

USO DE SORO DE QUEIJO PARA FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO COMO MEIO DE GERAR VALOR PARA RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

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

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

RESUMO

A presente pesquisa tem como objetivo avaliar a viabilidade de produção de ácido cítrico em meio contendo soro de queijo como caldo fermentativo. O fungo *Aspergillus niger* AN400 foi inoculado da forma dispersa, e incubado em mesa agitadora a 150 rpm. Os reatores foram divididos em quatro grupos, onde três destes teve o meio enriquecido com sacarose nas concentrações de 50 g/L, 100 g/L e 150 g/L, e foram nomeados como RFSI, RFSII e RFSIII, nesta ordem, e um grupo de reatores não teve sacarose, e foi chamado e RF. A maior concentração de ácido cítrico foi observada no RFSIII, onde atingiu 400 mg/L no sétimo de operação, e para os reatores RFSI, RFSII e RF tiveram como concentração máxima 280 mg/L, 170 mg/L e 250 mg/L, respectivamente. Os valores do pH não tiveram muitas alterações, e o oxigênio dissolvido se manteve em limites baixos. O crescimento do fungo foi observado da forma de *pellets* nos reatores RFSI, e no RFSII foi observado crescimento tanto filamentosos como em *pellets*, o outros reatores, RF e RFSIII teve crescimento filamentosos. O uso de sacarose em uma concentração de 15% favoreceu o acúmulo de ácido cítrico ao longo do tempo reacional. Além disso, foi observado que mesmo sem o acréscimo de sacarose 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.

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

INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um dos ácidos orgânicos produzido a granel mais importante e bem estabelecido, é largamente usado nas indústrias alimentícias e de bebidas, além de ter uso aplicado também nas indústrias químicas e farmacêuticas (LEGISA E GRAPULIN, 1995). No ano de 2008, a produção mundial de ácido cítrico foi por volta de 1,6 milhões de toneladas, e a cada ano que passa, a necessidade de produção só tende a aumentar (HUSSEINY *et al.*, 2010).

A produção de ácido cítrico é feita principalmente através da fermentação submersa, ou a base de sacarose através do fungo *Aspergillus niger*, embora existam relatos de fermentação baseado em leveduras, mas é o fungo *Aspergillus niger* o mais empregado (LU *et al.*, 1997). O *Aspergillus niger* é um fungo filamentosos, está entre os micro-organismos de grande relevância biotecnológica, e é utilizado para a produção de vários metabólitos primários, como ácidos orgânicos, e enzimas. Entre os bioprocessos para geração de produtos valorosos, a fermentação de ácido cítrico por *Aspergillus niger* é muito eficiente, uma vez que *Aspergillus niger* pode converter boa parte do substrato no produto final, isso em condições ideais (JERNEJC e LEGIŠA, 2004).

A escolha do resíduo para fermentação depende de várias características, mas as principais são custos e disponibilidade, por isso, em destaque estão os resíduos agroindustriais, por terem um baixo custo e disponíveis em larga escala (TREICHEL *et al.*, 2010). A capacidade que o processo tem de utilizar resíduos agroindustriais e outros resíduos de hidrocarbonetos para a geração de produtos com valor agregado pode ser usada para reduzir significativamente os custos com tratamentos de resíduos gerados pela indústria (MAFAKHER *et al.*, 2010).

Este trabalho tem como objetivo estudar diferentes concentrações de sacarose para o caldo de fermentação contendo soro de queijo inoculado com *Aspergillus niger* AN400 disperso no meio, além de utilizar meio sem adição de sacarose a fim de comparação. No entanto, o principal objetivo é buscar valor agregado, utilizando um resíduo que poderia vir a ser descartado gerando custos para o tratamento e tornando o resíduo um potencial poluidor, caso esse tratamento não fosse eficaz. O processo será realizado por meio de batelada de desmonte agitada, com o fungo inoculado de forma dispersa. Será verificado também o tipo de crescimento ao final do processo, como também avaliado ao longo da fermentação as concentrações de Oxigênio Dissolvido e a variação do pH no meio.

MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo *Aspergillus niger* AN400 foi cultivada em placas de Petri contendo meio *Saboroud*, previamente esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 minutos. Após 10 dias de cultivo, nos quais as placas foram mantidas a uma temperatura de 28°C, os esporos foram removidos utilizando uma solução isotônica contendo Tween 80 e com ajuda de alça de *Drigalsky*. A suspensão foi armazenada para posterior contagem de esporos, que ocorreu com o auxílio de um microscópio e utilização de Câmara de *Neubauer* para a contagem e, com base no resultado obtido, foi acrescentado nos reatores uma quantidade correspondente a 2×10^6 esporos/mL.

SUBSTRATO

O substrato utilizado na presente pesquisa para o processo de fermentação foi soro de queijo. As coletas do soro foram realizadas em uma fazenda. As amostras, após coletadas, foram acondicionadas em gelo durante a viagem e logo após a chegada ao laboratório feita análises de caracterização do efluente.

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 sacarose em três concentrações diferentes (g/L): 50, 100 e 150, em diferentes grupos de reatores. E ainda houve uma outra série de reatores que não teve acréscimo de fonte de carbono. 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 *erlenmeyers*, 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 e o mais usual para a maioria dos cossubstratos para a fermentação de ácido cítrico. O ajuste foi feito utilizando ácido sulfúrico PA. Os reatores foram divididos em quatro grupos, três deles receberam adição de sacarose como cossubstrato.

Assim, a sacarose foi aplicada em reatores denominados RFS (reatores com fungos e sacarose), 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 foi montada mais uma série de reatores do tipo RF – reatores com fungo –, sem acréscimo de fonte de carbono. Estes foram analisados nos mesmos TR que os reatores do tipo RFS. 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 determinadas foram Oxigênio Dissolvido (OD) e pH, segundo Apha (2005), e a de ácido cítrico pelo método modificado de Marier & Boulet (1958). Além de tudo, no final do processo fermentativo, foi observado o tipo de crescimento do fungo por meio de microscopia.

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

Reator	Concentração do Cossubstrato	Tempo de Reação (dias)				
		1	2	3	4	7
RFSI	50 g/L	RFSI1	RFSI2	RFSI3	RFSI4	RFSI5
RFSII	100 g/L	RFSII1	RFSII2	RFSII3	RFSII4	RFSII5
RFSIII	150 g/L	RFSIII1	RFSIII2	RFSIII3	RFSIII4	RFSIII5
RF	-	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5

RESULTADOS

A melhor produção de ácido cítrico ocorreu em RFSIII, no sétimo dia de operação, chegando a 400 mg/L de ácido cítrico. Para os reatores RFSI, o máximo de produção ficou em 280 mg/L, e para RFSII 170 mg/L, ambos tiveram pico de produção no quarto dia de fermentação. O reator RF, onde não houve adição de sacarose, produzir 250 mg/L de ácido cítrico no 3º dia de fermentação. A Figuras 1 mostra as concentrações de ácido cítrico ao longo do TR para os reatores com e sem sacarose.

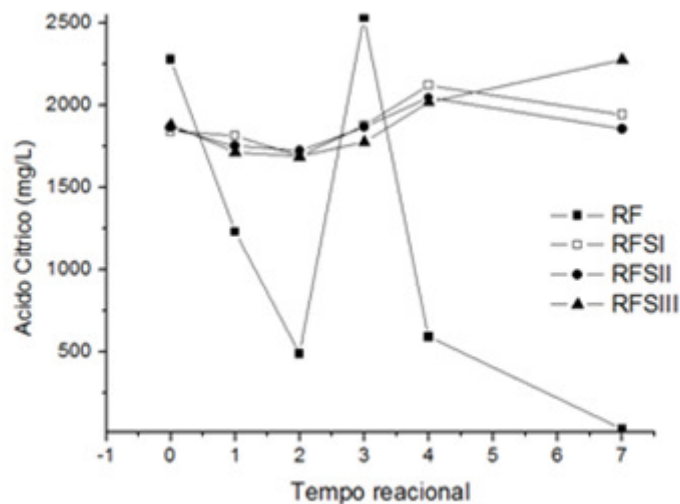


Figura 1. Variação de ácido cítrico ao longo do período de fermentação.

Todos os reatores com sacarose apresentaram decaimento nas primeiras 48 horas e elevação da produção a partir do 3º dia de fermentação, porém não foi possível saber se continuaram em ascensão no 5º e 6º dia. O reator RF apresentou queda bem acentuada da quantidade inicial de ácido cítrico nas primeiras 48 horas, o teve seu pico no 3º dia e depois tornou a cair. Observado os valores e o tempo que levou para produzir, a utilização das concentrações 5% e 10% não são vantajosas se levado em conta o que foi produzido por RF e o tempo que se deu para produzir. Os valores de produção de RF e RFSI foram próximos, porém RFSI levou 24 horas a mais para alcançar seu pico que RF, além de tudo, o acréscimo de açúcar implica em um custo adicional, e só seria vantajoso usar esta concentração se a produção fosse superior. O reator RFSII foi o que menos produzir dentre todos.

A natureza dos açúcares e suas concentrações podem influenciar diretamente na produção de ácido cítrico (GREWAL e KALRA, 1995). Estudos relataram que a sacarose é a fonte de carbono mais favorável, seguida por glicose, frutose e lactose (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003), e devido a isso que provavelmente o RF não foi superior a todos os reatores contendo sacarose.

Além de tudo a concentração da fonte de carbono é crítica para a fermentação, de modo que concentrações abaixo de 2,5% não produzem ácido cítrico (XU *et al.*, 1989a), sendo defendida a faixa ótima entre 10% e 14% (XU *et al.*, 1989a; XU *et al.*, 1989b), no entanto, a concentração de 10% (RFSII) não foi favorável em comparação ao RFSIII (15%), um pouco acima do que é relatado na literatura.

Pastore (2010), ao usar manipueira como substrato no meio, enriquecido com sacarose, obteve seus melhores resultados com a concentração de 50 g/L de sacarose, porém nesse trabalho isso não ocorreu, a concentração de 50 g/L de sacarose juntamente com o soro de queijo não favoreceu em relação ao RFSIII, usando 150 g/L do açúcar.

Houve pouca variação do pH e do OD no período de fermentação. As Figuras 2 e 3 mostra a variação de pH e OD durante o tempo reacional, respectivamente.

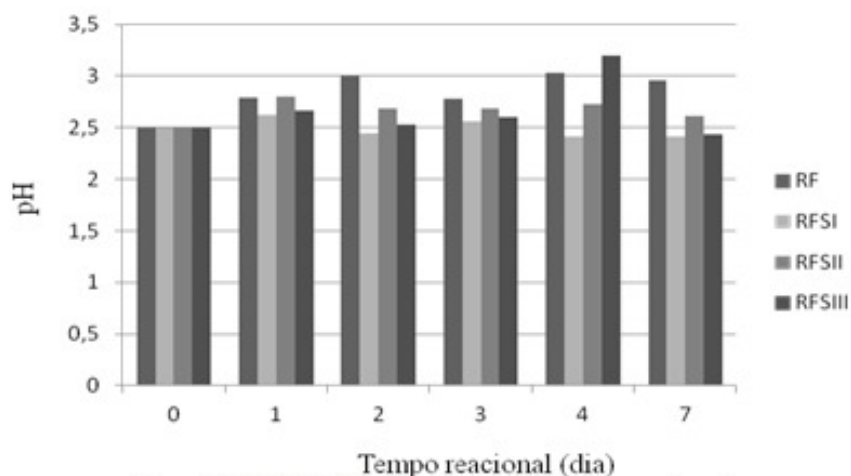


Figura 2. Variação do pH ao longo do tempo reacional.

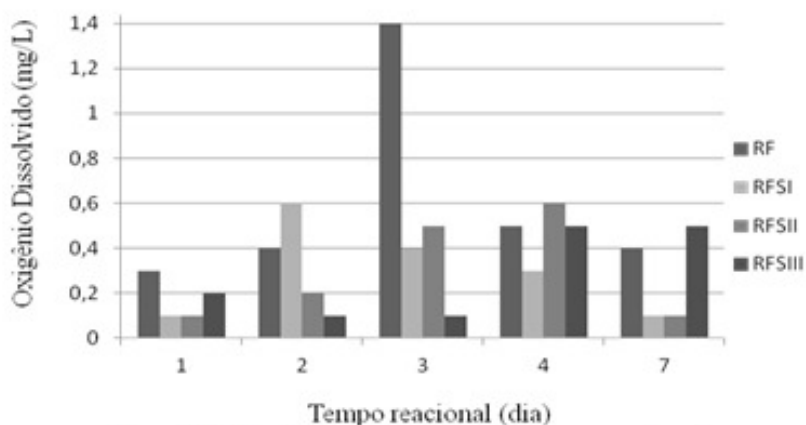


Figura 3. Variação do OD ao longo do tempo reacional.

A produção de ácido cítrico ocorre durante a fermentação aeróbia, mas durante essa fermentação, o micro-organismo cresce lentamente quando o oxigênio dissolvido é fornecido de maneira insuficiente, no entanto, se o oxigênio dissolvido for excessivo, o acúmulo de ácido cítrico também será limitado (ZHENG, 1999).

O oxigênio dissolvido está intimamente ligado ao pH, pois, segundo Pamboukian (1997), 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.

Autores como Grewal e Kalra (1995), sem levar em conta o tipo de crescimento do fungo, destacaram que um valor baixo de pH é 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, ressaltando que um pH a partir de 2,0 é necessário para uma produção ótima para quase todos os substratos.

Foi observado nos reatores um crescimento do tipo filamentosos, com exceção do RFSI que teve formação de *pellets* durante o crescimento, e o reator RFSII, por mais que tenha tipo crescimento filamentosos, como pode ser observado na Figura 4.c., foi possível achar alguns *pellets* durante a microscopia (sem imagens). A Figura 4 mostra imagens do tipo de crescimento de cada reator no final dos 7 dias de fermentação do soro de queijo.

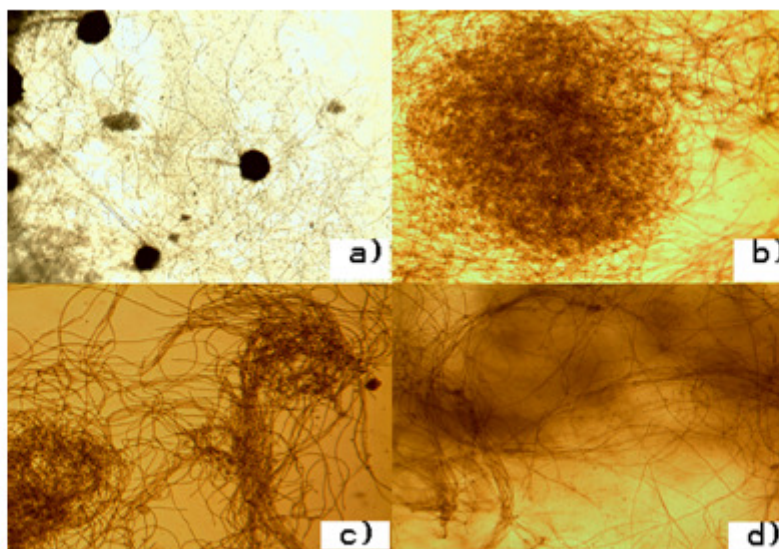


Figura 4. Microscopia dos reatores no 7º dia de operação, em aproximação de 100x: a) RF, b) RFSI, c) RFSII e d) RFSIII.

CONCLUSÃO

Foi observado que o fungo *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 sacarose em uma concentração de 15% favoreceu o acúmulo de ácido cítrico ao longo do tempo reacional. Além disso, foi observado que mesmo sem o acréscimo de sacarose 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, para buscar melhorias nas trocas gasosas.

REFERÊNCIAS

1. APHA. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. American Water Work Association, Water Environment Federation, 20ª Edição, 2005.
2. GREWAL, H.S.; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. *Biotechnology*, v.13, n.2, p.209-234, 1995.
3. HUSSEINY, S. M.; HELEMISH, F. A.; YOUNIS, N. A; FARAG. S. S. Selection of most potent *Aspergillus niger* isolates growing on different carbohydrate by products for citric acid production. *J. Am. Sci.* 6, 1222-1229, 2010.
4. LESIGA, M.; GRAPULIN, M. G. Sudden substrate dilution induces a higher rate of citric production by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2732-2737, 1995.
5. LU, M.; BROOKS, J. D.; MADDOX, I. S. Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 392-397, 1997.
6. MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology*, v. 27, n.4, 2010.
7. MARIER, J. R.; BOULET, M. J. *Dairy Sci.* 41, 1683±1692, 1956.
8. 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.
9. 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.
10. SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 205-218, 2003.

11. TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 3, 182–196, 2010.
12. XU, D. B.; MADRID, C. P.; M. R/SHR AND C.P. KUBICEK, The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *A. niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 553-558, 1989a.
13. XU, D. B.; KUBICEK, C. P.; RRHR, M. A comparison of factors influencing citric acid production by *A. niger* grown in submerged culture and on filter paper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 444-449 (1989)b.
14. ZHENG, Y.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. Citric acid production from the mash of dried sweet potato with its dregs by *Aspergillus niger* in an external-loop airlift bioreactor. *Process Biochemistry*, n.35, p.237-242, 1999.