

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudos de meios de cultura para produção de ácido  
cítrico por *Aspergillus niger* NRRL 6411 em  
fermentação submersa

Maria Paula Rosseto

Monografia apresentada à Coordenação do  
curso de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Uberlândia, para a obtenção de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG  
Dezembro - 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudos de meios de cultura para produção de ácido  
cítrico por *Aspergillus niger* NRRL 6411 em  
fermentação submersa

Maria Paula Rosseto

Eloizio Júlio Ribeiro

Monografia apresentada à Coordenação do  
curso de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Uberlândia, para a obtenção de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG  
Dezembro - 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudos de meios de cultura para produção de ácido cítrico  
por *Aspergillus niger* NRRL 6411 em fermentação submersa

Maria Paula Rosseto

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nota \_\_\_\_\_

---

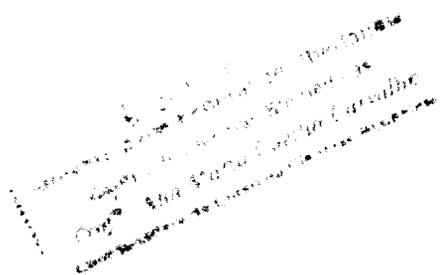
Eloizio Júlio Ribeiro

---

Euclides Honório Araujo

---

Angela Maria Abdalla Henares Beicher



Uberlândia, 16 de 12 de 1999

Agradeço a Deus a possibilidade de ter chegado até aqui, aos meus pais e irmão pelo esforço para a manutenção desse sonho, ao meu namorado pela paciência em acompanhar-me domingos e feriados ao laboratório e à amiga Kelly por dividir os mesmos planos.

Agradeço aos professores Eloizio e Euclides pela receptividade imediata e enorme disposição para auxiliar-me, mesmo nos momentos em que estavam mais ocupados, resolvendo todos os obstáculos que surgiram durante essa empreitada.

## RESUMO

Acompanhou-se o cultivo do fungo *Aspergillus niger* NRRL 6411 na produção de ácido cítrico em diferentes meios de cultura, assim como o resultado do crescimento do fungo em forma de massa seca em g/L.

Observou-se que as condições das fermentações influenciam diretamente na produção do ácido cítrico, assim como o crescimento celular. Dentre as condições experimentais, utilizou-se a fermentação submersa por ser esta a que demonstra maior capacidade de produção de ácido cítrico.

Foram utilizados meios de cultura à base de glicose ou sacarose, contendo ou não ions como ferro, cobre e zinco em quantidades reduzidas. As fermentações ocorreram em incubador rotativo, sob controle das condições de temperatura, pH, acidez total e esterilidade.

*Aspergillus niger* NRRL 6411 demonstrou nas condições de fermentação submersa, utilizando-se a sacarose como fonte de carboidratos e pequenas quantidades de ions, a maior capacidade de produção de ácido cítrico.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, fermentação cítrica, produção ácido cítrico.

# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	01
2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA.....	04
2.1 Histórico.....	04
2.2 Cinética da fermentação cítrica.....	06
2.3 Fatores que influenciam no acúmulo de ácido cítrico por <i>A. niger</i> .....	07
2.4 Fundamentos bioquímicos no acúmulo de ácido cítrico.....	08
2.5 Matérias primas para produção de ácido cítrico.....	09
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Microorganismo.....	10
3.2 Manutenção da cultura.....	10
3.3 Preparo do inóculo.....	11
3.4 Condições de cultivo.....	11
3.5 Meios de cultura.....	11
3.5.1 Meio de esporulação.....	15
3.6 Fermentação submersa.....	15
3.7 Método de cultura por tubo inclinado.....	15
3.8 Obtenção do ácido cítrico.....	16
3.8.1 Métodos analíticos.....	16
3.8.2 Determinação de pH.....	16
3.8.3 Determinação de massa seca.....	16
3.8.4 Determinação da acidez total.....	16
3.8.5 Determinação de açúcar.....	17
3.8.6 Determinação do ácido cítrico.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1 Produção de ácido cítrico em relação ao crescimento.....	18
4.2 pH.....	20
4.3 Carboidratos.....	21
4.4 Características morfológicas.....	21
4.5 Temperatura.....	22

4.6 Sugestões para estudos posteriores.....	22
5. CONCLUSÕES.....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
7. APÊNDICE.....	29

## 1- INTRODUÇÃO

O ácido cítrico (ácido 2 hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico) é um intermediário do ciclo TCA e foi isolado pela primeira vez do suco de limão e cristalizado como citrato de cálcio por SHEELE (citado por TSAY & TO, 1987). Este ácido é relativamente comum em frutas cítricas como laranja, uva e figo.

A produção do ácido por alguns *microrganismos* foi descoberto há cerca de cem anos, quando WEHMER em 1883 (citado por ROHR *et al*, 1983) descobriu que o fungo *Citromyces* (hoje identificado como *Penicillium sp*) e o *Mucor* possuíam a capacidade de produzi-lo. Mas, a sua utilização para produção em escala industrial não teve sucesso inicial, principalmente por causa de contaminações já que o tempo das fermentações era longo e o pH próximo da neutralidade. Já o fungo filamentosso *Aspergillus niger* produz sob determinadas condições e dependendo da linhagens selecionadas, ácido cítrico sem tantas restrições, sendo que ele não produz apenas este ácido de interesse industrial, mas o ácido cítrico tem um grande valor devido a sua alta solubilidade, palatibilidade e baixa toxicidade (KAPOOR *et al*, 1982). Cerca de 70% é usado pela indústria de alimentos e bebidas, 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias. Na indústria de alimentos usa-se em larga escala como

acidulante por apresentar sabor agradável. Além disso, esse ácido tem a capacidade de complexação com metais pesados como cobre e ferro. Essa propriedade tem conduzido a crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação, catalisadas por esses metais. Também, essa propriedade aliada ao baixo grau de corrosividade a certos metais tem permitido seu uso na limpeza de caldeiras e instalações. Em alguns casos o citrato substitui o fosfato nos detergentes para aumentar sua potência. Essa propriedade é usada não só para limpeza de metais, mas também na composição de detergentes domésticos. Pelo fato de ser facilmente biodegradável, o seu uso vem sendo ampliado em substituição aos polifosfatos.

Na indústria farmacêutica, o ácido cítrico é usado como estabilizante de ácido ascórbico por causa da sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o ácido cítrico é usado juntamente com bicarbonatos e carbonatos para gerar gás carbônico ainda usado como aniônicos para preparo de medicamentos.

Sais sódicos de ácido são também usados nas indústrias de alimentos, de produtos farmacêuticos e de higiene onde confere poder tampão.

A produção mundial de ácido cítrico girava em torno de 350.000 toneladas por ano (KUBCEK e ROHR, 1986). No Brasil, a produção de ácido surgiu em 1954, produzia-se cerca de 3.000 toneladas por ano. Após a descoberta de suas aplicações a produção em larga escala tornou-se objeto de pesquisa de muitas empresas, que desenvolveram algumas técnicas para processos sintéticos. O processo fermentativo mostrou-se o mais viável, sendo no momento o mais utilizado para a produção de ácido cítrico.

Neste trabalho foram realizadas quatorze fermentações utilizando-se o fungo *Aspergillus niger* NRRL 6411, com duração média de dez dias cada uma. Foram analisados vários tipos de condições e apresentados os melhores resultados.

Considerando-se que grandes investimentos e diversas pesquisas foram e são feitas na área de produção do ácido cítrico utilizando-se da fermentação por *Aspergillus niger*, o presente trabalho teve como objetivos:

1- Estudo do crescimento do *microrganismo* em meios de cultura utilizando-se glicose ou sacarose como fonte de carbono, enriquecido de outros nutrientes.

2- Determinar experimentalmente o melhor tipo de açúcar para produção de ácido cítrico.

3- Estudo das condições operacionais na produção do ácido cítrico por fermentação submersa com *Aspergillus niger* NRRL 6411 como: pH, temperatura e presença de sais e íons nos meios de cultura.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Histórico

O ácido cítrico foi isolado por SHEELE (citado por ROHR *et al*, 1983), do suco de limão. Foi WEHMER (citado por KUBCEK *et al*, 1986), o primeiro a observar a presença de ácido cítrico como um produto de oxalato de cálcio produzido por duas linhagens de fungos, os quais, WEHMER incorporou em um novo gênero *Citromyces*, agora identificado como *Penicillium*.

Originalmente, as primeiras fermentações foram desenvolvidas em fermentações de superfície SZUCS (E.U.A. Pat.2.35.771, 1944). Foram realizadas importantes investigações utilizando processo submerso, o qual foi posteriormente sucedido pelas investigações de SHU & JOHNSON, (1947).

Estudos similares foram reportados, utilizando-se como substratos o melão de cana (SHU & JOHNSON, 1947; WOODWAR, 1949; MOYER, 1953), melões de beterraba (STEEL *et al*, 1955); amido ( MOYER, 1953) e xaropes de glicose (SCHWEIGER & SNELL,1949).

Em 1961, novas espécies (*Penicillium janthinellum* e *P. restrictum*) foram descritas em uma patente concedida para KINOSHITA com apreciáveis rendimentos.

Uma das principais limitações do emprego destes organismos, é o acúmulo de quantidades significativas de ácido isocítrico, que é um subproduto indesejável (MARSHALL *et al*, 1980) quando se utiliza glicose e hidrocarbonetos como substratos.

*Aspergillus niger* (algumas linhagens ) são mais utilizadas na produção de ácido cítrico , devido a facilidade com que pode ser trabalhado, a utilização dos resíduos industriais pode ser utilizada pelo *microrganismo*. A obtenção de altos rendimentos também torna o processo econômico.( KAPOOR *et al*, 1982 ).

Existem dois métodos de fermentação normalmente utilizados: o de superfície e o submerso. Os processos de fermentação clássicos do ácido cítrico eram todos de superfície. A introdução do processo submerso teve um avanço significativo. Embora já na década de vinte tenha-se descrito o processo submerso, somente na década de cinquenta foi possível sua aplicação industrial (YOKOYA, 1992 ).

No método submerso, existe a vantagem de se empregar diferentes tipos de substratos e ter melhor controle da fermentação. Substratos usados na fermentação submersa incluem: glicose, sacarose, melaços de cana, de beterraba, além de soro permeado (SOMKUTI & BENCIVENGO, 1981). O cultivo submerso é um processo de fermentação líquida que pode ser descontínua, contínua ou semicontínua.

A maioria da produção mundial de ácido cítrico é obtida pelo processo submerso (SODECK *et al*, 1981). Sendo conduzido em fermentadores de diferentes tipos, desde que possuam condições para proporcionar aeração necessária e que sejam construídos de material resistente à corrosão. O processo é realizado durante um período de cinco a oito dias. (KUBICEK & RORH, 1986).

Nem todos os tipos de linhagem de *Aspergillus niger* são convenientes para a produção de ácido cítrico, mesmo sob condições ótimas de fermentação (MILSON, 1987). Suspensões de esporos podem ser tratados por agentes mutagênicos como luz ultravioleta, raios X e outros afim de que se obtenha cepas viáveis para produção de ácido cítrico.

No Brasil, alguns trabalhos têm sido publicados visando o melhoramento de linhagens de *Aspergillus niger* (BARACHO, 1983), (BONATELLI *et al*, 1983), empregaram a técnica do ciclo parassexual.

## 2.2 Cinética da fermentação cítrica

Poucos trabalhos envolvendo cinética da fermentação cítrica são encontradas na literatura. Segundo RORH & KUBICEK, (1981), a fermentação apresenta uma primeira fase caracterizada pelo crescimento rápido do fungo e uma segunda fase em que o crescimento diminui significativamente, e a produção de ácido cítrico é máxima, constituindo um processo bifásico. Dependendo da velocidade do crescimento, há significativa formação de produto durante a fase inicial. Na fase estacionária a formação de produto é máxima. Os mesmos autores, em 1986, concluíram que a produção de ácido cítrico é realizada em uma pequena proporção por células em crescimento e , na maior parte, por células em fase estacionária.

### 2.3- Fatores que influenciam no acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

A produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* envolve vários fatores, sendo necessário o estudo de diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos, como temperatura, pH, constituintes do meio, aeração e agitação (ACOSTA, 1994).

O crescimento de *Aspergillus niger* pode ser ilimitado em meios de cultura ricos em nutrientes, porém isso não implica em formação de ácido cítrico (GOMES *et al*, 1987).

A temperatura é um importante fator no controle fisiológico do fungo. Temperaturas entre 28 e 30°C têm sido propostas para obter rápida acumulação de ácido cítrico (PRESCOTT & DUNN, 1959; KARKLINSH & PROBOK, 1972). Sob altas temperaturas o processo de fermentação é muito rápido e o crescimento do micélio é abundante, mas a produção de ácido cítrico é pequena. Grandes quantidades de ácidos oxálico e glucônico são formadas. Baixas temperaturas, por outro lado, permitem grande formação de ácido cítrico e pequenas quantidades de outros ácidos. Entretanto, isto prolonga o processo (MARTIN & STEEL, 1955).

O pH é outro fator importante e crítico. O pH mais favorável está entre 2,0 e 3,0. Este pH baixo não é somente ótimo para a formação de ácido cítrico mas para inibir a produção de outros ácidos, além de reduzir o risco de contaminações por outros organismos. O pH inicial ideal varia dependendo do açúcar utilizado para fermentação, assim, para meios contendo sacarose ou glicose, as fermentações são conduzidas em pH inicial menor que 5,0 (SANCHEZ *et al*, 1970).

A concentração de metais no meio tem importante papel no controle da fermentação de ácido cítrico. A adição em excesso de ferro tem mostrado pequena produção de ácido cítrico (SCHWEIGR, 1961). Entretanto,

pequenas quantidades de ferro acompanhado de uma quantidade limitada de zinco são essenciais para obter-se altas produções de ácido cítrico (SHU & JOHNSON, 1948 ; TRUMPY & MILLIS, 1963). Cobre tem sido usado em oposição ao ferro (SCHWEIGER, 1961). Manganês também tem um papel inibidor na fermentação de ácido cítrico (SHU & JOHNSON, 1947). Entretanto, TOMLINSON *et al*, (1950) tem reportado que o manganês e o cobre são essenciais para fermentação de ácido cítrico no processo de superfície.

O nitrogênio é usualmente suprido na forma de sulfato de amônio ou nitrato de amônio. Fisiologicamente, os compostos de amônia são geralmente preferidos. Em geral, a concentração de íons de amônio durante a fermentação cítrica pode estar na faixa entre 0,3 até 1,5 g  $\text{NH}_4^+$  /L. (ACOSTA, 1994). Segundo MILSON (1987), a limitação de nitrogênio ou fosfato também pode ser feita também para os metais (ferro, cobre, manganês e zinco). Por outro lado é conhecido que o fungo *Aspergillus niger* necessita de uma certa quantidade de todos os traços de elementos para o seu crescimento (STEINBERG, 1939).

#### 2.4 Fundamentos Bioquímicos no acúmulo de ácido cítrico

O ciclo do ácido é o mecanismo pelo qual o acetato é oxidado em duas moléculas e  $\text{CO}_2$ , sendo liberados da célula. De maneira normal, uma célula de acetato é condensada com uma molécula de oxaloacetato, dando uma molécula de citrato. O citrato é metalizado via isocitrato para oxaloacetato, perdendo uma molécula de  $\text{CO}_2$  para produzir alfa-cetogluturato, o qual, por sua vez perde, posteriormente uma molécula de  $\text{CO}_2$ , dando succinato. O succinato é metalizado via fumarato e malato para regenerar oxaloacetato. Se

o ciclo de ácido cítrico é interrompido, nenhum oxaloacetato é regenerado para condensar-se com acetil-CoA, e assim formar citrato. Daí é necessário fazer agir a chamada reação anaplerótica, produzindo oxaloacetato (ACOSTA, 1994).

Do ponto de vista metabólico, o acúmulo de ácido cítrico é caracterizado por três processos distintos (KUBICEC & ROHR, 1986):

- 1) Oxidação de hexoses a piruvato e acetil-CoA através da glicólise.
- 2) A formação anaplerótica a partir de piruvato e fixação de CO<sub>2</sub>.
- 3) Acúmulo de ácido cítrico no ciclo de ácido tricarboxílico.

O ciclo do ácido tricarboxílico é complexo e envolve várias enzimas, a aconitase por exemplo, estudada por KUBICEC & ROHR, (1985) e a piruvato carboxilase estudadas por WARONICK & JOHNSON, (1960).

## 2.5 Matérias Primas para produção de ácido cítrico

*Aspergillus niger* é um fungo do tipo bolor, pertencente a Classe Plectomycetes, Ordem Eurotiales e Família Aspergillaceae (SILVEIRA, 1995). Encontrado em quase toda a natureza, em frutas, vegetais, terra ou em qualquer substrato capaz de fornecer o alimento necessário ao seu desenvolvimento (PELCZAR, 1996). A distribuição geográfica é ampla, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (BARACHO & COELHO, 1978).

Os substratos mais utilizados nos processos de fermentação por fungos são sacarose, o melaço de cana-de-açúcar e o melaço de beterraba (SIEBERT & SCHUZ, 1979). A glicose, em forma de xarope também é incluída por MILSON & MEERS, (1985).

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho, foi uma cepa de *Aspergillus niger* NRRL 6411, obtida na forma liofilizada dos laboratórios do NRRL, Peoria USA, provenientes da coleção de cultura da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosselo”.

#### 3.2 Manutenção da cultura

As culturas de *Aspergillus niger* foram mantidas em estoque em meio sólido em tubos inclinados em Ágar Sabouraud, em temperatura ambiente ou a 10°C e foram repicadas a cada mês.

### 3.3 Preparo do inóculo

Uma suspensão de esporos, não germinados, obtida do cultivo em meio ágar inclinado, por um período médio de 20 dias, à temperatura ambiente, foi utilizada como inóculo. Foi adicionado 10 mL de água esterilizada no tubo inclinado, espalhou-se com o auxílio de uma alça os esporos e procedeu-se uma filtragem através de lã de vidro, afim de separar o micélio dos esporos .

A contagem de esporos foi realizada em Câmara de Newbauer, mantendo-se sempre uma suspensão de  $10^6$  esporos/mL.

### 3.4 Condições de cultivo

Todos os meios de cultura foram preparados em capelas estéreis, com materiais e meios autoclavados por 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 Meios de cultura

Foram utilizados quatro meios básicos na fermentação submersa, utilizando-se glicose ou sacarose na presença ou não de alguns nutrientes e íons, a partir de cada um deles houveram modificações afim de se obter os melhores resultados, como indicam tabelas a seguir.

Tabela 1. Meio de cultura submersa 1.

Glicose	100,00g/L
$\text{NH}_4\text{nO}_3$	2,50g/L
$\text{MgSO}_4$	0,10g/L
$\text{KH}_2\text{SO}_4$	0,50g/L

Tabela 2. Meio de cultura submersa 1.1.

Glicose	150,00g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,50g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,25g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50g/L

Tabela 3. Meio de cultura submersa 2.

Glicose	100,00g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,50g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,25g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00g/L
CuSO <sub>4</sub>	0,06mg/L
ZnSO <sub>4</sub>	0,25mg/L
FeSO <sub>4</sub>	1,30mg/L

Tabela 4. Meio de cultura submerso 3.

Glicose	150,00g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,252g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,50g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,25g/L
ZnSO <sub>4</sub>	4,50mg/L
KCl	0,42g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10g/L
FeSO <sub>4</sub>	0,75mg/L

Tabela 5. Meio de cultura submerso 04.

Sacarose	150,00g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,5g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,10g/L
CuSO <sub>4</sub>	0,06mg/L
FeSO <sub>4</sub>	0,75mg/L
ZnSO <sub>4</sub>	4,50mg/L

Tabela 6. Meio de cultura submerso 4.1.

Sacarose	140,00g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,25g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,5g/L
CuSO <sub>4</sub>	0,06mg/L
FeSO <sub>4</sub>	0,25mg/L
ZnSO <sub>4</sub>	1,30mg/L

Tabela 7. Meio de cultura submerso 05.

Sacarose	140,00g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,25g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,50g/L

### 3.5.1 Meio de esporulação

Foi utilizado como meio de esporulação, nos tubos inclinados, o Ágar Sabouraud.

### 3.6 Fermentação submersa

Os experimentos foram conduzidos em fermentação submersa utilizando-se erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio de cultura e 10 mL de solução de inóculo filtrado contendo  $10^6$  de esporos por mL. O pH foi ajustado para 3,0 com HCl e incubados à temperatura de 32°C.

Os frascos foram incubados sob agitação rápida em incubador rotativo Metalfrio ou “shaker”. Os experimentos em shaker foram realizados em duplicata para maior confiabilidade, com repetições. As amostras foram coletadas de 24 em 24 horas durante dez dias consecutivos. As análises seguiram sempre os mesmos padrões.

### 3.7 Método de cultura por tubo inclinado

O cultivo do meio foi feito em tubos padronizados de vinte centímetros de comprimento e três de diâmetro com o ágar Sabouraud, em inclinação de 45°, tampados com algodão .

### 3.8 Obtenção do ácido cítrico

#### 3.8.1 Métodos analíticos

Todos os testes foram realizados em duplicata, com as seguintes determinações:

#### 3.8.2 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro DMPH-2 Digimed, calibrado com soluções a pH 7,0 e 4,0.

#### 3.8.3 Determinação de massa seca

A massa seca (MS) foi determinada pesando-se o papel de filtro ainda seco (PF), em balança HR-200, e depois do mesmo ter sido utilizado para a passagem da suspensão para a filtração do micélio, usando-se bomba de vácuo MARCONI, e secando em estufa a 60°C por 24 horas (PS), foi novamente pesado.

$$PS - PF = MS$$

#### 3.8.4 Determinação da acidez total

A determinação da acidez total foi realizada com as amostras já filtradas. Por titulação utilizou-se NaOH 0,1 N e pHmetro. Os resultados foram expressos em mL NaOH/50 mL de meio.

### 3.8.5 Determinação de açúcar

Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (MILLER, 1959). A sacarose sofreu hidrólise ácida utilizando-se HCl 1N. A curva de calibração foi determinada a partir de glicose na faixa de 0,1 a 1,0 g/L. A absorbância foi lida em espectrofotômetro B 380 MICRONAL, utilizando-se um comprimento de onda de 540nm.

Os resultados foram expressos em gramas de açúcar totais/Litro de meio.

### 3.8.6 Determinação do ácido cítrico

A determinação do ácido cítrico foi feita utilizando-se o método de MARIER & BOULET, (1958). A curva de calibração com ácido cítrico foi realizada na faixa de 0,1 a 1,0 g/L com leitura da transmitância em espectrofotômetro com comprimento de onda em 420 nm.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção de ácido cítrico em relação ao crescimento

Foram constatadas diferenças entre as fermentações realizadas com glicose ou sacarose como fontes de carbono, assim como diferenças entre os meios com glicose ou sacarose que continham íons e os que não continham.

Pode-se observar nas Figuras 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6 e 7 e 8 o crescimento expresso em g/L de massa seca e a produção de ácido cítrico do fungo *Aspergillus niger* NRRL 6411, conforme o tipo de meio de cultura oferecido.

A Figura 1 mostra que no meio contendo glicose como fonte de carbono e na ausência de íons  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  houve crescimento celular rápido nos três primeiros dias de fermentação, chegando-se a 13,40 g/L de massa seca, porém, após o terceiro dia, houve queda brusca. E na Figura 2, referente à produção de ácido cítrico, observou-se que a produção de ácido começou na fase estacionária, chegando a 2,0 g/L de ácido no sétimo dia de fermentação.

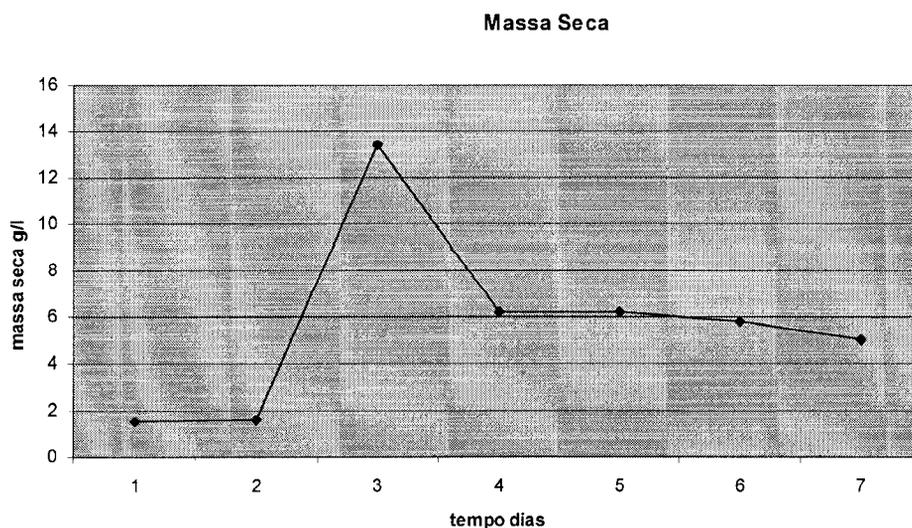


Figura 1. Valores de massa seca em g/L na fermentação contendo glicose na ausência de íons.

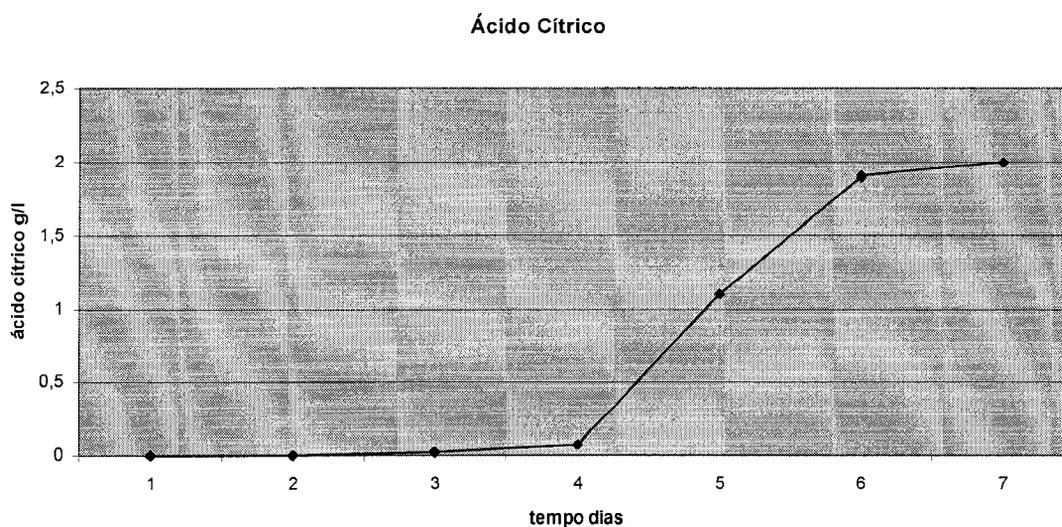


Figura 2. Valores da produção de ácido cítrico em g/L da fermentação contendo glicose na ausência de íons.

A Figura 3 mostra que, a massa seca em g/L na fermentação realizada com glicose na presença de íons foi maior. Observou-se que o crescimento do fungo foi mais lento mas, chegou ao seu valor máximo, 29,6 g/L por volta do sexto dia de fermentação e que a produção de ácido cítrico representada na

Figura 4 foi crescente, atingindo o valor máximo de 2,08 g/L de ácido cítrico por volta do sétimo dia de fermentação.

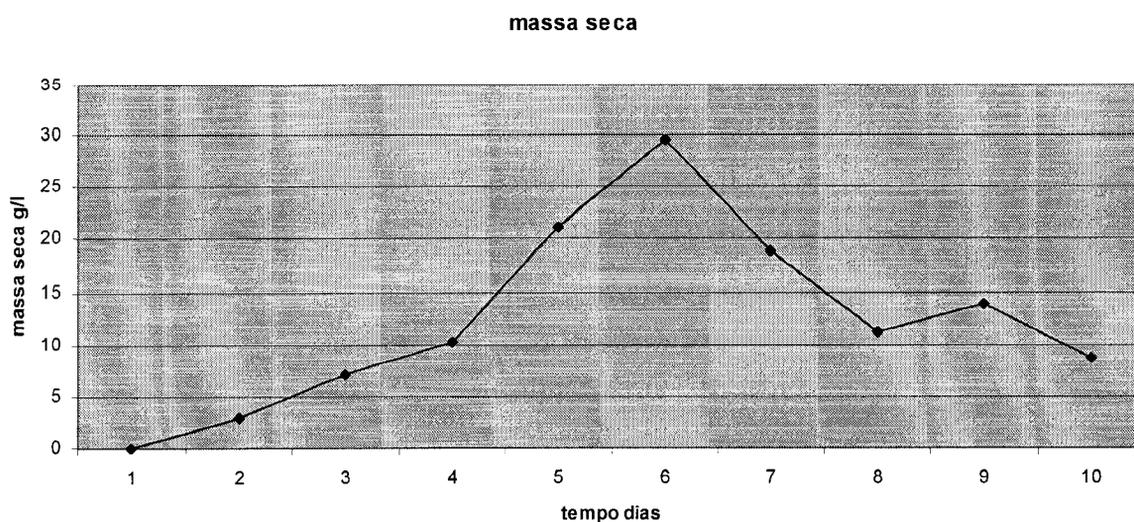


Figura 3. Valores de massa seca g/L na fermentação contendo glicose na presença de íons.

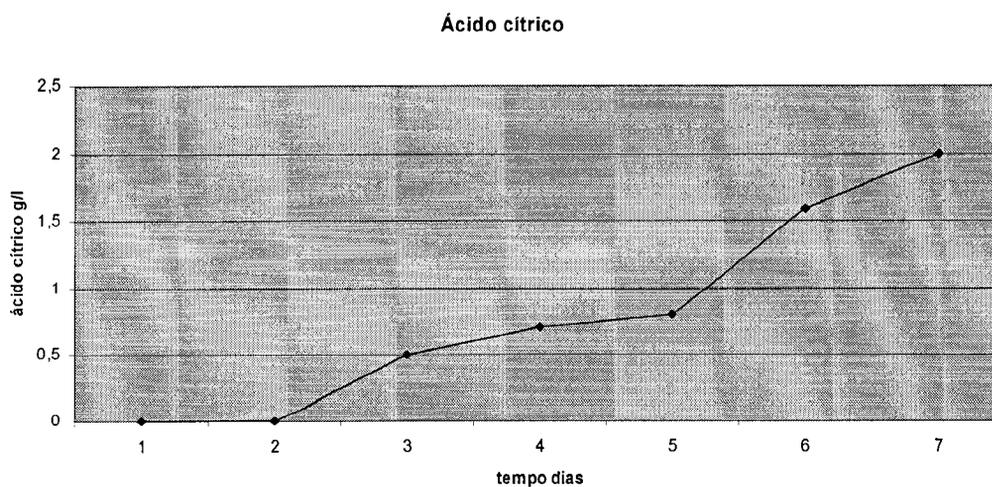


Figura 4. Valores da produção de ácido cítrico na fermentação contendo glicose na presença de íons.

A Figura 5 mostra a massa seca no meio contendo sacarose na ausência de íons. Observa-se que ocorreu o mesmo que na fermentação com glicose na

ausência de íons . O crescimento do fungo foi rápido, chegando ao seu valor máximo de 14,4 g/L por volta do terceiro dia de fermentação e após isso houve uma queda intensa também. A Figura 6 mostra que a produção de ácido cítrico no meio que contem sacarose é crescente, porem não ultrapassa 1,20 g/L por volta do sétimo dia de fermentação.

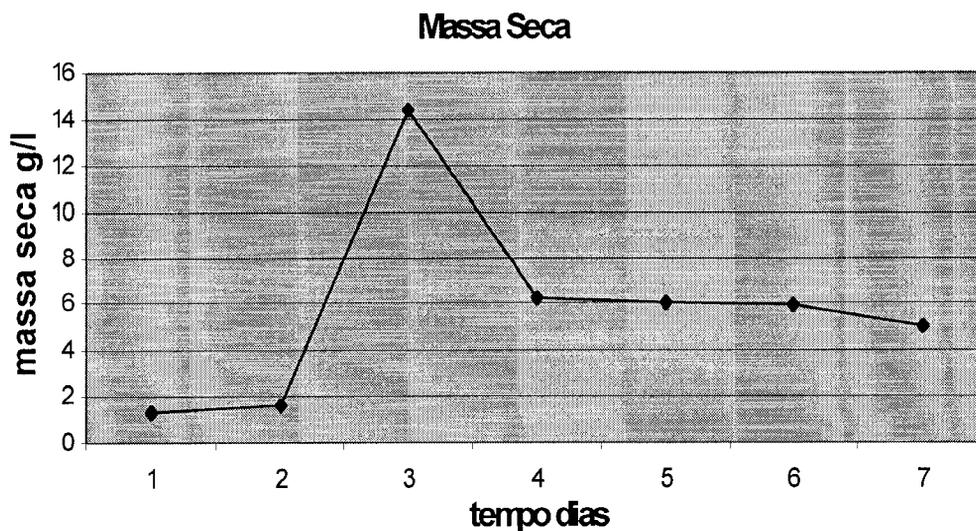


Figura 5. Valores de massa seca na fermentação contendo sacarose na ausência de íons.

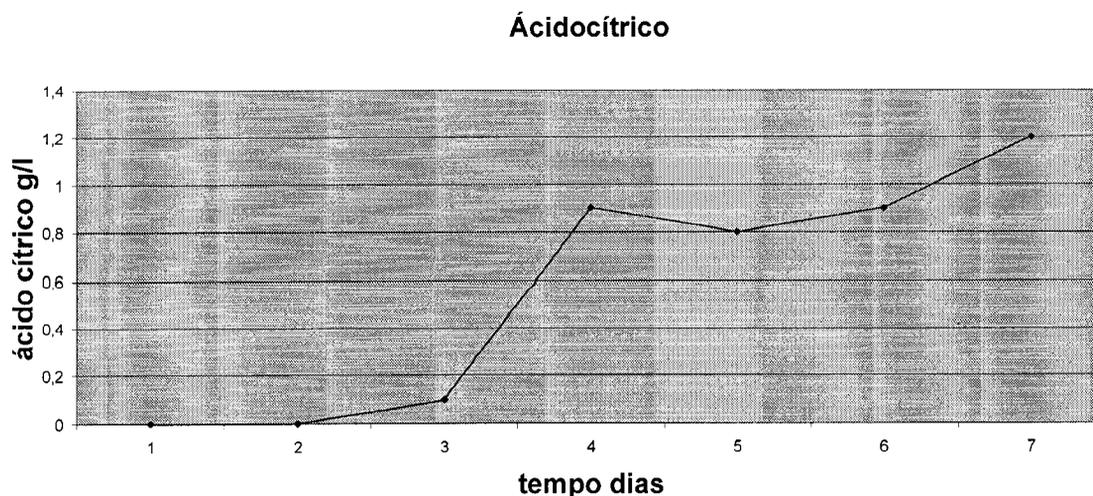


Figura 6. Valores da produção de ácido cítrico na fermentação contendo sacarose na ausência de íons.

A Figura 7 mostra o crescimento do fungo expresso em massa seca em g/L na fermentação contendo sacarose como fonte de carbono e na presença de íons. Observou-se que houve crescimento padronizado, não se obteve massa seca em grande volume mas foi constante chegando ao seu máximo de 18,9 g/L por volta do sétimo dia de fermentação. A Figura 8 mostra que a produção de ácido cítrico foi constante, acompanhando o crescimento do fungo. Verificou-se que o meio que contem sacarose na presença de íons não apresenta maior crescimento do micélio, mas sim, a melhor produção de ácido cítrico.

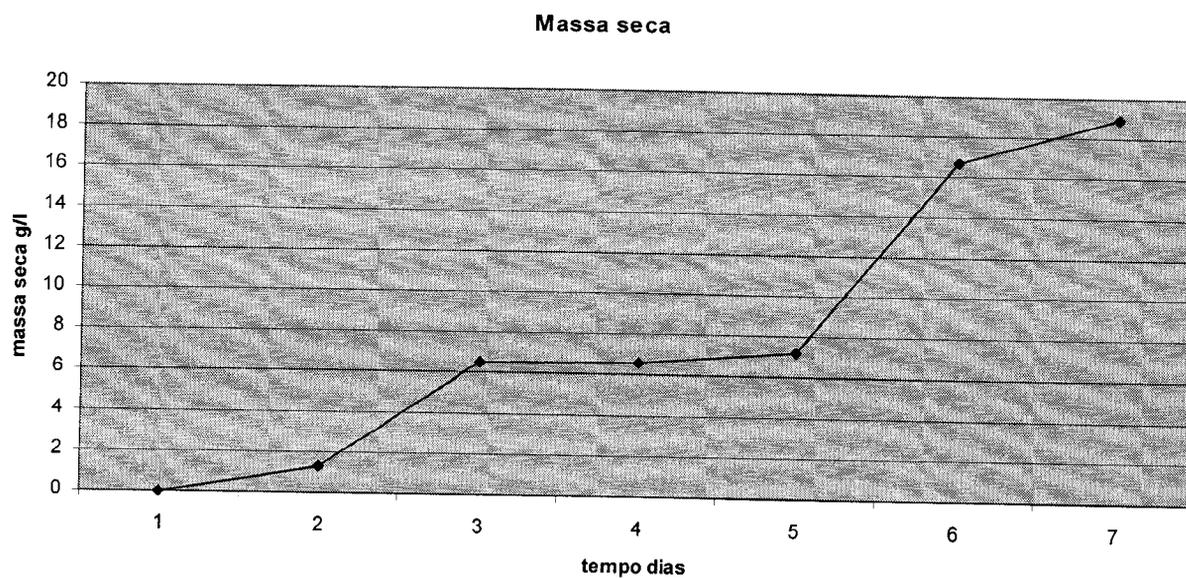


Figura 7. Valores de massa seca g/L na fermentação contendo sacarose na presença de íons.

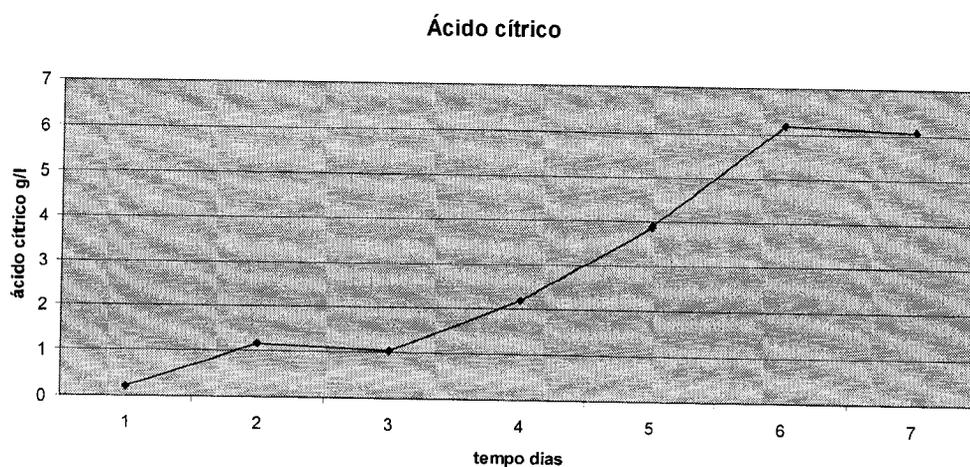


Figura 8. Valores da produção de ácido contendo sacarose na presença de íons.

Comparando-se o crescimento celular estimado pela massa seca e a capacidade de produção de ácido cítrico, observou-se que o rápido aumento da massa seca expressada em todos os meios que não continham os nutrientes em forma de íons, era acompanhada de baixas ou quase nenhuma produção de

ácido cítrico. Enquanto que no meio contendo sacarose na presença de íons o crescimento foi lento mas constante e pode ser acompanhado pela produção de ácido cítrico.

#### 4.2 pH

Os pH's iniciais foram estabelecidos em 3,0 nos meios de cultura contendo glicose ou sacarose como fonte de açúcar. Observou-se que o pH após 24 horas de fermentação caía de 3,0 para uma média de 2,0 e após os quatro primeiros dias se mantinham constantes por volta de 0,7 para os meios de glicose e 1,2 para os meios de sacarose, (tabela 8). As conseqüências destes pHs foram :

- Crescimento celular expresso em massa seca controlado, pois o íon acetato tem o poder de inibir o crescimento do fungo a baixos pH's (NOWAKOWSKA-WASZCUZ *et al*, 1984).
- Produção mais adequada de ácido cítrico, pois embora o pH intracelular seja muito pouco afetado pelo pH do meio, a atividade de enzimas ligadas ao crescimento é aumentada com elevação de pH. Como resultado tem-se acúmulo de ácido glucômico principalmente em pH's superiores a 4,0 (MISCHAK, 1985).

Tabela 8. Média de pH's nos meios de glicose ou sacarose.

Meio utilizado	pH inicial	pH após quatro dias de fermentação	pH final após sete dias de fermentação
Glicose	3,0	0,7	0,4
Sacarose	3,0	1,2	1,0

### 4.3 Carboidrato

O consumo de carboidratos foi o mesmo para os meios que continham glicose ou sacarose. Na média, o fungo consumiu 60% do açúcar colocado à disposição após sete dias de fermentação, como indica a tabela 9. A presença de carboidrato prontamente metabolizável é essencial para uma boa produção de ácido cítrico. Maltose, sacarose, manose, glicose e frutose são os açúcares mais apropriados para a produção de ácido, na ordem decrescente. Em meios preparados com glicose e frutose, a produção de ácido é maior do que quando esses açúcares são adicionados separadamente. Isso explica o comportamento da sacarose em relação à glicose e frutose (YOKOYA, 1992). Porém, nas fermentações realizadas, não confirmou-se tal preferência, um dos motivos aparentes pode ser explicado pela cepa utilizada.

Tabela 9. Consumo de açúcar por *Aspergillus niger* em fermentações submersas.

Fontes de carbono	Concentração inicial g/L	Concentração final g/L	% de consumo
Glicose	150,0	60,0	60
Sacarose	150,0	55,0	63,4

### 4.4 Características morfológicas

Observou-se algumas mudanças na formação dos pellets durante as fermentações realizadas. A cor mudou de branca para amarelada conforme o tipo de nutriente utilizado. Tal característica poderia ter influenciado a produção de ácido cítrico, mas os estudos não foram aprofundados a esse respeito.

Foram também observadas diferenças no tamanho dos pellets, isso devido ao número de rotações por minuto que eram condicionados os

erlenmeyers. Sob agitações mais lentas, formavam-se pellets maiores e com agitações mais rápidas formavam-se menores. Não foi analisado tal fator em relação à produção de ácido cítrico, porém, foi estabelecido como padrão a agitação rápida.

#### 4.5 Temperatura

A melhor temperatura para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* NRRL 6411 é de 32°C, de acordo com a literatura obtida sobre o assunto, sendo que a mesma é um importante fator no controle da fisiologia de *Aspergillus niger*. Temperaturas aplicadas na antiga União Soviética para crescimento de micélio giravam em torno de 34 a 36°C. Já para produção de ácido cítrico giravam de 32 a 34°C (KARKLISH & PROBOK, 1972).

#### 4.6 Sugestões para estudos posteriores

As seguintes sugestões são apresentadas como alternativas para o desenvolvimento de outros estudos do processo fermentativo na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

- Utilização de outras cepas do fungo para análise e comparação dos resultados obtidos.
- Análise dos dados obtidos para produção de ácido cítrico utilizando-se outros métodos para a comprovação dos resultados.
- Verificar, através de testes mais refinados, existência de enzimas em cada fase do processo.
- Estudo detalhado sobre a produção de ácidos totais, e posterior verificação da porcentagem de cada ácido formado.

## 5- CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos deste estudo conclui-se que:

O melhor meio utilizado para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* NRRL 6411 dentre os dois tipos de açúcares utilizados foi a sacarose na presença de íons.

O comportamento do fungo, nos quatro meios de cultura estudados, foi diferente para o crescimento expresso em g/L de massa seca, mas igual para o consumo de açúcar.

O pH teve papel importante, mantendo-se sempre abaixo de 3,0 evitando contaminações e contribuindo para o crescimento do fungo. A temperatura utilizada demonstrou ser uma das possibilidades existentes para a manutenção de culturas submersas.

Os resultados gerais deste estudo mostram que, as condições gerais utilizadas com *Aspergillus niger* NRRL 6411, não foram suficientes para a produção de grandes quantidades de ácido cítrico, isso pode ter sido devido ao tipo de cepa e métodos utilizados.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACOSTA, L., Análise dos meios de cultura para a produção de ácido cítrico por linhagens de *Aspergillus niger*. Tese apresentada à faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos. Campinas, março, 1994.
2. BARACHO, I. R. e COELHO, W. R., Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. Ciência e Cultura, 30:605-608, 1978.
3. BARACHO, I. R., Utilização da luz ultra violeta no melhoramento de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico. Ver. Microbiol. 14: 84-89, 1983.
4. BONATELLI, R. Jr.; AZEVEDO, J. L.; UMBEZEIRO, V. G., Parasexuality in a citric acid strain of *Aspergillus niger*. Ver. Bras. Genética. 6: 339, 1983.
- 5 GOMES, R.; SCHNABEL, I. e GARRIDO, J., Pellets growth and citric acid yeld of *Aspergillus niger* 110. Enz. Microbiol Technol. 10: 181-188, 1987.
6. KAPOOR, K. K.; CHAUDHARRY, K. e TAURO, P., Citric acid. Prescott e Dunn's industrial microbiology. 4: 709-747, 1982.
7. KARKLINSH, R. Y. e PROBOK, A. D., Biosintes organichs. Riga Zinatre. 1972
8. KITOS, P; CAMPBELL, J. J. R. e TOMLINSON, N., Influence of temperature on the trace elements requirements for citric acid production by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology. 1: 156-159, 1953.
9. KUBICEK, C. P. e ROHR, M., Aconitase and citric acids fermentation by *Aspergillus niger*. Appl. Environm. Mocrrobiol. 50: 1336-1338, 1985.
10. KUBICEK, C. P. e ROHR, M., Citric acid fermentation. Crit. Ver. Biothecnol. 3: 331-337, 1986.

11. MARIER, J. R. e BOULET, M., Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine, acetic anhydride method. J. Dairy Scienc. 41: 1683-1692, 1958.
12. MARSHALL, R., METCHE, E. e VANDECASTEELE, J. P., Intracellular concentration of citric acid and isocitric acids in cultures of the citric acid excreting yeast of *Candida lipolytica* grown on alkanes. J. Gen. Microbiol. 6: 535-539, 1980.
13. MARTIN, S. M. e STEEL, R., Effect of phosphate on production of organic acids by *Aspergillus niger*. Can. J. Microbiol. 1: 470-472, 1955.
14. MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428, 1959.
15. MILSON, P. E. e MEERS, J. L., Citric acid. In: MOOYOUNG, M. Ed. Comprehensive biotechnology. 665-680, 1985.
16. MILSON, P. E., Organic acids by fermentation, especially citric acid. In: KING, R. D. e CHEETHAM, P. S. J., Food biotechnology. 273-307, 1987.
17. MISCHAK, H., HUBICEK, C. P. e ROHR, M., Formation and location of glucose oxidase in citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21: 27-31, 1985.
18. MOYER, A. J., Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. Appl. Microbiol. 1: 7-13, 1953.
19. NOWAKOWSKA-WASZCZUK, A., RUBAJ, E., MATUSIAK, B. e KOSIEK, E., The effect of acetate on the production of citric acid by *Aspergillus niger* in submerged fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20: 416-418, 1984.
20. PELCZAR, M. J. Jr., Microbiologia: Conceitos e Aplicações. Tradução Sueli Fumi Yamada. 2ª ed., São Paulo, Makron Books, 1996.
21. PRESCOTT, S. D. e DUNN, C. G., Industrial Microbiology, 1959.

22. ROHR, M. e KUBICEK, C. P., Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Proc. Biochem. 16: 34-37, 1981.
23. ROHR, M., KUBICEK, C. P. e KOMINEK, J., Citric acid. In: DELLWEG, H. ed. Biotechnology. 3: 419, 1983.
24. SANCHEZ-MARROQUINI, A., CARRENO, R. e LEDEZMA, M., Effect of trace elements on citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. 20: 888-892, 1970.
25. SCHWEIGER, L. B., Citric acid by fermentation. US Patent 2.970.084, 1961.
26. SCHWEIGER, L. B. e SNELL, R. L., US Patent 2.476.159, 1949.
27. SHU, P. e JOHNSON, M. J., Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *Aspergillus niger* in submerged culture. J. Bacteriol. 54: 161-167, 1947.
28. SHU, P. e JOHNSON, M. J., The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. J. Bacteriol. 56: 577-585, 1948.
29. SIEBERT, D. e SCHUTZ, G., Citric acid fermentation. In: Int. microbiol. food industry cong., 55-71, 1979.
30. SILVEIRA, V. D., Micologia. 5ª ed. Rio de Janeiro, 1995.
31. SODECK, G., MODEL, J., KOMINEK, J., SALZBRUNN, W., Production of citric acid according to the submerged fermentation process. Proc. Biochem., 3: 9-11, 1981.
32. STEINBERG, R. A., Effect of nitrogen compounds and trace elements on growth of *Aspergillus niger*. J. Agric. Res. 59: 731, 1939.
33. SOMKUTI, G. A. e BENCIVENGO, M. M., Citric acid fermentation in whey permeate. Dev. Ind. Microbiol., 22: 557-563, 1981.
34. SZUCS, J., Citric acid fermentation. US Patent. 2.353.771., 1944.

35. TOMLINSON, N., CAMPBELL, J. J. R. e TRUSELL, P. C., The influence of zinc, iron, copper and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. J. Bacteriol. 61: 17-21, 1950
36. TRUMPHY, B. H. e MILLIS, N. F., Nutritional requirements of an *Aspergillus niger* mutant for citric acid production. J. Gen. Microbiol., 30: 381-394, 1963.
37. TSAY, S. S. e TO, K. Y., Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. Biotechnol. Bioeng., 20: 297-304, 1987.
38. YOKOYA, F., Fermentação Cítrica. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1992.
39. WARONICK, C. L. e JOHNSON, M. J., Carbon dioxide fixation by cell free extracts of *Aspergillus niger*. J. Biol. Chem., 235: 9-15, 1960.
40. WOODWARD, J. C., SNELL, R. J. e NICHOLLS, R. S., US Patent 2.492.673, 1949.

## APÊNDICE

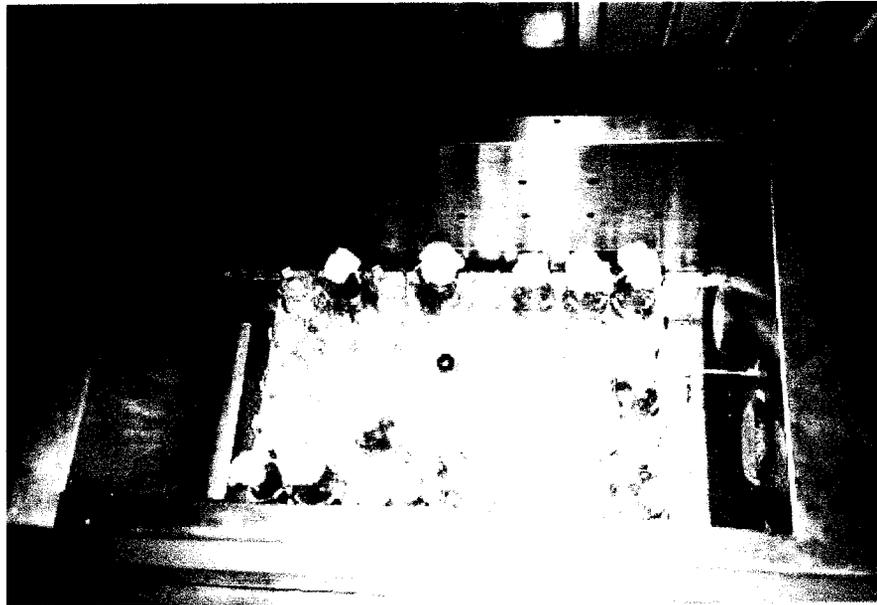


Figura 09. Shaker com Erlenmeyers durante fermentação submersa.

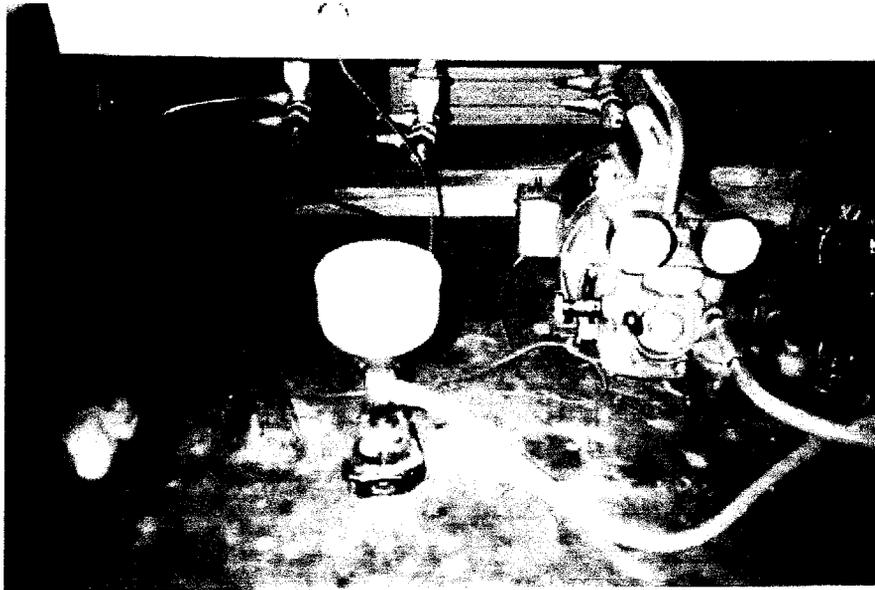


Figura 10. Bomba a vácuo durante a operação de filtragem do micélio.

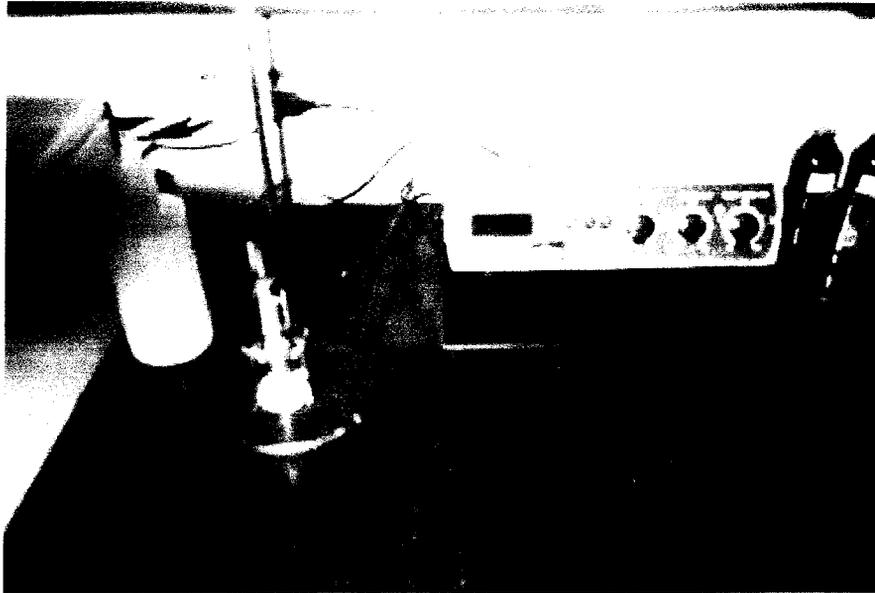


Figura 11. phmetro utilizado durante todo experimento.



Figura 12. Material utilizado para titulação durante os experimentos.

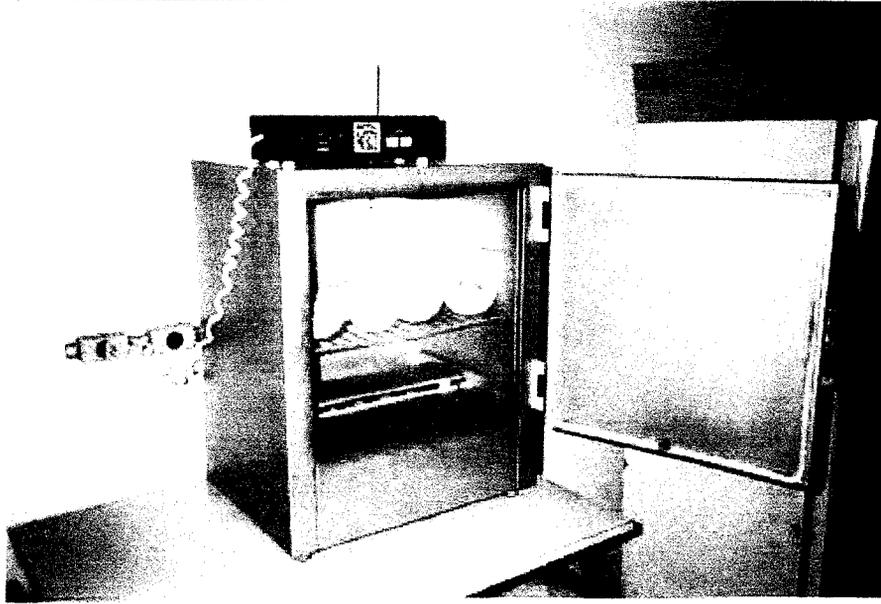


Figura 13. Estufa utilizada para secagem de papeis de filtro durante experimento.

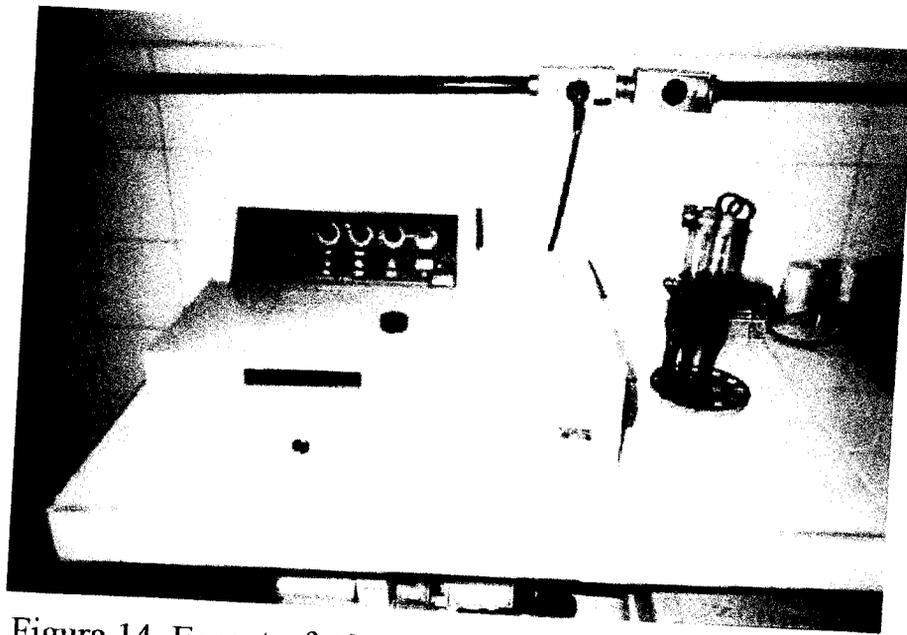


Figura 14. Espectrofotômetro utilizados nos experimentos.

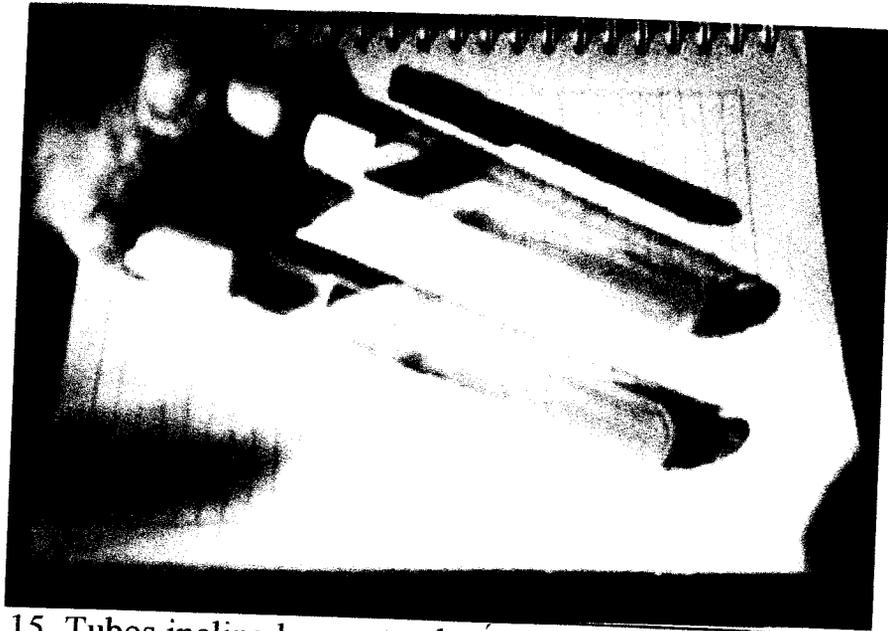


Figura 15. Tubos inclinados contendo Ágar Sabouraud após 24 horas de inoculação do fungo *Aspergillus niger*.

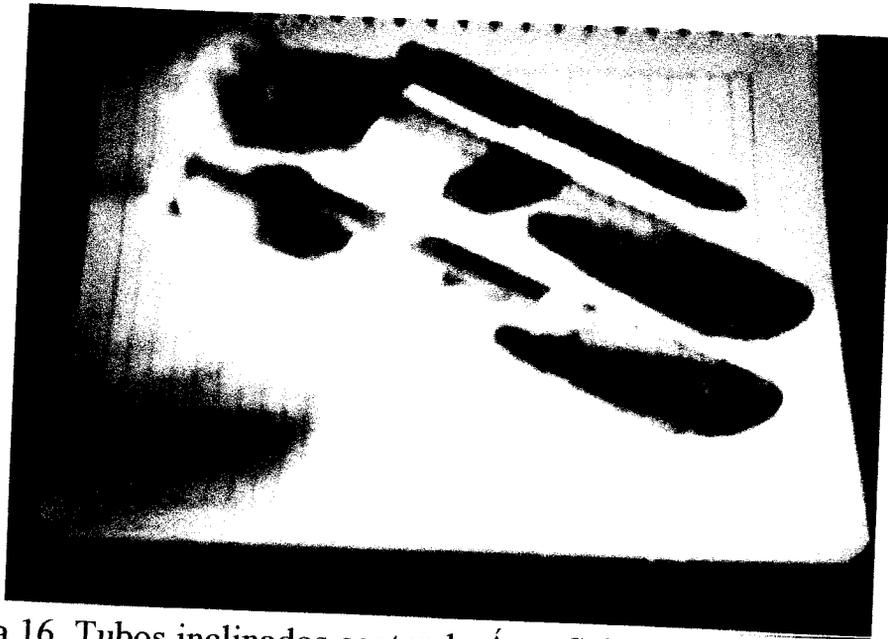


Figura 16. Tubos inclinados contendo Ágar Sabouraud após 30 dias de inoculação do fungo *Aspergillus niger*.