

XII-089 – SORO DE QUEIJO E GLICOSE PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO COM USO DE *Aspergillus niger* AN 400

Alyne V. Cavalcante⁽¹⁾

Licenciada em Química pela Universidade Estadual do Ceará (UECE). Aluna de graduação em Tecnologia em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – Campus Fortaleza (IFCE).

Nathália A. Magalhães

Graduada em Tecnologia em Gestão Ambiental e graduanda em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – Campus Fortaleza (IFCE).

Carlos R.P. Wanderley

Doutorando em Engenharia Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Glória Marinho

Doutora em Saneamento Ambiental pela Universidade de São Paulo (USP).

Kelly Rodrigues

Doutora em Saneamento Ambiental pela Universidade de São Paulo (USP).

Endereço⁽¹⁾: Av. Treze de Maio, 2081 - Benfica - Fortaleza - CE - CEP: 60040-215 - Brasil - Tel: (85) 3307 3666 – e-mail: alyneifce@gmail.com

RESUMO

O ácido cítrico é o principal constituinte das frutas cítricas, atualmente, um dos mais importantes ácidos orgânicos produzidos por via microbiana. Por causa de suas características, é amplamente utilizado na indústria de alimentos como acidulante, flavorizante, antioxidante e, também, na indústria farmacêutica. Dentre os micro-organismos, o fungo *Aspergillus niger* é o mais utilizado pela indústria para produção deste ácido, a partir de resíduos agroindustriais, pois o mesmo apresenta facilidade de manipulação, fermenta grande variedade de matérias-primas de baixo custo, além de fornecer alto rendimento de bioprodutos. Nesta pesquisa foi estudada a viabilidade desta produção por esta espécie, através da fermentação de soro de queijo, com adição de três concentrações de glicose: 50 g/L, 100 g/L e 150 g/L. Foi observado um acúmulo de ácido cítrico nos valores de 2318,95 mg/L, 2814,15 mg/L e 1830,10 mg/L, para as concentrações de glicose utilizadas, respectivamente. Os resultados mostram-se favoráveis para o décimo dia de fermentação, nas concentrações menores, e para o terceiro dia, em relação à maior concentração de glicose. Todos os reatores foram submetidos a uma rotação de 150 rpm, mas o valor de oxigênio dissolvido (OD) foi melhor no reator cujo acúmulo de ácido cítrico foi maior e o decaimento de demanda química de oxigênio (DQO) se mostrou melhor nas baixas concentrações (50 g/L) que foram as segundas mais rentáveis em termos de ácido cítrico. Assim, o fungo em associação com as diferentes condições em que foi submetido, apresentou potencialidade para a produção de ácido cítrico, quando comparado a reatores que continham apenas soro de queijo e fungo, com acúmulo ótimo no 9º dia de fermentação num valor de 1287,72 mg/L de ácido cítrico, sendo este dia igualmente o melhor para valores de OD e DQO.

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

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado, sendo necessárias novas formas de estancar o atual processo de mudanças climáticas causadas pela atividade antropogênica, especialmente pelas emissões de CO₂, metano e óxidos de nitrogênio. Nos dias atuais é de suma importância que o fornecimento de produtos de qualquer setor esteja associado à gestão dos resíduos advindos dos processos industriais.

Dentre os vários setores da indústria, destaca-se o setor alimentício, mais precisamente o de laticínios, cujos resíduos constituem poluentes ambientais que, através da biotecnologia, podem ser reaproveitados para a obtenção de produtos de interesse econômico-social (SANTOS, 2005).

Aliado à necessidade de fornecer novos produtos ao mercado consumidor, a utilização do soro de queijo como matéria-prima ainda auxilia na redução de efluentes gerados pelos laticínios, bem como dos gastos necessários para tratá-lo (BACH, 2009).

Neste contexto os processos fermentativos foram desenvolvidos e foram isolados micro-organismos com potencial produtivo, como o fungo *Aspergillus niger*, que é a espécie mais utilizada para produção de ácido cítrico, produto de grande interesse econômico, através da fermentação de resíduos agroindustriais, no caso, soro de queijo. Embora várias matérias-primas possam ser utilizadas como fontes de carboidratos para a elaboração do meio de fermentação, elevadas concentrações (120 – 250g/l) de açúcares facilmente metabolizáveis pelo fungo, como glicose e sacarose, favorecem a obtenção de melhores rendimentos e taxas de produção (CARVALHO *et al.*, 2005). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de ácido cítrico pela espécie fúngica a partir de soro de queijo e comparar o rendimento obtido na ausência e na presença de glicose em três concentrações distintas.

MATERIAIS E MÉTODOS

- **Substrato**

O substrato utilizado para o processo de fermentação foi soro de queijo, cujas coletas foram realizadas em uma fábrica de laticínios – Leite Maranguape, localizada no centro do município de Maranguape/CE. As amostras coletadas foram acondicionadas em gelo durante a viagem para posteriores análises de caracterização do efluente.

O soro *in natura*, com valor de pH 6,55 teve esse valor reajustado para 4,6. Após a mudança de pH foi submetido a um aquecimento em banho-maria numa temperatura de 90°C durante 15 minutos para que ocorresse uma desproteínização. Após a formação de um aglomerado protéico foi realizada uma filtração à vácuo para separação do soro da gordura formada. O soro filtrado ficou em repouso para atingir temperatura ambiente e 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 3,5, por se tratar de um pH mais propício ao favorecimento da produção de ácido cítrico dentre outras faixas testadas (2,5; 4,5 e 5,5), 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* AN 400 foram cultivados em placas de Petri estéreis contendo 15 mL de meio de cultura *Saboraud*, previamente esterilizado a 121°C, durante 15 minutos. Após a solidificação do meio de cultura, os esporos foram transferidos para as placas, as quais depois do procedimento de inoculação foram mantidas a temperatura de 28°C por 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 2×10^6 esporos/mL foi acrescentada aos reatores, após serem autoclavados, com os 200 mL de soro já distribuídos e à temperatura ambiente.

- **Reatores em batelada agitada**

O substrato foi distribuído em alíquotas de 200 mL em *erlenmeyers* de 250 mL, previamente esterilizados antes da adição do inóculo. Os reatores foram divididos em reatores com glicose, nas concentrações de 50, 100 e 150 g/L, para avaliar a eficiência de acúmulo de ácido cítrico, buscando produzir maiores concentrações pela adição do cossubstrato. Os outros reatores foram do tipo RF – reatores com fungo. Os reatores RF foram estudados num tempo reacional (TR) de 15 dias consecutivos, e os reatores com adição de glicose num tempo reacional de 10 dias. Isto porque alguns estudos mostram que a fermentação pode ocorrer de 8 a 15 dias, mas observou-se na batelada de RF um declínio a partir do dia 11, daí a opção por um TR de 10 dias. O estudo foi

feito em duplicata e todos os reatores foram incubados em mesa agitadora a uma temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm.

As análises físico-químicas determinadas serão as de demanda química de oxigênio (DQO), oxigênio dissolvido (OD), segundo APHA (2005) e a de ácido cítrico pelo método modificado de Marier e Boulet (1958).

RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

Na Etapa 1 os reatores que continham apenas soro de queijo e fungo – reatores RF – apresentaram valores para acúmulo de ácido cítrico conforme a Figura 1.

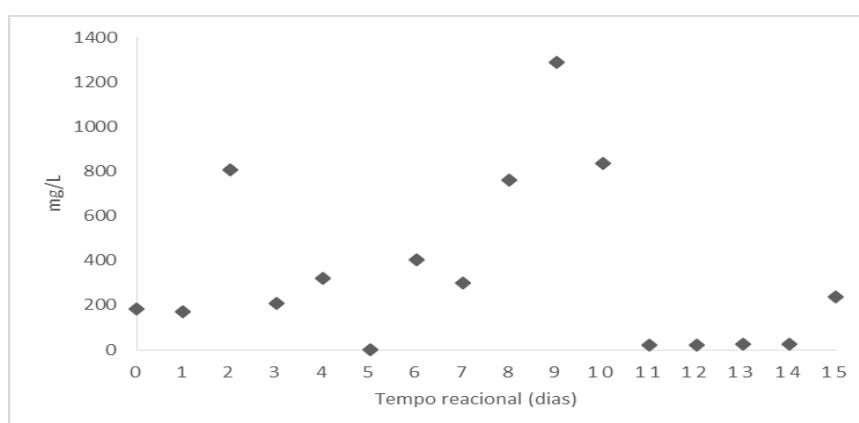


Figura 1: Valores de ácido cítrico acumulado, em mg/L, nos reatores RF.

Foi constatado que o 9º dia foi o dia de melhor resultado com uma concentração de 1287,72 mg/L de ácido cítrico. Este também é o dia em que o oxigênio dissolvido atingiu seu maior valor, 4,5 mg/L, apresentado na Figura 2, assim como a DQO tanto bruta quanto filtrada apresentaram um valor máximo desde a contínua queda desde o dia 2 até o dia 5, conforme mostrado na Figura 3. A lactose presente no soro foi aparentemente totalmente utilizada e o fungo pode ter ainda feito uso do próprio ácido cítrico como fonte de energia para manter seu metabolismo, excretando outros ácidos orgânicos. A partir do dia 11, já não se contabilizou aumento significativo de ácido cítrico, e apenas leve aumento de matéria orgânica.

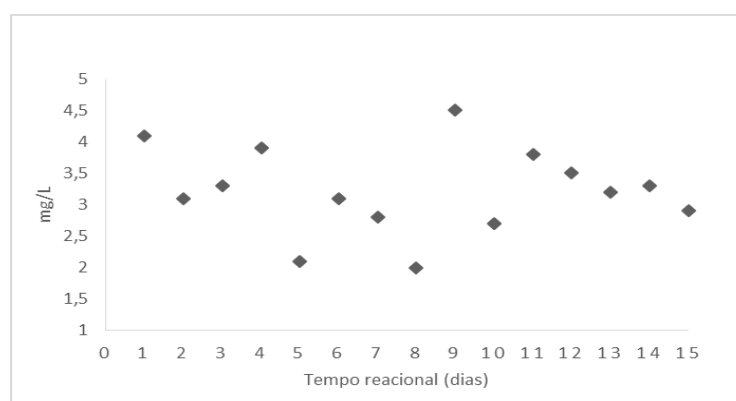


Figura 2: Valores de oxigênio dissolvido, em mg/L, nos reatores RF.

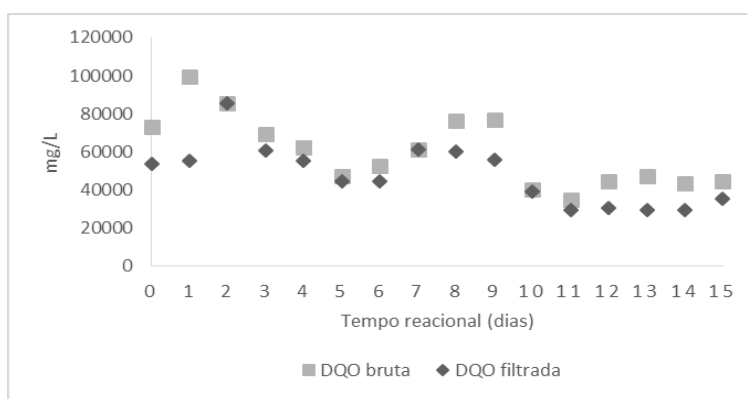


Figura 3: Variação de DQO bruta e filtrada, em mg/L, nos reatores RF.

RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA – com adição de glicose

Fazendo uma comparação entre as concentrações de ácido cítrico produzido, foi obtido um melhor resultado no reator que continha 100 g/L de glicose, o qual gerou 2814,15 mg/L do ácido, no décimo dia, seguido por 2318,95 mg/L no reator com menor concentração de glicose, também no décimo dia. O reator que recebeu a maior concentração de glicose (150 g/L) produziu 1830,10 mg/L de ácido cítrico, valor este registrado no terceiro dia. Para Papagianni e Matthey (2004), a produção de ácido cítrico aumenta à medida que os níveis de glicose são maiores. Sendo assim, os reatores que continham 150 g/L deveriam ter se destacado, o que não ocorreu neste experimento, pois na maior concentração de glicose não houve melhor eficiência e tal fato pode estar associado à própria morfologia do fungo que é alterada pelas condições do meio. Vale ressaltar que a produção foi maior no terceiro dia, um tempo menor quando comparado aos reatores com 50 e 100 g/L de glicose. A estimativa na literatura é bem variável, mas essas diferenças são em virtude dos tipos de processos utilizados. Embora, em geral, todas as cepas de *Aspergillus niger* apresentem capacidade de produzir ácido cítrico, cada cepa pode apresentar particularidades quanto à quantidade produzida e sua adaptação ao meio. Conforme Paul *et al* (1999), uma fermentação que promove formação de pellets, muito observados nesse estudo, resulta em uma menor taxa de utilização da glicose correspondendo a uma menor produção. Na Figura 4 são apresentadas as variações na produção de ácido cítrico no reator com 100 g/L de glicose.

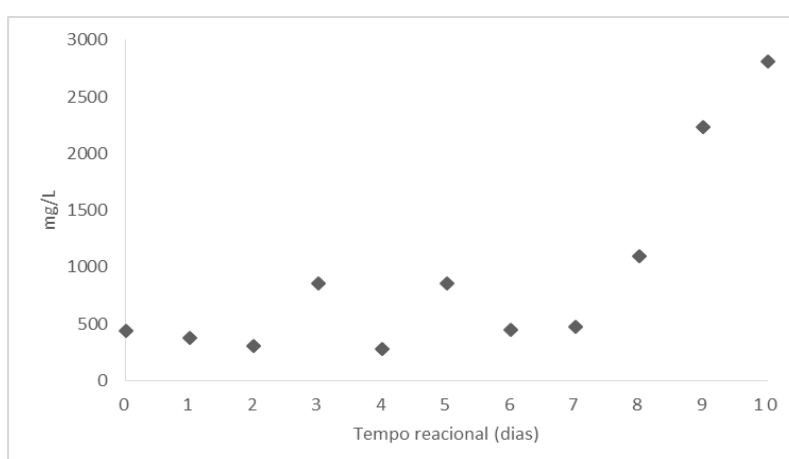


Figura 4: Valores de ácido cítrico acumulado, em mg/L, nos reatores com 100 g/L de glicose.

As variações na concentração de ácido cítrico já conseguido em outros experimentos com o uso de resíduos industriais vão de $4,58 \pm 0,24$ g/L (DHILLON *et al.*, 2012); 2,43 g/L obtidos por *A. niger* ATCC9642 (El-Holi e Al-Delaimy, 2003); 4,63 g/L através de fermentação submersa (El-Asar, 2006); $6,53 \pm 0,2$ g/L por *A. niger* NRRL 567 e $6,9 \pm 0,3$ g/L por *A. niger* NRRL 2001 usando soro de leite em pó como meio fermentativo (DHILLON *et al.*, 2011). Segundo Penna (2001) a baixa concentração de açúcar nos meios de produção pode comprometer diretamente a formação de ácido cítrico, facilitando assim o acúmulo de outros ácidos orgânicos, como o oxálico, que também são produzidos no processo fermentativo, mas em menor escala. O mesmo autor também relatou que os diferentes tipos de açúcares introduzidos na composição dos meios de produção são assimilados de forma rápida pelos fungos como fonte de carbono nos processos fermentativos, em que a concentração e tipo de fonte de carbono utilizada são relevantes fatores respostas relacionados ao acúmulo ou não de ácido cítrico.

Os valores para oxigênio estiveram entre 1,4 mg/L e 3,3 mg/L, conforme Figura 5, e o maior valor foi justamente no reator com 100g/L de glicose, que foi o de melhor produção de ácido cítrico (2814,15mg/L), confirmando o que a literatura trata sobre boa aeração para bons resultados e o quanto o processo de produção sofre interferência deste parâmetro.

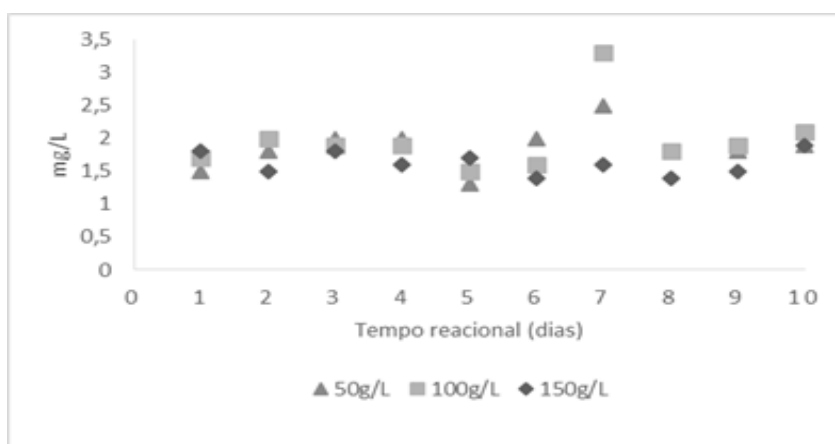


Figura 5: Comparação entre valores de oxigênio dissolvido em reatores com 50 g/L, 100 g/L e 150 g/L de glicose.

Em relação à matéria orgânica, os valores de DQO, apresentados na Figura 6, até decaíram, mas mostraram-se sempre muito altos. Pode ser inferido que o açúcar presente no meio foi consumido para que o ácido cítrico fosse produzido, gerando assim uma queda na DQO, no entanto, o ácido cítrico também é contabilizado na análise como matéria orgânica, além da própria biomassa fúngica, sendo assim, o valor não representa o que foi consumido de açúcar, mas que houve um maior consumo e que este excesso de açúcar é importante. Como o que ocorre é uma transformação de substrato em produto de interesse econômico não ocorre uma remoção de DQO, de fato. O decaimento da DQO se mostrou melhor nas baixas concentrações (50g/L) que foram as segundas mais rentáveis em termos de ácido cítrico, embora o maior dia de redução da DQO (dia 7) não tenha coincidido com o de melhor acúmulo do ácido (dia 10).

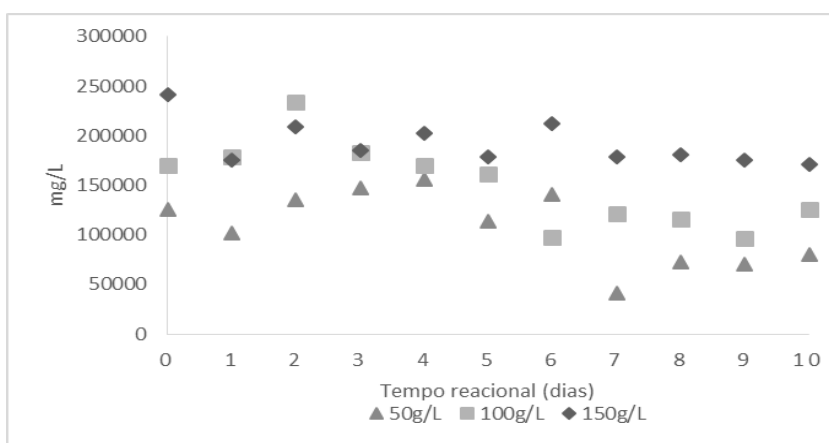


Figura 6: Comparação entre as oscilações de DQO em reatores com 50 g/L, 100 g/L e 150 g/L de glicose

CONCLUSÕES

A aplicação da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 foi viável para fermentar soro de queijo no intuito de produzir ácido cítrico. A adição de glicose como cossustrato favoreceu o acúmulo de ácido cítrico no caldo de fermentação, obtendo-se valor de 2814,15 mg/L no reator que continha 100 g/L do cossustrato. Os reatores que continham concentrações de 50 g/L e 150 g/L também apresentaram valores de produção de ácido cítrico, no 10º e 3º dia, com produção de 2318,95 mg/L e 1830,10 mg/L, respectivamente. Os valores estiveram conforme o esperado, de 9 dias de fermentação para acúmulo de 1,2 g/L do ácido de acordo com a literatura, que registrou 1,06 g/L, e resultados superiores quando da adição de glicose confirmando a viabilidade do soro de queijo e trazendo a importância de estudos de outros parâmetros para uma produção maior e melhor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. Standard Methods for examination of Water and Wastewater American Water Works Association, Water Environment Federation, 20ª edição, 2005.
2. BACH, F. Obtenção de fermentado acético a partir do soro de leite. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos). Universidade do Estado de Santa Catarina - Pinhalzinho, 2009.
3. BECKER, C. R. Tratamento de soro de queijo por método físico-químico e por método biológico aeróbio. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental), Lajeado, 2013.
4. CARVALHO, W.; SILVA, D.D.V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I.M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte I: ácidos orgânicos. Revista Analytica, n. 18, ago/set. 2005.
5. DHILLON, G.S., BRAR, S.K., VERMA, M. Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged fermentation. International Journal of Food Science and Technology, 47, 542–548, 2012.
6. DHILLON, G.S., BRAR, S.K., VERMA, M.; TYAGI, R.D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of CA by *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 53, 83–92, 2011.
7. EL-ASAR, S.A. Submerged fermentation of cheese whey and Molasses for CA production by *Aspergillus niger*. International Journal of Agriculture and Biology, 8, 863–867, 2006.
8. EL-HOLI, M.A.; AL-DELAIFY, K.S. CA production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. African Journal of Biotechnology, 2, 356–359, 2003.
9. MARIER, J.R., BOULET, M. Direct determination of citric acid in milk with improved pyridine acetic anhydride method. Journal of Dairy Science 41, 1683–1692, 1958.
10. PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Modeling the mechanisms of glucose transport through the cell membrane of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation processes. Biochem. Eng. J, 20, p.7–12, 2004.
11. 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, n.13, v.3, p. 149-159, 2011.
12. PAUL, G.C.; PRIEDE, M.A.; THOMAS, C.R. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. Biochemical Engineering Journal, v. 3, p. 121-129, 1999.

13. PENNA, T. C. V. Produção de ácidos. In: Lima, U.A., Aquarone, E.; Borzani, W.; Schidell, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blucher, v.3, p. 45-50, 2001.
14. SANTOS, R.S. Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator. Dissertação (Mestrado). Lorena, 2005.
15. ZEMPULSKI, D.A. Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação anaeróbia de manipueira e de permeado de soro de queijo. Dissertação (Engenharia Química). Toledo – PR, 2013.