

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

“Produção de ácido cítrico através da fermentação do
Aspergillus niger NRRL 6411”

KELLY CRISTINE COSTA VILAÇA

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

Uberlândia - MG
Dezembro-1999

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

“Produção de ácido cítrico através da fermentação do
Aspergillus niger NRRL 6411”

KELLY CRISTINE COSTA VILAÇA

EUCLIDES HONÓRIO DE ARAÚJO

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

Uberlândia - MG
Dezembro-1999

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

“Produção de ácido cítrico através da fermentação do
Aspergillus niger NRRL 6411”

KELLY CRISTINE COSTA VILAÇA

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 26 / 11 / 2009 Nota 10

Euclides Honório de Araújo
(Orientador)

Eloízio Júlio Ribeiro
(Co-orientador)

Ângela Abdalla Beicher

[Faint stamp or text, possibly a library or institutional mark]

Uberlândia, 26 de 11 de 2009

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Aos professores Euclides e Eloízio pela oportunidade que me deram para realização desse trabalho; pelas suas colaborações e dedicação nas horas mais difíceis, devido à todos os problemas enfrentados.

À todo o pessoal do laboratório de Engenharia Química, em especial à Zuleide por sua constante colaboração.

À minha família, pela força e confiança depositados para finalização desse trabalho.

À minha querida amiga Paula, por estar sempre ao meu lado durante toda a realização desse trabalho enfrentando todos os obstáculos, para juntas terminarmos com êxito essa etapa de nossas vidas.

Ao meu namorado Cláudio, pelo apoio dado sempre que precisei, porque sem a companhia dele não conseguiria dar continuidade a esse trabalho.

RESUMO

Foram realizadas quatro fermentações com diferentes meios para produção de ácido cítrico num período de sete dias cada uma. Os métodos analíticos foram feitos de 24 em 24 horas.

Somente uma linhagem foi estudada, uma cepa de *Aspergillus niger* NRRL 6411, obtida na forma liofilizada dos laboratórios do NRRL, Peoria, USA.

O *Aspergillus niger* é um fungo filamentososo, capaz de produzir grande quantidade de ácido cítrico através da fermentação. Atualmente é considerado importante por ser um dos melhores produtores desse ácido, e oferece inúmeras vantagens em relação aos demais microrganismos. Os *Aspergillus* do grupo *niger* são provavelmente mais comuns do que qualquer outro dentro do gênero. Eles apresentam uma ampla distribuição geográfica, e ocorrem em uma grande variedade de substratos, sendo abundantes nos solos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais.

O processo de fermentação estudado, foi o processo submerso em meio natural, pois requer menos espaço físico, tem menor risco de contaminação, mostrando-se mais viável, sendo no momento o mais utilizado para a produção do ácido cítrico.

Verificou-se nesse processo fermentativo influências dos meios para a produção do ácido cítrico, empregando-se principalmente, sacarose e glicose, como substratos na forma pura.

Os resultados foram mais satisfatórios quando o meio utilizado continha os íons Fe, Cu e Zn, como verificou-se influência em seu crescimento e na produção de ácido cítrico.

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

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Histórico	5
2.2	Fatores que Influenciam o Acúmulo de Ácido Cítrico por Fungos	8
3	OBJETIVOS	10
4	MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1	Microrganismo	11
4.2	Manutenção da Cultura	12
4.3	Preparação do inóculo	12
4.4	Fermentação	12
4.5	Procedimentos Analíticos:	12
4.5.1	Crescimento celular	12
4.5.2	Dosagem de açúcar	12
4.5.3	Medidas de acidez	13
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1	Resultados das Fermentações	16
5.2	Métodos Analíticos	20
5.3	Sugestões Para Estudos Posteriores	23
6	CONCLUSÃO	25
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um ácido tri-carboxílico contendo seis carbonos que foi isolado primeiramente do suco de limão e cristalizado por Scheele em 1784 (GLAZER & NIKAIDO, 1995). A produção de ácido cítrico por fermentação é conhecida desde 1893, quando Wehmer relatou sua ocorrência em fungos que foram posteriormente classificados como gênero *Penicillium* (PERLMAM *et al.*, 1960).

No Brasil, a produção de ácido cítrico pelo processo fermentativo surgiu em 1954.

Vários ácidos orgânicos são acumulados por diferentes espécies de bactérias e fungos através da fermentação.(PERLMAM *et al.*, 1960).

Atualmente, a fermentação industrial para produção deste ácido é conduzida utilizando uma única espécie de fungo, o *Aspergillus niger* YOKOYA (1992), que vem sendo utilizado comercialmente desde 1923 (HOCKNER *et al.*, 1989). Esta espécie é responsável por grande parte da produção de ácido cítrico, estimada nos Estados Unidos em cento e oitenta e

cinco mil toneladas por ano em 1995 (BRADLEY et al., 1992). A produção sofreu aumento considerável pois é utilizado como substituto dos sais de fosfato nos detergentes e como neutralizadores de gases de enxofre emitidos pela queima de combustível (HOCKNER et al., 1989).

As vantagens que o *A. niger* leva sobre os demais organismos são: facilidades de manipulação, baixos custos dos substratos utilizados e alto rendimento. Com relação aos métodos de produção, são utilizados dois processos: A fermentação de superfície e a submersa, que se diferenciam essencialmente pelo modo de crescimento do organismo. No primeiro método - fermentação de superfície - o fungo desenvolve-se sobre o meio de cultura líquida ou semi-sólido colocado em recipientes de material resistente ao ataque do ácido, os quais são mantidos em câmaras com condições controladas. No segundo o fungo desenvolve-se no interior do meio de cultura líquida, em agitação, colocado em tanques fermentadores também com controle de condições ambientais. O segundo processo vem prevalecendo devido as vantagens em termos de rendimento, e pela menor área e investimento necessários para ser obtida grande quantidade do produto (BONATELLI, 1977).

A síntese química é possível, mas não se tem relato de nenhum processo industrial baseado nesta rota. A produção do ácido por fermentação de superfície ou mesmo a submersa têm vários inconvenientes, para evitá-los alternativas têm sido estudadas visando principalmente a imobilização do *Aspergillus niger* (YOKOYA, 1992).

Da produção fúngica de ácido cítrico 70% é utilizado pelas indústrias de alimentos e bebidas, 12% pela farmacêutica e 18% pelas indústrias têxteis, domésticas/ sanitárias e de cosméticos (YOKOYA, 1992).

Na indústria de alimentos usa-se em larga escala como acidulante por apresentar sabor agradável, baixíssima toxicidade e alta solubilidade (YOKOYA, 1992). Além disso, esse ácido tem a capacidade de complexação

com metais pesados como o ferro e o cobre. Essa propriedade tem conduzido a crescente utilização como estabilizante de óleos e gorduras para reduzir a sua oxidação catalisada 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 especiais (YOKOYA, 1992).

Na indústria farmacêutica, o ácido cítrico é usado como estabilizante de ácido ascórbico por causa de sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o ácido cítrico é usado juntamente com carbonatos e bicarbonatos para gerar gás carbônico. É ainda usado como aniônios para preparo de medicamentos onde é requerida a administração de cátions específicos como ferro e cálcio. Sais sódicos de ácido cítrico são também usados nas indústrias de alimentos, de produtos farmacêuticos de higiene para conferir o poder tampão (YOKOYA, 1992).

O ácido cítrico compete diretamente no mercado de acidulantes com o ácido láctico fabricado por Sínteses e Fermentação, ácido fumárico produzido pela Proaroma e Proquinter e, ácido fosfórico produzido pela Monsanto. O setor alimentício é responsável pelo consumo de 22%, refrigerantes carbonatos, de 15% e bebidas em pó, 10% (YOKOYA, 1992).

O setor de cosméticos responde por cerca de 8%. O emprego de ácido cítrico como desincrustador de equipamentos industriais, como caldeira e trocadores de calor, conta com 4% de consumo, com tendência a aumento na sua participação. (Nothemberg, 1983), (YOKOYA, 1992).

Na indústria têxtil auxilia na estabilização dos peróxidos sendo utilizado como alvejante. Nos banhos de tingimento corrige o pH atuando na fixação de corantes (BRADLEY *et al.*, 1992).

No município de Uberlândia, está sendo implantado pela Cargill uma “Unidade de Produção de Ácido Cítrico” que representa um projeto de alta tecnologia, inédito e que vai gerar importantes divisas para o Município e o

Estado com exportação de mais de 70% da produção total (revista Dystak's, 1998).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

O ácido cítrico isolado por SCHEELE (citado por ROHR et al., 1983), do suco de limão é o principal componente dos frutos cítricos. A microbiologia conseguiu obter esse ácido por fermentação, tendo havido, então, um grande incremento de seu uso, devido à redução do preço. Segundo LIMA (1975), ainda existe alguma produção de ácido cítrico pelo processo de extração na Sicília, Havaí e Califórnia.

Foi WEHMER (citado por KUBICEK et al., 1986), o primeiro a observar a presença de ácido cítrico como um produto de oxalato de cálcio produzido por 2 linhagens de fungos, os quais WEHMER incorporou em um novo gênero *Citromyces*, agora identificado como *Penicillium*.

CURRIE (1917) realizou investigações sistemáticas das condições da produção de ácido cítrico em um meio de cultura com concentrações altas de açúcar de baixo pH.

Originalmente, as fermentações cítricas foram desenvolvidas por fermentações em superfície. SZUCS (E.U.A. Pat 2.353.771, 1944), realizou importantes investigações utilizando processo submerso, o qual foi posteriormente sucedido pelas investigações de SHU & JOHNSON (1947).

Estudos têm mostrado que a fermentação cítrica é extremamente complexa. O êxito do processo depende de dois parâmetros fundamentais: da linhagem do fungo produtor de ácido e de uma fermentação sobre condições ótimas (ROHR et al., 1983).

A partir das investigações históricas de WEHMER (citado por ROHR et al., 1983), tem sido demonstrado que existe um grande número de fungos capazes de produzir ácido cítrico em variadas quantidades, sendo comum em membros do gênero *Penicillium* (CURRIE, 1917).

A excreção de ácido cítrico é um fenômeno que ocorre em bactérias, leveduras e fungos. *Arthrobacter paraffineus* e *Corynebacterium* produzem ácido cítrico em um meio contendo hidrocarboneto como fonte de carbono (MILSON & MEERS, 1985).

PERLMAN & SIH (1960) citaram as seguintes espécies de *Aspergillus* na produção de ácido cítrico: *A. awamori*, *A. clavatus*, *A. fenicius*, *A. fonsecaeus*, *A. fumaricus*, *A. luchensis*, *A. saitoi*, *A. usumii* e *A. wentii*. As linhagens são as mais utilizadas na produção de ácido cítrico. KAPOOR et al. (1883), citaram as seguintes vantagens de seu uso:

- A facilidade com que ele pode ser trabalhado;
- A utilização de resíduos industriais crus pelo microrganismo;
- Obtenção de altos rendimentos, tornando o processo econômico.

A fermentação em superfície é um dos processos mais conhecidos e empregados na produção de ácido cítrico. Foi introduzido em 1919 por Societé des Produits Organique na Bélgica; em 1923 por Chas. Pfizer & Co. nos USA. É

muito usado porque é um processo menos sofisticado e requer instalações mais simples, comparado com a fermentação submersa (KUBICEK & ROHR, 1986). O cultivo em superfície é feito em bandejas de alumínio criando uma grande superfície em relação ao volume, uma vez que a conversão de açúcar se dá intracelularmente, após a sua passagem para o interior da célula. O aumento na velocidade do processo é conseguido pela aceleração da difusão, pelo fato da película de fungos ser superficial.

No método submerso, existe a vantagem de se empregar diferentes tipos de substratos e ter um melhor controle da fermentação. Substratos usados na fermentação submersa incluem: glicose, sacarose, melaços de cana de beterraba, além de soro permeado, empregado, por SOMKUTI & BENCIVENGO (1981). Segundo ROHR et al. (1983), o cultivo submerso é um processo de fermentação líquida que pode ser descontínua, contínua ou semicontínua.

Sabemos que a forma do crescimento do micélio de *Aspergillus niger* tem uma grande influência no desenvolvimento da fermentação. Na escala macroscópica, muitos autores tem citado que a formação de pequenos "pellets" suaves e densos de micélio, é essencial para um bom rendimento na fermentação cítrica (SODECK et al., 1981). Estes resultados coincidem com as informações citadas por CLARK et al. (1966), que afirmam que o *Aspergillus niger* cultivado em melaço na forma de micélio filamentosos, possui baixa capacidade de produção de ácido cítrico e tal crescimento durante a fermentação submersa resulta em baixos rendimentos. Entretanto, outros autores obtiveram melhores rendimentos com o fungo crescendo na forma filamentosos (TAKAHASHI, 1965).

A maioria da produção mundial de ácido cítrico é obtida pelo processo submerso (SODECK et al., 1981). De acordo com KUBICEK & ROHR (1986), o processo submerso é conduzido em fermentadores de diferentes tipos, desde que possuam condições para proporcionar a aeração necessária e que possuam

condições de material resistente à corrosão. O processo é conduzido por um período de cinco a oito dias.

No Brasil, alguns trabalhos têm sido publicados visando o melhoramento de linhagens de *Aspergillus niger*, BARACHO (1983), utilizou luz ultravioleta como agente mutagênico; BONATELI et al. (1983), empregaram a técnica do ciclo parassexual.

2.2 Fatores que Influenciam o Acúmulo de Ácido Cítrico por Fungos

Os meios de cultura para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, além de apresentar uma fonte de carbono, necessitam também de nutrientes básicos: fonte de nitrogênio, de fosfatos e de sulfatos.

TRUMPY & MILLIS (1963) enfatizaram que a dificuldade no estudo dos efeitos dos nutrientes na produção de ácido cítrico é devido ao fato de que a melhor concentração de um componente, frequentemente, depende das concentrações dos outros meios.

O nitrogênio é usualmente suprido na forma de sulfato de amônio ou nitrato de amônia. Fisiologicamente, os compostos de amônia geralmente são preferidos. Em geral, a concentração de íons amônia durante a fermentação cítrica pode estar na faixa entre 0,3 a 1,5g NH_4^+ /L.

Para acumular ácido cítrico, o crescimento pode ser restringido, limitando-se o fornecimento de nitrogênio ou fosfato. Foi assim que DAWSON et al. (1989) demonstraram mediante uma fermentação em bateladas, que em uma limitação na concentração de fosfato, o rendimento de ácido cítrico foi inversamente relacionado com o excesso da concentração de nitrogênio no meio.

Segundo MILSON (1987), a limitação de nitrogênio ou fosfato não é a única restrição que deve ser aplicada na cultura de *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico. Também se faz necessário restringir o fornecimento

de certos traços de metais (Fe, Cu, Mn, Zn). Por outro lado, é bem conhecido que *Aspergillus niger* requer uma certa quantidade de todos os traços de elementos para o seu crescimento (STEINBERG, 1939).

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos gerais, estudar numa primeira etapa, as condições de crescimento (meios de cultura, pH, temperatura e aeração) do fungo *Aspergillus niger* NRRL 6411, e numa segunda etapa, tentar encontrar as melhores condições de produção do ácido cítrico, em fermentações submersas.

Como objetivos específicos do presente estudo, podem ser citados:

- 1- Determinar-se experimentalmente a melhor concentração de sacarose para crescimento do fungo.
- 2- Estudar a produção do ácido no meio citado em 1.
- 3- Estudar as condições operacionais na produção do ácido cítrico como pH, temperatura, aeração e sais de ferro, cobre e zinco por fermentação com *Aspergillus niger* NRRL 6411, utilizando como meios de cultura aqueles que implicarem em melhor crescimento do microrganismo.
- 4- Comparar a quantidade de ácido formada em função da concentração dos sais de ferro, cobre e zinco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *Aspergillus niger* tem sido cultivado em fermentações submersas KRISTIANSEN & SINCLAIR (1978), mas na maioria dos trabalhos publicados, diferentes formulações, meios de cultivo e condições operacionais, tem sido relatadas.

No presente trabalho, pretendemos avançar no estudo de meios alternativos e condições de cultivo, procurando melhorar as condições de inoculação, usando técnicas de seleção de esporos.

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho era uma cepa de *Aspergillus niger* NRRL 6411, obtida na forma liofilizada dos laboratórios do NRRL, Peoria, USA.

4.2 Manutenção da Cultura

As culturas estoque do microrganismo foram mantidas em meio sólido, em tubos de ensaio, sendo periodicamente repicadas.

4.3 Preparação do inóculo

Os meios de cultura líquidos foram inoculados com o microrganismo desenvolvido em cultivo sólido, e após esporulação, foram utilizados como inóculos das fermentações em incubador rotativo.

4.4 Fermentação

Os ensaios de fermentação em processo submerso foram realizados em erlenmeyers colocados em incubador rotativo, utilizando meios de cultivo contendo como fonte de carbono sacarose quimicamente pura e glicose. Todos os meios foram enriquecidos com outros nutrientes.

Foram realizadas as fermentações em um incubador rotativo, após definidas as condições de fermentação, com controle de temperatura, aeração e pH.

4.5 Procedimentos Analíticos:

4.5.1 Crescimento celular

O crescimento celular foi acompanhado pela determinação da massa seca, baseado numa curva de calibração em função da absorbância do caldo em fermentação.

4.5.2 Dosagem de açúcar

Os açúcares foram determinados como açúcares redutores totais, após hidrólise ácida, pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico.

4.5.3 Medidas de acidez

A acidez dos meios fermentados, bem como do ácido cítrico, foram determinadas: por titulação com uma base, indicando a acidez total e o ácido cítrico propriamente dito foi analisado através do método Marier e Boulet.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas quatro fermentações em cultura submersa, utilizando como fonte de carbono, a glicose e a sacarose.

As Tabelas 1-a e 1-b mostram as respectivas concentrações e os meios de cultura estudados.

TABELA 1-a: Meios de cultura e concentrações estudados, utilizando como fonte de carbono a glicose:

MEIO 1	g/L	MEIO 2	g/L
Glicose	150,00	Glicose	150,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,25	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,25
NH ₄ NO ₃	2,5	NH ₄ NO ₃	2,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25
KCl	0,42	KCl	0,42
KH ₂ PO ₄	0,1	KH ₂ PO ₄	0,10
Traços de metais: mg/L			
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,5		
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,75		
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,06		

TABELA 1-b: Meios de cultura e concentrações estudados, utilizando como fonte de carbono a sacarose.

MEIO 3	g/L	MEIO 4	g/L
Sacarose	140,00	Sacarose	140,00
KH ₂ PO ₄	1,0	KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25
NH ₄ NO ₃	2,5	NH ₄ NO ₃	2,5
Traços de metais: mg/L			
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,3		
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,25		
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,06		

5.1 Resultados das Fermentações

As tabelas 2 e 3 mostram os resultados obtidos das análises feitas de 24 em 24 horas, em fermentação submersa, durante um tempo de sete dias.

TABELA 2: Resultados das análises, em fermentação submersa, em meio sintético contendo glicose na presença e ausência de metais traços:

Hora	Meios(*)	pH	Acidez Total (mL/mL)	Massa seca(g/L)	Consumo de açúcar (g/L)	Ácido citríco (g/L)
0	1	3,0	1,0	2,98	150,0	
	2	3,0	1,0	1,56	150,0	
24	1	2,0	1,5	7,12	129,0	
	2	1,7	1,5	1,78	120,0	
48	1	0,97	5,75	10,22	114,84	0,5
	2	1,0	4,5	13,10	115,0	0,02
72	1	0,91	10,0	18,80	97,77	1,5
	2	0,69	7,5	6,23	102,50	0,07
96	1	0,82	15,0	21,14	88,89	2,49
	2	0,67	11,5	6,20	109,60	1,10
120	1	0,57	17,75	29,68	87,52	3,88
	2	0,64	14,0	5,80	80,0	1,90
144	1	0,42	23,25	30,14	67,37	4,0
	2	0,59	14,5	5,0	60,0	2,0

(*) Meio 1: Glicose na presença de metais traços;
Meio 2: Glicose na ausência de metais traços

TABELA 3: Resultados das análises, em fermentação submersa, em meio sintético contendo sacarose na presença e ausência de metais traços:

Hora	Meios(*)	pH	Acidez Total (mL/mL)	Massa seca (g/L)	Consumo de açúcar (g/L)	Ácido cítrico (g/L)
0	3	3,0	3,5	0,75	140,0	
	4	3,0	3,5	1,32	140,0	
24	3	1,8	5,5	2,09	70,0	
	4	1,8	5,3	1,61	70,0	
48	3	1,3	11,0	9,93	65,0	0,90
	4	0,98	8,5	14,43	97,7	0,10
72	3	0,8	18,0	5,0	60,0	2,5
	4	0,88	10,5	6,26	85,0	0,90
96	3	0,69	22,5	5,0	60,0	4,0
	4	0,69	16,5	6,0	80,0	0,82
120	3	0,65	25,0	4,9	58,0	4,8
	4	0,67	20,5	5,9	65,0	0,95
144	3	0,62	27,0	4,5	58,0	6,2
	4	0,64	21,5	5,0	63,0	1,2

(*) Meio 3: Sacarose na presença de metais traços;

Meio 4: Sacarose na ausência de metais traços

As Figuras 3 e 4 mostram a produção de ácido cítrico determinados à partir do terceiro dia, em fermentação submersa, em todos os meios de cultura fermentados.

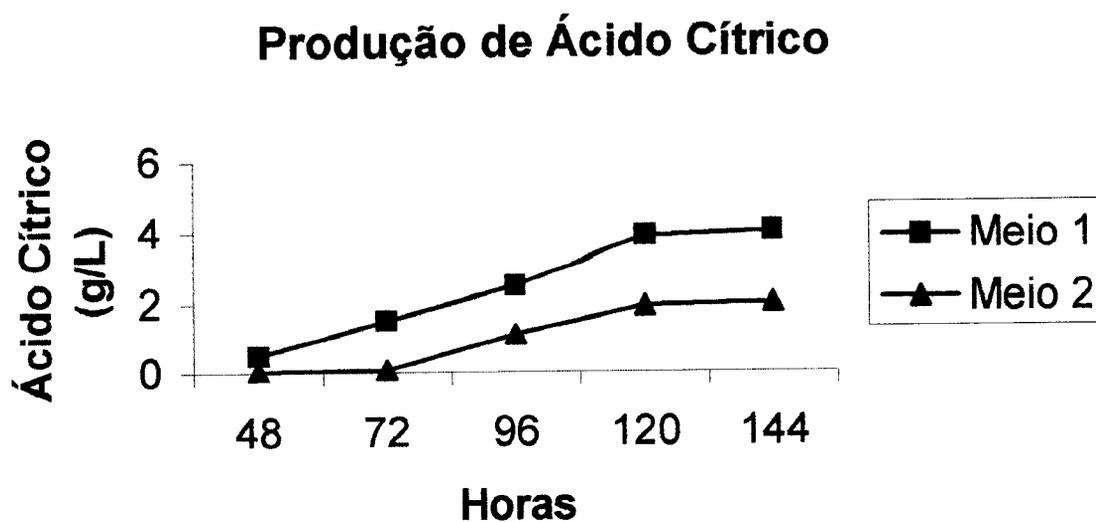


Figura 3: Produção de Ácido Cítrico em meio contendo glicose

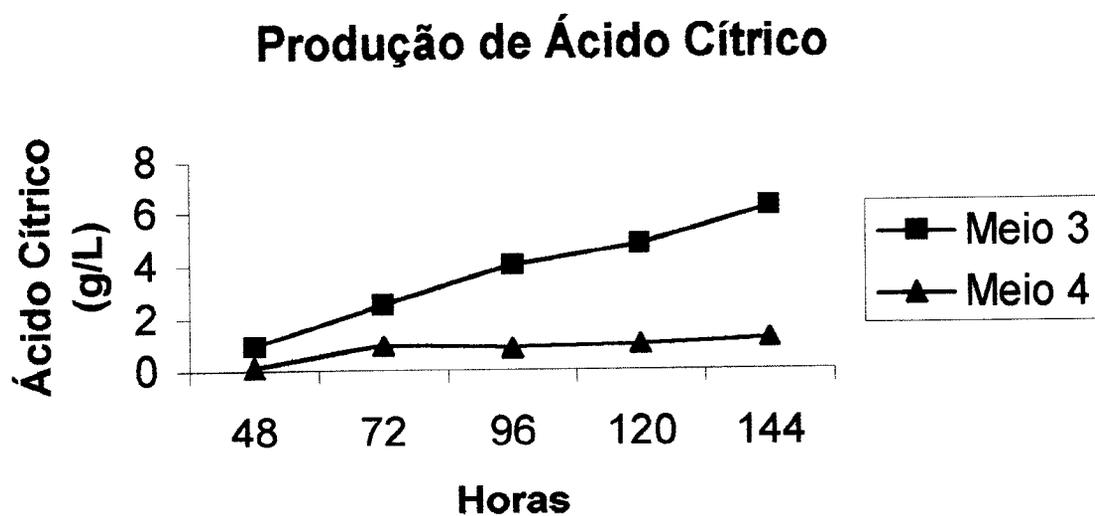


Figura 4: Produção de Ácido Cítrico em meio contendo sacarose

5.2 Métodos Analíticos

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, a 121°C por 20 minutos.

Inicialmente, para o seu crescimento o *Aspergillus niger* era inoculado em tubos padronizados em meio ágar Sabourand (meio sólido) devidamente esterilizado. Adicionava-se 10mL de meio a cada tubo, onde este permanecia até o seu crescimento com as bordas curvadas a um ângulo de 45°, tampados com algodão. Periodicamente o repique era feito.

Em relação ao aspecto morfológico, em todos os meios fermentados, o *Aspergillus niger* teve morfologia semelhante, ou seja, formou-se grânulos compactos e pequenos, não influenciando na produção de ácido cítrico. HANNAN (1972), analisando um certo número de linhagens de *Aspergillus niger*, mostrou que tal caracter morfológico não está ligada com a propriedade de alta produção

Os experimentos foram conduzidos em fermentação submersa utilizando frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL do meio. O pH foi ajustado para 3,0 com HCL.

Para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, além da seleção de amostras, é necessário o estudo de diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos, tais como a temperatura, o pH, os constituintes do meio, e as taxas de aeração e agitação.

Os frascos foram incubados em um incubador rotativo, com o devido controle das condições ambientais, temperatura, aeração e agitação . adequadas.

A fermentação cítrica por *Aspergillus niger* deve ser conduzida à temperatura em torno de 28°C à 35°C. A temperatura utilizada durante toda a fermentação neste trabalho foi de 32°C. Segundo SODECK et al. (1981), citado por PRATA (1989), em temperaturas acima do limite máximo, ocorre formação

de ácido oxálico; abaixo de 28°C ocorre diminuição significativa da produção de ácido cítrico.

A oxigenação por aeração é um problema significativo em fermentação submersa (MILSON, 1987). O consumo de oxigênio causa um aumento no consumo de açúcar e no crescimento do micélio. O oxigênio funciona como um regulador da produção. Uma interrupção do seu fornecimento faz com que a velocidade de produção seja alterada completamente, dependendo da fase em que o processo se encontra (de crescimento do fungo, ou de acúmulo de ácido). O aumento da produção de ácido cítrico é relacionado proporcionalmente com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio. As taxas de aeração e agitação não tiveram um controle adequado durante a fermentação neste trabalho.

Um importante fator que deve ser levado em conta é o pH. O pH inicial usado depende do substrato. No caso da fermentação do melaço (meio natural), emprega-se valores de pH acima de 5,0, porque *Aspergillus niger* não pode germinar, nem crescer bem em valores de pH inferiores a 5,0, em tal substrato.

Quando o substrato é a sacarose ou glicose (meio sintético), as fermentações são conduzidas em pH abaixo de 5,0 (SANCHEZ et al., 1963, GOMES et al., 1987). O pH foi ajustado para 3,0 em todos os meios fermentados, permanecendo inferior a 2,0 durante todo o processo.

Para determinação do peso do micélio, o conteúdo dos frascos foi filtrado com papel filtro Whatman, previamente tarados.

O filtrado recolhido foi submetido às análises e o micélio foi submetido à secagem em uma estufa à 60°C, para controle do peso que era realizada em uma balança HR-200, e crescimento do fungo.

Para determinação da acidez total, pegou-se um volume de 50mL de meio, para ser titulado com NaOH 0,1N até o pH se neutralizar. Não usou-se

fenolftaleína como indicador de pH, pois não houve mudança de cor nesse experimento.

Os açúcares redutores foram determinados utilizando-se a metodologia DNS, redução do ácido 3,5 dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

Fez-se a curva de calibração com glicose na faixa de 0,1 a 1,0 g/L. A absorbância foi lida em espectrofotômetro B 380 MICRONAL, utilizando um comprimento de onda de 540nm.

Após feita a curva padrão, as amostras diluídas dos meios fermentados eram analisadas de modo que a concentração de açúcares se situe na faixa de 0 a 0,1g/L. Da amostra adequadamente diluída, determinou-se a concentração de açúcar redutor através da equação da curva padrão, e então, levando-se em conta o fator de diluição empregado na amostra inicialmente, determinou-se a concentração de açúcar redutor na amostra desconhecida.

Os resultados foram expressos em gramas por litro, através da equação da reta:

$$C(\text{g/L}) = 3,415572 \times \text{Abs.} + 0,051668 \times \text{Diluição}$$

Para determinação do ácido cítrico, foi utilizado o método “Marier & Boulet”. Diversas pesquisas foram feitas e constatou-se que esse método é o mais usado em geral por pesquisadores.

Fez-se a curva de calibração de concentração em função da absorbância na faixa de 0,1 a 1,0g/L, e obteve-se a equação da reta. A leitura foi feita no espectrofotômetro B 380 MICRONAL, utilizando um comprimento de onda de 420nm.

Os resultados foram obtidos e expressados em gramas por litro, usando a seguinte equação da reta:

$$C(\text{g/L}) = 6,299 \times \text{Abs.} - 0,0306 \times \text{Diluição}$$

Observou-se que a combinação de glicose e frutose produziu mais ácido que a glicose sozinha, portanto a sacarose é o açúcar que permite maior produção de ácido.

É bem conhecido que *Aspergillus niger* requer uma certa quantidade de todos os traços de elementos para o seu crescimento (STEINBERG, 1939).

Íons de ferro são conhecidos como ativadores de acoitase e, portanto, a deficiência de ferro é provavelmente um requisito no acúmulo de ácido cítrico. Caso o ciclo seja interrompido nesta etapa, uma pequena quantidade de ferro é necessário para a máxima produção de citrato (SHU & JOHNSON, 1948).

As investigações de CLARK et al. (1966) confirmam também a natureza reguladora de íons manganês. SCHWEIGERT (E.U.A. Pat. 2.476.159, 1961), descobriu que íons cobre atuavam como um contra-agente na contaminação por íons ferro no meio nutriente. A ação antagonística dos íons cobre, também tem sido usada como um argumento a favor de que o ferro é o elemento chave na regulação de acúmulo de ácido cítrico. O mesmo autor mostra ainda que os íons cobre pode contra-atacar com sucesso na adição de manganês, no meio da fermentação. Estas observações são confirmadas por recentes investigações de que íons cobre são inibidores do acúmulo de manganês celular. Eles concluíram portanto, que o manganês é o íon metálico crítico na fermentação, para produção de ácido cítrico.

De acordo com os resultados, observou-se que a produção de ácido cítrico é altamente influenciado pelos metais traços, sendo importante sua presença na composição do meio.

5.3 Sugestões Para Estudos Posteriores

As seguintes sugestões são apresentadas como alternativas para o desenvolvimento de outros estudos do processo de fermentação cítrica:

- Desenvolver outros experimentos, variando-se as concentrações dos meios e nutrientes no meio de cultura;
- -Pesquisar sobre novos métodos de fermentação, visando meios de cultura diferentes;
- Selecionar outras linhagens de *Aspergillus niger*, empregando-se novas técnicas de melhoramento genético;
- Pesquisar outros métodos para determinação do ácido cítrico.

6 CONCLUSÃO

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

O pH permaneceu baixo, inferior a 2,0 durante toda a fermentação, e em todos os meios de cultura, que é essencial para uma produção adequada de ácido cítrico.

A massa seca para determinação do crescimento celular, mostrou-se significativa nos meios fermentados, em especial, no meio 1, que continha os metais traços.

A acidez total, teve crescimento ótimo, observado em todos os meios de cultura, principalmente, nos que continham a presença dos metais traços.

Constatou-se que o consumo de açúcar e produção de ácido cítrico, foi maior nos meios sintéticos na presença dos metais traços, mostrando-se sua forte influência na composição do meio.

Os resultados gerais deste estudo mostraram, que a linhagem estudada, que foi um cepa de *Aspergillus niger* NRRL 6411, apresentou as melhores características de desenvolvimento e maior produção de ácido, nos meios 1 e 3,

ou seja, nos meios contendo os íons Fe, Cu e Zn. Observou-se, que essa linhagem, pelos estudos realizados, não apresentou um produção de ácido eficiente, na condição de fermentação utilizada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARACHO, J.R. & COELHO, W. R. Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. Ci. E Cul. 30(5): 605-608, 1988.
2. BONATELLI JR., R. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Tese Mestrado, USP/ESALQ, 1977.
3. BRADLEY, R. et al. Citric Acid Stanford Res. Inst. Int-Chem. Econ. Handbook, junho, 1992.
4. CHAUDHARY, A. Q. PIRT, S. J. The influence of metal complexing agents on citric acid production of *A. niger*. J. Gen. Microbiol. 43, 71-81, 1966.
5. CLARK, D.S.; ITO, K.; HORITSU, H. Effect of manganese and other heavy metals on submerged acid fermentation of the molasses. Biotechnol. Bioeng. 8: 465, 1966.
6. CURRIE, J. N. The citric acid fermentation. Biol. Chem. 31: 15-37, 1917.

7. DAWSON, M. ; MADDOX, I. S.; BROOKS, J.O. Evidence for catabolic repression during citric acid production by *Aspergillus niger* under phosphate limited growth conditions. Biotechnol. Bioeng. 33: 1500-1504, 1989.
8. E.U.A. Pat. 2.476.159 L.B. Schweiger. Method of production citric acid by fermentation. 1949.
9. E.U.A. Pat.2.353.771 J. Szucs. Citric acid by fermentation. 6 May 1944
10. GLAZER, A. N., NIKAIDO, H., Microbiol Bioechnology, W. H. Freeman and Company, 1995.
11. HANNAN, M.A. Variants of *Aspergillus niger* induced by gamma rays. Indian. J. Exp. Biol. 10: 379-381, 1972.
12. HOCKNER, 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 Biotech., 31, 17-24, 1989
13. JERNEJC, K.; CIMERMAN, A.; PERDIH, A. Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.14: 29-33, 1982.
14. KAPOOR, K. K.; CHAUDHARRY, K.; TAKUO, P. Citric acid. In: REED, G. "Prescott e Dunn's industrial microbiology. 4 ed. Westport, AVI, 1982.
15. KRISTIANSEN, B., SINCLAIR, C. G., Producion of Citric Acid in Batch Culture. Biotech. Bioeng., Vol. XX, 1711-1722, 1978.
16. KUBICEK, C.P. & ROHR, M. Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acumulation in *Aspergillus niger*. Eur. J. Appl. Microbiol. 4: 167, 1977.
17. LIMA, U. A., AQUARONE, E. & BORZANI, W. Tecnologia das Fermentações. Editora Edgard Blucher. São Paulo, 1975.

18. MARIER, J.R. & BOULET, M. Direct determination of citric acid in milk by an improved pyridine, acetic anhydride method. J. Dairy Sci. 41: 1683-1693, 1958.
19. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428, 1959.
20. MILSON, P. E. Organic acids by fermentation, especially citric acid. In: KING, R. D. & CHEETHAM, P.S.J. Ed. Food biotechnology. London, Elsevier Applied Science, Chapt 7, p. 273-307, 1987.
21. PANDA, T; KUNDU, S.; MAJUNDAR, S.K. Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using treated Indian cane molasses. Proc. Biochem. 19(5): 183-187, 1984.
22. PERLMAN, D. & SIH, C.J. Fungal synthesis of citric, fumaric, and itaconic acids. In: HOCKENHULL, D.I.D. ed. Progress and industrial microbiology. London, Hymood. V.2. pags 167-168, 1960.
23. PRATA, A.M.R. Avaliação do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de ácido cítrico. Viçosa, 1989. Tese (mestrado em Ciências de Alimentos) – Fac. Eng. Alim. – Universidade Federal de Viçosa.
24. ROHR, M. KUBICEK, C.P. & KOMINEK, J. Citric acid. In: DELLWEG, H. ed. Biotechnology. Weinheim, Verlag chemie, v.3., pag. 419, 1983.
25. SANCHEZ-MARROQUIN, A.; CARRENO, R.; LEDEZMA, M. Effect of trace elements on citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. 20(6): 888-892, 1970.
26. SHU, P. & JOHNSON, M.J. Effect of composition of the sporulation medium on citric acid production by *Aspergillus niger* in submerged culture. J. Bacteriol. 54: 161, 1947.

27. SODECK, G.; MODEL, J.; KOMINEK, J.; SALZBRUNN, W. Production of citric acid according to the submerged fermentation process. Proc. Biochem. V. (3): 9-11, 1981.
28. SOMKUTI, G. A. & BENCIVENGO., M. M. Citric acid fermentation in whey permeate. Dev. Ind. Microbiol. 22: 557-563, 1981.
29. STEINBERG, R. A. Effect of nitrogen compounds and trace elements on growth of *Aspergillus niger*. J. Agric. Res. 59: 731, 1939.
30. TAKANASHI, J.; HIDAHA, H.; YAMADA, K. Effect of mycelial forms on citric acid fermentation in submerged mold culture. Agric. Biol. Chem. 29(4): 331-336, 1965.
31. TRUMPHY, B. H. & MILLIS, N. F. Nutritional requirements of on *Aspergillus niger* mutant for citric acid production. J. Gen. Microbiol. 30: 381-394, 1963.
32. TURA, C. Unidade de Ácido Cítrico. Dystak's. Uberlândia, 13 (162) 6-9, setembro de 1998.
33. YOKOYA, F. Fermentação Cítrica. Campinas, S.P: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1992.