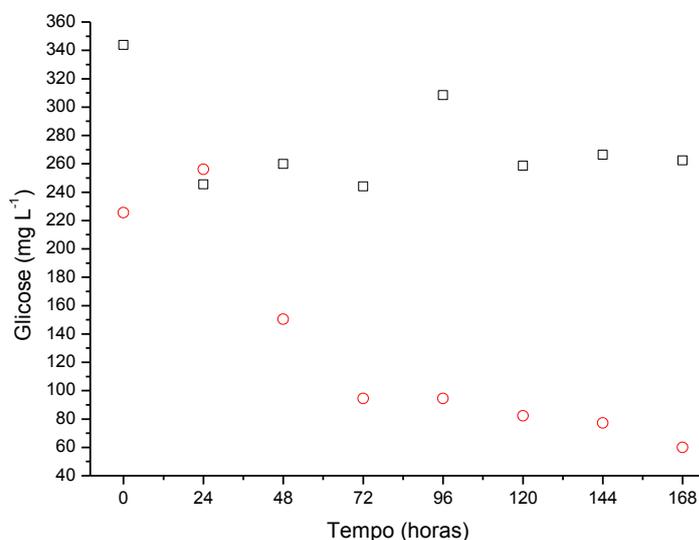


Figura 16. Perfis de glicose no extrato durante o CES de *T. reesei* em bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□)



De acordo com as Figuras 17 e 18, os perfis de carbono, nitrogênio, umidade do meio sólido e pH do extrato fúngico para *T. reesei* não diferiram dos ensaios com *A. niger*. De fato, os perfis tenderam a uma variação discreta durante os 7 dias amostrados, sendo destacado um teor de nitrogênio e umidade levemente inferior para este fungo, sugerindo um crescimento menor no bagaço de cana-de-açúcar. A exceção foi a variação de umidade levemente superior para condição de vinhaça hidrolisada como agente impregnante, o que sugere um crescimento mais expressivo nesta condição devido à maior disponibilidade de glicose. Além disso, o pH não apresentou uma queda brusca, possivelmente devido a menor produção de ácidos orgânicos.

Figura 17. Perfis de carbono orgânico total (A), nitrogênio total (B), umidade do meio sólido (C) e pH do extrato fúngico (D) durante o CES de *T. reesei* em bagaço de cana-de-açúcar com e (○) sem adição de sacarose (□)

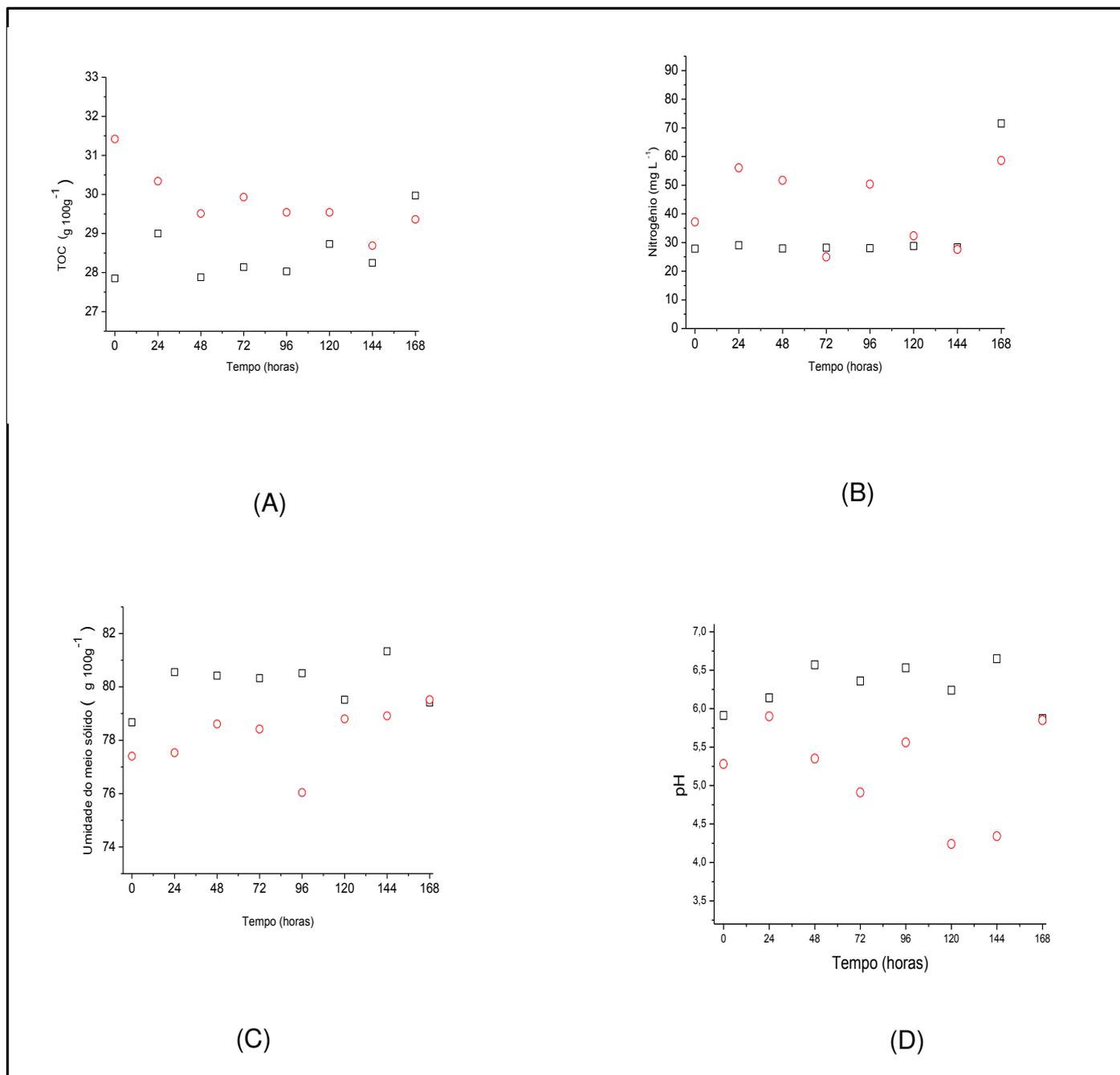
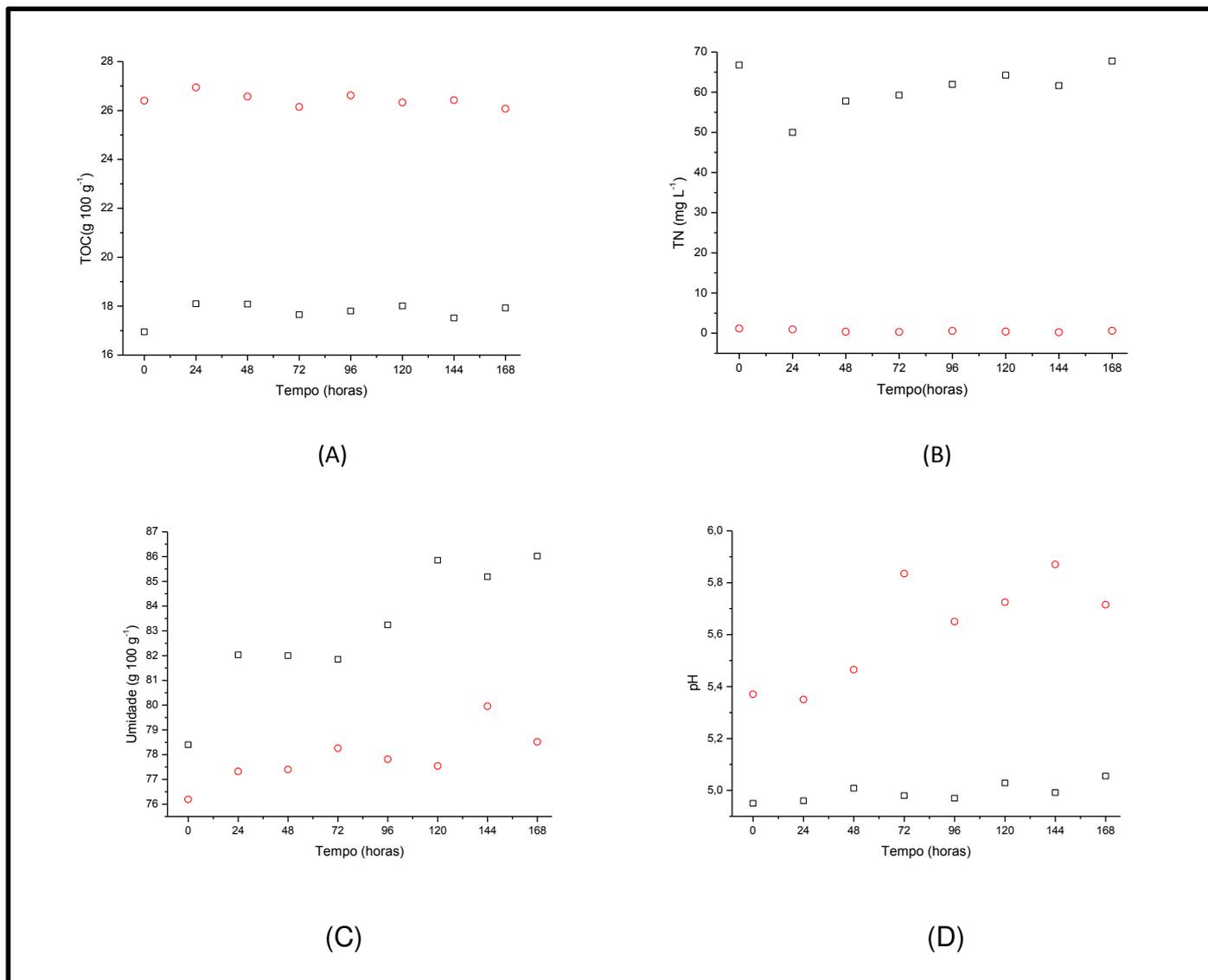


Figura 18. Perfis de carbono orgânico total (A), nitrogênio total (B), umidade do meio sólido (C) e pH do extrato fúngico (D) durante o CES de *T. reesei* em bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□)



5.2.3 Cultivo em estado sólido do consórcio de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana de açúcar

A literatura reporta que o consórcio entre *Trichoderma reesei* e *A. niger* pode levar a uma complementação em termos de enzimas hidrolíticas se comparado ao cultivo dos micro-organismos separadamente, o que possibilitaria uma aproveitamento maior dos substratos (YANG et al., 2004; PAPAGIANNI,

2007). Entretanto, há uma lacuna no conhecimento sobre o consórcio destes fungos para obtenção de outros bioprodutos como ácido cítrico. Sendo assim, ensaios com o consórcio de *A. niger* e *T. reesei* foram propostos e os resultados são apresentados nas Figuras 19 à 24 para condição com e sem a adição de sacarose e com vinhaça bruta e hidrolisada como solução umidificante das partículas de bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com as Figuras 19 e 20, na condição com sacarose foi possível obter uma concentração máxima de ácido cítrico em torno de 113 mg L⁻¹ em 4 dias de cultivo. Este valor é levemente superior ao obtido usando unicamente *A. niger*, sugerindo que este fungo é o principal responsável pela produção de ácido cítrico neste sistema. A utilização de vinhaça bruta ou hidrolisada não levou a uma obtenção superior de ácido cítrico quando foi inoculado o consórcio microbiano, indicando que o fornecimento de sacarose foi fundamental para esta conversão pelos fungos. Por outro lado, a quantidade de glicose liberada no extrato fúngico foi inferior ao cultivo onde foi inoculado somente *T. reesei*, indicando que este fenômeno foi prejudicado pela presença de outro micro-organismo e competição pela quantidade de glicose disponível, esta condição é observada para todos os ensaios.

Novamente, os perfis de carbono, nitrogênio, umidade e pH do meio sólido não sofreram variações consideráveis durante o período experimental, com destaque para a queda do pH após 48 horas para o cultivo com sacarose e com vinhaça bruta, momento este em que a produção de ácido cítrico se intensifica.

Podemos observar que para a condição de vinhaça hidrolisada o nitrogênio aumenta nas primeiras 24 horas e diminui progressivamente até as 144 horas, caindo bruscamente até as 168 horas de experimento.

Figura 19. Perfis de ácido cítrico durante o CES de *T. reesei* e *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com (○) e sem adição de sacarose (□).

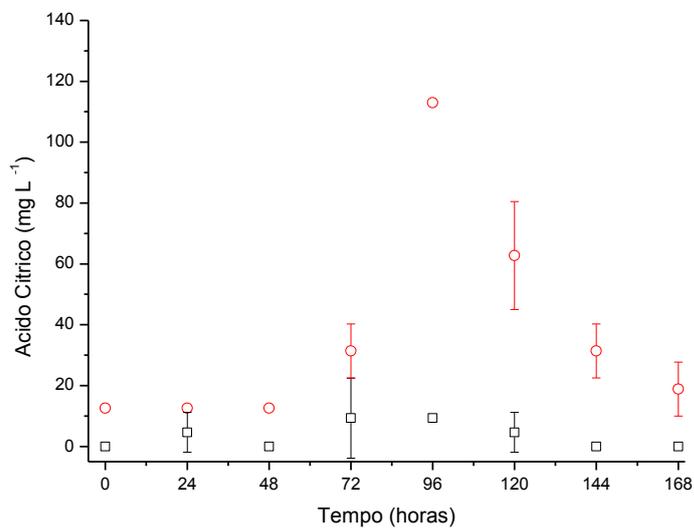


Figura 20. Perfis de ácido cítrico durante o CES de *T. reesei* e *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□)

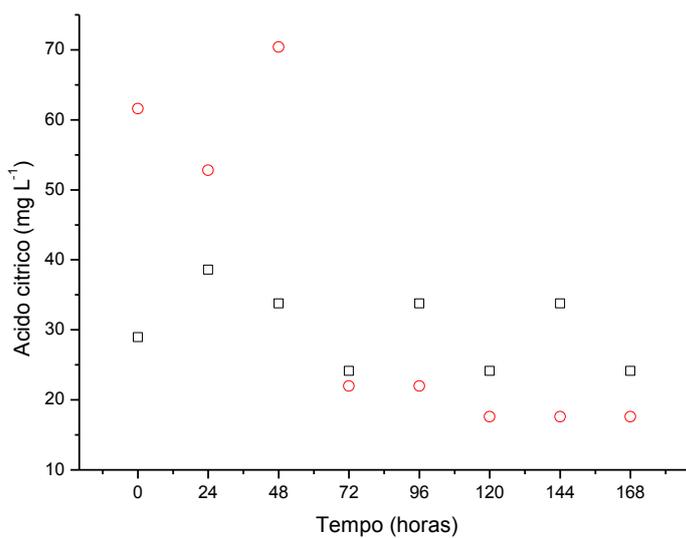


Figura 21. Perfis de glicose durante o CES de *T. reesei* e *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com (○) e sem adição de sacarose (□)

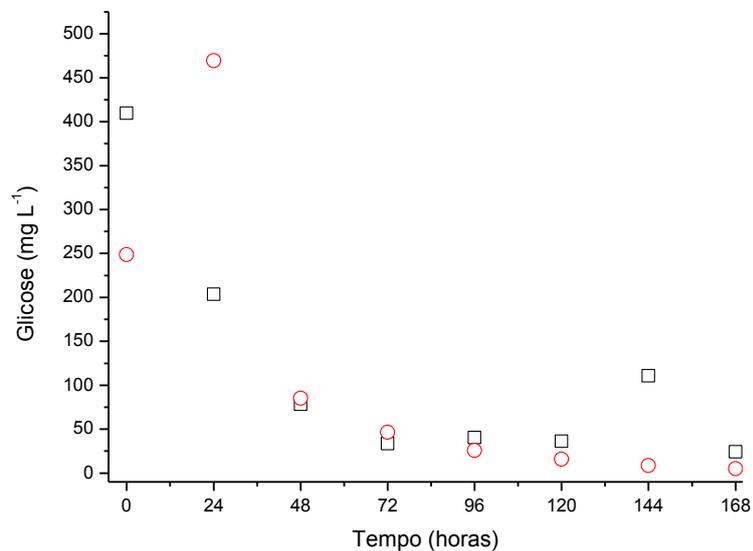


Figura 22. Perfis de glicose durante o CES de *T. reesei* e *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□)

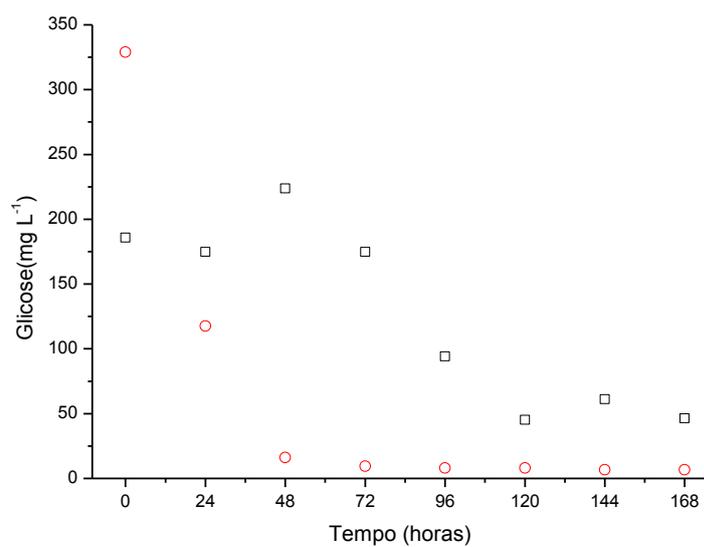


Figura 23. Perfis de carbono orgânico total (A), nitrogênio total (B), umidade do meio sólido (C) e pH do extrato fúngico (D) durante o CES de *T. reesei* e *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com e (○) sem adição de sacarose (□)

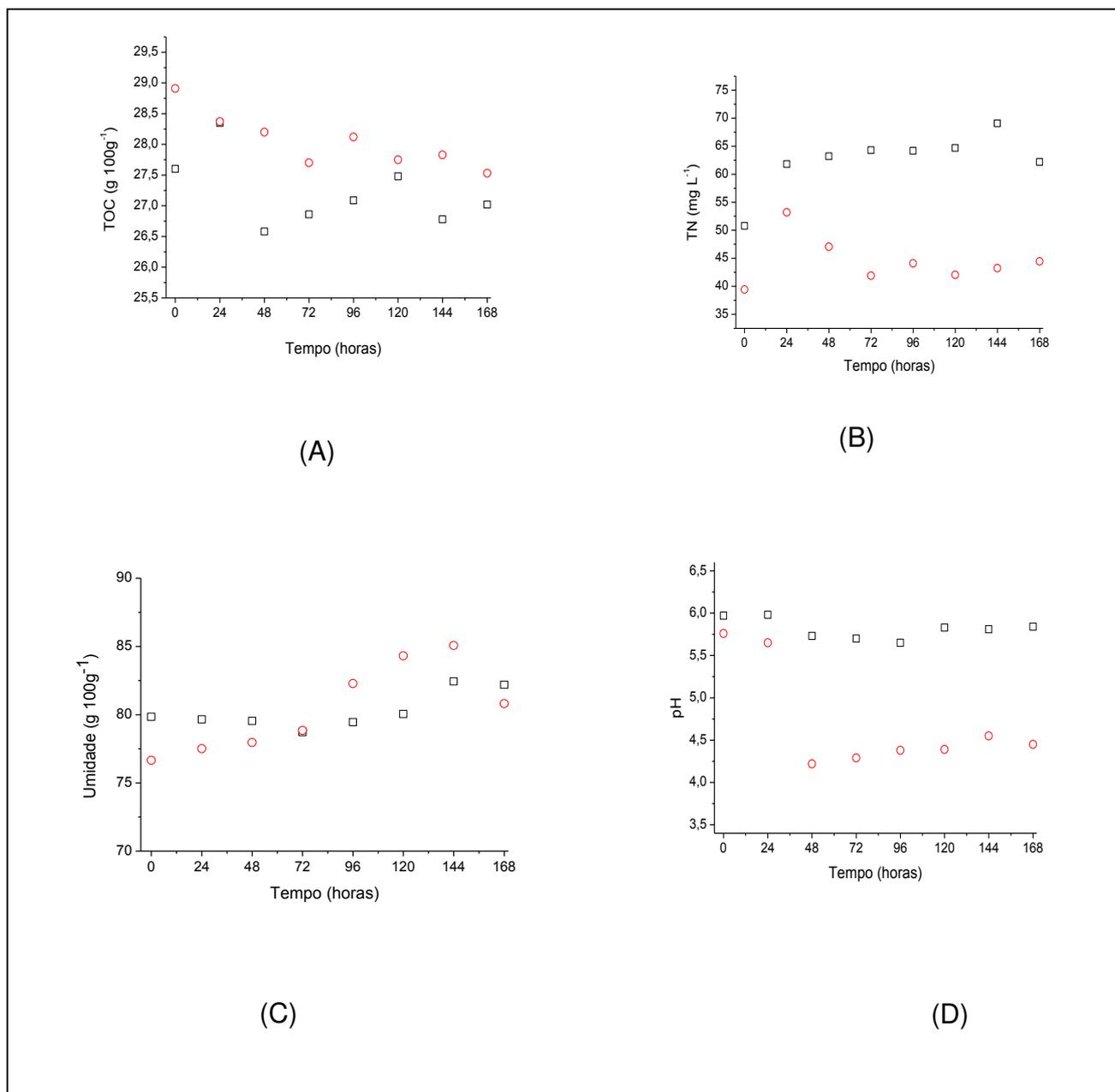
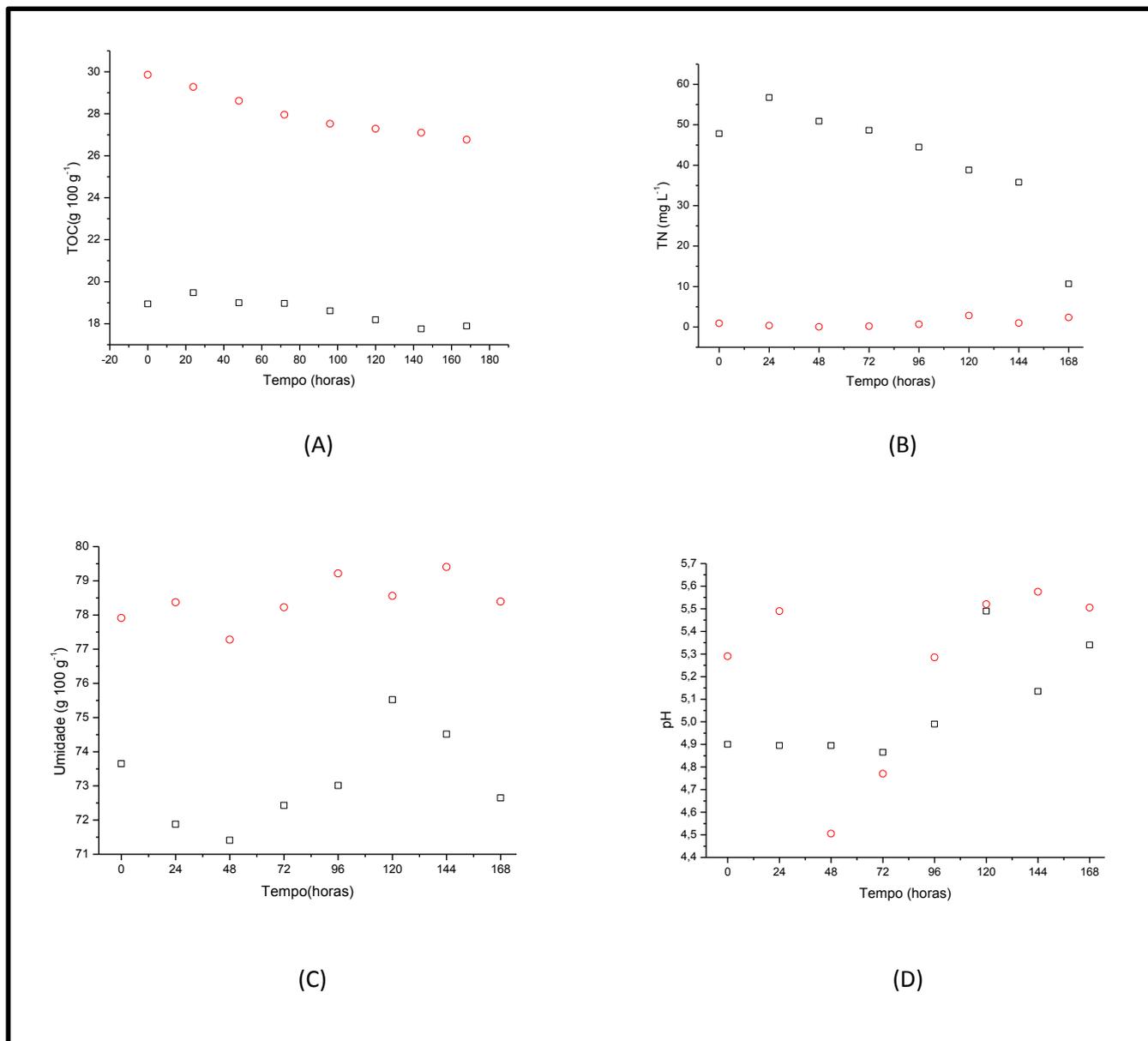


Figura 24. Perfis de carbono orgânico total (A), nitrogênio total (B), umidade do meio sólido (C) e pH do extrato fúngico (D) durante o CES de *T. reesei* e *A. niger* em bagaço de cana-de-açúcar com vinhaça bruta (○) e hidrolisada (□)



5.2.4 Análise de parâmetros de processo no cultivo em estado sólido de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana de açúcar

Conforme verificado nos itens anteriores, tanto a quantidade de carbono total (TOC) como o teor de glicose no extrato fúngico apresentaram um balanço

entre consumo e produção, o que prejudica a estimativa do rendimento e análise da conversão destes substratos em ácido cítrico. Desta forma, os parâmetros que podem descrever de forma mais confiável os cultivos são a produtividade máxima (P_{rod}) e a velocidade específica de formação de ácido cítrico (μ_P). Devido às reconhecidas dificuldades em quantificar a biomassa nos CES, tal estimativa foi realizada considerando a fórmula elementar empírica dos fungos (Nielsen et al. 2003) e o teor de nitrogênio total determinado.

Sendo assim, a Tabela 3 apresenta a P_{rod} e μ_P para os cultivos em bagaço de cana-de-açúcar com os fungos isolados e consorciados, nas condições de máximos teores de ácido cítrico. Apesar dos CES com *Trichoderma* apresentarem valores levemente superiores para vinhaça bruta, não houve de fato uma produção de ácido cítrico, mas uma manutenção dos teores em torno de 60 mg L^{-1} (Figura 14). Os resultados indicam que, para os fungos isolados, que a produtividade mais elevada para *A. niger* se deve a uma quantidade maior de biomassa, o que leva a um μ_P menor. Sendo o ácido cítrico parcialmente vinculado ao crescimento, a velocidade específica normaliza esta condição, já que a produtividade apenas considera a evolução do produto de interesse durante o tempo.

Tabela 3. P_{rod} e μ_P para os cultivos em bagaço de cana-de-açúcar com os fungos isolados e consorciados

Condição	P_{rod}	μ_P
	($\text{mg ácido cítrico L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	($\text{mg ácido cítrico g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
<i>A. niger</i> sem sacarose	1,08	1,72
<i>T. reesei</i> com sacarose	0,72	2,30
Consórcio fúngico com sacarose	1,18	2,51

Nesse sentido, considerando os resultados da Tabela 3, percebe-se que a utilização do consórcio fúngico foi eficaz tanto em termos de produtividade como produção específica, sendo mais indicado para a obtenção de ácido cítrico por bagaço de cana-de-açúcar na condição com adição de sacarose.

5.3 Ensaio de fermentação etanólica do extrato fúngico

Com o intuito de estudar a viabilidade do aproveitamento de glicose do extrato fúngico, tendo como prova de conceito a produção de etanol além do ácido cítrico obtido no CES, foram conduzidos ensaios de fermentação etanólica com *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 do extrato fúngico esterilizado. Para estes testes foram considerados os extratos com o maior teor de glicose passível de ser convertida em etanol. Como observa-se na Tabela 4, embora os máximos teores de glicose não ultrapassem 500 mg L^{-1} , o seu aproveitamento pode ser interessante na medida que esta quantidade é passível de ser convertida em produtos biotecnológicos com alto valor agregado. Nesse sentido, nesta etapa da pesquisa foram conduzidos ensaios de fermentação etanólica como “prova de conceito” do aproveitamento da glicose residual do extrato fúngico obtidos em diferentes condições de CES.

Tabela 4. Extratos obtidos nos CES com maiores teores de glicose no extrato fúngico para os ensaios de fermentação etanólica

Inóculo	Condição do CES	Tempo (dias)	Glicose (mg L^{-1})
<i>T. reesei</i>	Sem sacarose	5	450,00
<i>A. niger</i>	Sem sacarose	4	18,07
Consórcio	Com sacarose	4	144,62
<i>T. reesei</i>	Vinhaça hidrolisada	4	516,92

A Figura 25 apresenta as curvas de crescimento das leveduras nos diferentes extratos. Claramente o crescimento foi superior na condição do extrato obtido via CES de *T. reesei* com vinhaça hidrolisada. Porém, a condição que apresentou o melhor resultado em termos de fermentação etanólica foi o extrato de *T. reesei* sem sacarose e 5 dias de CES (Figura 26). Nesta condição podemos observar que houve uma produção de 170 mg L^{-1} de etanol em 24 horas e 220 mg L^{-1} em 48 horas. Como a glicose foi quase totalmente consumida (depleção),

o resultado aproximou-se do rendimento estequiométrico em etanol. Além disso verifica-se um aumento discreto no nitrogênio no decorrer da fermentação devido ao crescimento das leveduras, indicando que nesta condição a maior parte da glicose no meio foi convertida em etanol. Os resultados sugerem que, diferente do etanol de segunda geração convencionalmente obtido via hidrólise ácida do material lignocelulósico, não houve inibição considerável do crescimento das leveduras. De acordo com BRETHER e WYMAN (2010), potenciais inibidores da fermentação etanólica podem ser formados e liberados a partir da hemicelulose, celulose e lignina a partir da rota termoquímica de hidrólise, incluindo furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido levulínico, ácido acético, ácido fórmico, dentre outros.

Assim, a atividade do fungo *T. reesei* deve ser destacada porque, a partir da quantidade de glicose liberada, houve elevado crescimento das leveduras e eficiência destacada da fermentação etanólica.

Figura 25. Curvas de crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 em meio extrato fúngico do CES de *T. reesei* sem sacarose (\square), *A. niger* sem sacarose (\circ), consórcio microbiano com sacarose (Δ) e *T. reesei* com vinhaça hidrolisada (∇)

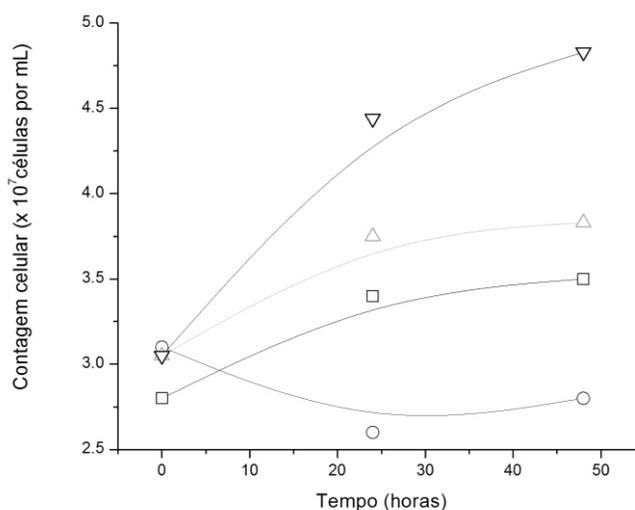
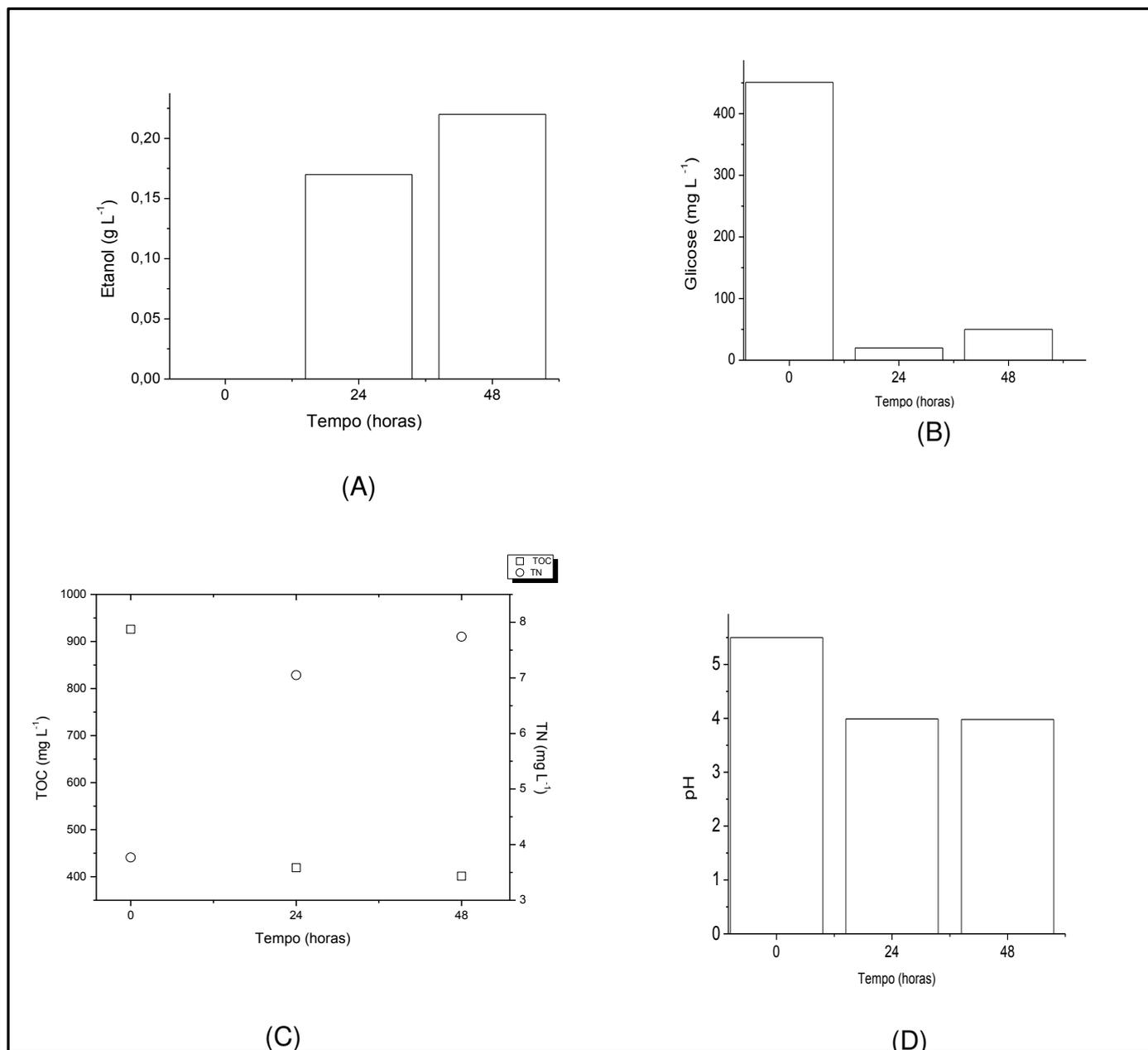


Figura 26. Perfis de etanol (a), glicose (b), carbono e nitrogênio (c) e pH (d) durante a fermentação etanólica para extrato do CES de *T. reesei* sem sacarose



Os demais resultados das fermentações a partir dos extratos em outras condições são apresentados nas Figuras 27 a 31. Para todos os casos houve redução na quantidade de carbono no meio, indicando crescimento microbiano. Nesse sentido, o próprio ácido cítrico presente no extrato fúngico pode estar

sendo consumido para produção de biomassa, considerando o metabolismo aeróbio das leveduras. Entretanto, não foram encontradas na literatura informações a respeito de uma possível conversão de ácido cítrico em etanol, de forma que, todo o álcool obtido foi devido ao consumo da glicose presente no meio. Para a condições de CES com *A. niger* sem a adição de sacarose, percebe-se uma produção de etanol mais lenta, porém, atingindo valores que indicam o consumo de outras fontes de carbono além da glicose do extrato.

Figura 27. Perfis de etanol (A), glicose (B), carbono e nitrogênio (C) e pH (D) durante a fermentação etanólica para extrato do CES de *A. niger* sem sacarose

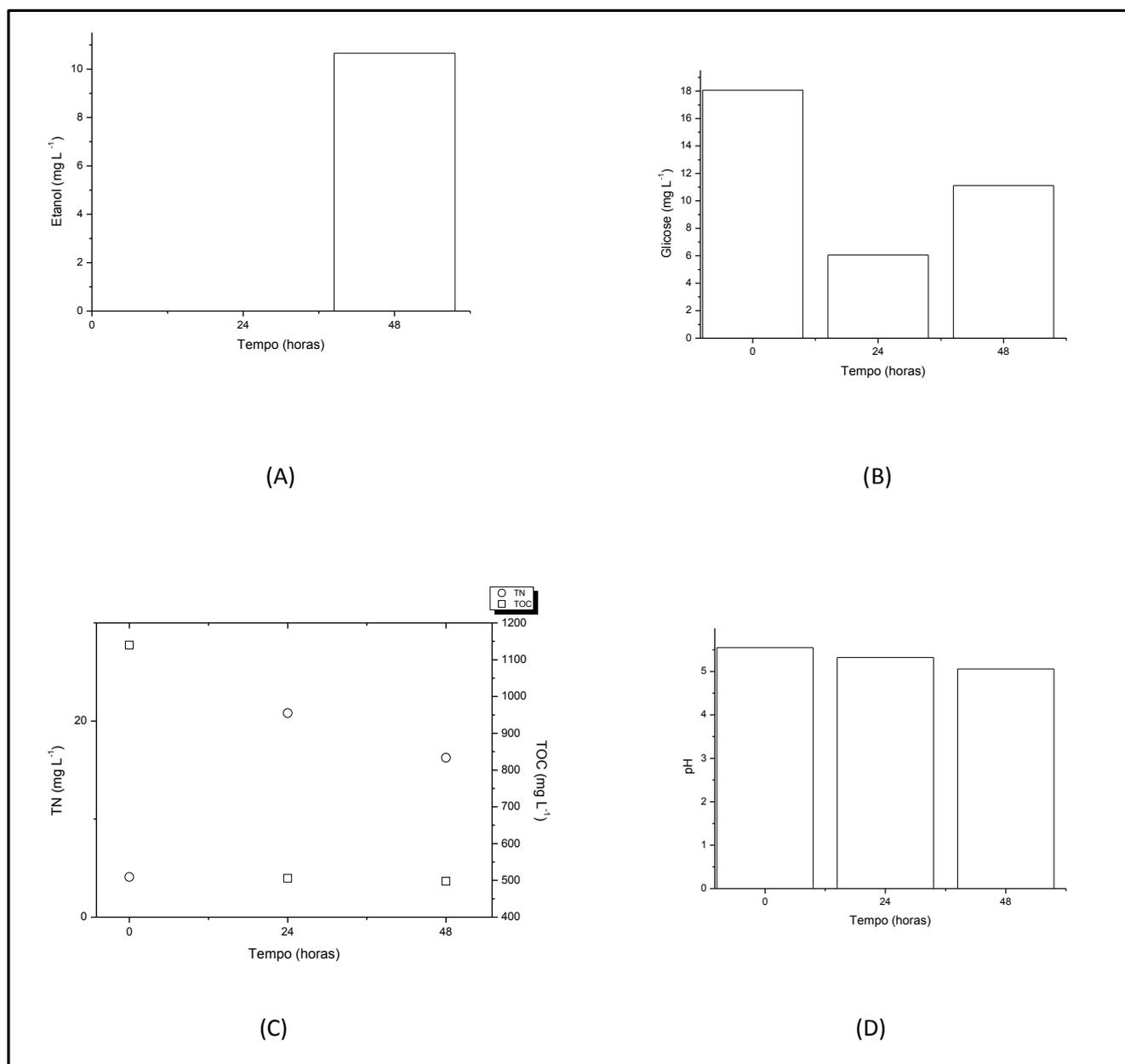
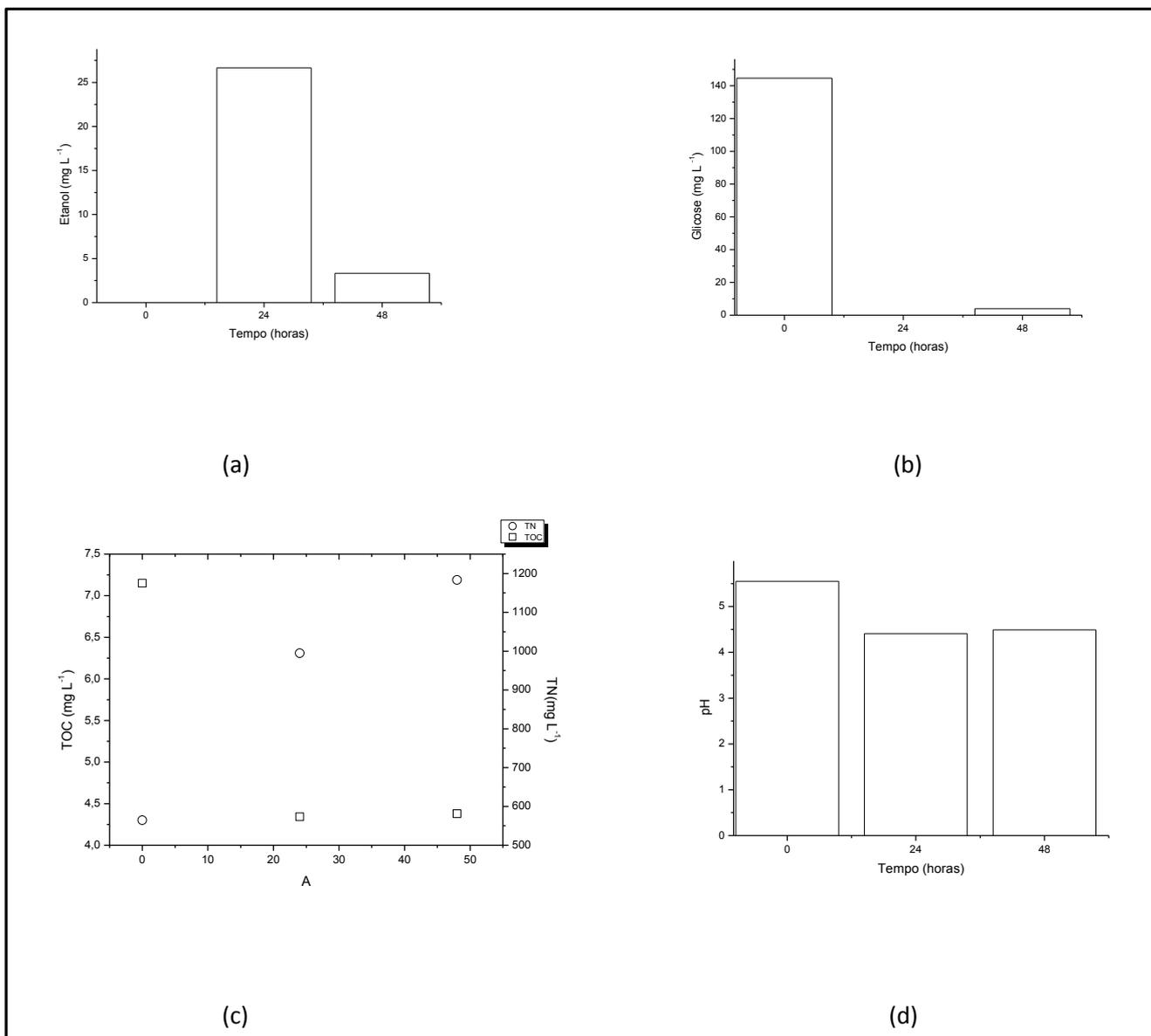


Figura 28. Perfis de etanol (A), glicose (B), carbono e nitrogênio (C) e pH (D) durante a fermentação etanólica para extrato do CES do consórcio fúngico sem sacarose



A condição de fermentação do extrato obtido a partir do consórcio fúngico levou a uma produção de etanol em torno de 25 mg L⁻¹ a partir de pouco mais de 140 mg L⁻¹ de glicose, indicando cerca de 35% do rendimento máximo estequiométrico (0,51 g de etanol por g de glicose). Isto pode ser explicado pela

produção de ácido acético nesta condição, conforme observado no cromatograma da Figura 29. Como estes ensaios ocorreram a partir de frascos agitados, a ocorrência de ácido acético nestas condições pode ser um indicativo de disponibilidade de oxigênio. Além disso, ácido cítrico também é um potencial inibidor da fermentação etanólica (BRETAHUER e WYMAN, 2010). Entretanto, o mais importante é inferir que houve aproveitamento dos substratos contidos no extrato pelas leveduras.

Figura 29. Cromatograma da amostra com 48 horas de fermentação etanólica do extrato fúngico obtido via CES do consórcio microbiano com sacarose

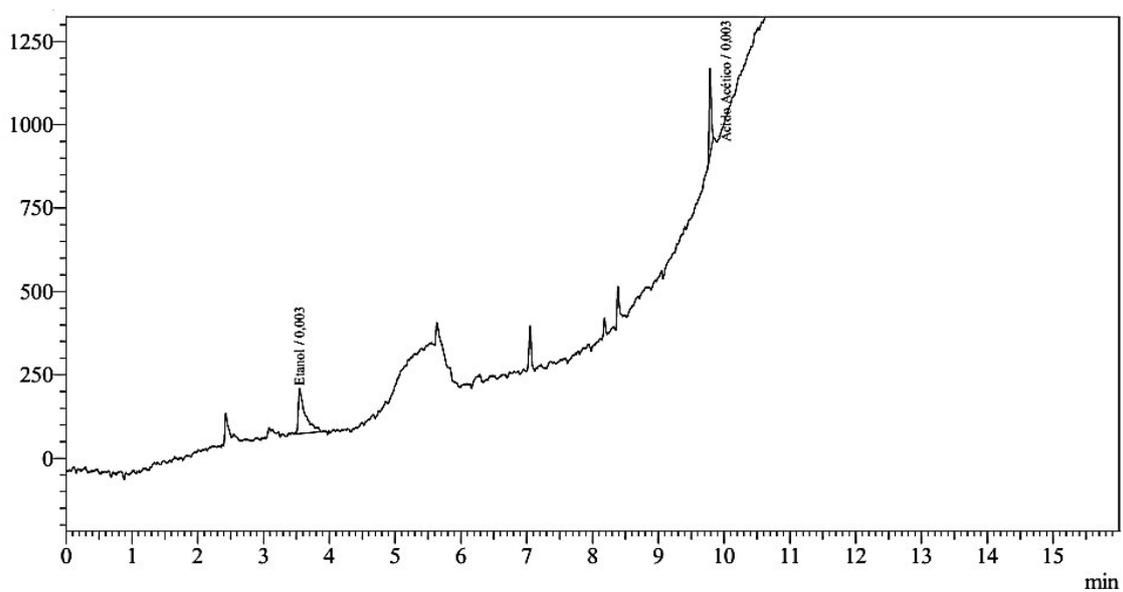
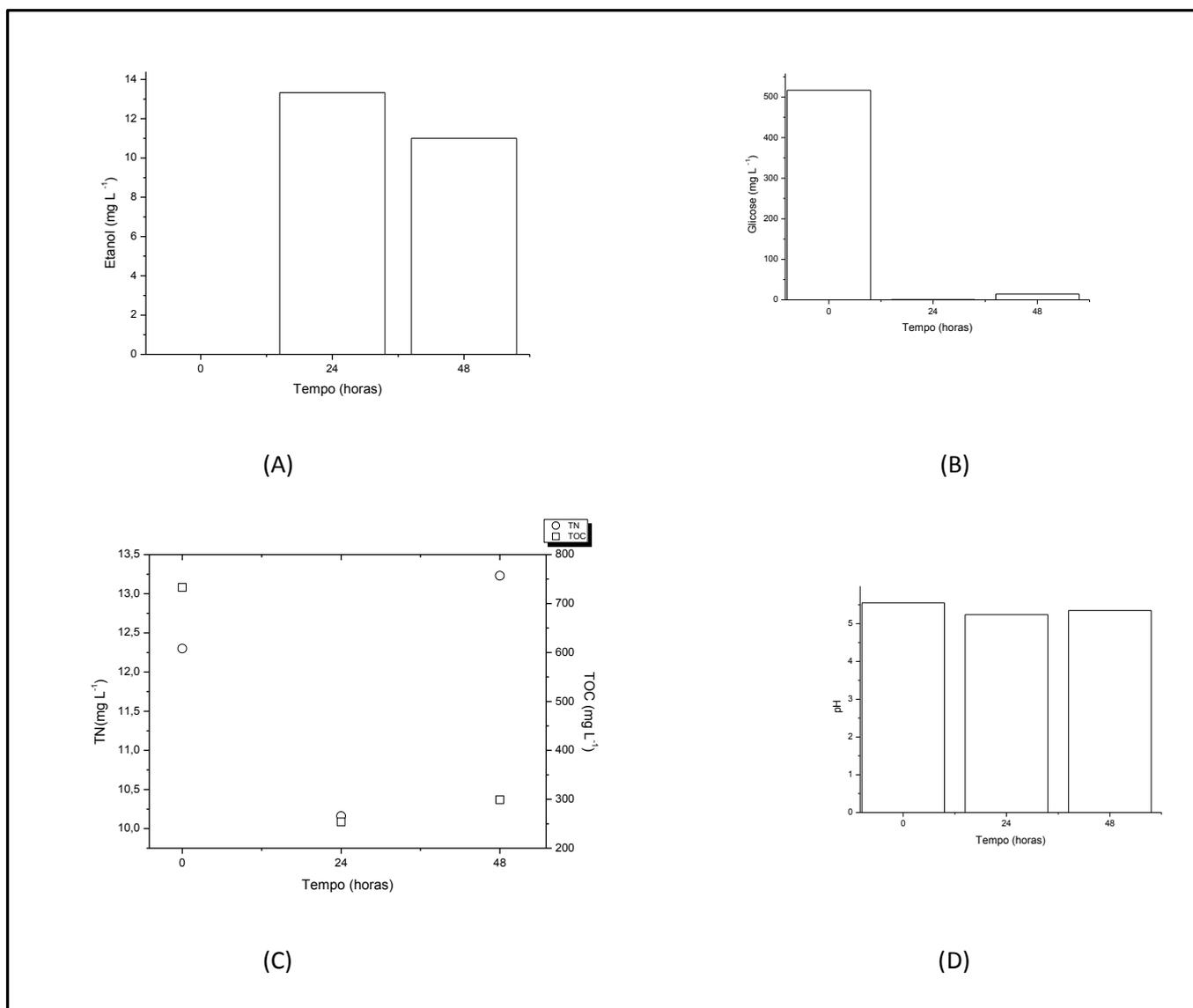


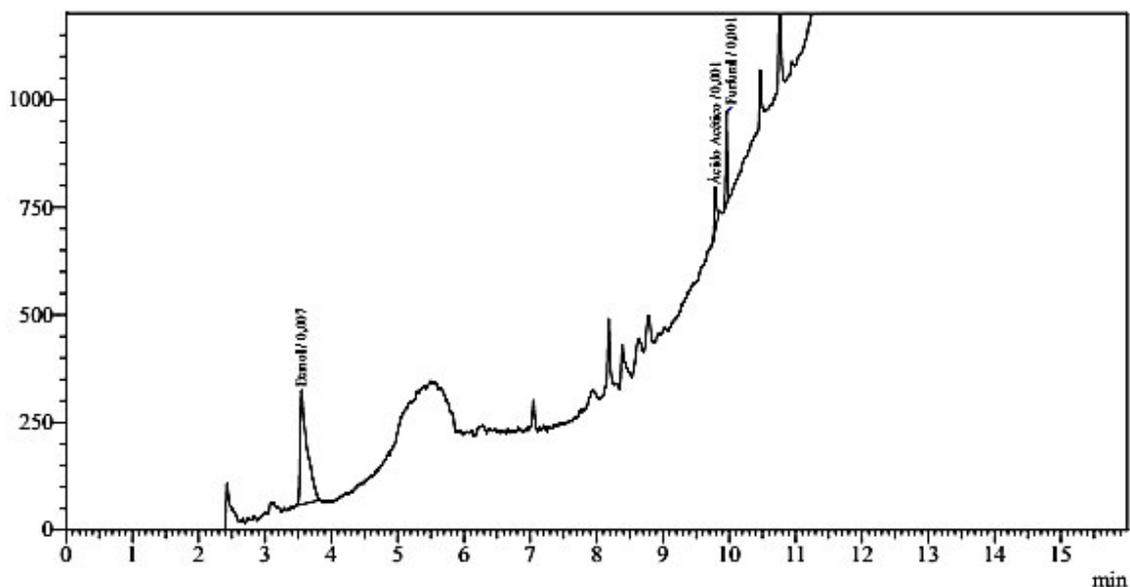
Figura 30. Perfis de etanol (A), glicose (B), carbono e nitrogênio (C) e pH (D) durante a fermentação etanólica a partir do extrato fúngico via CES de *T. reesei* com vinhaça hidrolisada



Para a fermentação do extrato do CES de *T. reesei* tendo vinhaça hidrolisada como solução impregnante das partículas de bagaço, verificou-se a presença de furfural no meio com 24 horas de cultivo, logo após o pico de ácido acético, com um tempo de residência um pouco superior a 10 minutos na coluna cromatográfica. Sabe-se que este componente é um inibidor microbiano e sua ocorrência pode ser atribuída ao uso de vinhaça, por tratar-se de uma molécula gerada pela degradação de açúcares (SAHA, 2004). Tal componente não foi detectado no final da fermentação, mas sua presença pode ter prejudicado o

desempenho da fermentação nesta condição, embora não tenha alterado o crescimento fúngico conforme já ilustrado na Figura 25.

Figura 31. Cromatograma da amostra com 24 horas de fermentação etanólica extrato obtido via CES de *T. reesei* com vinhaça hidrolisada como solução impregnante



As leveduras usadas nesta etapa do trabalho são muito utilizadas industrialmente devido a sua capacidade de fermentar rapidamente hexoses produzindo etanol, sendo muito tolerante a diversas condições de stress (HAHN-HÄGERDAL et al., 1991; ANDRIETTA et al., 2007;). No entanto, o resultado mais importante desses ensaios foi que, a princípio, não houve nenhum componente com ação inibitória presente no extrato fúngico que comprometesse a conversão de glicose em etanol, além do furfural na condição com vinhaça. Sendo assim, a aplicação de vinhaça deve ser vista com cautela se o objetivo também for o aproveitamento do extrato fungo para bioprocessos subsequentes. De uma maneira geral, os resultados indicam a viabilidade deste processo e vantagens com relação aos hidrolisados ácidos de material lignocelulósico utilizados convencionalmente no estudo da produção de etanol de segunda geração.

Sendo assim, a pesquisa demonstrou viabilidade no aproveitamento de um importante subproduto agroindustrial do setor sucroenergético com resultados promissores em termos de produção de ácido cítrico e etanol. Assim, a proposta representa uma alternativa e valoração via obtenção de produtos biotecnológicos de alto valor principalmente do bagaço de cana-de-açúcar, subproduto obtido em grande escala na região de Araras.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas diferentes condições experimentais, podemos concluir que:

- É viável o cultivo de *Aspergillus niger* em partículas de bagaço de cana-de-açúcar submersas (meio heterogêneo) com produção de ácido cítrico, tendo como melhor condição a adição de 1 % (em massa) de sacarose;

- *Aspergillus niger* pode ser cultivado em bagaço de cana-de-açúcar com produção máxima em torno de 103 mg L⁻¹ de ácido cítrico em 4 dias para a condição sem adição de sacarose ao meio sólido;

- *Trichoderma reesei* apresenta crescimento em bagaço de cana-de-açúcar, com destaque para a produção de ácido cítrico em torno de 67 mg L⁻¹ em apenas um dia tendo vinhaça bruta como solução impregnante das partículas;

- É viável o CES do consórcio microbiano de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar, com produção específica de ácido cítrico (2,51 mg g⁻¹h⁻¹) superior ao obtido empregando os dois fungos isoladamente;

- O consórcio microbiano utilizando vinhaça bruta permitiu o aproveitamento simultâneo de dois subprodutos gerados na mesma plataforma industrial.

- Os resultados da fermentação etanólica do extrato fúngico obtido nas diferentes condições de CES indicam a viabilidade do aproveitamento dos substratos liberados durante o crescimento fúngico posterior;

- O aproveitamento do extrato fúngico abre um campo interessante de pesquisas para a obtenção de outros bioprodutos de maior valor agregado além do próprio CES.

7 SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

- Estudar os cultivos usando inóculo com consórcio em diferentes proporções de *T. reesei* e *A. niger*;
- Estudar outras condições para o CES como, aeração, umidade inicial, pH, temperatura e tamanho das partículas;
- Avaliar os ensaios em escala maior, com um volume de meio sólido de pelo menos 10 vezes maior;
- Realizar os ensaios de fermentação etanólica em biorreator de bancada;
- Avaliar o aproveitamento da glicose do extrato fúngico para a obtenção de demais metabólitos de maior valor agregado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHAM, N. Z. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. **Bioresource technology**, v. 84, p. 97–100, ago. 2002.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 1, p. 41–46, out. 2008.

ANASTASSIADIS, S.; AIVASIDIS, A.; WANDREY, C. Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, p. 81–87, out. 2002.

ANDERSEN, M. R. et al. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome research**, v. 21, n. 6, p. 885–97, jun. 2011.

ANDRIETTA, M. G. S., ANDRIETTA, S. R., STECKELBERG, C., STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol: 30 years of proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n.1299, p.195-200, 2007.

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

BARRINGTON, S.; KIM, J.-W. Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. **Bioresource technology**, v. 99, p. 368–377, jan. 2008.

BASSO, T.P.; GALLO, C.R.; BASSO, L.C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.11, p. 1282-1289.2010.

BASTOS, V. D., Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.25, p.5-38, 2007

BASTOS, REINALDO GASPAR ; MOTTA, FERNANDA LOPES ; SANTANA, MARIA HELENA ANDRADE . Oxygen Transfer in Solid-State Cultivation Under Controlled Moisture Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p.2014.

BASTOS, REINALDO GASPAR ; VOLPI, M.P.C. ; MORAIS, D.V. . Influence of solid moisture and bed heigh in cultivation of *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse with vinasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** (Online), v. 32, p. 377-384, 2015.708-718, 2015.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana de açúcar para a produção de etanol. In: III **Workshop tecnológico sobre hidrólise para produção de etanol**, 3, São Paulo. 2007.

BAYER, E.A., LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation** 3, 171-188.1992.

BENNETT J.W. An overview of the genus *Aspergillus*. In: **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**. (Machida M, Gomi K, eds) Caiser Academic Press, Portland: 1–17.2010.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Crit Rev Biotechnol** 22:375–407.2002.

BONFIM, K. S. et al. Comparação da síntese de celulases pelos fungos *Trichoderma reesei* E O FSDE15. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1–7, 2010.

BONINI, A. M., BASTOS, R. G., Produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de Glicose. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 151-160, jul./dez. 2012
BULEÓN, A; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 23, p. 82-112, 1998

BRAKHAGE, A.A. Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Current Drug Targets* v.6, p.875–886.2005.

BRASIL, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar. Brasília, Agosto 2012, segundo levantamento, 18p.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 4862 - 4874. 2010.

CAI, Y.J.; CHAPMAN, S.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S. Production and distribution of endo- β -glucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. **Applied and Environmental Microbiology** v.65, p.553–559.1999.

CARDONA, C. A; QUINTERO, J. A; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754–66, jul. 2010.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova** [online], v.33, n.1, p. 181-188, 2010.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, v.27, p.51-57, 2008.

CHANDEL, A. K., RAJEEV, K. K., SINGH, A., KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n.10, p. 1947-1950, 2007.

CINELLI, C.L.K. **Interferência estatística e a prática econômica no Brasil: os (ab)usos dos testes de significância**. 2012. 135p. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Brasília.

CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. Biomassa para Bioenergia. UNICAMP[S.I.], 2008

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.Á. Application of solid state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, p.291-302. 2006.

CRUEGER, W. E; CRUEGER, A. Biotecnologia: Manual de Microbiologia Industrial. **Zaragoza**: Acribia, 413p.1993.

CUI, Y.; DONG, X.; TONG, J.; LIU, S. Degradation of lignocellulosic components in unpretreated vinegar residue using an artificially constructed fungal consortium. **Bioresources**, v.10, p. 3434-3450.2015.

DELABONA, P.D.; PIROTA, R.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products** v.42, p.236-242.2013.

DELABONA, P.S. **Bioprospeção de fungos produtores de celulases da região amazônica para a produção de etanol celulósico**. Dissertação de mestrado - UFSCar, São Carlos, 121p. 2011.

DHILLON, G. S. et al. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 83–92, abr. 2011.

DHILLON, G. S. et al. 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, jan. 2013.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, V. 13. p.113-125. 2003.

EL-BONDKLY, A. M. Gene transfer between different *Trichoderma* species and *Aspergillus niger* through intergeneric protoplast fusion to convert ground rice straw to citric acid and cellulases. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 135, p. 117–32, nov. 2006.

FERREIRA, M.A.B.; MAIOR, A.M.S. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído. In: **XIX CONIC, III CONITI e VII JOIC. CTG – UFPE**, 2011

FRANSCISCHINI, F. In: Tecnologia e Gestão Sulcroalcoleira (Curso de extensão). Araras: Uniararas, 2008, 1CD-ROM.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: **Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics**. Ed. Taylor & Francis. v.1.2002.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665–667, 1997.

GUTIÉRREZ-CORREA, M.; VILLENA, G. K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category Fermentación. v. 10, p. 113–124, 2003.

HASAN, S.D.M.; ZOLNER, R.; SANTANA, M.H.A. Fungi Allergens Produced by Solid-State Fermentation Process: Optimization and Allergen Characterization **Applied Biotechnology and Biochemistry**, V.106, p. 403-412. 2003

KAHIL, T.; HASSAN, H.M. Economic co-production of cellulase and α -Amylase by Fungi Grown on Agro- Industrial Wastes Using Solid-State Fermentation Conditions. **Middle East Journal of Applied Sciences**. v.5.p.184-195.2015

KAMZOLOVA, S. V et al. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 217–222, abr. 2003.

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

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

KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1–29, 2011.

KUMAR, D. et al. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1731–1738, 2003.

LEEUWEN, M. R. VAN et al. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 59–70, 2011.

LEKANDA, J.S. & PÉREZ-CORREA, J.R. Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. **Process Biochemistry**, V.39, p.1793- 1802. 2004.

LINDER, M.B.; SZILVAY, G.R.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; PENTTILÄ, M.E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. **Federation European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews**, V.29, p.877-896. 2005.

LÓPEZ-GARZÓN, C. S.; STRAATHOF, A. J. J. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 873–904, 2014.

LYND, L.R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H. AND PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 66: 506–577.2002.

MADAMWAR, D.; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 183–186, 1992.

MART, C.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274–282, 2002.

MATTEY, M. Biochemistry of citric acid production by yeasts. In: Kristiansen B, Matthey M, Linden J, editors. **Citric acid biotechnology**. London: Taylor and Francis; 1999. p. 33–54.

MAZUTTI, M. et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 56–59, jun. 2006.

MEKALA, N.K.; SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 151:122–131.2008.

MENEZES, E. A. et al. Biochemical, antigenic and allergic characterization of crude extracts of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. **Mycopathologia** v. 131, p. 75–81, 1995.

MEYER, V.; WU, B.; RAM, A.F;. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnology Letters** 33: 469–476.2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011**. Secretaria de Produção e Agroenergia. 2ed. revisada. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2006, 110p.

- NASCIMENTO, V.M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros.** Dissertação de Mestrado - UFSCar, São Carlos, 136p. 2011.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDEN, G. **Bioreaction engineering principles**, 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum, New York. 2003.
- NOOR EL-DEEN, A. M.; SHATA, H. M. A. H.; FARID, M. A. F. Improvement of β -glucosidase production by co-culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae* under solid state fermentation through feeding process. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 627–637, 31 jul. 2013.
- OLIVEIRA, A.F.; MATOS, V.C.; BASTOS, R.G. Cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse with vinasse. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 889–894. 2012.
- OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, V.18. p.355-360. 2000.
- PANDEY, A. Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109–117, 1992.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, ago. 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. July 2002, p. 81–84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, jul. 2000.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. **Bioresource technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–34, set. 2007.
- PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 244–263, 2007.
- PAWAR, N.V.; PATIL, V.B.; KAMBLE, S.S.; DIXIT, G.B. First Report of *Aspergillus niger* as a Plant Pathogen on Zingiber officinale from India. **Plant Disease** v. 92, p.1368– 1368.2008.
- PENSUPA, N. et al. A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 149, p. 261–7, dez. 2013.

PITT, J.I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical and Veterinary Mycology** 32 Suppl. v.1, p.17–32.1994.

PRADO, F. C. et al. Relation between Citric Acid Production and Respiration Rate of *Aspergillus niger* in Solid-State Fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 2, p. 179–186, doi:10.1002/elsc.200420020, 2004.

RAMOS, A.S.P. **Transporte de glicose em *Trichoderma reesei*: caracterização estrutural e funcional dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2***. Tese de doutorado. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 106p. 2002.

REINO, J.L.; GUERREIRO, R.F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I.G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**. v. 7 p. 89 – 123, 2008.

ROIGERS, D.J.; JEFFERS, S.N.; CALDWELL, R.W. Occurrence of *Trichoderma* species in Apple orchard and woodland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p. 352-359, 1991.

ROUKAS, T. Influence of impeller speed on citric acid production and selected enzyme activities of the TCA cycle. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 221–226, abr. 1991.

SAAD, M. B. W.; GONÇALVES, A. R. Avaliação técnica-econômica da produção de etanol de bagaço de cana via hidrólise enzimática. In: **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, 18, 2011, Caxias do Sul, Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011

SABU, A.; KEERTHI, T.R.; RAJEEV KUMAR, S. & CHANDRASEKARAN, M. L- Glutaminase production by marine *Beauveria* sp. under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, V.35, p.705-710, 2000.

SAHA, B.C. Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology. American Chemical Society, pp. 2–34. 2004.

SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**. v.100, p.923-935.1996.

SCHEUFELE, F.B.; BUTZKE, A.S.; MARRA, I.F.; HASAN, S.D.M.; FIORESE, M.L. 2012. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engvista**, v. 14, p. 310-321, 2012.

SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, p. 43 – 58, 2012.

SILVA-FILHO, E. A. **Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de**

fermentação. 2003. 108p. Doutorado em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2003

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, abr. 2009.

SOARES, P.A; ROSSELL, C.E.V. **Conversão de celulose pela tecnologia Organosolv**. NAIPPE - USP, Vol. 3 - Nova Série, São Paulo, 2007.

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

STOILLOVA, I. S.; GARGOVA, S. A.; KRASTANOV, A. I. Production of Enzymes by Mixed Culture from Micelial Fungi in Solid-State Fermentation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 19, n. 1, p. 103–108, 15 abr. 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599 - 1606, 2005.

SUN, J. X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, jun. 2004.

SUZUKI, A. et al. Direct Production of Citric Acid from Starch by a 2-Deoxyglucose- Resistant Mutant Strain of *Aspergillus niger*. v. 81, n. 4, p. 320–323, 1996.

TORRADO, A. M. et al. Citric Acid Production from Orange Peel Wastes by Solid-State Fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 394–409, 2011.

TRENNEPOHL, T. **Mundo depende do petróleo, extraído de 20 países enquanto o etanol tem mais de 100 países aptos a produzi-lo**. Valor Econômico, 30 jul. 2010.

VANDENBERGHE, L. P. . et al. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 175–178, set. 2000.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. Microbial Production of Citric Acid. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 3, p. 263–276, 1999.

WAITES, M.J.; MORGAN,N.L.; ROCKEY, J.S.; HIGTON,G. **Industrial Microbiology: An Introduction**.Blackwell Science, 288p. 2001.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3087–3094, set. 2005.

WESSELS, J.G.H. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. **Trends in Plant Science**. V.1 (1), pp.9-15. 1996.

YANG, Y. H. et al. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 34, n. 1, p. 1–6, 1 mar. 2004.

ANEXO

Trabalho completo submetido à revista *Industrial Crops and Products*

CITRIC ACID PRODUCTION BY THE SOLID-STATE CULTIVATION
CONSORTIUM OF *Aspergillus niger* AND *Trichoderma reesei* FROM SUGARCANE
BAGASSE

Hiléia Camargo Ribeiro França.

UFSCar Araras – Centro de Ciências Agrárias, Rodovia Anhanguera, Km 174, CEP 13604-900, Araras - São Paulo – Brasil. Email:

hileiacr@hotmail.com (corresponding author).

Reinaldo Gaspar Bastos.

UFSCar Araras – Centro de Ciências Agrárias, Rodovia Anhanguera, Km 174, CEP 13604-900, Araras - São Paulo – Brasil. Email:

reinaldo@cca.ufscar.br

Abstract

Solid-state cultivation (SSC) is characterized by microbial growth on solid supports often agroindustrial by-products in the near absence of free water conditions. Citric acid, an important by-product used in various sectors of the economy that can be obtained from the SSC using sugarcane bagasse, minimizing the cost of its production with the use of this industrial by-product. The fungal consortiums have advantages over the isolated cultures, highlighting the best use of substrates due to enzyme supplementation, especially hydrolases. Thus, the aim of this research was to evaluate the SSC of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* alone and in consortium for the citric acid production from sugarcane bagasse. The results indicated a maximum production of citric acid by *A. niger* around 103 mg L⁻¹ for 4 days without addition of sucrose in the solid medium. *Trichoderma reesei* provides a citric acid production of around 50 mg L⁻¹ over 3 days with the addition of sucrose. The microbial consortium of fungi led to a specific production of citric acid of 2.51 mg per g of biomass per hour, which was higher than that obtained when using the two fungi alone.

Keywords: solid-state cultivation, sugarcane bagasse, microbial consortium, citric acid.

INTRODUCTION

Solid-state cultivation (SSC) may be defined as the microbial growth on solid supports in conditions of the absence of free water, i.e., similar to the occurrence of fungi found in nature [1]. This process has been highlighted in chemical, food, pharmaceutical and agricultural industries as it requires little power, produces low-waste and reuses industrial residues as substrates having advantages when compared to submerged fermentation as it produces more a concentrated product and a higher yield in some metabolites [2]. Among the many microorganisms that can be grown from solid supports, those distinguished by filamentous fungi have the best ability to grow in these conditions due to their physiological and biochemical characteristics [3]. After the phycomycetes (*Mucor* and *Rhizopus*), ascomycetes (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*); basidiomycetes (*Polysporus*) and hyphomycetes (*Dreschlera*) are the most studied classes [4, 5, 6].

Literature data foment that fungal consortia have advantages over the use of unique cultures because they better use the substrate leading to higher incomes and are better adapted and more resistant to contamination by other micro-organisms due to the synergistic interactions that occur between them [7]. There are reports that in lignocellulolytic microorganisms, they naturally interact in mixed cultures to degrade cellulose, occur without competition for nutrients and that they are compatible partners [8]. A known example of the association between fungi in biotechnology processes is the use of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for the production of hydrolytic enzymes. However, there is a lack of knowledge about this consortium in the generation of by products such as citric acid by SSC, which is from *A. nigeris*, the fungi most widely used in industrial terms [9, 10].

Used mainly by the food and pharmaceutical industries, citric acid is the second most produced microbial metabolite in the world. [11]. Its global production is upwards of 1.7 million tons per year, affecting an annual 5% increase in its demand, which makes it necessary to develop new processes for obtaining this molecule [12, 13].

Although most of the citric acid is produced by *A. niger* in submerged fermentation processes using solid state growth, it has been gaining momentum and the use of lignocellulosic agricultural residues such as bagasse from sugarcane has proven effective in research [3].

In this sense, the present study evaluated the citric acid production of isolated cultures of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*, as well as its consortium in the cultivating of SSC from sugarcane bagasse.

MATERIAL AND METHODS

Inoculum

The strains of *Trichoderma reesei* were provided by Dr. Itamar Soares de Melo (Embrapa, Brazil), while *Aspergillus niger* CCT 4355 belongs to the strains of cultures (LAMAM/CCA/UFSCar, Brazil). Both were maintained in a PDA medium at 4 ° C, according to the methodology proposed by Kumar et al., 2003 at the Center for Agricultural Sciences (UFSCar), Federal University of São Carlos (UFSCar), Araras, Brazil. The fungi were propagated in flasks for seven days in a synthetic medium and the spore suspension was characterized in terms of total carbon and nitrogen in TOC-LCPNSHIMADZU®.

Bagasse sugarcane

The bagasse sugarcane used in the experiments was collected in a sugar industry located in the region of Araras, Brazil, being storage in LABMAC/CCA/UFSCar. The particles of sugarcane bagasse were classified through a series of Tyler sieves, those selected were retained in the 14 and 28 mesh, corresponding to an average diameter range of 1.17 and 0.59 mm, these were subsequently sterilized in polypropylene bags.

SSC in a packed-bed column bioreactor

SSCs were set up in conventional packed-bed column bioreactor with a 30 mm diameter and a 60 mm bed height (Figure 1) at 25°C, with an up-flow aeration of 0.2 L min⁻¹ with water saturated with air by a humidifier [14]. In this context, experiments were conducted with a suspension of spores of *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and consortiums of them, with and without the addition of sucrose in the solution impregnating the particles.

The kinetic process was evaluated during the 7-day sample by analysis of the solid medium and fungal extract. In the solid medium the moisture by dry weight was determined gravimetrically. The fungal extract was obtained with deionized water in the ratio of 1:15 (solid-solvent), and then the same amount of acetone was added. Each stage lasted 45 minutes in an orbital shaker at 100 rpm and 28°C, according to the conditions adapted from Khoshavi-Darani and Zhoghi [12] and optimized by our research group [14].

Raw fungal extract obtained from each analysis had its pH characterized by potentiometry. The glucose content was determined by the glucose oxidase enzyme

method - peroxidase (LABORLAB®), citric acid by colorimetric reaction with pyridine and acetic anhydride using the IN VITRO® commercial kit and carbon and nitrogen balance in a TOC -LCPN SHIMADZU® Carbon and Nitrogen Analyzer.

The highest citric acid productivity ($Prod_{m\acute{a}x}$) was calculated considering the maximum concentration obtained in the timeframe. The specific rate of citric acid production (μ_P) was calculated considering the relationship between $Prod_{m\acute{a}x}$ and the amount of biomass, considering the elemental formula $CH_{1,72}O_{0,55}N_{0,17}$ for two fungi as reported by Nielsen et al. [15]. Furthermore, the total nitrogen concentration was determined in the TOC - LCPN SHIMADZU®.

RESULTS AND DISCUSSION

SSC of *Aspergillus niger* in sugarcane bagasse

Experiments in the packed bed column type bioreactor were first conducted with inoculum consisting of only *Aspergillus niger* suspension. According to Figure 2, it was found that the highest yield of citric acid occurred after 4 days of culture (103.45 mg L^{-1}) in the initial condition without addition of sucrose. As the measurement of the evolution of biomass in SSC is complex due to the difficulty of separating the solid support of cells, citric acid being a partially linked to growth product can only indicate fungal growth. Currently, this microorganism is extensively used in the industrial production of citric acid, especially in submerged cultivation medias from sucrose [16]. Even so, the result indicates a high yield even without the presence of sucrose, probably having the

hydrolysis of the structural components from the residue with the subsequent synthesis of citric acid. In this regard, Figure 3 shows glucose profiles in the SSC of *A. niger* in sugarcane bagasse with and without the addition of sucrose. According to the results, in the tests with the addition of sucrose a peak of glucose in the early hours was found, indicating a possible hydrolysis of this disaccharide generating monomeric units followed by a substantially constant consumption up to 7 days. Moreover, such initial behavior was not observed for the tests without the addition of sucrose, with about two days after maintenance of the glucose content (*pseudosteady-state*) due to consumption and formation from the hydrolysis of the structural polysaccharides. This glucose profile is supported by Oliveira et al. [17], which suggested this behavior due to the low content of naturally occurring monosaccharides in sugarcane bagasse.

According Papagianni, [18], citric acid production depends on the control of key parameters such as the availability of carbon, nitrogen, moisture and an optimum pH range. In this sense, Figure 4 shows the profiles of total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), the solid medium moisture and pH for the SSC fungal extract obtained from *A. niger* in sugarcane bagasse with and without adding sucrose. The results indicate a carbon balance in the fungal extract, since substrates were converted into metabolites such as citric acid, calculated in determining the TOC. However, the TN profiles indicate a discrete higher growth for the condition without adding sucrose, suggesting that fungal hydrolases were instrumental in glucose release in the middle time, as already illustrated in Figures 2 and 3. This phenomenon can also be seen in Figure 4C, where a slightly higher moisture content was observed in the experiment without the addition of glucose, which usually indicates metabolic water production and more intense fungal growth. According to Lekanda and Perez-Correa [19], the water mass balance of cultures in solid state can be described by Eq 5.1.:

$$\frac{dX_W}{dt} = R_W - E + \frac{F_W - W_P}{M_S} - \frac{X_W}{M_S} \frac{dM_S}{dt} \text{ (Eq. 5.1)}$$

Where R_W is the metabolic water production rate [g water/g solid medium.h]; E represents the water loss due to evaporation [g water/g solid medium.h]; F_W is the amount added in the solid medium; W_P is the amount of water lost in the bottom of the column; M_S is mass of solid medium. Whereas sugarcane bagasse is the solid support, no addition of water during the process and the evaporation losses are negligible due to the condensation column, we have:

$$\frac{dX_W}{dt} = R_W - \frac{X_W}{M_S} \frac{dM_S}{dt} \text{ (Eq. 5.2)}$$

Therefore, considering the water mass balance proposed by the equations described, until the second day of the experiment there is a relative moisture that is substantially constant for both conditions due to the residue of degradation for the release of glucose, there was water consumption from the hydrolysis and production of water due to the respiratory metabolism of the fungi. Thus, the reaction term Eq. 5.2 were similar, there was no significant accumulation. After this period, production word (R_W) was slightly higher due to the more intense microbial growth and due to the degradation of the solid medium, bringing the moisture content virtually, highlighted in the cultivation without additional sucrose. According to Delabona et al. [20], higher humidity solid mediums can be inconvenient because they lead to a reduction in the porosity of the particle bed and hence limit oxygen transfer. Moreover, SSC is, by definition, microbial growth on solid matrices in conditions of the absence of free water [1]. Thus, if the moisture in the solid medium

varies widely in order to have a tendency for a medium water accumulation in the final days of cultivation, the physical characteristics of CES were changed, generating a hybrid system between solid and submerged state with losses by mass transfer. However, in this paper the results point to a maximum moisture of 85%, which is below the maximum capacity of the particles' water absorption, this guaranteed the absence of free water in the system and the citric acid production can be attributed to an increase in solids. In respect of pH, it is noted that in the tests with the addition of sucrose there was a decreased value during the first hours, staying at around 4.3. On the other hand, the pH of the crude extract remained at around 5 throughout the sampling period in the tests without the addition of sucrose, a value more suitable for fungal growth, which might also have influenced the higher production of citric acid.

Another point to be noted is that the tests do not occur in axenic conditions and that, despite the occurrence of bacteria contamination be far less significant than in submerged processes due to lower water availability, this can not be ruled out. Thus, such contamination could have been more significant in the condition with sucrose in the medium, leading to a reduction in the pH due to production of other organic acids, which are common products of fermentation by bacteria reduction of pyruvate.

In this context, the results indicate the feasibility for the production of citric acid by *Aspergillus niger* in packed-bed columns using sugarcane bagasse as the natural support of the experimental conditions, i.e. without the addition of other sources of carbon and nutrients.

SSC of *Trichoderma reesei* in sugarcane bagasse

In tests carried out with *Trichoderma reesei* in packed-bed columns with sugarcane bagasse it was found that the maximum citric acid concentration was lower than the tests performed with *Aspergillus niger* (57.58 mg L^{-1}), although it does occur in 3 days of cultivation and for the condition with the addition of sucrose (Figure 5). Moreover, the glucose concentration decreased within 96 hours for both initial conditions, increasing after 120 hours with no sucrose in the experiment and after 168 hours in the experiment with sucrose remaining above 100 mg L^{-1} . The results indicate that *T. reesei* releases higher amounts of glucose in the medium compared to *A. niger*, probably due to the high structural and biological diversity of this fungus, recognized by the production of various hydrolytic enzymes, especially cellulases [21].

According to Figure 7, profiles of carbon, nitrogen, moisture and solid medium pH fungal extract of *T. reesei* does not differ much from tests with *A. niger*. In fact, the profiles tended to show a slight variation during the 7 days of sampling, a nitrogen and moisture content slightly lower for this fungus was highlighted, suggesting slower growth in the bagasse of sugarcane. Furthermore, the pH did not show a sharp decrease, possibly due to the decreased production of organic acids.

SSC with consortium of *A. niger* and *T. reesei* in sugarcane bagasse

The literature reports that the consortium of *Trichoderma reesei* and *A. niger* may lead to a supplement in terms of hydrolytic enzymes when compared to the cultivation of microorganisms separately, which would allow for a greater use of substrates [18, 22]. However, there is a gap in knowledge about the consortium of these fungi to obtain other bio-products such as citric acid. Thus, results with the consortium are shown in Figures 8, 9 and 10 for conditions with and without the addition of sucrose. According to Figure

9, provided with sucrose it was possible to obtain a maximum citric acid concentration of around 113 mg L^{-1} at 4 days of culture. This value is slightly higher than that obtained using only *A. niger*, suggesting that this fungus is primarily responsible for the production of citric acid. Moreover, the amount of glucose released into the fungal extract was lower than the cultivation where only *T. reesei* was inoculated, indicating that this phenomenon was hampered by the presence of another micro-organism and competition by the amount of available glucose.

Again, the carbon profiles, nitrogen, moisture and pH of solid medium did not suffer considerable variations during the test period, highlighting the drop in pH after 48 hours for the cultivation with sucrose, at which point the citric acid production is intensified.

Kinetic parameters in SSC of *A. niger* and *T. reesei* from sugarcane bagasse

As noted in previous sections, both the carbon content as glucose in the middle have a balance between consumption and production, which affect the estimates of income or conversion of these substrates in citric acid. Thus, the parameters may describe more reliably about the crops productivity and specific rate of citric acid formation (μ_P). For this, an estimated biomass was carried out considering the empirical elemental formula of fungi [15] and the specific total nitrogen content.

Thus, Table 1 shows the maximum $\text{Prod}_{\text{máx}}$ and μ_P for SSC in sugarcane bagasse with fungi in consortium and isolated. The results indicate that, for the isolated fungi, the higher productivity for *A. niger* is due to a higher amount of biomass, which leads to a lower μ_P . As citric acid is being partially linked to growth, the specific rates normalize

this condition, since the productivity only considers the evolution of the product of interest over time. Thus, considering the results in Table 1, it is clear that the use of a fungal consortium was effective both in terms of productivity as a specific production and being more suitable for obtaining citric acid from sugarcane bagasse with added sucrose [15].

Acknowledgment

The authors would like to thank FAPESP and CAPES for financial support.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Schematic experimental system of packed-bed column bioreactor (adapted by [14])

Figure 2. Citric acid profiles during SSC of *A. niger* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 3. Glucose profiles during SSC of *A. niger* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 4. TOC (A), TN (B), moisture (C) and pH of fungal extract (D) profiles during SSC of *A. niger* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 5. Citric acid profiles during SSC of *T. reesei* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 6. Glucose profiles during SSC of *T. reesei* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 7. TOC (A), TN (B), moisture (C) and pH of fungal extract (D) profiles during SSC of *T. reesei* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 8. Citric acid profiles during SSC of *T. reesei* and *A. niger* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 9. Glucose profiles during SSC of *T. reesei* and *A. niger* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□)

Figure 10. TOC (A), TN (B), moisture (C) and pH of fungal extract (D) profiles during SSC of *T. reesei* and *A. niger* in sugarcane bagasse with (○) and without sucrose addition (□).

FIGURES AND TABLES

Figure 1.

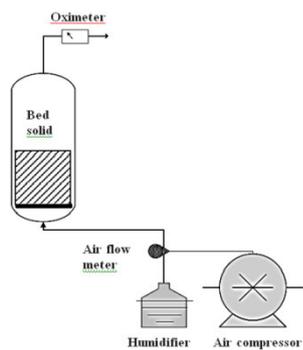


Figure 2.

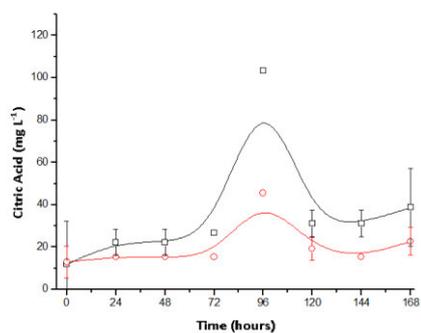


Figure 3.

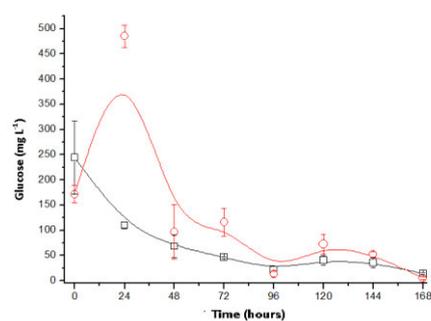


Figure 4.

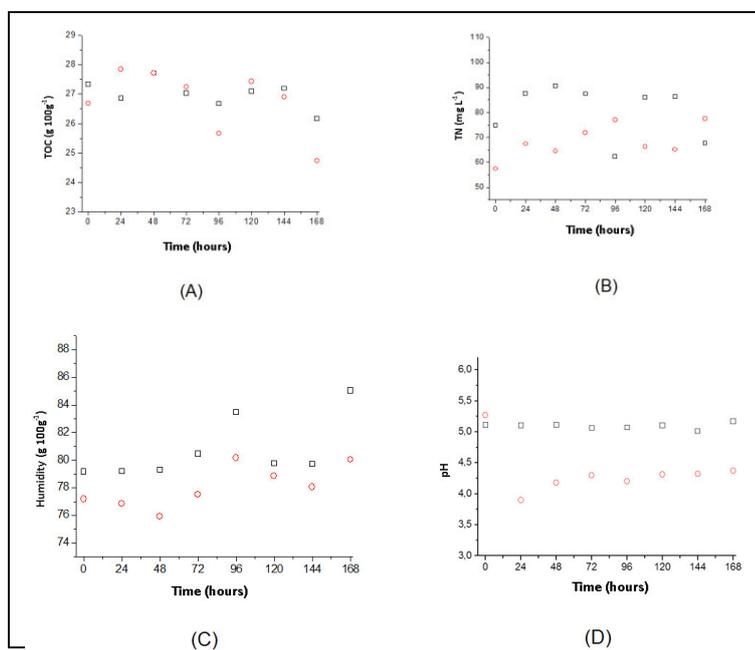


Figure 5.

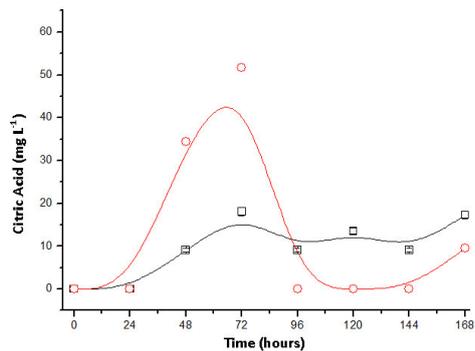


Figure 6.

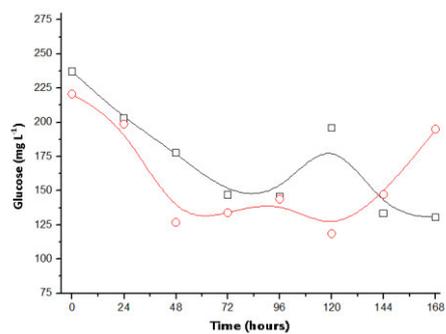


Figure 7.

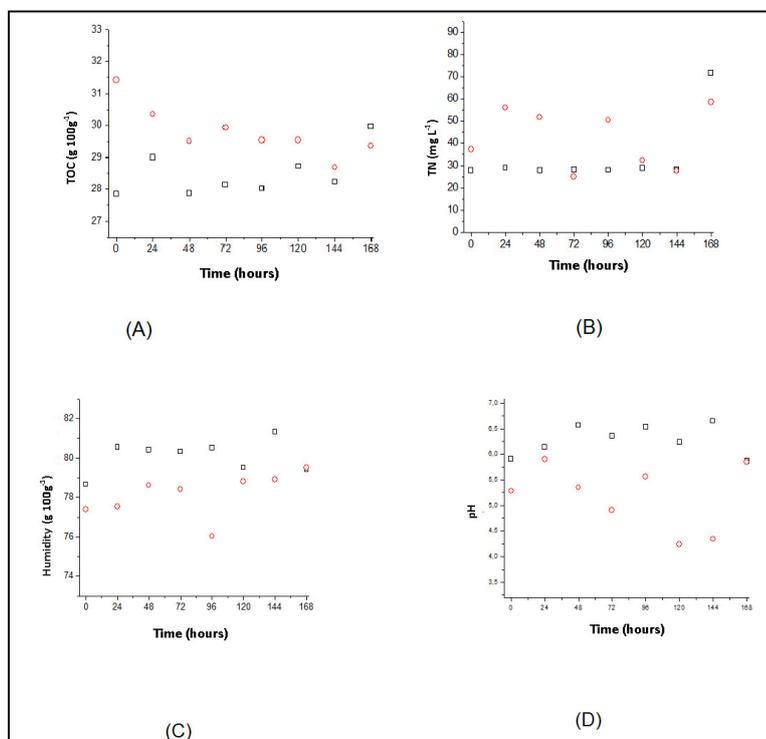


Figure 8.

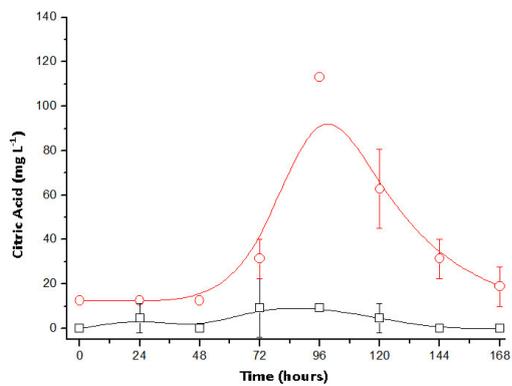


Figure 9.

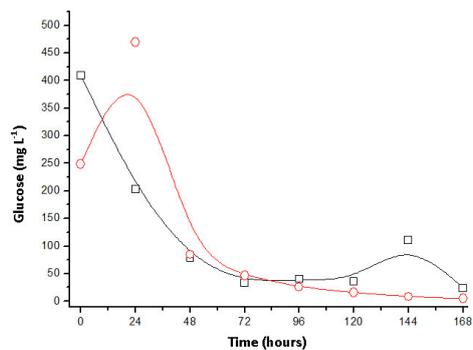


Figure 10.

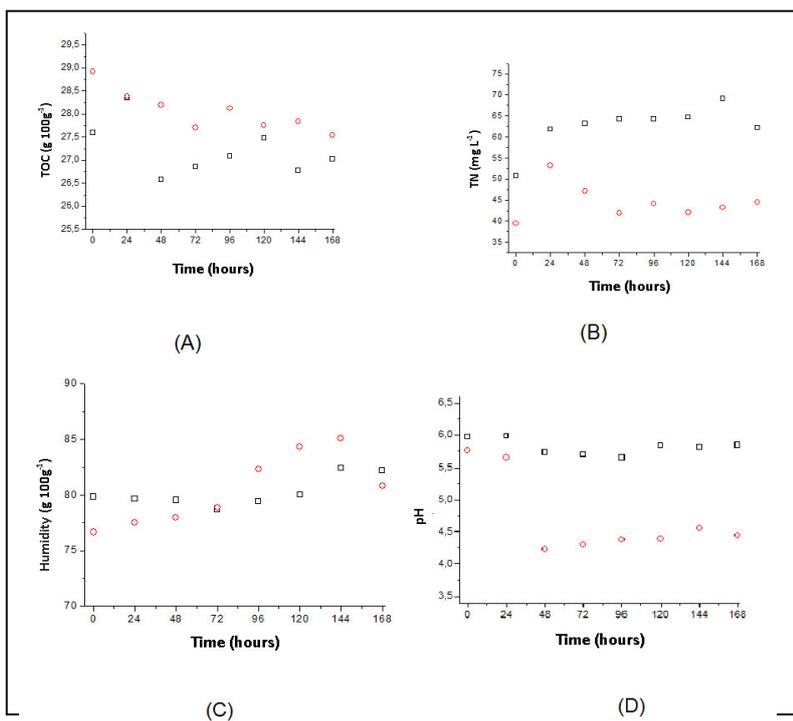


Table 1.

Condition	$P_{\text{rod max}}$ (mg citric acid L ⁻¹ h ⁻¹)	$\mu_P \text{ max}$ (mg citric acid g _{biomassa} ⁻¹ h ⁻¹)
<i>A. niger</i> without sucrose	1,08	1,72
<i>T. reesei</i> with sucrose	0,72	2,30
Fungal consortium with sucrose	1,18	2,51

REFERENCES

- [1] Pandey A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2003; 13:81–84.
- [2] Gutiérrez-Correa M, Villena GK. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. *Fermentación*, 2003;10:113–124.
- [3] Pandey A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 2000; 74: 69–80.
- [4] Hasan SDM, Zolner R, Santana MHA. Fungi Allergens Produced by Solid-State Fermentation Process: Optimization and Allergen Characterization Applied *Biotechnology and Biochemistry*, 2003; 106:403-412.
- [5] Menezes EA. et al. Biochemical, antigenic and allergic characterization of crude extracts of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. *Mycopathologia*, 1995; 131: 75–81, 1995.
- [6] Pandey, A. Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. *Process Biochemistry*, 1992; 27: 109–117.
- [7] Ahamed A, Vermette P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2008; 42: 41–468.
- [8] Bayer EA, Lamed R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation*, 1992; 3: 171-188.
- [9] Kumar D. et al. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, 2003; 38: 1731–1738.
- [10] Stoilova IS, Gargova SA, Krastanov AI. Production of Enzymes by Mixed Culture from Micelial Fungi in Solid-State Fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2005; 19: 103–108.

- [11] Dhillon GS et al. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Industrial Crops and Products*, 2013; 41: 78–84.
- [12] Khosravi-Darani K, Zoghi A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: experimental design for citric acid production. *Bioresource technology*, 2008; 99: 6986–6993.
- [13] Vanderberghe LP et al. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2000; 74: 175–178.
- [14] Bastos RG, Motta FL, Santana MHA. Oxygen Transfer in Solid-State Cultivation Under Controlled Moisture Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014; 174 p.
- [15] Nielsen J, Villadsen J, Linden G. *Bioreaction engineering principles*, 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum, New York.2003.
- [16] Vandenberghe LPS. et al. Microbial Production of Citric Acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 1999; 42: 263–276.
- [17] Oliveira AF, Matos VC, Bastos RG. Cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse with vinasse. *Bioscience Journal*, 2012; 28: 889-894.
- [18] Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 2007, 25: 244–263.
- [19] Lekanda JS, Pérez-Correa JR. Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. *Process Biochemistry*, 2004; 39:1793- 1802.
- [20] Delabona PD, Pirola R, Codima CA, Tremacoldi CR, Rodrigues A, Farinas CS. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated fermentation category. *Rer. peru biol.* V. 10 (2), p.113-124, 2003.