

XII-061 - INFLUÊNCIA DA SACAROSE PARA FERMENTAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

Nathália A. Magalhães⁽¹⁾

Gestora Ambiental e graduanda em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará.

Alyne Vasconcelos Cavalcante

Licenciada em Química pela Universidade Estadual do Ceará e graduanda em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará.

Carlos Ronald Pessoa Wanderley

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará. Mestre em Engenharia Civil (Saneamento Ambiental) pela Universidade Federal do Ceará. Doutorando em Engenharia Civil (Recursos Hídricos) pela Universidade Federal do Ceará.

Glória Maria Marinho Silva

Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará. Mestre em Engenharia Civil (Saneamento Ambiental) pela Universidade Federal do Ceará. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

Kelly Rodrigues

Engenheira Civil pela Universidade Estadual do Maranhão. Mestre em Engenharia Civil (Saneamento Ambiental) pela Universidade Federal do Ceará. Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

Endereço⁽¹⁾: Av. Treze de Maio, 2081 - Benfica - Fortaleza - CE - CEP: 60040-250- Brasil - Tel: (85) 3307-3750 - e-mail: nathaliamagalhaes.tga@gmail.com

RESUMO

Soro de queijo foi usado no processo de produção de ácido cítrico utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* AN 400. Os reatores foram divididos em quatro séries, onde a variação entre eles foi a concentração de sacarose inicial. Foi incrementado no caldo de fermentação sacarose a 50, 100 ou 150 g/L, além de existir uma série de reatores sem adição de açúcar extra. Os reatores foram inoculados em forma dispensa e incubado em mesa agitadora a 150 rpm a uma temperatura de 30°C. Os reatores com 150 g/L de sacarose apresentaram um melhor desempenho, chegando a acumular 1803,3 mg/L de ácido cítrico no 10º dia de fermentação, enquanto os reatores contendo 100 g/L não favoreceu a fermentação e foi o que mesmos produziu, apresentando uma concentração máxima de 1092,5 mg/L de ácido cítrico.

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

INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é obtido através da fermentação da sacarose, 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 (HOSSAIN *et al.*, 1983; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). 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).

A maior parte do ácido cítrico é produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* (EL-AASAR, 2006). A produção comercial do ácido cítrico é feito em maior escala por fermentação submersa, contendo excesso de açúcar em meio utilizando o fungo *Aspergillus niger* (VANDENBERGHE *et al.*, 2000). Um dos maiores problemas para a fermentação de ácido cítrico está ligado ao custo do processo, onde o substrato a ser empregado para a fermentação apresenta um alto valor, e, para tentar reduzir os custos empregados, a tendência é que se utilize resíduos agroindustriais como substrato para o meio de fermentação (LEONEL e CEREDA, 1995).

A indústria de laticínios é uma das grandes geradoras de resíduos, com a produção de queijo geram-se grandes volumes de soro, que pode ser posteriormente descartado caso não aplicado em outro processo. Seu desperdício e impacto podem ser minimizados com a utilização deste resíduo como matéria prima para a produção de ácido cítrico, além de tudo, os custos de produção do ácido podem ser menos dispendiosas por utilizar um resíduo facilmente disponível (EL-AASAR, 2006). Vários pesquisadores já vêm estudando a possibilidade de utilizar o soro de queijo como substrato de fermentação (EL-AASAR, 2006; EL-SAMRAGY *et al.*, 1996; EL-HOLI e AL-DELAIFY, 2003; DHILLON *et al.*, 2011).

A utilização de resíduos agroindustriais não é importante somente no ponto de vista econômico, mas também ambiental, pois além de reduzir o impacto causado na natureza, ainda gera valor aos resíduos agrícolas e agroindustriais. Em busca de maior produtividade e baixo custo na geração de tecnologia produção e aproveitamento de resíduos, têm-se estudado meios de utilizar subprodutos da agroindústria, micro-organismos mais eficientes e adaptados aos processos fermentativos para a fermentação do ácido cítrico (RODRIGUES, 2006).

A presente pesquisa tem o intuito de averiguar a necessidade de aplicação de sacarose em reatores contendo soro de queijo para fermentar ácido cítrico em comparação com os reatores que contém somente a lactose natural do soro como fonte de açúcar para a fermentação. O fungo utilizado no processo será o *Aspergillus niger* AN 400, inoculado na forma dispersa em reatores em batelada agitada a 150 rpm, sob temperatura de 30°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

O fungo *Aspergillus niger* AN 400 foi cultivado 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 com a ajuda de solução isotônica contendo Tween 80, onde cerca de 5 mL de solução foi adicionada por cima da cultura, e com a alça de *Drigalsky* foi promovido o arraste dos esporos, gerando assim uma suspensão. A suspensão foi armazenada em frasco estéril para posterior contagem de esporos. A contagem dos esporos ocorreu com o auxílio de um microscópio utilizando 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 o soro de queijo. As coletas do soro foram realizadas em uma indústria de laticínios na região metropolitana de Fortaleza-CE. Não houve diluição do soro, no entanto, ele passou por um processo de desproteíntização, que se dá com o ajuste do pH para 4,6 utilizando ácido sulfúrico, e logo depois aquecimento à 90°C por cerca de 30 minutos. Após atingir temperatura ambiente o soro foi filtrado, e o meio filtrado foi distribuído *in natura* nos reatores. Além disso, o meio foi acrescido de nutrientes essenciais para o desenvolvimento fúngico, cujas concentrações foram adaptadas de Pastore (2010) (g.L^{-1}): Sulfato de Amônio (0,1); Sulfato de Magnésio (1,0) e Fosfato de Potássio (1,0).

Além dos nutrientes acima citados, para que fosse testada a eficiência da adição de uma fonte extra de açúcar em diferentes concentrações, foi acrescentado sacarose em três concentrações diferentes (g/L): 50, 100 e 150, em três grupos distintos de reatores. Além dos três grupos de reatores contendo sacarose, foi feito um grupo sem adição de fonte extra de cossubstrato, onde foi utilizado somente o açúcar natural presente no soro. Os reatores e meio fermentativo foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos antes do inóculo.

MONTAGEM E OPERAÇÃO DOS REATORES

O substrato foi distribuído em *erlenmeyer* de 250 mL, em alíquotas de 150 mL. Os reatores tiveram o pH inicial ajustado para 3,5 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A. Três séries de reatores denominados como RFS – reatores com fungo e sacarose –, receberam sacarose em três concentrações diferentes, sendo estas 50 g/L , 100 g/L e 150 g/L . E ainda houve mais um grupo que não recebeu adição de sacarose, denominado de RF – reatores com fungo e sem sacarose –, assim como mostrado na Tabela 1. O experimento foi conduzido em duplicata.

Tabela 1. Reatores segundo a adição de fonte extra de açúcar.

REATORES	COSSUBSTRATO ADICIONAL (g/L)
RF	-
RFSI	50
RFSII	100
RFSIII	150

O tempo reacional em que foi avaliada a produção de ácido cítrico foi de 10 dias, onde diariamente foram feitas análises para averiguar a concentração de ácido cítrico no processo fermentativo. Os reatores contendo o meio de fermentação foram incubados em mesa agitadora a uma rotação de 150 rpm a uma temperatura de 30°C.

O monitoramento das amostras foram feitas através de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Oxigênio Dissolvido (OD) e pH, segundo Apha (2005), e a de ácido cítrico pelo método modificado de Marier e Boulet (1958).

RESULTADOS

Na Figura 1 é mostrado o acúmulo de ácido cítrico ao longo do período de fermentação do soro de queijo. Foi observada uma menor produção de ácido cítrico para a série de reatores RFSII, com produção de aproximadamente 1092,5 mg/L. A série RFSIII foi a que mais acumulou ácido cítrico, seguida de RFSI e o RF.

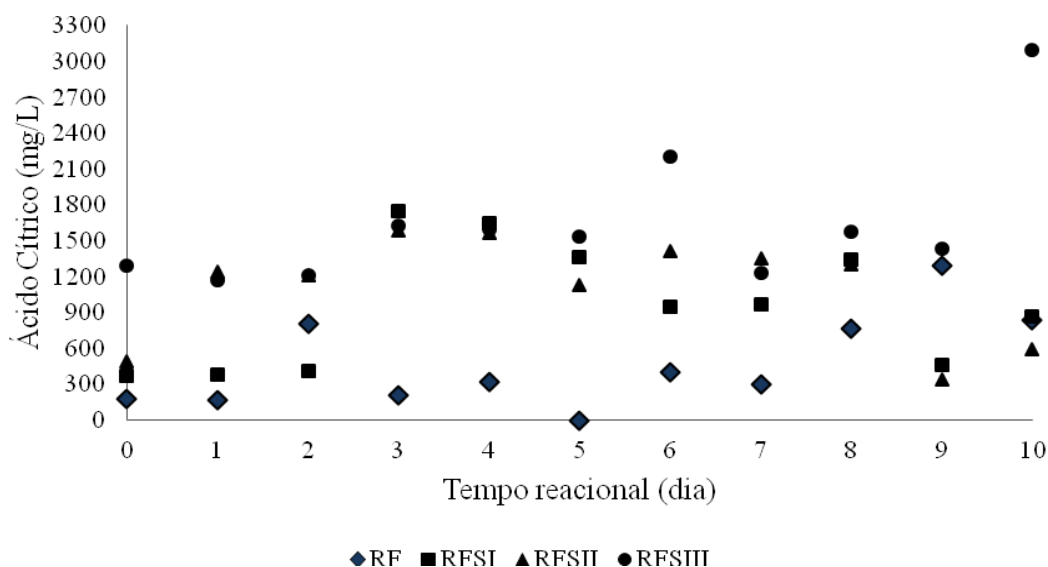


Figura 1: Concentrações de ácido cítrico ao longo do tempo reacional.

Os reatores RFSIII tiveram pico de produção no 10º dia de fermentação, onde chegaram a acumular 1803,3 mg/L do produto. Já a série de reatores RFSI acumulou 1373,3 mg/L no 3º dia do tempo reacional, assim como o pico observado em RFSII. No entanto RF, que não teve adição de sacarose, produziu uma maior quantidade que RFSII, que usou 100 g/L de sacarose, alcançando 1106 mg/L no 9º dia do processo.

Neste trabalho a sacarose foi usada como meio de impulsionar a fermentação, assim como em outros estudos que também testaram a eficiência da adição da sacarose em diferentes concentrações (EL-HOLI E AL-DELAIMY, 2003; PASTORE, 2010). A concentração de 100 g/L não foi favorável neste estudo, mas pesquisadores como Khare *et al.*, (1994) utilizaram esta concentração de sacarose em meio contendo soro de leite de soja e obtiveram ótimos resultados, alcançando até 21 g/L.

El-Holi e Al-Delaimy (2003) também aplicaram testes com soro de queijo e conseguiram concentrações próximas as apresentadas nesta pesquisa, onde acumulou 2,43 g/L de ácido cítrico quando usou o soro sem adição de açúcar extra, no entanto, quando acrescentaram ao caldo fermentativo contendo soro de queijo 15% de sacarose, conseguiram impulsionar a fermentação, chegando a produzir 106 g/L de ácido cítrico no 16º dia de fermentação. Assim como neste trabalho, uma concentração maior de sacrose (15%) favoreceu um maior acúmulo, no entanto, não atingiu níveis tão altos como o apresnetado no estudo de El-Holi e Al-Delaimy (2003).

A baixa produção de ácido cítrico pode ser justificada em parte pela presença da galactose, constituinte da lactose do soro, pois acredita-se que a sua presença e dos seus matabólitos gerados causaria inibição da produção de ácido cítrico através da redução da taxa de utilização da glicose (HOSSAIN *et al.*, 1984; MODDAX *et al.*, 1986). O ácido cítrico é obtido através da fermentação da sacarose, assim, a natureza dos açúcares e suas concentrações podem influenciar diretamente na produção de ácido cítrico (GREWAL e KALRA, 1995; HOSSAIN *et al.*, 1984).

Yaykaşlı *et al.* (2005) utilizaram em seus testes uma faixa de 100 a 180 g/L de sacarose, em meio sintético, e obtiveram o melhor resultado com a concentração de 14% (140 g/L) de sacarose, chegando a alcançar produção de 1,1 g/L de ácido cítrico durante a fermentação no período de 4 dias. Porém, Pastore (2010) utilizou concentrações menores (50 e 100 g/L) de sacarose em dois testes, um em manipueira e outro em meio sintético para efeito de comparação (somente nutrientes e sem a manipueira). Mesmo com adição da menor concentração de sacarose (50 g/L), o autor conseguiu obter resultados superiores em seus dois testes, registrando 78,4 g/L em substrato utilizando manipueira, em apenas 24 horas de fermentação e 80,9 g/L de ácido cítrico em meio sintético, mas somente no 5º dia de reação. Neste sentido, observa-se que não somente o açúcar pode influenciar uma maior ou menor excreção, outros fatores estão intimamente ligados, como a composição do meio e até mesmo a estirpe utilizada.

Este fato pode ser observado na pesquisa de El-Samragy *et al.* (1996), eles relataram testes com soro de queijo utilizando duas estirpes diferentes. Foram usadas as estirpes de *Aspergillus niger* CAIM111 e *Aspergillus niger* CAIM167, nas mesmas condições de temperatura e rotação que estudadas nesta pesquisa. Na primeira fase do seu experimento eles utilizaram quatro o soro em um pH de 3,5 e produziram 1060 mg/L e 820 mg/L de ácido cítrico para *A. niger* CAIM 111 e *A. niger* CAIM 167, resta ordem.

Outros fatores que também afetam a fermentação e produção do ácido cítrico são o pH do meio e o OD disponível (VANDENBERGUE *et al.*, 1999) Na Figura 2 e 3 são mostradas as variações de pH e OD durante a fermentação.

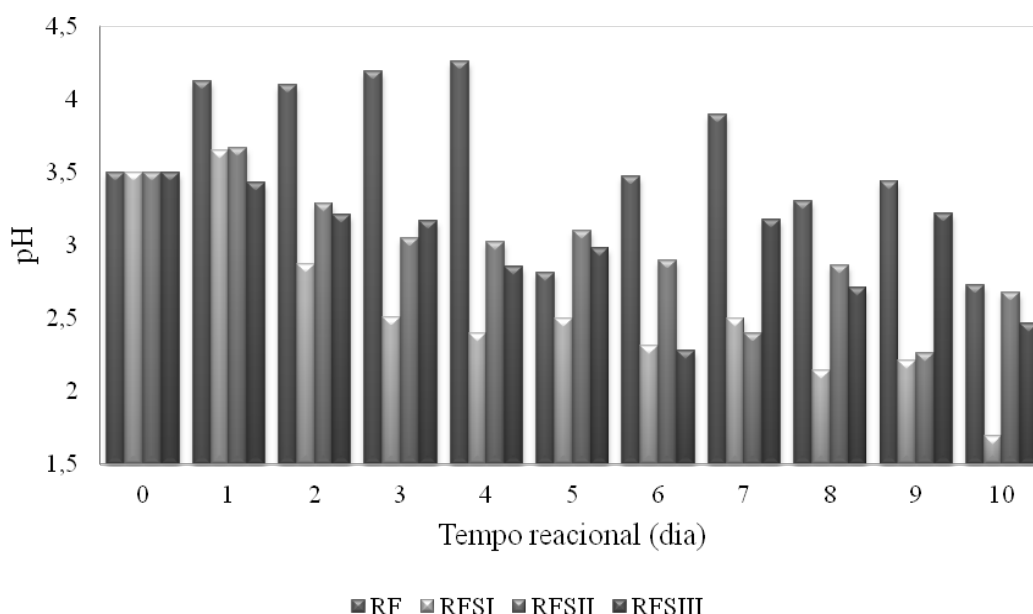


Figura 2: Variação de pH para todas as séries de reatores.

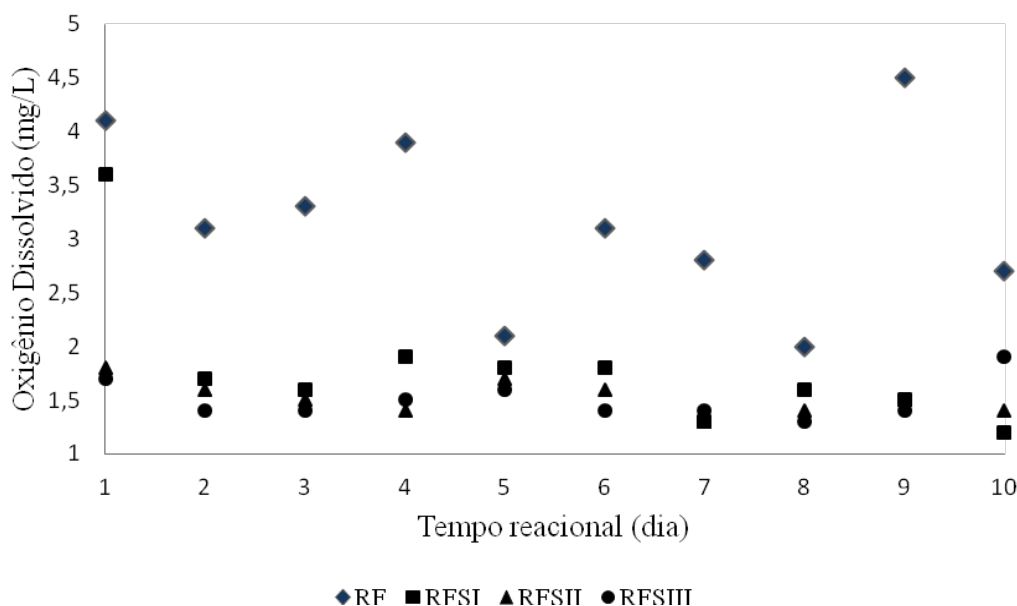


Figura 3: Variação de Oxigênio Dissolvido (OD) durante a fermentação.

Para que a produtividade seja eficiente, é necessário que o meio contenha nutrientes essenciais, mais fatores como o pH e aeração também tem grande influencia no processo (GREWAL e KALRA, 1995), e precisam ser monitorados e avaliados. O pH pode influenciar a forma de crescimento, que por sua vez pode influenciar a viscosidade do meio, pois crescimento predominantemente filamentosos pode acarretar no aumento da viscosidade, e uma viscosidade elevada pode influenciar em menores taxas de oxigênio dissolvido no meio por dificultar as trocas gasosas (PAMBOUKIAN, 1997). O processo de fermentação do ácido cítrico é aeróbio, e a importância do oxigênio tem sido enfatizada (KIM *et al.*, 1995). Certas taxas de aeração aumentam a vantagem para a melhoria do rendimento, reduzindo assim o tempo de fermentação (GREWAL e KALRA, 1995). Segundo Jing *et al.*, (1989), baixos níveis de oxigênio no meio pode atrasar o crescimento do fungo, gerando atraso na produção, assim como o oxigênio em excesso também pode acarretar em uma queda de eficiência na fermentação.

Em todos os reatores, com exceção do RFSIII, o pH tendeu a aumentar nos primeiros dias e depois tornou a cair, provavelmente pela adaptação do fungo ao meio e excreção de ácidos orgânicos. No entanto os reatores RFSIII apresentaram somente pH abaixo do inicial, o que pode ter contribuído para que o mesmo atingisse maior produção, pois um pH baixo seria fator importante para o maior acúmulo de ácido cítrico, desde que seja mantido acima de 1,5, pois em meios com valores de pH igual e inferiores a 1,5 há o favorecimento da produção de ácido oxálico em detrimento ao ácido cítrico (GREWAL e KALRA, 1995).

O crescimento do fungo nos reatores apresentou-se predominantemente na forma filamentosos em todos os reatores. De todo modo, a morfologia filamentosos não parece ter interferido mais do que a concentração maior de matéria orgânica no meio, visto que maiores concentrações de açúcar favoreceram um OD com níveis mais baixos em comparação com o soro sem adição de sacarose (RF). RF apresentou uma média de OD no meio de 3,16 mg/L, já RFSI de 1,8 mg/L, enquanto RFSII e RFSIII um OD médio de 1,5 mg/L. No entanto, mesmo a níveis mais baixos de oxigênio dissolvido RFSIII apresentou maior produção. Gomez *et al.* (1988) afirma através de sua pesquisa que o oxigênio pode ser uma variável ainda mais importante que afirmado por outros autores, que para *Aspergillus niger* não existe diferença morfológica para a boa eficiência na produção do ácido cítrico, portanto que os níveis de oxigênio dissolvido no meio não ficasse abaixo de 40% de saturação.

Durante a fermentação foi observada uma redução da carga orgânica, medida em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), os valores iniciais e concentrações observadas durante a fermentação estão apresentados na Figura 4. Até o 10^o dia de produção os reatores contendo sacarose tiveram uma redução crescente de 23, 28 e 30 g/L, para os reatores RFSI, RFSII e RFSIII, respectivamente. No entanto, a maior carga orgânica reduzida foi a do reator RF, onde apresentou redução de 33 g/L. Pastore (2010) observou em seus testes que com a

fermentação do ácido cítrico a DQO do meio foi reduzida em grandes concentrações. O meio de manipueira apresentou valor inicial da DQO de 2,2 g/L, e, após a adição dos nutrientes, como ureia e peptona, 5 g.L⁻¹ cada, apresentou uma carga de 3,2 g/L. Após um período de fermentação de 6 dias, a concentração inicial de DQO caiu para 1,2 g/L, abaixo do valor de caracterização, indicando que o processo para a produção de ácido cítrico contribuiu para a redução da carga poluidora do efluente.

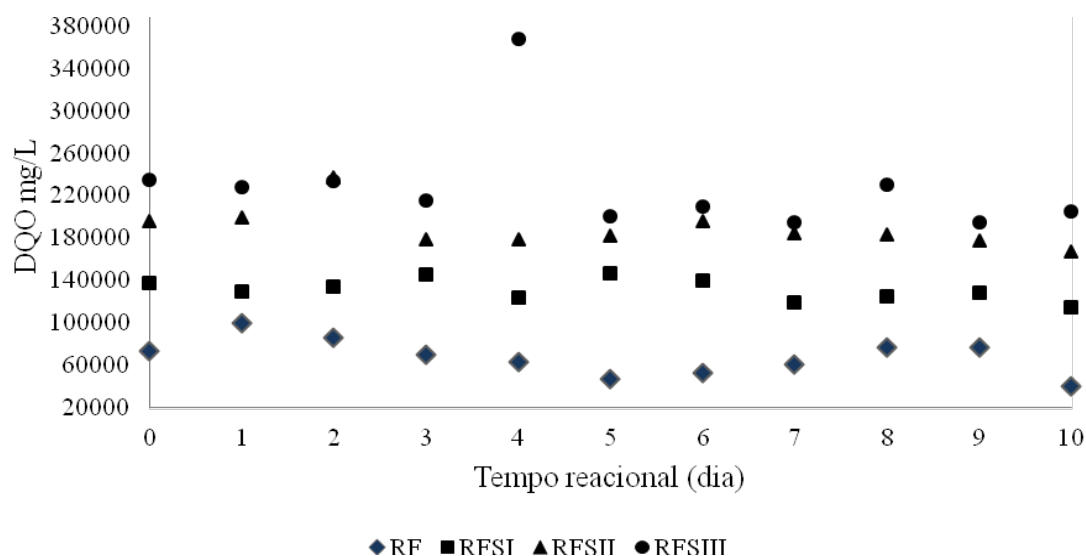


Figura 4: Variação de DQO ao longo do tempo reacional.

CONCLUSÕES

Dentre as concentrações de sacarose avaliadas, os reatores RFSIII, com 150 g/L do açúcar, mostrou ter um maior potencial de produção em comparação com outras concentrações estudadas. No entanto, a redução da DQO foi maior para a série de reatores sem sacarose (RF), mostrando o potencial da própria produção de minimizar a carga orgânica do efluente final. No entanto, mais estudos devem ser feitos a fim de observar melhores condições e potencializar o uso do soro sem adição de uma fonte extra de carbono, para assim tornar menos dispendioso o processo fermentativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COSTA, E. R. H. Estudo de Polímeros Naturais como Auxiliares de Flocculação com Base no Diagrama de Coagulação do Sulfato de Alumínio. São Carlos. 1992. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo 1992.
2. APHA. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. American Water Work Association, Water Environment Federation, 20ª Edição, 2005.
3. DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. Biochem. Eng. J. 54, p.83–92, 2011.
4. EL-AASAR, S.A., Submerged Fermentation of Cheese Whey and Molasses for Citric acid Production by *Aspergillus niger* International Journal Of Agriculture & Biology, Botany Department, Faculty of Science, Zagazig University, Egypt, 2006.
5. EL-HOLI, M. A.; AL-DELAIFY, K. S. Citric acis production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. African Journal of Biotechnology, v.2, p.356-359, 2003.
6. 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.

7. GOMEZ, R.; SCHNABEL, I.; GARRIDO, J. Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.10, n.3, p.188-191, 1988.
8. GREWAL, H.S.; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. *Biotechnology*, v.13, n.2, p.209-234, 1995.
9. HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D.; MADDOX, I. S. Production of citric acid from whey permeate by fermentation using *Aspergillus niger*, *N.Z. J Dairy Sci Technol.*, 18, 161-168, 1983.
10. HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D.; MODDAX, I. S. The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.19, p.393-397, 1984.
11. JING, Q.; ZHANG, J.; XU, Q. Fermentation technology of original acid. Light Industry Press, 138–192, 1989.
12. KHARE, S. K.; JHA, K.; GANDHI, A. P. Use of agarose-entrapped *Aspergillus niger* cells for the production of citric acid from soy whey. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.41, p.571-573, 1994.
13. 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.
14. LEONEL, M; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *aspergillus niger*. *Sci. Agric. Itapicaba*, 52(2), p.299-304, 1995.
15. MARIER, J. R.; BOULET, M. J. *Dairy Sci.* 41, 1683±1692, 1958.
16. MODDAX, I. S.; HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D. The effect of methanol on citric acid production from galactose by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.23, p.203-205, 1986.
17. 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.
18. PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25, p.244-263, 2007.
19. 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.
20. RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2006.
21. SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 205-218, 2003.
22. VANDENBERGUE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Review: microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 42, n. 3, p. 263-276, 1999.
23. VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.74, p.175-178, 2000.
24. XU, D. B.; MADRID, C. P.; M. R/SHR; KUBICEK, C. P. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *A. niger*, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 30, p.553-558, 1989a.
25. 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, p.444-449, 1989b.
26. YAYKAŞLI, O. Y.; GOKHAN, D.; AHMET, Y. Influence of alcohols on citric acid production by *Aspergillus niger* A-9 entrapped in polyacrylamide gels. *Journal of Food Engineering*, v.70, p.518-522, 2005.