

**UNIVERSIDADE FEREDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BEATRIZ SILVA CAMPANHOL**

**EFEITO DA SOLUÇÃO NUTRIENTE NA  
PRODUÇÃO MICROBIANA SEQUENCIAL DE  
ÁCIDO CÍTRICO E ETANOL A PARTIR DE  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E VINHAÇA**

**ARARAS**

**2018**

**BEATRIZ SILVA CAMPANHOL**

**EFEITO DA SOLUÇÃO NUTRIENTE NA  
PRODUÇÃO MICROBIANA SEQUENCIAL DE  
ÁCIDO CÍTRICO E ETANOL A PARTIR DE  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E VINHAÇA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

**ARARAS**

**2018**

Silva Campanhol, Beatriz

Efeito da solução nutriente na produção microbiana sequencial de ácido cítrico e etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça. / Beatriz Silva Campanhol. -- 2018.

96 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Reinaldo Gaspar Bastos

Banca examinadora: Reinaldo Gaspar Bastos, Márcia Maria Rosa Magri, Viktor Oswaldo Cárdenas Concha

Bibliografia

1. Cultivo em estado sólido. 2. Produção de ácido cítrico. 3. Consórcio Fúngico . I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.



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 Beatriz Silva Campanhol, realizada em 26/02/2018:

---

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
UFSCar

---

Profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri  
UFSCar

---

Prof. Dr. Viktor Oswaldo Cárdenas Concha  
UNIFESP

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me permitido viver e a realizar este sonho.

Aos meus pais Eli e Valdirene, e ao meu irmão Hugo, por sempre estarem ao meu lado me apoiando em todos os momentos.

A minha Tia Edna, por ter ajudado nos meus estudos e na vida, sendo um exemplo para mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, por ter acreditado em mim, ter sido paciente e ter me proporcionado grandes conhecimentos. Muito obrigada. A coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, por estar sempre de prontidão.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC/DTAiSER-Ar), por todo apoio e amizade.

Aos meus amigos de república e minha turma de mestrado, que estiveram sempre comigo nesta caminhada e sempre me apoiaram. Muito obrigada.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, com o qual pude concretizar todo o trabalho.

A FAPESP (Processo 2016/-09629-7) pelo auxílio financeiro, que também contribuiu para a realização deste trabalho.

E agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e contribuíram para que este dia chegasse. Obrigada.

## RESUMO

O processo conhecido como “cultivo em estado sólido” (CES) refere-se ao crescimento microbiano em suportes sólidos em condições de água limitada, ou seja, similares à ocorrência principalmente de fungos na natureza. Este processo tem apresentado um potencial tecnológico considerável na indústria química, alimentícia, farmacêutica e agrícola. Na maior parte dos casos, o meio sólido é impregnado com uma solução contendo a fonte de carbono e nutrientes, os quais fornecem, além do substrato necessário, condições de umidade adequadas. Dentre os diversos micro-organismos que podem ser cultivados a partir de suportes sólidos, os fungos filamentosos se destacam devido as suas características fisiológicas e bioquímicas. A literatura reporta que consórcios fúngicos apresentam vantagens em relação ao uso de culturas únicas, pois utilizam melhor o substrato levando a um maior rendimento, sendo mais adaptados e resistentes a contaminações por outros micro-organismos devido a interações sinérgicas que ocorrem entre eles. 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 nos suportes sólidos, como bagaço de cana-de-açúcar por exemplo, há uma liberação de glicose neste extrato, sendo que outros produtos poderiam ser gerados a partir desta fonte de carbono. Ácido cítrico é um bioproduto com diversas aplicações industriais, sendo que sua produção é tradicionalmente microbiana a partir de meios contendo sacarose, sendo induzida pela presença de álcoois inferiores, principalmente metanol e etanol. Sabendo-se que o ácido cítrico e etanol são importantes bioprodutos comerciais utilizados em vários setores da economia, estes poderiam ser obtidos por um processo sequencial CES-fermentação a partir de bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça, com o aproveitamento de dois subprodutos. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar tendo vinhaça e etanol como indutor da produção metabólica deste ácido orgânico, seguindo de fermentação etanólica do extrato bruto por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*. Os resultados indicam que os maiores rendimentos de glicose em ácido cítrico, produtividade e velocidade específica de produção para as condições tendo vinhaça e vinhaça/etanol como solução nutriente. Além disso, os perfis de ácido cítrico e glicose indicam maiores rendimentos, produtividades e velocidades específicas ( $1,88 \text{ mg ácido cítrico mg glicose}^{-1}$ ,  $13,77 \text{ mg ácido cítrico L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e  $29,30 \text{ mg ácido cítrico g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) para a condição tendo apenas vinhaça como solução nutriente, com concentração máxima de ácido cítrico de  $734 \text{ mg L}^{-1}$  em 48 horas. Os ensaios de escalonamento do CES levaram a obtenção por volta de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido cítrico para 100 mm de altura de leito em 24 e 48 horas, período onde ocorre a maior demanda de oxigênio. Sendo assim, os perfis axiais de ácido cítrico, glicose, oxigênio e umidade do meio sólido no biorreator de coluna de maiores dimensões indicam sucesso na proposta de escalonamento do CES. Com relação ao aproveitamento do extrato fúngico, não houve produção considerável de etanol por *Dekkera bruxellensis*, possivelmente pela presença de inibidores. Porém, a fermentação etanólica por *Saccharomyces cerevisiae* atingiu um rendimento de 71% do máximo estequiométrico. Os resultados experimentais demonstram a viabilidade da co-produção de ácido cítrico e etanol via processo sequencial CES-fermentação com consórcio microbiano fúngico (*Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*) e *Saccharomyces cerevisiae* a partir de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça.

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

## ABSTRACT

Solid-state cultivation (SSC) refers to microbial growth on solid supports under limited free-water conditions, that is, similar to the occurrence of mainly fungi in nature. This process has had considerable technological potential in the chemical, food, pharmaceutical and agricultural industries. In most cases, the solid medium is impregnated with a solution containing the carbon source and nutrients, which provide, in addition to the required substrate, suitable moisture conditions. Among the various microorganisms that can be grown from solid supports, filamentous fungi are mainly used due to their physiological and biochemical characteristics. The literature reports that fungal consortia have advantages over the use of single cultures because they use the substrate better, leading to a higher yield, being more adapted and resistant to contamination by other microorganisms due to the synergistic interactions that occur between them. The products obtained by SSC are generally separated from an extract which may be aqueous or obtained from organic solvents. Considering the effect of fungal hydrolases on solid supports, such as sugarcane bagasse for example, there is a release of glucose in this extract, and other products could be generated from this carbon source. Citric acid is a bioproduct with several industrial applications, and its production is traditionally microbial from the medium containing sucrose, being induced by the presence of lower alcohols, mainly methanol and ethanol. Whereas citric acid and ethanol are important commercial bioproducts used in various sectors of the economy, these could be obtained by a sequential SSC-fermentation process from sugarcane bagasse impregnated with vinasse, using two by-products. In this context, the aim of these research was evaluated the production of citric acid by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* consortium in sugarcane bagasse with vinasse and ethanol as inducer of the metabolic production of this organic acid, followed by ethanol fermentation of the fungal extract by yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Dekkera bruxellensis*. Results indicate that the highest yields of glucose in citric acid, productivity and specific production speed for the conditions having vinasse and vinasse/ethanol as nutrient solution. In addition, citric acid and glucose profiles indicate higher yields, yields and specific rates (1.88 mg citric acid mg glucose<sup>-1</sup>, 13.77 mg citric acid L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and 29.30 mg citric acid g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) for the condition having only vinasse as nutrient solution, with maximum citric acid concentration of 734 mg L<sup>-1</sup> in 48 hours. Scale-up of SSC in packed-bed column bioreactor leading around 1000 mg L<sup>-1</sup> of citric acid to 100 mm of bed height in 24 and 48 hours, where occurs the highest oxygen demand. Thus, the axial profiles of citric acid, glucose, oxygen and moisture of the solid medium in the larger column bioreactor indicate the success of scale-up proposal in the SSC. Regarding the use of the fungal extract, there was no considerable production of ethanol by *Dekkera bruxellensis*, possibly due to the presence of inhibitors. However, the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* achieved a yield of 71% of the stoichiometric maximum. The experimental results demonstrate the feasibility of the co-production of citric acid and ethanol via the sequential SSC-fermentation process with fungal microbial consortium (*Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*) and *Saccharomyces cerevisiae* from sugarcane bagasse and vinasse.

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

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema do sistema de cultivo em estado sólido, com o bagaço de cana-de-açúcar compondo o leito de sólidos. 14
- Figura 2.** Detalhe do biorreator em coluna de leito fixo utilizados nos ensaios de CES. 14
- Figura 3.** Bagaço de cana-de-açúcar como suporte sólido impregnado com diferentes soluções impregnantes e aplicação do consorcio microbiano de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. 15
- Figura 4.** Esquema ilustrando um biorreator de coluna de leito fixo para o escalonamento do CES. 17
- Figura 5.** CES com bagaço de cana-de-açúcar como suporte sólido impregnado com diferentes soluções impregnantes e, a aplicação do consorcio microbiano de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. 19
- Figura 6.** Teores de ácido cítrico no extrato fúngico em 4 dias de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com (A) sacarose, (B) sacarose e etanol, (C) vinhaça e (D) vinhaça e etanol. 21
- Figura 7.** Teores de glicose no extrato fúngico em 4 dias de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com (A) sacarose, (B) sacarose e etanol, (C) vinhaça e (D) vinhaça e etanol. 22
- Figura 8.** Perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH do extrato fúngico e a umidade do suporte solido após 4 dias de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com: (A) sacarose, (B) sacarose e etanol, (C) vinhaça e (D) vinhaça e etanol. 25
- Figura 9.** Perfis de ácido cítrico no extrato fúngico para CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça. 27
- Figura 10.** Perfis de glicose no extrato fúngico para CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça. 27
- Figura 11.** Perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH e umidade no CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça. 29



<b>Figura 12.</b> Perfis de ácido cítrico no extrato fúngico para CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e etanol.	30
<b>Figura 13.</b> Perfis de glicose no extrato fúngico durante 144 horas de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e etanol.	31
<b>Figura 14.</b> Perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH do extrato fúngico e a umidade do suporte sólido durante 144 horas de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e etanol.	32
<b>Figura 15.</b> Perfis axiais de ácido cítrico durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões.	35
<b>Figura 16.</b> Perfis axiais de glicose durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões.	36
<b>Figura 17.</b> Perfis axiais da umidade do meio sólido durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões.	37
<b>Figura 18.</b> Perfis axiais da demanda de oxigênio durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões.	38
<b>Figura 19.</b> Perfis de crescimento celular para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE02 e de <i>Dekkera bruxellensis</i> em extrato fúngico do CES de consórcio microbiano impregnado com vinhaça.	40
<b>Figura 20.</b> Cromatograma da amostra com 6 horas de fermentação etanólica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante.	41
<b>Figura 21.</b> Cromatograma da amostra com 12 horas de fermentação etanólica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante.	41
<b>Figura 22.</b> Cromatograma da amostra com 6 horas de fermentação etanólica com <i>Dekkera bruxellensis</i> , a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante.	42

**Figura 23.** Cromatograma da amostra com 12 horas de fermentação etanólica com *Dekkera bruxellensis*, a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante. 43

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Rendimentos observados de glicose em ácido cítrico ( $Y_{P/S}$ ), produtividades ( $P_{rod}$ ) e velocidades específicas de produção de ácido cítrico ( $\mu_P$ ) para os cultivos em bagaço de cana-de-açúcar com consórcio fúngico. 23

**Tabela 2.** Rendimentos máximos observados de glicose em ácido cítrico ( $Y_{P/S}$ ), produtividades máximas ( $P_{rod\ máx}$ ) nos respectivos tempos e velocidades específicas de produção de ácido cítrico ( $\mu_P$ ) para os cultivos em bagaço de cana-de-açúcar consórcio fúngico com vinhaça e vinhaça/etanol em 144 horas. 33

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	3
2.1. Objetivos específicos .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Ácido cítrico .....	4
3.2. Produção microbiana de ácido cítrico .....	5
3.3. Etanol .....	7
3.4. Cultivo em estado sólido (CES) .....	10
3.5. Bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4.1. Inóculo .....	12
4.2. Bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça .....	13
4.3. Cultivo em Estado Sólido (CES) .....	13
4.3.1. Ensaio exploratório de CES a partir de vinhaça e etanol como solução impregnante das partículas de bagaço de cana-de-açúcar .....	13
4.3.2. Perfis de ácido cítrico e glicose nas condições de CES previamente selecionadas .....	16
4.3.3. Escalonamento do CES em biorreator de bancada .....	17
4.4. Aproveitamento do extrato fúngico via fermentação etanólica .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
5.1. Ensaio exploratório de CES a partir de vinhaça e etanol como solução impregnante das partículas de bagaço de cana-de-açúcar .....	19
5.2. Perfis de ácido cítrico e glicose nas condições de CES previamente selecionadas .....	26
5.3. Escalonamento do CES em biorreator bancada .....	34
5.4. Fermentação com <i>S. cerevisiae</i> e <i>D. bruxellensis</i> a partir de extrato fúngico obtido via consórcio microbiano em CES impregnado com vinhaça bruta. ....	39
6. CONCLUSÕES .....	44
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	45
8. REFERÊNCIAS .....	45
ANEXOS .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um ácido carboxílico comumente encontrado no metabolismo de plantas, animais e micro-organismos (DHILLON et al., 2011). Por ser um dos ácidos orgânicos mais importantes, é amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, bebidas, químicas e metalúrgicas (ZHANG et al., 2017). Sua demanda no mercado brasileiro é atendida por meio de importações. Além disso, há um aumento constante em torno de 4% no consumo de ácido cítrico a cada ano, o que demonstra uma necessidade de se encontrar alternativas para sua fabricação (SOCCOL et al., 2006).

Um grande número de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras vêm sendo utilizados para a produção de ácido cítrico, sendo que o processo produtivo industrial mais utilizado é o cultivo submerso a partir do uso de meios a base de amido ou sacarose utilizando fungos filamentosos, em especial *Aspergillus niger* (ABDULLAH-AL-MAHIN et al., 2012; CHEN; NIELSEN, 2016; DEZAM et al., 2017). Porém, nas últimas décadas tem havido um número crescente de relatos sobre a utilização do processo de cultivo em estado sólido para a produção de ácido cítrico como uma alternativa aos cultivos submersos (SHOJAOSADATI; BABAEIPOUR, 2002; KUMAR et al., 2003; KHOSRAVI-DARANI; ZOGHI, 2008; DHILLON et al., 2011; DHILLON et al., 2013).

O cultivo em estado sólido (CES) pode ser definido como o crescimento de micro-organismos em suportes sólidos, em condições próximas da ausência de água livre. De maneira geral, o meio sólido atua como suporte físico fornecendo nutrientes contendo água que satisfaça as exigências para crescimento microbiano. Dessa maneira, os custos com o cultivo em estado sólido podem ser inferiores aos cultivos submersos, até mesmo porque muitas vezes são utilizados resíduos e subprodutos agroindustriais (BARRINGTON et al., 2009; THOMAS et al., 2013).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, contribuindo com cerca de 25% para produção total mundial (SINDHU et al., 2016). O bagaço da cana-de-açúcar composto basicamente por 50% de celulose, 30% de açúcares e 2,4% de cinzas apresenta características de suporte sólido para CES, podendo servir como fonte de carbono e/ou nutriente para a geração de uma variedade de compostos com valor agregado (MAZUTTI et al., 2006; MUSSATTO et al., 2012). A vinhaça é a principal água residuária do setor sucroalcooleiro

devido ao elevado volume gerado e a alta demanda biológica de oxigênio (NAVARRO et al., 2000; MADEJÓN et al., 2001). Para cada litro de etanol produzido, podem ser gerados mais do que 10 litros de vinhaça, totalizando aproximadamente 300 bilhões de litros por ano desta água residuária no Brasil (MARIANO et al., 2009; CONAB 2013). A vinhaça poderia ser aproveitada como solução nutriente para o CES impregnando as partículas de bagaço de cana-de-açúcar, minimizando o custo de produção e aproveitando dois subprodutos gerados na mesma plataforma industrial.

Os produtos obtidos por CES geralmente são separados de um extrato que pode ser aquoso ou orgânico. Considerando o efeito de hidrólises fúngicas nos suportes sólidos, tais como bagaço de cana-de-açúcar, há liberação de glicose no meio (JAIN; AGRAWAL, 2017). Sendo assim, outros produtos biotecnológicos poderiam ser gerados a partir desta fonte de carbono disponível após a atividade microbiana. Neste contexto, ácido cítrico e etanol, importantes bioprodutos comerciais utilizados em vários setores da economia, poderiam ser obtidos a partir de um processo sequencial (CES-fermentação) a partir de bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça.

Considerando que trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa no Centro de Ciências Agrárias da UFSCar indicam a viabilidade desse tipo de CES (OLIVEIRA et al., 2012; BASTOS et al., 2015; FRANÇA, 2016), esta proposta amplia o espectro de estudo para a utilização de consórcios microbianos e obtenção de etanol como “prova de conceito” do aproveitamento da glicose residual no extrato fúngico obtido via CES, levando a um melhor aproveitamento dos polissacarídeos estruturais do bagaço de cana-de-açúcar. Assim, nossa hipótese de pesquisa é a produção de ácido cítrico via CES do consórcio de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* a partir de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça com elevado rendimento e posterior obtenção de etanol a partir do extrato fúngico com menor interferência de inibidores. Nesta etapa, busca-se avaliar o efeito de indutores na produção de ácido cítrico. Cabe destacar ainda que não foram encontrados na literatura trabalhos a respeito da utilização de águas residuárias como solução impregnante de partículas para CES, tampouco o aproveitamento do extrato microbiano obtido para condução de outros processos biotecnológicos, o que sugere o caráter inovador da pesquisa. Além disso, há um aspecto regional destacado devido ao uso complementar de diferentes subprodutos agroindustriais típicos do setor industrial da região de Araras, onde situa-se o CCA/UFSCar.

Neste contexto, o presente trabalho busca avaliar a produção de ácido cítrico via cultivo em estado sólido de consórcio fúngico (*Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*) a partir de bagaço de cana-de-açúcar com diferentes soluções impregnantes, seguido de fermentação etanólica do extrato fúngico.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a produção de ácido cítrico pelo consórcio de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* a partir de bagaço de cana-de-açúcar com diferentes soluções impregnantes, seguido de fermentação etanólica do extrato fúngico.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Montar um sistema de cultivo em estado sólido em biorreatores tipo coluna de leito fixo contendo bagaço de cana-de-açúcar impregnado com solução contendo vinhaça e etanol;

- Avaliar o CES a partir do consórcio fúngico de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em termos dos perfis de glicose e ácido cítrico no extrato fúngico bruto obtido;

- Avaliar a produtividade e rendimento de ácido cítrico no CES na presença e ausência de etanol como indutor metabólico;

- Conduzir ensaios de fermentação etanólica, com *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*, no extrato bruto obtido via CES como forma de aproveitamento da glicose.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Ácido cítrico

O ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ , ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) é um constituinte natural do metabolismo de plantas, animais e micro-organismos (PAPAGIANNI, 2007). Este ácido orgânico foi extraído e cristalizado a partir do suco de limão por Karls Scheels em 1784. A partir desta descoberta, a produção comercial de ácido cítrico começou na Inglaterra em 1860, com o citrato de cálcio importado da Itália (GREWAL; KALRA, 1995). Devido aos elevados custos da matéria-prima vinda da Itália, muitas tentativas foram pesquisadas visando a sua produção, incluindo técnicas químicas e microbianas (VANDENBERGHE et al., 1999). Contudo, atualmente a produção comercial de ácido cítrico se dá geralmente pelo processos microbianos de cultivo submerso ou por cultivo em estado sólido (PRADO et al., 2005; DEZAM et al., 2017).

Segundo Dhillon et al., 2013, a produção de ácido cítrico foi estimada em mais de 1,7 bilhões de toneladas por ano, apresentando uma tendência de aumento de 5% na taxa anual da bioprodução. A grande produção deste biocomposto pode ser explicada devido ao uso de ácido pelas indústrias. Cerca de 70% do ácido cítrico é destinado a indústria de alimentos e bebidas, 12% para as indústrias farmacêuticas e 18% são destinados a outras indústrias (RODRIGUES et al., 2013). A aplicação deste produto está relacionado com as suas funções como antioxidante, aromatizantes, conservantes, quelante e agente tampão em alimentos, bebidas, fármacos e cosméticos (SINDHU et al., 2016).

Considerando a grande importância da demanda na produção do ácido cítrico, o interesse no processo produtivo usando polpas de frutas e outros resíduos agroindustriais tem aumentado nos últimos anos (DHILLON et al., 2011; ALI et al., 2016). Além disso, o uso de resíduos agroindustriais tem apresentado vantagens para o processo de produção do ácido cítrico, servindo como suporte sólido para o desenvolvimento de um processo mais sustentável e econômico (KUMAR et al., 2010).

O processo de produção do ácido cítrico em larga escala foi realizado exclusivamente com *Aspergillus niger* em cultivo submerso a partir de beterraba, melão de cana-de-açúcar, sacarose ou xarope de glicose (DHILLON et al., 2011). As vantagens para o uso deste processo podem ser descritas devido ao seu maior rendimento e produtividade (SOCCOL et al., 2006). Já o processo de cultivo em estado sólido apresenta como vantagens biotecnológicas o aumento da produtividade do cultivo, maior concentração de produtos, maior a estabilidade do produto, menor repressão catabólica, cuidados menos rigorosos quanto ao tratamento térmico devido baixa atividade de água nos CES, cultivo de micro-organismos em materiais insolúveis em água e a aplicação de cultura mista de vários fungos (SINGHANIA et al., 2009). Nesse sentido, França (2016) estudou a produção microbiana de ácido cítrico em bagaço de cana-de-açúcar a partir de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, obtendo melhores resultados quando o inóculo era composto por consórcio destes fungos. A produção de ácido cítrico por CES é influenciada por fatores físicos, químicos e nutricionais, tais como umidade do meio sólido, tamanho de partícula do suporte sólido, nutrientes, temperatura, pH e tamanho do inóculo (ALI et al., 2016). Além destes fatores, a presença de álcoois de menor massa molar, tais como metanol e etanol, pode também afetar positivamente a produção de ácido cítrico, uma vez que sua adição conjunta com carboidratos tende a aumentar a obtenção metabólica de ácido cítrico (SOCCOL et al., 2006).

### **3.2. Produção microbiana de ácido cítrico**

Diversos micro-organismos, tais como fungos, bactéria e leveduras, vêm sendo empregado nos últimos anos para a produção de ácido cítrico (GREWAL; KALRA, 1995). Porém, os fungos filamentosos têm se destacado para a produção destes ácidos, até mesmo a partir da biodegradação de resíduos lignocelulósicos (CASTILLO et al., 1994; BARRINGTON; KIM, 2008).

Segundo Khosravi-darani e Zoghi (2008) o uso de materiais lignocelulósicos como resíduos agroindustriais para a produção de ácido cítrico surgiu devido à necessidade de altas concentrações de carbono orgânico no meio para crescimento fúngico (ANWAR et al., 2009). No estudo feito por Wehmer em 1893, *Penicillium* foi capaz de acumular ácido cítrico em um meio contendo açúcares e sais inorgânicos e, a partir deste estudo outros micro-organismos, como *Aspergillus niger* foram testados visando o acúmulo deste ácido orgânico (PAPAGIANNI, 2007).



Dentre as vantagens frequentemente citadas para a obtenção de ácido cítrico por fungos podemos destacar a facilidade no manuseio, capacidade de metabolizar uma variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir com elevados rendimentos (NADEEM et al., 2010). Mas apesar de uma longa e bem-sucedida história de pesquisas relacionadas a produção de ácido cítrico a partir de micro-organismos, ainda não há uma explicação única para a base do processo bioquímico que explica consistentemente o acúmulo microbiano destes ácidos orgânicos (PAPAGIANNI, 2007).

Os primeiros estudos sobre os efeitos de álcoois inferiores na produção de ácido cítrico foram feitos por Moyer (1953). Este autor observou que o metanol era capaz de aumentar a produção de ácido cítrico a partir de glicose comercial e outras fontes de carboidratos brutos. Assim, um grande número de pesquisadores passou a investigar o papel estimulador do metanol e etanol (JIANLONG; PING 1998; NADEEM et al., 2010).

O estímulo para maior produção de ácido cítrico através de solventes orgânicos, incluindo etanol e metanol, ocorre com o aumento da permeabilidade da membrana celular ou alteração da atividade das enzimas citrato sintetase e aconitase presentes no Ciclo de Krebs (Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos). Além disso, o *Aspergillus niger*, por exemplo, pode converter o etanol disponível no meio em acetil-CoA, molécula precursora chave deste ciclo (BARRINGTON; KIM, 2008). O uso de álcoois inferiores para intensificar a produção de ácido cítrico vem ao encontro do aproveitamento de resíduos e subprodutos agroindustriais devido a facilidade da sua utilização em solução umidificante de partículas sólidas (DHILLON et al., 2011).

Os suportes sólidos normalmente compõem o *habitat* natural dos fungos filamentosos, tais como madeira, sementes, caules, raízes e folhas das plantas. A utilização de resíduos lignocelulósicos pode exigir uma ação enzimática mais intensa visando a biodegradação, o que pode ser facilitado a partir da interação com outros micro-organismos. Com isso, culturas mistas de fungos em substrato sólidos podem produzir uma combinação ótima de enzimas para que o processo de biodegradação seja mais eficiente (CASTILLO et al., 1994; ALI et al., 2016; FRANÇA, 2016).

Segundo Yoon et al. (2014), o cultivo de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, isoladamente apresentam deficiências com relação à degradação da celulose. *Trichoderma reesei* não é capaz de produzir uma quantidade substancial de  $\beta$ -glucosidase, enquanto que para o *Aspergillus niger* endoglucanase e exoglucanase são limitantes. No entanto, algumas pesquisas relataram que o uso de cultivo mistos de micro-organismos podem complementar as

capacidades metabólicas dos micro-organismos, gerando produtos de secreção com perfis mais adequados, elevando a capacidade de bioconversão de substratos (GUTIÉRREZ-CORREA; VILLENA, 2017).

As vantagens da utilização de culturas mistas pode ser mais evidenciada nos CES, pois a colonização, a penetração e a degradação do substrato em estado sólido tende a ser intensificada pela associação simbiótica, onde cada espécie pode ter seu próprio nicho para o crescimento e degradação do substrato, devido a sua própria matriz de enzimas hidrolíticas, as quais podem atuar com outras sinergicamente (GUTIÉRREZ-CORREA; TENGARDY, 1997).

França (2016) trabalhando com *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* obtiveram velocidades específicas de produção de ácido cítrico superiores quando foram utilizados cultivos mistos em CES a partir de bagaço de cana-de-açúcar em comparação aos fungos isoladamente ( $2,51 \text{ mg ácido cítrico g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Estes autores explicam este fato devido à complementação em termos de enzimas hidrolíticas se comparado ao cultivo dos micro-organismos separadamente, possibilitando um aproveitamento maior dos substratos (YANG et al., 2004; PAPAGIANNI, 2007a). 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*. e *A. phoenicis* (NOOR EL-DEEN et al., 2013; GUTIERREZ-CORREA; TENGARDY, 1997; WEN et al., 2005).

### 3.3. Etanol

Segundo Sindhu et al., (2016) o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e contribui para 25% da produção total mundial. Com isso o Brasil também se destaca como o maior produtor mundial de açúcar e etanol, a partir da cana-de-açúcar, e com cerca de 660 milhões toneladas sendo produzidos por ano (MAZUTTI et al., 2006; MAPA, 2016).

O processo para a obtenção do etanol atualmente é em sua maioria produzido apenas a partir de matérias-primas sacarinas ou amiláceas (cana-de-açúcar, milho, trigo), com os açúcares prontamente disponíveis, e além disso, micro-organismos como as leveduras, tem sido utilizado na produção do chamado de etanol de primeira geração (BAYER; LAMED, 1992; MART; HAHN-HÄGERDAL; JÖNSSON, 2002). Contudo, no Brasil a produção de etanol tem

se destacado através de processos fermentativos a partir da cana-de açúcar (TRENNEPOHL, 2010). No entanto, alguns estudos indicam a possibilidade de expansão desta produção em cerca de 30% a 50%, reduzindo os impactos ambientais mediante a produção do chamado “etanol de segunda geração”, (SILVA, 2012; MEKALA, 2008; SOARES; ROSSELL, 2007).

O etanol de segunda geração refere-se ao produto obtido a partir de material lignocelulósico, como no 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 comprometer a segurança alimentar, além de serem fundamentais na redução dos impactos ambientais. Porém, a principal dificuldade para a obtenção do etanol de segunda geração, está associada a degradação da celulose, o qual é o componente principal da biomassa vegetal. Sua degradação natural é lenta e a produção de celulases tem 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; FRANÇA, 2016).

Para a conversão da celulose e da hemicelulose destes materiais em seus açúcares redutores, os mecanismos mais estudados são: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise ácida, utiliza 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. (FRANÇA, 2016). Já a hidrólise enzimática do 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; FRANÇA, 2016). 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 dúvidas quanto à viabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática no contexto da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (FRANÇA, 2016).

Para a otimização e redução dos custos no processo de obtenção do etanol a partir de material lignocelulósico, como resíduos e subprodutos agrícolas, pode-se destacar a utilização de micro-organismos, como diversos fungos e bactérias, os quais são capazes de sintetizar enzimas hidrolíticas, como as celulases (DELABONA, 2011; FERREIRA; MAIOR, 2011; FRANÇA, 2016, BONFIM et al., 2010). Estas enzimas apresentam uma capacidade de hidrolisar materiais lignocelulósicos, e possuem um complexo enzimático composto por endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases que atuam sinergicamente nas fibras celulolíticas, onde desempenham funções como: as endoglucanases hidrolisam internamente as cadeias de celulose produzindo polissacarídeos de menor comprimento, as exoglucanases hidrolisam os terminais não redutores nas extremidades da celulose liberando celobiose, e as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose em glicose (HORN, et al., 2012).

Dentre os micro-organismos que apresentam a maior capacidade de produção de complexos celulolíticos completos e em grandes quantidades pertencem ao gênero *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Humicola* (LYND et al. 2002; BONFIM et al., 2010). Com isso, estudos sobre a aplicação de consórcios entre fungos, como por exemplo *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, tem se destacado devido a sua eficiência superior na degradação de celulose. Isto pode ser explicado por esses fungos serem complementares, onde o *T. reesei* embora produza as três celulases essenciais à degradação de celulose, apresenta baixa produção de  $\beta$ -glicosidase, já o *A. niger* que possui maior atividade de  $\beta$ -glicosidase e menor produção das outras duas celulases, completando assim com maior eficiência a degradação da celulose (GUTIERREZ-CORREA; TENGARDY, 1997; MADAMWAR; PATEL, 1992; YANG et al., 2004; PENSUPA et al., 2013).

Neste contexto, segundo França (2016) que avaliou a viabilidade de obtenção de etanol por leveduras a partir do hidrolisado microbiano, demonstrou que produtos obtidos por cultivo em estado sólido geralmente são separados de um extrato que pode ser aquoso ou obtido a partir de solventes orgânicos. Com isso, considerando o efeito de hidrolases fúngicas no bagaço de cana-de-açúcar, há uma liberação de glicose neste extrato, sendo que outros produtos podem ser obtidos a partir desta fonte de carbono. Sendo assim, 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).

### 3.4. Cultivo em estado sólido (CES)

Cultivo em estado sólido (CES) ou fermentação semi-sólida foi desenvolvido primeiramente no Japão, onde as matérias-primas disponíveis eram principalmente resíduos de frutas e farelo de arroz (SOCCOL et al., 2006). Essa técnica tem se apresentado um interesse crescente como uma alternativa aos cultivos submersos convencionalmente utilizados em processos biotecnológicos (LU et al., 1995). Isso ocorre porque o CES apresenta requisitos de energia mais baixos, maior rendimento do produto de interesse, menor risco de contaminação e menor produção de águas residuais (KUMAR et al., 2003).

O CES pode ser definido como crescimento de micro-organismos em condições de baixa atividade de água, próximas a ausência de água livre (MAZUTTI et al., 2006). Nesse sentido, suporte sólidos naturais e/ou inertes têm sido utilizados, contendo em muitos casos a fonte de carbono que sustenta a atividade microbiana (MOHANTY et al., 2009). Porém, na maior parte dos casos, o meio sólido é impregnado com uma solução contendo a fonte de carbono e nutrientes, os quais fornecem além do substrato necessário, condições de umidade adequadas. O crescimento de micro-organismos em suportes sólidos pode se dar também na forma de biofilme ou por adesão de superfície (GUTIÉRREZ-CORREA; VILLENA, 2003).

Dentre as condições de processos importantes para os CES se destacam a umidade (por volta de 70% de umidade, a depender da capacidade de absorção de água do suporte sólido, pH inicial (entre 4,5-6,0 a depender do produto) e temperatura ótima de crescimento microbiano (VANDENBERGHE et al., 1999).

Os CES são uma importante forma de aproveitamento de resíduos agroindustriais e matérias-primas de baixo custo, tais como resíduos do processamento de cana-de-açúcar, grãos de uma maneira geral, laranja, café, arroz, dentre outros. Estes subprodutos são quimicamente adequados para a bioconversão por CES em bioprodutos de maior valor agregado, como o ácido cítrico, e minimizando seu impacto poluidor no ambiente (PRADO et al., 2005; ALI et al., 2016).

### 3.5. Bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar, em torno de 660 milhões toneladas por ano (MAZUTTI et al., 2006; MAPA, 2016). Com isso, o Brasil inevitavelmente produz bagaço após a moagem da cana-de-açúcar em abundância, o qual é geralmente utilizado como fonte de energia nas Usinas pela queima em caldeiras (OLIVEIRA et al., 2012).

O bagaço da cana-de-açúcar é o subproduto resultante da extração do caldo que contém principalmente a sacarose a ser cristalizada (produção de açúcar) e/ou convertida em etanol (fermentação) nas indústrias sucroenergéticas. Sua composição perfaz aproximadamente 46-52% de água, 43-52% de fibras (incluindo celulose 50%, hemicelulose 25% e lignina 25%) e 2-4% de sólidos solúveis (PANDEY et al., 2000). Estes componentes tornam este subproduto um potencial suporte sólido para CES industriais e obtenção de diversos bioprodutos. As propriedades físico-químicas da biomassa lignocelulósica fornecem uma estrutura rígida e complexa da matéria vegetal, o que normalmente é contornado através de tratamentos físicos e termoquímicos (JAIN et al., 2016). Além dos métodos físicos e químicos, micro-organismos também tem sido utilizados para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, dentre estes organismos os mais relatados estão os fungos (PINTO et al., 2012), os quais são capazes de produzir enzimas responsáveis por degradar a celulose, com liberação de glicose para manutenção do seu processo metabólico. As vantagens do uso microbiano são a geração menor de resíduos, assim como a menor presença de compostos inibidores gerados por reações paralelas, como hidrólises ácidas ou alcalinas. A presença destes inibidores pode ser importante a depender das etapas posteriores de aproveitamento da biomassa vegetal (LU et al., 1995).

Além do bagaço de cana-de-açúcar, um outro subproduto da indústria alcooleira é a vinhaça, a qual também representa um grave problema ambiental devido ao grande volume gerado e a alta demanda biológica de oxigênio (MADEJÓN et al., 2001; NAVARRO; SEPÚLVEDA; RUBIO, 2000). Sua composição química é variável, contudo ela apresenta coloração clara, constitui-se basicamente de 93% de água e 7% de sólidos orgânicos e minerais, possui alta turbidez, pH baixo, levedos níveis de matéria orgânica, potássio e cálcio e quantidades moderadas de nitrogênio e fosforo (MARIANO et al., 2009).

Alguns estudos designam fins para minimizar os impactos causados pela vinhaça. Para Madejón et al., (2001), por exemplo, a compostagem seria um destino que pode ser empregado pela vinhaça, pois a reciclagem da matéria orgânica dos resíduos atenua déficits dos mesmo em algumas culturas. Navarro, Sepúlveda e Rubio (2000), a concentração e incineração também são destinos dados a vinhaça, porém esta técnica apresenta custos elevados, além de causar poluição atmosférica. Além destes estudos, Parnaudeau et al., (2008) descreve a aplicação direta da vinhaça na terra como uma outra forma de elimina-la, uma vez que a mesma apresenta fontes de compostos nitrogenados, principalmente potássio, que com aplicação em quantidades adequadas pode trazer benefícios a agricultura além da economia de fertilizante.

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

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Inóculo**

A cepa de *Aspergillus niger* CCT 4355 foi gentilmente cedida pelo LAMAM/CCA/UFSCar, enquanto que *Trichoderma reesei* foi obtida na Embrapa Meio Ambiente através de Acordo de Transferência de Material UFSCar-EMBRAPA (Processo ProPq/UFSCar23112.004123/2014-61). Ambas as cepas foram mantidas em meio padrão PDA no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC/DTAiSER-Ar) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade federal de São Carlos (UFSCar) em Araras/SP, sendo propagadas previamente a cada experimento por pelo menos sete dias em Erlenmeyers em meio líquido contendo: 20% sacarose, 0,25% nitrato de amônio, 1% fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,025% sulfato de magnésio e 0,004% sulfato de cobre. A padronização do inóculo, em termos de esporos, foi feita em termos de carbono e nitrogênio total em analisador TOC-LCPN SHIMADZU® (OLIVEIRA et al., 2012; BASTOS et al., 2015; FRANÇA, 2016).

## **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. A caracterização físico-química e o acondicionamento foram realizados pelo LABMAC/CCA/UFSCar.

Para padronização do tamanho das partículas do bagaço de cana-de-açúcar, foram usados um conjunto de peneiras TYLER, MESH 14 e 28, sendo selecionadas para os experimentos as partículas correspondendo ao diâmetro médio entre 0,59 a 1,17 mm, as quais foram posteriormente esterilizadas em sacos de polipropileno em autoclave.

A vinhaça bruta a ser utilizada como solução impregnante das partículas de bagaço de cana-de-açúcar foi esterilizada a 121°C por 20 minutos em autoclave, sendo caracterizada em termos de pH por potenciometria, teor de glicose pelo método enzimático glicose oxidase – peroxidase com kit LABORLAB<sup>®</sup>, carbono e nitrogênio total em Analisador SHIMADZU<sup>®</sup> TOC-LCPN.

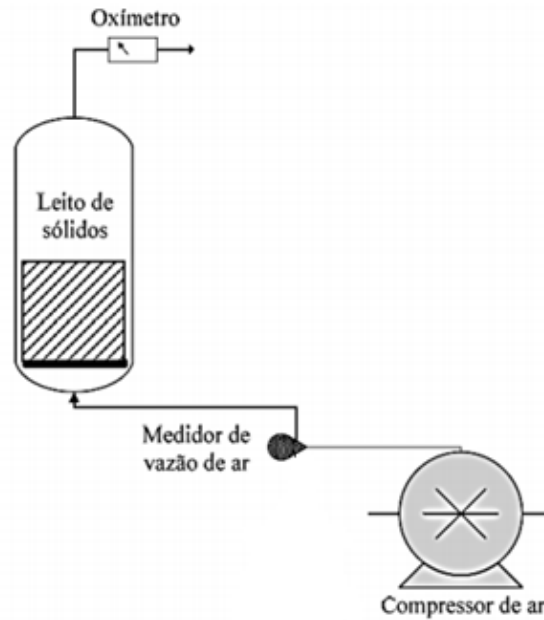
## **4.3. Cultivo em Estado Sólido (CES)**

### **4.3.1. Ensaio exploratório de CES a partir de vinhaça e etanol como solução impregnante das partículas de bagaço de cana-de-açúcar**

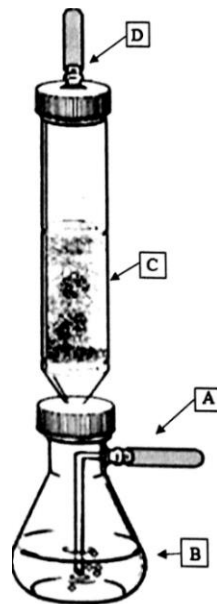
Os ensaios foram realizados em um biorreator do tipo coluna de leito fixo, conforme o ilustrado nas Figuras 1 e 2. As colunas de 30 mm de diâmetro e 200mm de altura máxima foram preenchidas até 60 mm de altura do leito com as partículas selecionadas e esterilizadas do bagaço de cana-de-açúcar (suporte sólido) com a umidade inicial de 80% (solução impregnante e suspensão do inóculo). Os experimentos nos biorreatores tipo colunas de leito fixo foram conduzidos em batelada com continua entrada de ar, mantidos em estufa a 30°C. Neste contexto, foram realizados ensaios com bagaço de cana-de-açúcar com 4 soluções impregnantes diferentes: sacarose a 1% (massa/volume), sacarose a 1% com etanol a 4% (massa/volume), vinhaça e vinhaça com etanol a 4%, e conjuntamente foram adicionados uma suspensão de esporos com 50% de *Aspergillus niger* e 50 % de *Trichoderma reesei*, conforme o ilustrado na Figura 3. Todos estes ensaios foram feitos em triplicata.



**Figura 1.** Esquema do sistema de cultivo em estado sólido, com o bagaço de cana-de-açúcar compondo o leito de sólidos (adaptado de BASTOS et al., 2015)



**Figura 2.** Detalhe do biorreator em coluna de leito fixo utilizados nos ensaios de CES (adaptado de Motta & Santana, 2014). A: entrada de ar para a umidificação; B: água destilada para umidificação; C: leito para o suporte sólido; D: saída de ar da coluna



**Figura 3.** Bagaço de cana-de-açúcar como suporte sólido impregnado com diferentes soluções impregnantes e aplicação do consórcio microbiano de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*.



Nesta etapa, as amostras foram incubadas por 4 dias, tempo este otimizado anteriormente pelo grupo de pesquisa (FRANÇA, 2016). A umidade do suporte sólido foi determinada através da massa seca por gravimetria. A obtenção dos extratos fúngicos bruto em cada tratamento foi realizada com a adição de água deionizada na proporção 1:15 (sólido-solvente), em agitação por 45 minutos 100 rpm/28°C, com posterior adição de acetona seguindo as mesmas condições conforme metodologia proposta por Khosravi-Darani e Zoghi (2008) e adaptada por Bastos et al. (2015).

O extrato fúngico foi caracterizado em termos de pH por potenciometria, o teor de glicose 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. Alternativamente, foram realizadas determinações de ácido cítrico em HPLC Ultimate 3000 Dionex® de acordo com a metodologia proposta por Pereira et al. (2010).

A produtividade máxima em termos de ácido cítrico e a velocidade específica de produção foram calculadas conforme Equações 1 e 2, considerando a fórmula elementar  $CH_{1,72}O_{0,55}N_{0,17}$  dos fungos conforme reportado por Nielsen et al. (2003) e concentração de nitrogênio total determinada no SHIMADZU® TOC-LCPN.

$$Prod = \frac{P_{m\acute{a}x} - P_0}{tempo} \quad (1)$$

Prod: Produtividade em ácido cítrico

$P_{m\acute{a}x}$ : Concentração máxima em ácido cítrico

$P_0$ : Concentração inicial (ácido cítrico intracelular)

$$\mu_p = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

$\mu_p$ : Velocidade específica de formação de ácido cítrico

X: Concentração de biomassa

dP: Variação da concentração de ácido cítrico

dt: Variação de tempo

O rendimento obtido nos ensaios de CES ( $Y_{P/S}$ ) pode ser estimado de forma a comparar com o máximo estequiométrico, ou seja, 0,8 mol de carbono produzido (ácido cítrico) por mol de carbono do substrato consumido (PAPAGIANNI, 2007).

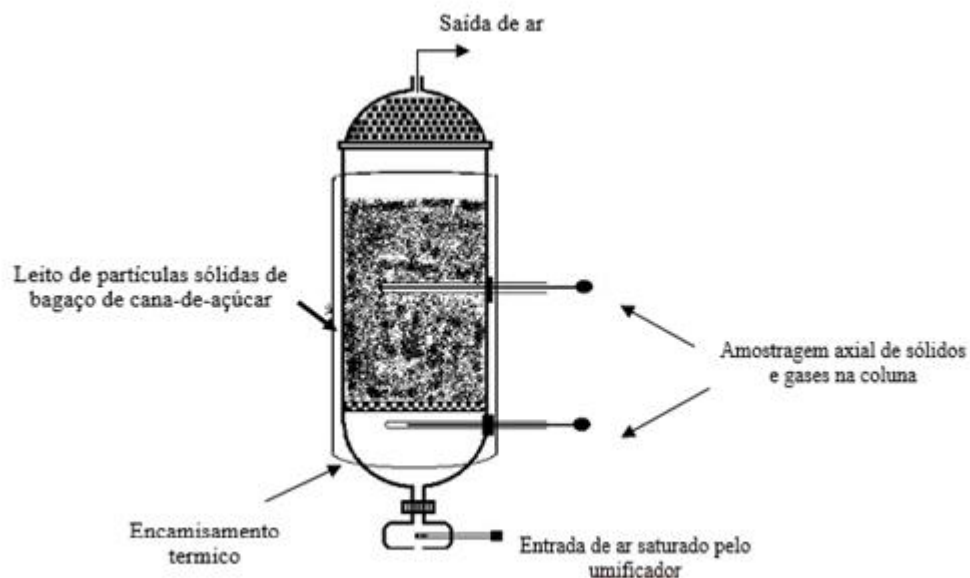
#### 4.3.2. Perfis de ácido cítrico e glicose nas condições de CES previamente selecionadas

Estes ensaios foram conduzidos conforme descrito no item 4.3.1, porém, com monitoramento a cada 24 horas por 144 horas totais, de forma a avaliar tanto a produção de ácido cítrico, como a liberação de glicose no meio. Nestes casos, foram utilizados bagaço de cana-de-açúcar impregnados com vinhaça, vinhaça e etanol a 4% (massa/volume) e apenas etanol a partir de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em consórcio. Os ensaios foram feitos em triplicata e a obtenção do extrato, assim como as análises de monitoramento, foram realizadas conforme o item 4.3.1 durante o período experimental.

### 4.3.3. Escalonamento do CES em biorreator de bancada

Os ensaios foram realizados em um biorreator de leito fixo conforme o ilustrado na Figura 4 nas condições previamente selecionadas (vinhaça como solução impregnante). O biorreator tipo coluna de leito fixo apresenta 50 mm de diâmetro e 400 mm de altura de leito, sendo preenchido com as partículas selecionadas e esterilizadas de bagaço de cana-de-açúcar (suporte sólido) inoculo via a suspensão de esporos de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, umidade inicial do meio sólido de 80%. Os ensaios foram conduzidos em batelada com contínua entrada de ar umidificado e mantidos a 30°C com um controle de temperatura por banho termostaticado e circulação de água em camisa térmica.

**Figura 4.** Esquema do biorreator de coluna de leito fixo para os ensaios de escalonamento do CES (adaptado de Durand, 2003).



Os experimentos foram acompanhados por 144 horas totais, com amostragem a cada 24 horas em diferentes alturas de leito (100, 200, 300 e 400 mm). A obtenção do extrato fúngico, as análises de umidade, ácido cítrico e glicose, assim como os parâmetros cinéticos seguiram conforme descrito no item 4.3.1.

Neste escalonamento foi realizado o monitoramento do oxigênio na entrada e saída em diferentes alturas do leito, com avaliação dos perfis axiais demanda através do oxímetro modelo YSI® 55-D. A demanda de oxigênio nestes ensaios foi avaliada pelo balanço gasoso na entrada e saída da coluna, conforme metodologia adaptada de Gowthaman et al., (1995), sendo utilizada vazão de ar de  $1,3 \text{ L min}^{-1}$ , mantendo a razão de aeração de  $0,0067 \text{ m}^3_{\text{ar}} \text{ m}_{\text{leito}}^{-1} \text{ min}^{-1}$  previamente otimizada por Bastos et al., (2015).

#### 4.4. Aproveitamento do extrato fúngico via fermentação etanólica

Para os ensaios de fermentação etanólica do extrato fúngico, o meio de cultura YEPD líquido contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 e *Dekkera bruxellensis*, separadamente, foram adicionados em tubos tipo “Falcon” de 15 mL foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, sendo ressuspendido em solução salina ( $8,5 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl) para lavagem das células. A massa celular foi diluída em série e foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 600 nm. A concentração celular utilizada ficou na ordem de  $10^7$  células por mL para *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*.

O extrato fúngico bruto foi obtido a partir dos ensaios de CES descritos no item 4.3.2, sendo selecionado o tempo de batelada onde ocorria a maior liberação e disponibilidade de glicose no meio. Neste caso, a obtenção do extrato ocorreu com água deionizada na proporção de 1:15 (sólido-solvente) em agitador orbital a 100 rpm,  $28^\circ\text{C}$  por 90 minutos, sendo posteriormente filtrado em membrana tipo Milipore® com diâmetro de poro  $0,45 \mu\text{m}$  para eliminação de resíduos fúngicos, com posterior esterilização em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

Os ensaios fermentativos ocorreram em triplicata em Frascos Erlenmeyers de 50 mL com 25 mL de extrato (meio de cultivo) contendo a suspensão das leveduras a 100 rpm e  $27^\circ\text{C}$  na incubadora TECNAL® TE-420. O experimento foi monitorado por até 96 horas. As amostras foram retiradas diariamente 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 por cromatografia em fase gasosa em GC-2010 Plus SHIMADZU® com coluna Modelo Stabilwax – DA (30m x 0,25mm x 0,25um). O rendimento fermentativo foi

calculado em termos de etanol produzido por glicose consumida, considerando o estequiométrico (0,511 g etanol por g de glicose).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio exploratório de CES a partir de vinhaça e etanol como solução impregnante das partículas de bagaço de cana-de-açúcar

Estes ensaios fixaram as bateladas em 4 dias, tempo este pré-selecionado por trabalhos anteriores (FRANÇA, 2016), porém, utilizando vinhaça e etanol como estimulantes da produção microbiana de ácido cítrico. A Figura 5 ilustra a condução dos experimentos, com destaque para as colunas de leito fixo preenchidas com bagaço de cana-de-açúcar com diferentes soluções impregnantes.

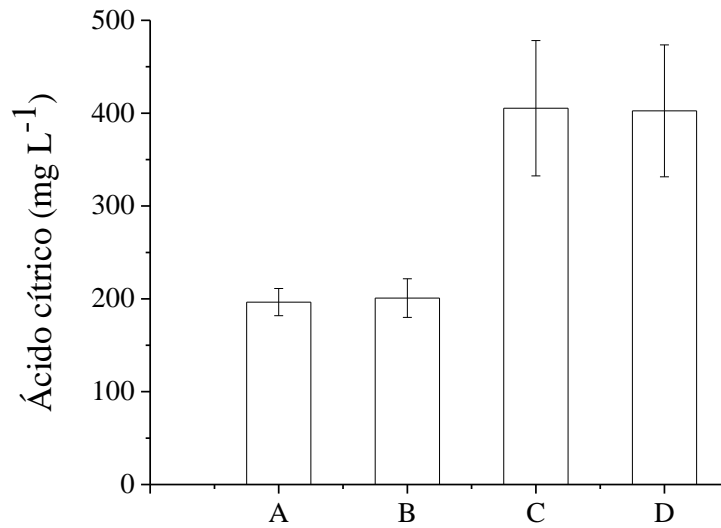
**Figura 5.** CES com bagaço de cana-de-açúcar como suporte sólido impregnado com diferentes soluções impregnantes e aplicação do consorcio microbiano de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*



De acordo com a Figura 6, foi possível observar produções de ácido cítrico bem superiores utilizando vinhaça e vinhaça/etanol como solução impregnante, 405 e 402 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Como todas as demais condições foram mantidas constantes, a explicação para a diferença dos resultados em termos de ácido cítrico está nas soluções impregnantes utilizadas. Pal e Khanum (2010) indicam que as soluções nutrientes afetam os rendimentos dos CES. De acordo com Dhillon et al., (2013), etanol e/ou metanol induzem a produção de ácido cítrico, porém, podem inibir a esporulação. De acordo com os resultados, mesmo não sendo fontes de carbono facilmente assimiláveis como a sacarose, a adição de vinhaça e etanol foi mais benéfica para produção de ácido cítrico do que inibitória. Cabe ressaltar que a própria vinhaça apresenta um mínimo teor de etanol, que pode ter induzido esta produção. O uso de álcoois como estimulante da produção de ácidos orgânicos por fungos pode estar ligado à alterações na sua morfologia. Nadeem et al., (2010) obtiveram rendimentos e produtividades discretamente superiores utilizando álcoois como estimulantes do acúmulo de ácido cítrico, principalmente com metanol. Considerando que este álcool é de difícil manuseio e tendo como perspectivas o escalonamento do processo, foi sugerido o uso de etanol, de ocorrência abundante no Brasil, com custo reduzido.

Deve-se enfatizar que a vinhaça apresenta, além de matéria orgânica principalmente na forma coloidal, diversos sais que podem contribuir para a produção de ácido cítrico. De acordo com Papagianni (2007), *Aspergillus niger* exige concentrações de diversos metais-traço para a produção de ácido cítrico e crescimento, tais como zinco, manganês, ferro e cobre. Cabe ressaltar que a vinhaça utilizada nos ensaios apresenta, além de razão C/N favorável em torno de 20 (carbono orgânico total 1036 mg L<sup>-1</sup> e nitrogênio total 50,27 mg L<sup>-1</sup>), teores de zinco (0,69 mg L<sup>-1</sup>), cobre (0,035 mg L<sup>-1</sup>), ferro (14,5 mg L<sup>-1</sup>) e manganês (3,11 mg L<sup>-1</sup>). Sendo assim, a composição da vinhaça certamente influenciou positivamente a produção de ácido cítrico em comparação às condições com sacarose, onde a produtividade foi muito inferior, direcionando o substrato para crescimento celular.

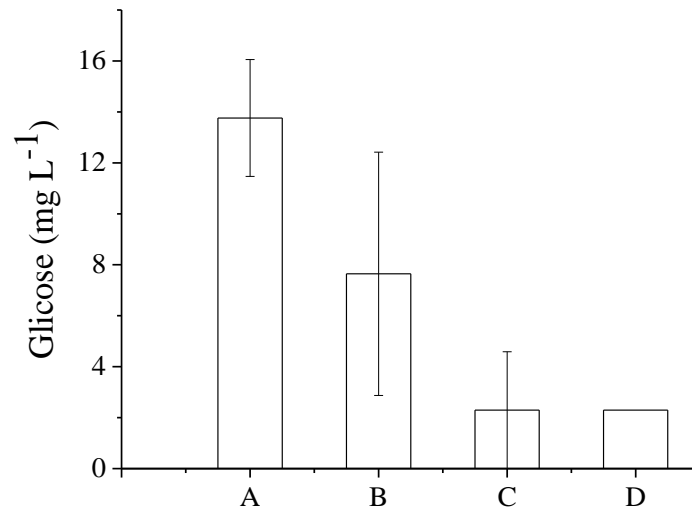
**Figura 6.** Teores de ácido cítrico no extrato fúngico em 4 dias de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com (A) sacarose, (B) sacarose e etanol, (C) vinhaça e (D) vinhaça e etanol



Nesse sentido, a Figura 7 apresenta as concentrações de glicose residual durante o CES nessas condições. De acordo com os resultados, nas condições com vinhaça também houve a menor concentração de glicose residual. Parte do carbono orgânico na vinhaça fica disponível na forma de glicose, uma vez que há um pré-tratamento desta água residuária posterior aos experimentos (DE MATTOS; BASTOS, 2016). Sendo assim, no caso da sacarose, deve ocorrer a hidrólise microbiana nas duas hexoses para sequência do metabolismo aeróbio via glicose, Ciclo de Krebs e cadeia respiratória. Segundo Angumeenal e Venkappayya (2013), a qualidade e quantidade das fontes de carbono influenciam a atividade metabólica dos micro-organismos para o processo de obtenção do ácido cítrico, sendo que a glicose é considerada a melhor fonte de carbono para a produção de ácido cítrico.



**Figura 7.** Teores de glicose no extrato fúngico em 4 dias de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com (A) sacarose, (B) sacarose e etanol, (C) vinhaça e (D) vinhaça e etanol



Estes resultados podem ser melhor quantificados a partir da Tabela 1 que apresenta os parâmetros cinéticos da produção microbiana de ácido cítrico. Os dados indicam rendimentos, produtividades e velocidades específica de produção (em termos de biomassa) superiores para as condições com vinhaça, indicando a viabilidade dos CES nestas condições. Como o rendimento estequiométrico em ácido cítrico é relatado como 0,8 mol por mol de substrato, este parâmetro não pode ser expresso neste caso em termos percentuais, como apresentado em determinados trabalhos (PAPAGIANNI, 2007; NADEEM et al., 2010), uma vez que teríamos valores superiores a 100% (1,31 e 1,29 mg ácido cítrico mg glicose<sup>-1</sup>). Porém, isto pode ser explicado uma vez que, além da quantidade inicial de glicose, ocorre a liberação via hidrólise dos polissacarídeos estruturais, de difícil detecção durante o processo, elevando a quantidade de substrato total. Assim, ao invés da real quantidade de glicose convertida em ácido cítrico, tem-se os rendimentos observados em termos de massa.

**Tabela 1.** Rendimentos observados de glicose em ácido cítrico ( $Y_{P/S}$ ), produtividades ( $P_{rod}$ ) e velocidades específicas de produção de ácido cítrico ( $\mu_P$ ) para os cultivos em bagaço de cana-de-açúcar com consórcio fúngico

Solução impregnante	$Y_{P/S}$ (mg ácido cítrico mg glicose <sup>-1</sup> )	$P_{rod}$ (mg ácido cítrico L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$\mu_P$ (mg ácido cítrico g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Vinhaça	1,31	4,22	8,97
Vinhaça e etanol	1,29	4,19	8,91
Sacarose	0,66	2,05	4,36
Sacarose e etanol	0,67	2,79	5,94

Oliveira et al., (2012), em trabalho pioneiro combinando bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça, obtiveram produtividades em torno de 1,45 g por grama meio sólido por dia em termos de ácidos totais, trabalhando com *Aspergillus niger*. Kumar et al., (2003) reportam rendimentos em torno de 30% do máximo estequiométrico em 9 dias com bagaço impregnado de solução nutriente e adição de metanol. Bastos et al., (2015), avaliando a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* a partir de bagaço de cana e vinhaça em biorreator de coluna com diferentes alturas de leito verificou maiores produções em 3 dias (1,75 g por 100 g de meio sólido), assim como maior liberação de glicose para alturas de leito inferiores a 120 mm. Vandenberghe et al., (2000) reportaram produções de 88 g de ácido cítrico por kg de massa seca para bagaço de mandioca, 48,7 g kg<sup>-1</sup> para bagaço de cana-de-açúcar e 12,7 g kg<sup>-1</sup> para casca de café. Segundo Bastos et al., (2014), no ponto de concentração máxima de ácido cítrico a 200 mm de altura de leito com aeração de 3 L min<sup>-1</sup> foi obtida uma produção de 27,1 g kg<sup>-1</sup> bagaço de cana-de-açúcar, valor ainda inferior às informações da literatura, mas promissor uma vez que é usado apenas vinhaça como solução nutriente, agregando desta forma dois subprodutos.

A Figura 8 apresenta os perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH do extrato fúngico e a umidade do suporte sólido após 4 dias de CES com bagaço de cana-de-açúcar impregnado com diferentes soluções nutrientes. Os dados de carbono e nitrogênio encontram-se na mesma ordem de grandeza para todas as condições (Figura 8a e 8b). Considerando os valores iniciais para vinhaça (TOC de 1036 mg L<sup>-1</sup>), verifica-se que carbono é dado pela quantidade de sacarose e etanol adicionados, além da biomassa microbiana. Apesar de estar na mesma ordem de grandeza, o valor discretamente superior de nitrogênio para

a condição tendo vinhaça como solução umidificante pode indicar um crescimento celular superior, até mesmo pelo aporte de nutrientes já indicado.

O pH do meio é importante para a esporulação e, para a produção de ácidos orgânicos, são relatados valores próximos de 2 (PAPAGIANNI, 1995). O baixo pH também beneficia o controle da contaminação, o que já é favorecido pela menor disponibilidade de água nos cultivos a partir de suportes sólidos. Tecnicamente, os meios contendo vinhaça poderiam facilitar a manutenção do pH em patamares inferiores a 4,5, o que seria ideal para a produção de ácido cítrico, inibindo a obtenção de outros ácidos (oxálico e glucônico). Porém, os resultados indicam que para todas as condições houve estabilidade durante o período experimental, mantendo-se numa faixa adequada, principalmente para o crescimento (Figura 8c).

Geralmente os estudos de CES envolvendo a seleção de umidade inicial, fundamental nestes cultivos, despreza o regime transiente, ou seja, tendência de variação deste parâmetro durante o tempo dependendo do crescimento microbiano. A umidade do meio sólido tende a elevar-se na medida que a respiração gera quantidades consideráveis de água metabólica (6 mols de H<sub>2</sub>O para cada mol de glicose consumida). Sendo assim, se o biorreator não consegue arrastar esta água para a fase gasosa, tem-se um acúmulo que pode elevar a umidade do meio, acarretando em limitações principalmente na disponibilidade de oxigênio. Este arraste depende, dentre outros fatores, da vazão e umidade do ar e altura do leito de partículas em biorreatores de coluna.

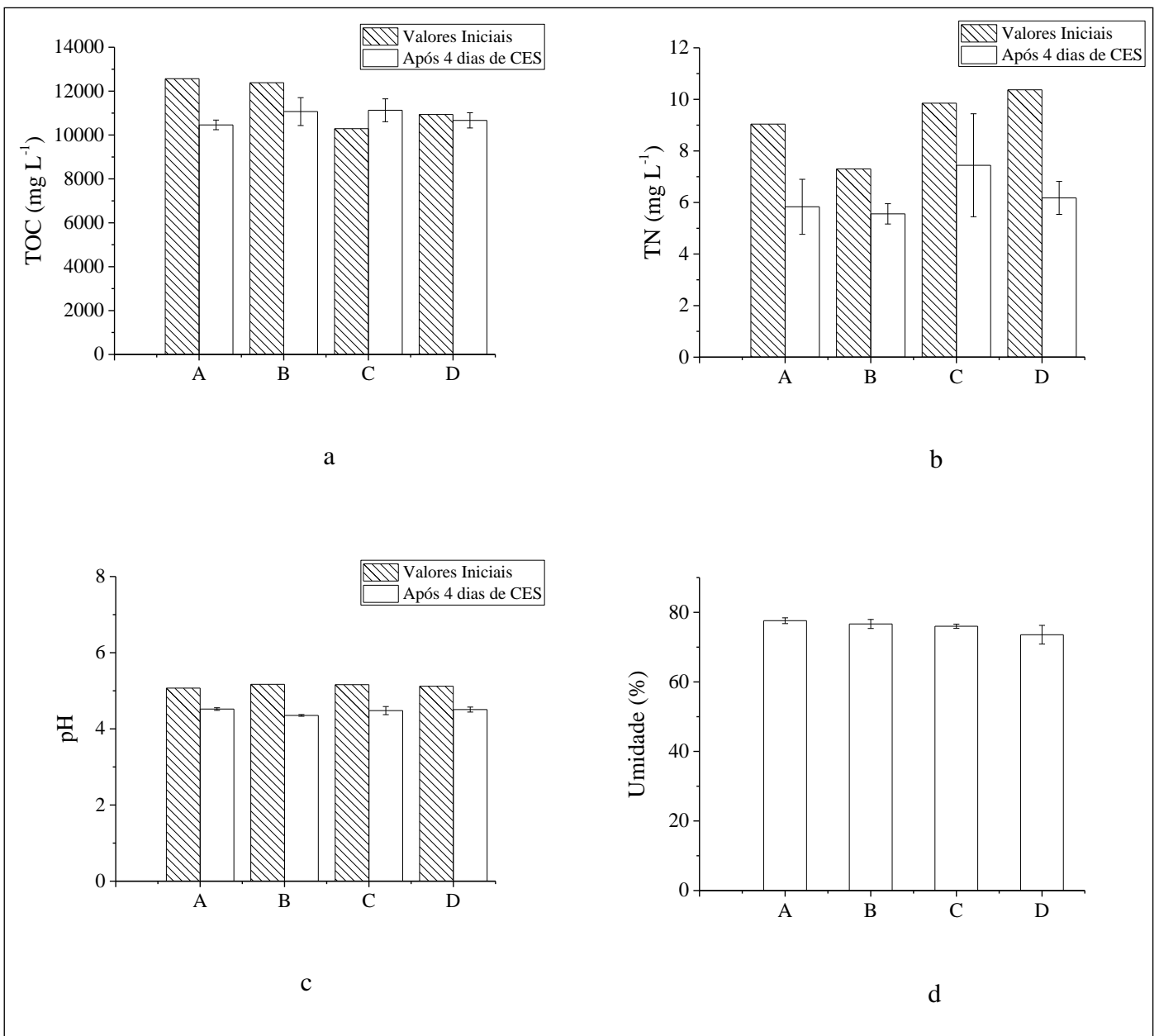
Bastos et al., (2015) mantiveram a umidade praticamente constante a partir da seleção de altura de leito e vazão de ar. Isto mantém as características originais do CES, ou seja, condições próximas da ausência de água livre, sem maiores efeitos de limitação de oxigênio ou considerável variação na porosidade ou espessura do filme líquido depositado na superfície das partículas.

Kumar et al., (2003) reportam máximos de consumo de açúcares por *Aspergillus niger* em CES a partir de resíduos de frutas a um conteúdo de umidade de 70%. Acima deste nível, tanto a produção de ácido cítrico como o consumo de açúcares diminuem, o que é explicado pelos autores devido à redução da porosidade do leito de partículas, com consequente limitação da transferência de calor e massa.

De acordo com Lekanda e Pérez-Correa (2004), o balanço de água pode atingir o regime permanente quando a taxa de geração de água metabólica é equivalente ao consumo do suporte sólido, com perda de massa.

Os resultados apresentados na Figura 8d indicam que, para todas as condições, a umidade manteve-se em 4 dias discretamente abaixo do valor inicial de 80%, sugerindo condições adequadas de transferência de oxigênio e balanço de água.

**Figura 8.** Perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH do extrato fúngico e a umidade do suporte sólido após 4 dias de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com: (A) sacarose, (B) sacarose e etanol, (C) vinhaça e (D) vinhaça e etanol

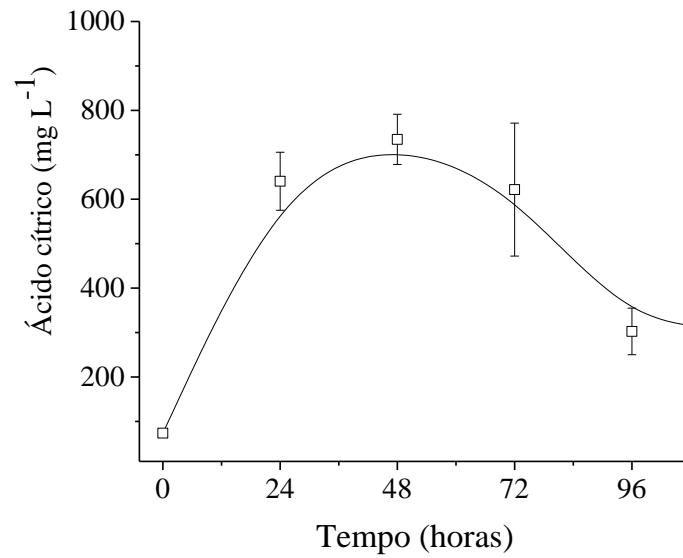


Segundo Papagianni et al., (1998), nos cultivos microbianos submersos a agitação é necessária para evitar gradientes de concentração e temperatura. Porém, o cisalhamento provocado por elevadas velocidades de agitação pode afetar os micro-organismos filamentosos de várias formas, causando variação no crescimento e formação de produtos, devido principalmente às alterações morfológicas. No caso dos CES, esta condição física é dada somente pela aeração para um dado nível de umidade do meio sólido. Desta forma, é fundamental a manutenção da umidade constante e estes resultados indicam uma estabilidade física do processo, garantindo que as diferenças de rendimento e produtividade foram condicionadas pela solução nutriente.

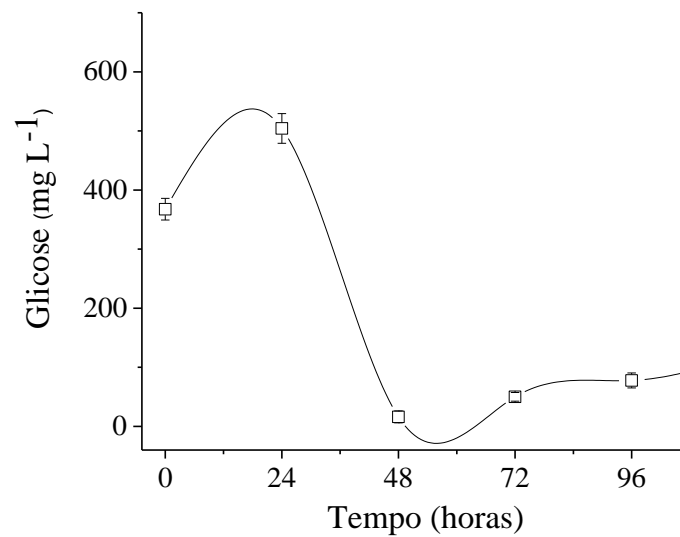
## **5.2. Perfis de ácido cítrico e glicose nas condições de CES previamente selecionadas**

Nestes ensaios foram conduzidos CES com monitoramento de 24 horas tendo como solução nutriente vinhaça e vinhaça/etanol, uma vez que apresentaram os melhores resultados em termos de rendimento e produtividade (Tabela 1). De acordo com a Figura 9 que apresenta o perfil de ácido cítrico usando somente vinhaça como solução impregnante, a produção apresentou um patamar satisfatório nas primeiras 72 horas de CES, com máximo em 48 horas (734,52 mg L<sup>-1</sup>). Os perfis de glicose apresentados na Figura 10 retratam uma elevação no teor de glicose, seguida de uma fase de consumo considerável até 48 horas que corresponde ao período de maior produção de ácido cítrico.

**Figura 9.** Perfis de ácido cítrico no extrato fúngico para CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça



**Figura 10.** Perfis de glicose no extrato fúngico para CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça

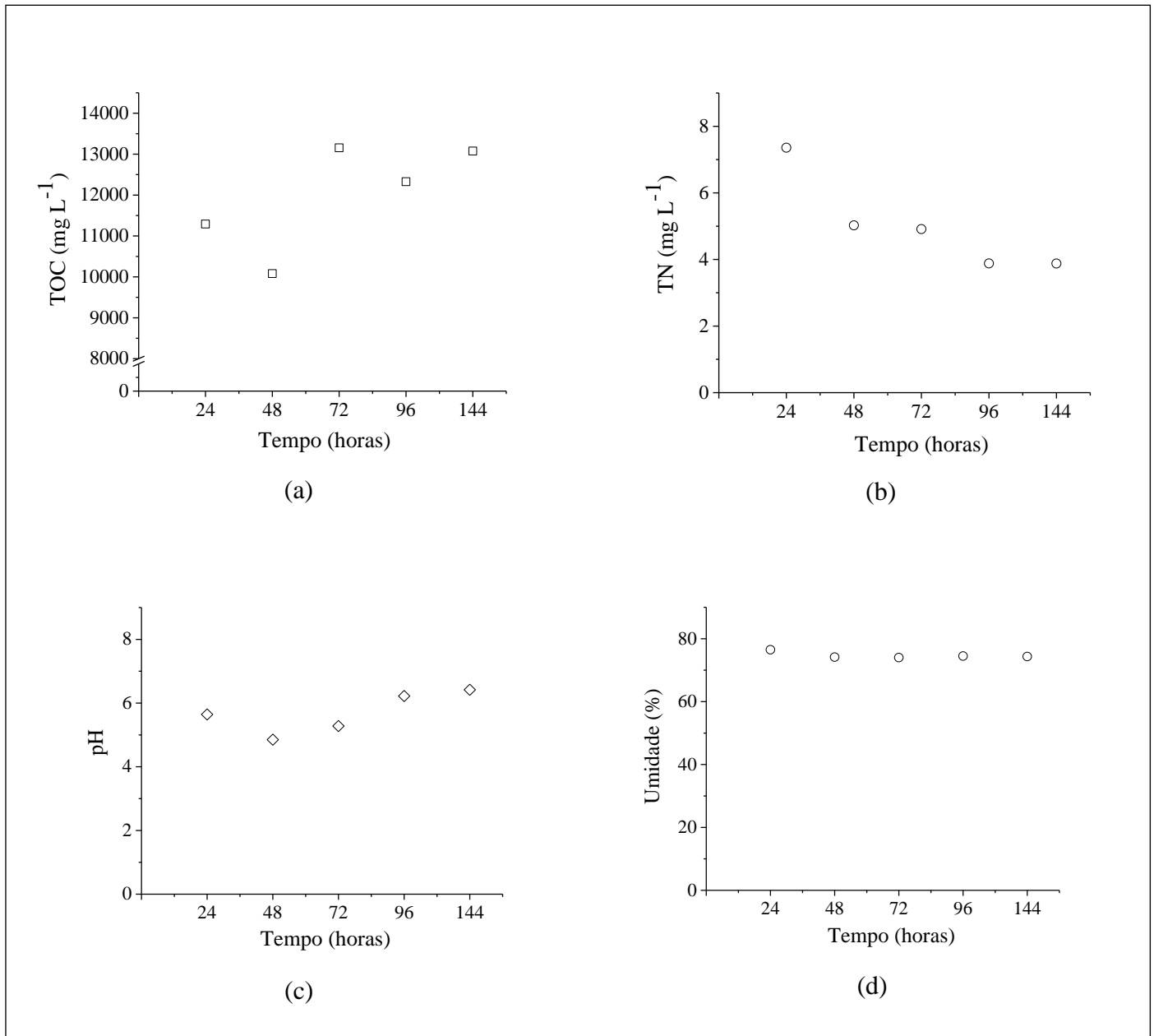


Segundo Diamantopoulou et al., (2016) a falta ou excesso de alguns nutrientes, dentre eles, carbono e nitrogênio, pode limitar o crescimento fúngico ou a síntese de produtos de interesse. A variação de carbono dentro da faixa de 11000 a 13000 mg L<sup>-1</sup>, conforme perfil de TOC apresentado na Figura 11a, indica que houve um balanço entre o consumo de matéria orgânica do meio e crescimento com formação de ácido cítrico. Por outro lado, o discreto decaimento de nitrogênio sugere um consumo maior deste nutriente, vindo da vinhaça, comparativamente ao crescimento, que também pode elevar o nitrogênio celular. O comportamento da curva indica que o nitrogênio pode ter controlado o crescimento nestas condições, com cinética de consumo de primeira ordem até 72 horas (taxa de 0,0084 h<sup>-1</sup> com tempo de meia-vida de 82,5 horas).

O pH apresentou uma discreta variação nas primeiras 48 horas, resultado provável da maior produção de ácidos orgânicos, elevando-se e ficando em torno de 6 até o final do período experimental.

Conforme discutido no item 5.1, a manutenção da umidade durante 144 horas de CES demonstra uma estabilidade física do leito de partículas, sem maiores limitações de transferência de calor e massa.

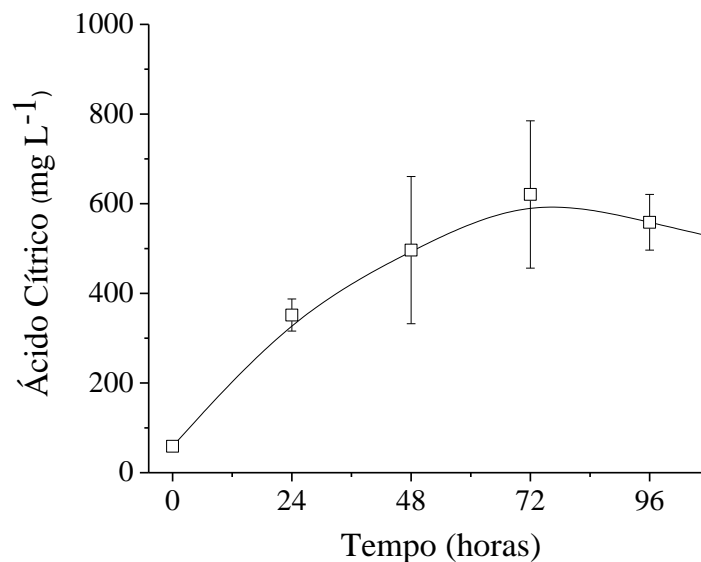
**Figura 11.** Perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH e umidade no CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça





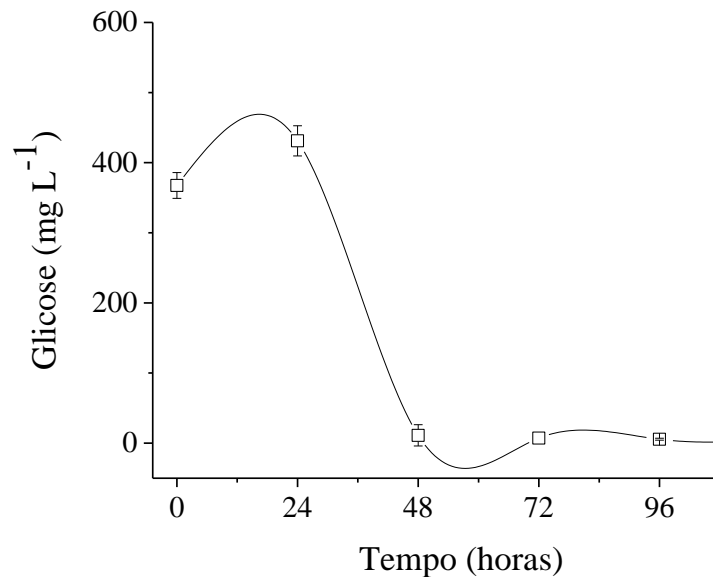
Segundo Haq et al., (2003) a utilização de álcoois inferiores, como etanol e/ou metanol, tende a aumentar o rendimento de ácido cítrico devido a alterações na permeabilidade da membrana celular. Neste ensaio, foram utilizados vinhaça e etanol como solução impregnante das partículas de bagaço de cana-de-açúcar. Na Figura 12, verifica-se que a maior quantidade de ácido cítrico se deu em 72 horas de CES, com cerca de 620 mg L<sup>-1</sup>.

**Figura 12.** Perfis de ácido cítrico no extrato fúngico para CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e etanol



Os resultados dos perfis de glicose (Figura 13) usando vinhaça e etanol como solução impregnante do bagaço de cana-de-açúcar apontam para um maior consumo de glicose pelos micro-organismos em 72 horas de CES, concomitante a maior produção de ácido cítrico. Contudo, após este período, os níveis de glicose se mantiveram inferiores, mantendo um regime permanente. Segundo Oliveira et al., (2012), isto é comum para CES onde o suporte sólido contém a fonte de carbono, uma vez que há o consumo de glicose e liberação via hidrólise enzimática da estrutura lignocelulósica pelos fungos.

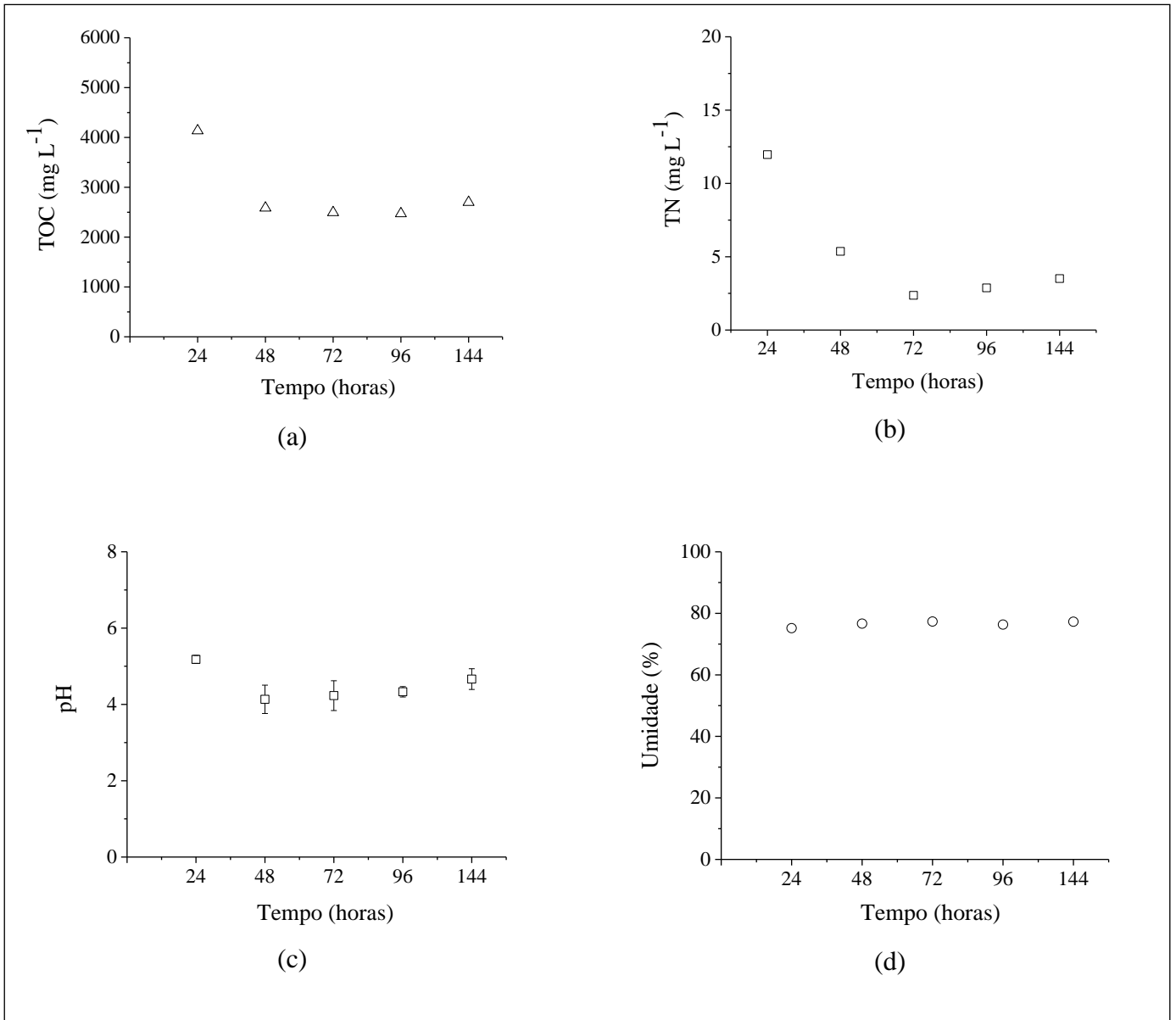
**Figura 13.** Perfis de glicose no extrato fúngico durante 144 horas de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e etanol



A Figura 14 apresenta os perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH do extrato fúngico e a umidade do suporte sólido durante 144 horas de CES com bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e etanol. Os resultados indicam valores de TOC inferiores, atingindo em torno de 2495 mg L<sup>-1</sup> em 72 horas, período de maior produção de ácido cítrico. Comparativamente à condição anterior que apresentava vinhaça como impregnante, o fato de ter agregado solução de etanol reduziu a quantidade total de carbono. A vinhaça apresenta elevados teores de matéria orgânica coloidal e glicerol, o que eleva o aporte de carbono no meio. Neste caso, com uma menor quantidade de carbono disponível, verificou-se um comportamento de consumo ao invés de balanço, indicando que este pode ter sido limitante tanto no crescimento como produção de ácidos orgânicos. Por outro lado, os perfis de nitrogênio seguem o comportamento característico, com cinética de consumo de primeira ordem na taxa de 0,034 h<sup>-1</sup> e tempo de meia-vida de 20,4 horas.

Os perfis de pH demonstraram que houve uma pequena queda após 24 horas de CES e em seguida se manteve estável até 144 horas. Os perfis de umidade, apresentaram-se estáveis durante todo o processo de CES.

**Figura 14.** Perfis de carbono orgânico total (TOC), nitrogênio total (TN), pH do extrato fúngico e a umidade do suporte solido durante 144 horas de CES em bagaço de cana-de-açúcar impregnado com vinhaça e etanol



Além disso, foram realizados ensaios nas mesmas condições tendo apenas etanol como solução impregnante, ou seja, na ausência de vinhaça. Como os resultados indicaram produções de ácido cítrico por volta de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , ou seja, muito inferiores das condições utilizando vinhaça na solução impregnante (Figuras 9 e 12), sugere-se que a presença de etanol como única fonte de carbono na fase líquida que envolve as partículas foi limitante para o crescimento e produção de ácido cítrico pelos fungos nas condições experimentais. Assim, mesmo que o etanol tenha um efeito indutor descrito na literatura (BARRINGTON; KIM, 2008), há a necessidade de nutrientes e outras fontes de carbono mais facilmente assimiláveis por estes micro-organismos.

Neste sentido, a Tabela 2 resume os resultados desta etapa em termos dos parâmetros cinéticos para as condições de vinhaça e vinhaça/etanol como solução impregnante. Todos os dados indicam que a seleção do tempo de batelada é fundamental para estes cultivos, uma vez que os valores máximos obtidos no tempo ideal foram superiores aos encontrados na Tabela 1, com destaque ao elevado rendimento ( $1,88 \text{ mg ácido cítrico mg glicose}^{-1}$ ), produtividade ( $13,77 \text{ mg ácido cítrico L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e velocidade específica de produção de ácido cítrico ( $29,3 \text{ mg ácido cítrico g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) tendo apenas vinhaça como solução nutriente. Sendo assim, o resultado dos parâmetros cinéticos vem ao encontro da discussão já relatada para as Figuras 8, 9 e 10, ou seja, elevada produção de ácido cítrico em 48 horas.

**Tabela 2.** Rendimentos máximos observados de glicose em ácido cítrico ( $Y_{P/S}$ ), produtividades máximas ( $P_{\text{rod máx}}$ ) nos respectivos tempos e velocidades específicas de produção de ácido cítrico ( $\mu_P$ ) para os cultivos em bagaço de cana-de-açúcar consórcio fúngico com vinhaça e vinhaça/etanol em 144 horas.

Solução impregnante	$Y_{P/S} \text{ máx}$ ( $\text{mg ácido cítrico mg glicose}^{-1}$ )	$P_{\text{rod máx}}$ ( $\text{mg ácido cítrico L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	$\mu_P$ ( $\text{mg ácido cítrico g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
Vinhaça	1,88	13,77	29,30
Vinhaça e etanol	1,56	7,79	16,58

O rendimento em termos de massa de ácido cítrico produzido por massa de glicose consumida é superior aos resultados apresentados na literatura. Kumar et al., (2003) trabalhando com *Aspergillus niger* DS 1 a partir de bagaço de cana-de-açúcar e meio a base de sacarose e melão obtiveram em condições otimizadas (73% de umidade inicial, 4% de metanol como indutor em partículas de 1,2 a 1,6 mm e 31,8 gramas de açúcar por 100 g de meio sólido) rendimentos máximos em torno de  $0,7 \text{ g ácido cítrico g meio sólido}^{-1}$  em 9 dias. Conforme já citado, os rendimentos obtidos superiores a  $1 \text{ g ácido cítrico g meio sólido}^{-1}$  indicam que não apenas a fonte de carbono da solução nutriente é utilizada, mas também os polissacarídeos estruturais da matriz sólida. Os resultados de produtividade máxima encontram-se inferiores aos dados apresentados por Nadeem et al. (2010) ( $256 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Porém, deve ser salientado que estes autores utilizaram *Aspergillus niger* M-101 e metanol como indutor nas concentrações de 0,5 a 2 % (volume por volume) em frascos agitados com meio otimizado a base de melão de beterraba. Por outro lado, a velocidade específica de crescimento é superior ao reportado por estes autores ( $6 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), o que indica uma adequada adaptação do inóculo ao meio sólido contendo bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça, ou seja, sendo obtida uma produção maior de ácido cítrico por biomassa. Neste contexto, os resultados da Tabela 2 são importantes e promissores, até mesmo por se tratar de uma produção biotecnológica a partir de dois subprodutos agroindustriais.

Cabe ressaltar ainda que as maiores liberações de glicose no meio ocorrem no início dos cultivos para ambas condições, vinhaça e vinhaça/etanol. Nesse sentido, visando o aproveitamento deste açúcar residual, o CES poderia ser interrompido em 24 horas, sendo ainda obtido em torno de  $600 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido cítrico usando vinhaça como solução nutriente (Figura 9).

### 5.3. Escalonamento do CES em biorreator de bancada

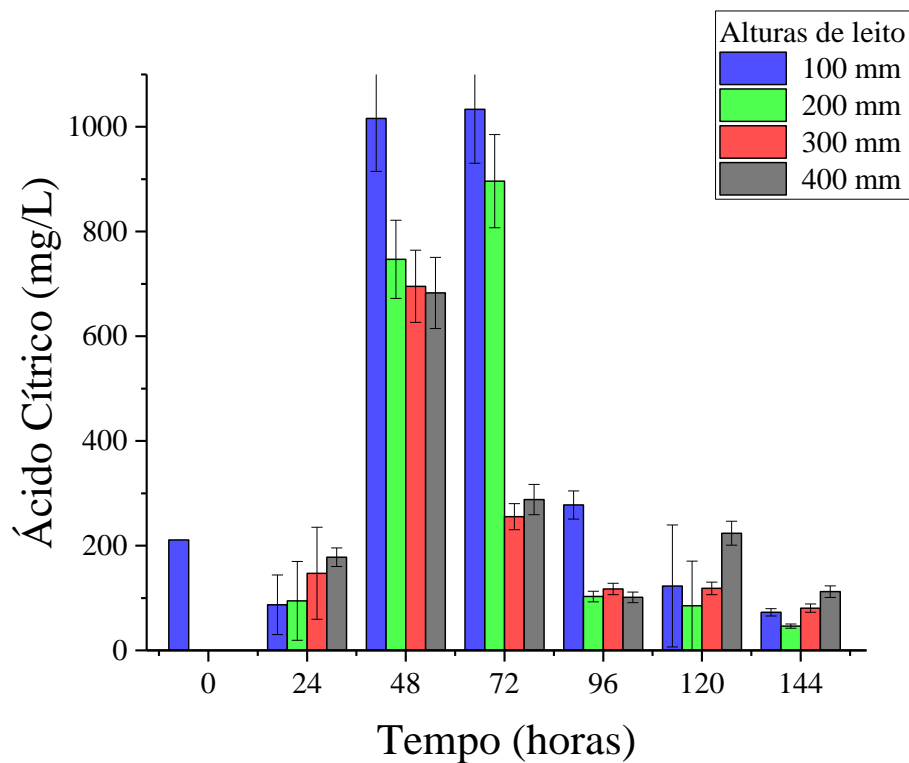
Nesta etapa, foram conduzidos CES por 144 horas em biorreator de coluna com maiores dimensões, com volume de meio sólido cerca de dez vezes maior, usando vinhaça como solução impregnante das partículas de bagaço de cana, uma vez que esta foi a condição selecionada devido à maior velocidade específica de produção  $\mu_P$  (Tabela 2).

De acordo com os perfis axiais de ácido cítrico apresentados na Figura 15, as maiores concentrações ficam em torno de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  para 100 mm de altura de leito em 48 e 72 horas. Cabe ressaltar que, apesar dos valores discretamente superiores, estes ocorreram nos intervalos de tempo onde as maiores concentrações de ácido cítrico foram obtidas nos ensaios

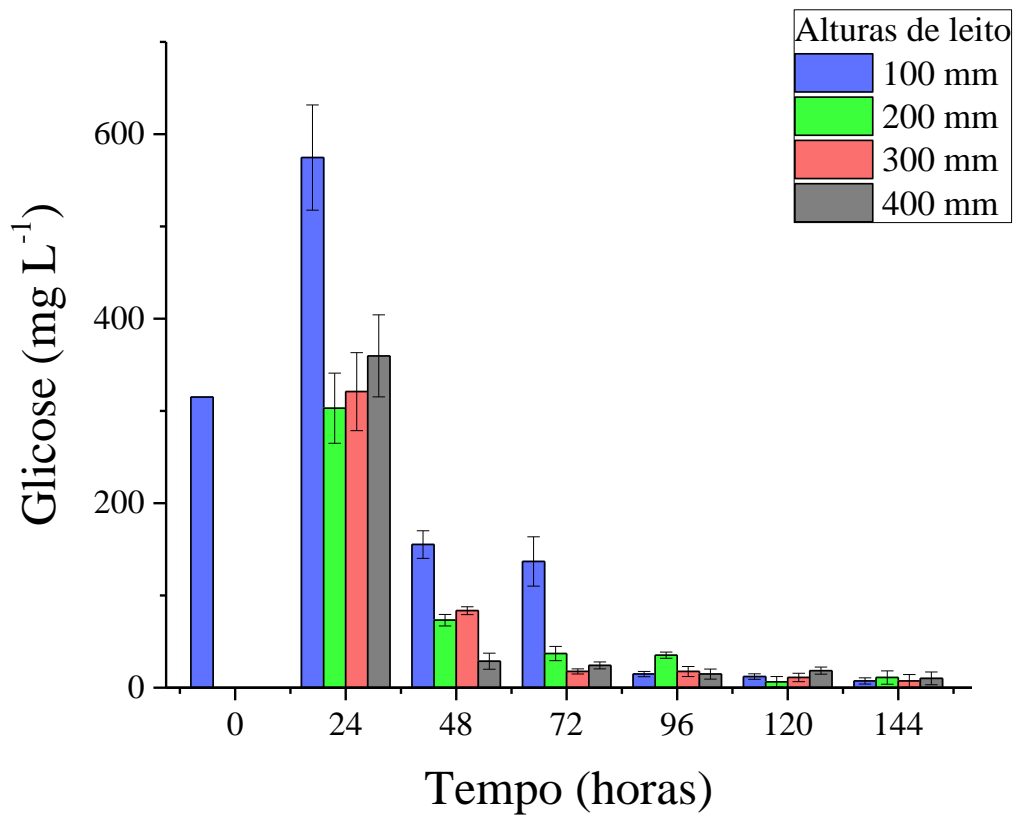
em colunas menores (Figuras 9 e 12). O fato do biorreator de coluna permitir um melhor controle de temperatura e aeração, mantendo a relação ótima entre vazão de ar e volume de leito de partículas, pode ter levado a um desenvolvimento mais adequado dos fungos, os quais são extremamente aeróbios. Como consequência disto, houve um aumento na produção de ácido cítrico, indicando um sucesso na proposta de escalonamento deste processo. Percebe-se que esta produção é dependente da altura de leito, principalmente em 48 horas, sugerindo limitação na transferência de oxigênio a partir de alturas superiores a 100 mm. Nesse sentido, a altura de leito parece ser o critério físico que governa os fenômenos de transferência de massa e crescimento microbiano nos CES em biorreatores de coluna.

De acordo com os perfis axiais de glicose apresentados na Figura 16, ocorre uma redução nos teores durante o tempo e nas diferentes alturas de leito. Contudo, os maiores consumos ocorrem para 100 mm de altura de leito em 48 e 72 horas, que correspondem aos períodos de maior produção de ácido cítrico.

**Figura 15.** Perfis axiais de ácido cítrico durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões



**Figura 16.** Perfis axiais de glicose durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões

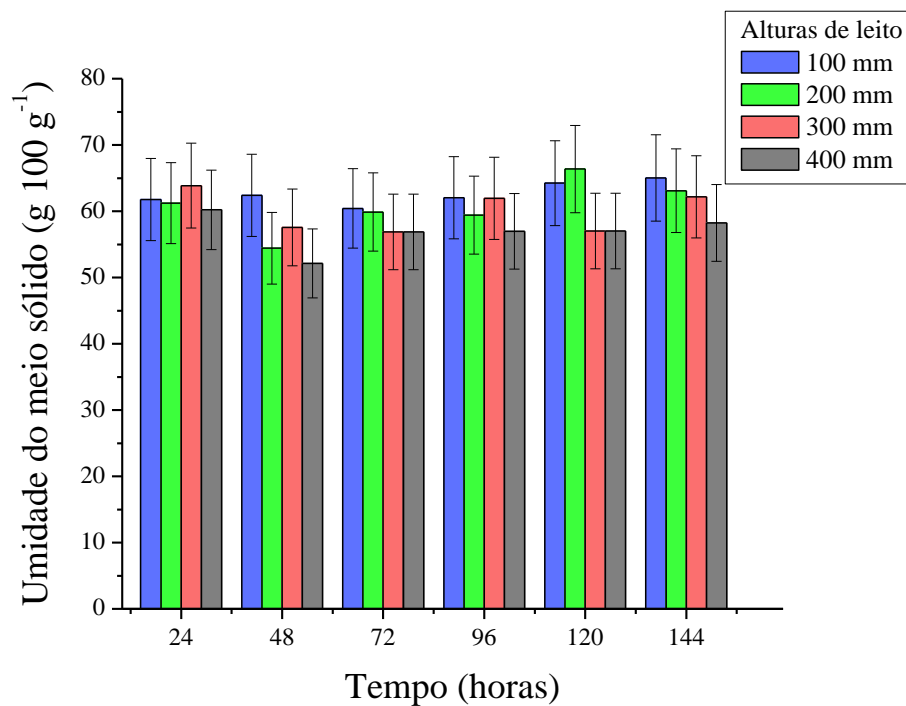


O elevado teor de glicose em 100 mm nas primeiras 24 horas sugere uma atividade microbiana considerável, levando a um consumo dos polissacarídeos estruturais do bagaço e liberação de hexoses. Neste caso, a maior liberação de glicose aproveitável para outros processos ocorreria neste período, anterior à maior produção de ácido cítrico. Nesse sentido, a proposta de escalonamento indica que dificilmente ambos objetivos poderiam ser conciliados num único sistema de biorreação, devendo-se a partir disto levar em conta outros aspectos como a viabilidade econômica.

A Figura 17 apresenta os perfis axiais de umidade do meio sólido. Apesar dos valores levemente inferiores às colunas menores (Figuras 11 e 14), os conteúdos de umidade do meio sólido permanecem praticamente constantes durante o tempo e com uma discreta redução à medida que se aumenta a altura de leito. Conforme reportado por Bastos et al., 2014, ensaios de CES em condições de umidade controladas podem ser obtidos através da seleção de altura de leito e vazão de ar. O conteúdo de umidade altera a espessura do filme líquido formado na superfície das partículas sólidas, afetando diretamente o coeficiente global de transferência

de oxigênio gás-líquido ( $k_{LA}$ ). Assim, há um conteúdo de umidade ótimo que permite os maiores valores de  $k_{LA}$ , sendo que é fundamental que este teor de água nos sólidos permaneça praticamente constante, independente da atividade microbiana.

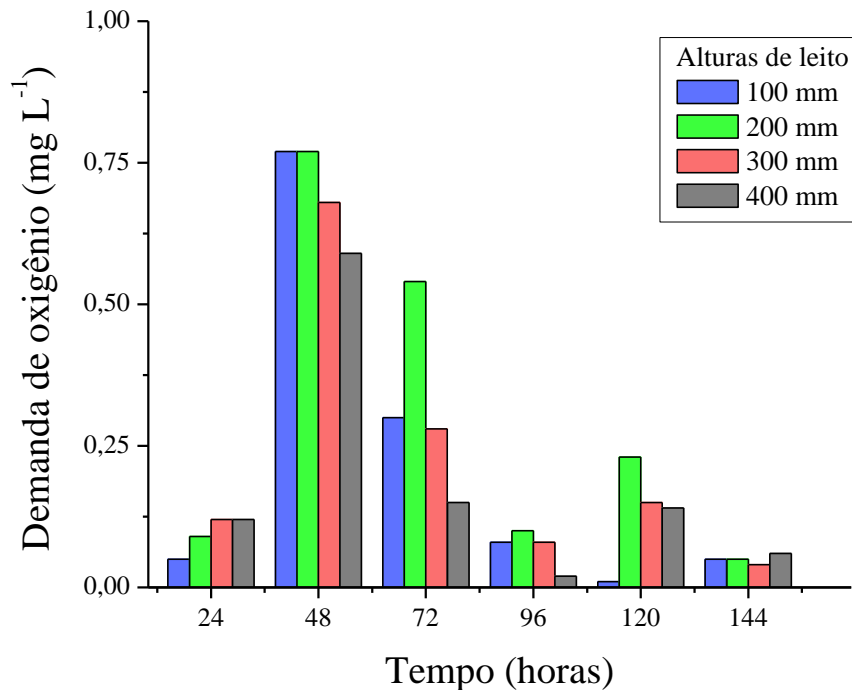
**Figura 17.** Perfis axiais da umidade do meio sólido durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões



O escalonamento de biorreatores em batelada inevitavelmente envolve o aumento de volume. Nestes casos, nos CES, é fundamental o monitoramento da disponibilidade de oxigênio nas diferentes alturas de leito, por se tratarem, em sua grande maioria, de cultivos aeróbios (BASTOS et al., 2015). Ainda de acordo com estes autores, há um tempo de residência ótimo do ar no leito de partículas, ou seja, relação entre o volume do biorreator e a vazão de ar. Para as menores alturas de leito, há um menor tempo de residência, podendo limitar a disponibilidade de oxigênio. Conforme pode ser verificado na Figura 18, o maior consumo de oxigênio (maior diferença entre os valores da entrada e saída da coluna) ocorre nas alturas de 100 e 200 mm, principalmente no período entre 48 e 72 horas, concordando com a maior produção de ácido cítrico.



**Figura 18.** Perfis axiais da demanda de oxigênio durante o CES em biorreator de leito fixo de maiores dimensões



Sabe-se que o rendimento na produção industrial de ácido cítrico é extremamente dependente da aeração e, mesmo pequenos intervalos de redução no oxigênio dissolvido podem causar perdas irreversíveis. *Aspergillus niger* é conhecido por apresentar dois modelos respiratórios durante o acúmulo de ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2007). Tanto o crescimento como a síntese deste metabólito dependem de vias que são sensíveis a cianeto e ácido salicilhidroxâmico, sendo que a presença de atalhos é bioquimicamente explicada e de suma importância. A produção de ATP a partir da glicólise é provavelmente suficiente para estas células, não havendo a necessidade de gerar mais via fosforilação oxidativa. Como a alta concentração interna de ATP teria um efeito inibitório sobre algumas das enzimas envolvidas na glicólise, vias oxidativas alternativas são usadas para reciclar NADH, mantendo o fluxo através da via glicolítica.

Assim, as limitações de transferência de oxigênio nos CES podem afetar completamente a produção de metabólitos microbianos. Porém, a interação entre o crescimento fúngico e os fenômenos físicos de transferência de massa são de difícil entendimento. A transferência de oxigênio nestes sistemas depende da natureza do suporte sólido utilizado, sua porosidade e conteúdo de umidade (OOSTRA et al., 2001). Mesmo em biorreatores de coluna

com pequenas dimensões, é comum a ocorrência de gradientes de oxigênio, umidade e temperatura (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; DELABONA et al., 2013). Além disso, o valor inicial do conteúdo de umidade nos CES tende a elevar-se na maioria dos casos, devido à produção de água metabólica, alterando assim as propriedades do suporte sólido. Porém, conforme apresentado na Figura 17, a umidade no leito de bagaço de cana-de-açúcar permaneceu praticamente constante, indicando que as variações na demanda de oxigênio apresentadas na Figura 18 provavelmente ocorreram devido à atividade metabólica dos fungos. Assim, estudos posteriores se fazem necessários para avaliar não apenas a demanda de oxigênio, mas para realizar também a estimativa do  $k_{La}$  nestes biorreatores de coluna, de forma a propor um critério físico adequado para o escalonamento destes cultivos.

#### **5.4. Fermentação com *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* a partir de extrato fúngico obtido via consórcio microbiano em CES impregnado com vinhaça bruta.**

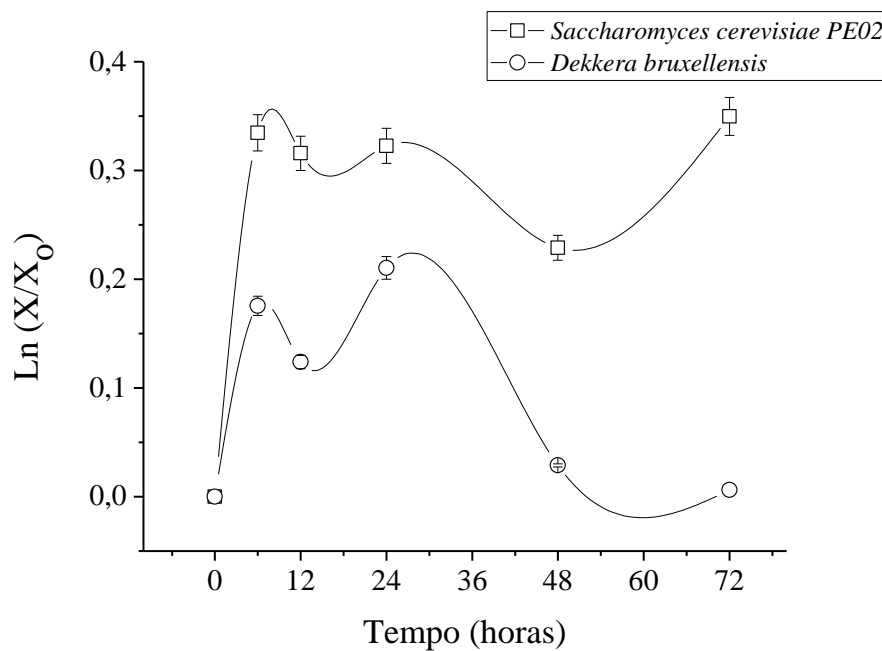
Considerando que a maior presença de glicose residual ocorreu em 24 horas para a condição tendo vinhaça como solução nutriente nos ensaios das colunas menores (aproximadamente  $507 \text{ mg L}^{-1}$  de acordo com a Figura 9), foram conduzidos ensaios de fermentação etanólica a partir deste extrato bruto com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*.

Leveduras do gênero *Dekkera* são citadas como resistentes a mudanças de temperatura e pH, com obtenção de energia mais eficiente em condições limitadas de oxigênio comparadas com *S. cerevisiae*, comprovando serem de grande potencial no desenvolvimento de processos industriais destinados à produção de etanol a partir de fontes renováveis (CECCATO-ANTONINI et al., 2017). Além disso, no sentido de aproveitar o material lignocelulósico para obtenção de etanol, torna-se importante a aplicação de leveduras passíveis de consumo tanto de hexoses como de pentoses. Dessa forma, foram realizados ensaios de fermentação com a levedura *Dekkera bruxellensis*, a fim de aumentar a produção de etanol.

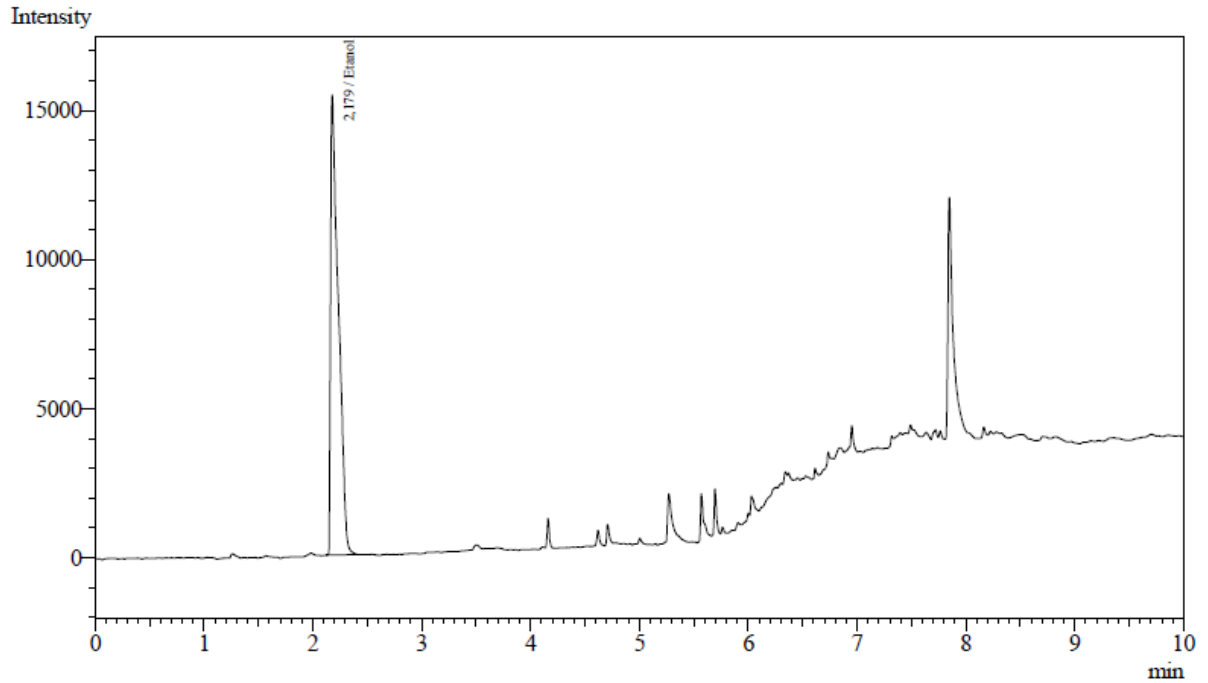
Assim, partindo-se do extrato fúngico obtido via consórcio microbiano com 1 dia de CES impregnado com vinhaça foram propostos ensaios de fermentação etanólica por 72 horas.

A Figura 19 apresenta as curvas de crescimento das leveduras ao decorrer do tempo do experimento. Como é possível observar, o crescimento da *S. cerevisiae* foi superior na condição do extrato obtido via CES de consórcio microbiano impregnado com vinhaça bruta (em torno de  $10^7$  células por mL), obtendo o seu maior rendimento em etanol nos tempos de 6 e 12 horas de fermentação. Nesta condição, podem-se observar que houve uma produção de  $182,01 \text{ mg L}^{-1}$  em 6 horas e  $137,82 \text{ mg L}^{-1}$  em 12 horas conforme os cromatogramas apresentados nas Figuras 20 e 21, para 2 minutos de tempo de detenção. Como o consumo de glicose foi quase total (depleção), o resultado aproximou-se do rendimento estequiométrico em etanol, onde foi alcançando um rendimento máximo de 71% em 6 horas de experimento.

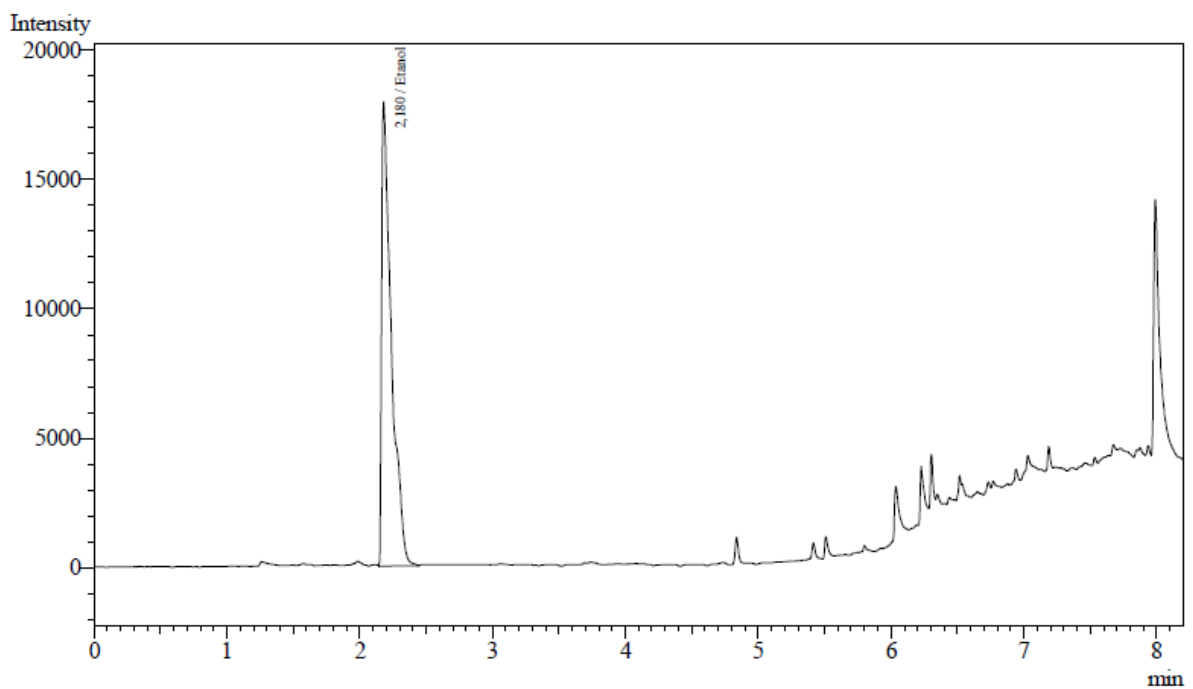
**Figura 19.** Perfis de crescimento celular para *Saccharomyces cerevisiae* PE02 e de *Dekkera bruxellensis* em extrato fúngico do CES de consórcio microbiano impregnado com vinhaça



**Figura 20.** Cromatograma da amostra com 6 horas de fermentação etanólica de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante

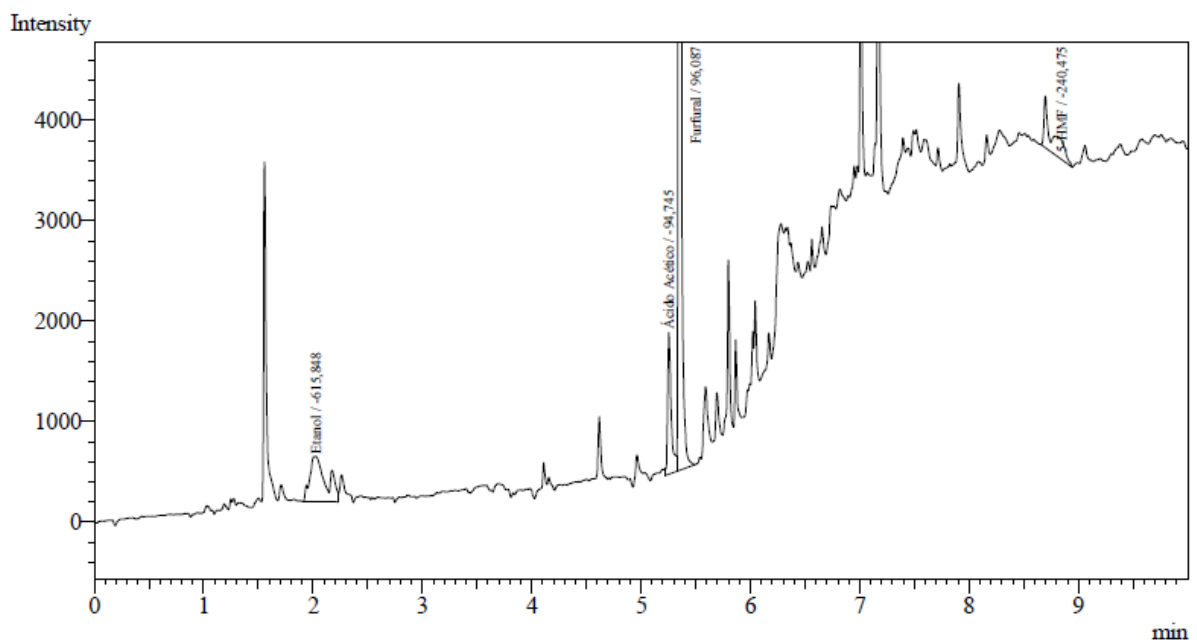


**Figura 21.** Cromatograma da amostra com 12 horas de fermentação etanólica de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante

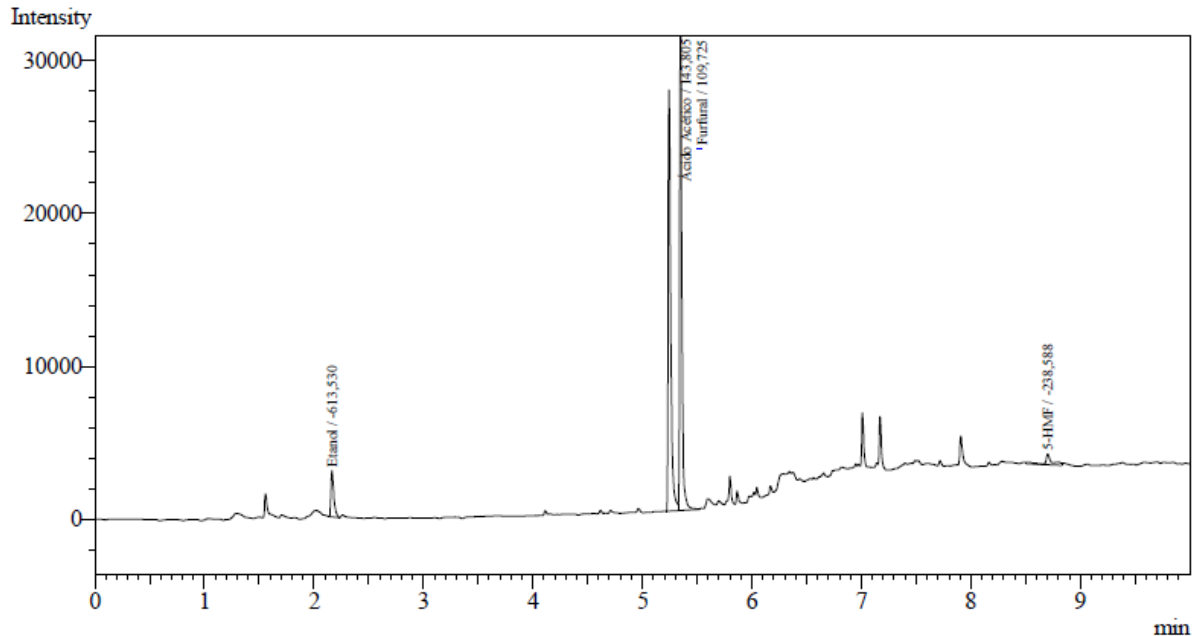


Nos ensaios com *Dekkera bruxellensis* foi verificada a presença de ácido acético, furfural e HMF em 6 e 12 horas (cromatogramas das Figuras 22 e 23), o que pode ter comprometido o desempenho da fermentação, com produção de etanol praticamente desprezível. Isto também pode ter afetado o crescimento, conforme apresentado na Figura 19. De acordo com Bassi (2011), essas leveduras podem desviar o açúcar para a produção de ácidos, os quais podem apresentar um efeito inibidor, afetando a sua viabilidade. Esta condição explicaria a produção de ácido acético já nas primeiras horas de cultivo, conforme apontado em aproximadamente 5 minutos nos cromatogramas. De qualquer forma, esta produção de ácido acético também é dependente das condições de agitação e disponibilidade de oxigênio. Sendo assim, as cepas de *Dekkera* devem ainda ser melhor exploradas visando a produção de etanol em condições industriais de *stress* (GALAFASSI et al., 2010).

**Figura 22.** Cromatograma da amostra com 6 horas de fermentação etanólica com *Dekkera bruxellensis*, a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante



**Figura 23.** Cromatograma da amostra com 12 horas de fermentação etanólica com *Dekkera bruxellensis*, a partir de extrato obtido via CES de consórcio microbiano com vinhaça bruta como solução impregnante



Os resultados das fermentações sugerem que novos experimentos sejam realizados com uma maior quantidade de extrato fúngico nos frascos, ou seja, elevando relação entre volume de meio e volume dos frascos, o que pode minimizar a disponibilidade de oxigênio e potencializar a fermentação. Por outro lado, o uso de vinhaça como solução nutriente nos CES pode ter levado a presença de inibidores no extrato fúngico como furfural e HMF, os quais são produtos da degradação de açúcares. Nesse sentido, apesar do aproveitamento da vinhaça ter sido extremamente promissor para a produção de ácido cítrico por CES, o posterior aproveitamento da glicose residual deve ser visto com cautela por conta da possível presença de compostos inibidores. Desta forma, também será analisado o uso de outros tipos de soluções impregnantes das partículas nos cultivos em estado sólido, substituindo em parte o uso da vinhaça.

Neste contexto, os resultados experimentais demonstram a viabilidade da co-produção de ácido cítrico e etanol a partir de um processo sequencial CES-fermentação a partir de consórcio microbiano e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, foi possível concluir que:

- Nos ensaios exploratórios de CES em 4 dias foram obtidos os maiores rendimentos de glicose em ácido cítrico, produtividade e velocidade específica de produção para as condições tendo vinhaça e vinhaça/etanol como solução nutriente;

- Analisando os perfis de ácido cítrico e glicose por 144 horas, foi possível concluir que os maiores rendimentos, produtividades e velocidades específicas ( $1,88 \text{ mg ácido cítrico mg glicose}^{-1}$ ,  $13,77 \text{ mg ácido cítrico L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e  $29,30 \text{ mg ácido cítrico g}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foram atingidas para a condição tendo apenas vinhaça como solução nutriente, com concentração máxima de ácido cítrico de  $734 \text{ mg L}^{-1}$  em 48 horas;

- Os resultados no ensaio de escalonamento do CES, as maiores concentrações de ácido cítrico ficaram em torno de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  para 100 mm de altura de leito em 24 e 48 horas, período onde ocorre a maior demanda de oxigênio;

- Os perfis axiais de ácido cítrico, glicose, oxigênio e umidade do meio sólido no biorreator de coluna de maiores dimensões indicam sucesso na proposta de escalonamento do CES;

- A fermentação etanólica por *Saccharomyces cerevisiae* a partir do extrato fúngico bruto atingiu rendimento de 71% do máximo estequiométrico, sendo que não houve produção considerável de etanol nas mesmas condições para *Dekkera bruxellensis*;

-Os resultados experimentais demonstram a viabilidade da co-produção de ácido cítrico e etanol via processo sequencial CES-fermentação com consórcio microbiano fúngico (*Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*) e *Saccharomyces cerevisiae* a partir de bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a influência de diferentes proporções dos fungos no inóculo para a produção de ácido cítrico por CES;
- Estimar o coeficiente de transferência de oxigênio e relacioná-lo com a produção de ácido cítrico por CES nas condições experimentais;
- Avaliar a fermentação etanólica do extrato fúngico em diferentes condições.

## 8. REFERÊNCIAS

ALI, S. R., ANWAR, Z., IRSHAD, M., MUKHTAR, S., & WARRAICH, N. T. Bio-synthesis of citric acid from single and co-culture-based fermentation technology using agrowastes. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 57-62, 2016.

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

ANWAR, S., ALI, S., & SARDAR, A. A. Citric acid fermentation of hydrolysed raw starch by *Aspergillus niger* IIB-A6 in stationary culture. **Sindh University Research Journal-SURJ (Science Series)**, v. 41, n. 1, 2009.

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, n. 2, p. 368-377, 2008.

BARRINGTON, S., KIM, J. S., WANG, L., & KIM, J. W. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 2, p. 422-427, 2009.

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, R. G.; MORAIS, D. V., & VOLPI, M. P. C. Influence of solid moisture and bed height on cultivation of *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse with vinasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 377-384, 2015.

BASTOS, R. G.; MOTTA, F. L., & SANTANA, M. H. A. Oxygen transfer in solid-state cultivation under controlled moisture conditions. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 2, p. 708-718, 2014.

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

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

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

CASTILLO, M. R., GUTIERREZ-CORREA, M., LINDEN, J. C., & TENGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. **Biotechnology letters**, v. 16, n. 9, p. 967-972, 1994.

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

CHEN, Y., & NIELSEN, J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current opinion in biotechnology**, v. 37, p. 165-172, 2016.

DA SILVA DELABONA, P., PIROTA, R. D. P. B., 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**, 42, 236–242, 2013.

DE MATTOS, L. F. A., & BASTOS, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 20, p. 9465-9473, 2016.

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

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

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

DHILLON, G. S., BRAR, S. K., VERMA, M., & TYAGI, R. D. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 505-529, 2011.

DIAMANTOPOULOU, P., PAPANIKOLAOU, S., AGGELIS, G., & PHILIPPOUSSIS, A. Adaptation of *Volvariella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. **Food chemistry**, v. 196, p. 272-280, 2016.

DO BONFIM, K. S., DA SILVA, R. K. P., CHAVES, E., DE CARVALHO, L. C. T., DE ARAÚJO, D. A. M., & SANTOS, S. D. M. Comparação da síntese de celulases pelos fungos *Trichoderma reesei* E O FSDE15. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1-7, 2010.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 113-125, 2003.

EL-DEEN, A. M. N.; SHATA, H. M. A. H., & FARID, M. A. F. Improvement of  $\beta$ -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, 2014.

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.

FRANÇA, H.C.R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, 97 p., 2016.

GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GHIDYAL, N.P., & KARANTH, N.G. Estimation of  $K_{La}$  in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Process Biochemistry*. V.30, p.9-15. 1995.

GREWAL, H. S., & KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. ***Biotechnology advances***, v. 13, n. 2, p. 209-234, 1995.

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. Batch and repeated batch cellulase production by mixed cultures of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* or *Aspergillus phoenicis*. ***Journal of Microbiology and Biotechnology Research***, v. 2, n. 6, p. 929-935, 2017.

GUTIERREZ-CORREA, M., & VILLENA, G. K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. ***Rev Peru Biol***, v. 10, n. 2, p. 113-24, 2003.

HAQ, I. U., ALI, S., QADEER, M. A., & IQBAL, J. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. ***Bioresource technology***, v. 86, n. 3, p. 227-233, 2003.

HORN, S.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B., & EIJSINK, V.G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels*, v.45, n.5, p 2-12, 2012.

JAIN, A.; WEI, Y., & TIETJE, A. Biochemical conversion of sugarcane bagasse into bioproducts. ***Biomass and Bioenergy***, v. 93, p. 227-242, 2016.

JAIN, L., & AGRAWAL, D. Performance evaluation of fungal cellulases with dilute acid pretreated sugarcane bagasse: A robust bioprospecting strategy for biofuel enzymes. ***Renewable Energy***, 2017.

JIANLONG, W., & PING, L. Phytate as a stimulator of citric acid production by *Aspergillus niger*. ***Process Biochemistry***, v. 33, n. 3, p. 313-316, 1998.

KHOSRAVI-DARANI, K., & ZOGHI, A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: Experimental design for citric acid production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 6986-6993, 2008.

KUMAR, D., JAIN, V. K., SHANKER, G., & SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1731-1738, 2003.

KUMAR, D., VERMA, R., & BHALLA, T. C. Citric acid production by *Aspergillus niger* van. Tieghem MTCC 281 using waste apple pomace as a substrate. **Journal of food science and technology**, v. 47, n. 4, p. 458-460, 2010.

LEKANDA, J. S., & PÉREZ-CORREA, J. R. Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1793-1802, 2004.

LU, M. Y.; MADDOX, I. S., & BROOKS, J. D. Citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-substrate fermentation. **Bioresource technology**, v. 54, n. 3, p. 235-239, 1995.

LYND, L.R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H., & 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 Microbzology and Bielechnology**, v. 8, p. 183–186, 1992.

MADEJÓN, E., LÓPEZ, R., MURILLO, J. M., & CABRERA, F. Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 84, n. 1, p. 55-65, 2001.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C. F.; 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.

MAZUTTI, M., BENDER, J. P., TREICHEL, H., & DI LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 56-59, 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.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Plano Nacional de Agroenergia 2015-2016**. Secretaria de Produção e Agroenergia. 2ed. revisada. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2016, 110p.

MOHANTY, S. K., BEHERA, S., SWAIN, M. R., & RAY, R. C. Bioethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by solid-state fermentation. **Applied Energy**, v. 86, n. 5, p. 640-644, 2009.

MOTTA, F. L., & SANTANA, M. H. A. Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 2205-2217, 2014.

MOYER, A. J. Effect of Alcohols on the Mycological Production of Citric Acid in Surface and Submerged Culture: I. Nature of the Alcohol Effect. **Applied microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1, 1953.

MUSSATTO, S. I., BALLESTEROS, L. F., MARTINS, S. L. F., & TEIXEIRA, J. A. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. **INTECH Open Access Publisher**, 2012.

NADEEM, A., SYED, Q., BAIG, S., IRFAN, M. & NADEEM, M. Enhanced production of citric acid by *Aspergillus niger* M-101 using lower alcohols. **Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]**, v. 35, n. 1, p. 7-13, 2010.

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  $\beta$ -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.; DE CARVALHO, M. V., & BASTOS, R. G. Cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse with vinasse. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, 2012.

OOSTRA, J., LE COMTE, E. P., VAN DEN HEUVEL, J. C., TRAMPER, J., & RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. **Biotechnology & Bioengineering**, 75, 13-24, 2001.

PAL, A., & KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 19, p. 7563-7569, 2010.

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, 2000.

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

PAPAGIANNI, M. **Morphology and citric acid production of *Aspergillus niger* in submerged culture**. 1995. Tese de Doutorado. PhD Thesis University.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M., & KRISTIANSEN, B. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 2, n. 3, p. 197-205, 1998.

PENSUPA, N.; JIN, M.; KOKOLSKI, M.; ARCHER, D. B., & DU, C. A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw. **Bioresource technology**, v. 149, p. 261–7, dez. 2013.

PEREIRA, G. E.; DE ANDRADE LIMA, T. L., & ROCHA, H. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quim. Nova**, v. 33, n. 5, p. 1186-1189, 2010.

PINTO, P. A., DIAS, A. A., FRAGA, I., MARQUES, G., RODRIGUES, M. A., COLAÇO, J., SAMPAIO, A., & BEZERRA, R. M. Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment. **Bioresource technology**, v. 111, p. 261-267, 2012.

PRADO, F. C., VANDENBERGHE, L. P. S., WOICIECHOWSKI, A. L., RODRIGUES-LEON, J. A., & SOCCOL, C. R. Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 547-555, 2005.

RODRIGUES, C., VANDENBERGHE, L. P., STURM, W., DERGINT, D. E., SPIER, M. R., DE CARVALHO, J. C., & SOCCOL, C. R. Effect of forced aeration on citric acid production by *Aspergillus sp.* mutants in SSF. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 2317-2324, 2013.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E., RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A., DE CARVALHO, J. C., KARP, S. G., STURM, W., PARADA, J. L., & SOCCOL, C. R. Influence of airflow intensity on phytase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, 118, 603–606, 2012.

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. **Engevista**, v. 14, p. 310-321, 2012.

SHARIFUZZAMAN, A. B. M., FARUK, M. O., KADER, M. A., ALAM, J., & BEGUM, R. Improved citric acid production by radiation mutant *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse extract. **Biotechnology**, v. 11, p. 44-9, 2012.

SHOJAOSADATI, S. A., & BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 8, p. 909-914, 2002.

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

SINDHU, R., GNANSOUNOU, E., BINOD, P., & PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products—An overview. **Renewable Energy**, 2016.

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

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

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

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

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

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

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., SOCCOL, C. R., PANDEY, A., & LEBEAULT, J. M. Microbial production of citric acid. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 3, p. 263-276, 1999.

VANDENBERGHE, L. P., SOCCOL, C. R., PANDEY, A., & LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 175-178, 2000.

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

YANG, Y. H., WANG, B. C., WANG, Q. H., XIANG, L. J., & DUAN, C. R. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2004.



YOON, L. W., ANG, T. N., NGOH, G. C., & CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.

ZHANG, H., XU, J., SU, X., BAO, J., WANG, K., & MAO, Z. Citric acid production by recycling its wastewater treated with anaerobic digestion and nanofiltration. **Process Biochemistry**, 58, 245-251, 2017.

## ANEXOS



XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS  
XII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA

3 a 6 de setembro de 2017

Aracaju, Sergipe, Brasil

---

**CITRIC ACID PRODUCTION BY MICROBIAL CONSORTIUM FROM  
SUGARCANE BAGASSE: EFFECT OF ETHANOL AND VINASSE IN  
MOISTURIZING SOLUTION**

**Gabriela C. da Silveira<sup>1</sup>, Mariana C. Castro<sup>1</sup>, Beatriz S. Campanhol<sup>1</sup> and  
Reinaldo G. Bastos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Center of Agricultural Sciences (CCA) – Federal University of São Carlos (UFSCar)

E-mail: reinaldo@cca.ufscar.br

**ABSTRACT**

*Solid-state cultivation (SSC) is characterized by microbial growth on solid supports in the near absence of free-water conditions. Citric acid, an important by-product used in various sectors of the economy, could be obtained from the SSC using sugarcane bagasse, minimizing the cost of its production. 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** in consortium for the citric acid production from sugarcane bagasse with vinasse and ethanol as impregnating solution. The results indicated a maximum production of citric acid around 405 mg L<sup>-1</sup> for 4 days with vinasse, which suggests the stimulating effect of low ethanol contents.*

## 1. INTRODUCTION

Solid-state cultivation (SSC) may be defined as the microbial growth on solid supports in conditions of the absence of free water (Pandey, 2003). 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 (Gutierrez-Correa and Villena, 2003). 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 (Ahamed and Vermette, 2008). 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 products such as citric acid by SSC (Kumar et al. 2003). Citric acid (2-hydroxy-propane-1,2,3-tricarboxylic acid) is a tricarboxylic acid with molar mass of 210.14 g.mol<sup>-1</sup>. Citric acid is the second most produced microbial metabolite in the world, used mainly by the food and pharmaceutical industries (Dhillon et al., 2011). 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 (Khosravi-Darani and Zoghi, 2008; Vandenberghe et al., 2000). The use of alcohols as a stimulant in citric acid production may enhance the yield. This stimulatory effect can be explained in terms of mycelia morphology as well as pellet shape and size (Aftab et al., 2010). Vinasse is the main wastewater from ethanol distillation-fermentation with high organic matter, acid pH and salts, mainly potassium. Citric acid production could be increased by exploiting available resources and adding the stimulatory agents to the solid-state medium. Thus, the main purpose of the present study was to investigate the stimulatory effect of lower alcohols and vinasse on citric acid production by consortium of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse.

## 2. MATERIAL AND METHODS

*Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* were maintained in a PDA medium at 4°C in Center for Agricultural Sciences (CCA), Federal University of São Carlos (UFSCar), according to the methodology proposed by Kumar et al., 2003. Sugarcane bagasse used in the experiments was collected in a sugarcane processing industry located in the region of Araras, SP. Particles were classified through a series of Tyler sieves, those selected were retained in the 14 and 28 mesh, corresponding to average diameter range of 1.17 and 0.59 mm, these were subsequently sterilized in polypropylene bags.

SSC were set up in conventional packed-bed column bioreactor (30 mm diameter and 60 mm bed height), 25°C, consortium of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*, up-flow aeration of 0.2 L min<sup>-1</sup> with water saturated with air by a humidifier and the moisture initial in sugarcane bagasse was sustained 80% (Bastos et al. 2014). Different impregnating solutions of the solid particles were sucrose (1%), sucrose and ethanol as stimulant (3%), sugarcane vinasse, vinasse and ethanol. 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 (2008) and optimized by our research group (Bastos et al. 2015). Glucose content of raw fungal extract was determined by the glucose oxidase-peroxidase (LABORLAB®), citric acid in THERMOFISHER SCIENTIFIC/DIONEX® HPLC, alcohols by GC-2010 Plus SHIMADZU®, carbon and nitrogen content in a TOC -LCPN SHIMADZU®.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1A shows the citric acid production in SSC by consortium of *A. niger* and *T. reesei* from sugarcane bagasse in 4 days (batch-time relative to high productivity according to previous results of our research group). Results indicate higher contents for the conditions having vinasse as impregnating solution, with or without addition of ethanol. Indeed, the sample of vinasse used already contained about  $0.033 \text{ g L}^{-1}$  of ethanol, besides organic matter and inorganic nutrients. According to Aftab et al., 2010, both ethanol and methanol showed stimulatory effect on citric acid production, i.e., lower concentration has stimulatory effect. However increase in concentration of ethanol and methanol tends to decrease its productivity. This might be due to the fact that the higher alcohol concentration in the medium disturbed the fungal metabolism and inoculum morphology, what could resulted in decrease citric acid production.

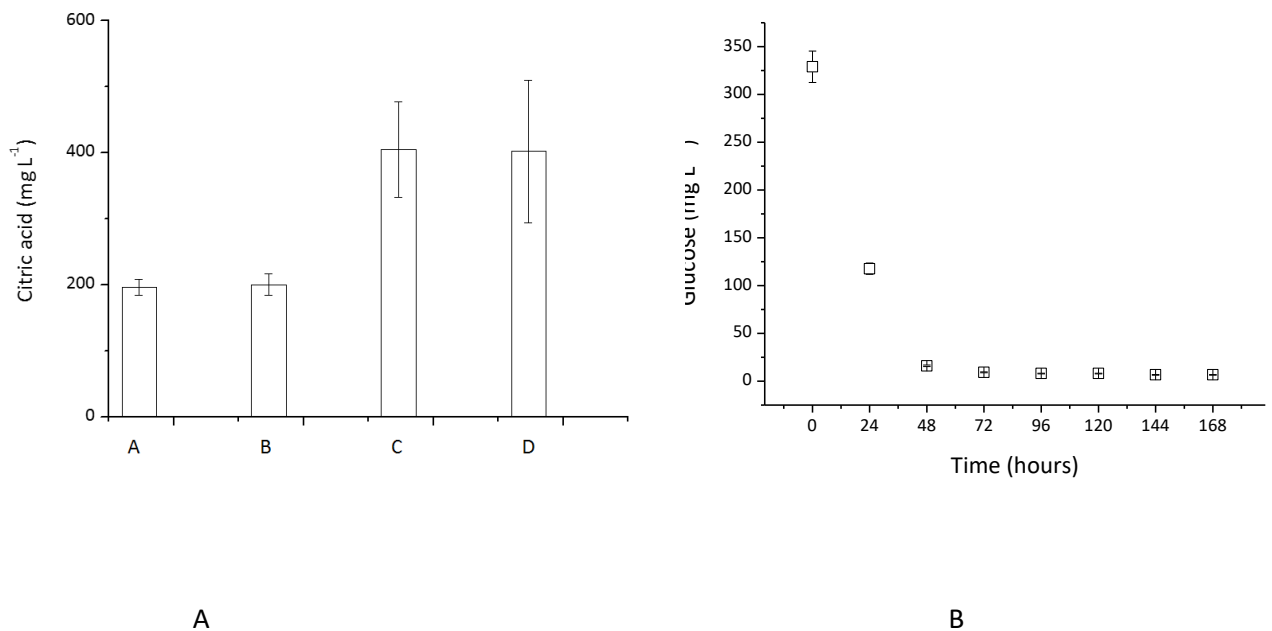


Figure 1. Citric acid for 4-days SSC by consortium *A. niger* and *T. reesei* from sugarcane bagasse in different conditions (A: sucrose, B: sucrose and ethanol, C: vinasse, D: vinasse and ethanol) and glucose profile

Figure 1B presents glucose profile in SSC by consortium *A. niger* and *T. reesei* from sugarcane bagasse with vinasse. This behavior follows a typically exponential curve, which suggests consumption by the fungi basically of the glucose available in the impregnating solution, that is, in the vinasse.

## 4. CONCLUSION

In the experimental conditions, it was possible to conclude that the production of citric acid by the fungal consortium in sugarcane bagasse is implemented with the use of vinasse as impregnating solution, considering the nutrients and the small amount of ethanol contained in this wastewater. Therefore, is feasible the production of citric acid combining the use of two important by-products of the sugarcane processing.

## 5. REFERENCES

- AFTAB, N.; QURATULAIN, S.; SHAHJAHAN, B.; MUHAMMAD, I.; MUHAMMAD, N. Enhanced Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* M-101 Using Lower Alcohols. **Turk. J. Biochem**; 35 (1); 7–13, 2010.
- 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.
- BASTOS, R. G. ; MOTTA, F. L. ; SANTANA, M. H. A . Oxygen Transfer in Solid-State Cultivation Under Controlled Moisture Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 708-718, 2014.
- BASTOS, R.G. ; VOLPI, M.P.C. ; MORAIS, D.V. Influence of solid moisture and bed height 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.
- DHILLON, G. S; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 83–92, abr. 2011.
- GUTIÉRREZ-CORREA, M.; VILLENA, G. K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category Fermentación. v. 10, p. 113–124, 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.
- KUMAR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1731–1738, 2003.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. July 2002, p. 81–84, 2003.
- VANDEBERGHE, L. P.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 175–178, set. 2000.



2950 Niles Road, St. Joseph, MI 49085-9659, USA  
269.429.0300 fax 269.429.3852 hq@asabe.org www.asabe.org

*An ASABE Meeting Presentation*

*DOI: 10.13031/aim.201700161*

*Paper Number: 1700161*

***Sequential process of citric acid production in sugarcane bagasse by microbial consortium and ethanol fermentation from fungal extract***

***Reinaldo G. Bastos; Hiléia C.R.França; Gabriela C. da Silveira; Beatriz S. Campanhol; Mariana C. Castro***

***Center of Agricultural Sciences (CCA) – University of São Carlos (UFSCar), Via Anhanguera, km 174, Araras – São Paulo, Brazil***

**Written for presentation at the  
2017 ASABE Annual International Meeting  
Sponsored by ASABE  
Spokane, Washington  
July 16-19, 2017**

**ABSTRACT.** Solid-state cultivation (SSC) may be defined as the microbial growth on solid supports. This process has been highlight in the chemical, food, pharmaceutical and agricultural with advantages compared to the submerged microbial growth. Citric acid, an important byproduct, can be obtained from the SSC from sugarcane bagasse by *Aspergillus* species, minimizing the cost of its production. *Trichoderma reesei* is a fungus with recognized activity of hydrolytic enzyme, leading to glucose release, which could be use in fermentation processes. Thus, the aim of this research was to evaluate the SSC of *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and consortium both for the citric acid production and glucose release from sugarcane bagasse. After this, evaluated ethanol fermentation by yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 from fungal extract of SSC. The results indicated the citric acid content around 405 mg L<sup>-1</sup> by fungal consortium, with vinasse as nutrient and moistening solution in the particles of sugarcane bagasse. On the other hand, 450 mg L<sup>-1</sup> of glucose in the fungal extract was obtained in 5 days of SSC by *Trichoderma* only. From fermentation this extract, there was a production of 0.22 g L<sup>-1</sup> of ethanol by yeast in 48 hours. Glucose was practically depleted leading the yield in ethanol near the stoichiometric. It can be suggested that there was no inhibitory component in fungal extract influencing the conversion of glucose to ethanol. The proposal SSC - fermentation for citric acid and ethanol production presents advantages when compared to conventional glucose release by acid hydrolysates of lignocellulosic material.

**Keywords.** *Citric acid, ethanol fermentation, microbial consortium, solid-state cultivation, sugarcane bagasse*

## 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 in nature (Pandey 2003). 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 (Gutiérrez-Correa & Villena 2003). 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 (Pandey, Socol & Mitchell, 2000). Phycomycetes (*Mucorand*, *Rhizopus*), ascomycetes (*Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*), basidiomycetes (*Polysporus*) and hyphomycetes (*Dreschlera*) are the most studied classes (Menezes et al, 1995; Hasan et al. 2003).

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 more resistant to contamination by other micro-organisms (Ahamed & Vermette, 2008; Ahmed et al., 2015). Lignocellulolytic microorganisms naturally interact in mixed cultures to degrade cellulose, without competition for nutrients. 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, usually obtained by unique culture of *A. niger* from sugars (Kumar, Jain, Shanker & Sri, 2003; Stoilova, Gargova & Krastanov, 2005).

Used mainly by the food and pharmaceutical industries, citric acid is the second most produced microbial metabolite in the world (Dhillon, Brar, Kaur & Verma, 2013). 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 (Khosravi-Darani & Zoghi, 2008; Vandenberghe, Socol, Pandey & Lebeault, 2000).

"Second generation ethanol" refers to the product obtained from lignocellulosic material, generally from industrial and agricultural by-products such as sugarcane bagasse or grain bran. The main components of the lignocellulosic material are cellulose and hemicellulose, consisting of hard and fibrous structures formed by aromatic alcohols known as lignin. In this sense, the main difficulty of this technique is associated with the degradation of cellulose, the main component of plant biomass. For the conversion of cellulose and hemicellulose of these materials into their constituent sugars, the most studied mechanism is acid hydrolysis. This process can use concentrated or diluted acids and the main products of these hydrolytic chemical reactions are hexoses (glucose, galactose and mannose), pentoses (xylose and arabinose), lignin, acetic acid and methanol in varying proportions depending on the raw material. However, the main problems of acid hydrolysis are related to the formation of fermentation inhibiting components. Glucose and xylose under high pressures and temperatures are converted to 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural, respectively, and, if not removed, can lead to microbial inhibition when the hydrolyzed are used as a culture medium in bioconversions. On the other hand, the enzymatic hydrolysis process presents advantages associated with obtaining superior yields under moderate temperatures. However, operational aspects related to the high process time (48-72h), catalytic deactivations due to inhibition of the enzymatic activity, as well as the high cost of enzymes, have led to uncertainties regarding the economic viability of the enzymatic hydrolysis process in the context of ethanol production from lignocellulosic biomass. Studies highlight a superior efficiency in the degradation of cellulose by consortia of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. This occurs because they have complementary enzymes: while *T. reesei* produces three cellulases and presents low activity of  $\beta$ -glucosidase, *A. niger* has higher  $\beta$ -glucosidase activity and a lower production of the other two

cellulases (Gutierrez-correa & Tengerdy, 1997; Madamwar & Patel, 1992; Pensupa, Jin, Kokolski, Archer & Du, 2013; Yang, Wang, Wang, Xiang, & Duan, 2004).

Brazil is the largest producer of sugarcane in the world with approximately 652 million tons per year, which are mainly destined to the production of sugar and ethanol. The bagasse is the by-product resulting from the extraction of the sugarcane juice, and an each ton of sugarcane produces an average of 280 kg of bagasse. Vinasse is the main wastewater of sugarcane processing, which generated by fermentation-distillation about 10 liter per liter of ethanol.

In this context, it is important to evaluate the viability of the ethanol fermentation of the fungal extract after solid-state cultivation using *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*, as well as its consortium, in sugarcane bagasse impregnated with vinasse. Thus, this research aims the use of by-products of the sugarcane processing for the non-conventional production of two bioproducts in the same platform.

## Material and methods

### Inoculum

The strains of *Trichoderma reesei* were provided by EMBRAPA, Brazil, while *Aspergillus niger* CCT 4355 from Centro de Culturas Tropical, Campinas, Brazil. Both were maintained in a PDA medium at 4°C, according to the methodology proposed by Kumar et al., 2003, and grown in flasks for seven days in a synthetic medium and the spore suspension was characterized in terms of total carbon and nitrogen by TOC-LCPN SHIMADZU®.

### Sugarcane bagasse and vinasse

Sugarcane bagasse and vinasse used in the experiments was collected in a sugarcane processing industry located in the region of Araras, São Paulo, Brazil, being storage in Applied Microbiology Laboratory (LABMAC), Center for Agricultural Sciences (CCA), Federal University of São Carlos (UFSCar), Araras, Brazil. 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 average diameter range of 1.17 and 0.59 mm, these were subsequently sterilized in polypropylene bags.

### Solid state cultivation

SSC were set up in conventional packed-bed column bioreactor (upflow air) with a 30 mm diameter and a 60 mm bed height at 25°C, with an up-flow aeration of 0.2 L min<sup>-1</sup> with water saturated with air by a humidifier (Bastos et al. 2014). In this context, experiments were conducted with a suspension of spores of *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* and consortium of them, with and without the addition of sucrose or vinasse with moistening solution impregnating the particles.

The kinetic process was evaluated during the 7-day by analysis. In the solid medium, the moisture by dry weight was determined gravimetrically. 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 Khosravi-Darani & Zoghi (2008) and optimized by our research group (Bastos, Morais & Volpi, 2015; Bastos, Motta & Santana, 2014). Raw fungal extract obtained from each analysis was evaluated by pH (potentiometry), glucose content (glucose oxidase enzyme method – peroxidase, LABORLAB®), carbon and nitrogen total in a TOC -LCPN SHIMADZU®.

Citric acid was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) - DIONEX® Ultimate 3000 with isocratic pump, Acclaim® OA C-18 analytical column (250 x 4.6 mm, 5µm), injection system with a fixed volume of 5 µL and Data Acquisition System with Chromeleon® software. The method was optimized with flow of 0.7 mL min<sup>-1</sup>, oven temperature 35°C, wavelength 200 nm, with injection volume



of 5  $\mu\text{L}$  and total run time of 13 min. In addition, the mobile phase used was 95% of a blend containing phosphoric acid (0.12%) and acetonitrile (0.1%) in ultrapure water, and in addition, a further 5% grade acetonitrile (Lima et al., 2010).

The maximum of citric acid productivity ( $\text{Prod}_{\text{m\acute{a}x}}$ ) was calculated considering the higher concentration obtained in the SSC batch time. Specific rate of citric acid production ( $\mu_{\text{P}}$ ) was calculated considering the relationship between  $\text{Prod}_{\text{m\acute{a}x}}$  and the amount of biomass, estimated by elemental formula  $\text{CH}_{1.72}\text{O}_{0.55}\text{N}_{0.17}$  for two fungi as reported by Nielsen et al. (2003) and total nitrogen biomass by TOC - LCPN SHIMADZU<sup>®</sup>.

Ethanol fermentative assay was performed in triplicate in 50 mL Erlenmeyers flasks with 10 mL of fungal extract and yeast *S. cerevisiae* PE-02, at 100 rpm and 27°C in the TECNAL<sup>®</sup> TE-420 incubator. For these experiments, pH and glucose were monitored as explained previously. Ethanol produced was determined by SHIMADZU<sup>®</sup> GC-2010 Plus Gas Chromatography (GC) with Stabilwax-DA model column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ).

## Results and discussion

Table 1 presents results of productivities, citric acid specific rates ( $\mu_{\text{P}}$ ) and glucose released in the solid-state cultivation from sugarcane bagasse with *A. niger*, *T. reesei* and fungal consortium. As verified in previous researches, the amount of total carbon and glucose in the fungal extract showed a balance between consumption and production, which complicate the estimation of the yield and analysis of the conversion of these substrates to citric acid. In this way, the parameters that can more reliably are the maximum productivity and specific rate of citric acid formation.

Productivity was higher with unique *A. niger* due to higher microbial growth, leading to lower specific rate ( $\mu_{\text{P}}$ ). Thus, normalizing the effect of the quantity of biomass, the best condition for the production of citric acid (specific rate 2.51  $\text{mg}_{\text{citric acid}} \text{g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) occurs from the fungal consortium.

On the other hand, Table 1 also shows that the condition of greater glucose release by SSC in the fungal extract occurs with the unique growth of *T. reesei*. Results suggests that citric acid production is linked to *A. niger* growth, whereas glucose release (high activity of fungal hydrolases) occurs due to the growth of *T. reesei*.

**Table 1. Productivity and citric acid specific rate for SSC condition**

SSC condition	Productivity ( $\text{mg}_{\text{citric acid}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$\mu_{\text{P}}$ ( $\text{mg}_{\text{citric acid}} \text{g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Glucose released ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<i>A. niger</i>	1.08	1.72	18.07
<i>T. reesei</i>	0.72	2.30	450.00
Fungal consortium	1.18	2.51	144.62

According results of SSC, experiments set up with fungal consortium on sugarcane bagasse and vinasse as a moistening solution, in order to take advantage of two by-products generated in the same industrial platform. The results indicated the citric acid content maximum around 405  $\text{mg L}^{-1}$ , according to HPLC chromatogram shown in Figure 1.

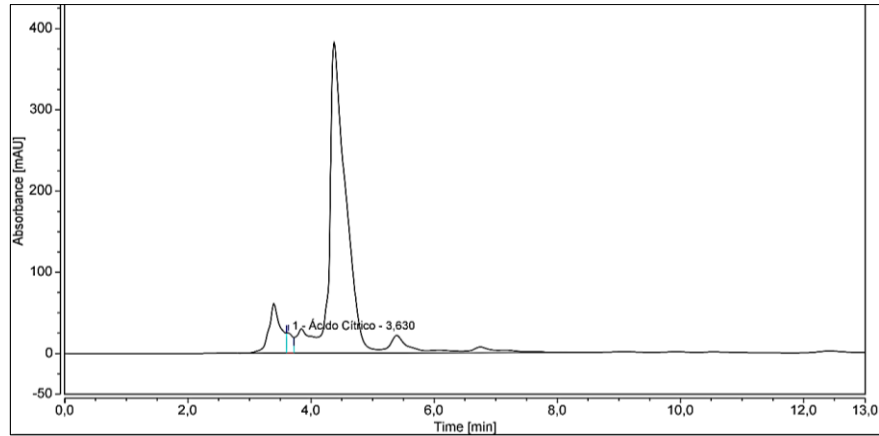


Figure 1. Chromatogram of citric acid obtained from fungal consortium in SSC

In order to study the viability of utilization fungal extract, ethanol fermentation tests with *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 were set up as "proof of concept" of the residual glucose utilization of the fungal extract obtained in different SSC conditions. From fermentation of extract of SSC *T. reesei*, there was a production of 170 and 220 mg L<sup>-1</sup> of ethanol content in 24 and 48 hours, respectively. As the glucose was almost completely consumed (depletion), the result approached the stoichiometric yield in ethanol. Results suggest that, unlike the "second generation ethanol" conventionally obtained via acid hydrolysis of the lignocellulosic material, there was no considerable inhibition of yeast growth. According to Bretahuer & Wyman (2010), potential inhibitors of ethanolic fermentation can be formed and released from hemicellulose, cellulose and lignin from the thermochemical route of hydrolysis, including furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), levulinic acid, acetic acid, formic acid, among others. Thus, it can be concluded that these inhibitors, if present, occur in non-inhibitory concentrations in the fungal extract, once an enzymatic hydrolysis has been set up via SSC. Although the maximum glucose levels do not exceed 500 mg L<sup>-1</sup>, their use may be of interest as this amount can be converted into biotechnological products with high add-value.

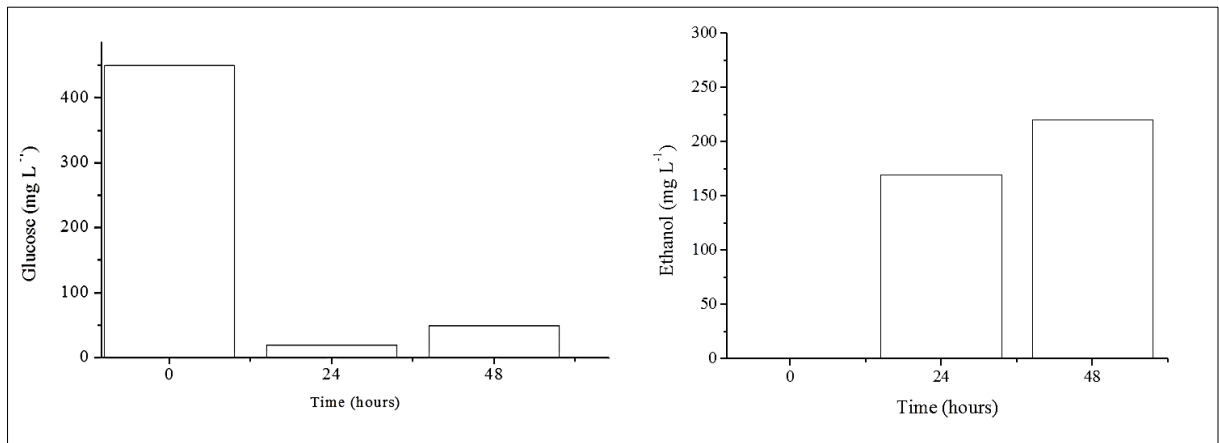


Figure 2. Glucose and ethanol profile during fermentation experiments by *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 from fungal extract (SSC with *T. reesei*)

## Simpósio Microbiologia Aplicada (SMA) 2017 Unesp Rio Claro

### Ethanol fermentation of fungal extract by solid-state cultivation of *Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse

Gabriela Chaves da Silveira<sup>1</sup>; Beatriz Silva Campanhol<sup>1</sup>; Hiléia Camargo Ribeiro França<sup>1</sup>; Reinaldo Gaspar Bastos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

\*reinaldo@cca.ufscar.br

---

#### RESUMO

Solid-state cultivation (SSC) may be defined as the microbial growth on solid supports in conditions of absence of free water, i.e., mainly similar to the occurrence of fungi in nature. In this sense, many lignocellulosic materials are used as solid supports and, which when consumed by the microorganisms, lead to the release of part of the organic carbon generally as glucose which could be recovered in a final extract. *Trichoderma reesei* is a fungus with recognized capacity of hydrolytic enzyme production with glucose release, which could be use in fermentation processes. *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 is a strain of yeast widely used ethanol fermentation from sugarcane broths in Brazil, precisely because of its stability and resistance to industrial conditions. Thus, the aim of this research was to evaluate the “second generation” ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 of fungal extract obtained from SSC of sugarcane bagasse by *Trichoderma reesei*. Fermentative assays were performed in triplicate with 10 mL of fungal extract (culture medium) 100 rpm and 27°C. The glucose consumed was determined by the enzymatic glucose oxidase-peroxidase method, while ethanol produced was determined by gas chromatography. Results indicated 0.22 g L<sup>-1</sup> of ethanol in 48 hours with depletion of glucose, leading near the stoichiometric yield. Thus, it can be suggested that there was no inhibitory component in fungal extract, which indicates advantages of obtaining the “second generation” ethanol when compared to the methods that use acid hydrolysates.

**Palavras-chave:** ethanol fermentation, solid state cultivation, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, sugarcane bagasse

Apoio Financeiro: FAPESP

**EFFECT OF THE NUTRIENT SOLUTION IN THE MICROBIAL  
PRODUCTION OF CITRIC ACID FROM SUGARCANE BAGASSE  
AND VINASSE**

Journal:	<i>Brazilian Journal of Chemical Engineering</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Campanhol, Beatriz; UFSCar, CCA da Silveira, Gabriela; UFSCar, CCA de Castro, Mariana; UFSCar, CCA Bastos, Reinaldo; UFSCar, CCA
Keyword:	solid-state cultivation, sugarcane bagasse, citric acid, microbial consortium

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## Submission Confirmation

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Brazilian Journal of Chemical Engineering

**Manuscript ID**

BJCE-2018-0058

**Title**

EFFECT OF THE NUTRIENT SOLUTION IN THE MICROBIAL PRODUCTION OF CITRIC ACID FROM SUGARCANE BAGASSE AND VINASSE

**Authors**

Campanhol, Beatriz  
da Silveira, Gabriela  
de Castro, Mariana  
Bastos, Reinaldo

**Date Submitted**

08-Feb-2018

## EFFECT OF THE NUTRIENT SOLUTION IN THE MICROBIAL PRODUCTION OF CITRIC ACID FROM SUGARCANE BAGASSE AND VINASSE

**Beatriz S. Campanhol<sup>a</sup>, Gabriela C. da Silveira<sup>a</sup>, Mariana C. Castro<sup>a</sup> e Reinaldo G.  
Bastos<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Center of Agricultural Sciences (CCA) – Federal University of São Carlos (UFSCar)

Via Anhanguera, km 174, 13600-970, Araras - SP, Brazil.

\*Corresponding author: tel.: +55 19 35432584, Fax: +55 19 35432614

Email: reinaldo.bastos@ufscar.br (Reinaldo G. Bastos)

### ABSTRACT

The process known as "solid-state cultivation" (SSC) refers to microbial growth on solid supports under limited water conditions. Citric acid is a bioproduct with several industrial applications, and its production is traditionally microbial. The present work evaluated the production of citric acid by microbial consortium of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* in sugarcane bagasse with vinasse and ethanol as inducer of the metabolic production of this organic acid. The results indicate that the highest yields of glucose in citric acid, productivity and specific production speed for the conditions having vinasse and vinasse/ethanol as nutrient solution. In addition, the kinetic parameters for the citric acid and glucose profiles indicate that only vinasse as a nutrient solution, has a maximum citric acid concentration of 734 mg L<sup>-1</sup> in 48 hours.

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

### Naming Section:

SSC: solid-state cultivation

## INTRODUCTION

Citric acid is a carboxylic acid commonly found in the metabolism of plants, animals and microorganisms (Dhillon et al., 2011). Because it is one of the most important organic acids, it is widely used in the food, beverage, chemical and metallurgical industries (Zhang et al., 2017). The demand of this product in the Brazilian national market has been supply by imports, and, in addition, there is a constant increase of about 4% in citric acid consumption each year, which demonstrates a need to find alternatives for its manufacture (Soccol et al., 2006).

A large number of microorganisms including bacteria, fungi and yeasts has been use for the production of citric acid. The most widely used industrial production process is submerged cultivation from starch or sucrose by fungi, mainly *Aspergillus niger* (Abdullah-al-mahin et al., 2012, Chen and Nielsen, 2016, Dezam et al., 2017). However, in the last decades there has been a growing number of reports on the use of the solid-state cultivation process for the production of citric acid as an alternative to submerged microbial processes (Shojaosadati and Babaeipour, 2002; Kumar et al., 2003; Khosravi- Darani and Zoghi, 2008; Dhillon et al., 2011; Dhillon et al., 2013).

Mixed cultures of microorganisms can complement the metabolic capacities of microorganisms, generating secretion products with more adequate profiles, increasing the bioconversion capacity of substrates (Gutiérrez-Correa and Villena, 2017). In addition, the advantages of using mixed cultures may be more evident in the SSC, since colonization, penetration and degradation of the solid-state substrate. Its tends to be intensified by symbiotic association, where each species may have its own niche for growth and degradation of the substrate due to its own matrix of hydrolytic enzymes, which may act with other synergistically (Gutiérrez-Correa and Tengerdy, 1997).

**Naming Section:** SSC: solid-state cultivation

Solid-state cultivation (SSC) can be define as the growth of microorganisms on solid supports under conditions near to the absence of free water. In general, the solid medium acts as a physical carrier providing nutrients containing water that meets the requirements for microbial growth. Thus, costs with SSC may be lower than submerged processes, even though agro industrial by-products are often used as solid support (Barrington et al., 2009, Thomas et al., 2013).

Brazil is the largest producer of sugarcane in the world, accounting for around 25% of total world production (Sindhu et al., 2016). Sugarcane bagasse is composed basically of 50% of cellulose, 30% of sugars and 2.4% of ash, i.e., presents characteristics of solid support for SSC, being able to serve as a source of carbon and/or nutrient for the generation of a variety of compounds with added value (Mazutti et al., 2006; Mussatto et al., 2012). On the other hand, vinasse is the main wastewater in the sugarcane processing due to the high volume generated and the high organic matter (Navarro et al., 2000; Madejón et al., 2001). For each liter of ethanol produced, more than 10 liters of vinasse can be generated, totaling approximately 300 billion liters per year of this wastewater in Brazil (Mariano et al., 2009; CONAB 2013). Thus, vinasse could be used as a nutrient solution for the SSC by impregnating the sugarcane bagasse particles, minimizing the cost of production and taking advantage of two by-products generated in the same industrial platform.

In this context, the aim of this research was to evaluate the citric acid production by fungal consortium (*Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*) in SSC from sugarcane bagasse with different impregnating solutions.

**Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Inoculum**

*Aspergillus niger* CCT 4355 and *Trichoderma reesei* were kept in standard PDA medium in the Laboratory of Applied Microbiology (Center of Agricultural Sciences CCA/UFSCar, Araras/SP). Previously to each experiment, inocula were grow at least seven days in Erlenmeyer´s Flasks in liquid medium with 20% sucrose, 0.25% ammonium nitrate, 1% potassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0.025% magnesium sulfate and 0.004%. Inoculum preparation followed the procedures according previous studies from research group (Oliveira et al., 2012, Bastos et al., 2015, França, 2016).

### **Sugarcane bagasse and vinasse**

Sugarcane bagasse and vinasse used in the experiments were collected in a sugarcane processing industry located in the Araras/SP. Particle size of the sugarcane bagasse was choose between 0.59 and 1.17 mm of mean diameter with a set of TYLER sieves, with subsequent sterilization in polypropylene bags.

Vinasse used as impregnating solution of the sugarcane bagasse particles was sterilized at 121°C for 20 minutes in autoclave, being characterized in terms of pH by potentiometry, glucose content by enzymatic glucose oxidase-peroxidase with kit LABORLAB®, carbon and total nitrogen in SHIMADZU® TOC-LCPN Analyzer.

### **Naming Section:**

PDA: Agar Potato Dextrose Medium

CCA: Center of Agricultural Sciences

UFSCar: Federal University of São Carlos

SP: São Paulo

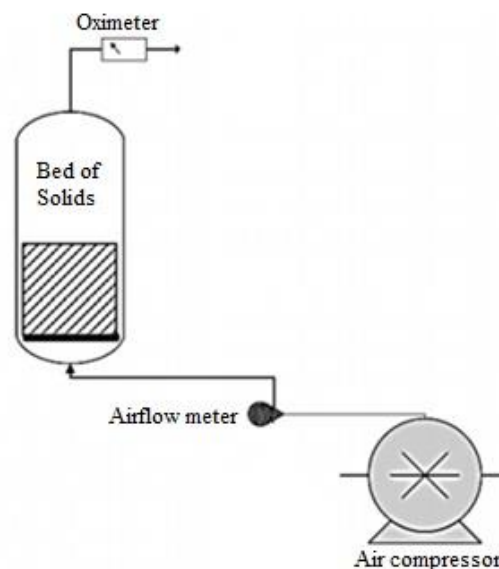


## Solid-State Cultivation (SSC)

### SSC exploratory tests from vinasse and ethanol as impregnating solution of the sugarcane bagasse particles.

SSC were performed in packed-bed columns (Figures 1 and 2) with 30 mm in diameter and 200 mm of bed height, filled to 60 mm with the selected and sterilized particles of sugarcane bagasse (solid support) with initial moisture of 80% (impregnating solution and inoculum suspension). Experiments were set up with continuous airflow and, 30°C. Four different moistening solutions added together with the spore suspension of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* consortium: 1% sucrose (mass/volume), 1% sucrose with ethanol at 4% (mass/volume), only vinasse and vinasse with 4% ethanol. At this step, the samples were incubate for 4 days.

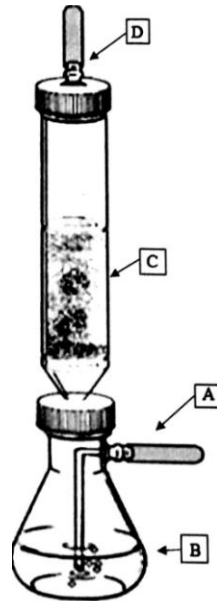
**Figure 1.** SSC scheme with the sugarcane bagasse composing of the packed-bed (adapted from BASTOS et al., 2015).



### Naming Section:

SSC: solid-state cultivation

**Figure 2.** Detail of the one packed-bed column bioreactor used in SSC (adapted from Motta and Santana, 2014). A: air inlet for humidification; B: distilled water for humidification; C: solid packed-bed; D: air outlet of the column.



Solid moisture of the support was determined by dry mass. Fungal extracts were obtained in each treatment with the addition of deionized water in 1:15 ratio (solid-solvent), shaking for 45 minutes at 100 rpm and 28°C, with subsequent addition of acetone, according methodology proposed by Khosravi-Darani & Zoghi (2008) and adapted by Bastos et al. (2015).

Fungal extract was characterized in terms of pH by potentiometry, the glucose content by the enzymatic glucose oxidase - peroxidase (LABORLAB®), citric acid by colorimetric reaction with pyridine and acetic anhydride using commercial kit IN VITRO® and Dionex® Ultimate 3000 HPLC (Pereira et al., 2010) and carbon/nitrogen total by SHIMADZU® TOC-LCPN.

### **Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

Rpm: rotation per minute

pH: [hydrogenionic potential](#)

TOC: total Organic Carbon Analyzer

Maximum productivity in terms of citric acid (Prod) and the specific rates of production ( $\mu_p$ ) were calculated considering the elemental general formula for fungi ( $\text{CH}_{1,72}\text{O}_{0,55}\text{N}_{0,17}$ ) as reported by Nielsen et al. (2003), using the total nitrogen concentration.

Citric acid yield obtained in the SSC ( $Y_{P/S}$ ) tests can be estimated in order to compare with the stoichiometric, i.e., 0.8 mol of carbon produced (citric acid) per mole of carbon of the substrate consumed (Papagianni, 2007).

### **Profiles of citric acid and glucose under the previously selected SSC conditions**

SSC were set up as described in the previous section, but with monitoring every 24 hours for 144 total hours, in order to evaluate both the production of citric acid and the release of glucose in the medium. In these cases, sugarcane bagasse was impregnated with only vinasse and vinasse and ethanol at 4% (mass/volume) and the consortium of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*. The assays were done in triplicate and the extraction of the extract, as well as the monitoring analyzes, were performed according to the previous item during the experimental period.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **SSC exploratory tests from vinasse and ethanol as impregnating solution of the sugarcane bagasse particles**

SSC fixed the batch time in 4 days, pre-selected time by previous researches (França, 2016), using vinasse and ethanol as stimulants of the microbial production of citric acid.

#### **Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

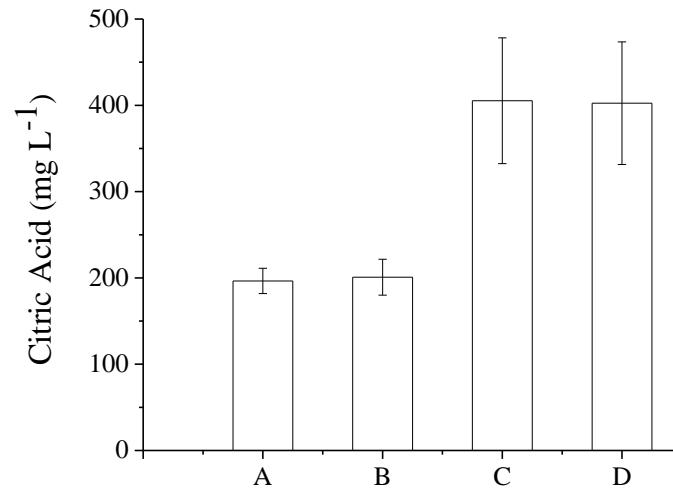
According to Figure 4, it was possible to observe higher citric acid contents using vinasse and vinasse/ethanol as impregnant solution, 405 and 402 mg L<sup>-1</sup>, respectively. As all other conditions were kept constant, the difference in citric acid results was due to impregnating solutions. Pal and Khanum (2010) indicate that nutrient solutions affect performance of SSC. According to Dhillon et al. (2013), ethanol and/or methanol induce the production of citric acid, however, may inhibit sporulation depending of concentration. According to the results, the addition of vinasse and ethanol was more beneficial for citric acid production than inhibitory. It should be noted that the vinasse originally already presents a minimum content of ethanol due to the conduction of alcohol distillation, which may have induced this production. The use of inferior alcohols as a stimulant for the production of organic acids by fungi may be linked to changes in their morphology. Nadeem et al. (2010) obtained slightly higher yields using alcohols as stimulants for the accumulation of citric acid, mainly with methanol. Considering that this alcohol is difficult to handle and with prospects the process escalation, it was suggested the use of ethanol, with reduced cost and abundant in Brazil. Moreover, vinasse presents organic matter mainly in the colloidal form and several salts, which can contribute to the production of citric acid. According to Papagianni (2007), *Aspergillus niger* requires concentrations of various trace metals for the production of citric acid and growth, such as zinc, manganese, iron and copper. Vinasse used in the tests presented a favorable C/N ratio of around 20 (total organic carbon 1036 mg L<sup>-1</sup> and total nitrogen 50.27 mg L<sup>-1</sup>), zinc contents (0.69 mg L<sup>-1</sup>), copper (0.035 mg L<sup>-1</sup>), iron (14.5 mg L<sup>-1</sup>) and manganese (3.11 mg L<sup>-1</sup>). Thus, the composition of the vinasse certainly influenced positively the citric acid production in comparison to the conditions with sucrose, where the productivity was much lower, directing the substrate for cell growth.

**Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

C/N: carbon by nitrogen

**Figure 4.** Citric acid contents in the fungal extract for 4 days of SSC in sugarcane bagasse impregnated with (A) sucrose, (B) sucrose and ethanol, (C) vinasse and (D) vinasse and ethanol

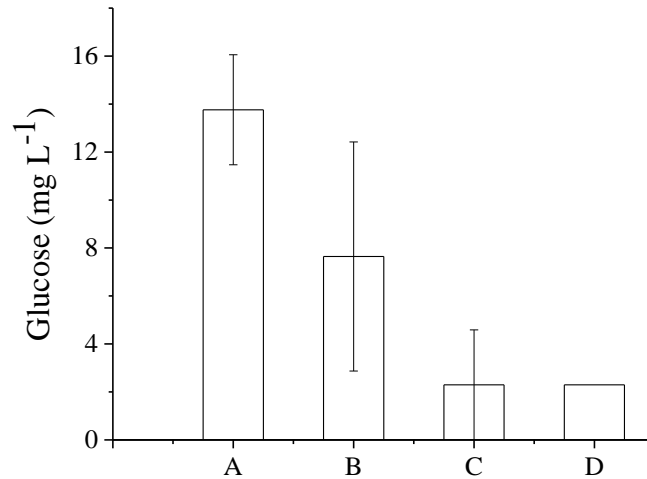


In this sense, Figure 5 shows the residual glucose concentrations during SSC under these conditions. According to the results, for vinasse conditions, there was also the lowest concentration of residual glucose. Part of the organic carbon in the vinasse is available in the form of glucose, resulting from pre-treatment and prior sterilization of the experiments (de Mattos and Bastos, 2016). Therefore, in the case of sucrose, the microbial hydrolysis in the two hexoses must occur for the sequence of the aerobic metabolism via glucose, Krebs Cycle and respiratory chain. According to Angumeenal and Venkappayya (2013), the quality and quantity of carbon sources influence the microbial metabolic activity for citric acid production, with glucose as a principal carbon source.

### **Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

**Figure 5.** Glucose contents in the fungal extract for 4 days of SSC in sugarcane bagasse impregnated with (A) sucrose, (B) sucrose and ethanol, (C) vinasse and (D) vinasse and ethanol



Such results can be discuss from the kinetic data presented in Table 1. The higher yields, productivity and specific citric acid production rates (in terms of biomass) for vinasse conditions indicating the viability of the SSC under these conditions. As the stoichiometric yield in citric acid is reported as 0.8 mol per mole of substrate, this parameter can not be expressed in this in percentual terms, according reported in literature (Papagianni, 2007; Nadeem et al., 2010). In this case, values higher than 100% ( $1.31$  and  $1.29 \text{ mg}_{\text{citric acid}} \text{ mg}_{\text{glucose}}^{-1}$ ), due to glucose release from hydrolysis of the structural polysaccharides, difficult to detect during the process, increasing the amount of total substrate. Thus, instead of the actual amount of glucose converted to citric acid, one has the observed yields in terms of mass.

### **Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

**Table 1.** Observed yields of glucose in citric acid ( $Y_{P/S}$ ), yields ( $P_{rod}$ ) and specific rates of citric acid production ( $\mu_P$ ) for sugarcane bagasse cultures with fungal consortium

Impregnating solution	$Y_{P/S}$ (mg citric acid mg glucose <sup>-1</sup> )	$P_{rod}$ (mg citric acid L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$\mu_P$ (mg citric acid g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Vinasse	1,31	4,22	8,97
Vinasse and ethanol	1,29	4,19	8,91
Sucrose	0,66	2,05	4,36
Sucrose and ethanol	0,67	2,79	5,94

Oliveira et al. (2012), in a pioneering work combining sugarcane bagasse and vinasse, obtained productivities around 1.45 g per gram of solid medium per day in terms of total acids with only *Aspergillus niger*. Kumar et al. (2003) reported yields around 30% of the stoichiometric maximum in 9 days with bagasse impregnated with nutrient solution and addition of methanol. Bastos et al. (2015) evaluated the production of citric acid by *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse and vinasse in packed-bed column with different bed heights. These authors verified higher production in 3 days (1.75 g per 100 g of solid medium), with higher glucose release at 120 mm of bed height. Vandenberghe et al. (2000) reported yields of 88 g of citric acid per kg of dry matter for cassava bagasse, 48.7 g kg<sup>-1</sup> for sugarcane bagasse and 12.7 g kg<sup>-1</sup> using bark coffee. According to Bastos et al. (2014), a production of 27.1 g kg<sup>-1</sup> sugarcane bagasse was obtain at the maximum concentration point of citric acid at 200 mm bed height with aeration of 3 L min<sup>-1</sup>. Anyway, the use of vinasse as a nutrient solution impregnating sugarcane bagasse is promising and interesting since it adds the use of two by-products from sugarcane processing.

SSC studies involving the initial solid moisture selection, fundamental in these microbial growth, neglects the transient regime, i.e., the tendency of variation of this parameter during the time depending. The moisture in the solid medium tends to rise as respiration generates considerable amounts of metabolic water (6 mols of H<sub>2</sub>O for each mole of glucose consumed). Therefore, if the bioreactor cannot disperse this water to the gas phase, there is a water accumulation in the bed, leading to limitations mainly in the oxygen transfer. This water drag in the columns depends of the air-flow, gas humidity and bed height.astos et al. (2015) maintained the solid moisture almost constant from the selection of bed height and air flow. This maintains the original characteristics of the SSC, i.e., conditions close to the absence of free water, without non-limiting oxygen effects or considerable variation in the porosity or thickness of the liquid film deposited on the surface of the particles. Kumar et al. (2003) report maximum sugars consumption by *Aspergillus niger* at SSC from fruit residues at a moisture content of 70%. Above this level, both the production of citric acid and the consumption of sugars decrease, which could be explain by the authors due to the reduction of the porosity of the bed of particles, with consequent limitation of the transfer of heat and mass.

According to Lekanda and Pérez-Correa (2004), the water balance can reach the permanent regime when the rate of metabolic water generation is equivalent to the consumption of solid support, with loss of mass.

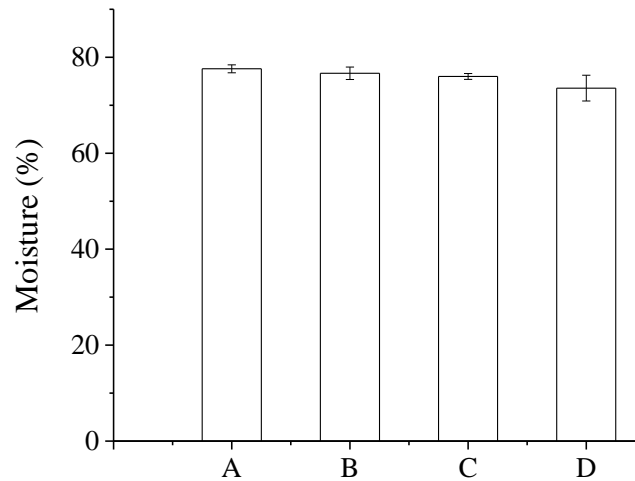
The results presented in Figure 6 indicate that, for all conditions, solid moisture remained at 4 days discreetly below the initial value of 80%, suggesting adequate conditions of oxygen transfer and water balance for SSC conditions.

**Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation



**Figure 6.** Profiles solid moisture for 4 days-SSC in sugarcane bagasse impregnated with: (A) sucrose, (B) sucrose and ethanol, (C) vinasse and (D) vinasse and ethanol



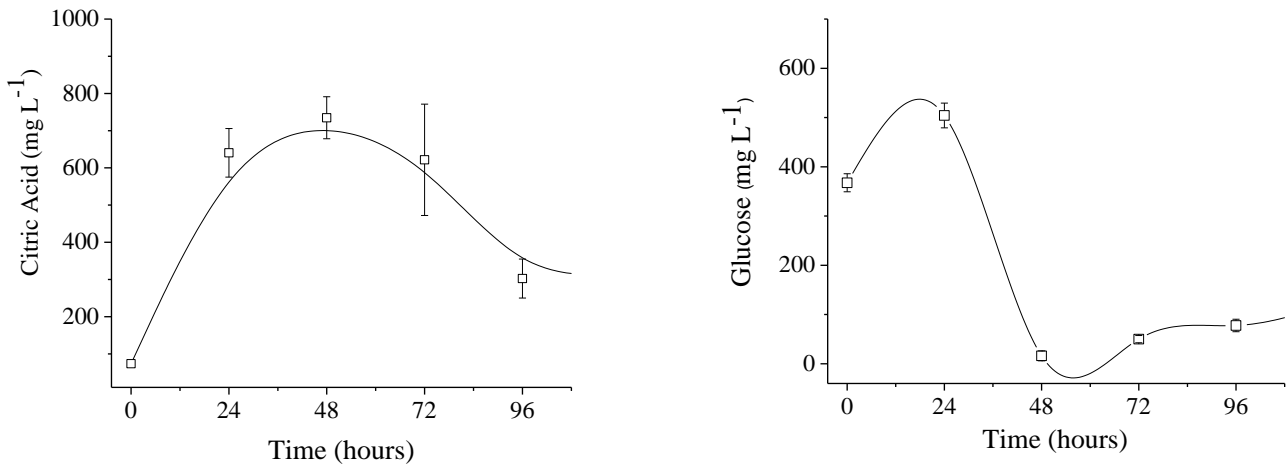
#### **Profiles of citric acid and glucose under the previously selected SSC conditions**

Considering the data from Table 1, vinasse and vinasse/ethanol as nutrient solution showed the best results of yield and productivity. Thus, the Figure 7 shows the citric acid and glucose profile using only vinasse as an impregnate solution. Citric acid production presented a satisfactory level in the first 72 hours of SSC, with maximum in 48 hours (734.52 mg L<sup>-1</sup>). Glucose profiles indicate an increase in glucose content, followed by a considerable consumption phase up to 48 hours, which corresponds to the period of greatest production of citric acid.

#### **Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

**Figure 7.** Profiles of citric acid in the fungal extract for SSC in sugarcane bagasse impregnated with vinasse



As discussed in section 5.1, the maintenance of humidity for 144 hours of SSC demonstrates a physical stability of the particle bed, without major limitations of heat transfer and mass.

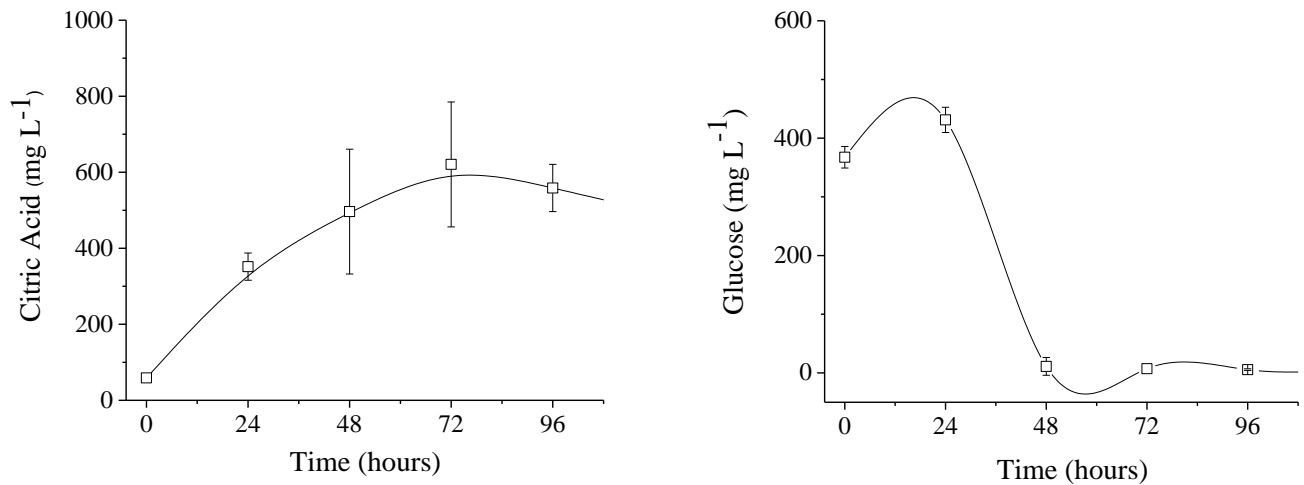
As was the case for the previous tests, the solid medium moisture remained practically constant, indicating a physical stability of the particle bed and non-limiting oxygen and heat transfer.

According to Haq et al. (2003), the use of lower alcohols, such as ethanol and/or methanol tends to increase the yield of citric acid due to changes in the permeability of the cell membrane. Figure 8 present the highest amount of citric acid occurred in 72 hours of SSC, (about 620 mg L<sup>-1</sup>), using vinasse and ethanol as impregnating solution of the sugarcane bagasse particles.

### **Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

**Figure 8.** Citric acid and glucose profiles in the fungal extract for SSC in sugarcane bagasse impregnated with vinasse and ethanol



Glucose profiles indicate a higher consumption of glucose by the microorganisms in 72 hours of SSC, concomitant to the greater production of citric acid. However, after this time, glucose levels remained lower, maintaining a steady state. According to Oliveira et al. (2012), this is common for SSC where the solid support contains the carbon source, since there is glucose consumption and release via enzymatic hydrolysis of the lignocellulosic structure by fungi.

Table 2 summarizes the results in terms of the kinetic parameters. Results indicate that the selection of the batch time is fundamental for these cultures, since the maximum values obtained in the ideal time were higher than those found in Table 1, i.e., yield ( $1.88 \text{ mg citric acid mg glucose}^{-1}$ ), productivity ( $13.77 \text{ mg citric acid L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and specific rate of citric acid production ( $29.3 \text{ mg citric acid gbiomassa}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) with only vinasse as a nutrient solution.

### **Naming Section:**

SSC: solid-state cultivation

**Table 2.** Maximum observed yields of glucose in citric acid ( $Y_{P/S}$ ), maximum yields ( $Prod_{max}$ ) at the respective times and specific rates of citric acid production ( $\mu_P$ ) for sugarcane bagasse cultivations fungal consortium with vinasse and vinasse/ethanol in 144 hours

Impregnating solution	$Y_{P/S} \text{ máx}$ (mg citric acid mg glucose <sup>-1</sup> )	$P_{rod} \text{ máx}$ (mg citric acid L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$\mu_P$ (mg citric acid g biomassa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Vinasse	1.88	13.77	29.30
Vinasse and ethanol	1.56	7.79	16.58

The yield in terms of mass of citric acid produced by mass of glucose consumed is higher than the results presented in the literature. Kumar et al. (2003) working with *Aspergillus niger* DS 1 from sugarcane bagasse and sucrose and molasses based medium obtained in optimized conditions (73% initial moisture, 4% methanol as inductor in particles of 1,2 to 1.6 mm and 31.8 grams of sugar per 100 grams of solid medium) yields at around 0.7 g g<sup>-1</sup> at 9 days. As already mentioned, yields greater than 1 g g<sup>-1</sup> indicate that not only the carbon source of the nutrient solution is used, but also the structural polysaccharides of the solid medium. The results of maximum productivity are lower than the data presented by Nadeem et al. (2010) (256 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). However, it should be noted that these authors used *Aspergillus niger* M-101 and methanol as an inducer in concentrations of 0.5 to 2% (volume by volume) in stirred flasks with an optimum medium based on beet molasses. On the other hand, the specific production rate is higher than that reported by these authors (6 mg g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), which indicates an adequate adaptation of the inoculum to the solid medium containing sugarcane bagasse and vinasse, i.e., the higher yield of citric acid is obtained by biomass. In this context, the results in Table 2 are important and promising, even as it is a biotechnological production from two agro industrial by-products.

## CONCLUSIONS

According experimental results, it is possible to conclude that the use of vinasse and ethanol as impregnating solution of the sugarcane bagasse particles is efficient for the production of citric acid, with ideal batch time to obtain higher production for solid-state cultivation with consortium of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*.

## LIST OF SYMBOLS AND UNITS

%: percent

g kg<sup>-1</sup>: gram per kilogram

L min<sup>-1</sup>: liters per minute

mg L<sup>-1</sup>: milligram per liter

mm: millimeters

°C: Celsius degrees

Prod<sub>max</sub>: maximum productivity (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>: milligram per liter per hour)

Y<sub>P/S</sub>: yield of product per substrate (mg mg<sup>-1</sup>: milligram per milligram)

μ<sub>P</sub>: specific reaction rate (mg g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>: milligram per gram per hour)

## REFERÊNCIAS

Angumeenal, A. R. and Venkappayya, D., An overview of citric acid production. *LWT-Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 367-370 (2013).

Barrington, S., Kim, J. S., Wang, L. and Kim, J. W., Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 26, n. 2, p. 422-427 (2009).

Bastos, R. G., Morais, D. V. and Volpi, M. P. C., Influence of solid moisture and bed height on cultivation of *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse with vinasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 32, n. 2, p. 377-384 (2015).

Bastos, R. G., Motta, F. L. and Santana, M. H., A. Oxygen transfer in solid-state cultivation under controlled moisture conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 174, n. 2, p. 708-718 (2014).

Brasil, Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar. Segundo levantamento, 18p. Brasília (2013).

Chen, Y. and Nielsen, J., Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 37, p. 165-172 (2016).

De Mattos, L. F. A. and Bastos, R. G., COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. *Desalination and Water Treatment*, v. 57, n. 20, p. 9465-9473 (2016).

Dezam, A. P. G., Vasconcellos, V. M., Lacava, P. T. and Farinas, C. S., Microbial production of organic acids by endophytic fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p. 282-287 (2017).

Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S. and Verma, M., Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Industrial Crops and Products*, v. 41, p. 78-84 (2013).

Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M. and Tyagi, R. D., Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, n. 4, p. 505-529 (2011).

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Aggelis, G. and Philippoussis, A., Adaptation of *Volvarella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. *Food chemistry*, v. 196, p. 272-280 (2016).

França, H.C.R., Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, 97 p. (2016).

Gutierrez-Correa, M. and Tengerdy, 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, Marcel and Villena, Gretty K., Batch and repeated batch cellulase production by mixed cultures of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* or *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, v. 2, n. 6, p. 929-935 (2017).

Haq, I. U., Ali, S., Qadeer, M. A. and Iqbal, J., Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* GCB-47. *Bioresource technology*, v. 86, n. 3, p. 227-233 (2003).

Khosravi-darani, K. and Zoghi, A., Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: Experimental design for citric acid production. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 15, p. 6986-6993 (2008).

Kumar, D., Jain, V. K., Shanker, G. and Srivastava, A., Citric acid production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 12, p. 1731-1738 (2003).

Lekanda, J. S. and Pérez-Correa, J. R., Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 11, p. 1793-1802 (2004).

Madejón, E., López, R., Murillo, J. M. and Cabrera, F., Agricultural use of three (sugar-beet) vinasse composts: effect on crops and chemical properties of a Cambisol soil in the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 84, n. 1, p. 55-65 (2001).

Mazutti, M., Bender, J. P., Treichel, H. and Di Luccio, M., Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 1, p. 56-59 (2006).

Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S. L. F. and Teixeira, J. A., Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. *Industrial Waste*. INTECH Open Access Publisher (2012).

Nadeem, A., Syed, Q., Baig, S., Irfan, M. and Nadeem, M., Enhanced production of citric acid by *Aspergillus niger* M-101 using lower alcohols. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, v. 35, n. 1, p. 7-13 (2010).

Oliveira, A. F., De Carvalho, M. V. and Bastos, R. G., Cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse with vinasse. *Bioscience Journal*, v. 28, n. 6 (2012).

Pal, A. and Khanum, F., Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. *Bioresource technology*, v. 101, n. 19, p. 7563-7569 (2010).

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

Pereira, G. E., De Andrade Lima, T. L. and Rocha, H., Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova*, v. 33, n. 5, p. 1186-1189 (2010).

Sharifuzzaman, A. B. M., Faruk, M. O., Kader, M. A., Alam, J., and Begum, R., Improved citric acid production by radiation mutant *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse extract. *Biotechnology*, v. 11, n.1, p. 44-9 (2012).

Shojaosadati, S. A. and Babaeipour, V., Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 8, p. 909-914 (2002).

Sindhu, R., Gnansounou, E., Binod, P. and Pandey, A., Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products—An overview. *Renewable Energy*, v. 98 (2016).

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C. and Pandey, A., New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology & Biotechnology*, v. 44, n. 2 (2006).

Thomas, L., Larroche, C. and Pandey, A., Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146-161 (2013).

Vandenberghe, L. P., Soccol, C. R., Pandey, A. and Lebeault, J. M., Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 2, p. 175-178 (2000).

Zhang, H., Xu, J., Su, X., Bao, J., Wang, K. and Mao, Z., Citric acid production by recycling its wastewater treated with anaerobic digestion and nanofiltration. *Process Biochemistry*, v. 58, p. 245-251 (2017).