



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Trabalho de conclusão de curso

Marcelo Eduardo Antunes

**OBTENÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR
DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA CASCA DE CAFÉ POR
ASPERGILLUS NIGER, *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE* E *RHIZOPUS SSP* EM
BIORREATOR**

Ouro Branco/MG

Dezembro/2017

MARCELO EDUARDO ANTUNES

**OBTENÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR
DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA CASCA DE CAFÉ POR
ASPERGILLUS NIGER, *ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE* E *RHIZOPUS SSP* EM
BIORREATOR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Dr. Boutros Sarrouh

Ouro Branco/MG

Dezembro/2017

RESUMO

O Brasil é o maior produtor de café do mundo, contribuindo para a geração de resíduos agroindustriais. A casca de café é um componente muito utilizado em adubos orgânicos e na queima para geração de energia. A busca por matérias-primas alternativas para obtenção de produtos de alto valor agregado e menor custo de produção tem-se destacado nos processos industriais. O ácido cítrico, um dos principais ácidos orgânicos produzidos por via microbiana através de processos fermentativos, é um produto muito utilizado por diversas indústrias, tanto na área farmacêutica quanto na alimentícia. Assim, considerando a disponibilidade da matéria-prima e a viabilidade do processo fermentativo, o presente trabalho tem como objetivo a produção de ácido cítrico através da fermentação submersa, utilizando como meio fermentativo, o hidrolisado hemicelulósico da casca de café. Foram testadas três espécies de fungo, sendo elas o *Aspergillus niger sp*, o *Aspergillus westerdijkiae* e o *Rhizopus ssp*. Para a realização do experimento, foi montado um biorreator de bancada, com agitação e temperatura (30°C) constantes. As amostras de fermentação foram coletadas e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação do ácido cítrico através da metodologia de Saffran e Denstedt (1948) e para quantificação de açúcares redutores conforme GUOSE (1987), o pellet foi utilizado para contagem celular. No presente trabalho, pode-se concluir que as três espécies se adaptaram bem ao meio fermentativo, tendo a produção de ácido cítrico ocorrendo em intervalos de horas diferentes para cada espécie. A produção máxima do ácido pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae*, no período de 96 horas de fermentação, alcançou uma produção de ácido cítrico 10% maior que o obtido pelo fungo *Rhizopus sp.*, obtendo assim o melhor rendimento.

Palavras-chave: Fermentação, Casca de café, Ácido cítrico, *Aspergillus niger*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Rhizopus ssp*, Biorreator.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer of coffee in the world, contributing to the generation of agro-industrial waste. The coffee husk is a widely used component in organic fertilizers and in burning for power generation. The search for alternative raw materials to obtain products with high added value and lower cost of production has been highlighted in industrial processes. Citric acid, one of the main organic acids produced by microbial via fermentative processes, is a product widely used by several industries, both in the pharmaceutical and food sectors. Thus, considering the availability of the raw material and the viability of the fermentation process, the present work has the objective of producing citric acid through the submerged fermentation, using the hemicellulose hydrolyzate medium of the coffee husk. Three fungal species were tested, including *Aspergillus niger* sp., *Aspergillus westerdijkiae* and *Rhizopus* ssp. For the accomplishment of the experiment, a bench bioreactor was set up, with constant agitation and temperature (30°C). The fermentation samples were collected and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The supernatant was used for the quantification of citric acid by Saffran and Denstedt (1948) and for quantification of reducing sugars according to GUOSE (1987), and the pellet was used for cell counting. In the present work, it can be concluded that the three species adapted to the fermentation medium, with the production of citric acid occurring at different time intervals for each species. The maximum production of acid by the fungus *Aspergillus westerdijkiae*, during the 96-hour period fermentation, achieved to 10% higher citric acid production than that obtained by the fungus *Rhizopus* ssp., thus obtaining the best yield.

Keywords: Fermentation, Coffee husk, Citric acid, *Aspergillus niger*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Rhizopus* ssp, Bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição da biomassa lignocelulósica (BETANCUR, 2010).	4
Figura 2: Estrutura da celulose, formada por monômeros de glicose (FERREIRA, 2014).	4
Figura 3: Representação esquemática da hemicelulose (SANTOS et al., 2012).	5
Figura 4: Estrutura da lignina (SIQUEIRA, 2015).	6
Figura 5: Estrutura do <i>Aspergillus niger</i> (INSPQ, 2016).	7
Figura 6: Estrutura do <i>Rhizopus</i> ssp.	8
Figura 7: Estrutura do <i>Aspergillus westerdijkiae</i> (FRISVAT J. C. et al. 2004).	9
Figura 8: Esquematização do biorreator utilizado.	13
Figura 9: Soluções de glicose antes (a) e depois (b) do aquecimento.	14
Figura 10: Curva padrão da solução de glicose.	14
Figura 11: Soluções de ácido cítrico antes (a) e depois (b) da adição de piridina e aquecimento.	15
Figura 12: Curva padrão da solução de ácido cítrico.	16
Figura 13: Concentração (g.L^{-1}) de açúcar redutor pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> sp. ao longo do processo fermentativo.	18
Figura 14: Crescimento celular (N° Células. mL^{-1}) pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> sp. em função do tempo.	18
Figura 15: Concentração (g.L^{-1}) de ácido cítrico pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> sp. ao longo do processo fermentativo.	18
Figura 16: Relação entre as concentrações (g.L^{-1}) do consumo de substrato e produção do ácido cítrico pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> sp. ao longo do processo fermentativo. .	19
Figura 17: Concentração (g.L^{-1}) de açúcar redutor pelo fungo <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ao longo do processo fermentativo.	20
Figura 18: Crescimento celular (N° Células. mL^{-1}) pelo fungo <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ao longo do processo fermentativo.	21
Figura 19: Concentração (g.L^{-1}) de ácido cítrico pelo fungo <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ao longo do processo fermentativo.	21
Figura 20: Relação entre as concentrações (g.L^{-1}) do consumo de substrato e produção do ácido cítrico pelo fungo <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ao longo do processo fermentativo.	21

Figura 21: Concentração (g.L^{-1}) de açúcar redutor pelo fungo <i>Rhizopus ssp</i> ao longo do processo fermentativo.....	23
Figura 22: Crescimento celular (N° Células. mL^{-1}) pelo fungo <i>Rhizopus ssp</i> ao longo do processo fermentativo.....	23
Figura 23: Concentração (g.L^{-1}) de ácido cítrico pelo fungo <i>Rhizopus ssp.</i> ao longo do processo fermentativo.....	24
Figura 24: Relação entre as concentrações (g.L^{-1}) do consumo de substrato e produção do ácido cítrico pelo fungo <i>Rhizopus ssp</i> ao longo do processo fermentativo.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da casca de café segundo diferentes autores.....	3
Tabela 2: Concentrações (g.L^{-1}) para substrato, produto e microrganismo (N° Células. mL^{-1}).....	17
Tabela 3: Concentrações (g.L^{-1}) para substrato, produto e microrganismo (N° Células. mL^{-1}).....	20
Tabela 4: Concentrações (g.L^{-1}) para substrato, produto e microrganismo (N° Células. mL^{-1}).....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3.1. Casca de Café.....	2
3.2. Biomassa Lignocelulósica	3
3.2.1. Celulose.....	4
3.2.3. Lignina	5
3.2.4. Hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos	6
3.3. <i>Aspergillus niger</i> sp.	7
3.4. <i>Rhizopus</i> ssp.....	8
3.5. <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	9
3.5. Ácido cítrico	10
3.6. Biorreator	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1. Matéria – prima.....	11
4.2. Obtenção do hidrolisado da casca de café	11
4.3. Tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café	11
4.4. Microrganismos	12
4.5. Preparo do meio de fermentação	12
4.6. Biorreator	12
4.7. Quantificação dos Açúcares Redutores pela Técnica DNS	13
4.8. Produção do Ácido Cítrico	15
4.9. Contagem de Células na Câmara de Neubauer.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1. <i>Aspergillus niger</i> sp	17
5.2. <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	20
5.3. <i>Rhizophus</i> ssp.....	22
6. CONCLUSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um composto utilizado por diversas indústrias como a alimentícia, farmacêutica e de bebidas. Ele é utilizado como acidulante, no melhoramento de sabor dos alimentos, além de sua capacidade de sintetizar polímeros. Também é utilizado como detergente, cosmético, produtos de higiene e na agricultura para biorremediação de metais pesados no solo (COSTA, 2011). A obtenção de ácido cítrico por processos fermentativos, em especial a fermentação submersa, tornou-se viável devido à utilização de materiais de baixo custo, como resíduos industriais (SANTOS, 2005), além da capacidade de diversos microrganismos, como o *Aspergillus sp.*, sintetizá-lo devido as suas capacidades de degradarem os materiais lignocelulósicos presentes em diversos resíduos.

A busca por matérias-primas alternativas tem se tornado de grande interesse mundial para a obtenção de produtos de alto valor agregado, redução de custo de produção e a crescente preocupação com a poluição ambiental (ANASTÁCIO, 2009). Os resíduos industriais têm sido cada vez mais utilizados como fontes de matéria-prima, uma vez que muitos desses resíduos são constituídos de materiais lignocelulósicos. Em destaque, tem-se os resíduos agrícolas gerados durante o processamento do café e que têm sido pouco utilizados para outras finalidades, além do uso como adubo orgânico.

Estes materiais lignocelulósicos constituem um recurso renovável e são utilizados para a obtenção de energia e na fermentação como fonte de açúcares para a conversão em produtos de interesse industrial. Porém, a natureza polissacarídica desses materiais dificulta a assimilação direta por microrganismos, sendo necessário realizar a hidrólise dos seus componentes nos respectivos monômeros para facilitar a fermentação e dessa forma, obter produtos de interesse comercial (SANTOS, 2005). Em razão da toxicidade desses hidrolisados, vários métodos de tratamento são empregados para que sejam utilizados como meio de cultivo.

Considerando a disponibilidade de matéria-prima renovável e a viabilidade de processos fermentativos, o presente trabalho teve como objetivo utilizar resíduos agrícolas, como o hidrolisado hemicelulósico da casca de café, como meio de cultivo para fermentação submersa pelos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Rhizopus ssp* a fim de avaliar a produção de ácido cítrico, o consumo de substrato e o crescimento celular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o hidrolisado hemicelulósico ácido da casca de café, como meio alternativo para a produção de ácido cítrico a partir da fermentação submersa em biorreator pelos fungos *Aspergillus niger sp.*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Rhizopus ssp.*

2.2. Objetivos específicos

- Pré-tratamento com ácido diluído da casca de café;
- Determinação dos teores dos açúcares totais;
- Determinação dos teores de ácido cítrico.
- Montar um sistema de cultivo submerso em um biorreator contendo hidrolisado hemicelulósico da casca de café.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Casca de Café

A cafeicultura no Brasil dá origem a diversos subprodutos a partir de um volume elevado de resíduos. O Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo Minas Gerais como o estado com maior produção brasileira (SILVA, 2012). A casca de café, advinda da limpeza do café em coco, é composta por epicarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (pergaminho). A diferença entre esses componentes, é que a casca é obtida seca e contém o endocarpo, já o mesocarpo (polpa) é úmido e não possui o endocarpo, visto que este é um componente fibroso que fica envolto a casca de café (VERGOIL, 1993).

A utilização da casca de café pode ser empregada em diversos produtos, como na produção de combustível, pois possui poder calorífico em torno de 3.500 Kcal/Kg, oferecendo grande autonomia energética, baixos teores de cinza e umidade. Além disso, pode ser utilizada como adubo orgânico e serve como complemento em misturas com outras plantas forrageiras para rações animais (VERGOIL, 1993).

A estimativa do IBGE para a produção cafeeira no Brasil para 2017 é de 46,4 milhões de sacas de 60 Kg, tendo um aumento de 1,7% em relação a 2016 (IBGE, 2017). Este dado sugere que com o aumento da produção de café, acarretará no aumento

da produção de resíduos, pois através das propriedades químicas em sua composição, o resíduo gerado da produção do café se torna um grande componente de fonte energética (IBGE, 2017).

Tabela 1: Composição química da casca de café segundo diferentes autores

Componente	% peso seco	Autores
Matéria seca	88,4	Barcelos A. F. (2001)
Celulose	37,3	Barcelos A. F. (2001)
Hemicelulose	25,0	Barcelos A. F. (2001)
Lignina	12,4	Souza <i>et al.</i> , (2001)
Carboidratos	57,8	Soccol (2002)
Proteínas	9,2	Soccol (2002)
Lipídeos	2,0	Soccol (2002)
Cafeína	1,3	Soccol (2002)
Taninos	4,5	Soccol (2002)
Pectinas	12,4	Soccol (2002)
Cinzas	7,4	Souza <i>et al.</i> , (2001)

Fonte: DURSO (2015).

3.2. Biomassa Lignocelulósica

Biomassa compreende todo recurso renovável provido de matéria orgânica de origem vegetal ou animal, utilizada como combustível ou para sua produção (BRAZ, 2014). Os materiais lignocelulósicos são compostos por hemicelulose, celulose e lignina (álcoois aromáticos), que dão as plantas as estruturas duras e fibrosas. Além desses componentes, são encontrados em sua composição lipídeos, proteínas, açúcares simples, água, componentes inorgânicos e outros metabólitos secundários (BETANCUR, 2010). A Figura 1 representa as estruturas que compõem o material lignocelulósico.

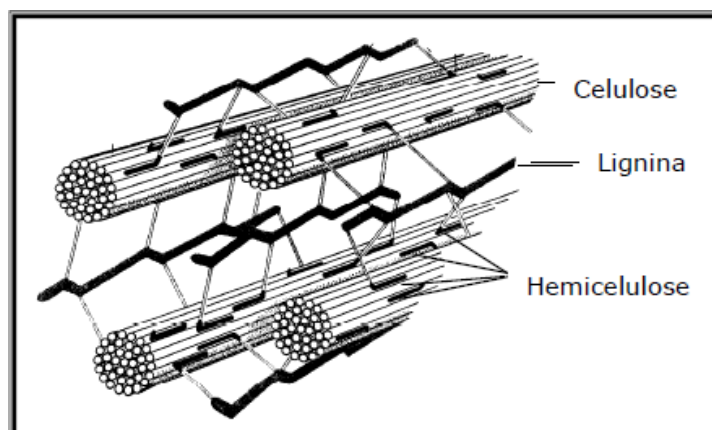


Figura 1: Composição da biomassa lignocelulósica (BETANCUR, 2010).

Os materiais lignocelulósicos não são diretamente utilizados pela maioria dos microrganismos produtores de substâncias de interesse industrial devido à sua natureza polissacarídica, havendo a necessidade de se realizar a hidrólise dos seus componentes para os respectivos monômeros (SANTOS, 2005).

3.2.1. Celulose

A celulose, classificada como homopolissacarídeo linear, composta por unidades de β -D-Glicose, unidas por ligações $\beta(1-4)$ carbono- carbono, é o maior constituinte da parede das células vegetais (BETANCUR, 2010). Por formarem entre si ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, a celulose possui tendência de formar cristais que a tornam completamente insolúveis na água e em solventes orgânicos (FERREIRA, 2014).

As ligações de hidrogênio intermoleculares conferem rigidez à planta, já as ligações intramoleculares são responsáveis pelas fibrilas, estruturas que se ordenam formando as fibras da celulose. A Figura 2 representa o homopolissacarídeo (FERREIRA, 2014).

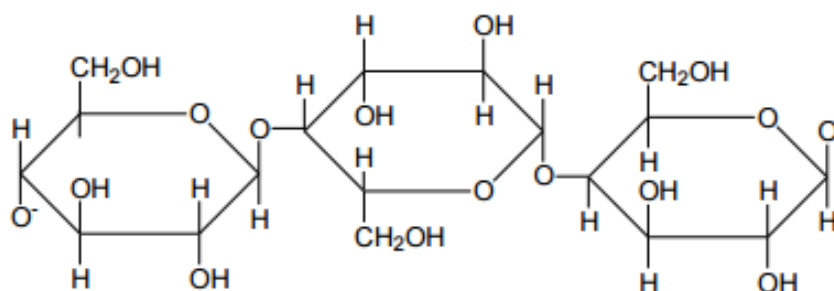


Figura 2: Estrutura da celulose, formada por monômeros de glicose (FERREIRA, 2014).

3.2.2. Hemicelulose

As hemiceluloses também presentes na parede de células vegetais são polissacarídeos complexos compostos principalmente por β -D- manose, β -D- glicose, α -D- galactose e por pentoses β -D- xilose e α -L-arabiose (BETANCUR, 2010). A hemicelulose possui uma estrutura mais complexa do que a celulose, devido à presença de diferentes unidades monoméricas, assim como a variedade de ligações e ramificações (FERREIRA, 2014). Quando sofrem hidrólise ácida, podem ser decompostas em unidades de açúcares, como xilose, glicose, além de ácido urônico e furfural (BRAZ,2014). A Figura 3, representa a estrutura da hemicelulose.

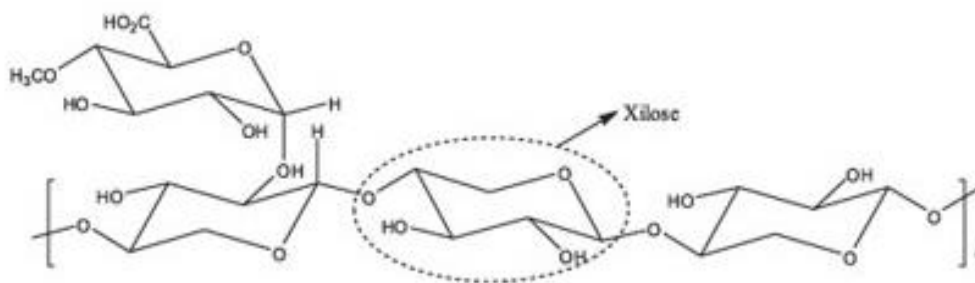


Figura 3: Representação esquemática da hemicelulose (SANTOS et al., 2012).

3.2.3. Lignina

A lignina é responsável pela rigidez e resistência da parede celular em vegetais, sendo assim, uma camada protetora a ataques microbiológicos devido a sua natureza hidrofóbica. Apesar de ser a menor fração de biomassa lignocelulósica, é a molécula mais complexa. É um polímero tridimensional amorfo, composto por unidades aromáticas de fenilpropano interligadas por ligações de éster. A Figura 4, representa a estrutura da lignina (SIQUEIRA, 2015).

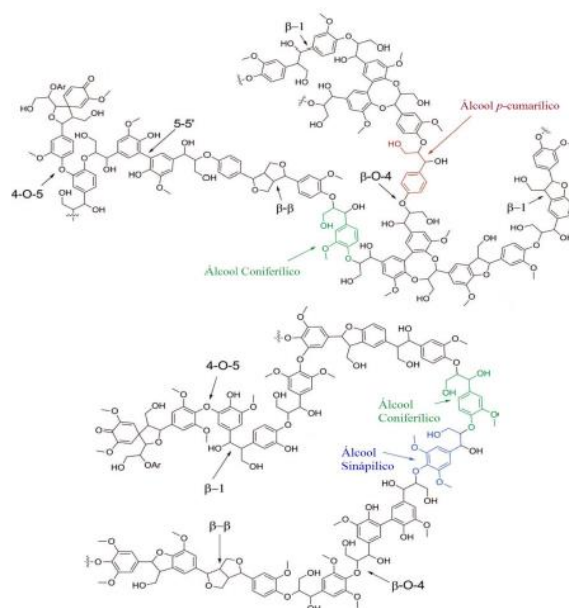


Figura 4: Estrutura da lignina (SIQUEIRA, 2015).

Devido à alta complexidade estrutural, torna-se difícil realizar a conversão dos resíduos da lignina em outros produtos (SIQUEIRA, 2015). Apesar disso, a lignina representa um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza, constituindo uma fonte de valiosos insumos para a indústria química. Além disso, são responsáveis pela resistência mecânica, pelo transporte de nutrientes como água e metabólitos nas plantas vasculares (FERREIRA, 2014).

3.2.4. Hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos

O pré-tratamento é necessário, pois permite um aproveitamento mais eficiente e integral dos materiais lignocelulósicos devido à separação das frações constituintes e a desorganização da estrutura cristalina da celulose (SIQUEIRA, 2015). Diversos tipos de pré-tratamentos são empregados, podendo ser métodos físicos, químicos e biológicos.

A hidrólise é um eficiente processo capaz de converter açúcares complexos em açúcares simples (D-glicose, D-xilose, D-manose) que são utilizados por microrganismos durante o processo de fermentação. Por possuir uma estrutura complexa, os materiais lignocelulósicos dificultam a passagem de microrganismos que possam degradar essas células, por esse motivo, a hidrólise torna-se um processo eficiente, pois transforma a celulose e a hemicelulose em monômeros (açúcares) para posterior ação de microrganismos fermentadores (ANASTÁCIO, 2009).

A hidrólise ácida, é um dos pré-tratamentos mais utilizados em materiais lignocelulósicos devido à sua eficiência e baixo custo (SILVA, 2007). Este processo, utiliza um catalisador ácido capaz de quebrar as estruturas da celulose e da hemicelulose

em açúcares fermentescíveis. Neste processo, pode-se empregar dois tipos de catalisadores: ácido diluído, com concentração ácida menor que 5% (m/v) e ácido concentrado, com concentração maior que 5% (m/v).

Os ácidos mais utilizados são o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl). Os ácidos mais concentrados possuem um papel fundamental para a concentração de açúcares, pois quanto mais concentrado, mais rápida será a conversão de celulose em hexoses (ARAÚJO et al., 2013). O uso de ácidos diluídos proporciona uma baixa produção de celulose-açúcar, pois não ocorre à degradação adequada da região cristalina da celulose, o que gera a redução de uma quantidade considerável de açúcares redutores. Para alcançar taxas aceitáveis de conversão deve-se trabalhar com pressão e temperatura adequadas, o que proporciona uma maior conversão em açúcares fermentescíveis (ANSTÁCIO, 2009).

3.3. *Aspergillus niger* sp

Dentre os fungos filamentosos mais utilizados em biotecnologia para produção de enzimas, destaca-se o gênero *Aspergillus*, que constitui o grupo de microrganismos aeróbicos que tem como hospedeiros uma variedade de espécies vegetais como arroz, trigo, milho, algodão, café e soja. O gênero *Aspergillus* apresenta mais de 185 espécies e possui como característica cabeça conidial escura e globosa, com conidióforos hialinos acinzentados (COSTA, 2011). A Figura 5, representa a estrutura do fungo *Aspergillus* sp.

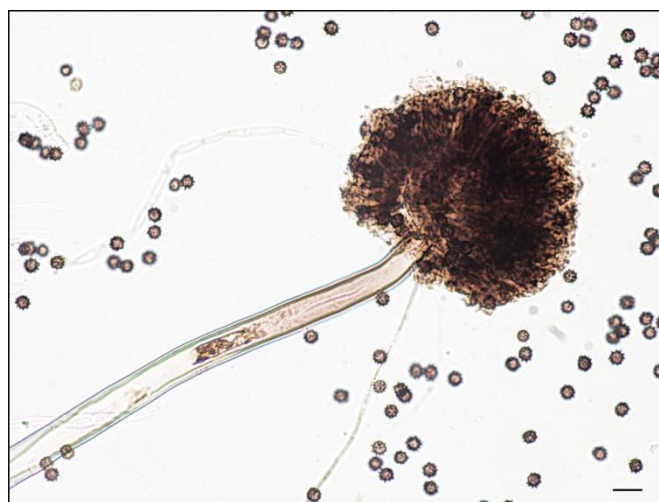


Figura 5: Estrutura do *Aspergillus niger* (INSPQ, 2016).

O *Aspergillus niger* pode se desenvolver em meios líquidos e sólidos, contendo glicose e sacarose. O crescimento desse fungo, pode ser influenciado pela composição do substrato, umidade, tamanho e distribuição da partícula, temperatura e tempo de

fermentação, pH, e densidade de inóculos (ANASTÁCIO, 2009). É uma das espécies mais utilizadas em cultivo submerso, pois apresentam um vasto leque de enzimas hidrolíticas e enzimas oxidativas, com destaque para as enzimas degradadoras de polissacarídeos como o ácido cítrico. Além desta enzima, o *Aspergillus niger* pode ser utilizado na produção de enzimas como amilase, celulase, invertase, xilanase, β -galactosidase, entre outras. A vantagem de se utilizar este fungo é a facilidade do controle de variáveis de processo, a habilidade de fermentar uma larga variedade de materiais de baixo custo e seus altos rendimentos (SANTOS, 2005).

3.4. *Rhizopus ssp*

Os fungos filamentosos, como o *Rhizopus ssp*, são eucariontes, e possuem parede celular rígida (TORTORA et al., 2008). Este fungo filamentoso possui o corpo formado por micélios e esporos, em que cada micélio é formado por vários filamentos chamados de hifas. Cada hifa tem em torno de 5 a 10 μm de largura e é formada por muitas células (PELCZAR et al., 1996). A parede rígida da hifa é constituída por quitina, celulose e glicanas (TORTORA et al., 2008). A Figura 6 representa a estrutura microscópica do fungo do gênero *Rhizopus sp*.

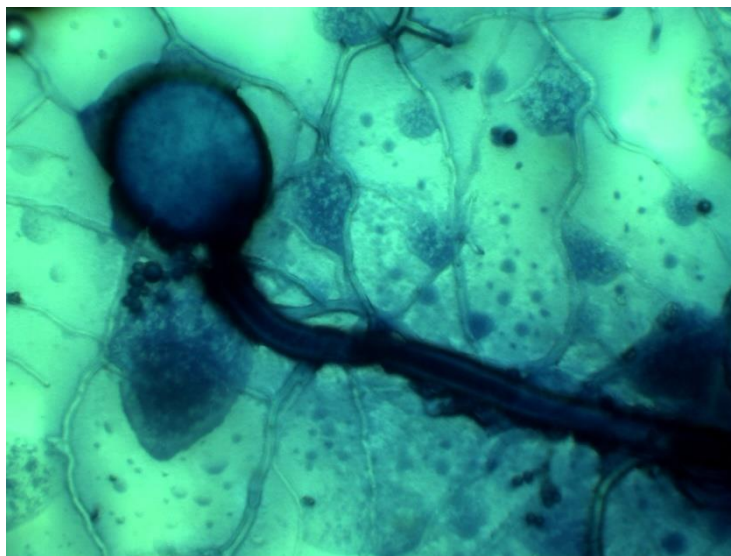


Figura 6: Estrutura do *Rhizopus ssp*.

Os fungos ao desenvolverem geram micélios brancos que se formam em volta de todo o substrato, e assim conseguem absorver os nutrientes do meio (TORTORA et al., 2008). Na biotecnologia tradicional os fungos estão sendo utilizados para produzir diversos componentes para a indústria, entre esses estão o ácido cítrico, a produção de

aromas e antibióticos, além de ser usado para produzir ácidos orgânicos (EVERLEIGH, 1981; SMITH et al., 1983).

O *Rhizopus ssp* é capaz de crescer em uma ampla gama de fontes de carbono como glicerol, etanol, ácido láctico, glicose, frutose, sacarose, xilose e óleos. Além de se desenvolver em uma ampla faixa de temperaturas (até 40°C) e pH (de 4 a 9), indicando um comportamento resistente a várias condições e meios de cultura, sendo aplicável a fermentação (MEUSSEN et al., 2012).

3.5. *Aspergillus westerdijkiae*

Muito encontrado em sementes de café e feijão, o *Aspergillus westerdijkiae* é uma espécie de descoberta recente. Provinda do táxon do *Aspergillus ochraceus*, são capazes de produzir em grandes quantidades a micotoxina ocratoxina A (OTA), associada à nefropatia em humanos (MORELLO et al. 2007). Muitas vezes são confundidos com o *A. ochraceus*, por possuírem extrema semelhança. Este fungo está sendo muito estudado devido a contaminações nos alimentos, principalmente no café, produto de consumo mundial (NOOMIN et al., 2008).

Além da micotoxina, o *A. westerdijkiae* também produz metabólitos importantes como o ácido penicílico, melleina e hidroximelina. Até o momento poucos estudos sobre a utilização deste fungo para produção de ácido cítrico foram realizados. A figura 7 representa a estrutura microscópica deste fungo.



Figura 7:Estrutura do *Aspergillus westerdijkiae* (FRISVAT J. C. et al. 2004).

3.5. Ácido cítrico

O ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), é considerado um importante produto utilizado pela indústria química, farmacêutica e de alimentos, inicialmente isolado por Sheele em 1784 através do suco de limão. É um dos produtos de fermentação submersa mais produzidos no mundo à partir do *Aspergillus niger* em meios de cultivo a base de sacarose e amido (ANASTÁCIO, 2009; FRANÇA, 2016).

Para que haja um crescimento significativo do *Aspergillus niger* e acúmulo de ácido cítrico, a composição do meio, na fermentação submersa, influencia muito. Dessa forma, as concentrações de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e estimuladores são fundamentais (ANASTÁCIO, 2009). O controle da temperatura é fundamental para o processo fermentativo cítrico pelo *Aspergillus niger*, onde temperaturas superiores a 30 °C conduzem a formação de ácido oxálico, que é um inibidor enzimático, e abaixo de 28°C, ocorre a baixa atividade metabólica acarretando em uma baixa produção de ácido cítrico (COSTA, 2011).

O ácido cítrico tem como características a alta solubilidade, ação sequestrante de íons metálicos, prevenindo reações indesejáveis de oxidação. É um ácido fraco, encontrado nos citrinos, utilizado como conservante natural e acidulante (ANASTÁCIO, 2009). Atualmente, o ácido cítrico é o segundo metabolito mais produzido por fermentação, atrás somente do etanol, cerca de 70% de sua produção é utilizada na indústria alimentícia como acidulante, seguida pela indústria farmacêutica para síntese de biopolímeros (COSTA, 2011).

Alguns metais presentes, contaminantes dessas matérias-primas, constituem o principal problema na fermentação cítrica. Além disso, em alguns produtos encontram-se substâncias inibidoras e/ou promotoras de crescimento, a maioria pouco conhecida ou analisada. Várias técnicas são usadas para remover ou neutralizar a inibição por esses contaminantes e aumentar a produção de ácido cítrico, sendo a adição de ferrocianato de potássio e metanol bastante comuns na prática. Outro fator que influencia a produção de ácido cítrico, é o pH do meio para a fermentação, onde meios com pH na faixa de 1,5 a 2,0 estimulam a formação de ácido cítrico (PENNA, 2001).

3.6. Biorreator

Os biorreatores, também chamados de fermentadores, são reatores químicos onde ocorre uma série de reações químicas catalisadas por enzimas ou células vivas, denominadas biocatalisadores (PORTO, 2005). Os biorreatores que utilizam células

vivas, geralmente são chamados de fermentadores, devido à realização de reações anaeróbias. Como a maioria das reações bioquímicas ocorre em fase líquida, os biorreatores geralmente lidam com líquidos, mas também podem envolver uma fase gasosa como nos casos de fermentadores aeróbios (KATOH et al., 2015; RECH, 2006).

Os biorreatores são utilizados em bioprocessos para o controle e manutenção de variáveis como temperatura, pH, aeração e agitação. Podem ser classificados em dois grupos, os reatores de fermentação sólida, e o de fermentação submersa, ou fase aquosa (SALLES, 2013). Devido à necessidade de controle desses parâmetros, estes equipamentos devem ser operados em condições assépticas, com sistemas de autolimpeza e de esterilização local. As possíveis configurações desenvolvidas para estes fermentadores incluem tubo horizontal, placa plana, coluna de bolhas, coluna *airlift* e tanque agitado (ALVES, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida nos Laboratórios de Biotecnologia, Microbiologia e Enzimologia do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos - UFSJ, Ouro Branco – MG.

4.1. Matéria – prima

A casca de café *in natura* utilizada para a realização dos experimentos foi obtida a partir de fazendas produtoras de café localizadas no Estado de Minas Gerais. Após recebimento e limpeza, as cascas passaram pelas etapas de moagem e secagem em uma estufa até atingirem o teor de umidade de 10 %.

4.2. Obtenção do hidrolisado da casca de café

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido a partir do processo de hidrólise ácida da casca de café. Inicialmente, misturou-se 50 mL de H₂SO₄ 10 % (v/v) com 5g de casca de café em erlenmeyers de 125 mL. Em seguida, levou-se os erlenmeyers a autoclave a 120 °C por 15 minutos, para iniciar o processo de hidrólise e fracionamento da estrutura fibrosa do material lignocelulósico (ALVAREZ et al., 2015; ALVIRA et al., 2010; SARROUH, 2009).

4.3. Tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café

Antes da utilização do hidrolisado como meio de fermentação, é necessário realizar um tratamento físico-químico para a remoção de compostos inibidores do

crescimento microbiano. Esse tratamento, foi baseado na variação de pH (SANTOS, 2005; AGBOR et al., 2011). Para obter um valor de pH aproximadamente 6,0 utilizou-se solução de hidróxido de sódio (NaOH) 12 mol.L⁻¹.

4.4. Microrganismos

Os esporos dos fungos *Aspergillus niger* sp (gentilmente doado pelo Prof. Enio Nazaré de Oliveira Júnior), *Aspergillus westerdijkiae*, previamente isolado a partir da casca de café, e *Rhizopus* ssp previamente isolado da casca de avelã, foram cultivados em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura Sabouraud, o qual foi previamente esterilizado a 121 °C em autoclave, durante 15 minutos. As placas contendo os inóculos de *Aspergillus niger* sp., *Aspergillus westerdijkiae* e *Rhizopus* ssp. foram mantidas em estufa bacteriológica sob temperatura média de 28 °C por um período de 7 dias e posteriormente, armazenados a 4°C. Para a remoção dos esporos da placa de Petri, foi utilizada uma espátula estéril, no qual foram transferidos para o meio de fermentação contido no biorreator.

4.5. Preparo do meio de fermentação

O meio de fermentação foi constituído de 100 mL de hidrolisado hemicelulósico da casca de café, suplementado com um meio mineral contendo 3,0 g de nitrato de sódio (NaNO₃); 1,0 g de Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄; 0,5 g de Sulfato de Magnésio (MgSO₄); 0,5 g de Cloreto de Potássio (KCl) e 0,001 g de Sulfato de ferro (FeSO₄ .7H₂O), o qual foram previamente autoclavados a 110°C por 15 minutos (BORTOLAZZO, 2011).

4.6. Biorreator

Para a realização dos ensaios de fermentação foi utilizado um biorreator constituído por um balão de fundo chato de 500 mL. O sistema foi mantido a temperatura de 30 °C, e agitação constante, utilizando uma chapa de aquecimento (Marca IKA). A Figura 8 mostra o sistema utilizado.

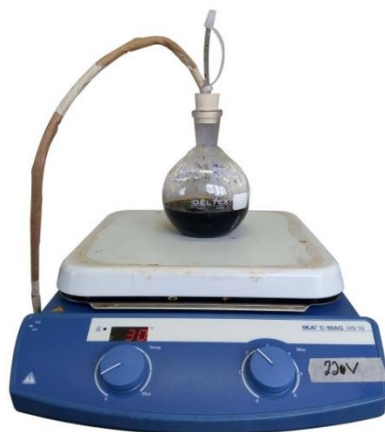


Figura 8: Esquematização do biorreator utilizado.

Após a esterilização do meio de cultivo, este foi transferido para o biorreator e inoculou-se o fungo para dar início ao processo fermentativo. As amostras foram coletadas com o auxílio de uma seringa, em um período de aproximadamente cinco dias. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Para determinação do teor de ácido cítrico e açúcares redutores, foi utilizado o sobrenadante proveniente da centrifugação, enquanto para a realização da contagem de microrganismos, utilizou-se o pellet.

4.7. Quantificação dos Açúcares Redutores pela Técnica DNS

A técnica DNS é utilizada para a determinação de açúcares redutores, baseia-se na capacidade de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de cor amarela, pela glicose, a um composto de cor avermelhada, nitroamino análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), (GUOSE, 1987). A partir da absorção da luz por esse composto aromático é possível determinar a concentração de açúcares redutores presentes no meio fermentativo (GONÇALVES, 2010).

Para o preparo do reagente DNS, inicialmente pesou-se 0,706 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico; 1,320 g de NaOH e 20,0 g de tartarato de potássio e sódio e dissolveu-se em 50 mL de água destilada em aquecimento e agitação. Em seguida adicionou-se 0,510 mL de fenol, 0,55 g de metabissulfito de sódio e completou-se a solução com água destilada para um volume final de 100 mL. Armazenou-se a solução em frasco âmbar envolto com papel alumínio a 4 °C (MALDONE et al., 2013).

Utilizou-se solução de glicose 1,0 g.L⁻¹ como solução padrão. Para análise, adicionou-se a cada tubo de ensaio a amostra de glicose, de forma a obter concentrações variando de 0,2 g.L⁻¹ a 1,0 g.L⁻¹. O hidrolisado foi diluído (1:50) em balão volumétrico

de 50 mL. Desta diluição, transferiu-se 1,0 mL para o tubo de ensaio. Para o branco, utilizou-se 1,0 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução de DNS a cada tubo de ensaio e levou-se os tubos ao banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Os tubos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 7,5 mL de água destilada para atingir um volume final de 10 mL (diluição 1:10). As concentrações dos açúcares foram calculadas utilizando uma curva padrão de glicose (absorbância x concentração), previamente construída. As leituras da absorbância foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm. A Figura 9, representa os tubos de ensaio antes e depois do aquecimento e a Figura 10 representa o gráfico da curva padrão.

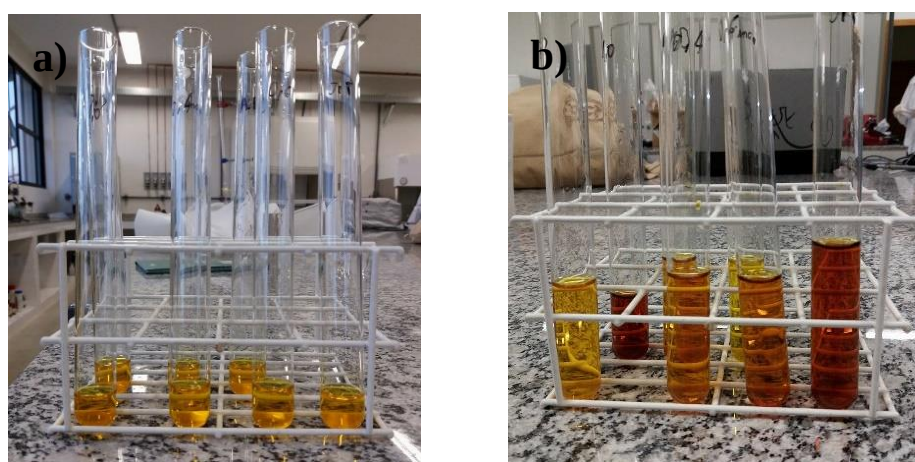


Figura 9: Soluções de glicose antes (a) e depois (b) do aquecimento.

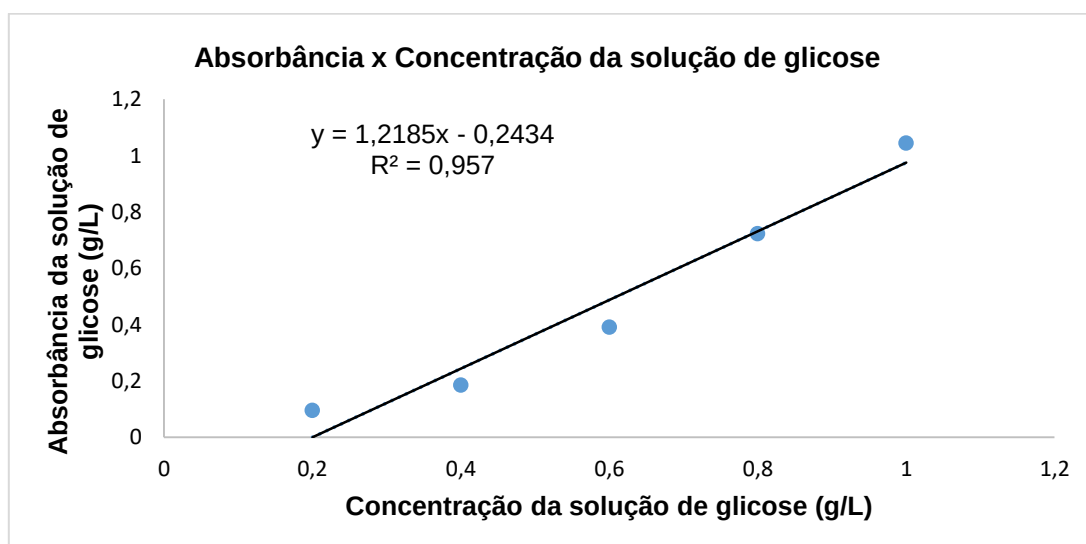


Figura 10: Curva padrão da solução de glicose.

A Equação da reta obtida do gráfico de absorbância versus concentração da solução de glicose permite correlacionar a absorbância com a concentração de açúcares redutores presentes no hidrolisado e é representado pela Equação 1.

$$y = 1,2185x - 0,2434 \quad (1)$$

Onde, y é a absorbância e x é a concentração da amostra (g.L^{-1}).

4.8. Produção do Ácido Cítrico

Os níveis de ácido cítrico foram determinados ao final do processo fermentativo, através da metodologia de Saffran e Denstedt (1948), onde, a presença do ácido cítrico gera coloração amarela no meio, após adição de ácido tricloroacético (TCA) com piridina e anidrido acético.

A curva padrão do ácido cítrico foi construída a partir da solução de ácido cítrico (4,0 g de ácido cítrico em 100,0 mL de TCA a 15%) cuja concentração inicial foi de 40 g.L^{-1} e fez-se as respectivas diluições. Para o branco, utilizou-se 0,5 mL de solução de TCA 15%. Para cada tubo, adicionou-se 4 mL de anidrido acético seguido de banho-maria por 10 minutos a 60°C . Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de piridina, retornou-se os tubos ao banho-maria por mais 40 minutos, e resfriou-os a temperatura ambiente. Durante o aquecimento, percebeu-se a variação de coloração da solução de amarelo até marrom escuro, devido as diferentes concentrações de ácido cítrico em cada tubo. A Figura 11 mostra os tubos antes e após o aquecimento.

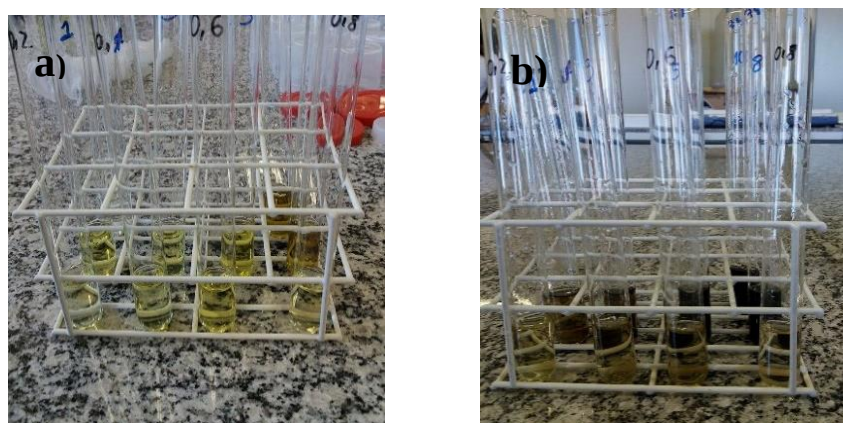


Figura 11: Soluções de ácido cítrico antes (a) e depois (b) da adição de piridina e aquecimento.

Ao longo do processo fermentativo, as amostras do meio fermentado foram diluídos utilizando a relação 1:50 e repetiu-se o procedimento descrito anteriormente.

A Figura 12 representa a curva padrão utilizada para a determinação do ácido cítrico.

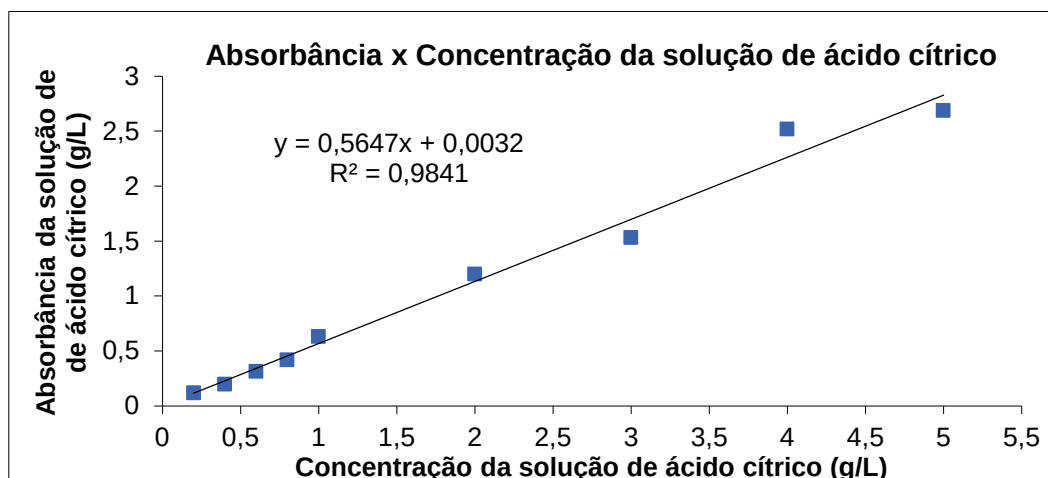


Figura 12: Curva padrão da solução de ácido cítrico.

A Equação da reta obtida do gráfico de absorbância x concentração da solução de ácido cítrico, permite determinar a produção de ácido cítrico ao longo do processo fermentativo e é representada pela Equação 2.

$$y = 0,5647x + 0,0032 \quad (2)$$

Onde, y é a absorbância e x é a concentração da amostra (g.L^{-1}).

4.9. Contagem de Células na Câmara de Neubauer

Após a centrifugação das amostras fermentadas, o pellet foi utilizado para a realização da contagem de células em câmara Neubauer. A cada tubo Falcon contendo o pellet, adicionou-se 10 mL de água destilada para ressuspender os microrganismos. A partir desta suspensão retirou-se 1 mL da amostra e fez-se diluição 1:100 em tubos de ensaio. Com o auxílio da pipetou, retirou-se alíquotas de 0,5 mL e preencheu-se a câmara de contagem. Esperou-se as células sedimentarem e focalizou-se a área demarcada para a realização da contagem de fungos. O número de células por mL, foi obtido conforme a Equação 3.

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \quad (3)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios fermentativos envolvendo o cultivo dos fungos *Aspergillus niger sp.*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Rhizopus spp.* em hidrolisado hemicelulósico da casca de café foram conduzidos para avaliar a real viabilidade de crescimento destes fungos neste meio e a produção de ácido cítrico.

5.1. *Aspergillus niger sp*

A Tabela 2, representa as concentrações (g.L⁻¹), para substrato, produto e microrganismo (N° Células.mL⁻¹) pelo fungo *Aspergillus niger sp* ao longo do processo fermentativo.

Tabela 2: Concentrações (g.L⁻¹) para substrato, produto e microrganismo (N° Células.mL⁻¹)

Tempo (h)	Substrato (g.L ⁻¹) *	Produto (g.L ⁻¹) *	Microrganismo (Células.mL ⁻¹) *
0	25,0267 ± 0,365	0,00	0,00
24	20,3283 ± 0,252	1,22 ± 0,072	9,25 x 10 ⁶ ± 0,176
29	19,3229 ± 0,227	1,17 ± 0,069	7,25 x 10 ⁶ ± 0,176
48	15,7530 ± 0,140	0,90 ± 0,054	6,00 x 10 ⁶ ± 0,353
72	13,9475 ± 0,096	1,26 ± 0,074	6,50 x 10 ⁶ ± 0,177
78	14,7066 ± 0,115	1,46 ± 0,085	7,75 x 10 ⁶ ± 0,177
80	13,8039 ± 0,093	1,16 ± 0,068	7,50 x 10 ⁶ ± 0,353
144	11,0341 ± 0,025	0,99 ± 0,059	7,00 x 10 ⁶ ± 0,177

⁽¹⁾ Concentração ± Desvio Padrão

As Figuras 13, 14, 15 e 16 representam o consumo de substrato, o crescimento celular dos fungos, a produção de ácido cítrico pelo tempo e a relação entre o consumo de substrato e a produção do ácido cítrico.

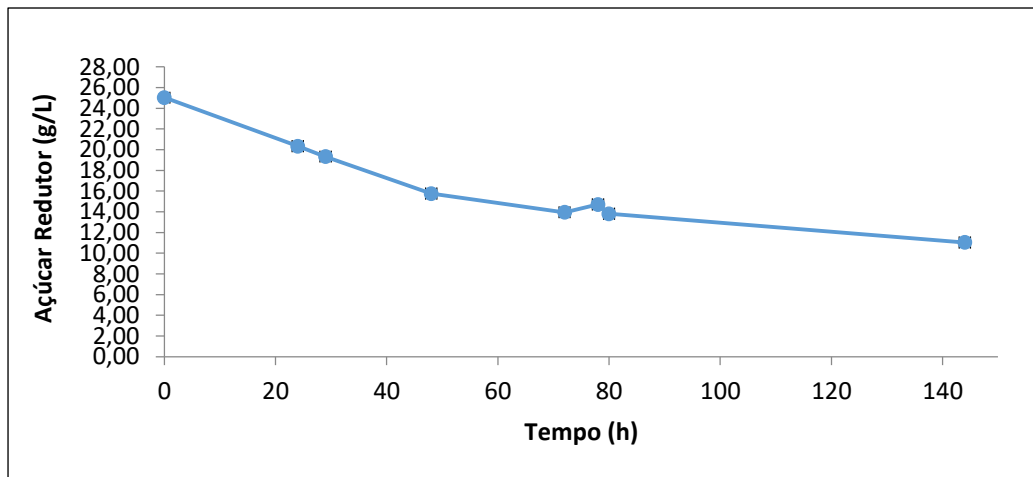


Figura 13: Concentração (g.L^{-1}) de açúcar redutor pelo fungo *Aspergillus niger sp* ao longo do processo fermentativo.

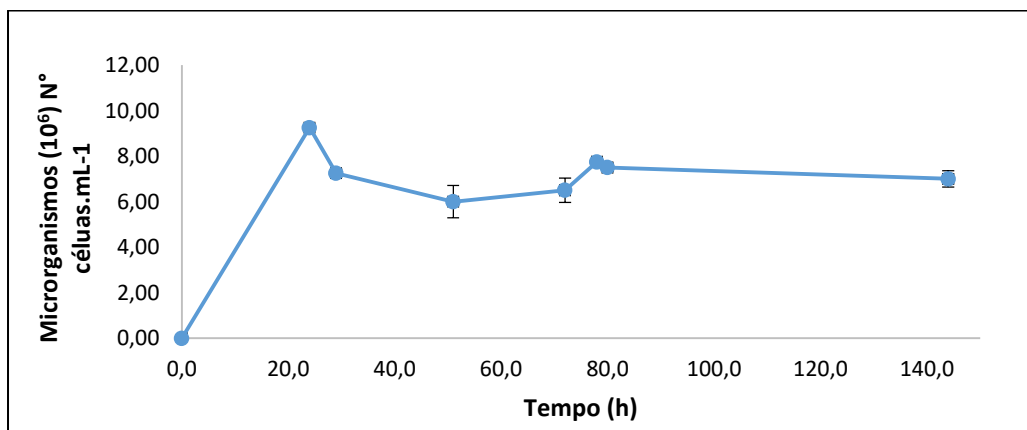


Figura 14: Crescimento celular (N° Células.mL⁻¹) pelo fungo *Aspergillus niger sp* em função do tempo.

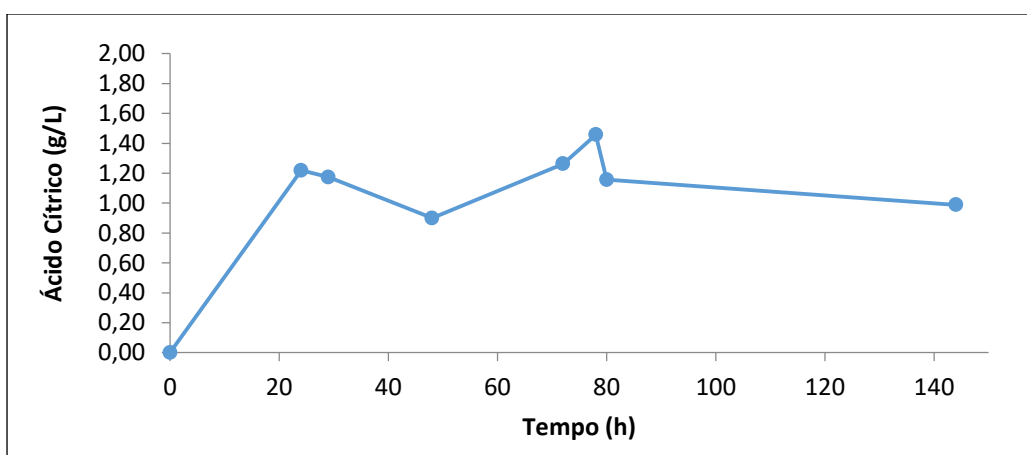


Figura 15: Concentração (g.L^{-1}) de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger sp* ao longo do processo fermentativo.

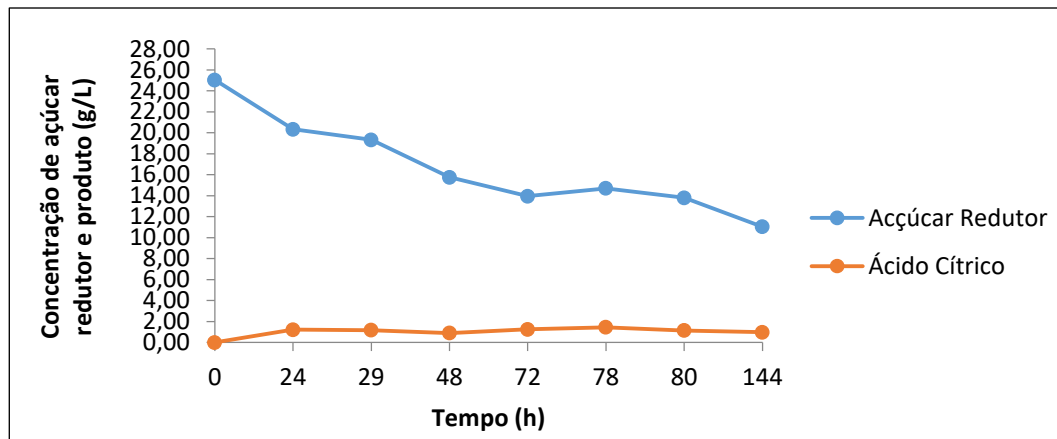


Figura 16:Relação entre as concentrações (g.L-1) do consumo de substrato e produção do ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger sp* ao longo do processo fermentativo.

Neste experimento, percebe-se que no início do processo fermentativo há uma elevada concentração de substrato e que essa concentração reduziu ao longo do tempo, sugerindo que houve um crescimento do fungo, tendo assimilado os açúcares presentes no hidrolisado (Figura 13). Embora o *Aspergillus niger sp.* seja uma das espécies mais utilizadas na biotecnologia industrial em fermentação submersa, devido a sua eficiente produção de enzimas degradadoras de polissacarídeos, com destaque para produção de ácido cítrico (FRANÇA, 2016), não foi possível obter uma significativa produção de ácido cítrico no experimento.

Ao analisar a Figura 14, pode-se observar que no tempo de 24 horas ocorreu um significativo crescimento do número de células viáveis do fungo estudado, alcançando um valor máximo de $9,25 \times 10^6$ (células.mL⁻¹) após 24 h de fermentação (Tabela 2). Porém, com o passar do tempo de fermentação, houve um decréscimo no número de células (Figura 14), possivelmente devido à baixa eficiência na remoção de compostos inibidores (metais) ao crescimento microbiano, durante a etapa de tratamento do hidrolisado, o que gerou a baixa concentração celular durante a fermentação.

Da mesma forma, de acordo com os resultados mostrados na Figura 15, observa-se uma máxima produção de ácido cítrico de 1,22 g.L⁻¹, após 24h de fermentação. Tal fato corrobora os resultados obtidos para o crescimento celular para o mesmo tempo de fermentação. Entretanto, percebe-se que não houve aumento significativo na produção do ácido cítrico após as primeiras 24 horas de fermentação mesmo com uma redução constante na concentração de açúcares durante o período fermentativo (Figura 16). Este fato indica que o consumo dos açúcares ocorreu em função da manutenção celular e não para a produção de ácido cítrico. Acredita-se que esse desvio na via metabólica do

fungo estudado pode ter ocorrido devido ao estresse celular causado pela produção do ácido cítrico, o que gerou efeitos de inibição no sistema.

5.2. *Aspergillus westerdijkiae*

A Tabela 3, representa as concentrações (g.L^{-1}), para substrato, produto e microrganismo (N° Células mL^{-1}) ao longo do processo fermentativo.

Tabela 3: Concentrações (g.L^{-1}) para substrato, produto e microrganismo (N° Células. mL^{-1})

Tempo (h)	Substrato (g.L^{-1}) *	Produto (g.L^{-1}) *	Microrganismo (Células. mL^{-1}) *
0	26,6270 $\pm$ 0,012	0,00	0,00
48	20,0205 $\pm$ 0,005	0,1470 $\pm$ 0,003	3,45 x 10 ⁶ $\pm$ 0,100
72	18,4612 $\pm$ 0,003	1,2272 $\pm$ 0,007	7,25 x 10 ⁶ $\pm$ 0,125
96	15,5273 $\pm$ 0,007	1,7230 $\pm$ 0,007	9,25 x 10 ⁶ $\pm$ 0,125
120	12,1009 $\pm$ 0,002	1,2449 $\pm$ 0,007	7,25 x 10 ⁶ $\pm$ 0,125

⁽¹⁾ Concentração $\pm$ Desvio Padrão

As Figuras 17, 18, 19 e 20, representam o consumo de substrato, o crescimento celular dos fungos, a produção de ácido cítrico pelo tempo e a relação entre o consumo de substrato e a produção do ácido cítrico.

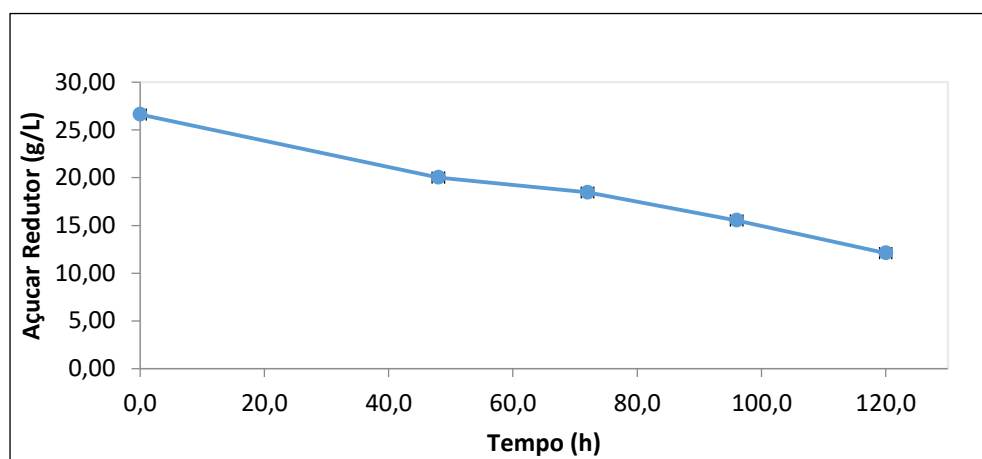


Figura 17: Concentração (g.L^{-1}) de açúcar redutor pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* ao longo do processo fermentativo.

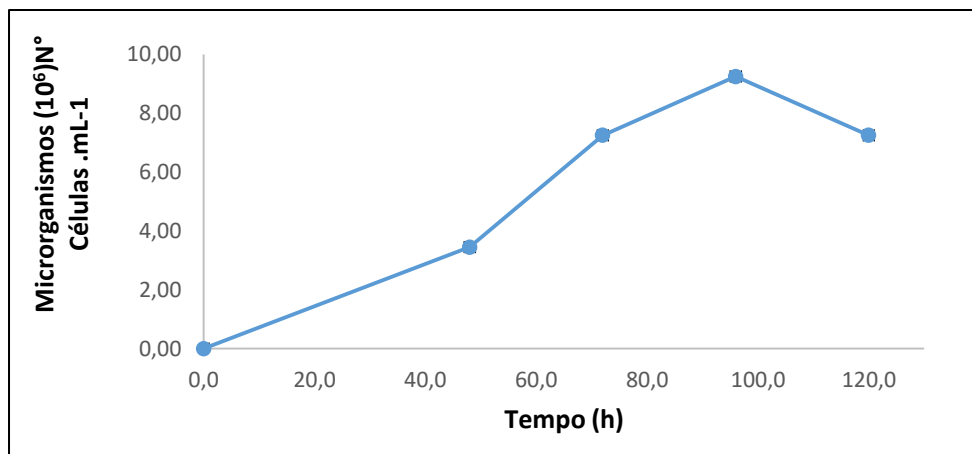


Figura 18: Crescimento celular (N° Células.mL⁻¹) pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* ao longo do processo fermentativo.

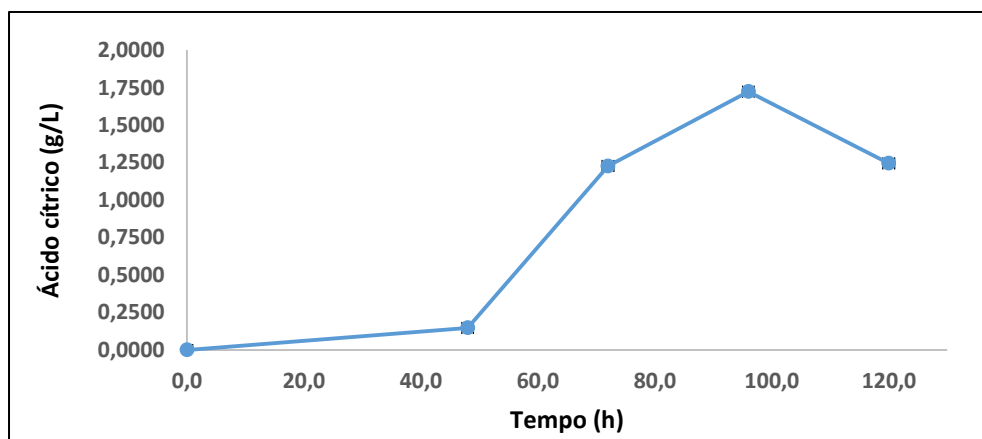


Figura 19: Concentração (g.L⁻¹) de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* ao longo do processo fermentativo.

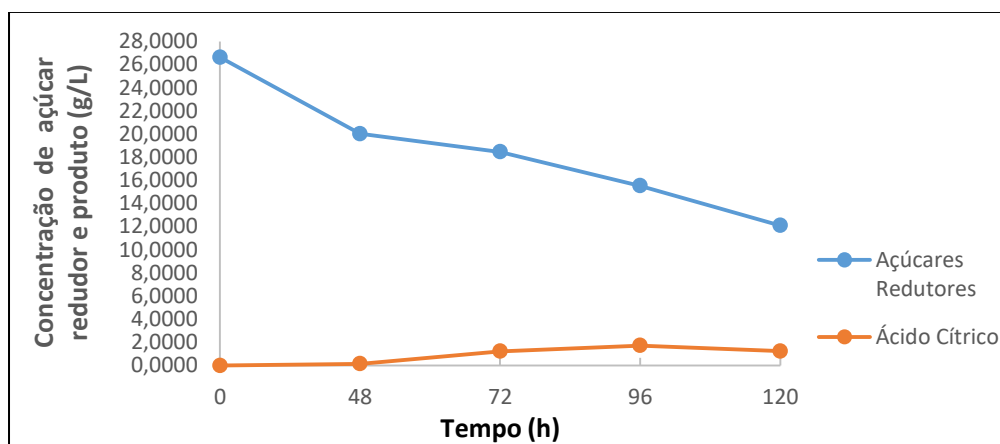


Figura 20: Relação entre as concentrações (g.L⁻¹) do consumo de substrato e produção do ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* ao longo do processo fermentativo.

No início do processo fermentativo pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae*, pode-se notar que há uma elevada concentração de substrato e que essa concentração decresce

ao longo do tempo, sugerindo que houve um consumo pelo fungo para que o mesmo pudesse se desenvolver (Figura 18). Estas análises também foram observadas na fermentação pelo fungo *Aspergillus niger* e o consumo de substrato por ambos os fungos *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus niger* foram iguais ao longo do tempo.

Ao analisar os gráficos de microrganismos e ácido cítrico em função do tempo (Figuras 19 e 20), pode-se notar que no tempo de 96 horas, ocorreram as maiores taxas de produção de ácido cítrico ($1,72 \text{ g.L}^{-1}$) juntamente com o maior desenvolvimento da massa microbológica ($9,25 \times 10^6 \text{ N}^\circ \text{ Células.mL}^{-1}$). Estes dados evidenciam que o fungo *Aspergillus westerdijkiae*, se adaptou adequadamente ao hidrolisado hemicelulósico, pois as taxas de crescimento microbológico acompanham a produção de ácido cítrico pelo fungo.

Um fato que justifica a melhor adaptação do fungo *Aspergillus westerdijkiae* no hidrolisado hemicelulósico, em relação ao *Aspergillus niger*, é a origem deste fungo, o qual foi isolado da casca de café para realização deste experimento. De acordo com ANASTÁCIO (2009), a concentração (g.L^{-1}) ideal de açúcares redutores para uma maior conversão em ácido cítrico, está na faixa de 14-22 % de açúcar, o que é comprovado no experimento, onde a taxa de açúcar redutor no período de 96 horas encontrava-se na faixa de 15 %, sendo o período em que observou-se a maior concentração de ácido cítrico (Figura 20).

5.3. *Rhizophus ssp*

A Tabela 4, representa as concentrações (g.L^{-1}), para substrato, produto e microrganismo ($\text{N}^\circ \text{ Células.mL}^{-1}$) pelo fungo *Rhizophus ssp* ao longo do processo fermentativo.

Tabela 4: Concentrações (g.L^{-1}) para substrato, produto e microrganismo ($\text{N}^\circ \text{ Células.mL}^{-1}$)

Tempo (h)	Substrato (g.L^{-1}) *	Produto (g.L^{-1}) *	Microrganismo ($\text{N}^\circ \text{ Células.mL}^{-1}$) *
0	$22,442 \pm 0,011$	0,000	0,0
24	$20,349 \pm 0,012$	$1,342 \pm 0,079$	$7,00 \times 10^6 \pm 0,035$
36	$21,600 \pm 0,018$	$1,457 \pm 0,086$	$4,75 \times 10^6 \pm 0,177$
48	$20,328 \pm 0,014$	$1,307 \pm 0,077$	$8,00 \times 10^6 \pm 0,353$
60	$19,590 \pm 0,980$	$1,165 \pm 0,069$	$10,50 \times 10^6 \pm 1,237$
72	$18,420 \pm 0,191$	$0,953 \pm 0,057$	$18,75 \times 10^6 \pm 2,475$
120	$14,584 \pm 0,191$	$0,997 \pm 0,059$	$14,50 \times 10^6 \pm 0,176$

(1) Concentração $\pm$ Desvio Padrão

As Figuras 21, 21, 22 e 23, representam o consumo de substrato, o crescimento celular dos fungos, a produção de ácido cítrico pelo tempo e a relação entre o consumo de substrato e a produção do ácido cítrico.

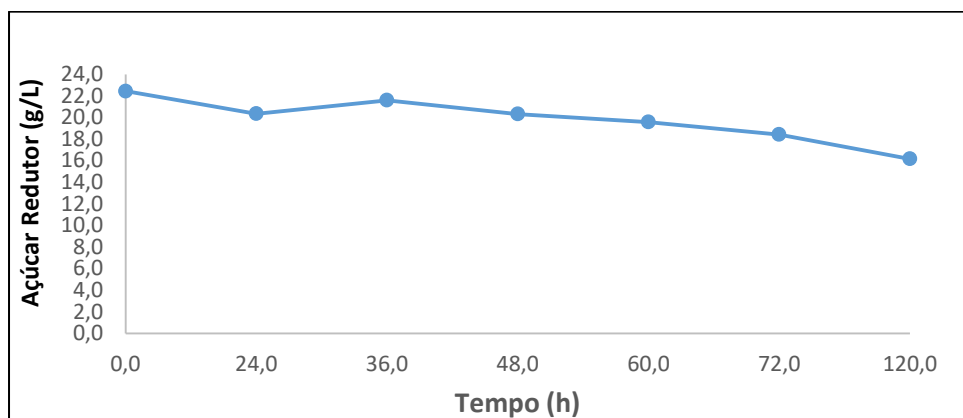


Figura 21: Concentração (g.L^{-1}) de açúcar redutor pelo fungo *Rhizopus ssp* ao longo do processo fermentativo.

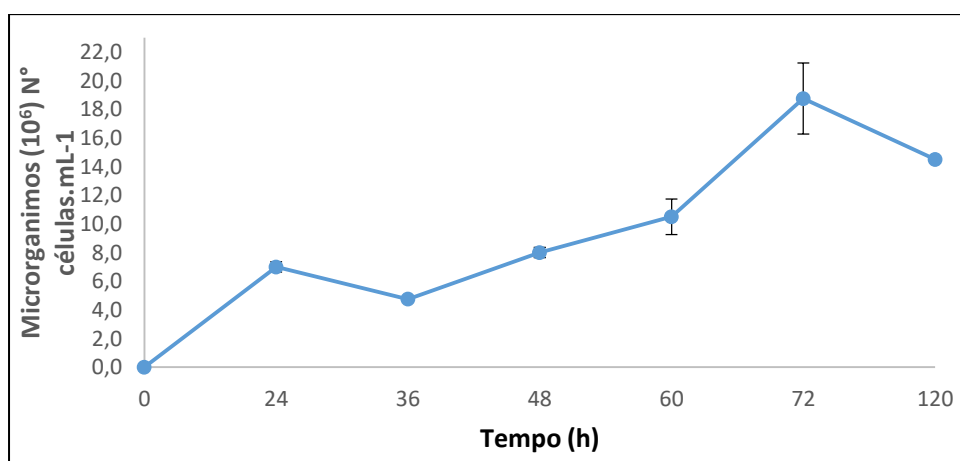


Figura 22: Crescimento celular (N° Células.mL $^{-1}$) pelo fungo *Rhizopus ssp* ao longo do processo fermentativo.

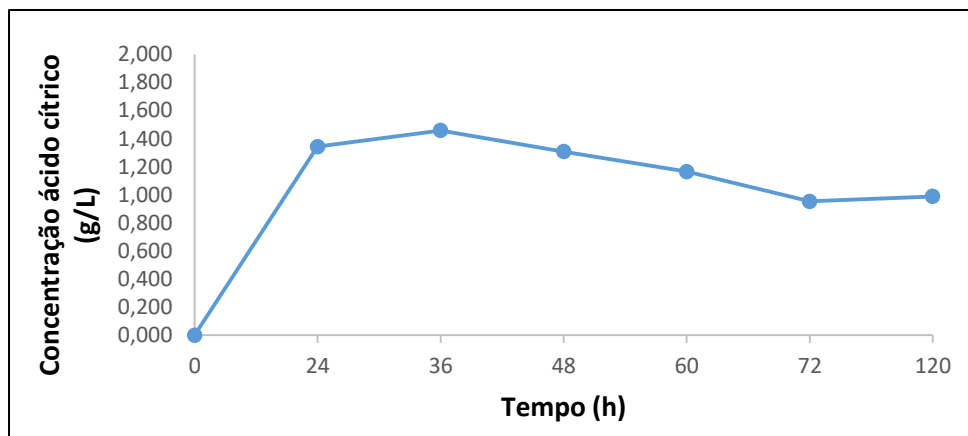


Figura 23: Concentração (g.L^{-1}) de ácido cítrico pelo fungo *Rhizopus ssp* ao longo do processo fermentativo.

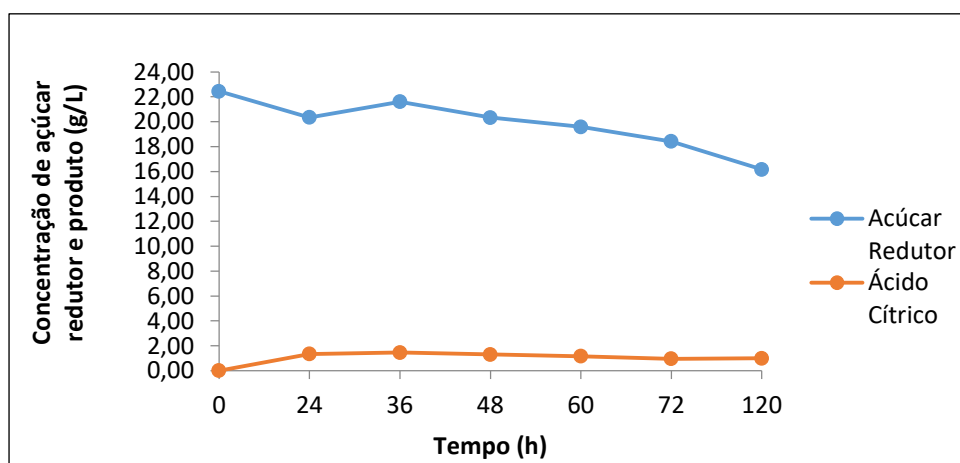


Figura 24: Relação entre as concentrações (g.L^{-1}) do consumo de substrato e produção do ácido cítrico pelo fungo *Rhizopus ssp* ao longo do processo fermentativo.

Analisando a Figura 22, observa-se uma elevada taxa de crescimento da massa microbológica durante o processo fermentativo, o que sugere que o fungo *Rhizopus ssp* se adaptou bem ao hidrolisado hemicelulósico. Contudo, não houve o consumo significativo de açúcares redutores pelo fungo *Rhizopus ssp* em relação aos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus westerdijkiae* (Figura 21). Uma justificativa para o ocorrido deve-se ao fato do fungo estar utilizando outro substrato de sua preferência para o seu desenvolvimento, ao invés de consumir os açúcares redutores presentes no hidrolisado hemicelulósico. De acordo com KUPISK (2012), o fungo *Rhizopus ssp* é capaz de produzir enzimas como proteases e xilanases, podendo assim degradar proteínas e xilose, componentes que estão presentes na casca de café, além da capacidade de degradar a cafeína.

Observou-se que uma produção eficiente de ácido cítrico de 1,34 g.L⁻¹ (Tabela 4) foi obtida após 24 h de fermentação (Figura 23), em comparação com os fungos *Aspergillus westerdijkiae* e *Aspergillus niger*. Segundo NWOKORO (2015), o fungo *Rhizopus stolonifer* foi capaz de produzir ácido cítrico (5,8 g.L⁻¹) após 72h de incubação, utilizando casca de laranja como substrato, confirmando assim a produção de ácido cítrico por este fungo.

Comparando o desempenho dos três fungos estudados, observa-se que o fungo *Rhizopus spp* apresentou uma produção de ácido cítrico 10% maior que o fungo *Aspergillus niger sp* após 24 h de fermentação. Por outro lado, a produção máxima do ácido pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* foi observado após 96 h de fermentação, alcançando uma produção de ácido cítrico 10% maior que o obtido para o fungo *Rhizopus spp*.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, pode-se concluir que o hidrolisado hemicelulósico da casca de café continha uma elevada concentração de açúcares redutores. No entanto, somente as fermentações submersas pelos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus westerdijkiae* obtiveram uma maior redução dessa concentração, o que indica que estes microrganismos foram capazes de assimilar os açúcares presentes no meio. Na fermentação pelo fungo *Rhizopus spp* observa-se somente uma pequena variação da concentração do substrato ao longo do tempo. Tal fato, pode estar associado a assimilação de outros substratos pelo fungo, uma vez que este gênero é capaz de produzir enzimas e dessa forma, degradar proteínas e cafeína, que são componentes presentes no hidrolisado hemicelulósico da casca de café.

O fungo *Aspergillus westerdijkiae* obteve uma produção de ácido cítrico 41% maior que do fungo *Aspergillus niger sp*, utilizando hidrolisado hemicelulósico da casca de café como substrato. Por outro lado, a produção máxima do ácido pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* foi observado após 96h de fermentação, enquanto para o fungo *Aspergillus niger sp* uma produção máxima foi alcançada após 24 h.

Da mesma forma, o fungo *Rhizopus sp* apresentou uma produção de ácido cítrico 10% maior que o fungo *Aspergillus niger sp* após 24 h de fermentação. Entretanto, a produção máxima do ácido pelo fungo *Aspergillus westerdijkiae* foi observado após 96h de fermentação, alcançando uma produção de ácido cítrico 10% maior que o obtido para o fungo *Rhizopus spp*.

Com base nesses resultados, sugere-se a continuidade dos experimentos, buscando formas mais eficientes de purificar o hidrolisado com outros tipos de tratamentos. Testar diferentes concentrações de glicose e xilose para posteriores comparações. Além de realizar estudos com diferentes sistemas de aeração que proporcionem uma maior transferência de massa no meio a fim de otimizar a cinética de crescimento celular e consequentemente a produtividade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 675-685, 2011.

ALVAREZ, P. A.; FILHO, R. M.; TOVAR, L. P.; MACIEL, M. R. W. Kinetics of the Acid hydrolysis of Sugarcane Bagasse Using Different Milling Size, High Solid Load and Low Pretreatment Temperature. *Chemical engineering transactions*, v.43, p. 625-630, 2015.

ALVES, F. *Modelagem e Simulação de Biorreator Operando com Fungos Trametes versicolor para Produção Enzima Lacase*. 2010, 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2010.

ALVIRA, P.; PEJÓ, T.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J.; Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ANASTÁCIO, G. S. *Utilização do resíduo casca de arroz para a produção de ácido cítrico por fermentação submersa com o fungo aspergillus niger*. 2009, 68 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, 2009.

ARAÚJO, C. R. de.; GARRIDO, C. V. S.; SANTOS, J. M. G. M.; LEAL, S. C. S.; SANTOS, L. M. A. *Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a Partir de resíduos lignocelulósicos*. Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, Salvador, 2013.

BACHA, N.; ATOUI. A.; MATHIEU, F. Aspergillus Westerdijkiae Polyketide Synthase Gene “Aoks1” Is Involved In The Biosynthesis Of Ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology* v. 46, p. 77- 84, 2009.

BETANCUR, G. J. V. *Otimização do Pré-Tratamento Ácido de Bagaço de Cana-de-Açúcar e Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico para a*

Produção de Etanol de Segunda Geração. 2010, 174 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

BRAZ, C. E. M. *Caracterização de biomassa lignocelulósica para uso em processos térmicos de geração de energia*. 2014, 114f. Dissertação (Mestre em Química), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

BORTOLAZZO, N. G. *Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar*. 2011, 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

COSTA, L. M. A. S. *Caracterização de isolados de Aspergillus niger Quanto à Produção de Ácido Cítrico e à Expressão de Genes da Citrato Sintase*. 2011, 92 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DURSO, T. F. A. *Otimização Da Hidrólise Enzimática Da Casca De Café Visando À Produção De Açúcares Fermentescíveis*. Programa de Iniciação Científica, Universidade Federal de São João Del Rei, Ouro Branco, 2015. 11 f.

FERREIRA, N. de L. *Pirólise de biomassa lignocelulósica utilizando diferentes catalisadores para produção de bio-óleo*. 2014, 115 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

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*. 2016, 96 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente), Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.

FRISVAD, J. C.; FRANCK, M.; HOUBRAKEN, J. M.P.; SAMSON, R. A. *New Ochratoxin A Producing Species Of Aspergillus Section Circumdati*. v.50, p. 23-43.2004.

GONÇALVES, C.; JASSO, R. M. R.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. *Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates*. *The Royal Society of Chemistry*. v. 2, p. 2046-2048, 2010.

GUOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

IBGE, Notícias Agrícolas. Disponível em: < <http://cccmg.com.br/ibge-revisa-para-cima-producao-do-brasil-em-2017-para-464-milhoes-de-sacas/>> Acesso em: 28 de novembro de 2017.

INSPQ, Institute National De Santé Publique. Disponível em: < <https://www.inspq.qc.ca/node/484> > Acesso em: 05 de dezembro de 2017.

KATOH, S.; HORIUCHI, J. I.; YOSHIDA, F. *Biochemical Engineering*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. 2ª Edição.

KUPISK. L. *Produção de celulasas a partir de resíduo da indústria arrozeira empregando Rhizopus oryzae e Trichoderma reesei*. 2012, 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

MALDONE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS – Embrapa, 2013, 1º Edição.

MEUSSEN, B. J.; GRAAF, L. H. de.; SANDERS, J. P. M.; WEUSTHUIS, R. A. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 94, p. 875-886, 2012.

MORELLO L. G.; SARTORI. D.; FUNGARO. M. H. Detection And Quantification Of *Aspergillus Westerdykiae* In Coffee Beans Based On Selective Amplification Of B-Tubulin Gene By Using Real-Time PCR. *Journal of Biological Chemistry*, v. 119, p 270-276, 2007.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD. J. C.; SAMSON. R. A. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand- *Journal of Biological Chemistry*, v. 128, p197-202, 2008.

NWOKORO, O. Studies on the Production of Citric Acid by *Rhizopus stolonifer*. *American Chemical Science Journal*, v.6, p.205-212,2015.

PENNA, T. C. V. Produção de Ácidos. In: Ed Edgard Blucher Ltda. (Org.). *Biotecnologia Industrial*. 1ed.Sao Paulo: 2001, v. 3, p. 45-59.

PORTO, L. de M. Modelagem de processo industrial de Fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série. 2005, 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RECH, R. **Bioengenharia para engenharia química: Polígrafo**. Porto Alegre. 2006. (Apostila).

SAFFRAN, M; DENSTEDT, O. F. A rapid method for the determination of citric acid. *Journal of Biological Chemistry*, v. 175, p. 849-855, 1948.

SALLES, P. Avaliação de um reator tipo tambor rotativo para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2013, 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. de.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v.35, n.4, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, R. da S. *Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator*. 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Faculdade de Engenharia de Lorena, Lorena, 2005.

SARROUH, B. F.; BRANCO, R. de F.; SILVA, S. S. da. Biotechnological Production of Xylitol: Enhancement of Monosaccharide Production by Post-Hydrolysis of Dilute Acid Sugarcane Hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 153, p. 163-170, 2009.

SILVA, J. P. A. *Estudo da produção de etanol por Pichia stipitis empregando hidrolisado de palha de arroz*. 2007, 144 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Faculdade de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.