

## PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO SORO DE QUEIJO COMO MEIO DE MITIGAR DESCARTES DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Nathália Magalhães (\*), Alyne Cavalcante, Carlos Ronald Pessoa Wanderley, Glória Marinho, Kelly Rodrigues

\* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, nathaliagalhaes.tga@gmail.com.

### RESUMO

Nesta pesquisa foi estudada a viabilidade de produção de ácido cítrico pela estirpe *Aspergillus niger* AN400 utilizando soro de queijo como substrato. Além disso, foram observados aspectos morfológicos do fungo no final do processo. Foram montadas quatro séries de reatores, com diferentes concentrações de glicose: 50 g/L para os reatores RFGI, 100 g/L para RFGII e 150 g/L para RFGIII. Foi avaliada a possibilidade de produção de ácido cítrico sem adição de glicose nos reatores RF. Foi observado acúmulo de ácido cítrico, na seguinte ordem, nos reatores RFGI, RFGII, RFGIII e RF de 0,51 g/L, 0,25 g/L, 0,20 g/L e 0,25 g/L. A menor concentração de glicose (50 g/L) favoreceu a produção de ácido cítrico em comparação aos outros reatores, mostrando que concentrações de glicose a partir de 100 g/L inibiram o processo. Porém, foi possível a produção do ácido em 0,25 g/L sem adição de glicose. O crescimento fúngico ocorreu nos reatores da forma filamentosa, isto é, com as hifas dispersas. Em geral, o emprego do fungo *Aspergillus niger* AN400 foi satisfatória para a obtenção de ácido cítrico através da utilização de soro de queijo, contudo, a faixa de pH pode ter evitado a formação de *pellets* pelo fungo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácido Cítrico, *Aspergillus niger*, Soro de Queijo, Batelada, Fermentação.

### INTRODUÇÃO

O ácido cítrico (2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico) com forma estrutural  $C_6H_8O_7$ , representado na Figura 1, é um metabolito intermediário do ácido tricarboxílico que foi isolado pela primeira vez a partir do suco de limão por Scheele em 1784 (KIM *et al.*, 1995; GREWAL e KALRA, 1995; WANG, 1998). O ácido cítrico em seu estado puro é incolor, com peso molecular de 210,14 g/L, solúvel em água, biodegradável e econômico (ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2013).

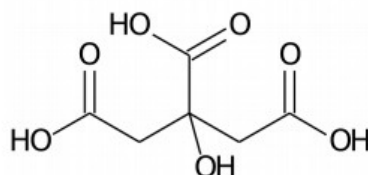


Figura 1. Fórmula estrutural do ácido cítrico.

Grandes quantidades de ácido cítrico são exigidas em escala industrial, por ser ele um importante produto químico multifuncional, com ampla gama de aplicações versáteis, como: em bebidas, alimentos, produtos farmacêuticos e nos ramos industriais (GREWAL e KALRA, 1995; WANG e LIU, 1996).

Dhillon *et al.* (2011a, 2011b) destacaram ainda a aplicação do ácido cítrico na biomedicina – síntese de biopolímeros para a cultura de uma variedade de células humanas, nanotecnologia – como no sistema interno de dosagem de drogas e na agricultura – tais como biorremediação de metais pesados (que se aplica devido a sua propriedade quelante, o ácido cítrico é utilizado para a despoluição de metais pesados dos solos e sedimentos contaminados). Levando em conta suas múltiplas aplicações, a produção do ácido cítrico por fermentação vem aumentando continuamente (GREWAL e KALRA, 1995; WANG, 1998).

A fermentação consiste na conversão microbiológica de produtos orgânicos para material celular e outros produtos úteis, relatando-se alguns problemas enfrentados pelo processo de fermentação são: uso de grande volume de água, exigência de tratamento antes do descarte devido a alta DBO e contaminação por microrganismos estranhos que podem reduzir o rendimento, sendo que é um processo que se mantém - mesmo sendo uma tecnologia antiga - por ser vantajoso, uma vez que tem como base fontes renováveis (ANGUMEENAL e VENKAPPAYYA, 2013).

Um importante aspecto que também deve ser considerado é o potencial de síntese do micro-organismo utilizado no processo de fermentação para a produção de ácido cítrico, devendo-se levar em conta as condições do processo e a composição do meio fermentativo, sendo estas variáveis importantes que, quando otimizadas, podem promover acréscimo ao rendimento de produção (MILLIS, 1985).

Ao longo dos anos, grande variedade de micro-organismos, incluindo fungos, leveduras e bactérias, têm sido utilizados para a fermentação de ácido cítrico. No entanto, quase toda sua demanda mundial é produzida através do emprego do *Aspergillus niger* (FRANCIELO *et al.*, 2008), de modo que sua escolha ocorre em função de vantagens, como: facilidade de manuseio; sua capacidade de fermentar uma ampla variedade de matérias primas de baixo custo; fermenta ácido cítrico em culturas sólidas e submersas; rendimentos elevados; condições de crescimento em pH extremo (2,0) e não geração de substâncias tóxicas (GREWAL e KALRA, 1995; KIM *et al.*, 1995; SASSI *et al.*, 1991). Os fungos filamentosos além de sintetizarem o ácido cítrico também secretam uma série de enzimas extracelulares como *protease*, *amilase*, *celulases*, *lipases*, dentre outras (PASTORE, 2010).

Um subproduto da indústria de laticínios, o soro de queijo é obtido através da coagulação do leite. O soro do queijo contém em sua composição principalmente água (93%), lactose (71%), gordura (12%), proteínas (10%) e alguns sais (11%) (EMBRAPA, 2014). O descarte do soro do queijo como resíduo inútil cria sérios problemas de poluição no meio ambiente. No entanto, o soro do queijo pode ser utilizado em outros processos na produção de laticínios, e até mesmo para o processo fermentativo para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (EL-SAMRAGY *et al.*, 1996), atenuando um agravante ambiental.

A presente pesquisa visa avaliar a viabilidade do soro de queijo no processo fermentativo para a produção de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* AN400 com diferentes concentrações de glicose – 50 g/L, 100 g/L e 150 g/L, e sem glicose, além de observar o comportamento morfológico do fungo no final do processo fermentativo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A espécie fungica *Aspergillus niger* AN400 foi cultivada em placas de petri contendo meio *Saboroud* previamente esterilizado em autoclave. Após 10 dias de cultivo, os esporos foram removidos com a ajuda de solução isotônica contendo Tween 80 e alça de *Drigalsky*, a suspensão foi armazenada para posterior contagem de esporos, e com base no resultado, foi acrescentado nos reatores uma quantidade correspondente a  $2 \times 10^6$  esporos/mL.

## SUBSTRATO

O substrato utilizado na presente pesquisa foi soro de queijo para o processo de fermentação. Não houve diluição do soro, ele foi distribuído *in natura* nos reatores, tendo sido acrescido de nutrientes essenciais para o desenvolvimento fúngico, cujas concentrações foram adaptadas de Pastore (2010) (g/L): Sulfato de Amônio (0,1); Sulfato de Magnésio (1,0) e Fosfato de Potássio (1,0).

Além dos nutrientes, foi acrescentado glicose em três concentrações diferentes (g/L): 50, 100 e 150, em diferentes grupos de reatores. E ainda houve uma série de reatores sem acréscimo de glicose. Os reatores e meio fermentativo foram esterilizados em autoclave a 121°C antes do inóculo.

## MONTAGEM E OPERAÇÃO DOS REATORES

O substrato foi distribuído em alíquotas de 200 mL em elermayer, previamente esterilizados antes da adição do inóculo. Logo após, o pH foi ajustado para 2,5, por se tratar de um pH menos propício para proliferações de bactérias. O ajuste foi feito utilizando ácido sulfúrico PA. Os reatores foram divididos em quatro grupos, três deles recebeu adição de glicose como co substrato.

Assim, a glicose foi aplicada em reatores denominados RFG (reatores com fungos e glicose), nas concentrações de 50, 100 e 150 g/L, de modo que foram montados 5 reatores para cada uma das concentrações mencionadas, totalizando 15 reatores, os quais foram estudados nos tempos reacionais (TR) de 1, 2, 3, 4 e 7 dias.

Também foram montados 5 reatores do tipo RF – sem acréscimo de fonte de carbono – que foram analisados nos mesmos tempos de reação que os reatores do tipo RFG. Na Tabela 1 são apresentados os reatores a serem estudados em função da concentração do cossubstrato e dos tempos reacionais.

Os reatores contendo o meio de fermentação foram incubados em mesa agitadora a uma temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm.

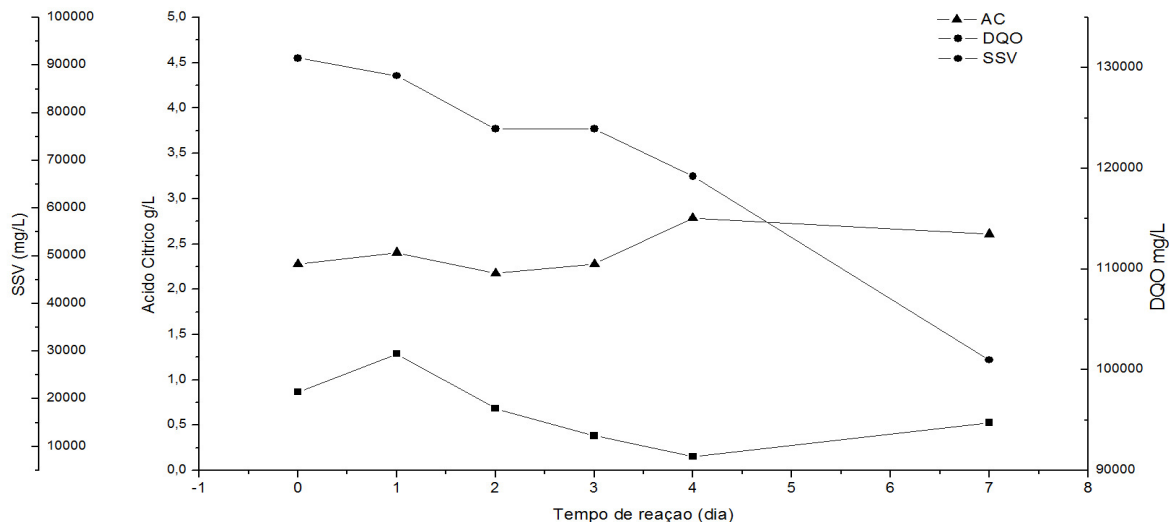
As análises físico-químicas determinadas foram DQO, SSV e pH, segundo APHA (2005), e a de ácido cítrico pelo método modificado de Marier & Boulet (1958).

**Tabela 1. Composição dos reatores a serem estudados em função do cossubstrato a ser adicionado e dos tempos reacionais.**

Reator	Concentração do Cossubstrato (g/L)	Tempo de Reação (dias)				
		1	2	3	4	7
RFGI	50	RFGI1	RFGI2	RFGI3	RFGI4	RFGI5
RFGII	100	RFGII1	RFGII2	RFGII3	RFGII4	RFGII5
RFGIII	150	RFGIII1	RFGIII2	RFGIII3	RFGIII4	RFGIII5
RF	-	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5

## RESULTADOS

A melhor produção de ácido cítrico ocorreu em RFGI, no 4º dia de operação, chegando a 0,51 g/L de ácido cítrico. Nos reatores RFGII e RFGIII o pico também ocorreu no 4º dia, porém foram registrados valores mais baixos, acumulando 0,25 e 0,20 g/L de ácido cítrico durante a fermentação, respectivamente. Já para o RF o pico ocorreu no terceiro dia (0,25 g/L). As Figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam os resultados para ácido cítrico, DQO e sólidos suspensos voláteis para as quatro séries de reatores.



**Figura 2. Resultados de Ácido Cítrico, DQO e Sólidos Suspensos Voláteis para RFGI (50 g/L de glicose).**

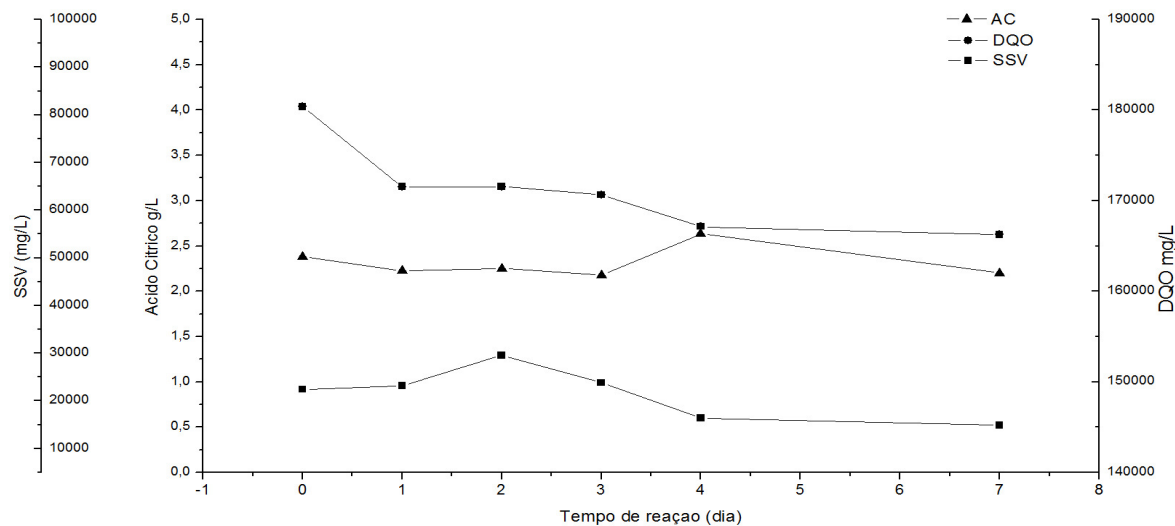


Figura 3. Resultados de Ácido Cítrico, DQO e Sólidos Suspensos Voláteis para RFGII (100 g/L de glicose).

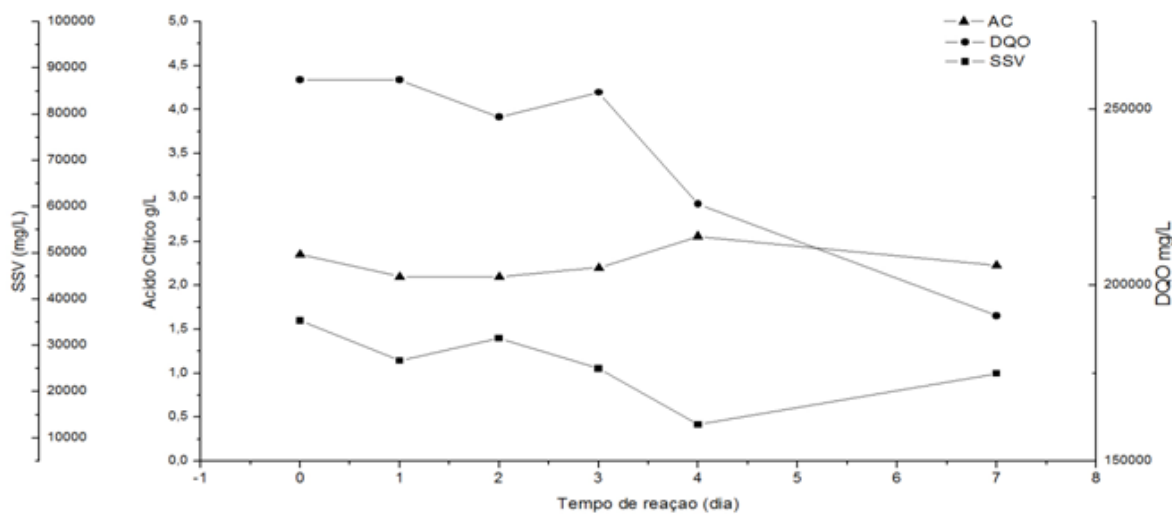
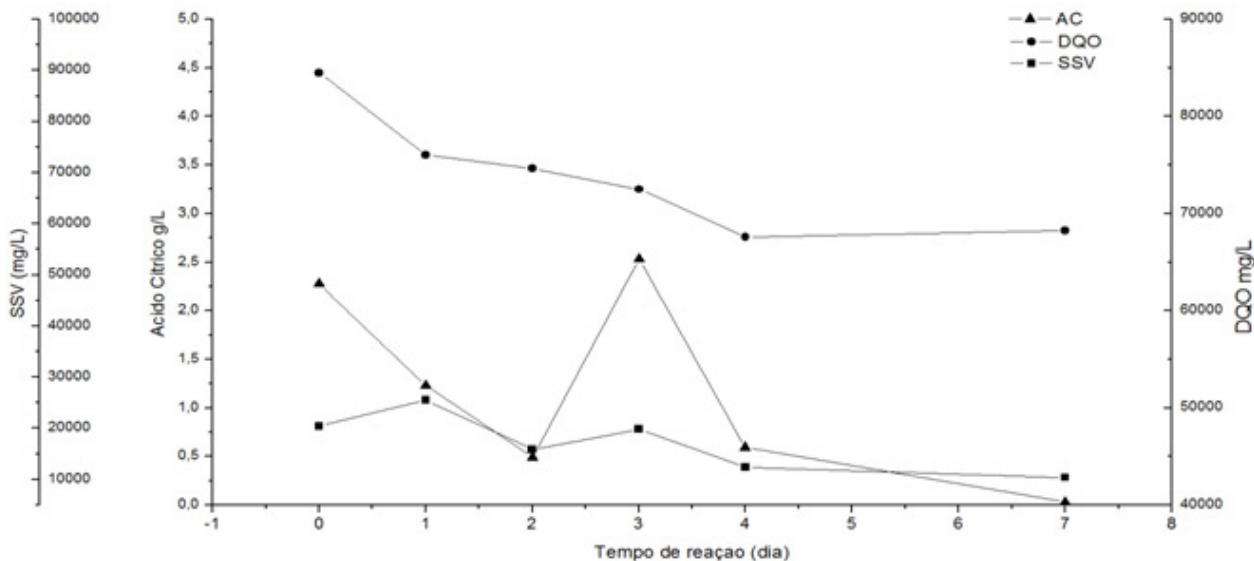


Figura 4. Resultados de Ácido Cítrico, DQO e Sólidos Suspensos Voláteis para RFGIII (150 g/L de glicose).



**Figura 5. Resultados de Ácido Cítrico, DQO e Sólidos Suspensos Voláteis para RF.**

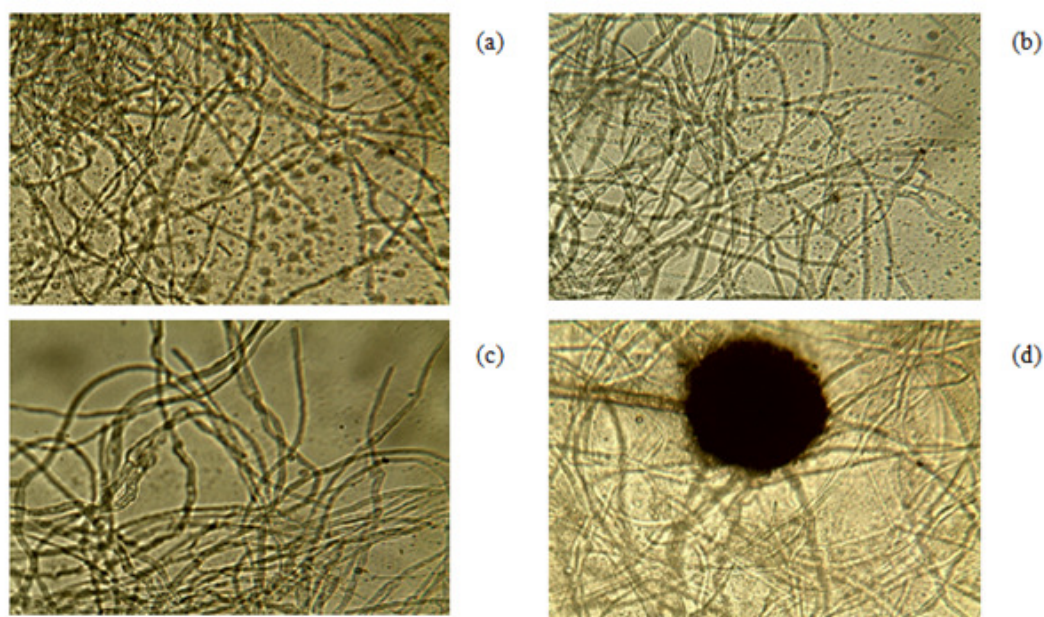
Em todos os reatores foi observada diminuição da concentração de DQO, coincidindo com o pico na produção de ácido cítrico. A redução de DQO entre a entrada e o dia de maior acúmulo de ácido cítrico teve como percentual 9% e 7% para os reatores RFGI e RFGII, nesta ordem, e de 14% tanto para RFGIII como para RF, o que indica o consumo de matéria orgânica para produzir ácido cítrico em contrapartida. Os reatores RFGI, que foram os que mais acumularam ácido cítrico, não foram os que contabilizaram maior redução de DQO, provavelmente porque o ácido cítrico, como é matéria orgânica, foi contabilizado como tal na análise de DQO. Além disso, o menor valor percentual de redução de DQO pode ser atribuído e relacionado com o maior crescimento de biomassa, que também foi contabilizada como DQO na análise. Papagianni e Matthey (2006) fizeram estudos contendo *Aspergillus niger* em diferentes concentrações de glicose, e observaram que baixas concentrações de glicose apresentaram maior concentração de biomassa nas primeiras 48 horas de fermentação, como de fato também foi observado neste estudo, como o aumento dos valores de SSV nas primeiras 24 h para RFGI e RF.

Os valores de SSV oscilaram inicialmente entre uma série e outra de reatores devido à concentração inicial de glicose que é contabilizada no método analítico, nas Figuras 2, 3, 4 e 5, podemos observar valores crescentes a medida que foi introduzido glicose e concentrações diferentes. Além disso, durante o processo fermentativo em mesa agitadora, há um decaimento natural da concentração de sólidos tipicamente presentes no soro de queijo que, devido à rotação da mesa agitadora, se aglomeram, formando uma esfera de gordura, não foi possível homogeneizar esse aglomerado de gordura com o restante da amostra, assim, a alíquota retirada durante os tempos reacionais para utilizar na análise de SSV apresentavam um teor menor de sólidos comparada com a análise do dia inicial, assim sendo, esses sólidos suspensos passíveis de aglomeração não foram contabilizados após o início no processo fermentativo, fazendo que os valores de SSV decaíam em comparação ao valor inicial. Os reatores RFGI e RF também tiveram queda na concentração de SSV por causa do aglomerado de gordura, porém, isto não é visível nas primeiras 24 horas de operação, como mostra as Figuras 2 e 5, pois nestes reatores houve um maior crescimento de biomassa.

El-Samragy *et al.* (1996) relataram testes com soro de queijo, utilizando *Aspergillus niger* CAIM111 e *Aspergillus niger* CAIM167. Utilizaram rotação de 150 rpm e temperatura de 30°C, como neste trabalho. Na primeira fase do seu experimento eles utilizaram quatro faixas de pH diferentes (2,0; 3,5; 4,0 e 5,0), sem adição de fonte de carbono ou qualquer outro nutriente, e obtiveram 0,03 g/L, 1,06 g/L, 0,06 g/L e 0,03 g/L de ácido cítrico, acumulado no 9º dia de fermentação, respectivamente para os valores de pH mencionados. O pH 3,5 foi o melhor para o processo fermentativo em desempenho, promovendo a obtenção de valor superior ao deste trabalho (0,25 g/L) na condição de ausência de glicose.

Porém, no presente estudo, o pico máximo de acúmulo ocorrido durante os testes foi no 3º dia, isso é, três vezes menos tempo que o observado por El-Samragy *et al.* (1996). Além disso, a maior eficiência de acúmulo de ácido cítrico, que corresponde ao RFGI (0,51 g/L), foi obtida com metade do tempo registrado por El-Samragy *et al.* (1986), sendo provável ainda que o menor pH utilizado neste teste tenha determinado uma menor taxa de acúmulo em comparação com o trabalho daqueles autores. Contudo, não foram analisadas amostras nos dias 5 e 6, onde pode ter ocorrido maior acúmulo que não foram evidenciados, principalmente para os reatores que tinham glicose, já que estavam em processo de ascensão de acúmulo no 4º dia de processo.

A morfologia de crescimento do fungo é outro fator que pode determinar a eficiência de acúmulo de ácido cítrico do meio de fermentação. Na Figura 6 são mostradas imagens de microscopia óptica em lente objetiva de x400, que apresentam *Aspergillus niger* AN400 no sétimo dia de fermentação do meio, comprovando que nos reatores houve crescimento da forma filamentososa.



**Figura 6. Microscopia de *Aspergillus niger* AN400 no sétimo dia de reação - (a) RFGI, (b) RFGII, (c) RFGIII e (d) RF.**

O *Aspergillus* é um fungo filamentososo que se reproduz por meio de esporos, formando micélios compostos por hifas septadas e ramificadas. O crescimento do fungo filamentososo pode ocorrer na forma de *pellets*, que seria um emaranhado de hifas formando pequenas esferas, ou na forma filamentososa, quando as hifas crescem dispersas. Para *Aspergillus* os *pellets* formam-se a partir de um aglomerado de esporos, nos estágios iniciais da germinação (PAMBOUKIAN, 1997).

Pamboukian (1997) destacou que há uma morfologia mais adequada para cada tipo de produto que se quer produzir, como por exemplo, para a produção de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* foi observado em testes que o acúmulo maior de ácido cítrico ocorreu com a forma de *pellets* do que com o crescimento filamentososo. Sendo assim, ele ressaltou a importância das condições do meio para a formação de *pellets*, dentre os fatores principais se destacam a agitação utilizada no processo, pH e oxigênio dissolvido. Segundo este mesmo estudo, agitações consideradas altas (600 rpm a 1000 rpm) são fatores limitantes para a formação de *pellets*. Então, verificou-se que a agitação aplicada neste experimento, que foi de 150 rpm, não foi um fator determinante para definir o tipo de crescimento. Porém, o pH utilizado pode ter prejudicado o processo de formação de *pellets* e posteriormente as trocas gasosas. Na Figura 7 estão os valores de pH dos reatores durante os dias de fermentação.

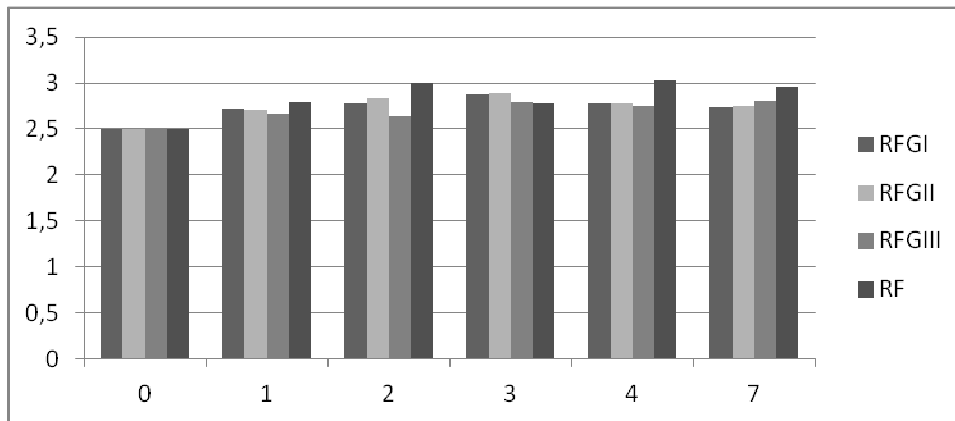


Figura 7. Valores iniciais de pH e valores médios de cada série de reatores.

Pamboukian (1997) explicou que o pH do meio provoca alteração das propriedades eletrostáticas da superfície dos esporos, assim sendo, um baixo valor de pH, como entre 2 e 3, provoca dispersão dos esporos e crescimento filamentosos, e um pH mais alto, como entre 5 e 6, gera aglomeração de esporos e crescimento em *pellets*. Isto é importante de ser observado por que o tipo de crescimento está diretamente ligado ao comportamento reológico do meio, pois, quando o crescimento ocorre da forma filamentosos, que seria quando as hifas estão dispersas pelo caldo de fermentação, o comportamento do caldo é não-newtoniano e altamente viscoso, tornando difícil a agitação, e posteriormente a aeração. No caso do crescimento em *pellets* a dificuldade de transferência de oxigênio reduz, devido à uma menor viscosidade. Mas é difícil haver um consenso na literatura com relação ao pH ótimo para a produção. Autores como Grewal e Kalra (1995), sem levar em conta o tipo de crescimento do fungo, destaca que um valor baixo de pH como sendo essencial para uma produção máxima de ácido cítrico, mas que o pH inicial para o processo de fermentação irá depender de qual fonte de carbono será utilizada, e destaca um pH na faixa de 2,0 como sendo necessário para uma produção ótima para quase todos os substratos.

## CONCLUSÃO

Foi observado que o fungo do tipo *Aspergillus niger* AN400 tem potencial para fermentar soro de queijo no intuito de produzir ácido cítrico e otimizar os resíduos agroindustriais gerando valor agregado, provando que seu descarte sem aproveitamento não é algo a ser considerado. Além disso, o uso de uma baixa concentração de glicose favoreceu o acúmulo de ácido cítrico no caldo de fermentação, obtendo valor de 0,51 g/L, o que seria interessante economicamente, pois uma maior quantidade de glicose utilizada iria aferir maior custo ao processo. Além disso, foi observado que mesmo sem o acréscimo de glicose no caldo de fermentação, ele foi capaz de produzir ácido cítrico utilizando somente o açúcar natural presente no soro, e ainda em um espaço de tempo mais curto. Contudo, outras faixas de pH devem ser testadas para buscar a otimização da fermentação e se possível, uma melhor formação morfológica do fungo durante o processo de crescimento.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que até aqui nos tem ajudado (I Samuel 7:12). Ao CNPq pela concessão das bolsas de iniciação científica, modalidade PIBIT.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANGUMEENAL, A.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. Food Science and Technology, v.50, p.367-370, 2013.
2. DHILLON, G.S., BRAR, S.K., VERMA, M., TYAGI, R.D. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. Food and Bioprocess Technology 4 (4), 505–529, 2011a.
3. DHILLON, G.S., BRAR, S.K., VERMA, M. Citric acid: an emerging substrate for the formation of biopolymers. In: Polymer Initiators. Nova Science Publishers, Inc., NY, USA, ISBN 978-1-61761-304-3, pp. 133–162 (Chapter 4), 2011b.

4. EL-SAMRAGY, Y. A.; KHORSHID, M. A.; FODA, M. I., SHEHATA, A. E. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid from cheese whey by *Aspergillus niger*. International Journal of Food Microbiology, v.29, p.411-416, 1996.
5. EMBRAPA, Instrução técnica para o produtor de leite. Visualizado dia 19 de fevereiro de 2014, às 03:41, em: <http://www.cileite.com.br/sites/default/files/44Instrucao.pdf>
6. FRANCIELO, V., PATRICIA, M., FERNANDA, S.A. Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. Critical Reviews in Biotechnology 28, 1–12, 2008.
7. GREWAL, H.S.; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. Biotechnology, v.13, n.2, p.209-234, 1995.
8. KIM, K.; YOO, Y.; KIM, M. Control of intracellular ammonium level using specific oxygen uptake rate for overproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.79, n.6, p.555-559, 1995.
9. MILLIS, Millis, N. F., The organisms of biotechnology In: MOO-YOUNG M. *Comprehensive Biotechnology*, Oxford: Pergamon, V.1. 1985.
10. PAMBOUKIAN, C. Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori*. Dissertação de Mestrado pela Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
11. PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculums level. Application of network and cluster analysis for characterization of mycelia morphology. Microbial Cell Factories, 5, 3, 2006.
12. PASTORE, N. S. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manipueira como substrato. Dissertação de Mestrado, 2010.
13. SASSI, G.; RUGGERI, B.; SPECCHIA, V.; GIANETTO, A. Citric acid production by *a. niger* banana extract. Bioresource Technology, v.37, p.259-269, 1991.
14. WANG, J. Improvement of citric acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. Bioresource Technology, v.65, n.3, p.243-245, 1998.
15. WANG, JIANLONG & LIU, PING. Comparison of citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized in gels and cryogels of polyacrylamide. *J. Ind. Microbiol.*, 16, 351-353, 1996.