



CRISTINE RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA  
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO  
NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO POLPA CÍTRICA

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre  
pelo Programa de Pós-Graduação em  
Processos Biotecnológicos da  
Universidade Federal do Paraná

Orientador : prof<sup>a</sup> Dra. Luciana P. S.  
Vandenberghe  
Co-orientador: prof. Dr. Carlos Ricardo  
Soccol

Curitiba  
2006



CRISTINE RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA  
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO  
NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO POLPA CÍTRICA

Curitiba  
2006

*Aos meus pais, exemplos  
de força e honestidade,  
meu amor e admiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Dr<sup>a</sup>. Luciana Porto de Souza Vandenberghe por sua orientação, paciência e apoio em todos os momentos na execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela co-orientação e apoio constantes.

Ao Professor Dr. Willibaldo Schmidell Netto e à Professora Dr<sup>a</sup>. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros, por tão gentilmente aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação.

À Mitiyo, Adriana e Juliana, pelo apoio e auxílio prestados durante os trabalhos realizados.

À Gisele, Michele, Cristina Beatriz, Clarice e Andréa, pela amizade, risos, e apoio ao trabalho, obrigada.

Aos colegas de trabalho e professores do Laboratório de Processos Biotecnológicos pela cooperação e auxílio.

Aos meus familiares, em especial minha avó Regina que rezou e, tenho certeza, ainda olha por mim, muita saudade.

Aos Badenias pelo incentivo, descontração e paciência, muito obrigada.

Ao Edgar pelo carinho, incentivo incondicional e infinita paciência, todo meu amor.

À CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o período de mestrado.

À UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos pela estrutura necessária á realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE ABREVIACOES</b>	xii
<b>RESUMO</b>	Xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	4
2.1. OBJETIVOS GERAIS	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	5
3.1. POLPA CÍTRICA (PC)	6
3.2. ÁCIDO CÍTRICO (AC)	9
3.2.1. APLICAÇÃO DO AC	10
3.2.2. PRODUÇÃO DO AC	13
3.2.2.1. Fermentaco no Estado Sólido (FES)	15
3.2.2.2. Aspectos da FES	18
3.3. MICRORGANISMO	20
3.3.1. Aspergillus niger	21
3.4. MUTAOES	22
3.4.1. MUTAÇÃO INDUZIDA POR RADIAÇÃO	24
3.4.2. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV)	25
3.4.3. MECANISMOS DE REPARO	26
3.4.4. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA	27
3.5. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE AC	27
3.5.1. FONTE DE CARBONO	28
3.5.2. FONTE DE NITROGÊNIO	29
3.5.3. FONTE DE FÓSFORO	29
3.5.4. ELEMENTOS TRAOS	30
3.5.5. ÁLCOOIS INFERIORES	30
3.5.6. pH	31
3.5.7. TEMPERATURA	31
3.5.8. AERAÇÃO	32
3.5.9. UMIDADE	33

3.5.10. GRANULOMETRIA DAS PARTÍCULAS DO SUBSTRATO	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1. POLPA CÍTRICA	35
4.2. ATIVIDADE DE ÁGUA	35
4.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	35
4.4. MICRORGANISMOS	36
4.4.1. RECUPERAÇÃO DE ESPOROS/PREPARO DE INÓCULO	36
4.4.2. CONTAGEM DE ESPOROS	37
4.4.3. CURVA DE ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE EM PLACA	37
4.5. SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE AC	38
4.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AC	39
4.7. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AC POR FES	39
4.7.1. pH E UMIDADE	40
4.7.2. FONTE DE CARBONO	40
4.7.3. GRANULOMETRIA DA PC	41
4.7.4. SAIS	41
4.7.5. FONTE DE NITROGÊNIO	42
4.7.6. ÁLCOOIS INFERIORES	42
4.8. PRODUÇÃO DE AC EM BIORRETORES DO TIPO COLUNAS COM AERAÇÃO FORÇADA	42
4.8.1. PREPARO DAS COLUNAS DE FERMENTAÇÃO	45
4.9. FERMENTAÇÃO EM BANDEJA PERFURADA	45
4.10. MUTAÇÃO INDUZIDA POR UV	46
4.10.1. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA	46
4.10.1.1. MEIO MÍNIMO (MM)	46
4.10.1.2. MEIO COMPLETO (MC)	47
4.10.2. IRRADIAÇÃO POR UV	47
4.10.3. TESTES DAS CEPAS OBTIDAS POR IRRADIAÇÃO DE UV EM MEIO FOSTER	48
4.10.4. FES DAS CEPAS OBTIDAS POR IRRADIAÇÃO DE UV	48
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA PC E SELEÇÃO DE CEPAS DE <i>A. niger</i> PRODUTORAS DE AC</b>	<b>49</b>
5.1.1. ATIVIDADE DE ÁGUA (aw)	49
5.1.2. CARBOIDRATOS	49
5.1.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PC	50

5.1.4. SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE AC	51
<b>5.2. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AC</b>	<b>53</b>
5.2.1. CURVA DE ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DO <i>A. niger</i> LPB BC	53
5.2.2. pH E UMIDADE	55
5.2.3. FONTES DE CARBONO	57
5.2.4. GRANULOMETRIAS DA PC	60
5.2.5. ADIÇÃO DE SAIS	61
5.2.6. ADIÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO	63
5.2.7. ÁLCOOIS INFERIORES	65
5.2.8. CINÉTICA FINAL EM FES COM AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM ERLNMEYER	68
5.2.9. COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AC EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREACTORES	71
5.2.9.1. FERMENTAÇÃO UTILIZANDO BANDEJA PERFURADA	71
5.2.9.2. FERMENTAÇÃO EM COLUNAS	72
5.2.9.3. PRODUÇÃO DE AC EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREACTORES	75
<b>5.3. ESTUDO DA MUTAÇÃO INDUZIDA POR IRRADIAÇÃO DE RAIOS UV SOBRE A CEPA <i>A. niger</i> LPB BC</b>	<b>76</b>
5.3.1. FORMAÇÃO DE HALO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO EM MEIO FOSTER	76
5.3.2. PRODUÇÃO DE AC EM FES COM AS CEPAS MUTANTES	80
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>83</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>85</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>86</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Propriedades do Farelo de PC	07
<b>Tabela 2</b>	- Exportação do Farelo de PC por Ano Safra	09
<b>Tabela 3</b>	- Utilização do Ácido Cítrico	11
<b>Tabela 4</b>	- Comparativos Entre Fermentação no Estado Sólido e Fermentação Submersa	16
<b>Tabela 5</b>	- Produção de AC por FES Utilizando Vários Tipos de Substratos	18
<b>Tabela 6</b>	- Principais Fatores Químicos que Influenciam a Produção de AC	28
<b>Tabela 7</b>	- Planejamento Estatístico para Estudo da Adição de Sais	41
<b>Tabela 8</b>	- Tempos de Retenção de Alguns Gases Monitorados por CPG	44
<b>Tabela 9</b>	- Resultados da Quantificação de Açúcares Totais e Redutores na PC Peletizada	50
<b>Tabela 10</b>	- Características Físico-Químicas da PC	50
<b>Tabela 11</b>	- Diferenças entre Halo de Produção de Ácido e Halo de Crescimento das Colônias de Cepas de <i>A. niger</i>	51
<b>Tabela 12</b>	- Ensaio de Variação de pH e Umidade Inicial para Produção de AC por FES Utilizando PC	55
<b>Tabela 13</b>	- Produção de AC com Adição de Fontes Diferentes de Carbono Comerciais	58
<b>Tabela 14</b>	- Influência da Adição de Diferentes Sais na Produção de AC	62
<b>Tabela 15</b>	- Resultados da Adição de Diferentes Concentrações de Metanol e Etanol ao Meio de Fermentação	65
<b>Tabela 16</b>	- Produção de AC com Diferentes Concentrações de Metanol com Adição ou não de Mel de Cana a 108 g/L	67
<b>Tabela 17</b>	- Acompanhamento da Cinética Final de Produção de AC por FES Utilizando PC com a Cepa <i>A. niger</i> LPB BC	68
<b>Tabela 18</b>	- Resultados da Produção de AC por FES em Colunas com Aeração Forçada	73
<b>Tabela 19</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias Tratamento da <b>Placa A</b> Oriundas do <b>MC</b>	77
<b>Tabela 20</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias Tratamento da <b>Placa B</b> Oriundas do <b>MC</b>	77
<b>Tabela 21</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias Tratamento da <b>Placa C</b> Oriundas do <b>MC</b>	77
<b>Tabela 22</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias	78

	Tratamento da <b>Placa D</b> Oriundas do <b>MC</b>	
<b>Tabela 23</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias	78
	Tratamento da <b>Placa E</b> Oriundas do <b>MC</b>	
<b>Tabela 24</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias	78
	Tratamento da <b>Placa A</b> Oriundas do <b>MM</b>	
<b>Tabela 25</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias	79
	Tratamento da <b>Placa B</b> Oriundas do <b>MM</b>	
<b>Tabela 26</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias	79
	Tratamento da <b>Placa D</b> Oriundas do <b>MM</b>	
<b>Tabela 27</b>	- Razão Entre DC e DH da Colônia Controle e das Colônias	79
	Tratamento da <b>Placa E</b> Oriundas do <b>MM</b>	
<b>Tabela 28</b>	- Produção de AC por FES das Cinco Cepas Mutantes após dois Meses de Conservação em PDA sob Refrigeração	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Representação das Partes Extraídas Industrialmente da Laranja	06
<b>Figura 2</b>	- Farelo de Polpa Cítrica Peletizado	07
<b>Figura 3</b>	- Fluxograma da Extração de Sub-Produtos da Laranja	08
<b>Figura 4</b>	- Esquema Geral do Acúmulo de AC no Ciclo de Krebs	14
<b>Figura 5</b>	- Esporos de <i>A. niger</i>	23
<b>Figura 6</b>	- Câmara de Neubauer	37
<b>Figura 7</b>	- Crescimento do fungo <i>A. niger</i> em Meio Foster	38
<b>Figura 8</b>	- Representação do Sistema de Fermentação em Colunas com Aeração Forçada	43
<b>Figura 9</b>	- Cinética da Produção de AC por FES Utilizando Diferentes Cepas de <i>A. niger</i>	52
<b>Figura 10</b>	- Evolução do Número de Esporos Durante o Crescimento do <i>A. niger</i> LPB BC	54
<b>Figura 11</b>	- Cinética de Contagem em Colônias de <i>A. niger</i> LPB BC em Placas de Petri	54
<b>Figura 12</b>	- Superfície de Resposta dos Testes de Variação de pH e Umidade em FES	56
<b>Figura 13</b>	- Diagrama de Pareto para Teste da Influência do pH e da Umidade na Produção de AC por FES Utilizando PC	57
<b>Figura 14</b>	- Produção de AC com Adição de Mel de Cana como Fonte de Carbono Suplementar	60
<b>Figura 15</b>	- Diagrama de Pareto do Teste de Adição de Sais para a Produção de AC por FES Utilizando PC	62
<b>Figura 16</b>	- Produção de AC por FES Utilizando a PC com a Adição de Fontes Suplementares de Nitrogênio	64
<b>Figura 17</b>	- Produção de AC com Adição de Diferentes Concentrações de Mel de Cana Utilizando 6% de Metanol	66
<b>Figura 18</b>	- Cinética de Consumo de Açúcares e Produção de AC	70
<b>Figura 19</b>	- Produção de AC em FES Utilizando Bandeja Perfurada com Leito de 3 cm	72
<b>Figura 20</b>	- Consumo de O <sub>2</sub> e Produção de CO <sub>2</sub> Durante FES de Produção de AC por <i>A. niger</i> LPB BC	74
<b>Figura 21</b>	- FES das Cepas de <i>A. niger</i> Obtidas por Irradiação de Raios UV Sobre a Cepa <i>A. niger</i> LPB BC	81

**Figura 22** - Cinética para Produção de AC por FES das Cepas *A. niger* LPB B3 e *A. niger* LPB B6 82

## LISTA DE ABREVIações

<b>AC</b>	Ácido Cítrico
<b>aw</b>	Atividade de água
<b><i>A. niger</i></b>	<i>Aspergillus niger</i>
<b>CA</b>	“Cítric Acid”
<b>CP</b>	“Citric Pulp”
<b>FES</b>	Fermentação no Estado Sólido
<b>LPB</b>	Laboratório de Processos Biotecnológicos
<b>MC</b>	Meio Completo
<b>MM</b>	Meio Mínimo
<b>PC</b>	Farelo de Polpa Cítrica Peletizado
<b>SSF</b>	“Solid State Fermentation”
<b>UFPR</b>	Universidade Federal do Paraná
<b>UV</b>	Ultra Violeta

## RESUMO

O presente trabalho teve por principal objetivo a produção de um concentrado rico em ácido cítrico (AC) por fermentação no estado sólido (FES) a partir da polpa cítrica (PC). Quatro cepas do fungo *A.niger* (LPB 21, LPB 28, LPB 326, LPB 03) existentes no banco de cepas da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR, e uma cepa de *A. niger* LPB BC isolada de bagaço de cana-de-açúcar neste Laboratório, foram selecionadas qualitativa e quantitativamente para produção de AC. O teste qualitativo consistiu na medida do halo de produção de ácido em meio Foster. As cepas foram em seguida submetidas à cinética de produção de AC em FES utilizando PC como substrato nas condições estudadas em trabalhos anteriores neste Laboratório. A cepa *A. niger* LPB BC apresentou os melhores resultados (383 g de AC/Kg de PC seca) no 4º dia de fermentação. Realizou-se a otimização dos parâmetros físico-químicos da fermentação com a cepa *A. niger* LPB BC em frascos Erlenmeyer de 250mL, onde a melhor produção se deu a 65% de umidade e pH de 5.5. Nestas condições foram realizados estudos da influência da adição de açúcares comerciais (glicose, frutose e sacarose). Os melhores resultados foram obtidos com adição de alta concentração de sacarose (216 g/L) justificando a utilização de fontes mais baratas como melaço de soja e o mel de cana, onde obteve-se os melhores resultados com o mel de cana (108 g/L de açúcares totais – 445,4g de AC/Kg de PC). Realizou-se, posteriormente testes com adição de fontes de nitrogênio, sais e álcoois inferiores (metanol e etanol) sendo que nenhum deles apresentou efeito significativo no aumento da produção de AC. A granulometria da PC foi testada e os melhores resultados foram obtidos com PC moída sem peneiramento. Sendo assim, ficou definido que as melhores condições de produção de AC por FES utilizando *A. niger* LPB BC e a PC como substrato foram: pH 5,5, umidade 65%, mel de cana a 108 g/L de açúcares totais, metanol a 4% e PC apenas moída, onde se obteve um aumento de 17,5 % na produção de AC. Foram realizadas fermentações em escala semi-piloto em colunas de vidro e em bandejas perfuradas onde os melhores resultados foram obtidos em bandejas perfuradas (410 g de AC/Kg de PC). A cepa *A. niger* LPB BC foi então submetida à indução de mutação por UV. Obteve-se duas cepas que apresentaram melhores resultados de produção de AC: *A. niger* LPB B3 (537,6 g/Kg de PC) e a *A. niger* LPB B6 (616,5 g/Kg de PC). Desta forma pretende-se transferir o processo para escala semi-piloto e piloto de forma a obter um produto rico em AC que possa ser utilizado em escala industrial para complemento em ração animal.

**Palavras-chave:** FES, *A. niger*, ácido cítrico, polpa cítrica, biorreatores tipo bandejas

## ABSTRACT

The present work had for main objective the attainment of a rich concentrate in citric acid (CA). Four strains of fungus *A. niger* (LPB 21, LPB 28, LPB 326, LPB 03) available at bank of strains of the Biotechnological Processes Laboratory of the UFPR, and a isolated strain of *A. niger* LPB BC from sugar cane bagasse, had been selected qualitatively and quantitatively for CA production. The qualitative test consisted of measure of the halo of production of acid in Foster media. After that the strains had been submitted to kinetic of production of CA in SSF using CP as substrate in the conditions studied in previous works. The best results were achieved with the strain *A. niger* LPB BC (383 g of dry CA/Kg of CP) in fourth day of fermentation. The parameters physical-chemical of the fermentation were optimized using the strain *A. niger* LPB BC in 250 mL erlenmeyer flasks, where the best production was 65% of moisture and pH 5.5. In these conditions the influence of the addition of commercial sugars (glucose, fructose and sucrose) had been studied. The best ones results had been achieved with additions of high concentrations of sucrose (216 g/L) justifying the use of sources cheaper as soy molasses and the sugar cane honey, where it got the best ones resulted with the sugar cane honey (108g/L of total sugars – 445.4g of CA/Kg of CP). Afterwards, tests with addition of nitrogen sources, salts and alcohols (methanol and ethanol) being that none of them presented significant effect in the increase of the AC production. Differents granulometries of the CP was tested and the best ones resulted had been obtained with CP grinded without sieve. Being thus he was defined that the best conditions of production of CA for SSF using *A. niger* LPB BC and CP as substrate were: pH 5.5, moisture 65%, sugar cane honey the 108 g/L of total sugars, methanol 4% and CP grinded without sieve, where an increase of 17.5 % had been obtained in the CA production. Semi-pilot scale fermentations were realized in glass columns and perforated trays where the best yield had been obtained in perforated trays (410 g of CA/Kg of CP). The *A. niger* LPB BC strain then was submitted induction of mutation by UV. Two strains showed the best results of CA production: *A. niger* LPB B3 (537.6 g/Kg of CP) and *A. niger* LPB B6 (616.5 g/Kg of CP). Of this form it is intended to transfer to the process to scale semi-pilot and pilot of form to get a rich product in CA that can be used in industrial scale for complement in animal feed.

**Key-words:** SSF, *A. niger*, citric acid, citric pulp, bioreactors of perforated trays

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico (AC) é um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, devido, entre outras características, a sua baixa toxicidade quando comparado a outros acidulantes utilizados pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos. A produção mundial de AC em 2004 foi estimada em 1,4 milhões de toneladas pelo Business Communications Co. (BCC) em estudos recentes sobre fermentações (GRAF, 2005). Além disso, devido à sua grande aplicação e baixos preços, espera-se que o consumo cresça significativamente até 2009, o que mostra a necessidade das indústrias buscarem novas alternativas em tecnologias e na redução dos custos de produção do AC (VANDENBERGHE, 2000).

O AC (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanetricarboxílico) possui fórmula molecular  $C_6H_8O_7$ , tem boa solubilidade em água, ponto de fusão de  $153^{\circ}C$  e peso molecular de 192,12. Quando aquecido começa a se decompor em outras substâncias a  $175^{\circ}C$ . É o principal constituinte das frutas cítricas constituindo um metabólito normal do organismo humano sendo completamente metabolizado (ABOUT-ZEID e ASHY, 1984).

O AC tem uso bastante variado. Cerca de 70% é usado pela indústria de alimentos e bebidas, 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias. Estudos recentes mostram que têm sido desenvolvidos vários testes relacionados aos efeitos do uso de ácidos orgânicos como complemento das rações para animais (BOLING, ANKENBACH *et al.*, 2001; TSILOYIANNIS *et al.*, 2001). Desta forma há um crescente interesse na procura de soluções para produção em larga escala do AC.

Há três diferentes processos para obtenção de AC: extração de frutas cítricas, síntese ou fermentação. Desde 1920, a fermentação é o processo mais econômico e mais utilizado, representando mais de 90% da produção mundial de AC através do fungo *Aspergillus niger*. O processo de obtenção de AC por fermentação apresenta como vantagens operações simples, baixo consumo de energia e não requer um controle do sistema muito sofisticado (TIMEIS, 2000).

O processo de fermentação submersa tem sido o mais utilizado atualmente na produção de larga escala. A fermentação no estado sólido (FES) - processo "Koji" - inicialmente foi considerado para produções pequenas (YOKOYA, 1992), mas hoje em dia estuda-se como mais uma alternativa para a produção do AC (VANDENBERGHE, 2000).

Uma grande variedade de substratos pode ser utilizada na produção de AC por FES, principalmente os sub-produtos e resíduos da agroindústria. No cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou re-processamento de bioresíduos, entre os quais podem ser citados como exemplo o bagaço de cana, de mandioca e o farelo de polpa cítrica (PC) (KOLICHESKI, 1995, SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

O uso de resíduos agroindustriais como suporte na FES é economicamente importante do ponto de vista ambiental, pois além de reduzir o impacto que causa sobre a natureza valoriza os resíduos agrícolas e agroindustriais. Visando maior produtividade e baixo custo na geração de tecnologia de produção e aproveitamento de resíduos, têm-se estudado algumas alternativas de utilização dos subprodutos da agroindústria, seleção de microrganismos mais competitivos e adaptados a processos fermentativos para a fermentação cítrica.

A PC é um subproduto da indústria de sucos obtido por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco de laranja. Entre esses resíduos estão: cascas, sementes e polpas de laranjas, o que equivale a 50% do peso de cada fruta. Uma vez que estes resíduos cítricos são ricos em carboidratos e outros nutrientes, apresentam-se como substrato viável para produção de AC por FES. Sua exportação anual gira em torno de um milhão de toneladas. É bastante usada como complemento para a ração animal, principalmente na pecuária (ABECITRUS, 2006).

Uma vez que a PC é utilizada, assim como o AC, como complemento para a ração animal, justifica-se estudos para produção deste ácido utilizando a PC como substrato em FES.

O presente trabalho dá continuidade a três estudos já realizados: KOLICHESKI (1995) e VANDENBERGHE (2000), que desenvolveram em escala laboratorial a otimização da produção de AC por FES a partir do resíduo

da agroindústria da mandioca, o bagaço de mandioca; e PRADO (2002), que produziu ácido cítrico em escala semipiloto usando o mesmo resíduo e dois tipos de biorreatores: bandejas e tambor horizontal. Desta forma, este trabalho visa desenvolver bioprocessos para a produção de um concentrado rico em AC por FES em escala laboratorial a partir do resíduo agroindustrial PC com o fungo *Aspergillus niger* e sua aplicação em nutrição animal.

Foram realizados estudos para a otimização do processo fermentativo de produção de AC por FES em escala laboratorial e semipiloto a partir do resíduo agroindustrial farelo de polpa cítrica com o fungo *A.niger*. Desta forma pretende-se estimular o desenvolvimento de processos que valorizem e agreguem valor aos produtos agrícolas produzidos no Brasil, especificamente às matérias-primas e subprodutos agroindustriais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto visa desenvolver bioprocesso para a produção de um concentrado rico em AC por FES em escala laboratorial e semipiloto a partir do resíduo agroindustrial PC com o fungo *A. niger* e sua aplicação em nutrição animal.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Isolar e selecionar cepas do gênero *Aspergillus* produtoras de ácido cítrico a partir de resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais;
- Testar e selecionar cepas do gênero *Aspergillus* de bancos de cepas internacionais para a produção de ácido cítrico;
- Caracterizar o substrato/suporte PC a ser utilizado através de análises físico-químicas;
- Otimizar a produção de AC através do estudo da influência de fatores químicos e físicos sobre os processos em escala laboratorial;
- Acompanhar o metabolismo dos microrganismos selecionados através do seu comportamento em estudo da cinética da produção do AC por FES, nas condições otimizadas (frascos de Erlenmeyer), com a PC;
- Realizar mutação por variabilidade induzida por UV da cepa que apresentar os melhores resultados de produção de AC;
- Realizar testes em escala semipiloto em biorreatores do tipo bandeja perfurada em condições otimizadas, como um estudo prévio para a transferência de tecnologia para o setor produtivo;

Todas as etapas foram realizadas nos laboratórios da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil possui uma das mais importantes economias baseadas na agricultura no mundo, por sua produção de café, cana-de-açúcar, soja, frutas, entre outros. Praticamente todo produto é exportado, tornando este fato uma definitiva contribuição para o desenvolvimento econômico (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Os resíduos de processos agrícolas, gerados em abundância no Estado do Paraná, causam graves problemas ambientais quando dispostos na natureza (SOCCOL, 1996a; PANDEY *et al.*, 2000b). A aplicação destes resíduos, além de ser uma alternativa em termos de substrato em processos fermentativos, auxilia na redução dos problemas de poluição ambiental (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). O uso do bagaço de mandioca como suporte na FES é economicamente importante, pois está diretamente relacionado com a valorização dos resíduos sólidos da industrialização da mandioca (SOCCOL, 2001). O bagaço de cana, resíduo fibroso da indústria do açúcar, também tem sido utilizado como substrato em vários processos que empregam a FES (PANDEY *et al.*, 2000a). No Laboratório de Processos Biotecnológicos (UFPR) já foram desenvolvidos processos alternativos para a produção de AC produzido por FES a partir de bagaço de mandioca (KOLICHESKI, 1995; SOCCOL *et al.*, 1999; VANDENBERGHE, 2000; PRADO, 2002), enquanto KUMAR *et al.* (2002) produziram AC por FES usando como substrato o bagaço de cana.

No cenário nacional existem inúmeras oportunidades para o estabelecimento de atividades industriais voltadas ao beneficiamento e/ou reprocessamento de bioresíduos, entre os quais podem ser citados como exemplo o bagaço de cana e de mandioca, a casca do coco de babaçu, a palha de cereais, o bagaço da laranja, a polpa da maçã, o caule e o sabugo do milho, a serragem, diversos tipos de papéis recicláveis e outros resíduos de atividades florestais.

Sendo o AC um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, há um grande incentivo à procura de soluções para a sua produção. O uso de resíduos em FES é economicamente importante, pois fornece alternativa

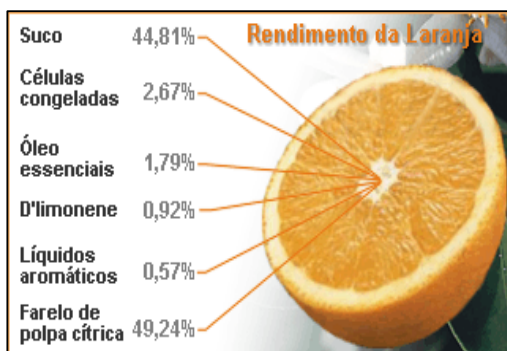
biotecnológica para a valorização dos resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais. Para viabilizar qualquer processo produtivo industrial é necessário utilizar matérias primas baratas e baixar os custos da produção, sem prejuízo à qualidade do produto final.

### 3.1. POLPA CÍTRICA (PC)

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja e seus subprodutos, disputando com os Estados Unidos a hegemonia nesse mercado. O Estado de São Paulo concentra 80% da produção de frutas e 90% da capacidade de processamento (SILVA *et al.*, 1998; ABECITRUS, 2006). Atualmente, 10 indústrias afiliadas a ABECITRUS (Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos), respondem por 98% da produção mundial de suco de laranja concentrado (CETESB, 1990).

Apesar do suco ser o principal produto da laranja, vários subprodutos com valor comercial são obtidos durante o seu processo de fabricação. Entre esses estão os óleos essenciais (óleos voláteis que são retirados da casca da laranja), limoneno (fração oleosa obtida da destilação dos resíduos úmidos da laranja) e o farelo de polpa cítrica (obtido por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco). Eles possuem diferentes aplicações, as quais incluem a fabricação de produtos químicos e solventes, aromas e fragrâncias, tintas, cosméticos e complemento para ração animal (Figura 1).

**FIGURA 1** - REPRESENTAÇÃO DAS PARTES EXTRAÍDAS INDUSTRIALMENTE DA LARANJA.



FONTE: ABECITRUS, 2006.

O farelo de polpa cítrica peletizado (PC) ou farelo de casca de laranja (Figura 2) é obtido por meio do tratamento de resíduos sólidos e líquidos remanescentes da extração do suco (Figura 3). Entre esses resíduos estão cascas, sementes e polpas de laranjas. Este material equivale a 50% do peso de cada fruta e tem uma umidade de aproximadamente 82%. Após passar pelo processo de industrialização onde a polpa é triturada e seca até chegar a 12% de umidade, o produto é peletizado (ABECITRUS, 2006).

**FIGURA 2 - FARELO DE POLPA CÍTRICA PELETIZADO**



FONTE: ABECITRUS, 2006.

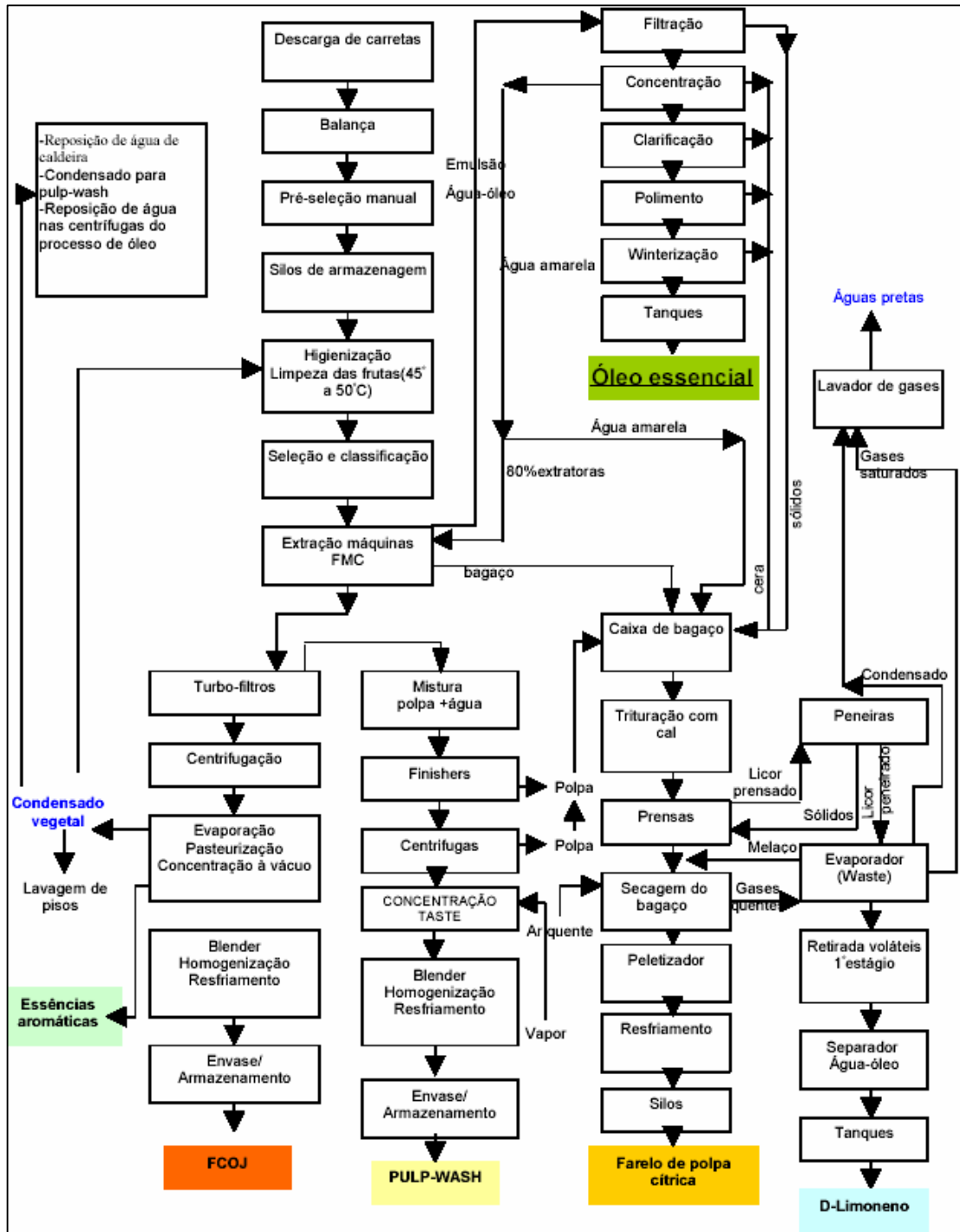
Devido à suas características físico-químicas (tabela 1) e a grande quantidade produzida anualmente, a PC pode ser considerada como um substrato em potencial para utilização em FES (KOLICHESKI, 1995; SOCCOL, 1996A; PANDEY *et al.*, 2000; VANDENBERGHE, 2000).

**TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DO FARELO DE PC.**

<b>PROPRIEDADES</b>	<b>VALOR</b>
Umidade (máximo)	12,0%
Proteína Bruta (mínimo)	5,0%
Extrato Etéreo (mínimo)	1,5%
Fibra Bruta (máximo)	14,0%
Matéria Mineral (máximo)	8,0%
Dioxinas/Furanos (máximo)	500 pg/kg I - TEQ

FONTE: ABECITRUS, 2006.

**FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE SUB-PRODUTOS DA LARANJA**



FONTE: CETESB, 2006.

A PC é um resíduo da agroindústria brasileira cuja exportação anual gira em torno de um milhão de toneladas por ano (Tabela 2). É utilizado principalmente como complemento para a ração animal, principalmente na pecuária. Tem boa aceitação como insumo na ração de rebanhos bovinos (leite e corte). Por tratar-se de um produto que absorve a umidade, é muito importante que o farelo seja transportado e armazenado em locais muito secos, ventilados e totalmente cobertos. Do contrário podem surgir microrganismos causadores de fermentação e bolor. Neste caso o produto não poderá ser utilizado na composição da ração. Recomenda-se não armazenar este produto por mais de 60 dias.

**TABELA 2- EXPORTAÇÃO DO FARELO DE PC POR ANO SAFRA**

<b>Ano/Safra</b>	<b>Quantidade exportada (em toneladas)</b>
2000/01	769.731
2001/02	712.031
2002/03	1.011.073
2003/04	875.937
2004/05	986.749

FONTE: Secex, 2005.

### 3.2. ACIDO CÍTRICO (AC)

O AC é um dos produtos de fermentação mais produzidos no mundo, principalmente por fermentação submersa de meios a base de sacarose ou amido, usando o fungo filamentosos *Aspergillus niger*. Recentemente observa-se na literatura um aumento no número de relatos do uso de processos de fermentação no estado sólido (FES) como uma alternativa em relação à fermentação submersa (VANDENBERGHE, 2000).

O AC apresenta-se na forma de cristais translúcidos brancos, possui sabor ácido, não possui odor e é levemente higroscópico (CARGILL, 2000). Está presente em todas as células vivas que necessitam de compostos de carbono como fonte de energia; é um metabólito normal no organismo humano

sendo quase completamente metabolizado quando consumido (ABOU-ZEID e ASHY, 1984).

### 3.2.1. APLICAÇÕES DO AC

O AC é considerado “GRAS” (geralmente reconhecido como um produto seguro) pela *United States Food and Drug Administration* e aditivo alimentício seguro pelo “Experts Committee de FAO/WHO”, sem restrições à quantidade usada (CARGILL, 2000). Assim, além da grande quantidade utilizada em alimentos, bebidas e fármacos, também é empregado em uma vasta quantidade de processos industriais (NOTHENBERG, 1983; PANDEY *et al.*, 2001, SOCCOL *et al.*, 2003).

Na indústria de alimentos é utilizado em larga escala como acidulante por apresentar sabor agradável, baixíssima toxicidade e alta solubilidade (KAPOOR *et al.*, 1982, SOCCOL *et al.*, 2003). Além disso, esse ácido tem a capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre. Essa propriedade tem conduzido à 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. O emprego de ácido cítrico como desincrustador de equipamentos industriais, como caldeiras e trocadores de calor, conta com 4% do consumo, como tendência a aumento na sua participação (NOTHEMBERG, 1983). 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 para detergentes domésticos. Pelo fato de ser facilmente biodegradável, o seu uso vem sendo ampliado em substituição aos polifosfatos.

Na indústria farmacêutica, o AC é usado como estabilizante de ácido ascórbico por causa de sua ação quelante. Nos antiácidos e analgésicos efervescentes, o AC 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 catiônios específicos como ferro e cálcio. Sais de citrato, como citrato trissódico e citrato tripotássico, são usados na medicina para evitar a coagulação do sangue e na indústria

alimentícia como emulsificante para fabricação de certos produtos como queijo. Sais sódicos de ácido cítrico são também usados nas indústrias de alimentos, de produtos farmacêuticos e de higiene para conferir o poder tampão.

Ésteres de AC, como trietil, tributil e acetildibutil, são usados como plastificante não tóxico nas películas plásticas de embalagem de alimentos. Monoestearil-citrato é usado como antioxidante de óleos e gorduras no lugar do ácido cítrico por ser mais facilmente incorporado ao produto.

O AC compete diretamente no mercado de acidulantes com o ácido láctico, ácido fumárico e ácido fosfórico. O setor alimentício é responsável pelo consumo de 22%, refrigerantes carbonatados, de 15% e bebidas em pó, 10%. O setor de cosméticos responde por cerca de 8%. Outras utilidades do ácido cítrico estão descritas na Tabela 3.

**TABELA 3 - UTILIZAÇÃO DO AC**

<b>UTILIZAÇÃO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Estabilizante de óleos e gorduras e limpeza de caldeiras	NOTHEMBERG, 1983
Melhora a disponibilidade de P para as plantas	ANDRADE <i>et al.</i> , 2003
Condicionador químico sobre a superfície dental	NETO e GREGHI, 2003
Possibilita avaliar o conteúdo de micronutrientes em fertilizantes	ALCARDE e VALE, 2001
Complexação de cátions na confecção de cerâmicas	ROCHA e MUCCILLO, 2001
Extrator de metais pesados	PIRES <i>et al.</i> , 2004
Complemento de ração animal	BOLING, ANKENBACH <i>et al.</i> , 2001

Segundo HAYNES (1984), o solo pode adsorver ácidos orgânicos com grande energia, ocupando os sítios de adsorção de fosfato, aumentando a disponibilidade deste elemento para as plantas. Esses ácidos podem também formar complexos organometálicos estáveis com ferro e, ou, alumínio, em várias faixas de pH (SPOSITO, 1989). O ácido cítrico aplicado ao solo acarreta,

de modo geral, diminuição da adsorção e conseqüente aumento na concentração de fósforo na solução de equilíbrio (ANDRADE *et al.*, 2003).

Sabe-se que a raspagem da superfície dental pode deixar pequenos cálculos, estes podem ser removidos por condicionamento químico sobre a superfície dental. O ácido cítrico quando testado desmineralizou parcialmente um pequeno cálculo sub-clínico deixado na raspagem, tendo se mostrado uma alternativa para este tipo de tratamento (NETO e GREGHI, 2003).

Como uma alternativa para o teor total, que não é um critério adequado, do ponto de vista agrônômico, para avaliar os micronutrientes contidos em fertilizantes, uma solução de ácido cítrico (20 g/L) mostrou-se como possibilidade de avaliar com mais segurança, o conteúdo de micronutrientes como B, Zn, Fe, Cu e Mn (ALCARDE e VALE 2001). Também o teor fitodisponível de metais pesados presentes em solos tratados com lodo de esgoto foi avaliado com uma solução extratora contendo ácido cítrico (0,72 mol/L) apresentando correlações significativas, indicando a eficiência do extrator (ROCHA e MUCCILLO, 2001). Este tipo de extração é fundamental na avaliação do risco de entrada de metais pesados, potencialmente tóxicos, na cadeia alimentar.

Estudos recentes mostram que têm sido desenvolvidos vários testes relacionados aos efeitos do uso de ácidos orgânicos como complemento das rações para animais. BOLING, ANKENBACH *et al.*, 2001 estudaram o efeito do ácido cítrico na absorção de cálcio e fósforo por frangos alimentados com ração a base de milho e soja. Os resultados mostraram que a adição de 6% do ácido na ração não afetou significativamente a absorção de cálcio pelos frangos, porém, o uso de 4-6% do ácido apresentou as maiores respostas em termos de crescimento e aumentou a absorção de fósforo. SUGIURA *et al.* (1998) testaram os efeitos de alguns suplementos em rações para peixes. Os resultados mostraram um aumento na absorção de cálcio, fósforo, magnésio, ferro, manganês e estrôncio quando a ração foi suplementada com ácido cítrico. TSILOYIANNIS *et al.* (2001) testaram o ácido cítrico em leitões, no controle da diarreia pós-desmama. Seu uso, em concentração de 1,5%, reduziu a incidência e a intensidade da diarreia. Estes efeitos foram associados à redução do pH estomacal, causado pela ingestão do ácido cítrico, o qual inibiu a intensa proliferação de bactérias, mais especificamente a *E. coli*.

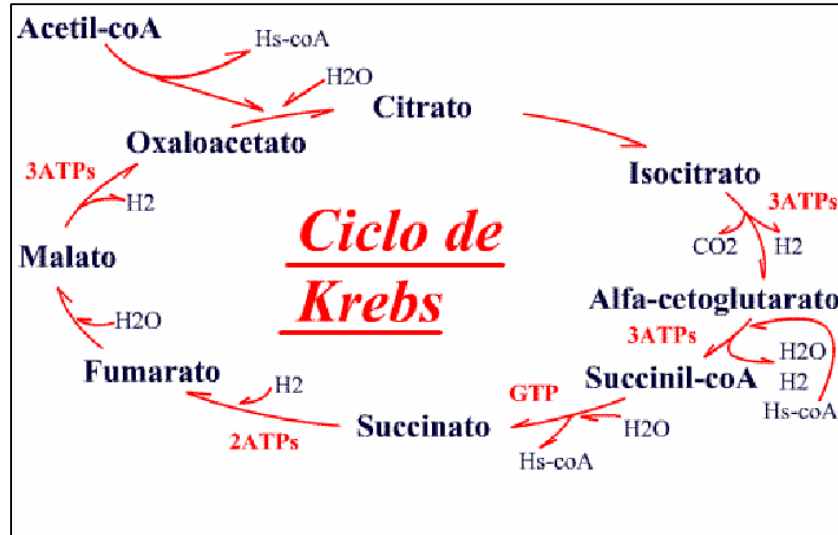
### 3.2.2. PRODUÇÃO DO AC

A produção de AC através de processos fermentativos já é conhecida há mais de cem anos, quando Wehmer em 1893 descobriu que linhagens de fungos *Citromyces* (hoje identificado como *Penicillium* sp.) e *Mucor* possuíam a capacidade de acumular quantidades consideráveis do ácido durante o seu cultivo (RÖHR *et al.*, 1983). Mas a sua transferência para a escala industrial não teve sucesso principalmente por causa da contaminação já que o tempo de fermentação era muito longo (várias semanas) e o pH de operação era próximo da neutralidade. Somente em 1917 foi construída a primeira planta de produção desse ácido na Bélgica, graças a estudos de Currie que estabeleceu algumas condições de produção.

Esta fábrica já utilizava o fungo *A. niger*, cujo desenvolvimento se dava em pH 2,5 a 3,5, a produção do ácido ocorria a pH's inferiores a 2,0. Isso possibilitou o controle mais simples da contaminação com um tempo de fermentação de 1 a 2 semanas. O trabalho pioneiro de Currie mostrou algumas bases para adequação do processo fermentativo tais como: necessidade de concentração elevada de açúcar e a constatação de que as condições de melhor produção do ácido coincidem com a restrição do crescimento micelial. Logo após a fábrica da Bélgica surgiram outras fábricas, nos Estados Unidos, Inglaterra, Checoslováquia, União Soviética e Alemanha, que começaram a produzir ácido cítrico por fermentação (YOKOYA, 1992).

Com a descoberta da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na década de 50, foi possível elucidar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose. A base bioquímica do processo envolve três etapas: (a) quebra da glicose gerando piruvato e acetil-CoA através da glicólise, (b) formação de oxaloacetato a partir do piruvato e CO<sub>2</sub> e (c) acúmulo do AC no ciclo de Kreb`s (KUBICEK e RÖHR, 1986; PANDEY *et al.*, 2001).

**FIGURA 4 - ESQUEMA GERAL DO ACÚMULO DE AC NO CICLO DE KREB'S**



A glicose utilizada na síntese do AC é quebrada através de duas vias: 80% pelas reações de Embden Meyerhof Parnas (EMP), também chamada via glicolítica, e 20% pelas reações da via monofosfato de hexose (HMP). Durante a fase de crescimento do fungo, a relação entre estas duas vias é de 2:1, e durante a produção de AC esta proporção aumenta para 4:1 (YOKOYA, 1992; PANDEY *et al.*, 2001). A via glicolítica tem duplo papel: degradação da glicose para geração de ATP e fornecimento de elementos para biossínteses celulares. A velocidade da glicólise é regulada para atender a essas duas necessidades.

Desde 1920, a fermentação é o processo mais econômico e mais utilizado na produção industrial de AC, representando mais de 90% da produção mundial. Este processo apresenta como vantagens operações simples, baixo consumo de energia e não requer um controle do sistema muito sofisticado (TIMEIS, 2000).

Industrialmente, há três formas de conduzir a fermentação cítrica: processo submerso, processo de superfície e processo em estado sólido (ou processo “Koji”). Os processos “Koji” e de superfície são os mais antigos e adequados para conduzir a fermentação em pequena e média escala (até 10 t/dia). Já o processo submerso é destinado à produção em grande escala (YOKOYA, 1992).

### 3.2.2.1. Fermentação no Estado Sólido (FES)

A fermentação no estado sólido (FES) foi desenvolvida originalmente no Japão onde se utilizavam subprodutos como farelo de arroz e cascas de frutas. Neste processo o fungo se desenvolve na superfície, como no processo de fermentação em superfícies, porém a base é constituída de material sólido com umidade em torno de 70%, dependendo do material. Após esterilização, o pH do substrato é ajustado para 4,5-6,0 e o material é inoculado, normalmente com esporos de *A. niger*, e transferido para o biorreator. Geralmente utilizam-se bandejas para aumentar o espaço de exposição ao ar. A temperatura de incubação é de 28-30°C, de acordo com o microrganismo utilizado. O tempo de fermentação varia de 4 a 6 dias (KUBICEK e RÖHR, 1986; YOKOYA, 1992; GREWAL e KALRA, 1995; SOCCOL *et al.*, 2002).

A FES é uma alternativa interessante uma vez que os metabólitos obtidos são mais concentrados e o processo de purificação é menos oneroso (KOTWAL *et al.*, 1998).

O processo de FES pode ser definido como uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida), onde o conteúdo de líquido contido nesta matriz deve ser mantido a um nível correspondente à atividade de água. Assim, é assegurado o conveniente crescimento do metabolismo celular que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz. O suporte sólido pode ser constituído por um substrato naturalmente úmido ou por uma matriz inerte capaz de absorver os nutrientes que se encontram em solução reproduzindo as condições de baixa atividade de água e alta transferência de oxigênio (OOJIKAS *et al.*, 2000; KOLICHESKI, 1995; VANDENBERGHE, *et al.*, 2000, SOCCOL *et al.*, 2002).

A FES, que envolve o crescimento de microrganismos (tipicamente fungos), tem considerável potencial econômico na indústria produtora de alimentos, farmacêuticos e agricultura em geral. Devido ao grande sucesso da escala industrial da fermentação submersa, a técnica foi muito pouco explorada.

No entanto, a FES nos últimos anos, tem sido vista com interesse renovado uma vez que apresenta algumas vantagens sobre a fermentação submersa (OOJKAAS, 2000; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Vários autores apresentam as vantagens e desvantagens da FES (SOCCOL, 1994; KOLICHESKI, 1995; VANDENBERGHE, 2000; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003). Podem ser citadas algumas vantagens como: condições da cultura em FES próximas as que se desenvolvem em meios naturais; simplicidade no preparo do meio de cultura; diminuição de contaminações; redução dos efluentes líquidos a tratar; resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação; produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma.

Por outro lado, as limitações da técnica ainda impedem sua ampla utilização industrial: dificuldade de remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria, tipos de substratos limitados e a dificuldade de se medir parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água e concentração do substrato no estado sólido. As diferenças básicas entre a fermentação submersa e no estado-sólido são a seguir apresentadas na Tabela 4:

**TABELA 4 - COMPARATIVOS ENTRE FERMENTAÇÃO NO ESTADO-SÓLIDO E FERMENTAÇÃO SUBMERSA.**

<b>Fermentação no Estado Sólido</b>	<b>Fermentação Submersa</b>
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Profundidade do meio limitado	Profundidade do meio variável com o biorreator
Grandes quantidades de consumo de água e descarte de efluentes	Consumo limitado de água, baixa $a_w$ , sem efluentes.
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato	Aeração requiere elevado fluxo.
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Condições estáticas	Boa homogenização

Equipamentos Industriais disponíveis	Necessita projetos.
Inoculação de esporos, batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos de crescimento lento	Risco de contaminação por bactérias do ácido láctico
Baixo consumo de energia	Elevado consumo energético
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico.

FONTE: HOLKER *et al.* 2004; RAIMBAULT, 1997; ROUSSOS *et al.*, 2003.

Algumas das limitações para a utilização da FES podem ser minimizadas com alguns procedimentos operacionais como, por exemplo, o aumento excessivo de temperatura do substrato fermentado pode ser controlado através do aumento na vazão de ar (em sistemas que utilizam aeração forçada) ou revolvendo o material durante o período de maior aumento de temperatura (entre 24 e 72 horas de fermentação). A determinação da biomassa fúngica, parâmetro de maior dificuldade de se determinar em FES, pode ser estimada monitorando o consumo de oxigênio durante o processo fermentativo. A aspersão de água no substrato evita o ressecamento durante a fermentação.

Vários tipos de fermentadores têm sido utilizados para FES em modelo contínuo ou em batelada. Uma característica comum em quase todos esses modelos tem sido sua simplicidade no funcionamento. Estudos laboratoriais geralmente são conduzidos em frascos (reatores de vidro), bequers, placas de petri, jarros e colunas de vidro (SOCCOL *et al.*, 2001). Frascos Enlenmeyers com abertura larga oferecem facilidade na manipulação e têm sido comumente empregados para processos de FES sem qualquer agitação e aeração. O inóculo é adicionado depois que o substrato é autoclavado (SOCCOL *et al.*, 2001).

Apesar da antiga utilização da FES, apenas recentemente a pesquisa científica se desenvolveu e se dedicou ao processo. Enquanto países ocidentais têm desenvolvido o uso da fermentação submersa desde a última década de 40, o interesse pela fermentação sólida foi revisada nas últimas duas décadas (BELLON-MARUEL *et al.*, 2003). Alguns estudos de produção

de AC por FES utilizando diversos substratos podem ser observados na Tabela 5.

**TABELA 5 - PRODUÇÃO DE AC POR FES UTILIZANDO VÁRIOS TIPOS DE SUBSTRATOS**

<b>Substrato</b>	<b>Cepa</b>	<b>Produção de AC- em base seca</b>	<b>Referência</b>
Semente de alfarroba	A. niger ATCC 9142	264 g/Kg	ROUKAS, 1999
Bagaço de mandioca	A. niger NRRL 2001	347 g/Kg	VANDENBERGHE, 2000
Batata doce (alto teor de amido)	A. niger YANG nº 2	99 g/Kg	LU, <i>et al.</i> , 1997
Casca de café	A. niger CFTRI 30	150 g/Kg	SHANKARANAND e LONSANE, 1994
Polpa de uva	A. niger NRRL 567	90 g/Kg	HANG e WOODAMS, 1985
Resíduo de abacaxi	A. niger ACM 4942	194 g/Kg	TRAN <i>et al.</i> , 1998
Abacaxi	A. niger ATCC 1015	132g/Kg	LIMA <i>et al.</i> 1995

### 3.2.2.2. Aspectos da FES

#### *Temperatura*

De acordo com BELLON-MARUEL *et al.* (2003), uma das grandes limitações de contexto industrial se refere ao controle de temperatura e umidade, fatores críticos no escalonamento do processo. A baixa condutividade térmica do material e seu baixo teor de umidade reduz consideravelmente a transferência de calor, que também é dependente do tamanho das partículas da camada sólida. Normalmente a temperatura é medida na camada sólida e no fluxo de gás de entrada e saída do biorreator.

#### *Teor de umidade e atividade de água*

Na fermentação líquida o substrato está em suspensão dentro de uma fase aquosa, na qual este teor não é limitante. Na fermentação no estado sólido, o teor de umidade é considerado ótimo na saturação do substrato que normalmente varia entre 30 e 85% dependendo do substrato, a quantidade máxima de água, neste caso, no meio é função da capacidade de retenção do

substrato. O líquido no seio da matriz não deve ser muito abundante para não reduzir a porosidade e, conseqüentemente, limitar as trocas gasosas. No entanto, deverá estar presente suficientemente para não limitar o crescimento dos microrganismos (SOCCOL, 1994).

Ambientes muito úmidos são propícios ao desenvolvimento de microrganismos que, além de consumir os nutrientes da PC, podem produzir substâncias tóxicas ao consumo animal. A presença de água no produto pode ser medida de diferentes formas, mas nem todos os métodos indicam a disponibilidade da água para os microrganismos, uma vez que nem toda água está igualmente disponível. Esta disponibilidade é melhor representada pela atividade de água ( $a_w$ ) que é numericamente igual a umidade relativa, quando se estabelece o equilíbrio (HALL, 1980; BROOKER *et al.*, 1992). CHRISTENSEN e KAUFMANN (1974) estudaram a influência da atividade de água para diversos produtos de origem vegetal, no comportamento dos principais fungos e verificaram que, em geral, atividades de água superiores a 0,70 são favoráveis à sobrevivência e desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus* sp.

O teor de água normalmente avaliado de modo gravimétrico, não diferencia a água disponível aos microrganismos caracterizada pela atividade de água ( $a_w$ ) da água de ligação ao substrato, não disponível aos microrganismos. A umidade e a disponibilidade de água ( $a_w$ ) constituem dois fatores essenciais para o crescimento dos microrganismos. Por exemplo, *Rhizopus oligosporus* necessita elevados teores de umidade para sintetizar proteases (BELLON-MARUEL *et al.* 2003; SOCCOL, 1994).

### *pH*

A forma de água nos substratos sólidos sempre constituiu um obstáculo para a medida satisfatória de pH. No processo de FES, não se utiliza um eletrodo para medição do pH, uma vez que mesmo pela definição do processo, falta água livre. Alguns autores sugerem a suspensão de amostra sólida em água destilada, fato que não pode precisamente identificar o valor real de pH no meio sólido. Na prática, o pH de fermentações sólidas não é controlado, entretanto, o poder tampão dos substratos e a mistura salina inicial permite que

durante o crescimento, o pH não sofra bruscas alterações (BELLON-MARUEL *et al.*, 2003; SOCCOL, 1994).

### 3.3. MICRORGANISMO

Os microrganismos provaram ser uma fonte excepcionalmente rica de produtos úteis sendo que tais produtos variam enormemente em termos de sua atividade biológica e complexidade estrutural. A maioria das reações bioquímicas necessárias para sintetizar uma nova célula foi elucidada, então o conhecimento do metabolismo primário está quase completo. Adicionalmente a estas reações essenciais, diretamente associadas ao crescimento celular balanceado, muitos microrganismos possuem capacidade de sintetizar uma grande variedade de compostos não essenciais, denominados de metabólitos secundários. Entretanto os microrganismos exerceram um papel muito importante como fonte de metabólitos primários conhecidos como aminoácidos e vitaminas. O foco atual é pela procura de novos compostos que são produtos do metabolismo secundário. Os dois principais fatores que determinam a eficácia da seleção destes compostos são a avaliação do microrganismo produtor e o teste de seleção empregado. O microrganismo de interesse deve ser convenientemente isolado e selecionado para a produção do metabólito desejado.

Nesse sentido, muitas linhagens e espécies de fungos e bactérias foram patenteadas como produtoras industriais de AC, que essencialmente não diferiam umas das outras, a não ser quanto à sua capacidade de acumular ácido. Dentre estas estão: *Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis* e *Corynebacterium ssp.*, *Aspergillus niger*, *A. aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fonsecaeus*, *A. phoenicis* and *Penicillium janthinellum*; e leveduras como *Candida tropicalis*, *C. oleophila*, *C. guilliermondii*, *C. citroformans*, *Hansenula anamola* e *Yarrowia lipolytica* (GREWAL e KALRA, 1995; IKENO *et al.*, 1975; KUBICEK e ROHR, 1986; PANDEY *et al.*, 2001; VANDENBERGHE *et al.*, 1999; YOKOYA, 1992).

Somente poucas espécies demonstraram ser capazes de secretar ou excretar quantidades apreciáveis de AC, o que é esperado, pois este é um composto intermediário do metabolismo normal, e a sua excreção seria

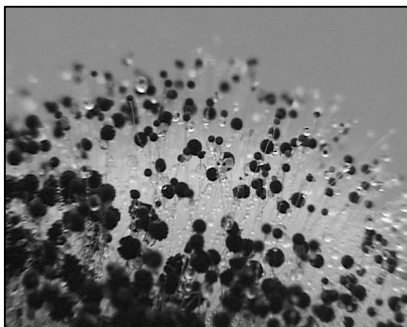
condicionada à situação peculiar de desequilíbrio metabólico (KUBICEK e RÖHR, 1986). Destas, apenas *A. niger* e *Saccharomycopsis* (Candida) são consideradas atualmente como importantes produtoras de AC.

Atualmente, a fermentação industrial para produção do AC é conduzida utilizando uma única espécie de fungo, *A. niger* devido a sua maior produção de AC por unidade de tempo, quando comparado a outros microrganismos (YOKOYA, 1992; PAZOUKI *et al.*, 2000; CROLLA e KENNEDY, 2001).

### 3.3.1. *Aspergillus niger*

O *A. niger* (Figura 4) faz parte dos fungos filamentosos que constituem um grupo de microrganismos aeróbios fisiologicamente diversos. Estes fungos podem se desenvolver em meios líquidos e sólidos. Em seu ambiente natural são encontrados freqüentemente em superfície de líquidos e sólidos de tal maneira que uma grande parte de suas hifas são aéreas.

**FIGURA 5** - ESPOROS DE *Aspergillus niger*



É um fungo ascomiceto imperfeito (classe dos Deuteromicetos), e faz parte da família Aspergillaceae. Possui coloração preta (*niger*: preto em latim), tendo uma grande variedade de cepas e subespécies. Durante a vida de um fungo imperfeito existem quatro etapas fisiológicas importantes que são a dormência, a germinação, a multiplicação vegetativa e a conidiogênese. Um esporo de *A. niger* em um meio favorável deixa seu estado de dormência e passa por uma etapa de germinação. Esta consiste em um conjunto de fenômenos morfológicos e metabólicos permitindo ao esporo germinar, se desenvolver formando hifas e, em seguida, o micélio. A germinação do esporo

não pode começar se a umidade ambiente for insuficiente. O esporo também deve encontrar no seu meio todos os elementos necessários para o crescimento da hifa. Neste instante a atividade metabólica é intensa (síntese de constituintes celulares, ácidos amínicos, nucleotídeos) quando comparado com o crescimento vegetativo.

O *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mas rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 µm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. Apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros (UCSF, 2000).

As principais vantagens no uso do *A. niger* são a facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de AC (YOKOYA, 1992). Além disso, o *A. niger* é considerado “GRAS” pela FAO, o que é bastante importante na produção de AC para utilização em ração animal utilizando este microrganismo.

O incremento na produtividade de AC tem sido feito através de mutação e seleção de cepas. Todos os seres vivos sofrem um certo número de mutações como resultado de funções celulares normais ou interações aleatórias com o ambiente. Tais mutações são denominadas *espontâneas*; a taxa de ocorrência das mesmas é característica para um determinado organismo e constitui o chamado *nível basal*. A ocorrência de mutações pode ser aumentada pelo tratamento com determinados compostos. Tais compostos são denominados *agentes mutagênicos* e as modificações que eles causam *mutações induzidas*. Muitos mutagênicos atuam diretamente no DNA devido a sua capacidade de atuar como uma determinada base ou de se incorporar à cadeia polinucleotídica. O efeito de um dado mutagênico é medido pelo grau que ele aumenta a taxa de mutação acima do nível basal (PASSAGLIA, 1996).

### 3.4. MUTAÇÕES

Segundo ALBERTS *et al.* (1994), mutação é qualquer alteração no material genético que possa ser transmitida aos seus descendentes, sejam estes novos indivíduos ou linhagens celulares. Os mutagênicos mais

freqüentemente utilizados são a radiação  $\gamma$ , radiação UV e os mutagênicos químicos. Geralmente a combinação de UV e alguns mutagênicos químicos podem gerar cepas hiper-produtoras de AC (KUBICEK e RÖHR, 1986; VANDENBERGHE *et al.*, 1999; IKRAM-UL-HAQ *et al.*, 2001; PANDEY *et al.*, 2001).

Um organismo que sofreu mutação é denominado mutante, ou seja, é todo organismo que exibe uma forma alterada como resultado da presença de uma mutação. Usado em um sentido amplo, o termo mutação se refere a qualquer modificação súbita e hereditária no conjunto gênico de um organismo que não é explicável pela recombinação da variabilidade genética preexistente. Essas modificações incluem mudanças no número cromossômico (euploidia e aneuploidia), mudanças grosseiras na estrutura dos cromossômicos (aberrações cromossômicas) e mudanças nos genes individuais. Atualmente, no entanto, o termo mutação é utilizado em um sentido mais restrito, referindo-se apenas a alterações detectadas em nível de genes individuais (PASSAGLIA, 1996).

Geralmente, os organismos portadores de uma mutação em um determinado gene apresentam problemas na sua sobrevivência e acabam sendo eliminados por seleção natural. No entanto, nem toda mutação resulta em uma conseqüência deletéria para o seu portador. Na verdade, a mutação é a fonte básica de toda a variabilidade genética, fornecendo a matéria prima para a evolução. A recombinação apenas rearranja essa variabilidade em combinações novas e a seleção natural (ou artificial) simplesmente preserva as combinações mais bem adaptadas às condições ambientais existentes (ou desejadas). Sem a mutação, todos os genes existiriam apenas em uma forma, e os organismos não seriam capazes de evoluir e de se adaptar às condições ambientais. Obviamente, uma alta frequência de mutações desestabiliza totalmente a transmissão da informação genética de uma geração para a outra (PASSAGLIA, 1996).

As mutações podem alterar a estrutura e número dos cromossomos e, como conseqüência causando as mutações cromossômicas e as numéricas como as poliploidias. Ainda há a mutação de ponto ou gênica, a qual altera apenas um par ou poucos pares de nucleotídeos do DNA (AZEVEDO, 1998).

Qualquer base do DNA pode ser mutada. Uma *mutação de ponto* envolve modificação em um único par de base (substituição, adição ou deleção) e pode ser o resultado de um mau funcionamento do sistema celular que replica ou repara o DNA, inserindo uma base errada na cadeia polinucleotídica que está sendo sintetizada, ou de uma interferência química diretamente sobre uma das bases do DNA (ZAHA, 1996).

As mutações devem normalmente causar alguma modificação detectável para que a sua presença seja reconhecida. Tais modificações podem ser ou tão pequenas que podem ser identificadas apenas por técnicas genéticas e bioquímicas especiais, ou modificações grosseiras na morfologia, ou modificações letais. A maioria das mutações úteis para a análise genética de muitos processos biológicos são *mutações letais condicionais* (ZAHA, 1996).

#### 3.4.1. MUTAÇÃO INDUZIDA POR RADIAÇÃO

As taxas de mutação espontânea são muito baixas e suas frequências são diferentes para os distintos genes, sendo em média, de uma mutação em cada  $10^6$  divisões celulares. As mutações espontâneas são oriundas de erros durante a duplicação do material genético, seguidos de falhas nos sistemas celulares de reparo do DNA (BOS e STADLER, 1996).

Devido à raridade dos eventos mutacionais, os programas de melhoramento genético em fungos buscam a indução de mutações para que a variabilidade natural seja aumentada, por meio de agentes mutagênicos físicos e químicos (VILAS-BOAS et al., 1992). Os mutagênicos físicos podem ser radiações ionizantes ou não-ionizantes. As radiações ionizantes são os raios alfa, beta, gama e X, os quais são responsáveis por ionizações que provocam alterações cromossômicas e formação de peróxidos no interior das células, provocando uma reação com as bases nitrogenadas. A radiação não-ionizante é representada pela luz ultravioleta (UV), cuja ação principal no DNA é a formação de dímeros de pirimidina (AZEVEDO, 1998).

As radiações ionizantes tais como os raios X (de 0,1 a 1 nm), têm muita energia e, portanto, são úteis para o diagnóstico médico, já que podem penetrar nos tecidos vivos. No processo de penetração, estes raios de muita energia colidem com os átomos da matéria e causam a liberação de elétrons,

deixando radicais livres positivamente carregados (íons). Estes íons, por sua vez, colidem com outras moléculas, provocando a liberação de outros elétrons. O resultado final é a formação de uma “trilha” de íons ao longo do caminho em que cada raio de alta energia passa através da matéria ou tecido vivo. Esse processo de ionização é induzido por máquinas que produzem raios X, prótons e nêutrons, assim como pela radiação alfa, beta e gama liberados pelos isótopos radioativos dos elementos (por exemplo,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , rádio,  $^{60}\text{Co}$ , etc).

Os raios ultravioleta (UV), que têm pouca energia, penetram apenas as camadas de células superficiais de plantas e animais superiores e não induzem ionizações. Os raios UV dissipam sua energia para os átomos que eles encontram, elevando os elétrons de orbitais exteriores para níveis de alta energia, um estado referido como *excitação*. As moléculas contendo átomos na forma iônica ou no estado excitado são quimicamente mais reativas do que as que contêm átomos no seu estado estável normal. A reatividade aumentada dos átomos presentes nas moléculas de DNA é a base dos efeitos mutagênicos da luz UV e da radiação ionizante (ZAHA, 1996).

### 3.4.2. RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV)

Os raios UV não possuem energia suficiente para induzir ionizações. Eles são, entretanto, prontamente absorvidos por certas substâncias tais como purinas e pirimidinas, as quais, por sua vez, ficam mais reativas ou no estado excitado. Nos organismos multicelulares, os raios UV atingem apenas a camada de células superficiais. Nos seres unicelulares, no entanto, os raios UV são um potente agente mutagênico. A absorção máxima de UV pelo DNA ocorre no comprimento de onda de 254 nm. A mutagenicidade máxima também ocorre a 254 nm, sugerindo que o processo de mutação induzida por UV é mediado diretamente pela absorção de UV por purinas e pirimidinas. Os estudos *in vitro* mostram que as pirimidinas, especialmente a timina, absorvem ativamente em 254 nm e, como resultado, se tornam muito reativas. A relação entre a taxa de mutação e a dose de UV é muito variável, dependendo do tipo de mutação do organismo e das condições empregadas. A cinética de colisão única é ocasionalmente observada, em constante com a radiação ionizante (ZAHA, 1996).

### 3.4.3. MECANISMOS DE REPARO

Um mutante sobrevive quando a sua troca genética não é prejudicial ou, mais raramente, é benéfica. Mas a maioria das mutações é desvantajosa e as células não conseguiriam sobreviver se não possuísem mecanismos enzimáticos para reverter os efeitos de processos mutagênicos naturais ou artificiais. As bases do DNA podem ser alteradas ou perdidas, as ligações fosfodiéster da cadeia podem ser quebradas e as fitas cruzadas podem se ligar covalentemente. Estas lesões são produzidas por radiações ionizantes, luz UV e uma variedade de compostos químicos. Muitos dos danos sofridos pelo DNA podem ser reparados porque a informação genética é preservada em ambas as fitas da dupla-hélice, de tal forma que a informação perdida em uma fita pode ser recuperada através da fita complementar. Os mecanismos existentes e conhecidos de reparo do DNA lesado são provavelmente universais, sendo, no entanto, melhor compreendidos e estudados em *Escherichia coli*.

Um dos mais bem estudados mecanismos de reparo é a remoção dos dímeros de pirimidina, os quais são formados pela exposição do DNA à luz UV. Resíduos de pirimidinas adjacentes podem se tornar covalentemente ligados sob estas condições. Este dímero não se encaixa bem na dupla-hélice e, assim, a replicação e a expressão gênica são bloqueadas até que a lesão pode ser reparada de diferentes formas. A forma mais direta envolve enzimas que simplesmente reverterem a modificação química que originou o dano. Dímeros de pirimidina são o alvo universal da enzima *fotoliase*, a qual se liga ao dímero e catalisa uma segunda reação fotoquímica, na presença da luz visível, desfazendo o anel ciclobutânico formado pela luz UV, e refazendo as bases pirimídicas individuais. Este processo é chamado de *fotorreativação* e envolve duas etapas: inicialmente, a enzima reconhece e se liga especificamente ao dímero no escuro; e, após a absorção de luz, energia é fornecida para converter o dímero ciclobutil em monômeros de pirimidina e a enzima dissocia-se do DNA.

#### 3.4.4. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Nem todas as células vivas têm a mesma sensibilidade à radiação. As células que tem mais atividade são mais sensíveis do que aquelas que não são, pois a divisão celular requer que o DNA seja corretamente reproduzido para que a nova célula possa sobreviver. Assim são, por exemplo as da pele, do revestimento intestinal ou dos órgãos hematopoiéticos. Uma interação direta da radiação pode resultar na morte ou mutação de tal célula, enquanto que em outra célula o efeito pode ter menor consequência (BRASIL, 2005).

Para ocorrer a mutação induzida por radiação UV em fungos, o tempo de exposição aos raios UV depende do gênero e espécie do fungo. Para a determinação do tempo de exposição para o fungo *Aspergillus niger*, um estudo é realizado para verificar a influência do tempo de exposição na sobrevivência do fungo. Uma curva de sobrevivência é construída plotando-se o tempo de exposição da solução de esporos aos raios UV (em minutos) versus % de sobrevivência do fungo. Com isso é verificado qual o tempo de exposição para haver 5% de sobrevivência do fungo. Pelo fato do fungo produzir esporos escuros e ter coloração escura, maior é a proteção deste fungo contra raios UV, por este motivo o tempo de exposição deste fungo é maior que o tempo de exposição de um fungo de coloração clara (AZEVEDO e COSTA, 1973; PIZZIRANI-KLEINER *et al.*, 1998).

#### 3.5. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE AC

Para que a obtenção do AC seja viável comercialmente, vários fatores devem ser levados em consideração no processo fermentativo, como por exemplo, os constituintes do meio de cultivo, o pH, a aeração, a temperatura e o microrganismo empregado (YOKOYA, 1992; KOLICHESKI, 1995; TIMEIS, 2000).

Na tabela 6 é apresentado um resumo das principais fontes de elementos que influenciam na produção de AC e suas concentrações usuais.

**TABELA 6** - PRINCIPAIS FATORES QUÍMICOS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE AC

Elemento	Principais fontes	Concentração ótima
Fonte de carbono	Sacarose, glicose, frutose, galactose, maltose, melaço de cana-de-açúcar, melaço de beterraba, sacarose bruta, caldo de cana, hidrolisado de amido	10-14%
Fonte de nitrogênio	Sulfato de amônio, uréia, nitrato de amônio, peptona, extrato de malte	0,1 a 0,4 g/L
Fonte de fósforo	Dihidrogeno fosfato de potássio	0,5 e 5,0 g/L
Elementos traços	Sulfato de ferro, sulfato de zinco, cloreto de ferro	-
Álcoois inferiores	Metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, metilacetato	1 a 5%
Outras substâncias	Óleos e gorduras Compostos quaternários de amônio e amino-oxinas Amido	0,05-0,3% 20 mg/L 0,025-0,5%

### 3.5.1. FONTE DE CARBONO

A natureza e concentração da fonte de carbono são fatores primordiais no resultado da fermentação cítrica. Estudos mostraram que a concentração inicial de glicose afeta tanto a taxa de produção de AC pelo *A. niger* quanto à morfologia do microrganismo (XU *et al.*, 1989; RANE e SIMS, 1993; PAPAGIANNI *et al.*, 1999; VANDENBERGHE *et al.*, 1999). Geralmente, melhores produções de AC são atingidas quando 10 – 14% de carboidratos são utilizados. Uma concentração inicial de açúcar de cerca de 10% foi relatada como ótima para a maltose, sacarose, manose e frutose, e 7,5% para a glicose. Em concentrações de açúcar inferiores a 2,5% não ocorre a produção de AC. (GREWAL e KALRA, 1995; VANDENBERGHE *et al.*, 1999). A presença de carboidratos facilmente metabolizáveis é essencial para uma boa produção de AC. A sacarose é a fonte de carbono mais favorável, seguida da glicose, frutose e galactose (HOSSAIN *et al.*, 1984; YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999). A combinação de glicose e frutose produz mais AC do que se utilizados individualmente. Isto explica o comportamento da sacarose em relação à glicose e frutose. Apesar da sacarose não ser quebrada pelo fungo, a sua hidrólise tem se mostrado desnecessária, pois parte deste

carboidrato é quebrada durante a esterilização do meio nutritivo. Além disso, o fungo possui uma invertase extracelular, ligada ao micélio, a qual é ativada sob condições ácidas e é capaz de hidrolisar rapidamente a sacarose. A galactose contribui para o crescimento muito lento do fungo e não provê o acúmulo de AC. Outras fontes como a celulose, etanol, manitol, sorbose, ácidos láctico e málico, permitem um crescimento limitado do fungo e mínima produção de AC (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

### 3.5.2 FONTE DE NITROGÊNIO

A síntese do AC é diretamente influenciada pela concentração e natureza da fonte de nitrogênio, que, na fermentação cítrica, normalmente é fornecida ao meio de produção na forma de sulfato de amônio, uréia, nitrato de amônio, peptona ou extrato de malte. (GREWAL e KALRA, 1995; VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

A concentração de nitrogênio requerida na fermentação do AC deve estar em torno de 0,1 a 0,4 g/L. Uma concentração elevada de nitrogênio aumenta o crescimento do fungo e o consumo de açúcares, porém reduz a quantidade de AC produzido, ao contrário, uma limitação no crescimento do fungo é favorável à produção de AC (KUBICEK e RÖHR, 1986; YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999). Dependendo da quantidade de nitrogênio no meio, no início da fermentação, é possível produzir ou somente AC ou uma mistura de outros ácidos como o glucônico (SANKPAL *et al.*, 2000).

### 3.5.3 FONTE DE FÓSFORO

A presença de fosfato no meio afeta em grande parte a produção de AC, pois é essencial para o crescimento e metabolismo do *A. niger*. O dihidrogeno fosfato de potássio é mencionado como a melhor fonte de fósforo. O fungo necessita de concentrações de fósforo na solução salina que variam entre 0,5 e 5,0 g/L para uma máxima produção do metabólito. Baixas concentrações de fosfato favorecem a produção de AC, porém, a presença de excesso de fosfato pode aumentar a concentração de açúcar-ácido e reduzir a fixação do CO<sub>2</sub> e o

crescimento do fungo (KUBICEK e RÖHR, 1986; GREWAL e KALRA, 1995; VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

#### 3.5.4 ELEMENTOS TRAÇOS

A presença de elementos traços no meio, principalmente no processo submerso, provavelmente seja o fator de principal influência na produção de AC. Estes elementos podem atuar tanto de forma positiva quanto negativa (ROUKAS e KOTZEKIDOU, 1987). Vários metais divalentes tais como zinco, manganês, ferro, cobre e magnésio afetam a produção de AC pelo *A. niger*. Porém, deve-se levar em conta a interdependência dos constituintes do meio na fermentação submersa e, provavelmente, na FES (VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

#### 3.5.5 ÁLCOOIS INFERIORES

A adição de álcoois inferiores aumenta a produção de AC a partir de glicose comercial e outros carboidratos não processados. Foi verificado que a adição de 1 a 5% (v/v) de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol ou metilacetato, neutralizava o efeito negativo dos metais na produção de AC. As concentrações ótimas de metanol e etanol dependem, sobretudo da cepa e da composição do meio. A adição de álcool em substratos puros causa inibição na produção do ácido, mas em substratos brutos estimula sua produção (KUBICEK e RÖHR, 1983; GREWAL e KALRA, 1995; YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

Na produção do AC, geralmente utilizam-se quantidades de 1-4% de metanol, no entanto trabalhos têm mostrado que com até 6% de metanol há um aumento no rendimento do AC. Com o uso de 3% de metanol pode-se praticamente anular o efeito inibidor de metais como  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ . Este álcool não é assimilado pelo *A. niger*, mas auxilia no acondicionamento do micélio sem prejudicar o seu metabolismo (YOKOYA, 1992; GREWAL e KALRA, 1995). O efeito do metanol também foi testado em diferentes cepas produtoras de AC pelo *A. niger*, porém, reduziu a produção pela *Cândida lipolytica* (PAZOUKI *et al.*, 2000).

### 3.5.6. pH

O consumo de nitrogênio causa abaixamento do pH do meio, favorecendo a formação do AC. Por outro lado, é necessário manter os valores de pH nos primeiros dias da fermentação para se garantir um bom crescimento da biomassa celular (VANDENBERGHE, 2000; VANDENBERGHE *et al.*, 1999; YOKOYA, 1992).

O pH de uma cultura pode variar em razão da atividade metabólica dos microrganismos. O motivo mais óbvio é a secreção de ácidos orgânicos, como é o caso do cítrico, o qual irá causar um abaixamento no pH. As variações de pH também dependem muito do microrganismo; no caso do *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., o pH pode cair muito rapidamente até um pH inferior a 3,0. Além disso, a natureza do substrato também influencia na variação do pH, sendo que em FES valores de pH entre 6,0-7,5 são normalmente utilizados para produção de AC (KUBICEK e RÖHR, 1986; GREWAL e KALRA, 1995; YOKOYA, 1992; PANDEY *et al.*, 2001). O valor ótimo de pH varia de acordo com a natureza do substrato devendo ser alto o suficiente durante o estágio inicial da fermentação de modo a facilitar a germinação dos esporos, havendo a diminuição do pH durante a fermentação pelo acúmulo de AC, obtendo-se freqüentemente um pH final entre 1,6 e 3,5 (MEERS e MILSOM, 1991).

### 3.5.7. TEMPERATURA

A maioria dos processos biológicos é caracterizada pelo fato de se desenvolverem em uma faixa relativamente restrita de temperatura. Temperaturas inapropriadas podem levar à desnaturação de proteínas, inibição enzimática, promoção ou inibição de produção de determinados metabólitos, afetar a produção de esporos e causar morte celular, entre outros efeitos indesejados.

A temperatura a ser empregada na produção de AC depende do tipo de microrganismo, da natureza do substrato e das condições de fermentação. Em geral são usadas temperaturas entre 25 e 35° C, porém, no caso do *A. niger* temperaturas em torno de 28-30°C são ideais. O processo fermentativo em

temperaturas mais elevadas é rápido, ocorrendo abundante crescimento dos micélios, o que causa alta oxidação do açúcar a CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, baixo rendimento de AC (KOLICHESKI, 1995).

Em FES, a liberação de calor produzido pelos microrganismos, durante as atividades metabólicas, causa uma considerável elevação na temperatura no decorrer da fermentação. Baixa atividade de água e baixa condutividade térmica prejudicam o desenvolvimento dos microrganismos por aumentarem a temperatura nos reatores (BRAND, 1999).

### 3.5.8. AERAÇÃO

Sendo a fermentação cítrica um processo aeróbico, o fornecimento de oxigênio tem um efeito crucial na produção de AC. Interrupções no fornecimento de oxigênio podem resultar na perda da capacidade de conversão do açúcar em AC, embora a formação da biomassa celular seja pouco afetada (DAWSON *et al.*, 1986; YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

Com relação à demanda de oxigênio, a FES necessita de quatro a cinco vezes menos que a fermentação submersa para a síntese de produtos, sendo, portanto adequadamente satisfeita com relativamente baixos níveis de aeração forçada (biorreatores do tipo coluna, tambor rotativo e tambor horizontal) ou aeração por difusão, caso dos tambores do tipo bandeja.

Estudos relataram que a aeração forçada no início da fermentação, em reatores tipo colunas para FES, propiciaram altas taxas metabólicas e maior produtividade. Porém, é importante levar em consideração o efeito adverso do “stresse”, causado por elevadas taxas de aeração, sobre o fungo filamentoso (LU *et al.*, 1997). Outros estudos mostraram que, em fermentação submersa e de superfície, a imobilização dos micélios do fungo por adsorção em suportes celulósicos ou em gel de alginato de cálcio, reduz as condições de estresse durante a operação em biorreatores convencionais com agitação e aeração (SANKPAL *et al.*, 2001).

### 3.5.9.UMIDADE

O teor de umidade do substrato é uma das principais variáveis que influencia o sucesso de uma FES. A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá ter no início e ao longo da fermentação.

Em FES a quantidade máxima de água presente no meio é função da capacidade de retenção do suporte, que varia de 30 a 80% de umidade. HANG e WOODAMS (1987), estudaram o teor de umidade para produção de ácido cítrico em polpa de maçã chegaram a conclusão de que o ideal se apresenta entre 65 e 75% de umidade. VANDENBERGHE (2000) realizou um estudo de otimização de fatores físicos do processo de produção de AC por FES utilizando o resíduo bagaço de mandioca. A umidade ótima inicial de 70% foi determinada em biorreatores com aeração por difusão. Já em biorreatores com aeração forçada a umidade inicial de 65% era ideal, pois havia passagem de ar saturado através do leito do biorreator.

Um substrato apropriadamente umedecido deve ter um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de massa de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas devem existir canais que permitam a difusão de gases e a dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo de porosidade do substrato e irá resultar em uma menor difusão de oxigênio no interior do meio e conseqüentemente decréscimo de trocas gasosas, além de aumentar o risco de contaminação, principalmente a bacteriana.

Para níveis de umidade menores que o necessitado, haverá maior dificuldade na difusão de nutrientes, resultando em um crescimento de microrganismo menor do que o esperado e, conseqüentemente, menor produtividade (SOCCOL, 1994; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

### 3.5.10. GRANULOMETRIA DAS PARTÍCULAS DO SUBSTRATO

A questão do tamanho e forma das partículas que compõem o substrato está intrinsicamente relacionada com a área superficial do substrato viável ao ataque enzimático do microrganismo. Ambos são fatores físicos interrelacionados que influenciam diretamente o crescimento do organismo em FES.

Os materiais sólidos, utilizados em FES, são geralmente fragmentados e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. Segundo o tipo de material utilizado, a quantidade de água presente varia muito, os substratos amiláceos são geralmente fermentados entre 25 e 60% de umidade inicial, no entanto, os substratos celulósicos permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados, de 60 a 80% sem o aparecimento de água livre (SOCCOL, 1994).

Por exemplo, segundo estudo de PANDEY *et al.* (2001), partículas de farelo de trigo e farinha de milho (a uma proporção de 9:1) com diâmetros entre 425-500  $\mu\text{m}$  e 500-600  $\mu\text{m}$ , respectivamente, resultaram em uma maior produção de amiloglicosidase, embora tenha sido notado que partículas de diâmetro entre 180  $\mu\text{m}$  e 1,4 mm tenham apresentado rendimentos similares.

Já ELLAIAH *et al.* (2004), na otimização de produção de neomicina com cepa de *Streptomyces marinensis* mutante, verificaram que dos três tamanhos de partículas de farinha de trigo utilizadas (pequena, intermediária e grande), o melhor rendimento foi obtido com a maior granulometria.

Para se obter uma adequada granulometria, muitos substratos em FES – especialmente resíduos agroindustriais – necessitam de uma etapa de processamento e preparação prévia ao processo fermentativo, tais como esmagamento, quebra, moagem e peneiramento.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. POLPA CÍTRICA**

O substrato a ser utilizado em FES deve ter algumas características ideais que possibilitem o maior rendimento do processo. Porosidade, tamanho e forma das partículas, atividade de água, teor de carbono e relação carbono/nitrogênio do meio de fermentação devem ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo.

A PC utilizada neste estudo foi cedida pela empresa Cargil Agrícola S. A., São Paulo/SP estando peletizada e seca. A PC foi previamente triturada em moinho de disco e peneirada de forma a obter as granulometrias a serem estudadas em cada etapa (entre 0,8 e 2 mm, maior que 2 mm e apenas moída sem peneiramento).

### **4.2. ATIVIDADE DE ÁGUA**

A atividade de água ( $a_w$ ) pode ser medida usando diferentes métodos e equipamentos, os quais, basicamente, mensuram a pressão entre a mistura e a fase gasosa em equilíbrio. Neste estudo a medida da atividade de água da PC e do fermentado foi realizada em equipamento próprio a este fim da marca Aqua Lab modelo CX-2.

### **4.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS**

As análises das características físico-químicas da PC: umidade (termogravimétrico), cinzas (termogravimétrico), proteínas (método de Kjeldahl) e pH (potenciométrico) foram realizadas conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985). Para a quantificação dos açúcares fermentescíveis presentes na PC foram realizadas dosagens pelas metodologias de Somogyi-Nelson e Fehling para efeito de comparação entre os métodos.

Para o fermentado foram realizadas análises de umidade utilizando-se o método termogravimétrico conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985), sendo que o acompanhamento do consumo de açúcares foi determinado através de análises pela metodologia de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). As medidas de pH foram realizadas com 5g do substrato/fermentado em suspensão em 50 mL de água e agitado durante 15 minutos, com posterior medida do pH da suspensão formada pelo método potenciométrico.

#### 4.4. MICRORGANISMOS

As cepas de *A. niger* (LPB 03, LPB21, LPB 28, LPB 326 e LPB BC) foram obtidas do banco de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, sendo que a cepa de *A. niger* LPB BC foi isolada neste laboratório a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Estas cepas foram conservadas em tubos contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) inclinado, no qual os microrganismos foram repicados. Cada cepa foi incubada a 28° C por seis dias e mantidas a 4° C por até dois meses. Os esporos foram produzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio PDA. O meio de cultivo foi esterilizado a 121° C durante 15 min. Depois de resfriado (45-55° C) o meio foi inoculado em profundidade com uma suspensão de esporos. Esta suspensão foi obtida pela extração dos esporos de um tubo com meio PDA inclinado onde foram adicionados 5 mL da água destilada, 1 gota de Tween 80 e pérolas de vidro previamente esterilizados. Cada Erlenmeyer contendo o meio de cultivo estéril foi inoculado com 0,2 mL desta suspensão. A incubação foi realizada a 28° C durante sete dias.

##### 4.4.1. RECUPERAÇÃO DE ESPOROS/PREPARO DO INÓCULO

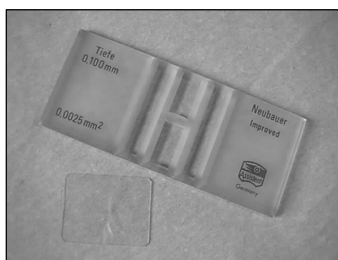
Os esporos foram recuperados da superfície do meio utilizando-se 30 mL de solução 0,01% de Tween 80 contendo pérolas de vidro e uma barra magnética. Com o auxílio de um agitador magnético, a solução adicionada

sobre os esporos foi mantida sob agitação durante 15 minutos. A suspensão obtida foi armazenada a 4° C por no máximo sete dias.

#### 4.4.2. CONTAGEM DE ESPOROS

Foram realizadas diluições sucessivas da suspensão de esporos e a contagem de esporos foi realizada em câmara de Neubauer (Figura 6) usando um microscópio ótico. A contagem de esporos é válida quando sua quantidade estiver entre 10 e 30 unidades por quadrículo (VANDENBERGHE, 2000).

**FIGURA 6 - CÂMARA DE NEUBAUER**



Estimou-se a concentração de esporos, expressa em números de esporos por mL de suspensão, presentes na suspensão do tubo utilizando a seguinte expressão:

$$N = NE \times 10^2 \times 10^4$$

Onde:

N = concentração de esporos/mL

NE = número de esporos contados nos quadrículos

10<sup>2</sup> = diluição utilizada para a suspensão de esporos (1:100)

10<sup>4</sup> = correção do volume de suspensão sobre os quadrículos

#### 4.4.3. CURVA DE ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE EM PLACA

Em dez frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 20ml de meio PDA, foi realizada semeadura em superfície de 100µl da suspensão de esporos obtida da cepa *A. niger* LPB BC. Retirou-se um frasco a cada período transcorrido de 24 horas. Os esporos foram coletados e contados como descrito previamente.

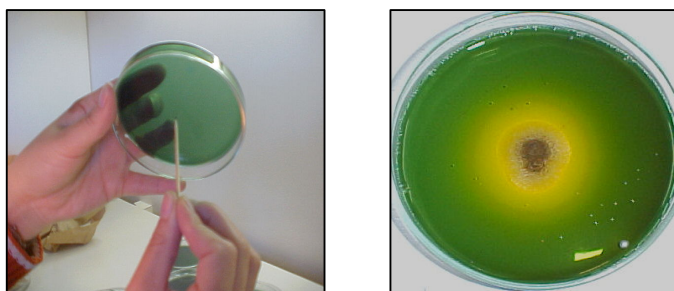
Relacionando tempo e número de esporos, chegou-se a curva de esporulação. Para a viabilidade em placa, aproveitou-se as diluições obtidas para contagem, das quais foi retirado 100µl e transferido para placas de petri contendo meio PDA. Após 24 horas de incubação, consideram-se apenas contagens entre 30 a 300 colônias. Para o cálculo, multiplicou-se a média aritmética das placas pelo fator de diluição considerado, deixando o resultado em Unidades Formadoras de colônia / 1ml de suspensão de esporos (BANWART, 1982).

#### 4.5. SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE AC

Para a seleção das cepas foram realizados testes qualitativos e quantitativos. A escolha qualitativa foi realizada através de uma análise comparativa entre as cepas onde se fez uma comparação da relação entre o tamanho do halo de produção de ácido e do halo de crescimento da colônia em meio Foster (FOSTER e DAVID, 1949).

Para o preparo do meio Foster, pesou-se 5 g de Glicose, 1 g de Peptona, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{Mg SO}_4$ , 15 g de Ágar, 65 ml de solução de Verde de Bromocresol (0,5 g de Verde de Bromocresol em 7 ml de NaOH 0,1 N completado o volume com água para 130 ml, armazenando-se em frasco escuro) e completou-se para 1000 ml com água destilada. Ajustou-se o pH para 5,0 e autoclavou-se a 121°C por 15 minutos. O meio assim preparado foi repassado para placa de Petri (15 mL) estéril, que após secagem, foi inoculada utilizando um palito estéril com o qual foi coletado alguns esporos e colocados no centro da placa para que houvesse um crescimento radial de apenas uma colônia (Figura 7).

**FIGURA 7** - CRESCIMENTO DO FUNGO *A. niger* EM MEIO FOSTER



FONTE: A autora

O teste quantitativo envolveu a produção de AC em FES utilizando PC como substrato, sendo impregnada com solução nutritiva contendo  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L) e metanol a 4% para se obter umidade inicial de 75%. O pH foi ajustado para 6.5. Após homogeneização, o suporte foi inoculado em frasco Erlenmeyer de 250mL com suspensão de esporos contendo  $10^7$  esporos/g de PC. O tempo de incubação foi de 7 dias a uma temperatura de 30° C. As condições de fermentação foram escolhidas com base em processos desenvolvidos em trabalhos anteriores (VANDENBERGHE, 2000).

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AC

A extração do AC foi realizada com 5g de material fermentado, ao qual foi adicionado 50 mL de água, agitado durante 15 minutos, filtrado à vácuo em papel de filtro Whatman nº 1. O pH da extração foi medido em potenciômetro sendo então centrifugado a 4500 rpm por 20 minutos, filtrado através de membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , diluído 1:4 vezes e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com as seguintes características e condições de operação:

- Bomba: Shimadzu DGU-2A;
- Forno: Shimadzu RID-10A;
- Integrador: Shimadzu CR-6A;
- Coluna: AMINEX modelo HPX 87HI;
- Fase móvel:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM degaseificada com hélio, à vazão de 0,6 mL/min e à temperatura de 60° C.

#### 4.7. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AC POR FES

Após a seleção de cepas, foram realizadas otimizações das variáveis físicas: pH, umidade e granulometria; variáveis químicas: fonte de carbono, de nitrogênio, de micronutrientes e de álcoois inferiores para a produção de AC por FES utilizando a PC.

#### 4.7.1. pH E UMIDADE

10 g de PC (com granulometria entre 0,8 e 2 mm) foi utilizada em frasco de Erlenmeyer de 250 mL. O substrato foi impregnado com solução salina contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2g/L e metanol a 4% de modo a obter uma umidade inicial de 65%, 75% ou 80%. Esta solução foi anteriormente utilizada em estudos de produção de AC em PC desenvolvidos na Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. O pH foi ajustado para 5,5, 6,0 ou 7,0 dependendo do teste a ser realizado. Utilizou-se NaOH e HCl 0,1N para os ajustes de pH. O substrato então foi inoculado com a solução de esporos a uma taxa de  $10^7$  esporos/g de PC seca e, depois de homogeneizado, foi incubado em estufa a 30°C durante 96 horas.

#### 4.7.2. FONTE DE CARBONO

Utilizando as condições otimizadas no subitem 4.7.1. (pH 5,5, umidade de 65% , metanol a 4% e granulometria da PC entre 0,8 e 2 mm) realizaram-se testes com adição de diferentes fontes de carbono comerciais: glicose e frutose (30, 60 e 120 g/L) e sacarose (27, 54, 108 e 216 g/L), respeitando-se na escolha das concentrações, as respectivas massas molares. Após os testes anteriores, foram analisadas novamente outras concentrações de glicose (60, 120 e 240 g/L) e sacarose (54, 108 e 216 g/L) para confirmação dos resultados. Posteriormente, foram testadas fontes de carbono alternativas e mais baratas: mel de cana (cedido pela empresa Ouro Fino Saúde Animal, Rodovia Anhangüera, São Paulo) contendo 540 g/L de açúcares totais, e melaço de soja (cedido pela empresa IMCOPA – Importação, Exportação e Indústria de Óleos LTDA., Av. das Araucárias, Araucária - Pr) que apresenta 423 g/L de açúcares totais, ambos utilizados a uma concentração de 120 g/L de açúcares totais.

#### 4.7.3. GRANULOMETRIA DA PC

Foram testadas três granulometrias de PC diferentes em FES como descrito no item 4.7.1. A PC foi moída em moinho de disco e classificada a fim de obter a granulometria desejada a cada estudo. Estas granulometrias foram: entre 0,8 e 2 mm, maior que 2 mm e apenas moído sem peneiramento. Neste experimento foi utilizado o pH ótimo de 5,5 com umidade de 65%.

#### 4.7.4. SAIS

Com as condições otimizadas no subitem 4.7.3. (pH 5,5, umidade de 65% , metanol a 4% e granulometria obtida sem peneiramento) realizaram-se testes com adição de diferentes sais (NaCl – 1g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,7709g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O -0,18g/L, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,0105g/L, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,1542g/L, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O -0,0005g/L) de forma a descobrir a influência da ausência ou presença destes sais na produção de AC por FES utilizando PC com a cepa *A.niger* LPB BC. Este ensaio foi realizado utilizando-se planejamento fatorial incompleto (2<sup>7-3</sup>) com 7 fatores e 2 níveis – ausência ou presença do sal, nas condições indicadas acima (Tabela 7).

**TABELA 7 - PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA ESTUDO DA ADIÇÃO DE SAIS**

ENSAIO	NaCl	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
5	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
6	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
7	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
9	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
10	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
11	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
12	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
13	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
14	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
15	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
16	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1

Onde -1: ausência do sal e +1: presença do sal

#### 4.7.5. FONTE DE NITROGÊNIO

Utilizando as condições otimizadas no subitem 4.7.3. (pH 5,5, umidade de 65% , metanol a 4% e granulometria obtida sem peneiramento) realizaram-se testes com adição de diferentes fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e uréia) em concentrações correspondendo à mesma concentração de nitrogênio: 1,8 g de nitrogênio/L. Esta concentração de nitrogênio foi escolhida baseada em otimização de produção de AC realizada por VANDENBERGHE (2000), onde se utilizou 2,93 g/L de uréia.

#### 4.7.6. ÁLCOOIS INFERIORES

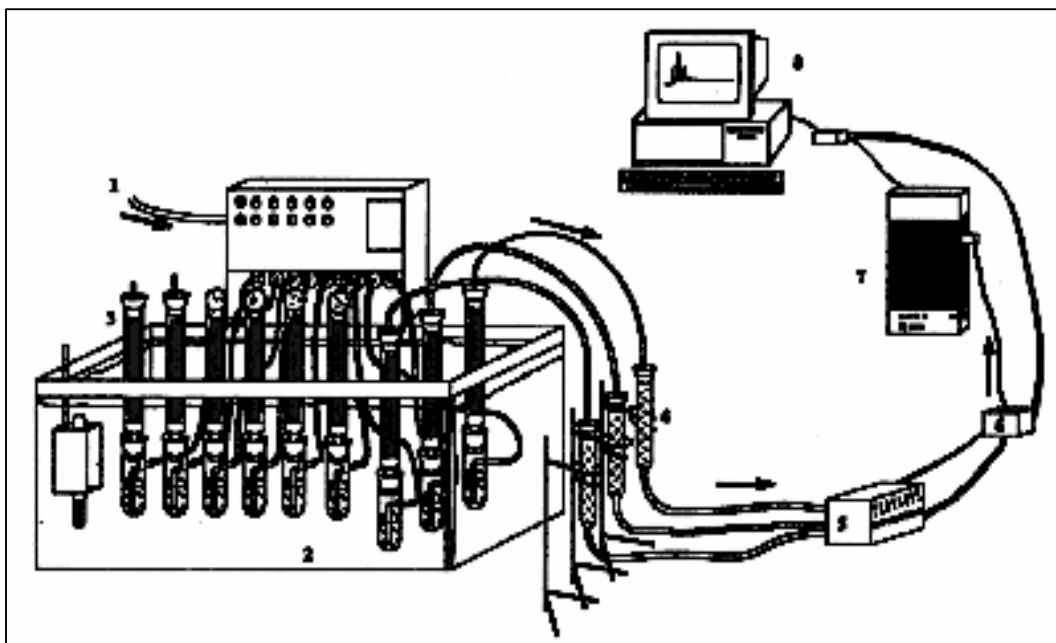
Foram realizados testes com adição de metanol (2, 4 e 6%) e etanol (2, 4, 6%) de forma a definir a melhor condição de produção de AC nas condições de pH 5,5, umidade inicial de 65%, sem adição de nenhuma fonte de nitrogênio, fonte de carbono ou sais durante 4 dias a 30°C.

Após os resultados desta fermentação e definido o metanol como melhor fonte de álcool inferior a ser adicionada, foram realizados testes com 4, 5, 6 e 8% de metanol (utilizando pH de 5,5, umidade inicial de 65% obtida com adição de solução de mel de cana 108 g/L).

#### 4.8. PRODUÇÃO DE AC EM BIORREADORES DO TIPO COLUNAS COM AERAÇÃO FORÇADA

Foi empregado um equipamento específico para a FES em colunas de baixa capacidade, acoplado a um sistema de aeração e temperatura, semelhante ao desenvolvido por RAIMBAULT e ALAZARD (1980). Os biorreatores são constituídos por colunas de vidro de 4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, com volume útil de aproximadamente 250 cm<sup>3</sup>. O equipamento (Figura 8) possui uma cuba de vidro a qual foi preenchida com água, onde há controle de temperatura, que permite a instalação de 8 colunas, que podem ser retiradas individualmente, sem provocar perturbações às outras colunas.

**FIGURA 8** – REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE FERMENTAÇÃO EM COLUNAS COM AEREÇÃO FORÇADA



Onde 1= Entrada de ar; 2 = Cuba de vidro com água; 3 = Colunas de vidro contendo meio de fermentação; 4 = Colunas contendo sílica gel; 5 = Válvula multi-nível ; 6 = Controle de injeção; 7 = Cromatógrafo gasoso; 8 = Computador.

O consumo de  $O_2$  e produção de  $CO_2$  durante a síntese de AC, foram medidas continuamente através da análise dos gases em todo o período de fermentação com as condições otimizadas (pH 5,5, 65% de umidade, 4 dias a  $30^{\circ}C$ ). Esta análise foi realizada com o fermentador estático acoplado à um cromatógrafo (SHIMADZU – GC – 8A) interligado com um computador (COMPAQ-XT386). Os dados foram armazenados pelo programa CHROMA, que é um integrador de cromatogramas. Ele recebe os sinais analógicos do detector do cromatógrafo e os converte em sinais numéricos. O cromatógrafo operou com um detector de condutividade térmica, um injetor automático e uma coluna Alltech CTR 1, que consiste em uma coluna concêntrica dupla, com parte externa formada de um filtro molecular de  $5 \text{ \AA}$  e a parte interna de uma mistura de polímeros porosos (Poropack). Esta coluna permite a separação de oxigênio, nitrogênio, ar, metano, dióxido e monóxido de carbono em diferentes tempos de retenção. O cromatógrafo gasoso operou nas seguintes condições:

Temperatura do detector	60 <sup>o</sup> C
Temperatura da coluna	60 <sup>o</sup> C
Fase gasosa	Hélio
Fluxo de Hélio	60 mL/min
Pressão de Hélio	1 bar
Corrente do catarômetro	120 mA
Volume de injeção	300 µL
Gás para calibração	Ar: CO <sub>2</sub> (0,0) / O <sub>2</sub> (21,0) / N <sub>2</sub> (79,0) Mistura1: CO <sub>2</sub> (5,0) / O <sub>2</sub> (5,0) / N <sub>2</sub> (90,0) Mistura2: CO <sub>2</sub> (10,0)/ O <sub>2</sub> (15,0)/ N <sub>2</sub> (75,0)

Os gases que saiam do incubador tipo coluna foram secos através da passagem em colunas contendo sílica gel montadas em série, e analisados por cromatografia gasosa para verificar o teor de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.

Cada gás apresenta uma condutividade térmica diferente, assim é necessário calibrar o detector antes de proceder à análise dos gases a serem medidos (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>) no decorrer da fermentação.

Nas condições utilizadas, o tempo de retenção de cada componente pode ser expresso como mostrado na Tabela 8.

**TABELA 8** – TEMPOS DE RETENÇÃO DE ALGUNS GASES, MONITORADOS EM CPG.

Componente	Tempo de Retenção (min)
Ar	0,62
CO <sub>2</sub>	0,95
O <sub>2</sub>	5,72
N <sub>2</sub>	8,02

#### 4.8.1. PREPARO DAS COLUNAS DE FERMENTAÇÃO

As colunas, bem como os borbulhadores de ar foram devidamente esterilizados a 121<sup>o</sup>C por 15 minutos. Cada coluna foi preenchida com 30 g de substrato úmido (pH 5,5, 65% de umidade com solução de mel de cana a 108 g/L de açúcares totais e 4% de metanol), que foi esterilizado separadamente em frascos erlenmeyer de 250 mL. A inoculação foi realizada no próprio frasco (10<sup>7</sup> esporos/g de meio) e após homogeneização, as colunas foram preenchidas assepticamente em câmara de fluxo laminar. Cada coluna foi pesada antes e após preenchimento com o substrato.

Após preenchimento com o substrato, as colunas foram conectadas em borbulhadores de ar de 250 mL, contendo aproximadamente 150 mL de água destilada, para umedecer o ar antes de sua passagem pelo incubador. As colunas foram introduzidas na cuba de vidro que continha água com temperatura de 30<sup>o</sup>C com auxílio de aquecedor e controlada por um termostato. Cada coluna foi ligada a uma válvula que permitiu ajustar a vazão de ar ao valor de 60 mL/min, controlado através de um aerômetro na saída de ar da coluna.

#### 4.9. FERMENTAÇÃO EM BANDEJA PERFURADA

Foi realizada fermentação em bandejas perfuradas de 90 cm por 50cm de largura utilizando-se 2 Kg (para 3 cm de profundidade) e 3 Kg (para 5 cm de profundidade) da PC moída com 65% de umidade, mel de cana a 108g/L de açúcares totais, 4% de metanol e pH inicial de 5,5, inoculada com suspensão de esporos de modo a obter 10<sup>7</sup> esporos/g de meio durante 4 dias mantida a temperatura de 30<sup>o</sup>C. A inoculação foi realizada em bandejas plásticas separadas, onde após homogeneização o meio foi espalhado sobre as bandejas perfuradas de forma que houvesse o mínimo de compactação possível.

Estas fermentações foram realizadas em câmara fechada constituída de uma sala de 2m de largura por 3m de comprimento dispondo de umidificador

com termostato, onde a umidade externa ao meio foi mantida acima de 90% e a temperatura da sala em 30<sup>o</sup> C.

#### 4.10. MUTAÇÃO INDUZIDA POR UV

Os experimentos de mutação induzida por UV foram realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Os esporos da cepa de *A.niger* BC utilizada neste estudo foram coletados da superfície do tubo de ensaio contendo a cepa crescida em meio PDA, com auxílio de alça de platina e colocados em solução previamente preparada e estéril contendo Tween 80 sendo esta homogeneizada. Realizou-se a contagem de esporos em câmara de Neubauer. Diluiu-se a suspensão de esporos até 10<sup>-4</sup>, de forma a se alcançar 30 colônias por placa. Esta solução foi denominada solução mãe e repicada em placas contendo Meio Mínimo (MM) com auxílio de alça de Drigalsky.

##### 4.10.1. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura constituem uma mistura de nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos. Estes meios podem ser preparados no próprio laboratório com pós-desidratados, ou adquiridos prontos no comércio em placas de Petri ou tubos de ensaio. Para se determinar necessidades nutricionais de um microrganismo são utilizados meios quimicamente definidos, ou seja, dos quais se conhece a composição exata.

*Meios mínimos* ou *basais* são meios onde somente são fornecidos elementos químicos necessários ao microrganismo, na forma de moléculas ou fórmulas iônicas simples. Nesses meios somente são encontrados uma única fonte de carbono (geralmente glicose), de nitrogênio (sais de amônio ou nitratos), de fósforo, etc. e não são detectados fatores de crescimento, aminoácidos ou ácidos nucleicos.

###### 4.10.1.1.Meio Mínimo (MM)

O Meio Mínimo utilizado apresenta a seguinte formulação:  $\text{NaNO}_3$  6,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 g; KCl 0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{FeSO}_4$  0,01 g;  $\text{ZnSO}_4$  0,01 g; Glicose 10,0 g; 15,0 g de ágar; completado para 1000 mL com água destilada.

#### 4.10.1.2. Meio Completo (MC)

O Meio Completo utilizado apresenta a formulação idêntica do meio mínimo, mais a adição dos seguintes ingredientes: Peptona 2,0 g; Extrato de levedura 2,0 g; Caseína hidrolisada 1,5 g; Solução de vitaminas 1,0 ml; ágar 15,0 g; completar para 1000 ml com água destilada.

#### 4.10.2. IRRADIAÇÃO POR UV

A suspensão de esporos foi transferida para uma placa de Petri, e com auxílio de lâmpada UV, em ambiente escuro, irradiou-se a suspensão por 2 minutos, para a obtenção de 5% de sobrevivência da cepa. Para o estabelecimento dos 2 minutos de irradiação e para a estimativa de obtenção de 5% de sobrevivência, foi construída anteriormente uma curva de sobrevivência de porcentagem de sobreviventes versus o tempo de exposição ao UV. Foi observado na curva que na faixa de 5% de sobrevivência, existia uma maior concentração de mutantes.

Em ambiente escuro, diluiu-se a suspensão de esporos tratada na luz UV até atingir a diluição de  $10^{-3}$  de forma a se alcançar 30 colônias por placa. Coletou-se 0,1 ml da diluição  $10^{-3}$  da cepa tratada com a luz UV e adicionou-se em 3 placas de Meio Mínimo (MM) e 2 placas de Meio Completo (MC). Espalhou-se com auxílio de alça de Drygalski.

Todas as placas (contendo a suspensão mãe e a irradiada por UV - tratamento) foram incubadas invertidas para evitar a contaminação pela disseminação dos esporos, a 28 °C por 48 horas, sendo que as placas com os esporos tratados com a luz UV foram acondicionadas em tubo de PVC fechado, para protegê-las da ação da luz.

#### 4.10.3. TESTES DAS CEPAS OBTIDAS POR IRRADIAÇÃO DE UV EM MEIO FOSTER

As colônias obtidas foram transferidas, com o auxílio de palito de madeira, para 10 placas contendo Meio Foster sendo que cada uma das placas continha 1 colônia controle (identificada com caneta) e 8 colônias tratamento. As colônias foram separadas sendo que cinco placas contendo meio Foster receberam as cepas crescidas em MM e cinco receberam as de MC. Incubaram-se as placas a 28°C por 48 horas

Nas placas com o Meio Foster, mediram-se as colônias e os halos amarelos formados pelas colônias controle e tratamento. O meio Foster apresentou coloração inicial verde, devido à presença da solução de Verde de Bromocresol que por ser indicador de variação de pH, passou a amarelo com a formação de ácido no meio.

#### 4.10.4. FES DAS CEPAS OBTIDAS POR IRRADIAÇÃO DE UV

Todas as cepas selecionadas pelo crescimento em meio Foster foram testadas em FES com a PC como substrato utilizando as condições físico-químicas do início dos estudos com a cepa *A.niger* BC (75% de umidade obtida com a utilização de solução contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L),  $\text{ZnSO}_4$  (0,2 g/L) e 4% de metanol, pH 6,5 em Erlenmeyer de 250 mL). As fermentações foram realizadas por cinco dias a 30°C, sendo retiradas amostras no 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias.

A cinética em FES de 7 dias a 30<sup>o</sup> C com as cepas de *A.niger* que apresentaram os melhores resultados e as análises dos fermentados, foram realizadas nas condições otimizadas para a cepa original *A.niger* BC (pH 5,5, adição de solução aquosa de mel de cana a 108 g/L e metanol a 4% para obtenção de umidade inicial de 65%), sendo as amostras retiradas e analisadas diariamente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA PC E SELEÇÃO DE CEPAS DE *A. niger* PRODUTORAS DE AC

A caracterização das propriedades físico-químicas da PC é uma etapa importante no início dos estudos de sua utilização em FES para produção de AC por *A. niger* já que estas propriedades podem sofrer variações devido à origem e manuseio das laranjas utilizadas no processo de obtenção da PC (Figura 3). Além destes estudos a escolha da cepa de *A. niger* a ser utilizada na produção de AC também é fator de grande importância. Embora em geral todas as cepas de *A. niger* apresentem capacidade de produzir AC, cada cepa pode apresentar particularidades quanto ao tempo de produção e quantidade de AC produzido e adaptação ao meio de fermentação.

Desta forma esta etapa do trabalho teve por objetivo caracterizar as propriedades físico-químicas da PC a ser utilizada como substrato na FES para produção de AC bem como selecionar a cepa de *A. niger* que melhor se adapte a este substrato com a maior produção de AC.

#### 5.1.1. ATIVIDADE DE ÁGUA ( $a_w$ )

Realizou-se análise da  $a_w$  da PC obtendo-se um valor médio de 0,594 o que foi considerado satisfatório já que a PC vai ser utilizada como substrato em FES utilizando o fungo *Aspergillus niger* como microrganismo produtor de AC. A  $a_w$  da PC em estudo está abaixo do ideal para o desenvolvimento de microrganismos. Tal característica ajuda a evitar contaminações indesejáveis durante a estocagem. No entanto, a umidade inicial deverá ser ajustada para a fermentação do material.

#### 5.1.2. CARBOIDRATOS

A título de comparação, foram realizadas análises de açúcares totais e redutores através do método de Somogyi-Nelson e Fehling (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

**TABELA 9 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS E REDUTORES NA PC**

<b>Açúcares (%)</b>	<b>Método de Somogyi-Nelson</b>	<b>Método de Fehling</b>
Totais	19,03 ± 0,252	16,71 ± 0,324
Redutores	9,63 ± 0,451	10,67 ± 0,503

Comparando os resultados obtidos com a utilização das duas metodologias, observou-se que entre os métodos de Fehling e Somogyi – Nelson não houve diferença significativa. Desta forma optou-se pela metodologia do Somogyi – Nelson para acompanhamento do consumo de açúcares das fermentações a serem realizadas com a PC por se tratar de método espectrofotométrico onde há menos erros de leitura quando comparado ao método de Fehling que é titulométrico.

### 5.1.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PC

Os resultados obtidos nas análises das características físico-químicas: umidade, cinzas, proteínas e pH da PC, estão relacionados na Tabela 10.

**TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA PC.**

<b>Umidade %</b>	<b>Cinzas %</b>	<b>Proteínas %</b>	<b>pH</b>	<b>Açúcares Totais</b>	<b>aw</b>
10,8±0,185	5,47±0,012	5,36±0,179	5,42±0,075	19,03±0,252	0,594±0,007

As análises de umidade, cinzas e proteínas demonstraram resultados condizentes com a literatura, onde os valores máximos permitidos são de 12,0% e 8,0% para umidade e cinzas respectivamente e de 5,0% como valor mínimo de proteínas (ABECITRUS, 2006).

O pH da PC de 5,42 está próximo ao utilizado normalmente para o processo de produção de AC em FES entre 5,0 e 6,0 de modo a evitar contaminações com outros microrganismos (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999). Para a correção de pH do substrato será

necessário menor quantidade de ácido e/ou base o que é economicamente favorável.

#### 5.1.4. SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE AC

Em meio Foster as cinco cepas de *A. niger* estudadas (LPB 03, LPB21, LPB 28, LPB 326 e LPB BC) apresentaram formação de halo significando a produção de ácido. Os resultados da medida dos halos de produção de ácido para as cinco cepas estudadas estão apresentados na Tabela 11.

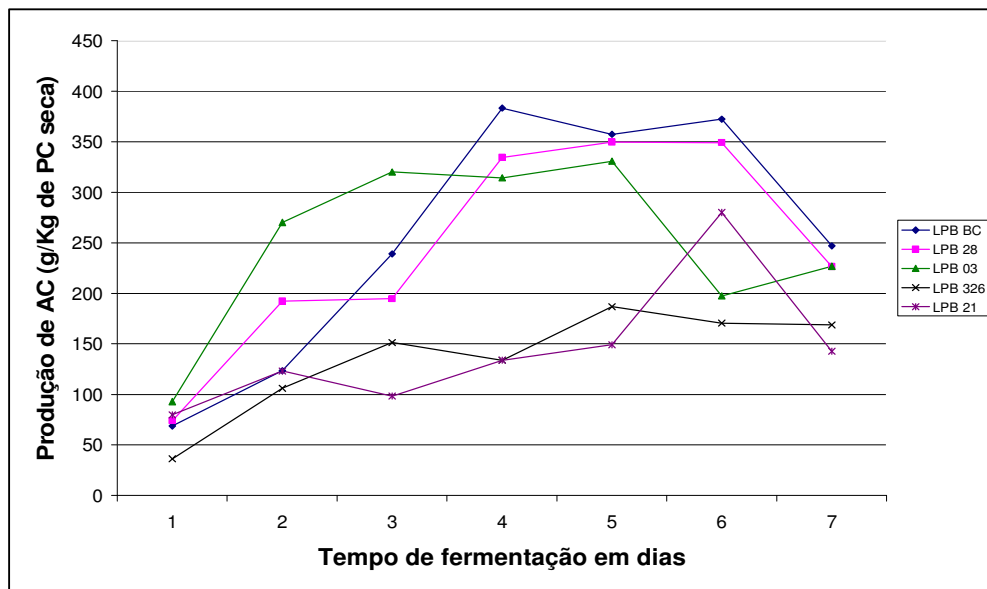
**TABELA 11** - DIFERENÇAS ENTRE DIÂMETRO DO HALO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO E DIÂMETRO DO HALO DE CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DAS CEPAS DE *A. niger*

Cepas	Halo da colônia (DC) em mm	Halo da produção de ácido (DH) em mm	Relação entre DH/DC
LPB 03	24.2	40.9	1.69
LPB 21	23.7	36.4	1.54
LPB 28	28.1	41.9	1.49
LPB 326	25.5	45.2	1.77
LPB BC	20.5	42.7	2.08

Como a relação DH/DC não é suficiente para a escolha da cepa visto que o halo amarelo formado é conseqüência do abaixamento de pH pela produção de ácido, não especificamente do AC, realizou-se um estudo cinético em FES utilizando PC como substrato para a produção de AC com todas as cinco cepas.

A cepa *A. niger* LPB 03 produziu 330,2g de AC/Kg de PC em 5 dias de fermentação, *A. niger* LPB 28 produziu 349,7 g de AC/Kg de PC no 6º dia. Resultados não tão promissores foram obtidos com as cepas *A. niger* LPB 21 (279,5 g de AC/Kg de PC no 6º dia de fermentação) e *A. niger* LPB 326 (185,9 g de AC por Kg de PC no 5º dia de fermentação). O melhor resultado foi alcançado com a cepa *A. niger* LPB BC que apresentou sua melhor produção no 4º dia, 383,5g de AC/Kg de PC (Figura 9).

**FIGURA 9** - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE AC POR FES UTILIZANDO DIFERENTES CEPAS DE *A. niger*.



Os resultados com a cepa *A. niger* LPB BC são bastante promissores em comparação com as produções reportadas utilizando outros substratos em FES com cepas de *A. niger* (Tabela 4). Desta forma estudos para otimização das características da fermentação apresentam-se como alternativa para aumentar a quantidade de AC produzida por esta cepa.

## 5.2. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE AC

Cada um dos aspectos físico-químicos da fermentação afeta significativamente a produção de AC e devem ser estudados como forma de otimizar a fermentação e, conseqüentemente, aumentar a produção de AC.

Neste trabalho foram estudados os fatores físicos de variação de pH e umidade e a granulometria da PC a ser utilizada.

Os fatores químicos como fonte de carbono, fonte de nitrogênio e micronutrientes adicionados na forma de sais ao meio de fermentação também foram estudados, devido à importância em diversos mecanismos de crescimento do *A. niger* e formação de AC. Outros fatores que auxiliam na excreção de AC são os álcoois inferiores, pois interferem na permeabilidade das membranas celulares do *A. niger*, além de diminuir a inibição causada por metais pesados que possam estar presentes no meio de fermentação (YOKOYA, 1992). Um parâmetro também importante, estudado neste trabalho, foi a viabilidade celular da cepa *A. niger* LPB BC para escolha do tempo de crescimento mais apropriado para esta cepa, onde se obteve a maior quantidade de esporos viáveis.

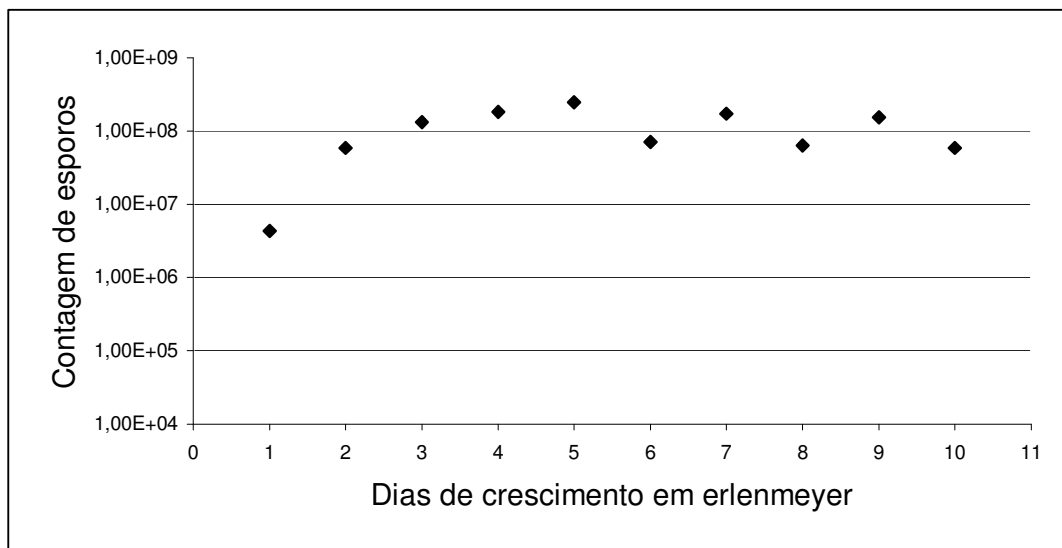
Após a otimização dos parâmetros do processo testou-se a transferência destas condições para fermentação em colunas de Raimbault e, escala semipiloto, em bandejas perfuradas para que se pudesse iniciar um estudo mais efetivo da produção de AC em grande escala.

Assim, esta etapa do trabalho teve como objetivo realizar a otimização das características físico-químicas da produção de AC por FES utilizando a cepa *A. niger* LPB BC, visando o aumento da produção de AC e sua passagem para escala semipiloto.

### 5.2.1. CURVA DE ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DO *A. niger* LPB BC

Os resultados do estudo da curva de esporulação do *A. niger* LPB BC e viabilidade celular estão representados respectivamente nos gráficos das Figuras 10 e 11.

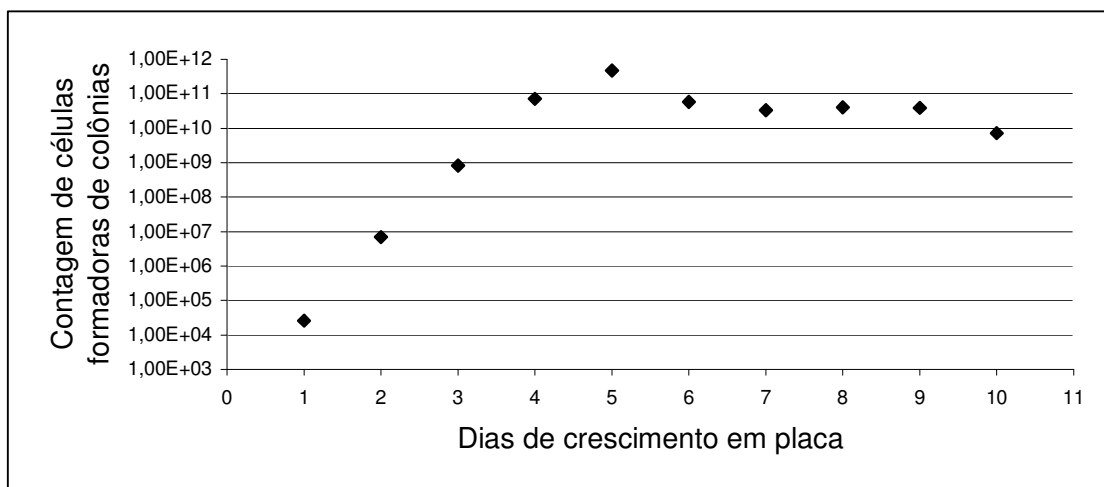
**FIGURA 10** - EVOLUÇÃO DO NÚMERO DE ESPOROS DURANTE O CRESCIMENTO DO *A. niger* LPB BC.



A Figura 10 apresenta a evolução do número de esporos durante o crescimento do *A. niger* LPB BC durante dez dias. O número de esporos aumentou exponencialmente até o 3<sup>o</sup> dia. Após este período houve uma estabilização do número de esporos a partir do 5<sup>o</sup> dia de crescimento.

Com relação à viabilidade celular (Figura 11), observa-se um comportamento semelhante. O número de células viáveis apresenta-se maior no 5<sup>o</sup> dia, antes de entrar na fase estacionária, onde o número de células viáveis difere levemente em função de pequenas variações relativas ao crescimento e morte celular.

**FIGURA 11** – CINÉTICA DE CONTAGEM DE CÉLULAS FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *A. niger* LPB BC.



Através da análise, tanto do crescimento quanto da viabilidade celular do *A. niger* LPB BC, pode-se escolher como o melhor dia para obtenção da suspensão de esporos da cepa *A. niger* LPB BC o 5<sup>o</sup> dia de crescimento em meio PDA, já que foi o menor tempo onde se observou a maior quantidade de esporos viáveis produzidos.

### 5.2.2. pH E UMIDADE

Neste estudo foram utilizados 3 níveis de pH (5,5, 6,5 e 7,5) e 3 níveis de umidade inicial diferentes (65%, 75% e 80%) obtida pela adição de solução salina contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2g/L e metanol a 4% durante 4 dias a 30°C, onde os testes foram realizados em duplicatas variando os valores de pH e umidade para cada ensaio segundo o planejamento da Tabela 12.

**TABELA 12**– ENSAIOS DE VARIAÇÃO DO pH E UMIDADE INICIAL PARA PRODUÇÃO DE AC POR FES UTILIZANDO PC.

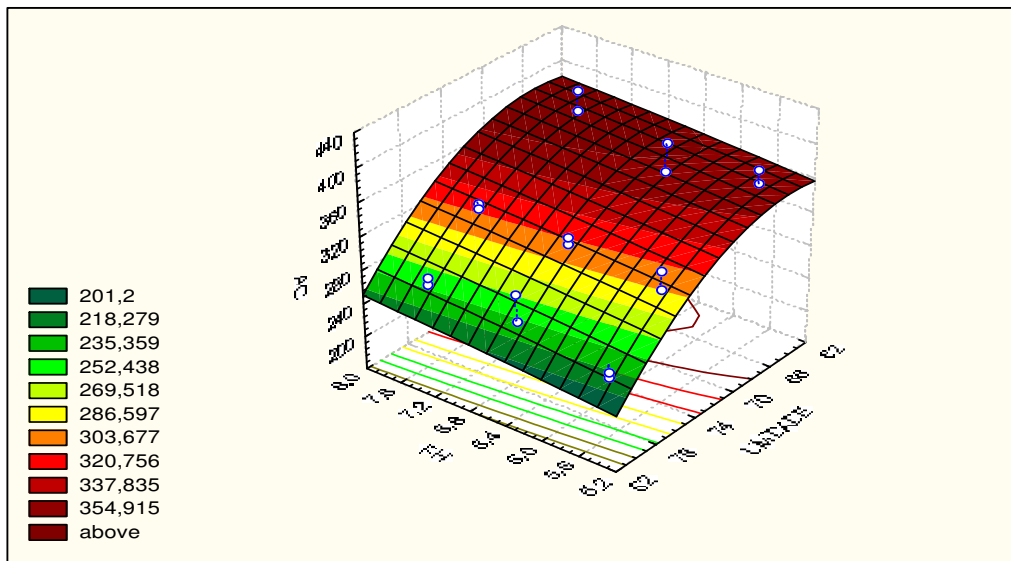
Ensaio	Umidade	pH	Produção de AC(g/Kg de PC seca) – média
1	65%	5,5	367,6
2	75%	5,5	304,8
3	80%	5,5	214,3
4	65%	6,5	350,3
5	75%	6,5	311,9
6	80%	6,5	258,5
7	65%	7,5	388,5
8	75%	7,5	314,1
9	80%	7,5	247,4

Os resultados obtidos com os testes de variação de pH e umidade foram submetidos à análise estatística com 3 níveis e 2 fatores onde estes foram plotados em gráfico de superfície de resposta (Figura 12) com  $p < 0,05$  (confiabilidade de 95%). O modelo estatístico obtido para este estudo apresenta a seguinte equação:

$$AC = -1507,3986111107 + 15,466666666663*x - 0,58333333333305*x^2 + 52,804999999999*y - 0,40833333333326*y^2$$

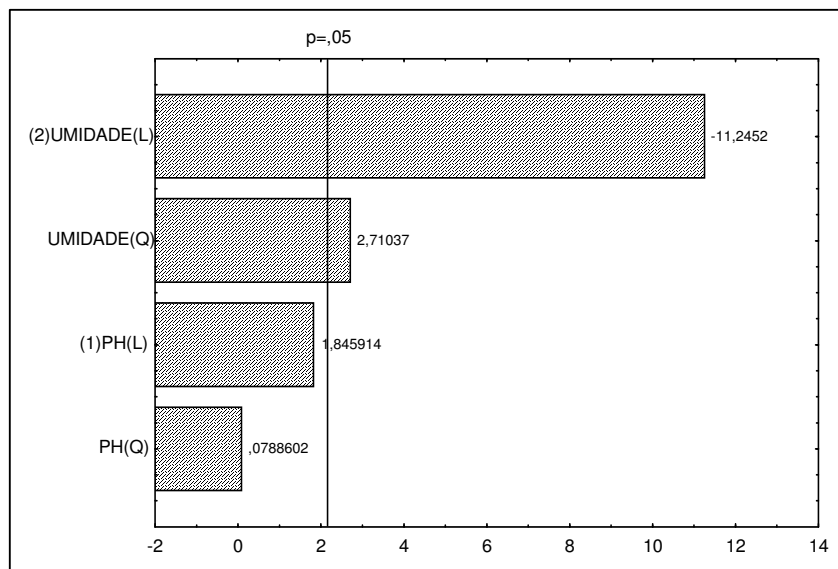
Onde x representa os valores de pH, e y os valores de umidade iniciais. O valor obtido para R<sup>2</sup> foi de 0,91.

**FIGURA 12 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS TESTES DE VARIAÇÃO DE pH E UMIDADE EM FES**



Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se umidade inicial de 65% onde a maior produção de AC foi observada com pH 5,5 (367,6 g de AC/Kg de PC) e com pH 7,5 (388,5 g de AC/Kg de PC), sendo que com o aumento na umidade inicial houve queda bastante significativa na produção de AC (Tabela 12). Os resultados sugerem que variações nos valores de pH não apresentaram efeito significativo para produção de AC utilizando PC em FES, já a umidade inicial demonstrou ser um fator importante. Este efeito foi comprovado pela análise do diagrama de Pareto (Figura 13), onde apenas a umidade inicial aparece acima da linha de significância.

**FIGURA 13** - DIAGRAMA DE PARETO PARA TESTE DA INFLUÊNCIA DO pH E DA UMIDADE NA PRODUÇÃO DE AC POR FES UTILIZANDO PC



Segundo estas análises pode-se observar que o processo de produção de AC pela cepa *A. niger* LPB BC em PC é mais efetivo quando níveis mais baixos de umidade inicial são utilizados. O pH inicial apresentou pouca influência sobre a produção de AC. Desta forma, optou-se pela utilização das seguintes condições: pH 5,5 e 65% de umidade inicial.

Este valor de umidade relativamente baixo (o que garante as trocas gasosas no meio) foi o suficiente para garantir a difusão de nutrientes no meio de fermentação. Tais condições além de melhorarem a produção do AC, também são vantajosas do ponto de vista operacional e econômico, pois não são necessários ajustes de pH já que 5,5 é um valor muito próximo do obtido para a PC seca onde o pH é 5,42 (item 5.1.3.) e menos água será gasto no processo sem perdas na produção.

### 5.2.3. FONTES DE CARBONO

O rendimento de um produto em estudos cinéticos está baseado no consumo da fonte de carbono. O tipo e a concentração dos açúcares têm efeitos muito significativos na produção de AC. Enquanto as concentrações ótimas de metais traços, fosfato e nitrogênio estão inter-relacionadas, a concentração e tipo de açúcar não podem ser influenciados pela manipulação

apropriada das outras fontes. Os fundamentos bioquímicos deste efeito aparecem como um desvio da regulação glicolítica, causada principalmente por mecanismos de controle perfeitos. Portanto, salienta-se que a produção de AC é altamente dependente da regulação glicolítica (RÖHR *et al.*, 1983; GREWAL e KALRA, 1995).

Neste estudo primeiramente foram adicionados ao meio de fermentação açúcares comerciais como fonte de carbono: glicose e frutose (30, 60 e 120 g/L) e sacarose (27, 54 e 108 g/L) para fermentação de 4 dias a 30°C, pH 5,5 e umidade inicial de 65% com adição de solução salina e metanol a 4%. Os melhores resultados de produção de AC foram observados para glicose a 120 g/L (427,7 g de AC/Kg de PC) e para sacarose a 108 g/L (405,6 g de AC/Kg de PC) sendo que com a adição de frutose o melhor resultado foi com a concentração de 120 g/L chegando-se a uma produção de 371,9 g de AC por Kg de PC.

Posteriormente estes testes foram repetidos utilizando-se apenas glicose (60, 120 e 240 g/L) e sacarose (54, 108 e 216 g/L). Os resultados foram mais significativos para o aumento na concentração de sacarose (Tabela 13), o que já era esperado devido ao fato da maior produção de AC ocorrer após crescimento micelial e o fungo possuir uma invertase extracelular ligada ao micélio, o que quebra a sacarose produzindo energia justamente na fase em que se observa o aumento na produção do AC.

**TABELA 13 - PRODUÇÃO DE AC COM ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO COMERCIAIS.**

<b>AÇÚCAR</b>	<b>PRODUÇÃO DE AC (g /Kg de PC)</b>
Glicose (60g/L)	387,3
Glicose (120g/L)	432,4
Glicose (240g/L)	426,7
Sacarose (54g/L)	371,3
Sacarose (108g/L)	410,5
Sacarose (216g/L)	476,1
BRANCO	373,2

BRANCO = sem adição de fonte suplementar de carbono

Estes resultados foram bastante significativos, pois na prática, o AC é produzido a partir de carboidrato purificado ou de fonte de carboidrato bruto, de preço mais conveniente, como melaço de cana-de-açúcar, melaço de

beterraba, sacarose bruta, caldo de cana e hidrolisado de amido. A maioria destas fontes apresenta açúcares na forma de mono, di e oligossacarídeos, além de outras impurezas (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE, 2000).

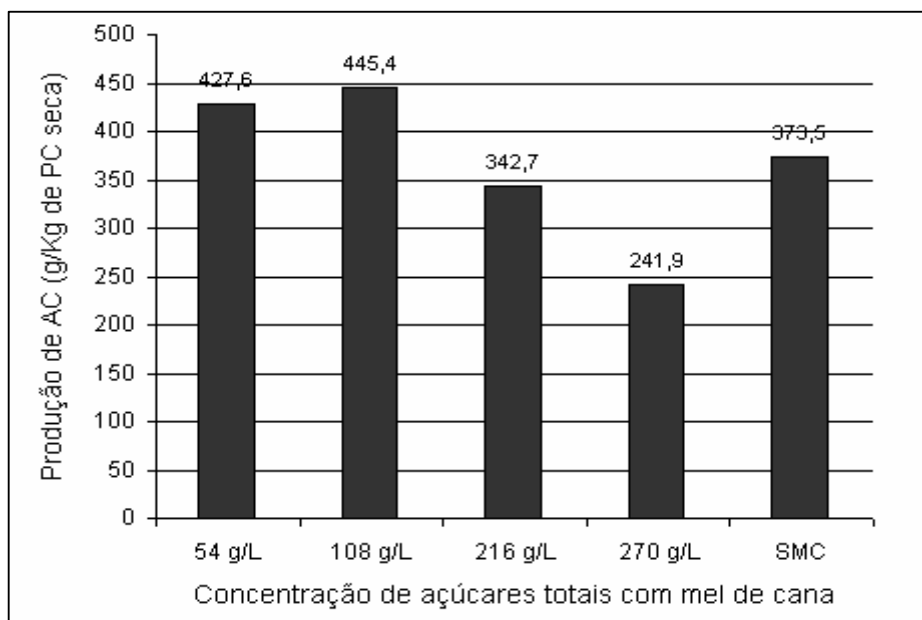
Como estas fontes brutas têm uma maior concentração de sacarose em sua formulação e houve acréscimo significativo de produção de AC com aumento na concentração de sacarose (o que não ocorreu para a glicose), foram realizados testes com duas fontes de carbono brutas: mel de cana e melaço de soja.

Para o mel de cana e o melaço de soja foi utilizada a concentração de 108 g/L em açúcares totais. Obtivemos um abaixamento na produção de AC com a utilização de melaço de soja (277,9 g de AC/Kg de PC) quando comparado ao controle não adicionado de fonte suplementar de carbono (363,7g de AC/Kg de PC). Já com a adição de mel de cana houve um aumento significativo na produção (420,3 g de AC/Kg de PC).

Estes resultados podem ser justificados devido à presença de outros tipos de açúcares além de glicose e frutose (estaquiase e melibiose) no melaço de soja compondo os açúcares redutores que não são metabolizados facilmente para produção de AC pela cepa *A. niger* LPB BC, o que não acontece com o mel de cana que é basicamente composto de glicose e sacarose que já demonstraram ser fontes de carbono bastante acessíveis à cepa para produção do AC.

Desta forma foram realizados testes em duplicatas com várias concentrações de mel de cana a fim de encontrar a concentração ótima a ser adicionada a PC de forma a aumentar a produção de AC. Estes resultados estão representados no gráfico da Figura 14.

**FIGURA 14 - PRODUÇÃO DE AC COM ADIÇÃO DE MEL DE CANA**



SMC = sem adição de mel de cana

Desta forma a fonte de carbono escolhida para suplementar a PC utilizada para produção de AC por FES foi o mel de cana a 108 g/L de concentração com produção média de 445,4 g de AC/Kg de PC seca.

#### 5.2.4. GRANULOMETRIA DA PC

Em geral considera-se que quanto menores são as partículas de um determinado substrato, melhores serão as condições do processo fermentativo. No entanto, há sérias restrições para tal regra. Se por um lado uma menor granulometria do substrato significa uma maior superfície de contato e, conseqüentemente, um melhor grau de transformação que proporcionaria melhores condições para aumento de transferência de massa; por outro lado, uma excessiva granulometria pode provocar compactação do substrato, dificultando a circulação de ar por entre a massa e reduzindo a dissipação dos gases e calor produzidos, fatores estes que ocasionarão prejuízos ao rendimento do processo.

Os resultados obtidos com os testes de diferentes granulometrias da polpa cítrica para produção de AC por FES indicaram que a melhor

granulometria empregada foi a obtida com a moagem sem peneiramento. Nestas condições onde a produção foi 388,7 g de AC/Kg de PC sendo esta produção superior à obtida com a granulometria entre 0,8 e 2mm (368,4 g de AC/Kg de PC) e com granulometria superior a 2mm (299,3 g de AC/Kg de PC).

Com esta granulometria (PC apenas moída) obteve-se um meio de fermentação sem muita compactação facilitando as trocas gasosas e ao mesmo tempo com boa superfície de contato o que é economicamente vantajoso para o processo de produção do AC por FES já que além de aumentar a produção, elimina uma operação (peneiramento) durante o processo.

#### 5.2.5. ADIÇÃO DE SAIS

Os micronutrientes presentes no meio de fermentação têm grande importância no acúmulo de AC por *A. niger*. Vários deles têm sido estudados, como por exemplo o zinco adicionado juntamente com o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , favorecendo a produção de AC, além de ter um papel importante no controle das fases de crescimento celular e de produção do ácido. O esgotamento do Zn no meio de produção faz com que o fungo passe da fase de crescimento para a fase de produção de AC. A presença de manganês, ferro e zinco (em concentrações elevadas) pode causar a redução da produção de AC somente em meios sem fosfato (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999)

A presença de íons ferro no meio afeta negativamente o acúmulo de AC na fermentação submersa. Porém, a adição de sais de cobre (0,1-500 ppm) no início da fermentação neutraliza esse efeito. As concentrações ótimas dos metais variam de um meio para outro e dependem de outros constituintes metálicos do meio (YOKOYA, 1992).

Neste estudo os seguintes sais: NaCl – 1g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,7709g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  -0,18g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0105g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1542g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  -0,0005g/L, escolhidos por se tratar dos sais mais estudados (ABOU-ZEID, 1984; SHANKARANAND e LONSANE, 1994; LIMA *et al.*, 1995; PINTADO *et al.*, 1998; VANDENBERGHE, 2000), foram adicionados ao meio de fermentação seguindo o planejamento estatístico  $2^{7-4}$  descrito na Tabela 14.

A fermentação foi realizada a 30<sup>0</sup>C durante 4 dias com pH inicial de 5,5 e umidade de 65% com adição de 4% de metanol sem adição de mel de cana.

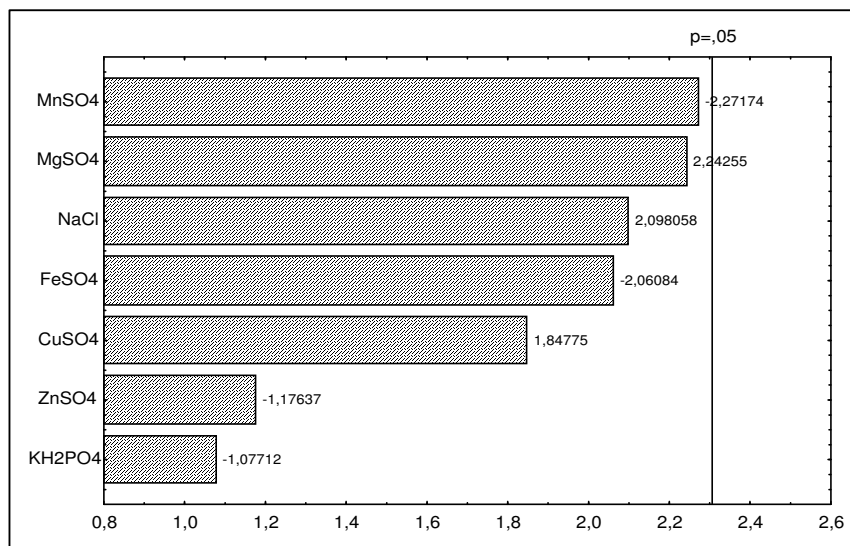
**TABELA 14** – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES SAIS NA PRODUÇÃO DE AC.

ENSAIO	NaCl	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Produção de AC – média (g/Kg de PC)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	321,1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	332,1
3	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	318,2
4	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	335,3
5	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	302,8
6	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	311,9
7	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	336,3
8	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	318,5

Onde: +1: presença do sal e -1: ausência do sal

Os resultados dos testes da adição de sais ao meio de fermentação em duplicatas foram submetidos a análise estatística onde foram plotados em diagrama de Pareto (Figura 15) com  $p < 0,05$  (confiabilidade de 95%). O valor obtido para  $R^2$  foi de 0,76 considerado satisfatório para processos de fermentação em estado sólido e bioprocessos em geral.

**FIGURA 15-** DIAGRAMA DE PARETO DO TESTE DE ADIÇÃO DE SAIS PARA PRODUÇÃO DE AC POR FES UTILIZANDO PC.



Não se observa nenhum dos sais estudados acima da linha de significância, embora os sais  $MnSO_4 \cdot H_2O$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  tenham apresentado um resultado muito próximo do que se poderia levar em consideração, sendo que a fonte de Mn apresentou-se com possível significância negativa para a fermentação e a fonte de Mg apresentou-se positiva. Os resultados para estes dois sais são justificados uma vez que a presença de alta concentração de manganês no meio inibe o acúmulo de AC, aumenta o crescimento celular e reduz o consumo de açúcar. Assim, a deficiência do íon é essencial para se obter alto rendimento de AC. Esta deficiência reprime as enzimas do ciclo anaeróbio e de Krebs, com exceção da sintetase citrato, conduzindo à superprodução de AC (RÖHR *et al.*, 1983; VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

Mesmo com estes dois sais apresentando valores próximos à linha de significância estes resultados sugerem que nenhum dos sais utilizados neste estudo foi significativo para o aumento da produção de AC por FES utilizando a PC o que pode indicar que a quantidade necessária de micronutrientes necessários à maior produção de AC pela cepa *A.niger* LPB BC devem estar presentes na própria PC utilizada neste estudo. Além disso quanto menos espécies químicas dissolvidas no meio maior concentração de oxigênio será dissolvido e conseqüentemente aproveitado pelo microrganismo.

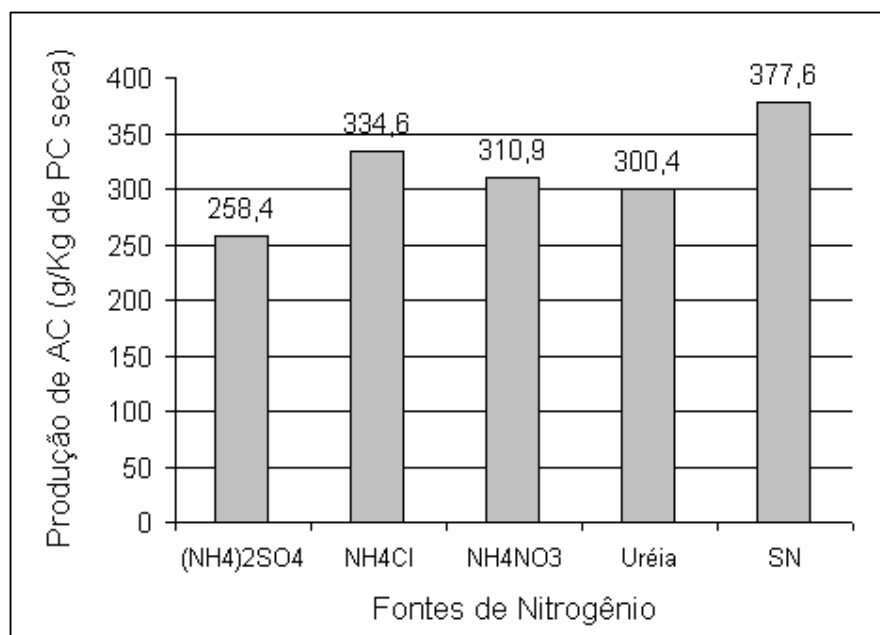
#### 5.2.6. ADIÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO

Nitrogênio é um dos componentes mais importantes para formulação de um meio de cultura em FES, pois está envolvido no crescimento do microrganismo e, normalmente, necessita ser determinado para obtenção máxima de biomassa. No caso da produção de AC, a concentração de nitrogênio necessária está ligada à produção de uma certa concentração de biomassa, para garantir a produção de AC e manutenção do fungo.

Esta etapa foi realizada paralelamente ao estudo da adição de sais descrito no item 6.1.5. utilizando as mesmas condições. Foi realizado em duplicata onde foi adicionado diferentes fontes de nitrogênio ( $NH_4Cl$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  e uréia) em concentrações que garantissem a mesma concentração de nitrogênio: 1,8 g de nitrogênio/L (VANDENBERGHE, 2000).

Os resultados das médias das produções de AC estão apresentados no gráfico da Figura 16.

**FIGURA 16** - PRODUÇÃO DE AC COM ADIÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.



SN = sem adição de fonte de nitrogênio

Microrganismos que necessitam altas quantidades de nitrogênio e fósforo não são ideais em FES devido à baixa taxa de difusão de nutrientes e metabólitos que ocorrem em processos com baixa atividade de água. (KUBICEK e RÖHR, 1986; YOKOYA, 1992; GREWAL e KALRA, 1995). Neste estudo a fonte de nitrogênio com a qual se obteve a melhor produção de AC foi o NH<sub>4</sub>Cl (334,6 g/Kg), no entanto esta produção foi inferior ao obtido sem adição de nenhuma das fontes de nitrogênio estudadas (377,6 g de AC/Kg de PC). Desta forma optou-se pela não adição de fonte de nitrogênio complementar ao meio de fermentação, pois a quantidade de nitrogênio necessária a um crescimento micelial suficiente do *A. niger* LPB BC para a produção de AC, já deve estar presente na PC utilizada (aproximadamente 5% - item 5.3.3). A produção de AC ocorre sob limitação do crescimento (VANDENBERGHE, 2000).

### 5.2.7. ÁLCOOIS INFERIORES

A síntese do citrato é a etapa final da biossíntese do AC nas mitocôndrias do *A. niger* antes de ser transferido para o citoplasma e então para o meio. Quando o nível de AC nas células estiver elevado, o ácido será excretado. O acúmulo extracelular de AC pode estar associado à maior ou menor facilidade de transporte do produto através da membrana celular e da mitocôndria (YOKOYA, 1992; GREWAL e KALRA, 1995). A adição de álcoois inferiores diminui a inibição causada por metais pesados que podem estar presentes no meio de fermentação além de facilitar a permeabilidade do AC pela membrana celular do *A. niger*.

Foram realizados testes com adição de três concentrações diferentes de metanol e de etanol (2, 4 e 6%) sem a adição de mel de cana com pH 5,5, 65% de umidade em fermentação de 4 dias a 30°C. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

**TABELA 15** – RESULTADOS DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE METANOL E ETANOL, SEM ADIÇÃO DE MEL DE CANA.

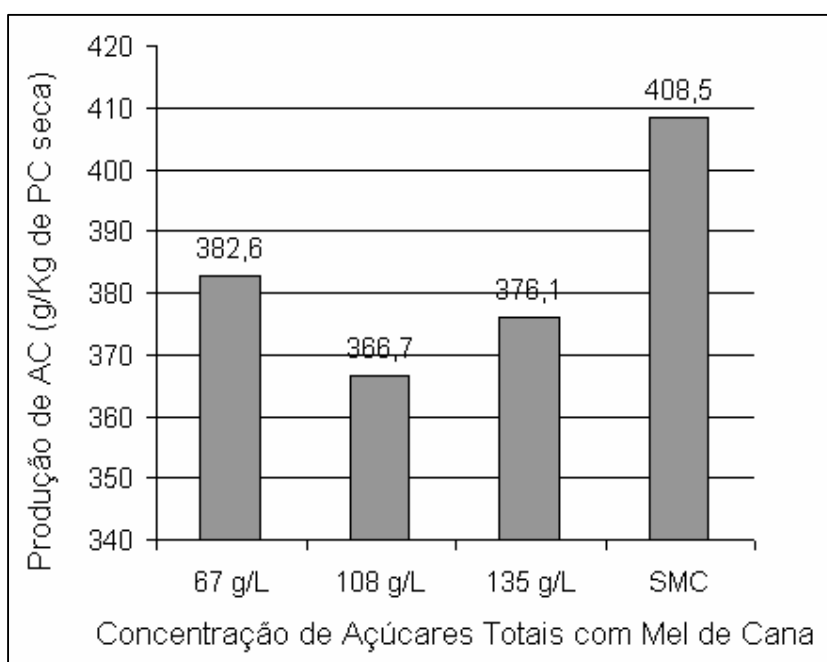
ÁLCOOL	PRODUÇÃO DE AC (g/Kg de PC seca) –MÉDIA
Metanol 2%	282,2
Metanol 4%	366,0
Metanol 6%	438,4
Etanol 2%	296,4
Etanol 4%	290,7
Etanol 6%	348,5
BRANCO	250,3

BRANCO = sem adição de álcool

Observou-se que entre os dois álcoois estudados (metanol e etanol), o que apresenta os melhores resultados de produção de AC (438,4 g/Kg de PC seca) nestas condições de fermentação foi o metanol e que a melhor concentração de metanol a ser utilizada foi a de 6%.

A partir destes resultados foram realizados testes com adição de diferentes concentrações de mel de cana (67, 108 e 135 g/L de açúcares totais) utilizando pH 5,5, 65% de umidade e 6% de metanol durante 4 dias a 30°C em duplicata. Tal estudo foi realizado para que se pudesse avaliar o efeito desta concentração de metanol com a presença de mel de cana. As médias dos resultados obtidos são apresentados no gráfico da Figura 17.

**FIGURA 17** - PRODUÇÃO DE AC COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEL DE CANA UTILIZANDO 6% DE METANOL



SMC = sem adição de mel de cana

Não houve variação significativa no aumento da produção de AC (estando em torno de 408 g/Kg de PC seca) utilizando diferentes concentrações de mel de cana com 6% de metanol, tal qual havia sido observado para a utilização de 4% de metanol, onde atingiu-se um aumento de 16% com a utilização de mel de cana a 108 g/L (Figura 14 do item 6.1.3.). Desta forma foram realizados novos testes com diferentes concentrações de metanol (4, 5, 6 e 8%) utilizando a melhor concentração de mel de cana (108 g/L) com a qual se conseguiu a maior produção de AC (pH 5,5, 65% de

umidade, durante 4 dias a 30°C). Os resultados estão representados na Tabela 16.

**TABELA 16** – PRODUÇÃO DE AC COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE METANOL COM ADIÇÃO OU NÃO DE MEL DE CANA A 108 g/L

<b>Metanol</b>	<b>Produção de AC (g/Kg de PC seca) – média</b>
4% SMC	380,9
4% MC	457,9
5% SMC	418,3
5% MC	419,9
6% SMC	425,1
6% MC	420,8
8% SMC	308,7
8% MC	266,1
BRANCO	261,2

SMC = sem adição de mel cana; MC = com adição de 108 g/L de mel de cana;  
BRANCO = sem adição de mel de cana e sem adição de metanol.

Observa-se que com a utilização de 5% e 6% de metanol sem adição de mel de cana, a produção de AC foi maior que a 4%, 380,9 e 418,3 g de AC/ kg PC seco, respectivamente. No entanto, quando adicionado mel de cana a 108 g/L, a produção de AC com adição de 5% e 6% (419,9 e 420,8 g /Kg de PC respectivamente) não foi tão elevada quanto com a utilização de 4% de metanol (457,9 g/Kg de PC). A 8% de metanol a produção de AC não foi significativa, com ou sem adição de mel de cana, demonstrando que esta concentração de fonte de carbono já é limitante para produção de AC.

Assim foi escolhida a concentração de 4% de metanol com adição de mel de cana a 108 g/L de açúcares totais para produção de AC por FES utilizando PC como substrato.

## 5.2.8. CINÉTICA FINAL EM FES COM AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS EM ERLLENMEYER

Após otimização dos parâmetros físicos e químicos do processo de produção de AC, definiu-se o 5<sup>o</sup> dia como o melhor tempo de crescimento para a cepa *A. niger* LPB BC depois, utilizando as condições estudadas anteriormente por VANDENBERGHE (2000) (adição de solução salina contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2g/L e metanol a 4%), realizou-se estudo para escolha do pH e umidade iniciais obtendo-se os melhores resultados para pH 5,5 e umidade de 65% (aumento de 17,8% na produção de AC com relação as condições iniciais).

Em seguida realizou-se estudo da influência de sais adicionados ao meio de fermentação ( $\text{NaCl}$  - 1g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,7709g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,18g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,0105g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1542g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,0005g/L) utilizando pH 5,5, metanol 4% e umidade de 65% durante 4 dias a 30<sup>o</sup>C, onde não se observou aumento na produção de AC com a adição de nenhum dos sais estudados. Paralelamente a este estudo, realizou-se fermentações com adição de diferentes fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e uréia) utilizando pH 5,5, metanol a 4% e umidade inicial de 65% com adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2g/L, onde também não se obteve nenhum aumento na produção de AC.

Após testes com diferentes granulometrias de PC moída (entre 0,8 e 2 mm, maior que 2 mm e apenas moída) onde se obteve aumento na produção de AC de 5,5% com utilização de PC apenas moída sem peneiramento, quando comparado ao utilizado até então (granulometria entre 0,8 e 2 mm), foi realizado testes de suplementação de fonte de carbono sendo escolhido a adição de mel de cana a 108 g/L de açúcares totais com a utilização de pH 5,5, metanol 4% e umidade inicial de 65% sem adição de sais ou fonte de nitrogênio onde obteve-se um aumento de 19,2% na produção de AC quando comparado ao meio sem adição de mel de cana. Com estes resultados foram realizados testes da adição de álcoois inferiores onde não se obteve melhores resultados.

Assim realizou-se um estudo da cinética da produção de AC durante 7 dias a 30<sup>o</sup>C em duplicata com as condições otimizadas: pH 5,5, umidade inicial

de 65% obtida com a adição de solução contendo mel de cana (108 g/L de açúcares totais) e 4% de metanol. Os resultados do acompanhamento deste estudo estão apresentados na Tabela 17.

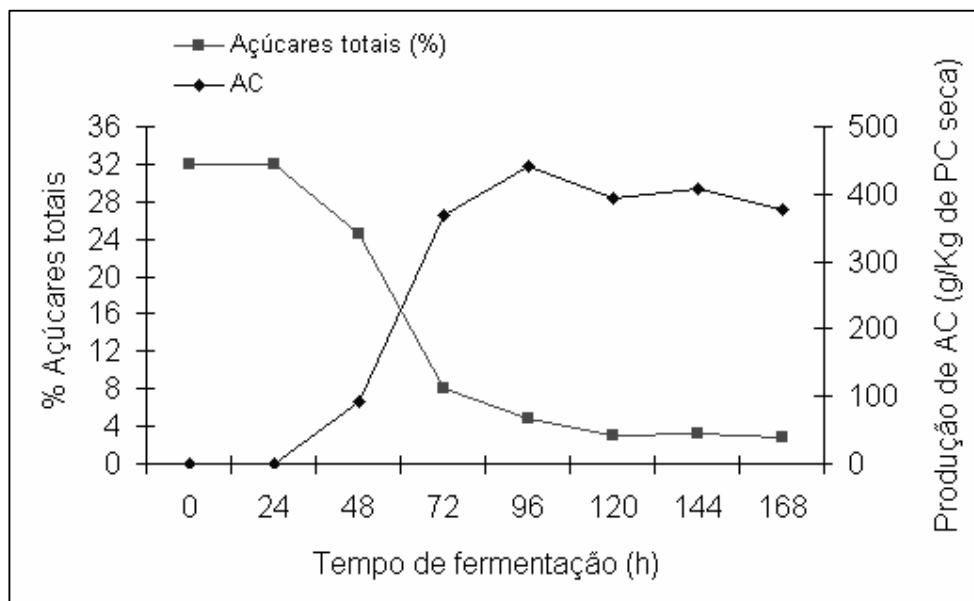
**TABELA 17** – EVOLUÇÃO DA CINÉTICA FINAL DE PRODUÇÃO DE AC POR FES UTILIZANDO PC COM A CEPA *A. niger* LPB BC.

Tempo de fermentação Horas	pH	Aw/T <sup>0</sup> C	Açúcares totais %	Umidade %	Produção de AC (g/Kg de PC seca) média
0	5,41	0,952/27,4	32,0	64	NP
24	5,34	0,953/27,3	31,9	63	NP
48	3,48	0,947/27,6	24,6	64	93,12
72	2,64	0,951/27,5	7,98	64,6	369,63
96	2,70	0,946/27,6	4,79	65,5	441,05
120	3,21	0,942/25,2	3,08	65,3	395,19
144	3,28	0,947/25,9	3,13	65,5	408,96
168	3,26	0,951/26,5	2,76	64,9	376,35

NP = não houve produção de AC

Pode-se observar um abaixamento acentuado no pH do meio de fermentação a partir do 2<sup>o</sup> dia justificado pelo início do acúmulo de AC no meio de fermentação, sendo que os menores valores de pH (2,64 e 2,7) foram observados nos dias de maior aumento na produção de AC. O 4<sup>o</sup> dia de fermentação apresentou a maior produção de AC (441,05 g/Kg de PC seca), a partir deste ponto os valores de pH subiram um pouco estabilizando em aproximadamente 3,2 devido ao abaixamento na quantidade de ácido presente no meio. Em trabalho desenvolvido por CASTRO *et al.* (2002), maiores produções de biomassa foram observadas quando valores de atividade de água mais altos foram utilizados. A atividade de água durante a cinética de produção de AC da cepa *A. niger* LPB BC manteve-se com valores acima de 0,94 durante todo o processo fermentativo o que é bastante importante para o desenvolvimento do microrganismo.

**FIGURA 18** - CINÉTICA DE CONSUMO DE AÇÚCARES E PRODUÇÃO DE AC.



Com a análise do gráfico da Figura 18 pode-se perceber um estágio de adaptação do fungo ao meio de fermentação nas primeiras 24 horas, quando então se inicia o consumo de açúcares e produção de AC. A formação micelial é observada em 48 horas o que acarreta o consumo de açúcares redutores presentes no meio. Tal fato é devido ao *A. niger* não possuir capacidade de hidrolisar a sacarose no início de seu crescimento, somente após a formação dos micélios é que juntamente com estes é formada a enzima invertase extracelular, capaz de hidrolisar sacarose em meio ácido. Assim, a maior produção de AC se deu em 96 horas (441,05 g de AC/Kg de PC seca) quando já havia sido formada biomassa suficiente e todo o açúcar necessário estava disponível ao metabolismo e produção do AC. A partir de então a quantidade de açúcar presente começa a cair mais rapidamente estabilizando-se em 3% de açúcares totais, o que provavelmente é uma quantidade limitante para a sobrevivência do fungo que assim, pode começar a utilizar outras fontes de carbono como o próprio AC para sua manutenção. Este fato foi observado com a queda de 17,2% na quantidade de AC após 144 horas de fermentação.

## 5.2.9. COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AC EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREATORES

Quanto ao tipo de aeração, na produção de AC foram utilizados dois sistemas diferentes de fermentação: a aeração por difusão ou aeração natural, com a qual foram realizadas fermentações em frascos Erlenmeyer (cujos resultados estão descritos nos itens anteriores) e fermentação em bandejas perfuradas, e aeração forçada utilizada nas fermentações em colunas de vidro. Desta forma foi possível uma comparação entre diferentes modelos de biorreatores utilizando as duas formas de aeração.

### 5.2.9.1. FERMENTAÇÃO UTILIZANDO BANDEJA PERFURADA

A fermentação em bandejas perfuradas foi realizada utilizando-se 3 cm de profundidade do meio (leito) onde inicialmente foram observados problemas operacionais com relação à secagem do meio de fermentação já que a exposição ao ar é muito maior devido ao aumento da superfície de contato. Apesar da umidade do ar na câmara ser mantida em torno de 95%, observou-se que no decorrer da fermentação a superfície do substrato ressecava (passando de 65% inicial a 54% de umidade) e, conseqüentemente, havia uma rápida esporulação do microrganismo, o que além de ser um problema para a passagem para escala industrial também limita a produção de AC. Desta forma foram realizadas aspersões periódicas de água sobre o meio de fermentação, onde se conseguiu uma melhor produção de AC (400 g/Kg de PC seca) embora ainda não tão alta quanto à obtida em frascos Erlenmeyer (450 g/kg de PC seca) onde a umidade tende a aumentar, pois quase não há perdas de umidade para o meio externo.

Desta forma realizou-se um estudo da influência da altura de meio de fermentação na produção de AC com o objetivo de encontrar a altura ideal de leito que melhor favorecesse a produção de AC e limitasse a esporulação, onde a compactação não fosse excessiva (o que limitaria as trocas gasosas). Por outro lado, uma altura muito pequena pode limitar o aproveitamento da área disponível. Assim foi escolhida a altura de 3 cm e 5 cm do leito de fermentação, onde se observou que o melhor resultado foi obtido utilizando 3

cm de profundidade do leito com uma produção de AC 11,6% maior (410 g/Kg de PC seca) que a obtida com 5 cm de profundidade (362,44 g/Kg de PC seca).

Embora utilizando-se 3 cm de profundidade do leito (Figura 19) se obtenha um menor aproveitamento da área disponível da bandeja, a diferença na quantidade de AC produzida é considerada significativa para se manter esta quantidade de meio por bandeja em estudos posteriores. Acima de 3 cm a compactação do meio compromete a difusão de ar e outros componentes, levando a menor produção.

**FIGURA 19** – PRODUÇÃO DE AC EM FES UTILIZANDO BANDEJA PERFURADA COM LEITO DE 3 cm.



FONTE: A autora.

#### 5.2.9.2. FERMENTAÇÃO EM COLUNAS

Na produção de AC biorreatores do tipo colunas com aeração forçada, realizada em duplicata, observou-se que o fermentado manteve melhor a umidade do que em bandejas perfuradas o que é devido a passagem de ar saturado através das colunas, o que evita a secagem do meio. Paralelamente foi realizado estudo com atraso do início da aeração em 24 horas de forma a tentar diminuir o crescimento de biomassa (VANDENBERGHE, 2000). Os resultados para fermentação em colunas estão representados na Tabela 18.

**TABELA 18** – RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE AC POR FES EM COLUNAS COM AERAÇÃO FORÇADA

<b>Aeração forçada</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Produção de AC (g/Kg de PC seca)</b>
Iniciada após 24h de fermentação	63,7	370,31 ± 1,95
Iniciada em 0 h de fermentação	64,5	379,34 ± 3,44

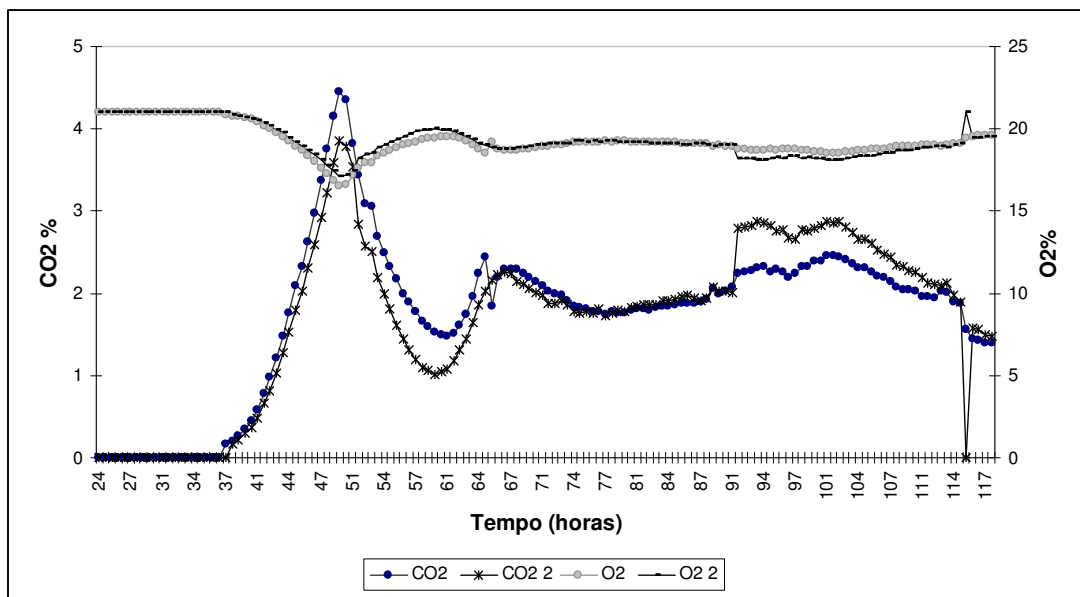
Os resultados obtidos nesse modelo de biorreator foram inferiores (379,34 g AC/ kg PC seco) ao observado em frascos Erlenmeyer e em bandeja perfurada. A diferença na produção de AC com o atraso no início da aeração foi pequena provavelmente devido ao fato do *A. niger* LPB BC nas primeiras 24 horas ainda estar em fase de adaptação ao substrato.

Quanto à esporulação, esta só foi visível no 3<sup>o</sup> dia de fermentação, sendo muito mais intensa que a observada em frascos Erlenmeyer o que era esperado, pois a aeração estimula o crescimento e, portanto, a esporulação também. Quanto maior o crescimento maior a esporulação.

No processo de produção de AC deve-se limitar o crescimento do microrganismo (YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE, 2000). Além disso, espera-se obter um produto com baixa produção de esporos que poderá ser aplicado diretamente em ração animal.

No decorrer do estudo foi avaliado o metabolismo respiratório do microrganismo, processo que está intimamente ligado ao crescimento do microrganismo (Figura 20). A biomassa celular é um parâmetro fundamental na caracterização do crescimento microbiano. Porém, em FES, é o parâmetro mais difícil de se estimar. As hifas do fungo filamentosos penetram e se ligam fortemente ao substrato, dificultando sua separação do material e, conseqüentemente, a determinação direta da biomassa. A biomassa celular pode ser estimada indiretamente através de medidas metabólicas. O consumo de O<sub>2</sub> e a produção de CO<sub>2</sub> são resultado da respiração do fungo e estão associadas ao crescimento (RAIMBAULT, 1997).

**FIGURA 20** – CONSUMO DE O<sub>2</sub> E PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub> DURANTE FES DE PRODUÇÃO DE AC POR *A. niger* LPB BC.



CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> = colunas com início de aeração em 0 h de fermentação

CO<sub>2</sub> 2 e O<sub>2</sub> 2 = colunas com início de aeração após 24h de fermentação

Apenas a partir de 30 horas de fermentação observa-se o início de uma respiração celular mais acentuada devido ao fato do microrganismo já estar adaptado ao meio e começar a se desenvolver e formar biomassa. As maiores taxas de respiração (consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub>) foram observadas em 48 horas de fermentação o que deve estar relacionado à maior produção de biomassa pelo microrganismo. Após 50 horas de fermentação ocorre uma queda brusca na produção de CO<sub>2</sub> no meio e o coeficiente de respiração permanece baixo até aproximadamente 92 horas de fermentação, quando então sofre um pequeno aumento até ficar constante. Estes resultados estão de acordo com o fato da maior produção de AC ocorrer em aproximadamente 96 horas de fermentação, onde se verifica que taxas de respiração mais baixas são necessárias para a produção de altas concentrações de AC.

As colunas com aeração forçada desde o início da fermentação apresentaram maior produção de CO<sub>2</sub> no início, entretanto, em 96 horas, quando a produção de AC é maior, a produção de CO<sub>2</sub> foi mais baixa do que a observada para as colunas cuja aeração forçada foi iniciada apenas após 24

horas de fermentação. Este fato está de acordo com a produção de AC um pouco mais elevada para as colunas com aeração forçada desde o início da fermentação.

#### 5.2.9.3. PRODUÇÃO DE AC EM DIFERENTES MODELOS DE BIORREATORES

Os melhores resultados para produção de AC por FES neste trabalho foram alcançados utilizando-se frascos Erlenmeyer (450 g/Kg de PC) seguido dos resultados em bandejas perfuradas (410 g/Kg de PC) e, por fim, em colunas de vidro com aeração forçada (377,75 g/Kg de PC).

Este estudo revelou a importância de se ter uma atmosfera rica em CO<sub>2</sub>. A limitação do crescimento do fungo é um fator importante na produção do ácido. Estudos comprovaram que a limitação no crescimento provocada pela alta concentração de CO<sub>2</sub> conduz a um elevado acúmulo de AC (VANDENBERGHE, 2000). A elevada pressão parcial do CO<sub>2</sub> provavelmente retarda a liberação de esporos pelo fungo filamentoso, favorecendo a síntese do AC, o que foi observado em frascos Erlenmeyer, onde a esporulação foi visível a partir do 3<sup>o</sup> dia de fermentação, enquanto que em bandejas perfuradas onde o sistema é aberto não havendo saturação de CO<sub>2</sub>, a esporulação foi visível já em 48 h de fermentação. Além disso, a umidade durante a fermentação em bandejas perfuradas diminuiu em comparação com a observada em frascos Erlenmeyer, o que também pode justificar a menor produção de AC observada em bandejas perfuradas do que em Erlenmeyer.

Com relação aos menores valores de produção de AC em fermentação em colunas de vidro, pode-se perceber que mesmo o sistema mantendo a umidade mais efetivamente que em bandejas perfuradas, a aeração forçada não possibilitou o acúmulo de CO<sub>2</sub>, não havendo assim a limitação necessária no crescimento do fungo o que resultou em menor produção de AC, quando comparado à fermentação em frascos Erlenmeyer e em bandejas perfuradas.

### **5.3. ESTUDO DA MUTAÇÃO INDUZIDA POR IRRADIAÇÃO DE RAIOS UV SOBRE A CEPA *A. niger* LPB BC**

Neste estudo foi realizada a indução de mutação da cepa *A. niger* LPB BC através de irradiação de raios UV já que esta apresentou ótimos resultados na produção de AC após otimização das características da FES. Desta forma pretende-se conseguir uma cepa mutante com maior capacidade de produção de AC por FES utilizando PC como substrato do que a *A. niger* LPB BC.

Além disso, foi monitorada a produção de AC das cepas mutantes obtidas que apresentaram os melhores resultados durante alguns meses, para analisar a possibilidade de mecanismos de reparo reconstituírem a genética original da cepa fazendo com que volte ao seu estado original.

Após realização da indução de mutação por UV (conforme item 4.8) da cepa *A. niger* LPB BC, foram realizados testes qualitativos e quantitativos de produção de AC nas cepas de *A. niger* mutantes obtidas.

#### **5.3.1. FORMAÇÃO DE HALO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO EM MEIO FOSTER**

Este teste foi realizado através da observação de formação de halo de coloração amarela em meio Foster revelado pela degradação da glicose presente no meio e conseqüente abaixamento de pH, sendo obtidos resultados em placas.

Foram repicadas as 72 cepas obtidas separadas em 9 placas sendo 5 contendo as cepas obtidas em meio completo (MC) e 4 placas contendo as cepas obtidas em meio mínimo (MM).

Os resultados para a produção de ácido em meio Foster estão apresentados nas Tabelas de 19 a 27. As tabelas apresentam a relação entre o diâmetro do halo de formação de ácido (DH) e o diâmetro da colônia (DC) de crescimento do fungo.

**TABELA 19 – RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA A ORIUNDAS DO MC**

<i>Colônia</i>	<i>Razão DH/DC</i>
Controle	1,70
Tratamento 1	1,62
Tratamento 2	1,55
<b>Tratamento 3</b>	<b>1,87</b>
Tratamento 4	NFHA
Tratamento 5	NFHA
Tratamento 6	1,60
Tratamento 7	1,35
Tratamento 8	1,54

NFHA = não houve formação de halo de ácido

**TABELA 20 – RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA B, ORIUNDAS DO MC**

<i>Colônia</i>	<i>Razão DH/DC</i>
Controle	2,02
Tratamento 1	NFHA
Tratamento 2	NFHA
Tratamento 3	1,86
Tratamento 4	1,45
Tratamento 5	NFHA
Tratamento 6	NFHA
Tratamento 7	1,82
Tratamento 8	NFHA

NFHA = não houve formação de halo de ácido

**TABELA 21 – RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA C, ORIUNDAS DO MC**

<i>Colônia</i>	<i>Razão DH/DC</i>
Controle	2,02
Tratamento 1	1,98
Tratamento 2	NFHA
Tratamento 3	NFHA
Tratamento 4	1,69
Tratamento 5	NFHA
Tratamento 6	1,81
Tratamento 7	NFHA
Tratamento 8	NFHA

NFHA = não houve formação de halo de ácido

**TABELA 22 – RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA D, ORIUNDAS DO MC**

<i>Colônia</i>	<i>Razão DH/DC</i>
Controle	2,22
Tratamento 1	1,68
Tratamento 2	1,68
Tratamento 3	1,72
Tratamento 4	1,88
Tratamento 5	1,41
Tratamento 6	NFHA
Tratamento 7	1,48
Tratamento 8	NFHA

NFHA = não houve formação de halo de ácido

**TABELA 23 – RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA E, ORIUNDAS DO MC**

<i>Colônia</i>	<i>Razão DH/DC</i>
Controle	2,04
Tratamento 1	1,41
Tratamento 2	1,65
Tratamento 3	NFHA
Tratamento 4	NFHA
Tratamento 5	NFHA
Tratamento 6	NFHA
Tratamento 7	NFHA
Tratamento 8	1,96

NFHA = não houve formação de halo de ácido

Das 40 colônias tratamento repicadas em MC, 21 apresentaram formação de halo de coloração amarelada evidenciando produção de ácido o que representa 52,5% do total. Contudo apenas uma destas colônias tratamento (Tabela 19, placa A) apresentou razão DH/DC (1,87) superior a relação apresentada pela colônia controle (1,70) indicando uma maior capacidade de produção de ácido quando comparada a cepa de origem.

**TABELA 24– RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA A, ORIUNDAS DO MM**

<i>Colônia</i>	<i>Razão DH/DC</i>
Controle	2,01
Tratamento 1	NFHA
Tratamento 2	1,85
Tratamento 3	1,91
Tratamento 4	2,09
Tratamento 5	NFHA

Tratamento 6	1,73
Tratamento 7	1,74
Tratamento 8	1,43

NFHA = não houve formação de halo de ácido

**TABELA 25 – RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA B, ORIUNDAS DO MM**

Colônia	Razão DH/DC
Controle	1,51
Tratamento 1	NFHA
Tratamento 2	NFHA
Tratamento 3	1,97
Tratamento 4	1,74
Tratamento 5	NFHA
Tratamento 6	1,70
Tratamento 7	1,62
Tratamento 8	1,57

NFHA = não houve formação de halo de ácido

**TABELA 26 – RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA D, ORIUNDAS DO MM**

Colônia	Razão DH/DC
Controle	1,91
Tratamento 1	1,78
Tratamento 2	1,82
Tratamento 3	1,70
Tratamento 4	1,59
Tratamento 5	1,56
Tratamento 6	1,59
Tratamento 7	NFHA
Tratamento 8	NFHA

NFHA = não houve formação de halo de ácido

**TABELA 27– RAZÃO ENTRE DC E DH DA COLÔNIA CONTROLE E DAS COLÔNIAS TRATAMENTO DA PLACA E, ORIUNDAS DO MM**

Colônia	Razão DH/DC
Controle	1,72
Tratamento 1	2,12
Tratamento 2	NFHA
Tratamento 3	1,78
Tratamento 4	1,93
Tratamento 5	NFHA
Tratamento 6	1,59
Tratamento 7	1,90
Tratamento 8	NFHA

NFHA = não houve formação de halo de ácido

De acordo com as Tabelas 24, 25, 26 e 27 do total de colônias tratamento (40) semeadas em meio Foster oriundas de MM, 23 (71,88%) apresentaram formação de halo de coloração amarela evidenciando formação de ácido. Destas foram obtidas 10 colônias tratamento (47,83%) que apresentaram razão DH/DC superior em comparação com a razão DH/DC da cepa controle.

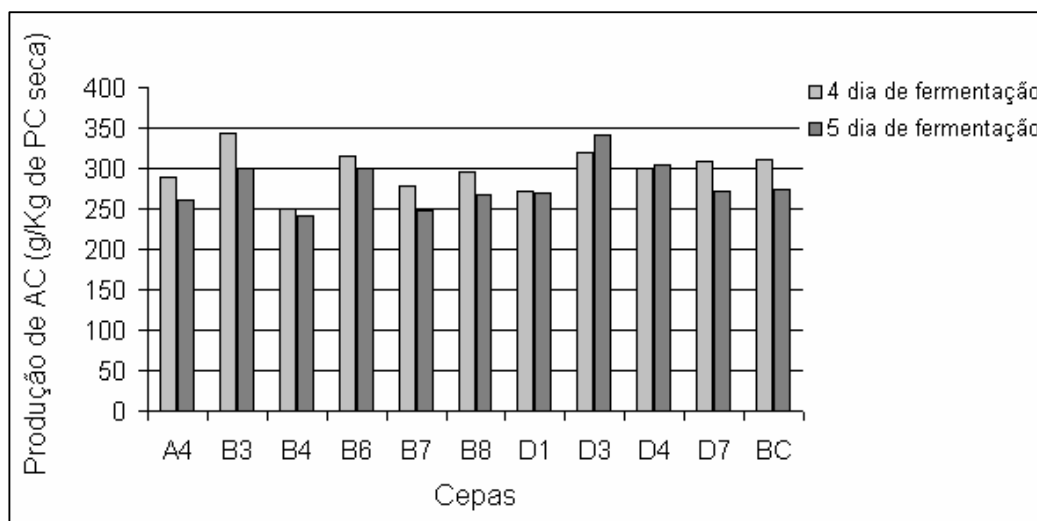
Segundo AZEVEDO (1998), um microrganismo selvagem pode crescer em MC, em que todos os nutrientes lhe são fornecidos, bem como em um MM, onde encontra-se apenas uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, alguns sais minerais e poucos suplementos nutricionais. Um fungo que tenha uma mutação auxotrófica somente poderá crescer em MC, já que não produz todos os nutrientes necessários para a sobrevivência em MM.

Desta forma, como as cepas de *A. niger* sobreviventes a irradiação de UV obtidos neste estudo cresceram também em MM, não devem ser mutantes auxotróficos cuja mutação envolveria a via metabólica de substâncias indispensáveis à sua sobrevivência. Assim podem ter sofrido alguma alteração bioquímica que aumente a produção de metabólitos secundários como o AC.

### 5.3.2. PRODUÇÃO DE AC EM FES COM AS CEPAS MUTANTES

Todas as 11 cepas que apresentaram melhores resultados em meio Foster foram testadas em FES nas condições originais dos estudos com a cepa *A.niger* LPB BC utilizando PC como substrato (item 6.2.3.). Estas cepas foram designadas como *A.niger* LPB A3MC, *A.niger* LPB A4, *A.niger* LPB B3, *A.niger* LPB B4, *A.niger* LPB B6, *A.niger* LPB B7, *A.niger* LPB B8, *A.niger* LPB D1, *A.niger* LPB D3, *A.niger* LPB D4, *A.niger* LPB D7. Os resultados destas fermentações para o 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias estão representados no gráfico da Figura 21.

**FIGURA 21** - FES DAS CEPAS DE *A.niger* OBTIDAS A PARTIR DE IRRADIAÇÃO DE UV SOBRE A CEPA *A.niger* LPB BC.



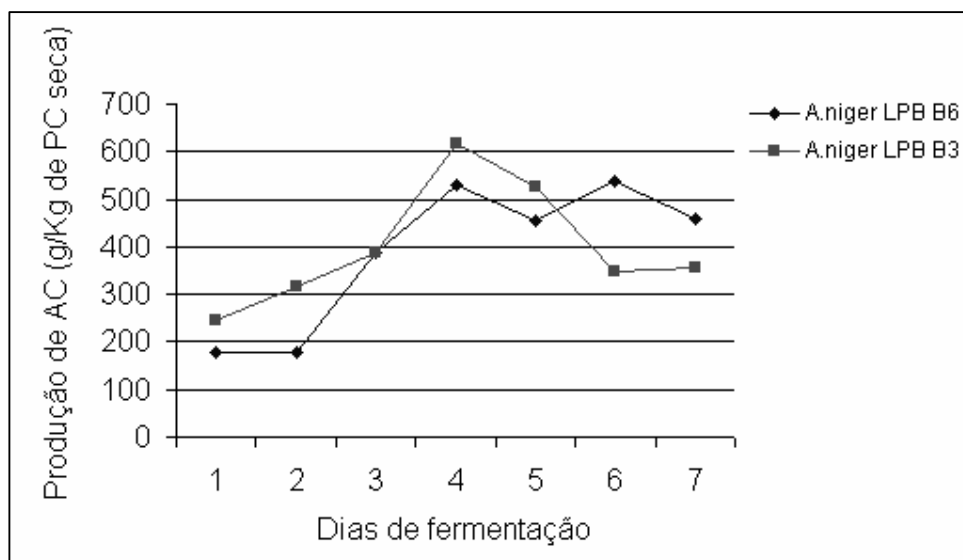
As cinco cepas que apresentaram os melhores resultados de produção de AC quando comparadas a cepa controle *A.niger* LPB BC (LPB B3, LPB B6, LPB B8, LPB D3 e LPB D7) foram novamente submetidas a FES nas mesmas condições anteriores após dois meses de armazenamento em PDA sob refrigeração. Desta forma pode-se testar a possibilidade de mecanismos de reparo reverterem as cepas a sua origem genética. Os resultados de produção de AC no quarto dia de fermentação estão representados na Tabela 28.

**TABELA 28** - PRODUÇÃO DE AC POR FES DAS CINCO CEPAS MUTANTES APÓS DOIS MESES DE CONSERVAÇÃO EM PDA SOB REFRIGERAÇÃO.

Cepas	Produção de AC (g/Kg de PC)
<i>A.niger</i> LPB B3	258,4
<i>A.niger</i> LPB B6	285,9
<i>A.niger</i> LPB B8	238,96
<i>A.niger</i> LPB D3	242,21
<i>A.niger</i> LPB D7	255,3
<i>A.niger</i> LPB BC	298,3

Todas as cepas apresentaram queda na produção de AC após dois meses de ocorrida a mutação. Decidiu-se reservar duas cepas: *A.niger* LPB B3 e *A.niger* LPB B6 que apresentaram os melhores resultados, sendo então realizada cinética de 7 dias nas condições anteriormente otimizadas para a cepa *A.niger* LPB BC (65% de umidade conseguida pela adição de solução de mel de cana a 108 g/L de açúcares totais, metanol a 4%, pH 5,5 e temperatura de 30<sup>0</sup>C) para estas duas cepas. Os resultados podem ser observados no gráfico da Figura 22.

**FIGURA 22** – EVOLUÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE AC POR FES DAS CEPAS *A.niger* LPB B3 E *A.niger* LPB B6.



As duas cepas apresentaram ótimos resultados, se comparadas a cepa BC em condições otimizadas (450 g/Kg de PC), sendo que a *A.niger* LPB B6 propiciou uma produção de 537,6 g de AC/Kg de PC no 6<sup>o</sup> dia de fermentação e a *A.niger* LPB B3 com 616,5 g de AC/Kg de PC no 4<sup>o</sup> dia de fermentação.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados das análises físico-químicas da PC indicaram que esta se apresenta como boa fonte de nitrogênio e carbono para a produção de AC, o que é bastante vantajoso para sua utilização em FES já que a produção do ácido está diretamente relacionada com a disponibilidade de carbono e da relação carbono/nitrogênio no substrato de fermentação. Além disso, a PC utilizada neste estudo é estocada na forma de pellet com umidade menor que 12% e aw de 0,594, inferior ao considerado ideal para desenvolvimento de microrganismos (mínima de 0,7 para fungos, enquanto que para as leveduras o valor situa-se em 0,8 e para as bactérias, 0,9) o que evita contaminações durante o tempo de estocagem.

A comparação entre os métodos de dosagem de carboidratos possibilitou a escolha do método de Somogyi – Nelson como o melhor método a ser utilizado para acompanhamento do consumo de açúcares durante as fermentações com PC. Principalmente por se tratar de método colorimétrico com leitura em espectrofotômetro, o que diminui problemas com erros de leitura quando comparado ao método de Fehling, que é titulométrico e está sujeito a variações nas leituras dos resultados.

Desta forma, a PC apresenta-se como substrato promissor para a produção de AC por FES, pois além de apresentar características físico-químicas favoráveis à sua utilização, é um subproduto da agroindústria brasileira produzido em grande quantidade, já utilizado em ração animal, e que se disposto na natureza poderia causar graves problemas ambientais.

Na seleção da cepa de *A. niger* a ser utilizada, a cepa designada LPB BC apresentou os melhores resultados tanto nos estudos qualitativos em meio Foster (maior relação entre o halo de produção de ácido e o halo do crescimento da colônia: 2,08) quanto em FES para produção de AC utilizando a PC como substrato (383,5 g de AC/Kg de PC seca).

Para uma aplicação direta em nutrição animal ou extração é necessário que sejam produzidas acima de 300 g de AC/kg de matéria seca. Desta forma estes resultados são bastante promissores, pois a cepa *A. niger* LPB BC já apresenta ótimos resultados mesmo antes da otimização dos parâmetros físico-químicos do processo.

Com a otimização dos parâmetros físico-químicos do processo obteve-se um aumento na produção de AC de 17,5%, de 383,5 g de AC/Kg de PC seca para 450 g de AC/Kg de PC seca, o que foi considerado bastante significativo, definindo-se assim como melhor condição o pH de 5,5, 65% de umidade obtida com a adição de solução a 108 g/L de açúcares totais e metanol a 4% durante 4 dias a 30°C. Utilizando as condições otimizadas pode-se fazer uma comparação entre a produção de AC em colunas com aeração forçada e em bandejas perfuradas. Os melhores resultados foram obtidos em bandejas perfuradas com 3 cm de profundidade do meio de fermentação (410 g de AC/Kg de PC seca). Já com a utilização de biorreatores do tipo colunas de vidro (produção de 379,34 g de AC/Kg de PC seca).

Posteriormente foi realizada a mutação induzida por UV da cepa *A. niger* LPB BC como tentativa de obtenção de uma cepa mutante com capacidade produtiva de AC maior que a original, onde obtivemos duas cepas, *A. niger* LPB B3 e *A. niger* LPB B6, que mesmo não mantendo o potencial de produção após dois meses de acondicionamento em meio PDA sob refrigeração, foram escolhidas para realização de cinética de FES utilizando PC como substrato com as condições otimizadas para a cepa de origem *A. niger* LPB BC. Os resultados obtidos foram bastante promissores para ambas as cepas (*A. niger* LPB B3 produção de 537,6 g de AC/Kg de PC no 6<sup>o</sup> dia de fermentação e a *A. niger* LPB B6 com 616,5 g de AC/Kg de PC no 4<sup>o</sup> dia de fermentação) quando comparadas à produção obtida com a cepa original *A. niger* LPB BC que produziu 450g de AC/Kg de PC.

Desta forma espera-se otimizar o processo de FES para estas duas cepas com submetidas a UV a utilização de PC como substrato alternativo de forma a conseguir um produto rico em AC e que possa ser adicionado em ração animal substituindo o AC comercial usualmente utilizado.

Os resultados alcançados durante o desenvolvimento do presente trabalho serão transferidos ao setor produtivo, onde o AC poderá ser produzido em escala industrial. Assim espera-se contribuir para a utilização de resíduos da agroindústria brasileira como produto de valor comercial e minimizar os problemas ambientais causados pela deposição destes resíduos na natureza.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, podem ser sugeridos ainda alguns experimentos a serem desenvolvidos futuramente:

- Otimizar outras condições de fermentação em bandejas perfuradas como a limitação na oxigenação, de forma a obter um produto rico em AC que apresente menor esporulação;
- Analisar a presença e atividade de enzimas que possam estar sendo produzidas juntamente com o AC durante a fermentação;
- Otimizar os parâmetros físico-químicos de fermentação para as duas cepas mutantes obtidas por indução por UV (*A.niger* LPB B3 e *A.niger* LPB B6);
- Testar o substrato fermentado seco como complemento de ração animal, passando assim o processo para escala industrial.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABECITRUS – Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/subprobr.html>>, acessado em Fev. 2006.
- ABOUD-ZEID, A., ASHY, M. A. Production of citric acid: A review. **Agric. Wastes**, 9, 51-76, 1984.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K; WATSON, J.D. **Molecular Biology of the Cell**. 3<sup>a</sup> edição. New York: Garland Publishing. 1994.
- ALCARDE J. C.; VALE F. **Solubilidade de micronutrientes contidos em formulações de fertilizantes, em extratores químicos**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.27 n° 2 . Viçosa mar./abr. 2
- ANDRADE F. V.; MENDONÇA E. S.; ALVAREZ V. H.; NOVAIS R. F. Adição de ácidos orgânicos e húmicos em Latossolos e adsorção de fosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 2003
- AZEVEDO, J.L.; COSTA,S.O.P. **Exercícios Práticos de Genética**. EDUSP. 288p. 1973.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de Microrganismos**. Goiânia, GO. Editora UFG. 478p. 1998.
- AZEVEDO, J. A. M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de isoflavonas bio-ativas (diazéina e genisteína) por fermentação no estado sólido com soja (Glycine max (L.) Merrill). 2004. 38f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.*
- BANWART, G.J. **Microbiologia básica de los alimentos**. Barcelona: Belaterra,1982. 464p.
- BELLON-MARUEL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**. v.38, p.881-896, 2003.
- BOLING-FRANKENBACH, S. D.; SNOW, J. L.; PARSONS, C. M.; BAKER, D. H. The effect of citric acid on the calcium and phosphorus requirements of chicks fed corn-soybean meal diets. **Poultry Science**, v.80, n.6, p.783-788, 2001.
- BRAND, D. **Detoxificação biológica da casca de café por fungos filamentosos em fermentação no estado sólido**. Curitiba, 1999. 99 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, UFPR.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva de mandioca quer ampliar consumo e exportação de fécula**. 08

de agosto de 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 03 out. 2002.

BROOKER, D.B.; BAKKER-ARKEMA, F.W.; HALL, C.W. **Drying and storage of grains and oilseeds**. Westport: The AVI Publishing Company, 1992, 450p

BROS, C.J.; STADLER, D. Mutation. In: **Fungal Genetics: Principles and Practice**. Edited by Cee J. Bos. P13-42. 1996.

CARGILL. Produtos cítricos. **Ácido cítrico anidro**. Uberlândia, 2000. Catálogo de informações do produto.

CASTRO, M.F.P.M., GRAGAGNOLO, N. and VALENTINI, S.R.T. The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. **Brazilian Journal of Microbiology**; Jan. 2002, v. 33, n<sup>o</sup> 1, p. 22-26.

CETESB – Nota técnica sobre tecnologia de controle NT-19- Indústrias de suco cítrico concentrado – 1990.

CETESB – Disponível em [http://www.cetesb.sp.gov.br/Ambiente/produção\\_limpa/documentos.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Ambiente/produção_limpa/documentos.asp) , acessado em Abril, 2006.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. Microflora. In; Christensen, C.M. Storage of cereal grain and their products. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1974, p158-192.

CROLLA, A; KENNEDY, K. J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 1, pg. 27-40, 2001.

DAWSON, M.W., MADDOX, I.S., BROOKS, J.D. Effect of interruption of oxygen supply on citric acid production by *A. niger*. **Enzyme Microbial Technol.**, **8**, 37-40. 1986.

ELLIAH, P., BAPIRAJU, K.V.V.S.N., SUJATHA, P., RAMANA, T., Mutation Induced Enhanced Biosynthesis of Lipase. **African Journal of Biotechnology**. V. 3, n<sup>o</sup> 11, 2004.

FOSTER, J. W. **Chemical Activities of Fungi**. Academic Press, New York, 1949.

GRAF G., **Citric acid prices stable, but trend points up** (2005) (<http://www.purchasing.com/article/CA624878.html>).

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p.209-234, 1995.

HALL, C.W. **Drying and storage of agricultural crops**. Westport: The AVI Publishing Company, 381p, 1980.

HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E. Grape pomace: a novel substrate for microbial production of citric acid. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 253-254, 1985.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. **Utilization of grape pomace for citric acid production by solid state fermentation**. American Journal Enology and Viticulture, v 37, n° 2, 1986.

HAYNES, R.J., Lime and phosphate in the soil-plant system. **Advances in Agronomy**. V. 37, p. 249-315, 1984.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid – state fermentation with fungi. **Applied Microbiol. Biotechnology**. v.64, p.175-186, 2004.

HOSSAIN M, BROOKS J.D., MADDOX I.S., The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*, **Appl. Microbial Biotechnol.** 19,393-397, 1984.

IKENO Y., Y., MASUDA M., TANNO K., OOMORI I., TAKAHASHI N., Citric acid production from various raw materials by yeasts. **J. Fermentation Technol.** 53, pg 752-756, 1975.

IKRAM-UL-HAQ; KHURSHID, S.; ALI, S.; ASHRAF, H.; QADEER, M.A.; RAJOKA, M.I. Mutation of *Aspergillus niger* for hyperproduction of citric acid from black strap molasses. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 35-37, 2001.

KAPOOR, K. K., CHAUDHARY, K., TAURO, P. Citric acid. In Reed, G. (Ed.) **Prescott e Dunn s Industrial Microbiology** 4<sup>th</sup>. Ed. A VI Publishing Co. Inc., Westport, Conn, 1982.

KOLICHESKI, M. B. **Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido utilizando como substrato Bagaço de Mandioca**. Curitiba, 1995. 137 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, UFPR.

KOTWAL, S.M. et al. Production of  $\alpha$ -galactosidase by thermophilic fungus *Humicola sp.* In solid-state fermentation its application in soyamilk hydrolysis. **Process Biochemistry**. V. 33, p. 337-343, 1998.

KUBICEK, C. P.; RÖHR, M. Citric acid fermentation. **CRC - Critical Reviews in Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 331-373, 1986.

KUMAR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 00, p. 1-8, 2002 (in press).

LIMA, V. L. A. G.; STAMFORD, T. L. M.; SALGUEIRO, A. A. **Citric acid production from pineapple waste by solid state fermentation using *Aspergillus niger***. Brazilian Archives of Biology and Technology, 38: 773-783, set. 1995.

LU, M.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 392-397, 1997.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NETO F. V. R.B.; GREGH S. L. A. Análise em microscopia eletrônica de varredura de superfícies radiculares antes e após raspagem e condicionamento com ácido cítrico e EDTA: um estudo "in vitro". **Journal of Applied Oral Science**. Vol.11, nº 1, Bauru Jan./Mar, 2003

NOTHENBERG, M. Novos mercados reativam a produção. **Química e derivados**, São Paulo, n. 205, p. 38-43, out. 1983.

OOJKAAS, F. et al. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **TBITECH**, v.18, p356-359, 2000

PANDEY et al. Biotechnological potential of agro-residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGUE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**. V. 74, p. 81-87, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; NIGAM, P.: **Production of organic acids by solid state fermentation. In: *Solid-state fermentation in biotechnology – fundamentals and applications***. Asistech Publishers, Inc.: New Delli , pp. 113-126, 2001.

PAPAGIANNI M., MATTEY M., KRISTIANSEN B., The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture, **Enz. Microbial Technol.** 25, 710-717, 1999.

PASSAGLIA, L.M.P. Mutação, mecanismos de reparo do DNA e recombinação. In: Zaha, A., coordenador. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre. Mercado Aberto; p 116-55, 1996.

PAZOUKI, M.; FELSE, P. A.; SINHA, J.; PANDA, T. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 353-361, 2000.

PINTADO, J.; LONSANE, B. K.; GAIME-PERRAUD, I.; ROUSSOS, S. On-line monitoring of citric acid production in solid-state culture by respirometry. **Process Biochemistry** vol. 33. n<sup>o</sup> 5. pp. 513-518, 1998.

PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; PEREIRA, J.O & AZEVEDO, J.L. **Genética de Fungos no Laboratório**. Série Fundamentos de Biotecnologia. Editora da Universidade de Manaus. 138p. 1998.

PRADO, F. C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. Curitiba, 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, UFPR.

RAIMBAULT, M. General and microbial aspects of solid state fermentation. In- **International training Course on Solid State Fermentation**, FMS 97, 6-10 OCTOBRE, Curitiba, Brasil, Documento ORSTOM, Montpellier, França, 1997.

ROCHA R. A.; MUCCILLO E. N. S. Efeito da temperatura de calcinação e do teor de dopante nas propriedades físicas da céria-gadolínia preparada pela complexação de cátions com ácido cítrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Cerâmica vol.47 n<sup>o</sup> 304 São Paulo Oct./Nov./Dec. 2001.

RÖHR, M.; KUBICEK, C.P.; KOMINEK, J. **Citric acid**. In: **Biotechnology**. 3, G. Reed and H. J. Rehm Eds. Verlag Chemie, Weiheim (1983) pp.419-454.

ROUKAS T., Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation, **Enz. Technol.** 24, 54-59, 1999.

SANKPAL, N. V.; JOSHI,A.P.; KULKARNI, B.D. Nitrogen-dependent regulation of gluconic and/or citric acid production by *Aspergillus niger*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 51-55, 2000.

SANKPAL, N. V.; JOSHI,A.P.; KULKARNI, B.D. Citric acid production by *Aspergillus niger* on cellulose microfibrils: influence of morphology and fermenter conditions on productivity. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1129-1139, 2001.

Secretaria de Estado da Saúde. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 523p, 1985.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., **Controle du Métabolisme de *Shwanniomyces castelli* cultivé sur support solide**. Tese de doutorado, Université Montpellier II, Montpellier, França, 212p. 1991.

Secex. **Secretaria de Comércio Exterior**: Disponível em:  
[http://www.uniaofarelos.com.br/polpa\\_citrica.html](http://www.uniaofarelos.com.br/polpa_citrica.html) e  
<http://www.masiram.com.br/Produtos/citropelet.htm> > Acesso em: 14/02/2006.

SHANKARANAND, V.S.; LONSANE, B.K. Sugarcane-pressmud as a novel substrate for production of citric acid by solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 165-168, 1994.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e Basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus***. Tese (Prof. Titular) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994. 228 p.

SOCCOL, C. R. Biotechnological products from cassava roots by solid-state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55, p. 358-364, 1996a

SOCCOL, C. R. Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido. Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Engenharia Química, 1996. **Livro de resumos**. Lavras, MG. 1996b.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; LEBEAULT, J. M. **Processo de produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando o fungo *A. niger***. Pt. Br. DEINPI/PR 00175, 1999.

SOCCOL, C. R. **Developpement de biprocedes pour la valorization post-recolt de produits et sous produits agricoles tropicaux**. Memoire Université de Provence. Marseille, 2001. 59 p.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, 2002.

SOCCOL, C.R.; PRADO, F.C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation**. In: Encyclopeida on Bioresource Technology. New York: Haworth Press, 2002.

SOCCOL, C. R., PRADO, F. C., VANDENBERGHE, L. P. S., PANDEY, A. **General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation**. In: Encyclopedia on Bioresource Technology. New York: Haworth Press, pp.652-664, 2003.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v.13, p.205-218, 2003.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SPOSITO, G. The chemistry of soils. New York, Oxford University, 277 p., 1989.

STRAYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. RJ: Guanabara Koogan, 1996.

SUGIURA, S. H.; DONG, F. M.; HARDY, R. W. Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observation. **Aquaculture**, v.160, p.283-303, 1998.

TIMEIS - Technology innovation management and entrepreneurship information service. **Citric acid**. Índia, 2000. Disponível em: <<http://www.technopreneur.net/timeis/index.htm>> Acesso em: 18 out. 2000.

TRAN, C.T.; SLY, L.I.; MITCHELL, D.A. Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 399-404, 1998.

TSILOYIANNIS, V. K.; KYRIAKIS, S. C.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. **Research in Veterinary Science**, v.70, p.287-293, 2001.

União Farelos - Disponível em: <[http://www.uniaofarelos.com.br/polpa\\_citrica.html](http://www.uniaofarelos.com.br/polpa_citrica.html)> Acesso em: 28 mar. 2005.

UCSF – University of California, San Francisco. Department of Laboratory Medicine. **Morphology of Medically Important Fungi**, San Francisco, 2000. Disponível em: [http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org/Education/fung\\_morph/homepage1.html](http://pangloss.ucsfmedicalcenter.org/Education/fung_morph/homepage1.html) Acesso em: 18 dez. 2004

VANDENBERGUE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A; LEBEAULT, J. M. **Review: microbial production of citric acid**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 42, n. 3, p. 263-276, 1999.

VANDENBERGHE, L. **Développement d'un Procédé pour la Production d'Acide Citrique par Fermentation en Milieu Solide à partir de Résidus de l'Agro-industrie du Manioc**. Tese de doutorado, Université de Technologie de Compiègne, 205 p., 2000.

VANDENBERGHE, L. P. S; SOCCOL, C. R; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 175-178, 2000a.

VILAS-BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES LIMA, E.A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. 35(4): 749-761. 1992.

YOKOYA, F. **Fermentação cítrica**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “ André Tosello”, 79 p., 1992.

XU D.-B., MADRID C.P., ROHR M., KUBICEK C.P., The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 30, 553-558, 1989.

ZAHA, A. **Biología Molecular Básica**. Cap. 6 . Porto Alegre: Mercado Aberto, 336 p, 1996.