

## PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *ASPERGILLUS NIGER* EM REATORES CONTENDO SACAROSE A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE SORO DE QUEIJO

Alyne Vasconcelos Cavalcante (\*), Nathália Araújo Magalhães, Glória Maria Marinho Silva, Carlos Ronald Pessoa Wanderley, Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa

\* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE - email: alyneifce@gmail.com

### RESUMO

Neste trabalho foi estudada a viabilidade de produção de ácido cítrico pela espécie *Aspergillus niger* AN400 utilizando soro de queijo como substrato. Foram montados reatores com diferentes concentrações de sacarose: 50 g/L para os reatores RFSI, 100 g/L para RFSII e 150 g/L para RFSIII. Os reatores foram operados em mesa agitadora com rotação de 150 rpm e temperatura de 30°C e os resultados para ácido cítrico foram de 0,28 e 0,17 g/L para RFSI e RFSII, respectivamente. No reator RFSIII o acúmulo do ácido chegou a 0,4 g/L, tendo sido o mais favorável. Os reatores tiveram máxima de produção em tempos reacionais distintos havendo máxima no 7º dia de produção para RFSIII e no 4º dia para RFSI e RFSII. Em geral, todos os reatores tiveram redução da concentração de DQO e aumento consecutivo de biomassa coincidindo com aumento do acúmulo de ácido cítrico. Fatores como pH e concentrações de oxigênio dissolvido são de grande importância e devem se adequar às condições que o fungo necessita para otimização do processo, sendo que a aplicação de *Aspergillus niger* AN400 foi viável para fermentar soro de leite no intuito de produzir ácido cítrico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácido cítrico, fermentação, soro de queijo, sacarose, *Aspergillus niger*.

### INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é o segundo maior produto de fermentação do mundo, ficando atrás somente da fermentação do etanol industrial, sendo que, entre os ácidos orgânicos, domina em primeiro lugar, apresentando bioprodução de mais de 1,7 milhões de toneladas por ano, com taxa anual de crescimento de 5% (FRANCIELO *et al.*, 2008). As condições de fermentação de ácido cítrico foram estabelecidas durante os anos 1930 e 1940, quando os efeitos de vários componentes do meio foram avaliados, mas apesar de extensa pesquisa bioquímica básica realizada com *Aspergillus niger*, a compreensão dos eventos relevantes para a acumulação de ácido cítrico não é completamente compreendida (PAPAGIANNI, 2004). Grandes quantidades de ácido cítrico são exigidas em escala industrial, por ser ele um importante produto químico multifuncional, com ampla gama de aplicações versáteis, tais como em bebidas, alimentos, produtos farmacêuticos e nos ramos industriais (GREWAL e KALRA, 1995; WANG e LIU, 1996). O soro de queijo, considerado um dos grandes poluentes da indústria de laticínios, é rico em lactose, gorduras e proteínas, é pouco aproveitado para fins alimentícios, tendo grandes volumes desperdiçados enviados para nutrição de suínos, ou direcionados a mananciais de água, contaminando drasticamente corpos receptores e gerando problemas ambientais como alta demanda bioquímica de oxigênio (SERPA, PRIAMO, REGINATTO, 2009). As alternativas de valorização de resíduos através do seu aproveitamento tem sido muito incentivada, já que podem contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica desses resíduos tornando-os um subproduto e, deste modo, agregando valor ao processo de agro industrialização (PASTORE, 2010). A acumulação de ácido cítrico é fortemente influenciada pelo tipo e concentração da fonte de carbono. O tipo de fonte de carbono pode ser variada de acordo com o micro-organismo utilizado. Para *Aspergillus niger*, a sacarose é o substrato mais favorável entre os substratos de carbono facilmente metabolizados, seguido por glicose, frutose e galactose. O melão também é frequentemente utilizado como matéria - prima para a produção de ácido cítrico pelo fungo (YALCIN *et al.*, 2010). Alguns trabalhos destacam o uso de soro desproteínizado e evaporado e que, em particular, seria necessário estabelecer uma temperatura e valores de pH ideais para certas linhagens, dentre elas, *Aspergillus niger*. Por outro lado, é necessário estudar condições de pré-adaptação do fungo ao meio para identificar como condições de pré-cultivo podem afetar os rendimentos do ácido durante a fase de produção (TORO *et al.*, 2004). Grandes quantidades de soro de leite são produzidas em todo o mundo como um subproduto do queijo e outros produtos lácteos. Em regiões como o Oriente Médio é geralmente considerado um lixo e descartado no sistema de esgoto, sendo deixado uma pequena quantidade para que animais domésticos possam bebê-lo (EL-HOLI e AL-DELAIMY, 2003). Estudos atuais visam propor alternativas para o aproveitamento economicamente viável e ambientalmente correto do soro de queijo, reduzindo seu impacto ambiental e oferecendo uma proposta de destino a seus componentes (SERPA, PRIAMO, REGINATTO, 2009).

## OBJETIVO

O presente trabalho objetivou estudar o processo fermentativo na produção do ácido cítrico por *Aspergillus niger* a partir de soro de queijo, adicionando-se ao mesmo três concentrações diferentes de cossustrato, no caso, sacarose nas concentrações 50 g/L, 100 g/L e 150 g/L, identificados como I (5%), II (10%) e III (15%), respectivamente.

## METODOLOGIA

### Substrato

O substrato utilizado foi soro de queijo, cujas coletas foram realizadas em uma fazenda situada no distrito de Sobral – Ceará. As amostras coletadas foram acondicionadas em gelo durante a viagem e, logo após a chegada ao laboratório, foram realizadas análises para sua caracterização. O soro *in natura* foi 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). Depois de ajustado o pH para 2,5, por se tratar de um pH menos propício para proliferações de bactérias, foram distribuídos 200 mL do soro em erlenmeyers de 250 mL que foram empregados como reatores. O ajuste foi feito utilizando ácido sulfúrico PA.

### Cultivo, produção e contagem do inóculo

Os esporos de *Aspergillus niger* AN400 foram cultivados em placas de Petri estéreis contendo 15 mL de meio de cultura *Saboraud*, previamente esterilizado a 121°C, durante 15 minutos. Após 10 dias em estufa bacteriológica, ao se observar o crescimento do fungo por toda placa, a remoção dos esporos das placas de Petri foi realizada com uso de alça de Drigalsky e solução isotônica contendo Tween 80, e a suspensão de esporos transferida para um frasco e mantida sob refrigeração a 0°C. A suspensão foi descongelada e agitada para melhor homogeneização e previamente agitada em agitador tipo vórtex. Depois de realizada a contagem dos esporos em câmara de Neubauer, uma quantidade correspondente a  $2 \times 10^6$  esporos/mL foi acrescentada aos reatores, após serem autoclavados, com os 200 mL de soro já distribuídos.

### Montagem e operação dos reatores em batelada sob agitação

Os reatores foram divididos em três grupos que receberam sacarose, sendo que esta foi adicionada nas concentrações de 50, 100 e 150 g/L nos diferentes grupos de reatores. Os reatores contendo os 200 mL de soro com nutrientes, pH ajustado e sacarose foram esterilizados em autoclave a 121°C antes do inóculo. Após a adição do inóculo, os reatores foram incubados em mesa agitadora a uma temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm. Foram divididos em dois tipos: 15 reatores controle (RCS I, RCS II e RCS III) e 15 reatores com fungos (RFS I, RFS II e RFS III). Na Tabela 1 os reatores estão esquematizados conforme os tipos e tempos reacionais. Durante o experimento foram realizadas análises de: demanda bioquímica de oxigênio (DQO), sólidos suspensos voláteis e a de ácido cítrico pelo método modificado de Marier & Boulet (1958). Todas as análises físicas e químicas foram executadas de acordo com os métodos descritos em APHA (2005).

Tabela 1. Distribuição de reatores controle e reatores com fungos.

Reatores	Concentração de Sacarose (g/L)	Tempo de Reação (dias)				
		1	2	3	4	7
RCSI	50	RCSI1	RCSI2	RCSI3	RCSI4	RCSI5
RCSII	100	RCSII1	RCSII2	RCSII3	RCSII4	RCSII5
RCSIII	150	RCSIII1	RCSIII2	RCSIII3	RCSIII4	RCSIII5
RFSI	50	RFSI1	RFSI2	RFSI3	RFSI4	RFSI5
RFSII	100	RFSII1	RFSII2	RFSII3	RFSII4	RFSII5
RFSIII	150	RFSIII1	RFSIII2	RFSIII3	RFSIII4	RFSIII5

## RESULTADOS

Na Figura 1 é apresentada a variação dos resultados para ácido cítrico em reatores controle e reatores com fungos. Dentre os reatores, o melhor acúmulo de ácido cítrico ocorreu em RFSIII, no 7º dia de operação, chegando a 0,4 g/L. Nos reatores RFSI e RFSII o pico ocorreu no 4º dia, porém foram registrados valores mais baixos, acumulando 0,28 e 0,17 g/L de ácido cítrico durante a fermentação, respectivamente. Segundo Penna (2001) *apud* Pastore *et al.* (2011), as baixas concentrações de açúcares facilitam o acúmulo de ácido oxálico, e, conseqüentemente, diminuem a produção de ácido cítrico. Os dias 5 e 6 não foram avaliados e, provavelmente, pode ter ocorrido maior acúmulo que não foi registrado, já que estavam com tendência ao acúmulo no 4º dia do processo. Com redução dos níveis de sacarose, o micro-organismo pode ter consumido o próprio ácido cítrico, não sendo possível afirmar que houve maior ou menor produção. De acordo com Honecker *et al.* (1989), concentração elevada de sacarose faz com que células livres precisem de pressão osmótica elevada para a produção de ácido cítrico, ao passo que células imobilizadas necessitam de uma concentração inicial de sacarose de pelo menos 160 g/L para uma produção de cerca de 50 g/L de ácido cítrico durante 28 dias de fermentação. Ainda conforme os mesmos autores, a diminuição do acúmulo de ácido cítrico utilizando altas concentrações de sacarose foi acompanhada de um aumento da formação de polióis, tais como glicerol, eritritol e arabitol. Os processos industriais operam com uma concentração inicial de sacarose de aproximadamente 140 g/L, o que é particularmente importante para explorar a possibilidade de estirpes diferentes assimilarem açúcares redutores obtidos a partir da hidrólise enzimática de concentrações de lactose do soro do leite. Tais processos atingem aproximadamente 83 g/L de ácido cítrico. Evaporando as concentrações de soro de leite hidrolisado podem ser obtidos até 165g/L, o que significa uma disponibilidade suficiente de substrato para cultivar vários tipos de micro-organismos, incluindo fungos que produzem o ácido cítrico (TORO *et al.*, 2004).

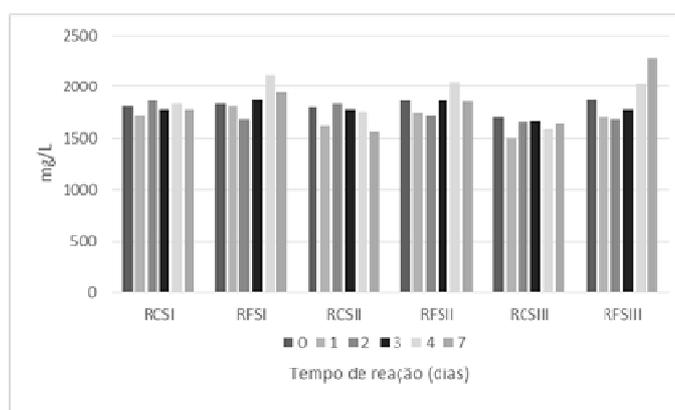


Figura 1. Valores de ácido cítrico para reatores controle (RCS) e reatores com fungos (RFS).

De forma geral foi observada diminuição da concentração de DQO em todos reatores com fungos, como mostra a Figura 2, coincidindo com o pico na produção de ácido cítrico em RFSI e RFSII, que foi o 4º dia. Os reatores RFSIII, embora tenham acumulado mais ácido cítrico, não contabilizaram maior redução de DQO, provavelmente porque o ácido cítrico, como se trata de matéria orgânica, foi contabilizado na análise de DQO. Isto mostrou que houve um aproveitamento da matéria orgânica inicial, com sua conversão em ácido cítrico, que é produto de grande interesse industrial.

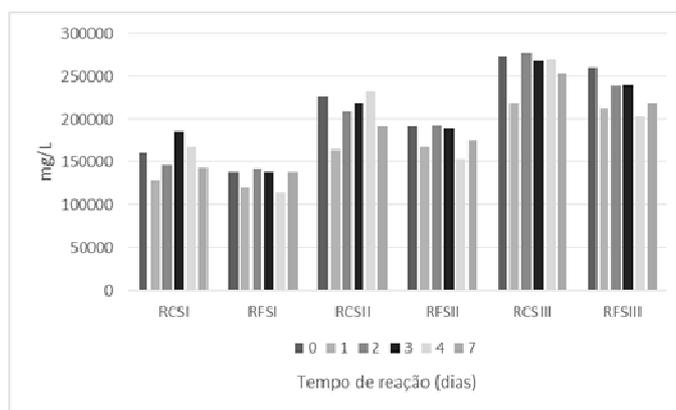


Figura 2. Variação da demanda química de oxigênio (DQO) para reatores controle (RCS) e reatores com fungos (RFS).

A fermentação de ácido cítrico é um processo essencialmente aeróbio e os micro-organismos requerem abundante suprimento de oxigênio para crescimento (SÁ, 2011). Os valores de oxigênio dissolvido ficaram entre 0,1 e 0,6 mg/L. Igualmente importante é um baixo valor de pH que é essencial para uma produção máxima de ácido cítrico, conforme destacaram Grewal e Kalra (1995). Tais autores destacaram um valor de pH 2,2 como ideal, ressaltando que o pH inicial depende da fonte de carbono utilizada. Dentre os carboidratos metabolizados, a sacarose é a fonte de carbono mais favorável, seguido de glicose, frutose e galactose. Durante a fermentação, neste trabalho, os valores de pH permaneceram entre 2,41 e 3,2. Conforme 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*, que, conseqüentemente, não foram observados. Na Figura 3 é notado que a partir do dia 2, os resultados dos sólidos suspensos voláteis em reatores com fungos aumentaram, quando comparados com seus respectivos reatores controles.

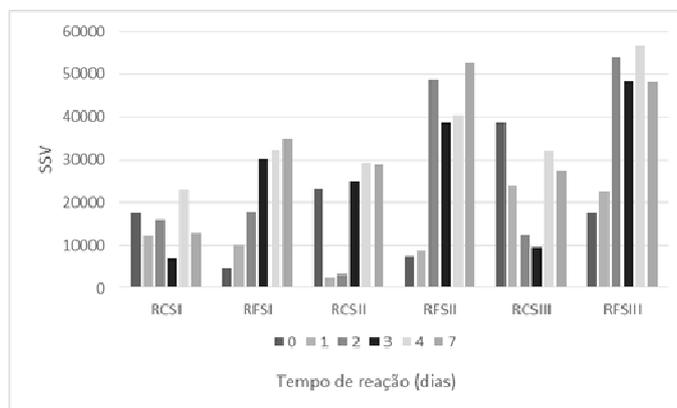


Figura 3. Variação de sólidos suspensos voláteis (SSV) para reatores controle (RCS) e reatores com fungos (RFS).

Experimentos realizados por El-Holi e Al-Delaimy (2003), com concentrações de 15% (v/v) de sacarose e utilizando a espécie *Aspergillus niger* ATCC9642, apresentaram aumento consecutivo de biomassa durante vinte dias de fermentação. Verificaram aumento na produção de ácido cítrico juntamente com a biomassa, seguido por diminuição

constante de açúcar residual. Eles encontraram um valor de 2,43 g/L de ácido cítrico produzido a partir de soro por si só, e uma produção de 106,5 g/L, com uso de 150g de sacarose. Significativamente menores valores foram obtidos utilizando a mesma concentração de outros açúcares. A fraca produção do ácido a partir de soro de leite sozinho se crê ser, pelo menos em parte, devido à presença da porção de lactose no soro (Hossain *et al.*, 1984). Um aumento gradual foi obtido para os valores de ácido cítrico atingindo o seu máximo de 83,7 g/L, após 16 dias, seguido por um decréscimo para 42 g/L, após 20 dias. Estes aumentos dos valores do ácido e os valores de biomassa foram acompanhados com progressiva diminuição de açúcar residual e do pH.

## CONCLUSÃO

A aplicação da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN400 é viável para fermentar soro de leite no intuito de produzir ácido cítrico e o uso de uma alta concentração de sacarose favoreceu o acúmulo de ácido cítrico no caldo de fermentação, obtendo valor de 0,4 g/L. Os valores industriais são superiores aos valores alcançados nas condições deste trabalho, confirmando a necessidade de teste em outras faixas de pH para buscar a otimização da fermentação e para que tais valores sejam viáveis para escala industrial. Nos dias 5 e 6 pode ter ocorrido ou não acúmulo nos reatores com sacarose, pois notou-se um aumento da produção no dia 4. As grandes aglomerações com longos filamentos aumentam a viscosidade do caldo para o ponto em que o oxigênio se torna um nutriente limitante, e neste trabalho as taxas de oxigênio dissolvido ficaram abaixo de 1 mg/L. Tal condição juntamente com as possíveis contaminações e a presença de gorduras, ainda que minimizadas, certamente influenciaram nos resultados finais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apha. Standard Methods for examination of Water and Wastewater American Water Works Association, Water Environment Federation, 20ª edição, 2005.
2. El-Holi. M.A.; Al-Delaimy, K.S. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. African Journal of Biotechnology, vol. 2 (10), pp. 356-359, 2003.
3. Franciolo, V., Patricia, M., Fernanda, S.A. Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. Critical Reviews in Biotechnology 28, 1–12, 2008.
4. Grewal, H.S.; Kalra, K.L. Fungal production of citric acid. Biotechnology. v.13, n.2, p.209-234, 1995.
5. Honecker, S.; Bisping, B.; Yang, Z.; Rehm, H-J. Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Appl Microbiol Biotechnol, 31, p. 17-24, 1989.
6. Hossain M, Brooks J.D, Maddox, I.S. The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 393-397, 1984.
7. Pamboukian, C. Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicocamilase por *Aspergillus awamori*. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
8. Pastore, N. S. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manífera como substrato. Dissertação (Mestrado). Toledo, 2010.
9. Pastore, N.S.; Hasan, S.M.; Zempulski, D.A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. Engevista, v. 13, n. 3. p. 149-159, 2011.
10. Sá, T.N.M. Produção de ácido cítrico utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como substrato. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Fortaleza, 2011.
11. Serpa, L.; Priamo, W.L.; Reginatto, V. Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica. 2nd International Workshop - Advances in Cleaner Production. Key elements for a sustainable world: energy, water and climate change. São Paulo, Mai. 2009.
12. Toro, O.J.S.; Buritica, M.C.O.; Garcés, A.L.B. Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp*. Revista Colombiana de Tecnología. v.6, n.1, Jul. 2004.

13. Wang, J.; Liu, P. Comparison of citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized in gels and cryogels of polyacrylamide. J. Ind. Microbiol., 16, 351-353, 1996.
14. Yalcin, S.K.; Bozdemir, M.T.; Ozbas, Z.Y. Citric acid production by yeasts: Fermentation conditions, process optimization and strain improvement. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2010.