

II-530 - USO DE *Aspergillus niger* PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO E DEGRADAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA EM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

Nathália Araújo Magalhães⁽¹⁾

Tecnóloga em Gestão Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará. Mestranda em Tecnologia e Gestão Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará (IFCE).

Germana Maria Marinho Silva⁽²⁾

Licenciada em Biologia pela Universidade Estadual do Ceará (UECE). Graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental pelo Instituto Federal do Ceará (IFCE). Diretora de Ensino e professora/pesquisadora do Instituto Federal do Ceará - Campus Maracanaú.

Carlos Ronald Pessoa Wanderley⁽³⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Professor/pesquisador do Instituto Federal do Ceará - Campus Maracanaú. Doutorando em Engenharia Civil (Recursos Hídricos/UFC).

Glória Marinho⁽⁴⁾

Graduação em Farmácia-bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (USP). Pós-doutorado pela Universidade do Minho – PT. Professora/pesquisadora do Instituto Federal do Ceará (IFCE) – Campus Fortaleza.

Kelly Rodrigues⁽⁵⁾

Engenheira Civil pela Universidade Estadual do Maranhão. Mestre em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutora em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (USP). Professora/pesquisadora do Instituto Federal do Ceará (IFCE) - Campus Fortaleza.

Endereço⁽¹⁾: Avenida Treze de Maio, 2081 – Benfica - Fortaleza - CE - CEP: 60040-531 - Brasil - Tel: (85) 3307-3750 - e-mail: nathaliamagalhaes.tga@gmail.com

RESUMO

O ácido cítrico é um importante ácido utilizado em larga escala na indústria de alimentos e bebidas. O bioprocessamento para a produção do ácido cítrico gera um custo elevado para a indústria, então, na busca de tornar o processo menos oneroso, diversos estudos são feitos na área para se buscar resíduos que possam ser aproveitados como substrato e micro-organismos que consigam excretar o ácido em maior quantidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de três cepas de *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico e redução do potencial poluidor do soro de queijo. Os reatores contendo soro de queijo e inóculo fúngico foram submetidos a uma agitação de 150 rpm por 10 dias. Foi observada produção de 584,4 mg/L de ácido cítrico nas primeiras 24 horas, consumo de açúcar redutor de 27,6 g/L, produção de biomassa de 9,3 g/L e eficiência de 58,4% em relação à remoção de DQO, para R1 ao final do processo. Para os reatores R2 a produção de ácido cítrico ficou cerca de 45 mg/L no dia 1, com um consumo de açúcar redutor de 25,4 g/L, 10,5 g/L de biomassa produzida e 63,7% na redução de DQO do meio no 10º dia de fermentação. A série de reatores R3 não teve pico de produção de ácido cítrico, o consumo de açúcar no meio foi de 13,3 g/L, produção de biomassa de 8,4 g/L e eficiência de redução da DQO de 21,2%. Todos os reatores cresceram na forma de *pellets*. A cepa utilizada em R1 foi a que mostrou melhor desempenho produtivo, contudo, deve ser observada a capacidade de otimização do meio para maior excreção do ácido orgânico em estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Fungo, Reator Biológico, Ácido Orgânico, Soro de Queijo.

INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um dos produtos resultante da fermentação mais produzido no mundo. É produzido da fermentação a base de sacarose ou amido, ou até mesmo utilizando resíduos da agroindústria (DHILLON *et al.*, 2011). Sua demanda de produção é cada vez mais crescente, graças a suas aplicações na indústria de alimentos, bebidas, farmacêutica e cosmética (AIACHE *et al.*, 1988 *apud* SILVA *et al.*, 2012).

A produção de ácido cítrico é totalmente dependente do potencial de biossíntese do micro-organismo aplicado. Contudo, as condições adotadas e a composição de meio são variáveis importantes, capazes de promover grandes acréscimos a eficiência produtiva (MILLIS, 1985). O ácido cítrico é, em maior parte, produzido através de biossíntese, utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* (LEONEL E CEREDA, 1995), isto devido a sua elevada taxa de crescimento e termotolerância, o que favorece sua aplicação em diversos estudos de seleção e geração de produtos de valor agregado (LIMA *et al.*, 2014).

Micro-organismos isolados do ambiente, principalmente aqueles que ainda não foram estudados, estão cada vez mais em evidência. Diversas pesquisas da área de biotecnologia já propõem em seus estudos isolar, caracterizar e identificar esses micro-organismos a fim de aplica-los na produção de biomoléculas com grande potencial biotecnológico (MUNIZ *et al.*, 2014).

No entanto, um dos maiores problemas para a fermentação de ácido cítrico está ligado ao custo do processo, pois o substrato a ser empregado para a fermentação apresenta um alto valor, o que tem impulsionado cada vez mais a busca pelo uso de resíduos agroindustriais como substrato para o meio de fermentação, visando reduzir os custos empregados (LEONEL e CEREDA, 1995).

As tecnologias de tratamento de efluentes são amplamente estudadas em todo o mundo a fim de obter sistemas cada vez mais eficientes quanto à remoção de poluentes diversos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Entretanto, é uma tendência atual o desenvolvimento não somente de sistemas de tratamento eficientes quanto à degradação de poluentes, mas também obter uma tecnologia limpa e capaz de gerar produto de interesse econômico.

A produção de ácido cítrico e de outros subprodutos utilizando resíduos como matéria-prima, se constitui em vantagem interessante que combina o gerenciamento ambiental, pelo tratamento do despejo, com a redução de custos e geração de divisas (KHOSRAVI-DARANI *et al.*, 2008).

Dentro deste contexto, o emprego de reatores fúngicos pode ser uma ferramenta útil promovendo a utilização da matéria orgânica presente em resíduos agroindustriais e em seus efluentes líquidos para produção de ácido cítrico, tratando-se de tecnologia ambientalmente adequada e com potencial econômico elevado. Contudo, sistemas desta natureza são pouco reportados, o que exige estudo profundo a fim de selecionar as condições ótimas para produção de quantidade expressiva do ácido.

Neste sentido, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade de produção de ácido cítrico e redução do potencial poluidor do substrato, fazendo uso de três cepas distintas de *Aspergillus niger*. O substrato utilizado foi o soro de queijo, em reatores de batelada agitada a 150 rpm com crescimento disperso, incubados a 30°C por 10 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

MICRO-ORGANISMOS

Duas cepas do fungo *Aspergillus niger*, utilizadas neste estudo, foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual do Ceará, após serem isoladas do ar e identificadas pelo referido laboratório. Neste trabalho, para diferenciá-las, serão denominadas de *Aspergillus niger* AX e *Aspergillus niger* BY. A cepa de *Aspergillus niger* AN 400 foi cedida pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental do Instituto Federal do Ceará.

O cultivo para preparo das suspensões de esporos foi feito em placas de *Petri* contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), previamente esterilizado em autoclave à 121°C, durante 20 minutos. Após 10 dias de cultivo, nos quais as placas foram mantidas a uma temperatura de 28°C, os esporos foram removidos com a ajuda da alça de *Drigalsky* e solução isotônica – NaCl a 0,9% - contendo Tween 80, onde cerca de 5 mL de solução salina contendo Tween 80 foi adicionada sobre a superfície da cultura e, com a alça de *Drigalsky*, foi promovido o arraste dos esporos, gerando assim uma suspensão que foi armazenada em frasco estéril para posterior contagem de esporos.

A contagem dos esporos ocorreu com o auxílio de microscópio óptico utilizando Câmara de *Neubauer* e, com base no resultado obtido, foi acrescentado nos reatores uma quantidade correspondente a 2×10^6 esporos/mL.

SUBSTRATO

O substrato utilizado na presente pesquisa para o processo de fermentação foi o soro de queijo. Não houve diluição do soro, no entanto, o mesmo passou por processo de extração da proteína, que se deu com o ajuste do pH para 4,6 utilizando ácido clorídrico P.A. Logo depois, o soro foi aquecido até atingir 90°C. Posteriormente, ao atingir temperatura ambiente, o soro mais clarificado foi separado da parcela sólida por sifonação.

Não foi adicionado nenhum outro tipo de nutriente ou fonte de carbono externo, deixando disponíveis apenas o açúcar e nutrientes naturais do meio. Antes da adição do inóculo, o meio fermentativo e os reatores foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, em temperatura de 121°C.

MONTAGEM E OPERAÇÃO DOS REATORES

O substrato foi distribuído em alíquotas de 200 mL em *erlenmeyers*, previamente esterilizados antes da adição do inóculo. Os reatores tiveram o pH ajustado para 3,5 com ácido clorídrico P.A. O experimento foi dividido em três séries de reatores denominados; R1 (reatores com *Aspergillus niger* AX), R2 (reatores com *Aspergillus niger* BY) e R3 (reatores com *Aspergillus niger* AN 400), todos em duplicata.

O tempo reacional das séries de reatores foi de 10 dias, onde diariamente foram feitas análises para averiguar a concentração de ácido cítrico no processo fermentativo. Os reatores foram incubados em mesa agitadora a uma temperatura de 30°C e agitação constante de 150 rpm. As análises físico-químicas observadas durante os 10 dias foram feitas segundo a Tabela 1.

Tabela 1: Análises executadas ao longo do experimento.

PARÂMETROS	METODOLOGIA
Ácido Cítrico (AC)	Marier e Boulet (1958)
Açúcar Redutor (AR)	Embrapa (2013)
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	Apha (2005)
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	Apha (2005)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados observados, desconsiderando o valor inicial de ácido cítrico presente no meio e levando em consideração somente o que foi produzido após o início do processo, obteve-se produção de ácido cítrico nos reatores R1 de 584,4 mg/L, nas primeiras 24 horas, a qual chegou a 599 mg/L, no dia 8. No entanto, os reatores R2 não conseguiram se manter produtivos quanto à produção de ácido cítrico ao longo do tempo reacional estudado, tendo-se registrado somente 45 mg/L de produção no 1º dia e, após isso, só houve consumo do ácido cítrico presente no meio. Para a série de reatores R3 não houve produção. Nas Figuras 1, 2 e 3 são mostrados o processo de produção de ácido cítrico, consumo de açúcar redutor e produção de biomassa pela análise de SSV, para os reatores R1, R2 e R3, respectivamente.

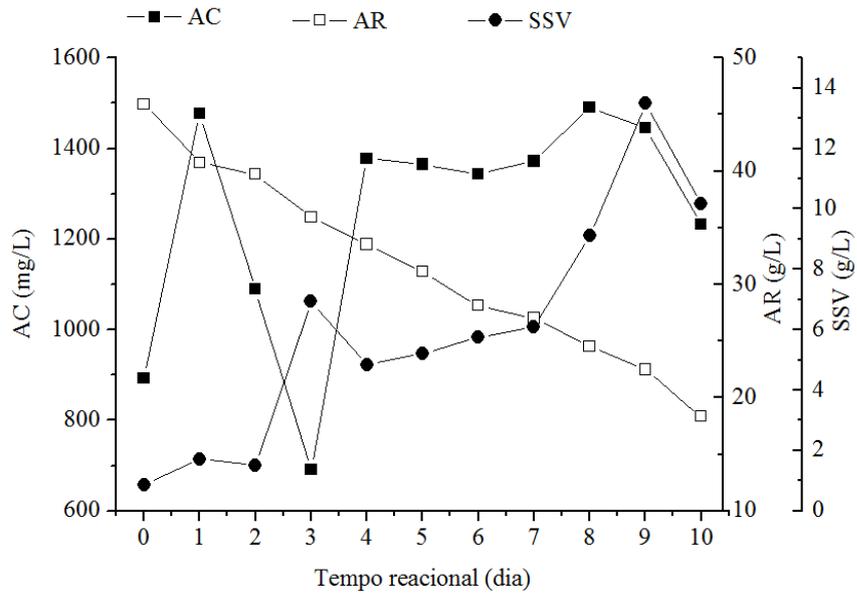


Figura 1: Produção de ácido cítrico (AC); consumo de açúcar redutor (AR); e produção de biomassa pelo método dos sólidos suspensos voláteis (SSV) em R1.

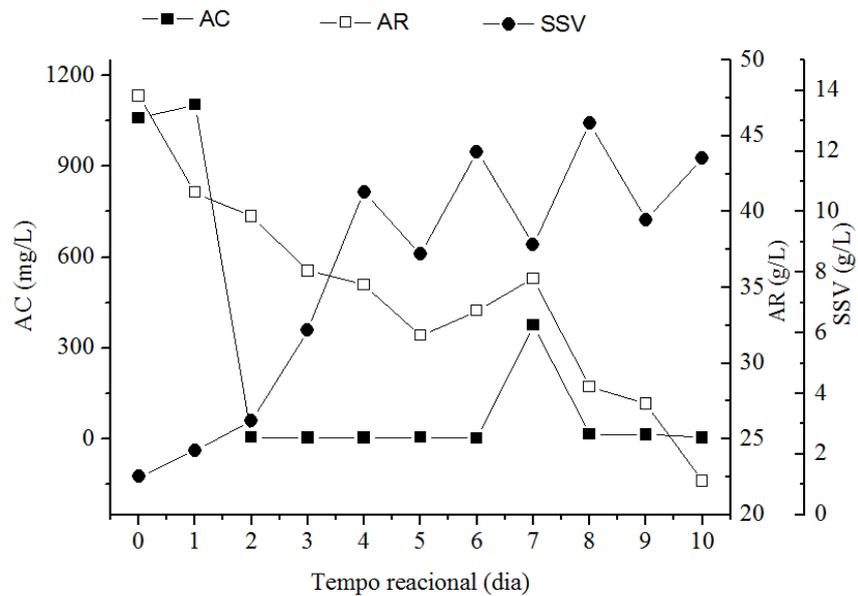


Figura 2: Produção de ácido cítrico (AC); consumo de açúcar redutor (AR); e produção de biomassa pelo método dos sólidos suspensos voláteis (SSV) em R2.

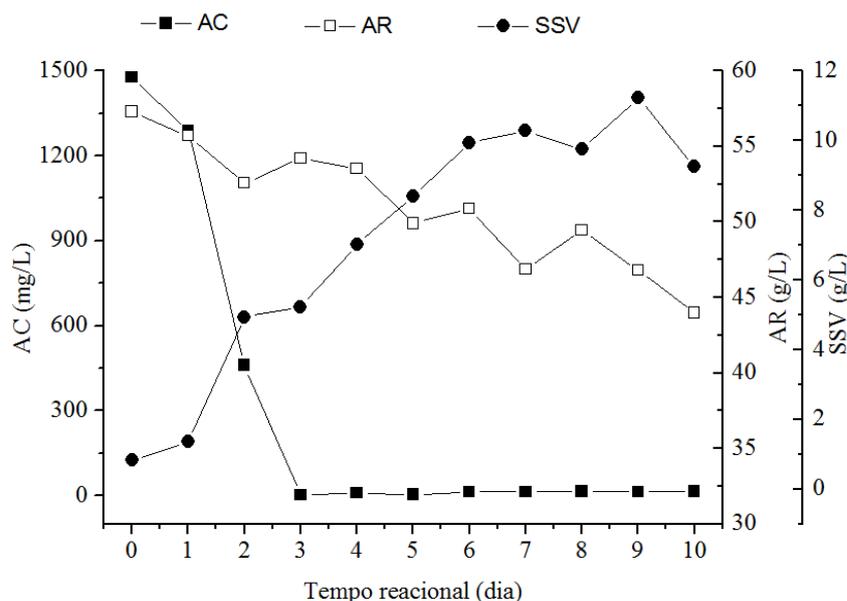


Figura 3: Produção de ácido cítrico (AC); consumo de açúcar redutor (AR); e produção de biomassa pelo método dos sólidos suspensos voláteis (SSV) em R3.

Nos reatores R1, mesmo que a concentração de ácido cítrico registrada no 8º dia tenha sido um pouco maior que a do 1º dia, o pico de produção deve ser observado que em termos de produtividade (variável que corresponde a concentração obtida, dividida pelo tempo em que a mesma foi obtida). Neste sentido, a produção de 599 mg/L no 8º dia não apresentaria vantagens, pois gera produtividade de 74,9 mg/L.dia. No entanto, para o 1º dia, em R1, tem-se 584,4 mg/L.dia. Assim, nem sempre uma maior produção significa uma maior produtividade, reforçando a importância de se observar o período que se levou para alcançar dada concentração do produto de estudo, pois um processo relativamente longo insere custos à produção.

Embora a produção de ácido cítrico alcançada na presente pesquisa não seja tão elevada, deve ser levado em conta que não houve adição nutricional para alcance de condição ótima para a produção, tentando-se em um primeiro momento apenas observar a capacidade das cepas de excreção do ácido.

El-Holi e Al-Delaimy (2003) ao utilizar *Aspergillus niger* ATCC 9642, observou concentração por volta de 2,4 g/L de ácido cítrico, no 8º dia, ao adicionar somente soro como substrato, no entanto, quando otimizou o meio com 15% de sacarose, a produção subiu para 106,5 g/L no 16º dia de fermentação. Os autores associaram a baixa produção ao utilizar somente soro de queijo pela presença da galactose, açúcar resultante da quebra da lactose.

Até o final do tempo reacional, 27,6 g/L, 25,4 g/L e 13,3 g/L do açúcar presente no meio foi consumido em R1, R2 e R3, nesta ordem. E ambos os reatores produziram 9,3 g/L, 10,5 g/L e 8,4 g/L de biomassa. A concentração de açúcar redutor presente nos reatores reduziu à medida que a biomassa aumentou.

Os carboidratos são a fonte de carbono mais facilmente assimilada pelos fungos para seu crescimento (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004), a natureza dos açúcares e suas concentrações podem influenciar diretamente na produção de ácido cítrico (GREWAL e KALRA, 1995; MOURYA e JAUHRI, 2000).

Neste sentido, Friedrich *et al.* (1994) fez análises individuais dos açúcares, e mostrou que sacarose, glicose, frutose e lactose estavam presentes no início do processo, e todos foram degradados, no entanto a lactose foi mantida inalterada.

Contudo, houve consumo de açúcar redutor deste experimento, então é provável que tenha ocorrido a quebra da lactose e posterior consumo da glicose resultante dessa quebra. Autores como Hossain *et al.* (1983) e Soccol e Vandenberghe (2003) dizem que a lactose não é preferencial para produção de ácido cítrico, sendo assim, é provável que as cepas estudadas necessitem de um açúcar mais simples, como sacarose ou glicose.

Tratando-se da demanda química de oxigênio solúvel nos reatores R1, R2 e R3, assim como apresentado na Figura 4, as cepas testadas mostraram potencial para redução da DQO inicial, gerando uma concentração final de menos de 30 g/L, com exceção da série de reatores R3, que além de não produzir ácido cítrico na condição estudada, também foi a que apresentou a menor redução de DQO. A eficiência de remoção da DQO ficou por volta de 58,4% e 63,7%, para os reatores R1 e R2, respectivamente, e de apenas 21,2% para R3.

Pastore (2010) demonstrou em seu trabalho a capacidade do fungo filamentososo *Aspergillus niger* de reduzir a DQO do meio, tornando-o menos carregado e atenuando seu poder poluidor. E esse fator, somado ao processo produtivo de ácido cítrico utilizando resíduo agroindustrial, torna a bioprodução ainda mais vantajosa.

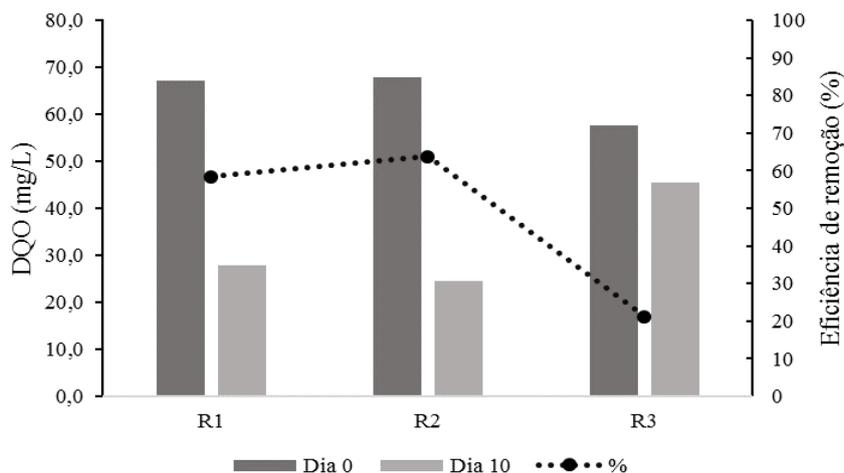


Figura 4: Valores da demanda química de oxigênio (DQO) no tempo inicial e final do bioprocessamento.

Em todas as séries de reatores os fungos cresceram na forma de *pellets*, que, de acordo com a literatura, é a morfologia mais adequada para a produção de ácido cítrico (GOMEZ *et al.*, 1988). Contudo, mesmo com o crescimento em *pellets*, não foi possível maiores excreções do ácido nos reatores, principalmente em R2, e nenhuma produção foi observada em R3. Na Figura 5 são mostrados os *pellets* já formados nos reatores R1 e R2. A forma dos *pellets* em R3 foi assim como a apresentada em R2.



Figura 5: Crescimento em *pellets* para os reatores R1 (esquerda) e R2 (direita).

A capacidade de produção de ácido cítrico a partir de soro de queijo pelo fungo *Aspergillus niger* AX, presente em R1, principalmente nas primeiras 24 horas do processo, tende a reduzir custos do processo de produção. No entanto, ainda é preciso buscar meios de impulsionar a produção, buscando nutrientes e condições que faça com que o fungo encontre um meio ideal para excretar o máximo de ácido cítrico possível, além de reduzir o potencial poluidor do substrato aplicado.

CONCLUSÃO

Duas das três cepas avaliadas conseguiram reduzir a DQO inicial do soro em concentrações abaixo de 30 g/L, mostrando o potencial para a redução da carga poluidora do resíduo. Entre as cepas testadas, a que demonstrou ter maior capacidade de resposta e produtividade, maior produção em menor tempo, foi o *Aspergillus niger* AX. No entanto, as concentrações observadas ainda são baixas, e devem ser estudadas novas condições para aumentar a produção do bioprocessamento e, paralelamente, uma maior redução da DQO inicial do substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20ª Edição. American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington: 2005. 953p.
2. DHILLON, G. S. *et al.* Utilization of different agroindustrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 54, p. 83-92, 2011.
3. EL-HOLI, M. A.; AL-DELAIFY, K. S. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. *African Journal Biotechnol*, v. 2, p. 356-359, 2003.
4. EMBRAPA. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para laboratório de bioprocessos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, ISSN 1679-6543, 2013.
5. ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 510 p.
6. FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. Concomitant biosynthesis of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes and citric acid on sucrose. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 16, p. 703-707, 1994.
7. GOMEZ, R.; SCHNABEL, I.; GARRIDO, J. *Pellet* growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 10, n. 3, p. 188-191, 1988.
8. GREWAL, H. S.; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. *Biotechnology*, v. 13, n. 2, p. 209-234, 1995.
9. HOSSAIN, M.; BROOKS, J. D.; MADDOX, I. S. Production of citric acid from whey permeate by fermentation using *Aspergillus niger*. *J. Dairy Sci. Technol.*, v. 18, p. 161-168, 1983.
10. KHOSRAVI-DARANI, K.; ZOGHI, A.; ALAVI, S. A.; FATEMI, S. Application of Plackett Burman design for citric acid production from pretreated and untreated wheat straw. *Iran J. Chem. Chem. Eng.*, v.27, n.1, p.91-104, 2008.
11. LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. *Sci. Agric. Iracicaba*, v. 52, n. 2, p. 299-304, 1995.
12. LIMA, B. F. *et al.* Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da Caatinga de Pernambuco. *Revista e-xacta*, v. 7, n. 1, p. 147-157, 2014.
13. MARIER, J. R.; BOULET, M. Direct determination of citric acid in milk with improved pyridine acetic anhydride method. *Journal of Dairy Science*, v. 41, p. 1683-1692, 1958.
14. MILLIS, N. F. The organisms of biotechnology In: MOO-YOUNG M. *Comprehensive Biotechnology*, Oxford: Pergamon, V.1. 1985.
15. MOURYA, S.; JAUHRI, K. S. Production of citric acid from starch-hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Microbial. Res.*, v. 155, p. 37-44, 2000.
16. MUNIZ, M. C. S.; LIMA, B. F.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A. Seleção de amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de Pernambuco e produção de ácido cítrico por fermentação submersa. *E-xacta*, v. 7, n. 2, p. 55-65, 2014.
17. OLIVEIRA, L.; BARRETO, M.; VITALLI, V.; MACHADO, K.; ROBERTO MATHEUS, D. Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros. *Naturalia*, v.33, p.85-99, 2010.
18. PASTORE, N. S. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* usando manipueira como substrato. 2010. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2010.
19. SILVA, G. K. C.; RAMALHO, S. A.; GUALBERTO, N. C.; GOMES, E. B.; MIRANDA, R. C. M.; NARAIN, N. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria prima para a produção de ácido cítrico por *Kluyveromyces marxianus* URM 4404. *Scientia Plena*, v. 8, n. 5, p. 2012.
20. SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 205-218, 2003.