

FLÁVERA CAMARGO PRADO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO EM ESCALA SEMPILOTO
PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO NO
ESTADO SÓLIDO A PARTIR DO BAGAÇO DE MANDIOCA**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de
Alimentos, Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-orientadora: Profª Dra. Luciana P. S.
Vandenberghe.**

**CURITIBA
2002**

BC / MUFPR
DOAÇÃO: DO AUTOR
R\$ 1000
10/02/2003

BC/MUFPR - BIBLIOTECA DE DOCUMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
AUTOR
R\$ 10 00 - Doação
Termo No 30/03 Registro 337,295
24/02/2003

PRO0035454-4

UFPR - Sistema de Bibliotecas

Prado, Flávera Camargo

**Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca / Flávera Camargo Prado — Curitiba, 2002
xiii, 81 f grafs , tabs**

**Orientador Carlos Ricardo Soccol, Luciana P S Vandenberghe
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia**

**1 Ácido cítrico – Produção 2 Mandioca – Fermentação I
Soccol, Carlos Ricardo II Vandenberghe, Luciana P S III Título**

CDD 20 664 024

FLÁVERA CAMARGO PRADO

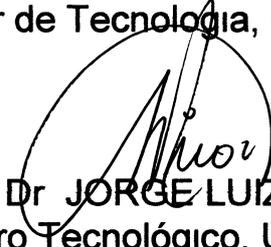
DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO EM ESCALA SEMI-PILOTO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO A PARTIR DO BAGAÇO DE MANDIOCA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores

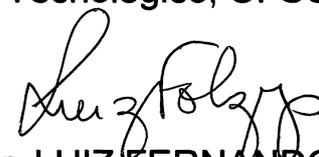
Orientador



Prof Dr CARLOS RICARDO SOCCOL
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof Dr JORGE LUIZ NINOW
Centro Tecnológico, UFSC



Prof Dr LUIZ FERNANDO DE LIMA LUZ JÚNIOR
Setor de Tecnologia, UFPR



Profª Drª LUCIANA L P DE S VANDENBERGHE
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 19 de Dezembro de 2002

*Ao Marinho,
com todo meu amor*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Ricardo Soccol que, além da orientação e constante incentivo na execução deste trabalho, foi o grande instigador da minha iniciação na Biotecnologia

À Professora Luciana Vandenberghe pela co-orientação e pronta-dedicação nos momentos de maior dificuldade

À CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o período de mestrado

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, representado pelos professores e funcionários responsáveis pelo bom andamento do curso

À Mitiyo e aos estagiários Cléo e Camila, pelo apoio e auxílio prestados durante os trabalhos realizados em laboratório

Aos amigos e colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, com os quais acabei dividindo a maior parte do meu tempo e que sempre mostraram receptivos e dispostos a ouvir, sugerir e ajudar, a todos meus sinceros agradecimentos

Aos meus pais que sempre me incentivaram e apoiaram na realização de todos os meus objetivos

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE TABELAS | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE SÍMBOLOS | x |
| LISTA DE ABREVIÇÕES | xi |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2 1 ACIDO CITRICO | 3 |
| 2 1 1 Historico | 4 |
| 2 1 2 Produção mundial de acido citrico | 5 |
| 2 1 3 Aplicações do acido citrico | 5 |
| 2 1 4 Obtenção do acido citrico | 6 |
| 2 1 5 Bioquímica da síntese do acido citrico pelo <i>Aspergillus niger</i> | 7 |
| 2 1 6 Rendimento teorico do acido citrico | 9 |
| 2 2 FERMENTAÇÃO CITRICA INDUSTRIAL | 10 |
| 2 2 1 Processo submerso | 10 |
| 2 2 2 Processo de superfície | 11 |
| 2 2 3 Processo em estado solido | 12 |
| 2 2 3 1 <i>Vantagens e desvantagens da FES</i> | 13 |
| 2 2 3 2 <i>Substratos utilizados na FES</i> | 14 |
| 2 2 4 Fatores que influenciam a produção de acido citrico | 15 |
| 2 2 4 1 <i>Fonte de carbono</i> | 15 |
| 2 2 4 2 <i>Fonte de nitrogênio</i> | 16 |
| 2 2 4 3 <i>Fonte de fosforo</i> | 17 |
| 2 2 4 4 <i>Elementos traços</i> | 18 |
| 2 2 4 5 <i>Álcoois inferiores</i> | 18 |
| 2 2 4 6 <i>Outras substâncias</i> | 19 |
| 2 2 4 7 <i>pH</i> | 20 |
| 2 2 4 8 <i>Temperatura</i> | 21 |
| 2 2 4 9 <i>Aeração</i> | 21 |
| 2 2 5 Microrganismos produtores de acido citrico | 22 |
| 2 3 RECUPERAÇÃO DO ACIDO CITRICO | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 2 4 ORIGEM E CARACTERISTICAS DO SUBSTRATO | 28 |
| 2 4 1 Mandioca | 28 |
| 2 4 2 Industrialização da mandioca | 30 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 3 1 MICRORGANISMO | 34 |
| 3 1 1 Manutenção da cepa | 34 |
| 3 1 2 Produção de esporos | 34 |
| 3 1 3 Recuperação de esporos | 35 |
| 3 1 4 Contagem de esporos | 35 |
| 3 2 SUBSTRATO | 36 |
| 3 2 1 Pre-tratamento mecânico do bagaço de mandioca | 36 |
| 3 2 2 Caracterização físico-química do bagaço de mandioca | 36 |
| 3 2 3 Pre-tratamento termico do bagaço de mandioca | 37 |
| 3 2 4 Homogeneização do substrato | 37 |
| 3 3 SOLUÇÃO SALINA | 37 |
| 3 4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SOLIDO | 38 |
| 3 4 1 Aeração por difusão | 38 |
| 3 4 1 1 <i>Fermentação em frascos Erlenmeyer</i> | 38 |
| 3 4 1 2 <i>Fermentação em bandejas</i> | 39 |
| 3 4 2 Aeração por convecção | 40 |
| 3 4 2 1 <i>Fermentação em biorreator tipo tambor horizontal</i> | 40 |
| 3 4 2 2 <i>Descrição e funcionamento do biorreator tipo tambor horizontal</i> | 41 |
| 3 5 ANALISE RESPIROMETRICA | 42 |
| 3 5 1 Cromatografia gasosa | 42 |
| 3 5 2 Analise respirometrica | 43 |
| 3 6 ANALISE DO SUBSTRATO FERMENTADO | 44 |
| 3 6 1 Umidade | 46 |
| 3 6 2 pH | 46 |
| 3 6 3 Proteinas | 46 |
| 3 6 4 Acido citrico | 47 |
| 3 6 5 Amido residual | 47 |
| 3 6 6 Açucares redutores | 48 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 4 1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO | 49 |
| 4 2 ENSAIOS EM FRASCOS ERLLENMEYER | 50 |
| 4 3 ENSAIOS EM BIORREATOR TIPO BANDEJA | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 4 4 ENSAIOS EM BIORREATOR TIPO TAMBOR HORIZONTAL | 53 |
| 4 5 COMPARAÇÃO ENTRE BANDEJA E TAMBOR HORIZONTAL | 54 |
| 4 6 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO | 56 |
| 4 6 1 Evolução dos parâmetros da fermentação | 56 |
| 4 6 2 Análise respirométrica | 57 |
| 4 6 3 Cálculo do rendimento | 66 |
| 5 CONCLUSÕES | 70 |
| 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 72 |
| REFERÊNCIAS | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 1 | - PROPRIEDADES FISICO-QUIMICAS DO ACIDO CITRICO ANIDRO E MONOIDRATADO | 3 |
| TABELA 2 | - QUANTIDADE DE ACIDO CITRICO ENCONTRADO EM ALGUNS FRUTOS | 4 |
| TABELA 3 | - APLICAÇÕES DO ACIDO CITRICO EM PROCESSOS INDUSTRIAIS | 7 |
| TABELA 4 | - PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO POR FES UTILIZANDO VARIOS TIPOS DE SUBSTRATOS | 14 |
| TABELA 5 | - PRINCIPAIS FATORES QUIMICOS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO | 15 |
| TABELA 6 | - COMPOSIÇÃO FISICO-QUIMICA DO BAGAÇO DE MANDIOCA SEGUNDO ALGUNS AUTORES | 33 |
| TABELA 7 | - TEMPO DE RETENÇÃO DE ALGUNS GASES SEPARADOS PELA COLUNA ALLTECH | 43 |
| TABELA 8 | - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO BAGAÇO DE MANDIOCA PARCIALMENTE SECO | 49 |
| TABELA 9 | - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO EM BIORREATORES TIPO BANDEJA E TAMBOR HORIZONTAL | 55 |
| TABELA 10 | - PARÂMETROS DA PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO POR FES DO BAGAÇO DE MANDIOCA PELO <i>A niger</i> | 56 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| FIGURA 1 | - FORMULA ESTRUTURAL DO ACIDO CITRICO | 3 |
| FIGURA 2 | - DISTRIBUIÇÃO DO CONSUMO DE ACIDO CITRICO | 6 |
| FIGURA 3 | - ESQUEMA GERAL DA BIOSINTESE DO ACIDO CITRICO A PARTIR DA GLICOSE | 8 |
| FIGURA 4 | - CULTURA DE <i>Aspergillus niger</i> | 23 |
| FIGURA 5 | - COLÔNIA TÍPICA DE <i>Aspergillus niger</i> | 24 |
| FIGURA 6 | - ESQUEMA DO METODO DE RECUPERAÇÃO DO ACIDO CITRICO POR PRECIPITAÇÃO | 26 |
| FIGURA 7 | - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANDIOCA EM RAIZ NOS PRINCIPAIS PAISES PRODUTORES | 29 |
| FIGURA 8 | - PRINCIPAIS PRODUTORES NACIONAIS DE MANDIOCA NA SAFRA 2000/2001 | 30 |
| FIGURA 9 | - ETAPAS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA MANDIOCA PARA OBTENÇÃO DE FECULA | 32 |
| FIGURA 10 | - <i>Aspergillus niger</i> LPB 21 | 34 |
| FIGURA 11 | - BAGAÇO DE MANDIOCA COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS | 36 |
| FIGURA 12 | - FES EM FRASCO ERLNMEYER | 38 |
| FIGURA 13 | - FES EM BANDEJAS COM 2, 4 E 6 CM DE ESPESSURA DE SUBSTRATO | 39 |
| FIGURA 14 | - BIORREATOR TIPO TAMBOR HORIZONTAL | 40 |
| FIGURA 15 | - ESQUEMA DO BIORREATOR TH E DISPOSITIVOS DE ANALISE DE GASES | 42 |
| FIGURA 16 | - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANALISE DO SUBSTRATO | 45 |
| FIGURA 17 | - PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO EM FRASCOS ERLNMEYER USANDO DIFERENTES PORCENTAGENS DE BAGAÇO DE MANDIOCA TERMICAMENTE TRATADO | 50 |
| FIGURA 18 | - PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO EM BANDEJAS COM 2, 4 E 6 CM DE ESPESSURA DO SUBSTRATO USANDO DIFERENTES PORCENTAGENS DE BAGAÇO DE MANDIOCA TERMICAMENTE TRATADO | 52 |
| FIGURA 19 | - PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO EM TAMBOR HORIZONTAL USANDO DIFERENTES PORCENTAGENS DE BAGAÇO DE MANDIOCA TERMICAMENTE TRATADO | 54 |
| FIGURA 20 | - EVOLUÇÃO DO PH E DA CONCENTRAÇÃO DE ACIDO CITRICO NO DECORRER DA FERMENTAÇÃO | 57 |
| FIGURA 21 | - EVOLUÇÃO DOS TEORES DE AMIDO E AÇUCARES REDUTORES NO DECORRER DA FERMENTAÇÃO | 58 |

- FIGURA 22 - PERFIL CINÉTICO DO CONSUMO DE O₂ E DA PRODUÇÃO DE CO₂ DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO** 60
- FIGURA 23 - COMPARAÇÃO ENTRE BIOMASSA FUNGICA ESTIMADA E MEDIDA DURANTE A FERMENTAÇÃO DO BAGAÇO DE MANDIOCA PELO *A niger*** 64
- FIGURA 24 - EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DA PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO POR FES DO BAGAÇO DE MANDIOCA** 65
- FIGURA 25 - COEFICIENTE RESPIROMETRICO DO *A niger* DURANTE O PROCESSO DE FES DO BAGAÇO DE MANDIOCA** 66

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------------|---|
| $\%CO_{2S}$ | porcentagem de CO_2 na saída do biorreator |
| $\%MSI$ | porcentagem de matéria seca inicial |
| $\%O_{2S}$ | porcentagem de O_2 na saída do biorreator |
| Δt | intervalo de tempo considerado |
| ΔX | biomassa sintetizada durante o intervalo de tempo considerado |
| μ_{max} | velocidade específica de crescimento máximo |
| <i>A</i> | <i>Aspergillus</i> |
| <i>C</i> | concentração de ácido cítrico dosado pelo CLAE |
| <i>C</i> | <i>Candida</i> |
| <i>F</i> | fator de diluição |
| F_E | fluxo de ar na entrada do fermentador |
| F_S | fluxo de ar na saída do fermentador |
| <i>M</i> | porcentagem de matéria seca |
| m_X | coeficiente de manutenção da biomassa celular |
| <i>N</i> | número de esporos por ml de suspensão |
| n_e | número total de esporos contados |
| n_r | número de retículos contados |
| <i>P</i> | <i>Penicillium</i> |
| R_{O_2CONS} | O_2 consumido em um intervalo de tempo Δt |
| R_{O_2SINT} | O_2 empregado na síntese da biomassa celular |
| R_{O_2ENDOG} | O_2 empregado no processo endógeno |
| <i>V</i> | volume de água utilizada na extração dos esporos |
| <i>v/v</i> | volume por volume |
| V_{CO_2S} | volume de CO_2 na saída do biorreator |
| V_{N_2E} | volume de N_2 na entrada do biorreator |
| V_{N_2S} | volume de N_2 na saída do biorreator |

| | |
|---------------|--|
| V_{O_2CONS} | volume de O ₂ consumido |
| V_{O_2S} | volume de O ₂ na saída do biorreator |
| V_r | volume do retículo |
| X | biomassa celular em um tempo t |
| X_n | biomassa celular em um tempo qualquer |
| X_0 | biomassa celular no início do intervalo de tempo Δt |
| $Y_{X/O}$ | rendimento baseado no consumo de O ₂ para síntese da biomassa celular |
| Y | rendimento prático |
| Y_G | rendimento global |

LISTA DE ABREVIACÕES

| | |
|------|--|
| AC | ácido cítrico |
| BM | bagaço de mandioca |
| BMS | bagaço de mandioca seco |
| CB | “cassava bagasse” |
| CLAE | cromatógrafo líquido de alta eficiência |
| FES | fermentação no estado sólido |
| LPB | laboratório de processos biotecnológicos |
| OUR | taxa de consumo de oxigênio |
| QR | quociente respirométrico |
| SSF | “solid-state fermentation” |
| TH | tambor horizontal |

RESUMO

Entre os ácidos orgânicos produzidos industrialmente, o ácido cítrico é o mais importante do ponto de vista quantitativo com uma produção anual de cerca de um milhão de toneladas. A fermentação no estado sólido (FES) tem sido apontada como um método alternativo para a produção do ácido cítrico usando resíduos agroindustriais. O Brasil ocupa o segundo lugar entre os maiores produtores mundiais de mandioca com 23 milhões de toneladas. O bagaço de mandioca (BM) é o resíduo sólido gerado em grandes quantidades no processo de extração de amido. O uso do BM como substrato em FES pode evitar problemas ambientais causados pela disposição final deste resíduo na natureza. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar a influência de diferentes porcentagens de bagaço termicamente tratado e, conseqüentemente, a influência do grau de gelatinização do amido presente no BM, na produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido, em biorreator tipo bandeja e biorreator tipo tambor horizontal. A maior produção de ácido cítrico (269 g/kg de BM seco) foi obtida em biorreator tipo tambor horizontal usando 100% de BM tratado, porém, o biorreator tipo bandeja apresentou vantagens e boas perspectivas para produção de ácido cítrico em grande escala.

Palavras-chave ácido cítrico, bagaço de mandioca, amido gelatinizado, fermentação no estado sólido, biorreatores

ABSTRACT

Among the organic acids industrially produced, citric acid is the most important in quantitative terms with an estimated annual production of about 1000,000 tons. Solid-state fermentation (SSF) has been an alternative method for citric acid production using agro-industrial residues. Brazil occupies the second place in the world ranking of production with 23 million tons of cassava. Cassava industrialization produces great quantities of cassava bagasse (CB), a solid residue generated in the starch extraction process. The use of this residue as substrate can avoid environmental problems caused by its disposal in the environment. This study was developed to verify the influence of the different treated bagasse amount and, consequently, the influence of the gelatinization degree of CB's starch on citric acid production by SSF in horizontal drum and tray bioreactors. Best results (269 g/kg of dry CB) were obtained in horizontal drum bioreactor using 100% of gelatinized CB, but tray-type bioreactor has showed advantages and good perspectives for large-scale citric acid production.

Key words citric acid, cassava bagasse, gelatinized starch, solid-state fermentation, bioreactors

1 INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um dos produtos de fermentação mais produzidos do mundo, principalmente por fermentação submersa de meios a base de sacarose ou amido, usando o fungo filamentosso *Aspergillus niger*, embora processos utilizando leveduras também sejam conhecidos. 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.

Consideráveis quantidades de ácido cítrico são necessárias em muitos processos industriais (JIANLONG, 2000). Este ácido orgânico é intensamente utilizado na indústria alimentícia além de encontrar várias outras aplicações. Atualmente sua produção mundial está em torno de 1 000 000 de toneladas/ano (SOCCOL *et al*, 2002). A maior parte do ácido cítrico consumido no Brasil é importada e sua demanda está aumentando continuamente, o que mostra a necessidade das indústrias buscarem novas alternativas em tecnologias e redução do custo da produção (VANDENBERGHE, 2000, VANDENBERGHE *et al*, 2000b).

Os resíduos de processos agrícolas, como é o caso do bagaço de mandioca que é gerado em abundância no Estado do Paraná, causam graves problemas ambientais quando dispostos na natureza (KOLICHESKI, 1995, SOCCOL, 1996a, PANDEY *et al*, 2000, VANDENBERGHE, 2000). O uso do bagaço de mandioca como suporte na FES, para fixar as células dos microrganismos, é economicamente importante do ponto de vista ambiental, pois é uma alternativa biotecnológica para a valorização dos resíduos sólidos da industrialização da mandioca (SOCCOL, 2001). Há uma grande viabilidade na produção de ácido cítrico utilizando como substrato o bagaço de mandioca que contém alta concentração de amido. Algumas cepas de *Aspergillus niger* contêm enzimas capazes de hidrolisar o amido e converter a glicose em ácidos orgânicos. A gelatinização do amido presente no substrato, feito por meio de tratamento térmico, facilita o ataque do mesmo pelo fungo.

No laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná já foram desenvolvidos vários processos alternativos para a produção de ácido cítrico produzido por FES a partir de bagaço de mandioca em escala laboratorial.

(KOLICHESKI, 1995, SOCCOL, VANDENBERGHE e LEBEAULT, 1999, VANDENBERGHE, 2000) Porém, existe a necessidade de testar a produção de AC em maior escala

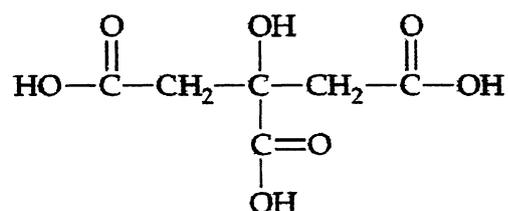
O principal objetivo desse trabalho é desenvolver um bioprocesso para produzir o ácido cítrico em escala semipiloto, por fermentação no estado sólido do bagaço de mandioca que será usado como substrato/suporte, validando assim diferentes modelos de biorreatores Para isto, serão utilizados um reator tipo bandeja e um reator tipo tambor horizontal Nestes dois biorreatores será testada a influência de diferentes porcentagens de bagaço de mandioca tratado termicamente na produção de ácido cítrico Por fim, será feito um estudo cinético nas condições de maior produção do metabólito

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÁCIDO CÍTRICO

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, ácido β-hidroxi-tricarboxílico) apresenta-se na forma de cristais translúcidos brancos, possui sabor ácido, não possui odor e é levemente higroscópico (CARGILL, 2000) Sua fórmula estrutural é mostrada na figura 1

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO CÍTRICO



FONTE McMURRY e CASTELLION, 1999

A tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas das duas formas comerciais de ácido cítrico, o anidro e o monoidratado

TABELA 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÁCIDO CÍTRICO ANIDRO E MONOIDRATADO

| Propriedade | Ácido cítrico anidro | Ácido cítrico monoidratado |
|------------------------|--|---|
| Formula molecular | C ₆ H ₈ O ₇ | C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O |
| Peso molecular (g/mol) | 192,13 | 210,13 |
| Ponto de fusão (° C) | 153 | 100 |
| Densidade específica | 1,665 | 1,542 |
| Teor de água (%) | < 0,5 | 8,6 ± 0,2 |
| pH de uma solução a 1% | 2,2 | 2,3 |

FONTE BLAIR e ZIENTY, 1979, VANDENBERGHE, 2000

O AC 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 (BENDER, 1982, ABOU-ZEID e ASHY, 1984)

Normalmente o AC está relacionado a frutos cítricos, principalmente limões, constituindo 5% do fruto ou 9% do suco, porém é encontrado também em frutos não cítricos, em quantidades consideráveis, como pode ser constatado na tabela 2 (BLAIR e ZIENTY, 1979)

O AC é o ácido orgânico cristalino mais utilizado na indústria de alimentos. Algumas características como alta solubilidade, sabor azedo, acidez e capacidade tamponante tornam os produtos cítricos bem adaptáveis em alimentos. Além disso, seus grupos carboxílicos e hidroxílico permitem a formação de uma grande variedade de moléculas complexas e reagentes de interesse comercial (BLAIR e ZIENTY, 1979)

TABELA 2 – QUANTIDADE DE ÁCIDO CÍTRICO ENCONTRADO EM ALGUNS FRUTOS

| Fruto | Quantidade de AC (mg/100ml) |
|-----------|-----------------------------|
| Lima | 7000 |
| Limão | 5630 |
| Framboesa | 2480 |
| Groselha | 1170 |
| Tomate | 1018 |
| Abacaxi | 605 |
| Morango | 580 |

FONTE: BLAIR e ZIENTY, 1979

2.1.1 Histórico

O AC foi isolado pela primeira vez do suco de limão por Scheele em 1784. Porém, a estrutura do AC só foi descoberta por Liebig em 1838 (BLAIR e ZIENTY, 1979). O acúmulo de AC por alguns fungos foi reconhecido há pouco mais de cem anos quando Wehmer, em 1893, descobriu que o *Cytromices* (hoje identificado como *Penicillium* sp.) e o *Mucor* possuíam a capacidade de acumular este ácido durante o seu cultivo. Wehmer conhecia a potencialidade do processo fermentativo, porém, sua

transferência para escala industrial não teve êxito devido à contaminação e ao longo tempo de fermentação (YOKOYA, 1992)

Em 1917 Currie realizou um aprofundado estudo das condições de produção do ácido cítrico e já em 1919 surgiu a primeira planta para a produção deste ácido na Bélgica. Nesta época a produção mundial de ácido cítrico era cerca de 10 000 t / ano produzidos principalmente a partir de frutas cítricas sendo a Itália o maior produtor. 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)

2.1.2 Produção mundial de ácido cítrico

A produção mundial de AC passou de 300 000 t no início da década de 90 (MEERS e MILSON, 1991) para 840 000 t em 2000 (PANDEY *et al.*, 2001). Atualmente a produção mundial está em torno de 1 000 000 de toneladas/ano (SOCCOL *et al.*, 2002)

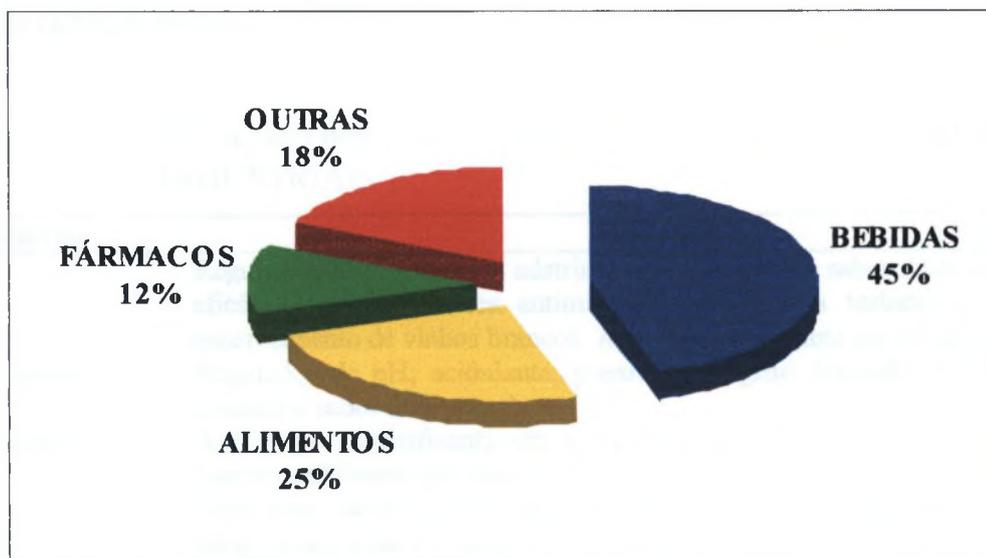
Quantidades consideráveis de AC são utilizadas em muitos processos industriais de grande escala. No Brasil, a maior parte do AC consumido é importada. Além disso, existe um aumento anual constante do consumo mundial (7%) o que mostra a necessidade das indústrias buscarem novas alternativas em tecnologias e na redução dos custos de produção do AC (VANDENBERGHE, 2000, JIANLONG, 2000)

2.1.3 Aplicações do ácido cítrico

Dos acidulantes utilizados nas indústrias de alimentos e bebidas, o AC é o mais consumido. Como pode ser observado na figura 2, estes dois setores representam 60% do consumo total. O AC 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). O AC atua como acidulante, antioxidante, aromatizante e dispersante nas indústrias de bebidas, sorvetes, sucos de frutas, geléias,

compotas, frutas e vegetais enlatados, queijos, balas, caramelos e gomas de mascar (KOLICHESKI, 1995).

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO DO CONSUMO DE ÁCIDO CÍTRICO



FONTE: PANDEY *et al.*, 2001; JEBSEN & JESSEN, 2002.

A tabela 3 mostra que o AC é ainda aplicado em grande quantidade de outros processos industriais. Muitos desses empregos têm origem no centenário “poder de limpeza” do limão que, associado ao sal de cozinha, era utilizado na limpeza de tachos de cobre, limas e na remoção de manchas de ferrugem em roupas (NOTHENBERG, 1983).

2.1.4 Obtenção do ácido cítrico

Há três diferentes processos para obtenção do 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. 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 fermentativo de produção do AC pode ser dividido basicamente em três fases: preparação e inoculação do substrato, fermentação e recuperação do produto. 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 microorganismo empregado (KOLICHESKI, 1995).

TABELA 3 – APLICAÇÕES DO ÁCIDO CÍTRICO EM PROCESSOS INDUSTRIAIS

| Indústria | Aplicações |
|------------------------|---|
| Bebidas | Regulador do pH, fornece adstringência e acentua o sabor de frutas, aumenta a eficácia de conservantes antimicrobianos. Evita a turbidez de vinhos e o escurecimento de vinhos brancos. Age como acidulante em refrigerantes. |
| Geleias e conservas | Regulador de pH, acidulante, possibilita o grau desejado de adstringência e acentua o sabor de frutas. |
| Produtos lácteos | Age como emulsificante em sorvetes e queijos processados, antioxidante e agente acidificante em queijos. |
| Balas | Atua como acidulante, produz sabor adstringente, confere firmeza às cores de balas duras, evita a cristalização da sacarose. |
| Farmacos | Atua em efervescentes em pó e tabletes quando combinado com bicarbonatos. Age como anticoagulante, facilita a dissolução de compostos ativos, e como acidulante em formulações adstringentes. |
| Cosméticos | Agente tamponante, regulador de pH e antioxidante como quelante de íons metálicos. |
| Limpeza de metais | Remove os óxidos de superfícies ferrosas e não-ferrosas, remove incrustações de caldeiras e tubulações. |
| Detergentes | Adjunto tensoativo, substitui os fosfatos em detergentes biodegradáveis. |
| Tintas e pigmentos | Como dispersante, reduz a viscosidade das lamas e retarda a decantação de pigmentos. |
| Concreto e refratários | Como retardante de pega e como ligante para cimentos refratários. |
| Têxteis | Agente tamponante na formulação de resinas empregadas em alguns tipos de tecidos, como quelante no tingimento de poliésteres e carpetes de nylon e polipropileno. |
| Adesivos | Como retardante de solidificação ou como endurecedor, dependendo da formulação. |
| Agricultura | Pela propriedade quelante, age como transportador de micronutrientes. Como solubilizante de fosfatos, facilita a absorção do fósforo pelas plantas. |

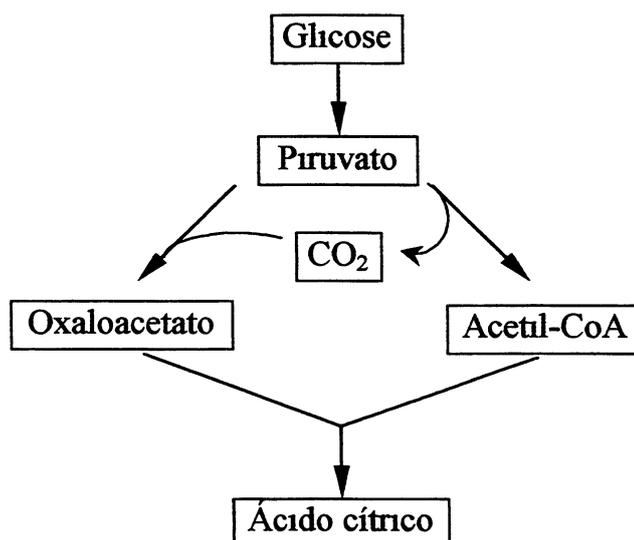
FONTE: NOTHENBERG, 1983; SOCCOL *et al.*, 2002.

2.1.5 Bioquímica da síntese do ácido cítrico pelo *Aspergillus niger*

O AC é um metabólito primário, formado no ciclo de Krebs. A glicose, fonte de carbono inicial do metabolismo, é disponibilizada a partir da hidrólise enzimática

de vários substratos utilizados como matéria-prima na fermentação cítrica. A figura 3 mostra a biossíntese básica do AC a partir da glicose, a qual envolve três etapas. (a) quebra da glicose gerando piruvato e acetil-CoA através da glicólise, (b) formação de oxaloacetato a partir do piruvato e CO₂ e (c) acúmulo do AC no ciclo de Krebs (KUBICEK e ROHR, 1986, PANDEY *et al* , 2001)

FIGURA 3 – ESQUEMA GERAL DA BIOSÍNTESE DO ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA GLICOSE



FONTE VANDENBERGHE. 2000

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 do ciclo pentose-fosfato ou via das pentoses. 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. Em vias metabólicas, as enzimas que catalisam as reações essencialmente irreversíveis são locais potenciais de controle. A fosfofrutocinase é o ponto crucial de controle, pois é a enzima que catalisa a reação específica da glicólise (STRYER, 1996)

Vários parâmetros influenciam na eficácia do acúmulo de AC pelo *A niger*. Entre eles, o tipo e a concentração dos açúcares têm efeitos muito significativos na produção do AC. Enquanto as concentrações ótimas de metais traços, fosfato e nitrogênio estão inter-relacionadas, a concentração e tipo de açúcar utilizado são os únicos parâmetros que 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 a produção de ácido cítrico é altamente dependente da regulação glicolítica (ROHR, KUBICEK e KOMÍNEK, 1983, GREWAL e KALRA, 1995)

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 substrato. 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)

Não se sabe ainda se um aumento da concentração de citrato nas mitocôndrias é necessário para a produção de AC, mas este fato pode ocorrer como consequência das propriedades regulatórias de algumas enzimas do ciclo de Krebs. Tem-se relatado a presença de duas enzimas, a aconitase e a isocitrato dehidrogenase, as quais catabolizam o AC. Além disso, altas concentrações intracelulares de NH_4^+ inibem a produção de AC (RÖHR, KUBICEK e KOMÍNEK, 1983, PANDEY *et al* , 2001)

2.1.6 Rendimento teórico do ácido cítrico

Parte da glicose proveniente dos substratos utilizados na fermentação cítrica é consumida na tropofase para a produção do micélio do fungo e conversão em CO_2 durante a respiração celular. O restante é convertido em ácidos orgânicos na idiofase. A reação da síntese do AC partindo-se da glicose é esquematizada abaixo:



Pela equação da estequiometria verifica-se que a taxa de conversão teórica (Y_p/s) de glicose em ácido cítrico anidro ou monohidratado é de 107% e 117%, respectivamente. Estes rendimentos são teóricos e não são atingidos na prática devido às perdas durante a tropofase. Na prática tem-se obtido conversão entre 70 e 90 % (YOKOYA, 1992, PANDEY *et al* , 2001)

2.2 FERMENTAÇÃO CÍTRICA INDUSTRIAL

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)

2.2.1 Processo submerso

A fermentação submersa pode ser conduzida em sistema contínuo, semicontínuo ou batelada, embora o processo em batelada seja o mais frequentemente utilizado. A fermentação pode ser realizada em um fermentador clássico (50-150 m³) com aeração e agitação, ou em um reator de torre tipo coluna borbulhante ou suspensão de ar (200-900 m³). Este processo requer um controle mais sofisticado no tratamento da matéria-prima e no processo de fabricação que o processo de superfície, porém, requer menor espaço físico, menor consumo de mão-de-obra e apresenta menor risco de contaminação, podendo operar com grande volume de produção. O preparo do meio inclui o pré-tratamento, adição de nutrientes e esterilização. O pH é ajustado para 2,5-3,0 e o meio é transferido para o fermentador e inoculado com uma suspensão de esporos. A temperatura é mantida entre 28 e 35 °C e o processo está concluído após 10 a 12 dias. O segundo e terceiro dias de fermentação, que correspondem ao período de crescimento vegetativo e formação de micélio, são decisivos para o sucesso da fermentação. Estima-se que 80% da produção mundial de AC seja conduzida pelo processo submerso de fermentação (ROHR, KUBICEK e KOMÍNEK, 1983, YOKOYA, 1992, GREWAL e KALRA, 1995, VANDENBERGHE *et al.*, 1999)

A fermentação submersa pode ser conduzida em batelada simples ou batelada alimentada. O processo contínuo só tem sido utilizado em escala laboratorial. Uma comparação entre o desempenho destas três formas de fermentação revelou que o rendimento de ácido cítrico foi de 56% para batelada simples e 65% tanto em batelada alimentada quanto em sistema contínuo (DAWSON *et al*, 1988). Em escala piloto, um experimento usando melaço de cana-de-açúcar tratado com 1,8 g/l de ferrocianeto de potássio apresentou um rendimento de 58%, e usando caldo de cana clarificado a pH 6,5, tratado com 0,18 g/l de ferrocianeto apresentou rendimento de 70% (QAZI *et al*, 1990).

2.2.2 Processo de superfície

A fermentação de superfície é o processo clássico de fermentação cítrica introduzido nos primeiros processos industriais. Ainda é utilizado em pequenas e médias indústrias, pois requer menos controle na instalação e operação, e menor gasto de energia. O processo consiste na sala de fermentação provida de sistema de circulação de ar filtrado com a finalidade de controlar a umidade e a temperatura. Na sala, várias bandejas, com capacidade de 0,4 a 1,2 m³, são dispostas umas sobre as outras em prateleiras. Geralmente são utilizados como fonte de carbono o açúcar bruto ou refinado, xarope de cana ou melaço de beterraba. A matéria-prima é diluída para obter 14-15% de açúcar e o pH é ajustado para 5,0-5,5. O meio preparado e estéril, após resfriamento, é transferido para as bandejas, em condições assépticas. A inoculação pode ser feita diretamente com uma suspensão de esporos, ou os esporos são misturados ao ar que passa sobre as bandejas, ou ainda o fungo é cultivado em uma bandeja menor e misturado no meio a ser distribuído nas as bandejas. Neste processo fermentativo, o fungo se desenvolve na superfície do meio formando uma película de micélios. A temperatura é mantida ao redor de 30°C e o processo se completa após um período de 8 a 12 dias. Normalmente a taxa de conversão em fermentação superficial é de 70-75%, baseada no conteúdo inicial de açúcar (RÖHR, KUBICEK e KOMÍNEK, 1983, KUBICEK e ROHR, 1986, YOKOYA, 1992, GREWAL e KALRA, 1995).

2.2.3 Processo em estado sólido

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 (ROHR, KUBICEK e KOMÍNEK, 1983, KUBICEK e ROHR, 1986, YOKOYA, 1992, GREWAL e KALRA, 1995, SOCCOL *et al*, 2002). Estudos de FES apontaram conversão de 51-68% em bandejas usando bagaço de cana-de-açúcar embebido em melaço (LAKSHMINARAYANA *et al*, 1975).

A FES é caracterizada pelo desenvolvimento do microrganismo em um ambiente com baixa atividade de água, sobre e no interior de partículas porosas úmidas denominadas suporte ou matriz sólida. Esta matriz sólida não solúvel atua tanto como suporte físico quanto como fonte de nutrientes. Não é necessário combinar as funções substrato e suporte, mas é fundamental a reprodução das condições de baixa atividade de água e alta transferência de oxigênio usando um material inerte impregnado com uma solução nutritiva (KOLICHESKI, 1995, SOCCOL, 1996b, PINTADO *et al*, 1998, VANDENBERGHE *et al*, 2000b, SOCCOL *et al*, 2002).

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. A presença de elementos traços em FES constitui um problema devido à dificuldade na sua remoção (KUBICEK e ROHR, 1986, YOKOYA, 1992, GREWAL e KALRA, 1995).

2 2 3 1 *Vantagens e desvantagens da FES*

Vários autores apresentam as vantagens e desvantagens da FES (DURAND e BLANCHERE, 1985, SOCCOL, 1994, KOLICHESKI, 1995, VANDENBERGHE, 2000, SOCCOL e VANDENBERGHE, 2002)

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 (adição somente de água e nutrientes),
- Diminuição de contaminações devido a pouca umidade do meio de cultura (60-80%),
- Redução dos efluentes líquidos a tratar (baixa produção de água residual),
- Facilidade de aeração devido à porosidade dos substratos,
- Resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação (podem ser secos com facilidade),
- Produção concentrada de metabólitos,
- Facilidade na utilização direta de substratos fermentados,
- A formação de espuma é eliminada,
- Facilidade no controle da respiração em linha (correlação crescimento/metabolismo do microrganismo)

Porém, a FES não é amplamente utilizada porque possui desvantagens como

- Dificuldade de remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria fermentada, causando aquecimento excessivo no interior da massa fermentativa (provavelmente a maior limitação),
- Dificuldade de medir parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, quantidade de água, concentração celular e concentração do substrato no estado sólido,
- Necessita pré-tratamento dos suportes (seleção, homogeneização e umidificação),
- Perda de umidade para as fermentações de longa duração

Algumas destas limitações podem ser minimizadas. Por exemplo, em sistemas que utilizam aeração forçada o aumento excessivo de temperatura do substrato

fermentado pode ser controlado através do aumento na vazão de ar ou revolvendo o material várias vezes durante o período de maior aumento na temperatura (entre 24 e 72 horas de fermentação) A determinação da concentração celular (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 seu ressecamento durante a fermentação

2.2.3.2 Substratos utilizados na FES

Uma grande variedade de substratos pode ser utilizada na produção de AC por FES, principalmente os sub-produtos e resíduos da agroindústria (tabela 4)

TABELA 4 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FES UTILIZANDO VÁRIOS TIPOS DE SUBSTRATOS

| Substrato | Cepa | Produção de AC | Referência |
|-------------------------------------|--------------------------|-----------------------|---|
| Bagaço de mandioca | <i>A niger</i> NRRL 2001 | 347 g/kg ^b | VANDENBERGHE, 2000 |
| Batata doce (alto teor de amido) | <i>A niger</i> YANG n° 2 | 99 g/kg ^b | LU, BROOKS e MADDOX, 1997 |
| Casca de café | <i>A niger</i> CFTRI 30 | 150 g/kg ^b | SHANKARANAND e LONSANE, 1994 |
| Casca de kiwi | <i>A niger</i> NRRL 567 | 100 g/kg ^a | HANG e WOODAMS, 1987 |
| Okara (resíduo de soja) | <i>A niger</i> | 51 g/kg ^a | KHARE, JHA e GANDHI, 1995 |
| Polpa de maçã | <i>A niger</i> NRRL 567 | 883 g/kg ^a | HANG e WOODAMS, 1984 |
| Polpa de uva | <i>A niger</i> NRRL 567 | 600 g/kg ^b | HANG e WOODAMS, 1985 |
| Resíduo de abacaxi | <i>A niger</i> ACM 4942 | 194 g/kg ^b | TRAN, SLY e MITCHELL, 1998 |
| Resíduo de cenoura | <i>A niger</i> NRRL 2270 | 29 g/kg ^a | GARG e HANG, 1995 |
| Resíduo de laranja | <i>A niger</i> | 46 g/kg | ARAVANTINOS-ZAFIRIS <i>et al</i> , 1994 |
| Resíduos de mexilhão | <i>A niger</i> | 300 g/kg | PINTADO <i>et al</i> , 1998 |
| Sabugo de milho | <i>A niger</i> NRRL2001 | 250 g/kg | HANG e WOODAMS, 1998 |
| Sacarose (açúcar do bagaço de cana) | <i>A niger</i> CFTRI 30 | 174 g/kg | SHANKARANAND e LONSANE, 1993 |
| Vagem de alfarroba | <i>A niger</i> ATCC 9142 | 264 g/kg | ROUKAS, 1999 |

^abaseado na quantidade de açúcar consumida, ^bem base seca

São suportes celulósicos, constituídos por palhas, cascas, bagaços, farelos e outros, que possuem alto teor de fibras e que permitem trabalhar com teores elevados

de umidade (KOLICHESKI, 1995) O bagaço de mandioca mostrou uma adaptação excelente em FES na produção de AC por *A niger* (VANDENBERGHE, 2000)

2 2 4 Fatores que influenciam a produção de ácido cítrico

A produção de AC pelo *A niger* a partir de carboidratos é altamente afetada pela composição do meio e pelos parâmetros de processo Os fatores químicos como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fonte de fósforo, elementos traços, álcoois inferiores e outras substâncias têm grande influência na produção de ácido cítrico Na tabela 5 é apresentado um resumo das principais fontes destes elementos e suas respectivas concentrações usuais Fatores físicos como pH, temperatura, umidade e aeração também apresentam influência significativa na produção de AC

TABELA 5 – PRINCIPAIS FATORES QUÍMICOS QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

| Elemento | Principais fontes | Concentração ótima |
|---------------------|--|--------------------|
| Fonte de carbono | Sacarose, glicose, frutose, galactose, manose, maltose, melação de cana-de-açúcar, melação de beterraba, sacarose bruta, caldo de cana, hidrolisado de amido | 10 – 14% |
| Fonte de nitrogênio | Sulfato de amônio, ureia, nitrato de amônio, peptona, extrato de malte | 0,1 a 0,4 g/l |
| Fonte de fosforo | Didrogeno fosfato de potassio | 0,5 e 5,0 g/l |
| Elementos traços | Sulfato de ferro, sulfato de zinco, cloreto de ferro | - |
| Alcoois inferiores | Metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, metilacetato | 1 a 5% |
| Outras substâncias | Oleos e gorduras | 0,05-0,3% |
| | Compostos quaternários de amônio e amino-oxinas | 20 mg/l |
| | Amido | 0,025-0,5% |

2 2 4 1 Fonte de carbono

A concentração e natureza 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* como a morfologia do microrganismo (XU *et al* , 1989; RANE e SIMS, 1993, PAPAGIANNI, MATTEY e KRISTIANSEN, 1999; VANDENBERGHE *et al* , 1999). A concentração ótima de

carboidrato fica em torno de 10 a 14%. 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, BROOKS e MADDOX, 1984, YOKOYA, 1992, VANDENBERGHE *et al*, 1999). A combinação de glicose e frutose produz mais ácido que se utilizados separadamente. Isto explica o comportamento da sacarose em relação à glicose e frutose. Apesar da sacarose não ser quebrada pelo fungo, 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).

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). Fatores como custo e necessidade de pré-tratamento devem ser considerados na escolha do substrato.

2.2.4.2 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 na forma de sulfato de amônio, uréia, nitrato de amônio, peptona ou extrato de malte. A uréia atua como tamponante, controlando as variações de pH. O nitrato de amônio em quantidade superior a 25% induz ao acúmulo de ácido oxálico, o que é indesejável. O sulfato de

amônio incrementa a produção de AC ao mesmo tempo em que evita a formação do ácido oxálico (GREWAL e KALRA, 1995, VANDENBERGHE *et al.*, 1999)

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

A concentração de nitrogênio requerida na fermentação do AC é de 0,1 a 0,4 g/l. Uma concentração de nitrogênio elevada aumenta o crescimento do fungo e o consumo de açúcares, porém, reduz a quantidade de AC produzido (KUBICEK e ROHR, 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 com outros ácidos como o glucônico (SANKPAL, JOSHI e KULKARNI, 2000)

Foi verificada a influência da relação entre o nitrogênio e o oxigênio na produção de AC. A taxa de produção no meio com nitrogênio (0,01 g/l de nitrato de amônio) foi 33% maior quando se utilizou oxigênio ao invés de ar durante a fase de produção. Porém, no meio sem nitrogênio, a produção de AC não foi consideravelmente influenciada quando se substituiu o ar pelo oxigênio (BAYRAKTAR e MEHMETOGLU, 2000)

2.2.4.3 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 dióxido de fosfato de potássio é mencionado como a melhor fonte de fósforo. O fungo necessita de concentrações de fósforo na solução salina que varia 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 CO₂ e o crescimento do fungo (KUBICEK e ROHR, 1986, GREWAL e KALRA, 1995, VANDENBERGHE *et al.*, 1999)

2 2 4 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)

Adicionado juntamente com o KH_2PO_4 , o zinco favorece a produção de AC Tem papel importante no controle das fases de crescimento celular e de produção do ácido Seu esgotamento durante o cultivo do fungo transfere da fase de crescimento para a fase de produção A presença de manganês, ferro e zinco (em concentrações elevadas) podem causar a redução da produção de AC somente em meios sem fosfato (YOKOYA, 1992, VANDENBERGHE *et al* , 1999)

A presença de alta concentração de manganês no meio inibe o acúmulo de ácido cítrico, 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 anaeróbico e de Krebs, com exceção da sintetase citrato, conduzindo à superprodução de AC como produto final da glicólise (ROHR, KUBICEK e KOMÍNEK, 1983, VANDENBERGHE *et al.*, 1999)

A presença de íons ferro no meio afeta negativamente o acúmulo de ácido cítrico 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)

2 2 4.5 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 ROHR, 1983, GREWAL e KALRA, 1995, YOKOYA, 1992, VANDENBERGHE *et al*, 1999)

Acredita-se que os álcoois estimulam a produção de AC por afetar o crescimento e a esporulação do fungo. Isto ocorre através da ação sobre a permeabilidade da membrana dos microrganismos afetando a composição fosfolipídica da parede celular (HAMISSA, 1978, INGRAM, 1984, DASGUPTA *et al*, 1994)

Em fermentações cítricas, geralmente utilizam-se quantidades de 1-4% de metanol, mas alguns trabalhos têm mostrado que até 6% aumenta o 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 seu metabolismo (YOKOYA, 1992, GREWAL e KALRA, 1995). O efeito do metanol também foi testado em diferentes cepas produtoras de AC. O uso de 3% deste álcool no meio fermentativo incrementou a produção do ácido pelo *A. niger*, porém, reduziu a produção pela *Candida lipolytica* (PAZOUKI *et al*, 2000)

2.2.4.6 Outras substâncias

Óleos e gorduras são usados na produção de AC por fermentação submersa para controlar a formação de espuma. São consumidos durante a fermentação, sendo necessário manter seu nível acima de 0,05-0,3%. Alguns óleos também estimulam a produtividade e a manutenção do processo fermentativo do *A. niger*. Óleos com elevado teor de ácidos graxos insaturados podem aumentar em cerca de 20% a produção de AC (YOKOYA, 1992)

Alguns compostos são inibidores do metabolismo do fungo. Fluoreto de cálcio, fluoreto de sódio e fluoreto de potássio aceleram a produção de ácido cítrico, enquanto ferrocianeto de potássio reduz o rendimento do AC. Muitos compostos atuam de maneira favorável no acúmulo do ácido como compostos quaternários de

amônio e amino-oxinas Usados em concentrações de 20 mg/l impedem a ação de íons metálicos (KUBICEK e ROHR, 1986, YOKOYA, 1992, VANDENBERGHE *et al.*, 1999, PANDEY *et al.*, 2001)

A adição de monofluoracetato de sódio ao meio fermentativo aumenta a produção de AC, por outro lado, se adicionado ao fermentado reduz o rendimento do ácido devido à sua toxicidade (GREWAL e KALRA, 1995) Cloreto de cálcio adicionado ao meio fermentativo reduz a concentração de biomassa celular e conseqüentemente aumenta a produtividade do AC (PERA e CALLIERI, 1999)

Amido, em baixa concentração (0,025-0,5%), apresenta um grande efeito na morfologia do fungo Pode estimular o acúmulo do AC, reduzir o tempo de fermentação e a quantidade de esporos Outras substâncias como o ácido benzóico, cianeto de ferro, EDTA, carvão ativo, H₂O₂, agentes tensoativos e vermiculita também incrementam a produção de AC (KUBICEK e ROHR, 1986, YOKOYA, 1992, PANDEY *et al.*, 2001)

2 2 4 7 pH

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 Para outros grupos de fungos como *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Pleurotus* sp, o pH é mais estável (entre 4,0 e 5,0) Além disso, a natureza do substrato também influencia na variação e pH (KUBICEK e ROHR, 1986; GREWAL e KALRA, 1995, YOKOYA, 1992, PANDEY *et al.*, 2001)

Durante a fermentação submersa, a manutenção de um pH inferior a 2,0 é essencial para a produção adequada de AC. Neste caso um pH inicial baixo apresenta a vantagem de evitar contaminação e inibir a formação de ácido oxálico e ácido glucônico como subprodutos Em meios sintéticos ou à base de açúcar purificado, o pH inicial do meio é ajustado para valores próximos a 3,0, no caso de fontes de

carbono brutas, como por exemplo, o melão, o pH é ajustado para 5,0-6,0, pois algumas impurezas desse material interferem na germinação e até no desenvolvimento do fungo (ROHR, KUBICEK e KOMÍNEK, 1983, YOKOYA, 1992, GREWAL e KALRA, 1995, VANDENBERGHE *et al* , 1999)

2 2 4 8 *Temperatura*

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* temperatura em torno de 26-30°C são ideais. O processo fermentativo em temperaturas mais elevadas é rápido, ocorrendo abundante crescimento dos micélios, o que causa alta oxidação do açúcar à CO₂ 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)

2 2 4 9 *Aeração*

Sendo a fermentação cítrica um processo aeróbico, o fornecimento de oxigênio tem um efeito crucial na produção de AC. Elevadas taxas de aeração conduziram ao aumento da produção e redução do tempo de fermentação. É importante manter a concentração de oxigênio acima de 25% da saturação. Interrupções no fornecimento de oxigênio pode resultar na perda da capacidade de conversão do açúcar em AC, embora a formação da biomassa celular seja pouco afetada (DAWSON, MADDOX e BROOKS, 1986; YOKOYA, 1992; VANDENBERGHE *et al.*, 1999)

A alta demanda de oxigênio é fornecida através de dispositivos apropriados, os quais dependem da viscosidade do meio fermentativo. Devido a razões econômicas, inicia-se a fermentação com taxas de aeração reduzidas. A incorporação de oxigênio

ao ar, em fermentação submersa, resulta no incremento da produção de AC, mas é economicamente inviável (YOKOYA, 1992) É possível recircular o oxigênio no fermentador, desde que o CO₂ seja removido do processo Altas taxas de aeração conduzem a formação de grandes quantidades de espuma, principalmente na fase de crescimento Assim, a adição de antiespumantes e o uso utensílios que empecem a formação de espuma são necessários neste caso (VANDENBERGHE *et al* , 1999)

Estudos relataram que a aeração forçada no início da fermentação, em reatores tipo coluna para FES, propiciaram altas taxas metabólicas e produtividade Porém, é importante levar em consideração o efeito adverso do estresse, causado por elevadas taxas de aeração, sobre o fungo filamentososo (LU, BROOKS e MADDOX, 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 as condições de operação em biorreatores convencionais com agitação e aeração (SANKPAL, JOSHI e KULKARNI, 2001)

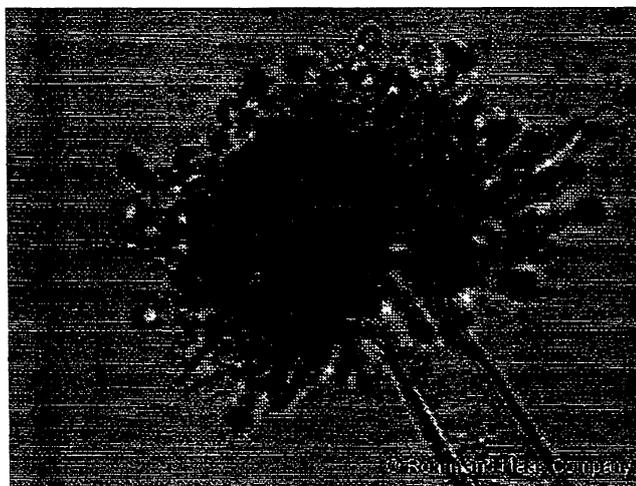
2.2.5 Microrganismos produtores de ácido cítrico

O AC pode ser acumulado por uma grande variedade de cepas, incluindo fungos e bactérias como *Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium ssp* , *Aspergillus niger*, *A aculeatus*, *A carbonarius*, *A awamori*, *A foetidus*, *A fonsecaeus*, *A phoenicis*, *A wentii*, *A clavatus*, *Penicillium janthinellum*, *P luteum*, *P. citrinum*, *Mucor piriformis*, *Citromyces pfefferianus*, *Paecilomyces divaricatum*, *Trichoderma viride*, etc , e leveduras como *Candida tropicalis*, *C oleophila*, *C guilliermondii*, *C citroformans*, *Hansenula anomala* e *Yarrowia lipolytica* (IKENO *et al* , 1975, KUBICEK e ROHR, 1986, YOKOYA, 1992, VANDENBERGHE *et al* , 1999, GREWAL e KALRA, 1995, PANDEY *et al* , 2001) Porém, muitos destes microrganismos não são capazes de produzir quantidades comercialmente aceitáveis de AC

O fungo *Aspergillus niger* (figura 4) tem sido o mais utilizado industrialmente 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)

FIGURA 4 – CULTURA DE *Aspergillus niger*

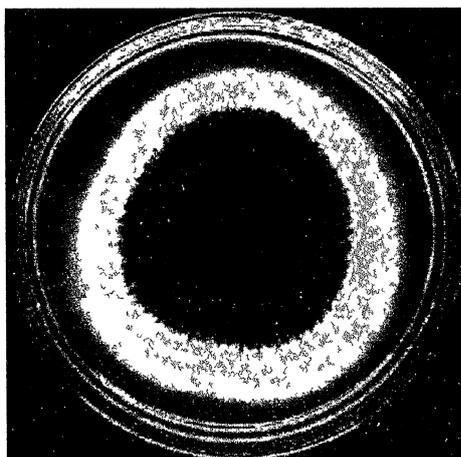


FONTE ROHM AND HAAS COMPANY, 2002

O *Aspergillus* é um fungo filamentoso, cosmopolita e onipresente encontrado na natureza. É comumente isolado do solo, de plantas em decomposição e do ar. O gênero *Aspergillus* inclui mais de 185 espécies dentre as quais, as mais conhecidas são o *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. O *Aspergillus* spp pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Pertence também ao grupo dos hyalohyphomyces os quais formam esporos. Suas colônias podem apresentar coloração branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde. A taxa de crescimento deste fungo é rápida a moderadamente rápida, exceto no caso do *A. nidulans* e *A. glaucus*. Enquanto estes crescem devagar e formam colônias de 0,5 a 1,0 cm quando incubados a 25°C e num período de 7 dias em meio Czapek ágar, as demais espécies formam colônias de 1 a 9 cm de diâmetro (UCSF, 2000, MCGINNIS e REX, 2002)

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

FIGURA 5 - COLÔNIA TÍPICA DE *Aspergillus niger*



FONTE 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)

A levedura oxidativa do gênero *Saccharomyces*, inicialmente classificada como pertencente ao gênero *Candida*, tem mostrado algumas características interessantes, podendo ser considerada potencialmente importante A maioria das linhagens em uso parece ter sido selecionada empiricamente do seu ambiente natural, principalmente do solo (YOKOYA, 1992, PAZOUKI *et al*, 2000; CROLLA e KENNEDY, 2001)

O incremento na produtividade de AC tem sido feito através de mutação e seleção de cepas Os mutagênicos mais frequentemente utilizados são a radiação γ , radiação UV e os mutagênicos químicos Geralmente a combinação de UV e alguns mutagênicos químicos podem gerar cepas hiper-produtoras de AC (KUBICEK e

ROHR, 1986, VANDENBERGHE *et al*, 1999, IKRAM-UL-HAQ *et al*, 2001, PANDEY *et al*, 2001)

2.3 RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO CÍTRICO

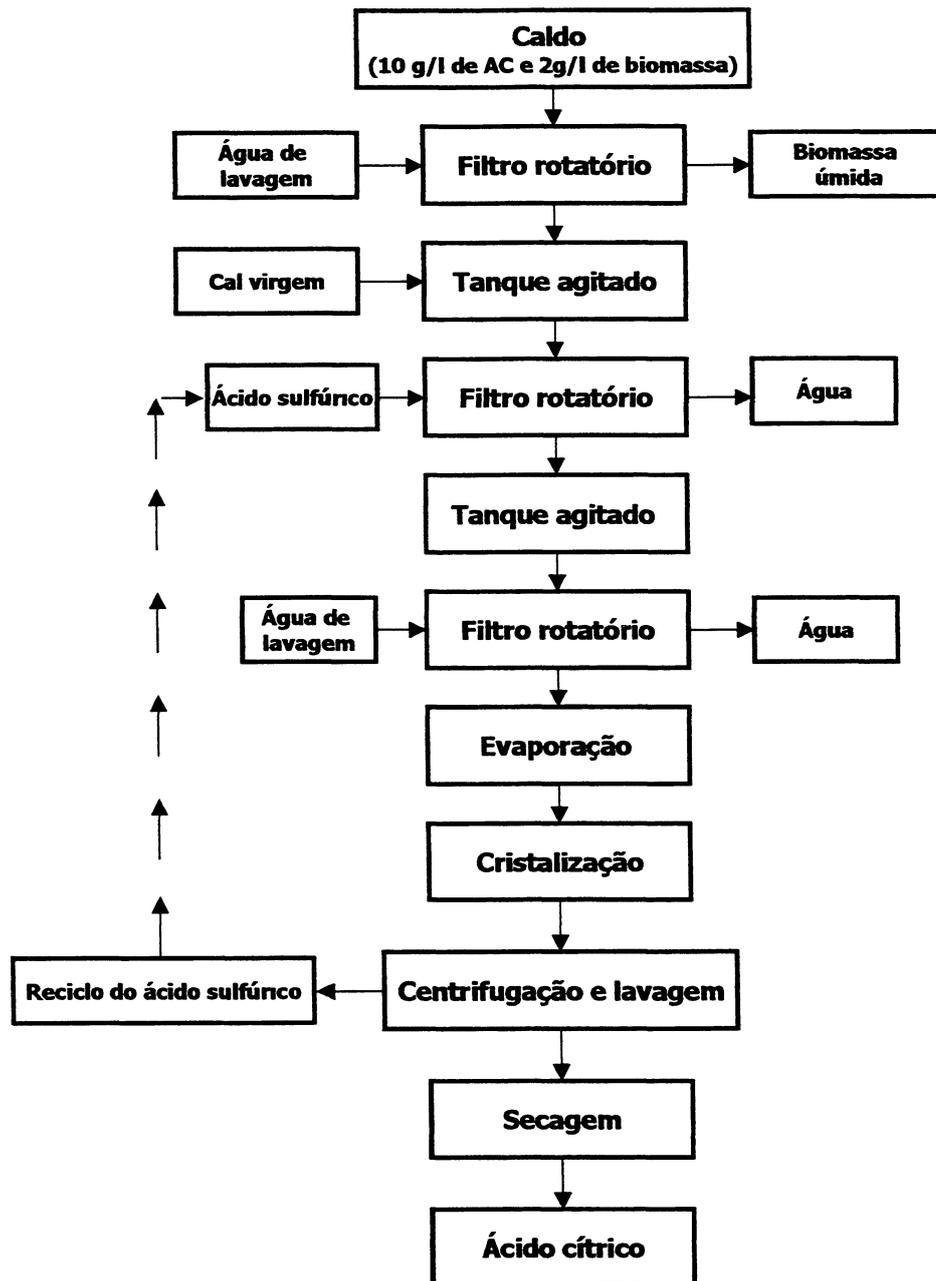
Os dois processos clássicos de recuperação de AC do substrato fermentado são a precipitação com hidróxido de cálcio e a extração com solventes. O primeiro método é o mais utilizado e pode ser aplicado em qualquer situação. O segundo método, porém, requer um meio fermentado com pequena quantidade de impurezas. Em ambos métodos há a necessidade de remover por filtração do fermentado os micélios do fungo e o material em suspensão (YOKOYA, 1992)

No método de precipitação, esquematizado na figura 6, o AC é transformado em citrato tricálcico tetraidratado que é ligeiramente solúvel. O precipitado é filtrado e tratado com ácido sulfúrico para recuperar o AC e remover o cálcio na forma de sulfato (gesso). A solução de AC é tratada com carvão ativo e passa por uma resina de troca iônica. Finalmente o “caldo mãe” é concentrado em cristalizador a vácuo a 20-25°C formando o AC monohidratado (YOKOYA, 1992, GREWAL e KALRA, 1995, VANDENBERGHE *et al*, 1999, PANDEY *et al*, 2001)

O AC anidro é obtido por cristalização à temperatura superior a 36,5°C. Os cristais são separados por centrifugação e a etapa de secagem é conduzida à temperatura inferior a 36,5°C para o AC monohidratado e acima desta para o AC anidro (KUBICEK e ROHR, 1986, YOKOYA, 1992)

O método de extração por solventes é outra alternativa na recuperação de AC. Neste caso a “solução mãe” deve conter pequena quantidade de impurezas, pois estas também podem ser captadas pelo solvente. Este método apresenta como vantagens a não utilização de hidróxido de cálcio e ácido sulfúrico, os quais são empregados em grandes quantidades no método de precipitação, e evita a formação de gesso, o qual apresenta o problema de eliminação. Na FES, além de água, foram testados também acetona, metanol e etanol na extração de AC de partículas sólidas. A temperatura ambiente (20-25°C), os melhores resultados usando esta técnica de extração foram obtidos com acetona, seguida de água, etanol e metanol (YOKOYA, 1992)

FIGURA 6 – ESQUEMA DO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO CÍTRICO POR PRECIPITAÇÃO



FONTE BAILEY e OLLIS, 1986

A extração líquido-líquido, usada para recuperar o AC de soluções aquosas, tem sido apontada em vários estudos como uma alternativa promissora em relação ao processo convencional, em fermentação submersa. A extração usando solventes orgânicos comuns é inviável devido à alta afinidade do AC com a água. As aminas têm

sido apontadas como um solvente promissor na separação de ácidos carboxílicos e hidroxicarboxílicos de soluções aquosas. Solventes como as aminas alifáticas de alto peso molecular e os solventes doadores de oxigênio à base de fósforo têm sido bastante utilizados (PAZOUKI e PANDA, 1998). Vários autores testaram aminas na extração do ácido cítrico. Podem ser citados como exemplos destes solventes a alamina 336 dissolvida em um diluente não polar (WENNERESTEN, 1983), uma mistura de 30-40% de butilacetato com 60-70% de uma alquilamida N,N-disubstituída (YI *et al* , 1987), trioctilamina em misturas de isodecanol/n-parafinas (POPOSKA, NIKOLOVSKI e TOMOVSKA, 1998), triálquilamina em mistura de 1-octanol ou clorofórmio com n-heptano (HEYBERGER, PROCHÁZKA e VOLAUFOVA, 1998). MILES LABORATORIES, INC (1981) sugeriram ainda o uso de alquilamidas N-substituídas na extração do AC de soluções aquosas.

Mais recentemente foram desenvolvidos alguns métodos com o objetivo de reduzir o custo de recuperação do AC e contornar os prejuízos causados pela formação e disposição final de enormes quantidades de sulfato de cálcio, evitando os problemas de poluição ambiental.

A eletrodialise é um processo de separação eletroquímica no qual se utilizam membranas eletricamente carregadas e uma diferença de potencial elétrico para separar espécies iônicas de soluções aquosas. Esta técnica foi testada na recuperação de AC e mostrou que é mais econômica em meios fermentados clarificados, uma vez convertidos em citrato tri-sódico. O custo desta técnica na recuperação do AC é bem superior aos processos corriqueiros usados em escala industrial. A grande especificidade da eletromembrana e os custos com energia elétrica limitam as aplicações da eletrodialise somente a produtos de grande valor agregado (MORESI e SAPPINO, 1998).

Muitos advordentes sólidos têm sido considerados na recuperação do produto e usados nas fermentações em batelada. A vantagem do método de sorção é a simplicidade na tecnologia. A produção de AC integrada com a recuperação do produto *in loco* pode ser uma opção no aumento da produtividade e minimização de resíduos. Para separar o AC do meio fermentado, uma coluna contendo uma resina de

troca iônica é acoplada a um fermentador. Após passar pela coluna, o meio retorna ao fermentador para ser reutilizado. Esta reutilização do meio possibilita alta conversão dos nutrientes do substrato e redução na quantidade de água de entrada. A técnica adsorção aumenta a produtividade de AC e a conversão de açúcar (JIANLONG, XIANGHUA e DING, 2000)

As membranas líquidas também estão sendo usadas para separar AC de meios fermentados. A membrana líquida consiste de uma solução orgânica composta de trilaurilamina e um álcool de cadeia longa dissolvidos em um hidrocarboneto inerte (solvente) o qual é imobilizado em um suporte de polipropileno microporoso. As membranas líquidas oferecem algumas vantagens como redução de custos, baixo consumo de energia, alto fator de separação em estágio único e habilidade de concentrar o AC durante a separação (FRIESEN *et al* , 1991)

As tecnologias para produção em grande escala de produtos químicos comuns não competem com os processos tradicionais porque o produto deve ser concentrado de soluções aquosas muito diluídas, o que envolve alto consumo de energia. Diferentes géis de poli(acrilamida) com quantidades variáveis de copolímero catiônico têm sido usados na concentração de soluções de AC. A recuperação de AC usando este tipo de gel é altamente dependente do pH e da porcentagem de cargas fixadas no interior do gel. Neste caso, o pH ótimo de recuperação do AC é de cerca de 3,5. Os géis apresentam como vantagens uma boa absorção de solutos iônicos e a facilidade de regeneração (GONZÁLEZ-S , FERNÁNDEZ-T e PIZARRO, 1997)

2.4 ORIGEM E CARACTERÍSTICAS DO SUBSTRATO

2.4.1 Mandioca

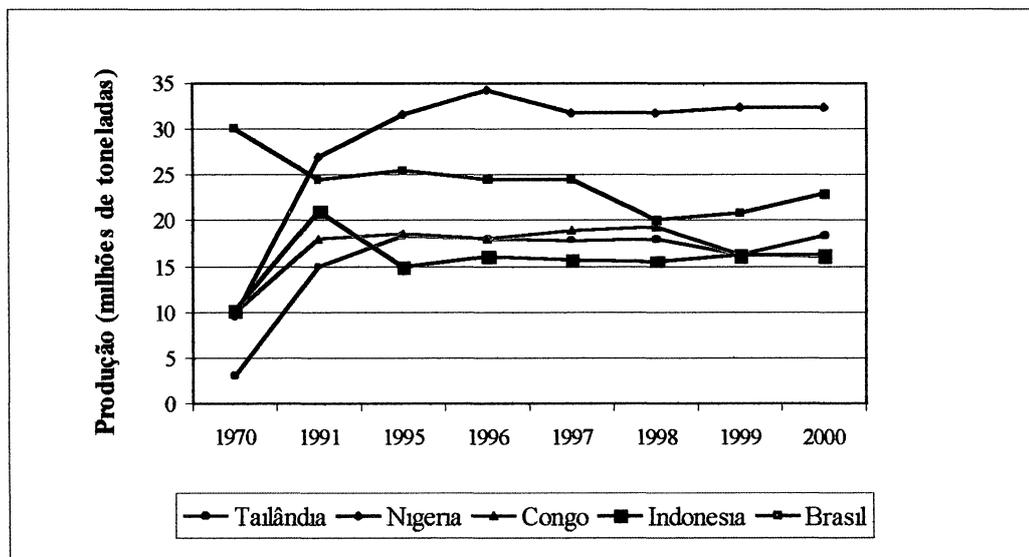
A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é originária da América do Sul, mais especificamente do Norte do Brasil. Constitui um dos principais alimentos energéticos, principalmente nos países em desenvolvimento, onde é cultivada em pequenas áreas com pouca ou quase sem qualquer tipo de tecnologia (PANDEY *et al* , 2000, EMBRAPA, 2002)

No Brasil a mandioca também é conhecida como macaxeira, aipim ou castelinha. De fácil adaptação, é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do País, em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção (PANDEY *et al* , 2000; EMBRAPA, 2002)

A planta é constituída de uma parte aérea que atinge de 2 a 4m de altura e de uma parte subterrânea. A porção subterrânea geralmente contém de 5 a 20 tubérculos, cada qual medindo 30-120 cm de comprimento e 4-15 cm de diâmetro. O peso dos tubérculos pode variar de algumas centenas de gramas até 8 kg (GRACE, 1977, EMBRAPA, 2002)

Dado a sua importância sócio-econômica, a produção mundial de mandioca passou de 97 para 173 milhões de toneladas nas últimas três décadas. Na figura 7 são apresentados os maiores produtores mundiais de mandioca deste período. Em 2001 a produção mundial de mandioca ficou em torno de 178 milhões de toneladas (FAO, 2001, SEAB, 2002)

FIGURA 7 – EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANDIOCA EM RAIZ NOS PRINCIPAIS PAISES PRODUTORES

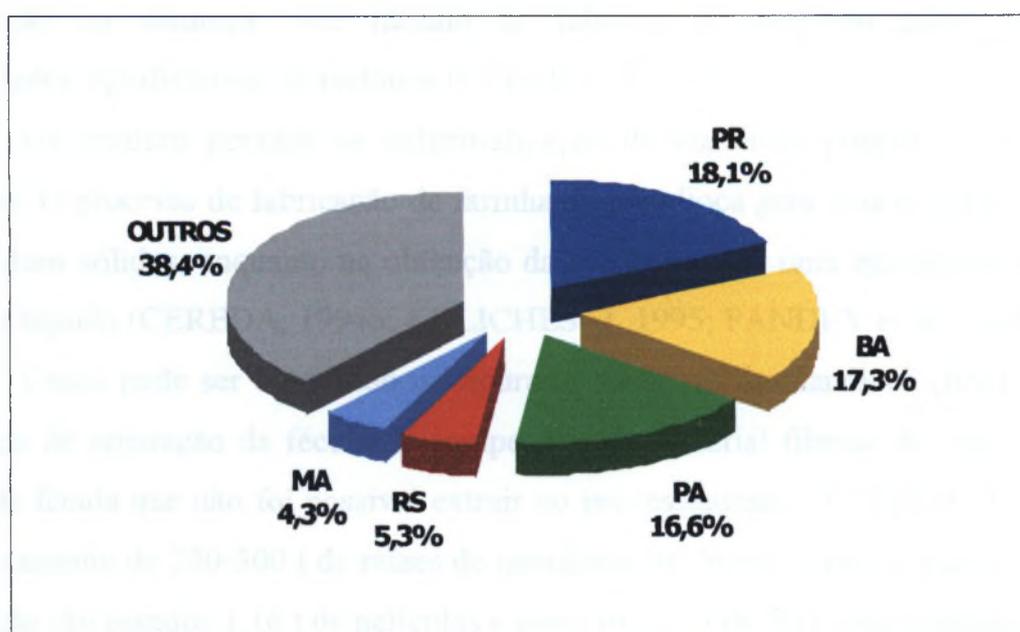


FONTE: SEAB, 2002

O Brasil é o segundo maior produtor de mandioca, com 23 milhões de toneladas, atrás apenas da Nigéria, que produz 34 milhões de toneladas (FAO, 2001,

BRASIL, 2002). O Paraná, na safra de 2000/2001, produziu cerca de 4.400.000 toneladas de mandioca o que lhe concedeu o primeiro lugar no “ranking” nacional dos produtores de mandioca (figura 8). Os Núcleos Regionais de Paranavaí, Umuarama, Campo Mourão e Toledo, respondem por cerca de 65% da produção estadual de mandioca (SEAB, 2002).

FIGURA 8 – PRINCIPAIS PRODUTORES NACIONAIS DE MANDIOCA NA SAFRA 2000/2001.



FONTE: SEAB, 2002.

Além da importância na alimentação humana e animal, a mandioca também é utilizada como matéria-prima em diversos produtos industriais. A principal importância da mandioca, como matéria-prima industrial, é a de ser fonte de amido e seus derivados (CEREDA, 1994b; EMBRAPA, 2002).

3.1.1 Industrialização da mandioca

Os produtos obtidos da industrialização da mandioca são a farinha, a fécula doce (ou amido), a fécula fermentada e a tapioca (OLIVEIRA e CANOILAS, 1994).

O mercado mundial de fécula, liderado pela Tailândia, é de 980 milhões de toneladas. O Brasil participa com apenas 10 mil toneladas, embora a produção alcance 720 mil toneladas (BRASIL, 2002)

A quantidade de resíduos gerados na industrialização da mandioca depende do método de processamento adotado. A qualidade e a quantidade dos resíduos estão relacionadas com alguns fatores tais como a idade da planta, o tempo de armazenamento após colheita e o tipo de equipamento industrial utilizado. O processo de industrialização da mandioca causa sérios problemas ambientais em função de sua disposição na natureza. Até mesmo as fábricas de pequeno porte produzem quantidades significativas de resíduos (CEREDA, 1994b)

Os resíduos gerados na industrialização da mandioca podem ser sólidos ou líquidos. O processo de fabricação de farinha de mandioca gera uma quantidade maior de resíduos sólidos, enquanto na obtenção da fécula gera-se uma quantidade maior de resíduo líquido (CEREDA, 1994b, KOLICHESKI, 1995, PANDEY *et al.*, 2000)

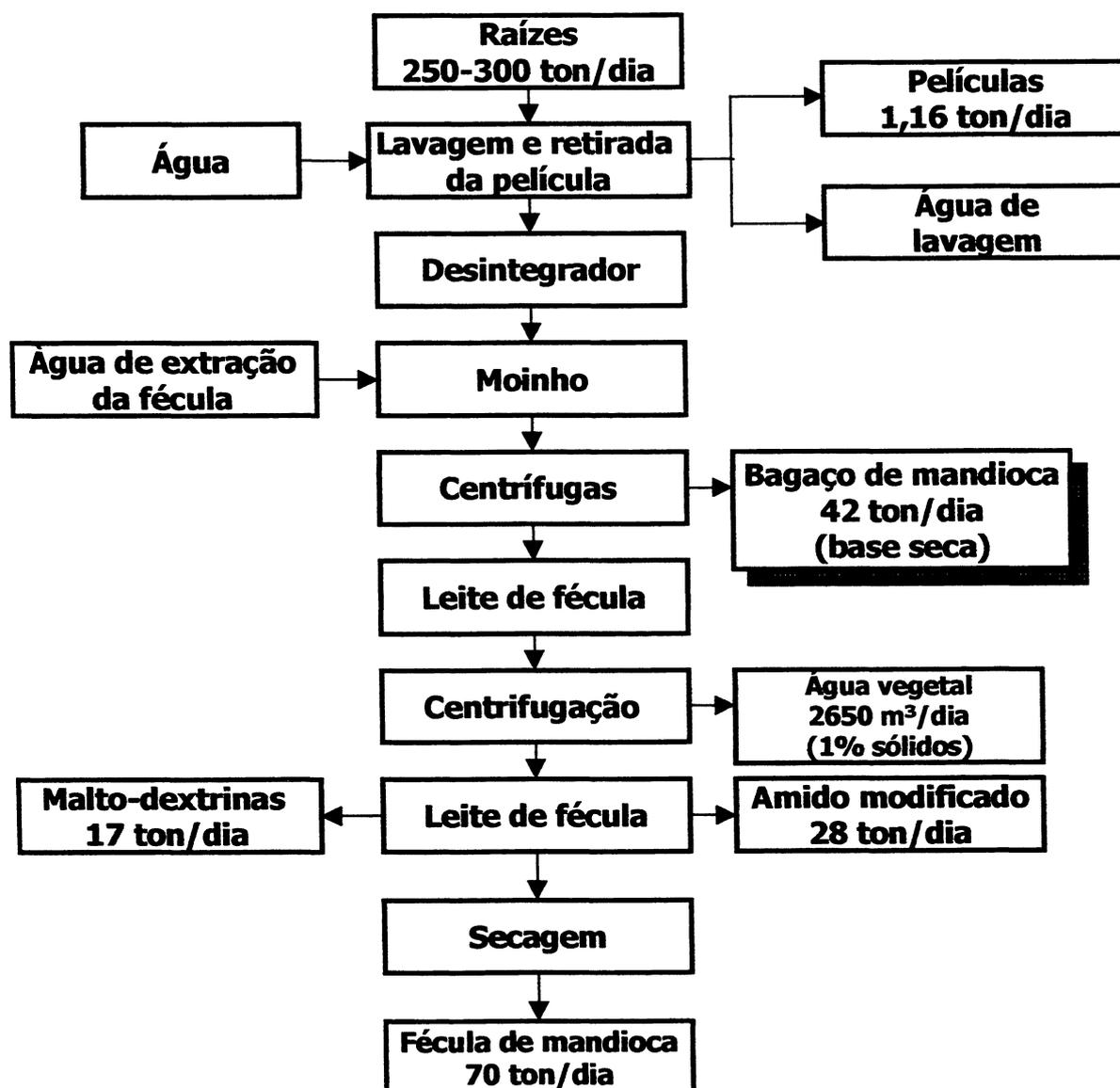
Como pode ser observado na figura 9, o bagaço de mandioca (BM) é gerado na etapa de separação da fécula. É composto pelo material fibroso da raiz, contendo parte da fécula que não foi possível extrair no processamento (CEREDA, 1994a). No processamento de 250-300 t de raízes de mandioca (incluindo a casca) para a obtenção da fécula são gerados 1,16 t de películas e cerca de 280 t de BM com umidade de 85%. Estes resíduos sólidos geralmente são descartados no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento (PANDEY *et al.*, 2000)

Na tabela 6 estão dispostos os valores da composição físico-química do bagaço de mandioca de acordo com alguns autores. As variações apresentadas na composição físico-química do BM provavelmente se devem a diferença entre o controle tecnológico feito pelas indústrias durante o processo da mandioca e ao uso de raízes provenientes de diferentes safras.

Em processos de bioconversão usando culturas microbianas, o BM oferece vantagens por apresentar baixo teor de cinzas quando comparado a resíduos como a palha de arroz e a palha de trigo, que apresentam respectivamente 17,5 e 11 % de cinzas. Quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar também apresenta vantagens.

não requer pré-tratamento e é facilmente atacado por microrganismos (PANDEY, *et al*, 2000)

FIGURA 9 – ETAPAS DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DA MANDIOCA PARA OBTENÇÃO DE FÉCULA



FONTE SOCCOL, 1994, PANDEY, *et al*, 2000, VANDENBERGHE, 2000

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DE MANDIOCA SEGUNDO ALGUNS AUTORES

| Composição | SOCCOL 1994 | CEREDA 1994a | KOLICHESKI 1995 | VANDENBERGHE 2000 |
|------------|----------------|-----------------|--------------------|----------------------|
| Umidade | 5,02 | 9,52 | 8,96 | 9,51 |
| Cinzas | 1,10 | 0,66 | 1,44 | 0,65 |
| Amido | 40,50 | 63,85 | 41,55 | 67,0 |
| Lípidios | 1,06 | 0,83 | 0,93 | 0,53 |
| Proteínas | 1,57 | 0,32 | 1,61 | 0,24 |
| Fibras | 50,55 | 14,88 | 13,95 | 22,20 |

Valores em g/100g de matéria seca

O BM já foi utilizado por vários autores em processos biotecnológicos como, por exemplo, no enriquecimento protéico do BM (SOCCOL, 1994), na produção de compostos aromáticos (MEDEIROS *et al*, 2001), cogumelos (BEUX *et al*, 1995) e ácidos orgânicos como o fumárico (CARTA *et al*, 1999) e o cítrico (KOLICHESKI, 1995, VANDENBERGHE, 2000)

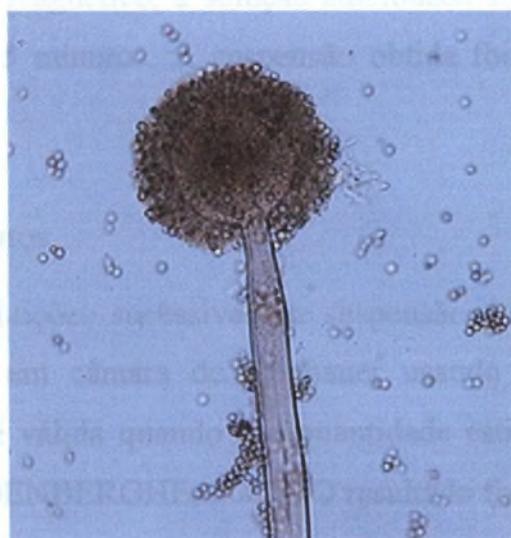
3 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná.

3.1 MICRORGANISMO

Neste estudo foi utilizada a cepa de *Aspergillus niger* LPB 21 apresentada na figura 10 e pertencente ao LPB.

FIGURA 10 – *Aspergillus niger* LPB 21



3.1.1 Manutenção da cepa

A cepa de *A. niger* foi conservada em tubos contendo meio PDA (Potato dextrose agar) inclinado, no qual o microrganismo foi repicado. O tempo de incubação foi de sete dias à temperatura de 28°C. A conservação foi feita à temperatura de 4°C por até dois meses.

3.1.2 Produção de esporos

Os esporos do *A. niger* foram produzidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50ml de meio PDA. O meio de cultivo foi esterilizado a 121°C durante 15

minutos. Depois de resfriado (45-55°C) o meio foi inoculado em profundidade a partir de uma suspensão de esporos. Esta suspensão foi obtida pela extração dos esporos conservados em tubo (item 3.1.1) com de 5 ml de 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.

3.1.3 Recuperação de esporos

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.

3.1.4 Contagem de esporos

Foram feitas diluições sucessivas da suspensão de esporos e a contagem de esporos foi realizada em câmara de Neubauer usando um microscópio ótico. A contagem de esporos é válida quando sua quantidade estiver entre 10 e 30 unidades por quadrículo (VANDENBERGHE, 2000). O resultado foi obtido usando a equação 1 e expresso em número de esporos por ml de suspensão.

$$N = \frac{n_e V_r F 1000}{n_r} \quad (1)$$

onde

N = número de esporos por ml de suspensão,

n_e = número total de esporos contados,

V_r = volume do retículo (ml),

F = fator de diluição (inverso da diluição),

n_r = número de retículos contados

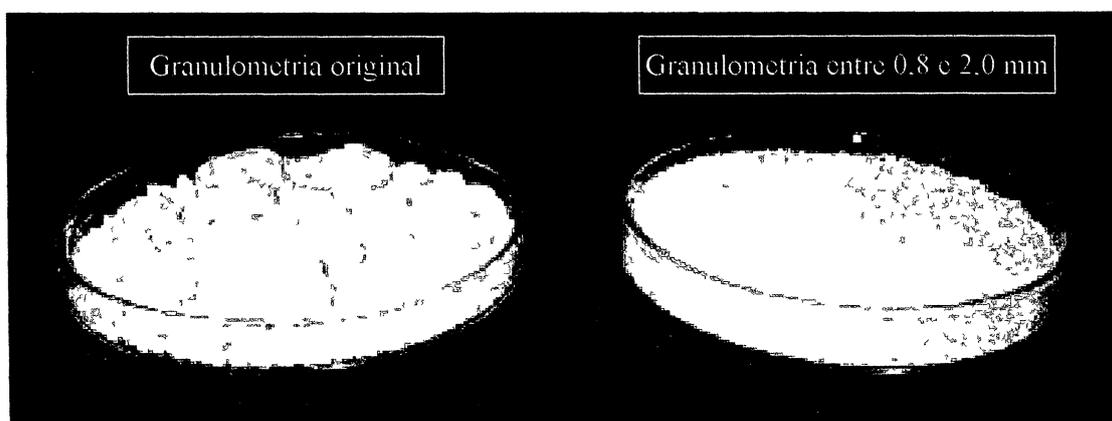
3.2 SUBSTRATO

O bagaço de mandioca (BM), utilizado como substrato/suporte na produção do AC por FES, foi gentilmente fornecido pela AGROINDUSTRIAL PARANAENSE DE POLVIHO LTDA, localizada na cidade de Paranavaí (PR)

3.2.1 Pré-tratamento mecânico do bagaço de mandioca

O BM foi inicialmente triturado em moinho de discos e peneirado de forma a obter granulometria entre 0,8 e 2,0 mm (KOLICHESKI, 1995; VANDENBERGHE, 2000) A figura 11 mostra o BM com a granulometria original e com a granulometria utilizada nas fermentações

FIGURA 11 – BAGAÇO DE MANDIOCA COM DIFERENTES GRANULOMETRIAS



3.2.2 Caracterização físico-química do bagaço de mandioca

Na análise do BM utilizou-se a metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985) Foram determinados:

- Umidade método termogravimétrico (100-105°C),
- Cinzas método termogravimétrico (500-550°C),
- Lipídios extração com solvente em extrator de Soxhlet,
- Fibras método gravimétrico;

- Proteínas método de Kjeldahl,
- Carboidratos método da diferença de 100

O teor de amido presente no BM foi determinado de acordo com o método enzimático proposto pela “National Starch Chemical Corporation” (1985) O mesmo método foi utilizado para determinar o teor de amido residual no substrato fermentado e será descrito mais adiante

3 2 3 Pré-tratamento térmico do bagaço de mandioca

A gelatinização do amido presente no BM foi realizada em frascos onde o substrato foi misturado com uma quantidade de água que corresponde a uma parte da umidade inicial necessária, o que permitiu a adição posterior da solução nutritiva usada na FES Segundo VANDENBERGHE (2000), a maior produção de AC é obtida adicionando-se 110 g de água em cada 100 g de BMS Após passar pelo tratamento mecânico, foi feita adição de água e a mistura foi mantida a temperatura de 121°C durante 20 minutos A estrutura do amido, quando gelatinizado, perde sua forma cristalina tornando-se poroso, o que favorece o ataque das enzimas secretadas pelo fungo

3 2 4 Homogeneização do substrato

Nas fermentações em que se utilizou quantidades de BM termicamente tratado diferentes de 0 ou 100%, o BM cru foi simplesmente adicionado ao BM tratado e resfriado e a mistura foi homogeneizada manualmente

3 3 SOLUÇÃO SALINA

A solução salina utilizada neste trabalho foi otimizada por VANDENBERGHE (2000) A solução constituída de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0105 g/l), KH_2PO_4 (1,86 g/l) e uréia (2,93g/l) foi esterilizada a 121°C durante 15 min Depois de resfriada à temperatura ambiente adicionou-se metanol (4% v/v) em condições estéreis

3.4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

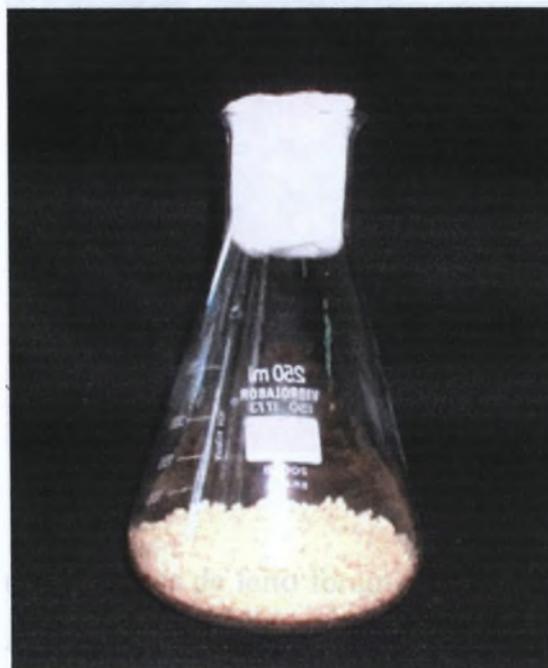
Quanto ao tipo de aeração, na produção de AC foram utilizados dois sistemas diferentes de fermentação: a aeração por difusão ou aeração natural, com a qual foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyer e bandejas, e aeração por convecção ou aeração forçada, usada na fermentação em biorreator tipo tambor horizontal.

3.4.1 Aeração por difusão

3.4.1.1 Fermentação em frascos Erlenmeyer

Foi utilizada uma quantidade de 10 g de BM por frasco Erlenmeyer de 250 ml. O substrato pré-tratado foi impregnado com a solução salina de modo a obter uma umidade inicial de 70%. O pH do substrato foi ajustado para 5,5-6,0, inoculado com uma suspensão de esporos a uma taxa de 10^7 esporos/g de BM seco e, depois de homogeneizado, foi incubado em estufa a 30°C durante 144 horas. A figura 12 mostra uma FES conduzida em frasco Erlenmeyer.

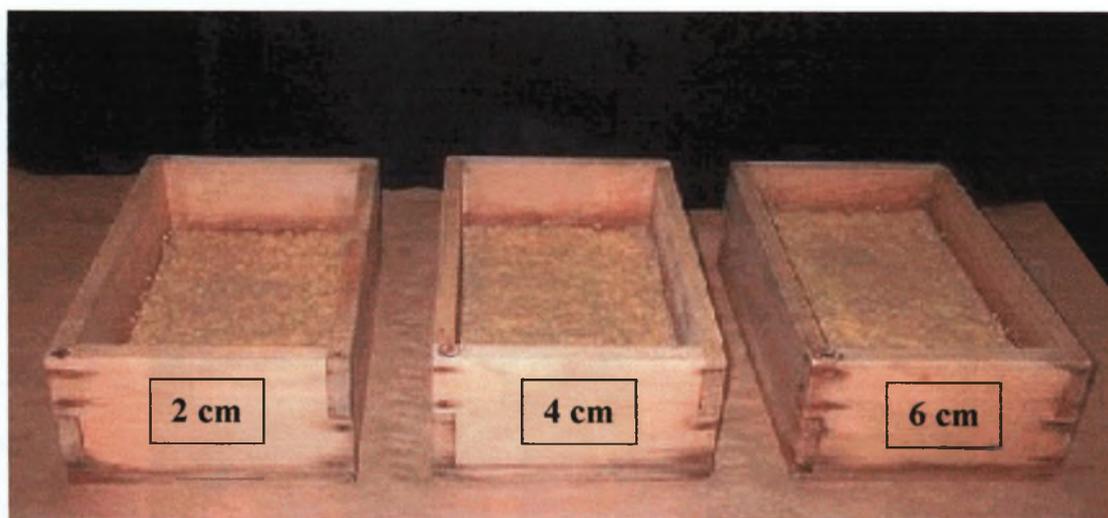
FIGURA 12 – FES EM FRASCO ERLENMEYER



3.4.1.2 Fermentação em bandejas

O substrato pré-tratado foi impregnado com a solução nutritiva de modo a obter uma umidade inicial de 70%. O pH do substrato foi ajustado para 5,5-6,0 e inoculado a uma taxa de 10^7 esporos/g de BM seco com uma suspensão de esporos. Depois de homogeneizado, o substrato foi disposto em bandejas de modo a obter as espessuras a serem testadas, como apresentado na figura 13. SOCCOL (1994) estudou o efeito da espessura do leito de fermentação na biotransformação do bagaço de mandioca por *Rhizopus oryzae* em biorreator tipo bandeja. Após testar espessuras de 1, 2, 4, 6 e 8 cm, observou que após 18-20 horas de fermentação a temperatura interna do leito com 6 e 8 cm de espessura atingiu valores superiores a 40°C. Baseando-se neste fato, foram testadas neste trabalho as espessuras do leito de fermentação de 2, 4 e 6 cm, pois a temperatura excessiva do substrato poderia prejudicar o desenvolvimento do fungo e conseqüentemente a produção de ácido cítrico.

FIGURA 13 – FES EM BANDEJAS COM 2, 4 E 6 CM DE ESPESSURA DE SUBSTRATO



Para obter estas espessuras de leito foram utilizadas respectivamente 150, 300 e 450 g de BM seco. As bandejas foram mantidas em uma sala a 30°C em ambiente saturado e com controle de temperatura e umidade. Apesar desta umidade ser mantida em torno de 97%, observou-se que no decorrer da fermentação a superfície do

substrato ressecava e, conseqüentemente, havia uma rápida esporulação do microrganismo. Para retardar a esporulação, passou-se a umedecer o substrato com água, 2 a 3 vezes ao dia. O tempo de incubação para este biorreator foi de 120 horas.

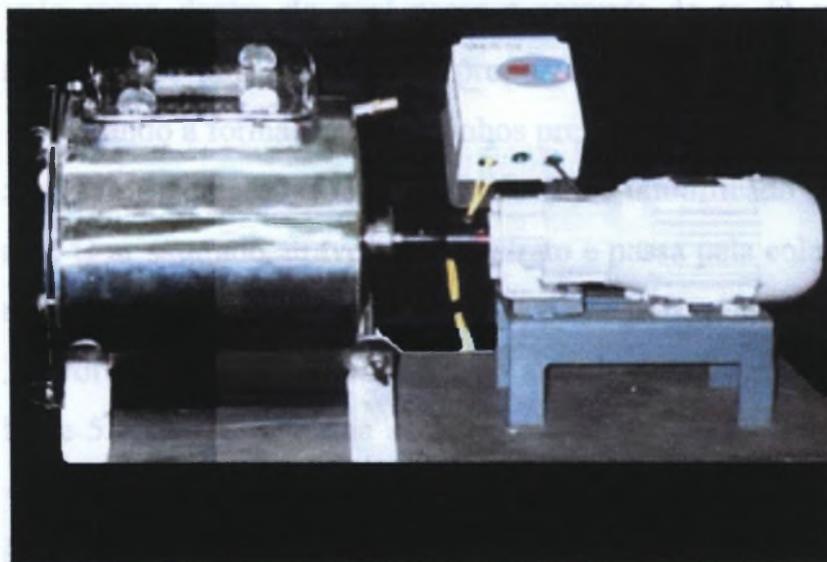
3.4.2 Aeração por convecção

3.4.2.1 Fermentação em biorreator tipo tambor horizontal

No biorreator tipo tambor horizontal (TH) foi utilizada uma quantidade de 2 kg de BM. O substrato pré-tratado foi impregnado com a solução nutritiva de modo a obter uma umidade inicial de 60%. Neste caso foi utilizada uma umidade menor que a utilizada em frascos Erlenmeyer e em bandejas para evitar a aglomeração das partículas do substrato durante o revolvimento do material, fato este observado visualmente nas primeiras fermentações feitas com 70% de umidade.

O pH do meio foi ajustado para 5,5-6,0 e inoculado com uma suspensão de esporos a uma taxa de 10^7 esporos/g de substrato seco. Depois de homogeneizado, o substrato inoculado foi transferido para o biorreator TH (figura 14).

FIGURA 14 – BIORREATOR TIPO TAMBOR HORIZONTAL



Após 20 horas de fermentação iniciou-se a aeração do meio. Este retardamento do início da aeração apresenta efeito positivo na produção de AC pelo *A. niger* usando BM (VANDENBERGHE, 2000)

Na fermentação em TH foi utilizada a temperatura ambiente. Para o cálculo do fluxo de ar a ser inserido no biorreator baseou-se no fluxo usado por VANDENBERGHE (2000) na FES em colunas aeradas, com 70% de umidade inicial, que foi de 3 ml/min/g. Assim, para um total de 2000 g de substrato, o fluxo de ar a ser utilizado seria de 6 l/min. Como a umidade utilizada em TH foi menor, padronizou-se o fluxo de ar em 5 l/min para evitar que o substrato ressecasse muito rapidamente. Mesmo assim, o substrato foi umedecido esporadicamente com água evitando a rápida esporulação do fungo. O ar saturado foi inserido continuamente no interior do TH e o material foi revolvido 3 a 4 vezes por dia. O tempo de incubação foi de 144 horas.

3.4.2.2 Descrição e funcionamento do biorreator tipo tambor horizontal

O conjunto de dispositivos para FES em TH está representado esquematicamente na figura 15. O biorreator TH (4) foi construído em aço inox 360, possui 32 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento. Seu volume total é de 24 l, possui capacidade de até 10 kg de substrato úmido e opera em batelada. O sistema de aeração envolve um duplo casco dentro do qual passa a corrente de ar. O casco interno é perfurado e revestido por uma tela, o que proporciona o envolvimento de todo o substrato pelo ar, evitando a formação de caminhos preferenciais.

O ar captado no compressor (1) é filtrado (2) e umidificado (3) antes de ser inserido no reator. O ar saturado atravessa o substrato e passa pela coluna de sílica (9) evitando que a umidade presente na corrente de ar passe pela coluna do cromatógrafo gasoso (11). O revolvimento do substrato é feito através de pás paralelas ao casco, a uma velocidade de 5 rpm. Desta forma a agitação é feita por tombamento e não por cisalhamento do material. As pás também são de aço inox 360, exceto sua parte inferior a qual é revestida com Celeron, material que evita o desgaste da superfície interna do equipamento.

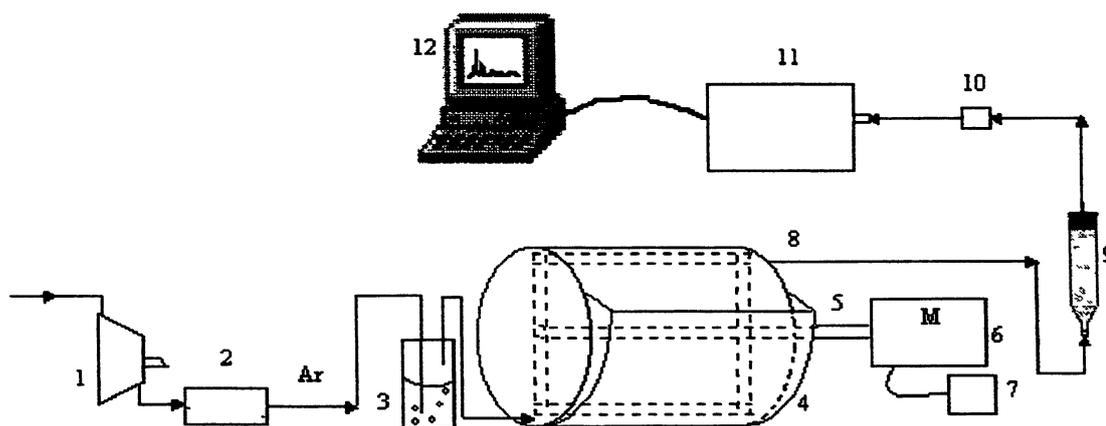
3 5 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA

A produção de CO₂ e o consumo de O₂ foram continuamente monitorados através da análise dos gases gerados durante a produção de AC em TH O metabolismo respiratório do fungo está intimamente ligado ao seu desenvolvimento Portanto, a análise respirométrica foi utilizada para estimar a biomassa fúngica sintetizada pelo *A niger*

3 5 1 Cromatografia gasosa

O sistema de análise de gases (figura 15) é constituído de um cromatógrafo gasoso (SHIMADZU GC-8A) ligado a um computador (COMPAQ-XT386) O cromatógrafo possui um detector de condutividade térmica e um forno O forno permite regular a temperatura da coluna e do detector A presença do injetor automático assegura a tomada de amostra automática e continuamente

FIGURA 15 – ESQUEMA DO BIORREATOR TH E DISPOSITIVOS DE ANÁLISE DE GASES



- | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| (1) Compressor de ar | (7) Controlador da velocidade da pa |
| (2) Filtro de ar | (8) Saída de ar |
| (3) Umidificador de ar | (9) Coluna de sílica gel |
| (4) Biorreator TH | (10) Injetor automatico |
| (5) Eixo da pa acoplado ao motor | (11) Cromatografo em fase gasosa |
| (6) Motor | (12) Computador |

A separação dos componentes CO₂, O₂, N₂, CH₄ e CO, em diferentes tempos de retenção, é feita em uma coluna dupla concêntrica (Alltech CTR1) com a parte externa formada de um filtro molecular e a parte interna de uma mistura de polímeros porosos (KOLICHESKI, 1995, BRAND, 1999)

Cada gás apresenta uma condutividade térmica diferente, assim é necessário calibrar o detector antes de proceder à análise dos gases a serem medidos (CO₂, O₂ e N₂) Nas condições acima especificadas, a coluna Alltech separa os componentes mostrados na tabela 7 em seus respectivos tempos de retenção

TABELA 7 – TEMPO DE RETENÇÃO DE ALGUNS GASES SEPARADOS PELA COLUNA ALLTECH

| Componente | Tempo de retenção (min) |
|-----------------|-------------------------|
| Ar | 0,62 |
| CO ₂ | 0,95 |
| O ₂ | 5,72 |
| N ₂ | 8,02 |

3.5.2 Análise respirométrica

Para o cálculo da concentração dos gases foi utilizado o programa CHROMA que realiza a integração dos cromatogramas registrados. A partir dos dados de consumo de O₂ e formação de CO₂ pode-se estabelecer as curvas que representam a cinética de crescimento do microrganismo.

As análises permitem medir diretamente a velocidade instantânea da evolução do gás (derivada) ou determinar sua produção global (integral). Os resultados da respirometria (em mg/h/g de matéria seca inicial) são calculados pela equação 2

$$dCO_2 \text{ ou } dO_2 = \frac{(CO_2 \text{ ou } (21 - O_2)) \times Fluxo \times 60 \times a \times b}{Peso \times \%MSI \times 100} \quad (2)$$

onde

CO₂ ou O₂ = teor destes gases no ar (%),

Fluxo = fluxo de ar (ml/min),

Peso = quantidade de substrato no TH (g),

%MSI = teor de matéria seca inicial (%),

b = peso molecular do CO₂ ou do O₂

a = variável calculada pela equação 3

$$a = \frac{P}{R \times T} = \frac{0,7697368}{0,08206 \times (T + 273)} \quad (3)$$

onde

T = temperatura de operação

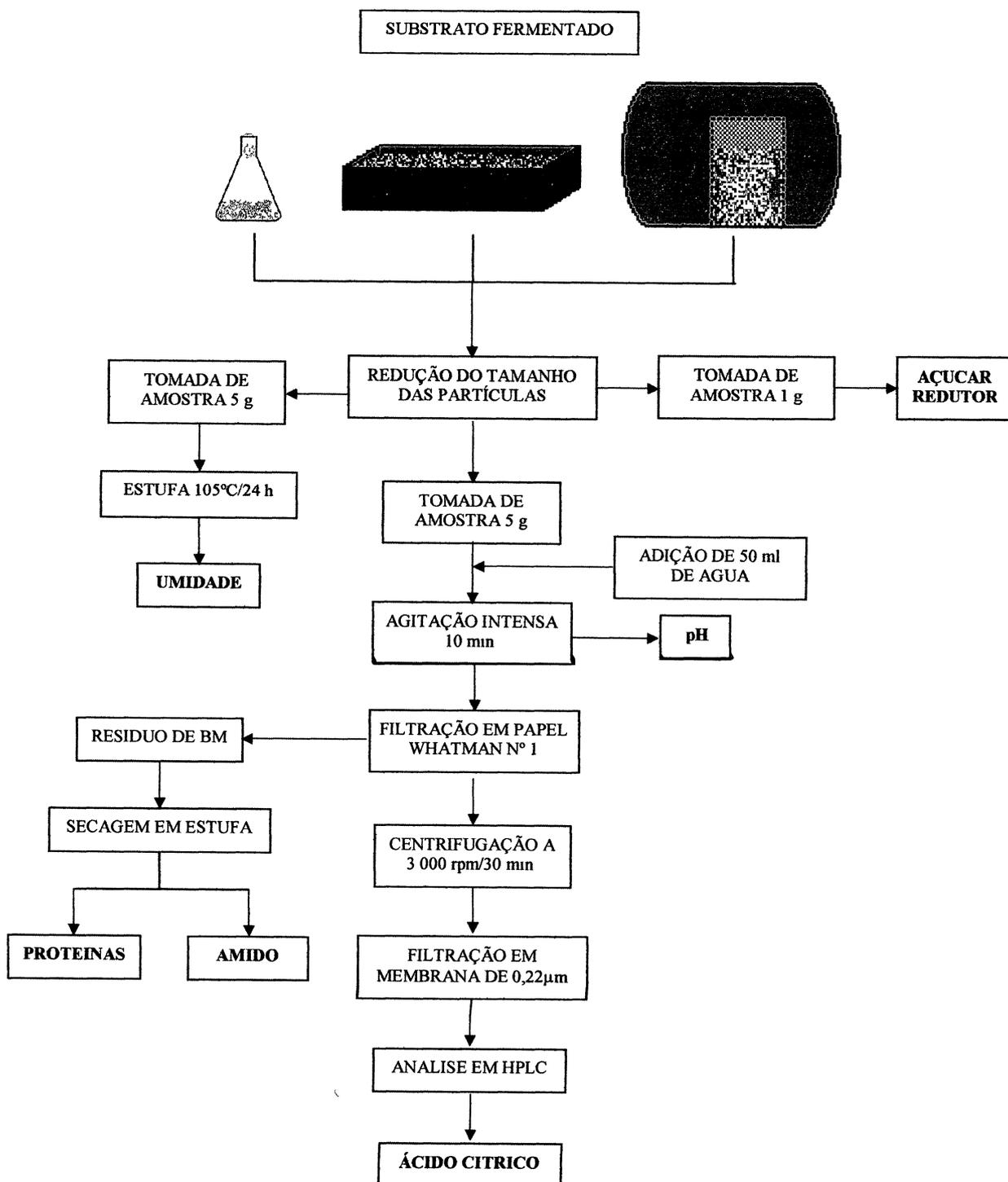
O quociente respirométrico (QR) é determinado pela equação 4

$$QR = \frac{CO_2 \text{ produzido}}{O_2 \text{ consumido}} \quad (4)$$

3.6 ANÁLISE DO SUBSTRATO FERMENTADO

O preparo do substrato, para cada determinação, foi feito seguindo o esquema apresentado na figura 16. Inicialmente foi feita a redução do tamanho e homogeneização das partículas dos fermentados obtidos em frascos Erlenmeyer, bandejas e TH. Foi retirada 1 g de amostra para a determinação de açúcares redutores, 5 g permaneceram em estufa a 105°C durante 24 para a determinação da umidade e 5 g foram misturadas a 50 ml de água. Esta suspensão permaneceu sob agitação intensa durante 10 min e foi filtrada em papel de filtro. O resíduo foi seco em estufa a 105°C durante 24 para realizar a determinação de proteínas e de amido residual. O filtrado foi centrifugado a 3000 rpm durante 30 min, filtrado em membrana de éster de celulose com 0,22 µm de poro e analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Foi determinada então a concentração de AC em g/l. Todas estas determinações foram feitas em triplicata.

FIGURA 16 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DO SUBSTRATO



3 6 1 Umidade

A umidade do substrato foi determinada utilizando o método termogravimétrico segundo a metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985) Cerca de 5 g de amostra foi pesada em balança analítica e seca em estufa a 105°C durante 24 h Depois de seca, a amostra foi resfriada em dessecador contendo sílica gel e novamente pesada na mesma balança O cálculo da umidade foi feito utilizando-se a equação 5

$$Umidade(\%) = \frac{A \times 100}{P} \quad (5)$$

onde

A = diferença de pesos antes e depois da secagem (g),

P = peso inicial da amostra (g)

3 6 2 pH

O pH do substrato foi determinado pelo método potenciométrico Utilizou-se uma suspensão de 5 g de fermentado em 50 ml de água a qual permanece em agitação contínua durante 10 minutos em agitador mecânico

3 6 3 Proteínas

A proteína real presente na amostra foi determinada pelo método de STUTZER (VERVACK, 1973). Neste método, as proteínas são precipitadas a quente com sulfato de cobre em meio alcalino O precipitado é filtrado e lavado com água e posteriormente com álcool desnaturado com 3% de éter O nitrogênio foi dosado pelo método de KJELDAHL e utilizou-se o fator 6,25 para determinar o teor de proteínas presente no material (SÃO PAULO, 1985)

3 6 4 Ácido cítrico

Após a determinação do pH (item 3 6 2), a suspensão foi filtrada em papel Whatman nº 1 e centrifugada a 2 500 rpm durante 30 minutos. A solução foi então filtrada em membrana MILLIPORE de 0,45 µm e analisada em cromatógrafo líquido 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 87H1,
- Fase móvel H₂SO₄ 5 mM degaseificada com hélio, à vazão de 0,6 ml/min e à temperatura de 60°C

A expressão dos resultados dos metabólitos analisados em CLAE é feita usando a equação 6

$$\text{Ácido cítrico (g/kg de BMS)} = \left(\frac{C \times F \times V}{P \times M} \right) \times 100 \quad (6)$$

onde

C = concentração de ácido cítrico dosado pelo CLAE (g/l),

F = fator de diluição,

V = volume de água utilizada na extração (ml),

P = peso da amostra (g),

M = % de matéria seca (100 - % umidade)

3 6 5 Amido residual

O amido residual presente no BM fermentado foi determinado de acordo com o método enzimático proposto pela “National Starch Chemical Corporation” (1985). Utilizou-se a enzima α-amilase Thermamyl 120 L (Novo Nordisk). Uma amostra de 4 g de fermentado previamente lavado e seco foi misturada a 100 ml de água. O pH foi

ajustado para 6,0-6,5 com uma solução de NaOH 1N Adicionou-se 1 ml da enzima e a solução foi incubada a 95°C por 15 min Filtrou-se a suspensão em papel de filtro previamente seco e pesado O resíduo foi lavado e seco em estufa a 105°C durante 1 hora O teor de amido é calculado pela equação 7

$$\text{Amido (\%)} = \frac{(P - B) 100}{P} \quad (7)$$

onde

P = peso da amostra (g),

B = peso do material retido no papel filtro (g)

3 6 6 Açúcares redutores

Para a determinar o teor de açúcares redutores presentes na amostra foi feita uma hidrólise usando de 1 a 2 g da amostra e 50 ml de água Após 10 minutos em banho-maria, o conteúdo foi completado com água para 100 ml

A suspensão foi filtrada e diluída Os açúcares foram então determinados pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944, SOMOGYI, 1945), fundamentado na ação da glucose reduzindo o reativo alcalino de óxido cuproso Este, em presença do reativo arseno-molibdato de sódio (reagente de Nelson), forma um complexo azul estável de óxido de molibdênio, o qual é medido por fotolorimetria em comprimento de onda de 535 nm

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

A composição centesimal do bagaço de mandioca (BM) parcialmente seco foi feita com o objetivo de se determinar as características do substrato utilizado neste estudo. As determinações foram feitas em triplicata e as médias dos resultados obtidos, em g/100g de BM, são apresentadas na tabela 8.

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO BAGAÇO DE MANDIOCA PARCIALMENTE SECO

| Constituinte | Media (g/100g de BM) |
|--------------|----------------------|
| Umidade | 10,34 |
| Cinzas | 1,59 |
| Lípidios | 0,25 |
| Fibras | 11,56 |
| Proteínas | 1,37 |
| Amido | 56,23 |

Como já foi visto na tabela 6, a composição centesimal do BM não varia muito em termos de cinzas, lípidios e proteínas. Porém, o teor de fibras, provavelmente de origem celulósica, e o teor amido podem variar bastante, dependendo da tecnologia empregada na industrialização da mandioca.

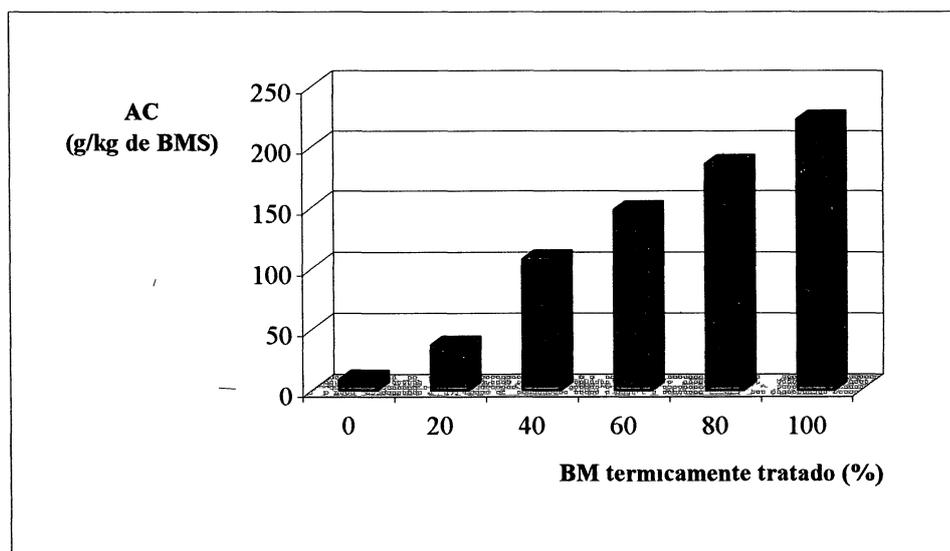
A presença do teor elevado de amido torna o BM uma excelente fonte de carbono, além de ótimo suporte para a FES. Enzimas produzidas por algumas cepas de *A. niger* são capazes de hidrolisar o amido e converter a glicose em ácidos orgânicos (KOLICHESKI, 1995).

4.2 ENSAIOS EM FRASCOS ERLLENMEYER

A FES em frascos Erlenmeyer foi realizada com o intuito de prever o comportamento do fungo, em relação à produção de ácido cítrico, quando se utilizam quantidades variadas de BM termicamente tratado. Além disso, a quantidade de material a ser manipulado quando se trabalha em escala semipiloto é muito maior do que em escala laboratorial. Dessa forma, os resultados das fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer fornecem uma boa noção das melhores condições a se trabalhar em maior escala.

Os resultados da produção de AC em frascos Erlenmeyer usando diferentes quantidades de BM termicamente tratado são apresentados na figura 17.

FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM FRASCOS ERLLENMEYER USANDO DIFERENTES PORCENTAGENS DE BAGAÇO DE MANDIOCA TERMICAMENTE TRATADO



O melhor resultado foi atingido com 100% de BM termicamente tratado. Nesta condição, a produção de AC foi de 222,08 g/kg de BM seco. Com 0% de BM tratado, a produção de AC foi praticamente insignificante (8,06 g/kg de BM seco).

A figura 17 mostra que o uso de teores mais elevados de BM tratado conduz à maior produção de ácido cítrico. Este fato prova que a gelatinização do amido presente no BM é essencial ao desenvolvimento microbiano sobre o suporte/substrato sólido.

(VANDENBERGHE, 2000) Quanto maior a quantidade de amido gelatinizado, mais facilmente os micélios do fungo invadem o substrato. O bom desenvolvimento do microrganismo no substrato, conseqüentemente, leva à produção de quantidades maiores de ácido cítrico.

Os resultados mostram ainda a viabilidade de se trabalhar com uma determinada porção de BM cru, misturado ao BM tratado termicamente. O uso do BM cru reduz o custo da produção do AC, pois diminui o consumo de energia utilizada no tratamento térmico do substrato.

4.3 ENSAIOS EM BIORREATOR TIPO BANDEJA

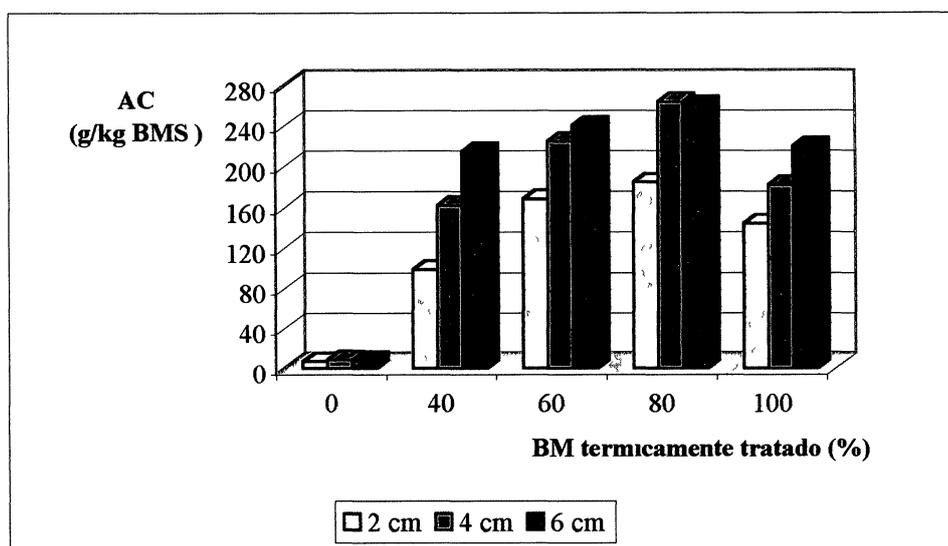
Foram realizadas fermentações em bandejas com 0, 40, 60, 80 e 100% de BM termicamente tratado. Em cada caso, também foram testadas as espessuras de 2, 4 e 6 cm de substrato. Os resultados mostrados na figura 18 indicam que há uma maior produção de ácido cítrico quando são utilizadas camadas de substrato mais espessas.

A fermentação com 0 % de BM tratado produziu quantidades de AC muito baixas, confirmando as expectativas geradas pela fermentação em frascos Erlenmeyer. A maior produção de AC foi de 263,65 g/kg de BMS em 4 cm de espessura de substrato e com 80% de BM termicamente tratado. Em todas as espessuras de substrato, a produção de AC em biorreator tipo bandeja com 80% de BM tratado foi superior, quando comparada às demais condições de fermentação em bandejas, usando quantidades diferentes de BM tratado. Este fato apresenta como vantagens a redução no custo do tratamento térmico do BM e a viabilidade de se trabalhar com uma porcentagem de BM cru. Além disso, quando se emprega camadas mais altas de substrato, utiliza-se um maior volume útil da bandeja, o que também favorece os custos de produção de AC.

O estudo da produção de AC pelo *A. niger* cultivado por FES em bandejas revelou a importância de se ter uma atmosfera rica em CO₂. A elevada pressão parcial do CO₂ provavelmente retarda a liberação de esporos pelo fungo filamentososo, favorecendo a síntese do AC. A limitação do crescimento do fungo é um fator importante na produção do ácido. Estudos prévios comprovaram que a limitação no

crescimento provocada pela alta concentração de CO_2 conduz a um elevado acúmulo de AC (VANDENBERGHE, 2000)

FIGURA 18 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM BANDEJAS COM 2, 4 E 6 CM DE ESPESSURA DO SUBSTRATO USANDO DIFERENTES PORCENTAGENS DE BAGAÇO DE MANDIOCA TERMICAMENTE TRATADO



Pode ser observado na figura 18 que, quanto maior a espessura de substrato, maior a produção de AC. Foi comprovado visualmente que as camadas mais espessas de substrato tornavam-se mais compactas no decorrer da fermentação do que as camadas de menor espessura. Isto explica o fato de que em camadas mais compactas há maior acúmulo de CO_2 e conseqüentemente maior produção de AC. Estes resultados provam ainda que a aeração não é um fator determinante na produção de ácido cítrico. Os valores encontrados em 80% de BM tratado não seguiram esta tendência, mas neste caso, a produção de AC com 4 e 6 cm de espessura de substrato (263,65 e 260,31 g/kg de BM seco, respectivamente) não apresentaram diferença significativa.

A queda na produção de AC em 100% de BM tratado, observada na figura 18, mostra que as fermentações em bandejas não seguiram a tendência apresentada nas

fermentações em frascos Erlenmeyer, apesar destes dois tipos de biorreatores utilizarem o mesmo sistema de aeração por difusão. O que pode ter ocorrido é que, no caso das bandejas, a maior quantidade de substrato (em relação aos frascos Erlenmeyer) e a elevada porcentagem de BM tratado conduziram a uma maior compactação do substrato e conseqüentemente a um acúmulo de CO₂ muito elevado. Sabe-se que a limitação no crescimento do fungo causada por alta concentração de CO₂ conduz a um elevado acúmulo de AC, porém o excesso de CO₂, principalmente após 24 de fermentação provoca a queda no acúmulo de AC (VANDENBERGHE, 2000)

Neste caso observa-se ainda a possibilidade de se trabalhar com até 40% de BM cru. Quando comparados aos resultados obtidos com 100% de BM termicamente tratado, os valores da produção de AC usando 60% de BM tratado são superiores, em todas as espessuras de substrato. Assim, além da produção de AC ter sido maior com 60% de BM tratado, o custo para gelatinizar o amido presente no BM foi menor, já que se utilizou 40% de BM cru.

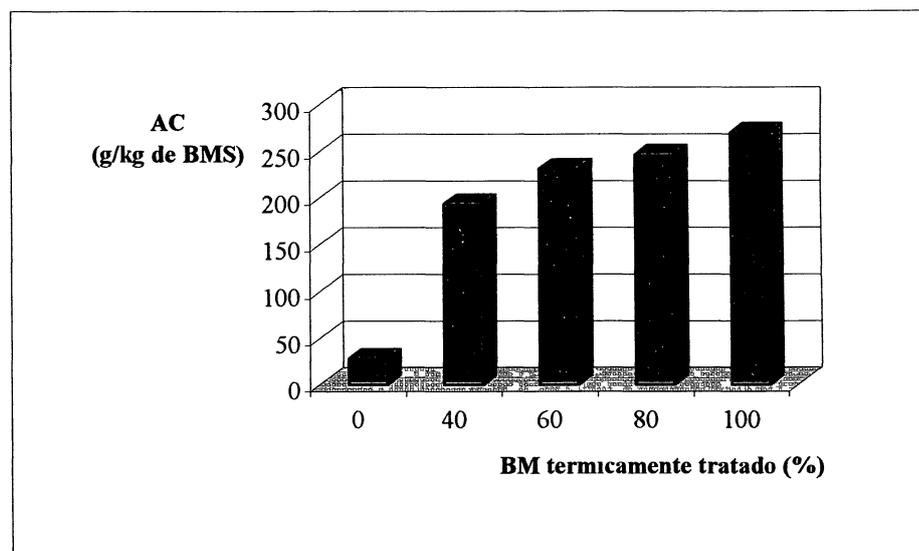
4.4 ENSAIOS EM BIORREATOR TIPO TAMBOR HORIZONTAL

As fermentações no biorreator tipo tambor horizontal (TH) foram testadas com 0, 40, 60, 80 e 100% de BM termicamente tratado. Os resultados da produção de ácido cítrico em cada caso são apresentados na figura 19.

A maior produção de AC em biorreator TH foi de 268,94 g/kg de BM seco usando 100% de BM termicamente tratado. Novamente a produção do ácido com 0% de BM tratado foi baixa (27,24g/kg de BM seco), porém, se comparado à produção de AC em frascos Erlenmeyer e bandejas com 100% de BM cru este valor é bem superior, representando um aumento em torno de 250%.

A influência da porcentagem de BM termicamente tratado na produção de AC foi claramente observada em frascos Erlenmeyer. Um fato muito similar foi observado no biorreator tipo TH, onde altas porcentagens de BM tratado são favoráveis.

FIGURA 19 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM TAMBOR HORIZONTAL USANDO DIFERENTES PORCENTAGENS DE BAGAÇO DE MANDIOCA TERMICAMENTE TRATADO



No biorreator tipo TH, a compactação do substrato não foi tão intensa quanto em bandejas porque o mesmo foi revolvido de três a quatro vezes ao dia. Com o decorrer da fermentação em TH, foi observada apenas a formação de pequenos grumos de partículas de substrato. Este fato, associado à aeração contínua do meio, provavelmente seja o motivo pelo qual neste tipo de biorreator o uso de porcentagens maiores de BM termicamente tratado produzem maiores concentrações de AC.

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE BANDEJA E TAMBOR HORIZONTAL

Para uma melhor visualização e comparação dos resultados da produção de AC obtidos na FES em bandejas e em TH, os dados foram dispostos na tabela 9.

Os dados mostram que a produção de AC foi maior em biorreator tipo TH quando comparada à produção em biorreator tipo bandeja, com 2 cm de espessura de substrato, em todas as porcentagens de BM termicamente tratado. A produção de AC também foi superior em biorreator tipo TH com 0, 40, 60 e 100% de BM tratado em comparação às bandejas com 4 cm de espessura de substrato. E, somente com 0 e

100% de BM termicamente tratado, a produção de AC foi superior em biorreator tipo TH quando comparada à bandeja com 6 cm de espessura de substrato

TABELA 9 – COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM BIORREADORES TIPO BANDEJA E TAMBOR HORIZONTAL

| Quantidade de BM cru (%) | Quantidade de BM tratado (%) | Biorreator tipo tambor horizontal (g de AC/kg de BM seco) | Biorreator tipo bandeja (g de AC/kg de BM seco) | | |
|--------------------------|------------------------------|---|---|------|------|
| | | | Espessura do substrato | | |
| | | | 2 cm | 4 cm | 6 cm |
| 0 | 100 | 269 | 144 | 181 | 219 |
| 20 | 80 | 245 | 184 | 263 | 260 |
| 40 | 60 | 231 | 168 | 224 | 240 |
| 60 | 40 | 194 | 98 | 161 | 214 |
| 100 | 0 | 27 | 7 | 8 | 7 |

Usando 100% de BM cru a produção de AC foi bem maior em TH se comparada às fermentações em bandejas em todas as espessuras de substrato. Este resultado mostra que quando se trabalha com quantidades maiores de BM cru a aeração a aeração forçada é um fator positivo que leva ao maior acúmulo de ácido cítrico.

Outras observações importantes relacionadas a custo de produção devem ser consideradas. O tempo de fermentação em bandejas (120 h) é inferior ao tempo de fermentação em TH (144 h). Além disso, o consumo de energia para realizar uma fermentação em biorreator tipo bandeja também é menor, pois na fermentação em TH há a necessidade de aeração contínua e revolvimento esporádico do substrato.

A fermentação em bandejas é mais simples já que, após a inoculação do substrato, é necessário apenas umidificar a superfície do substrato para evitar o ressecamento muito rápido. Em biorreator tipo TH deve-se controlar a vazão de ar inserido no reator, a fim de mantê-la constante, deve-se revolver esporadicamente o substrato para evitar aquecimento excessivo do leito, o que prejudica a produção de

AC e o substrato deve ser umedecido algumas vezes evitando que ocorra esporulação muito rápida do *A niger*

4.6 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO

4.6.1 Evolução dos parâmetros da fermentação

Foi realizado um estudo cinético na condição em que se obteve a maior produção de ácido cítrico FES em biorreator tipo tambor horizontal com 100% de BM tratado. O tempo total de fermentação foi de 144 h. Este estudo foi realizado com o objetivo de acompanhar a evolução de alguns parâmetros no decorrer da fermentação. As determinações foram feitas em triplicata e os resultados obtidos encontram-se na tabela 10.

TABELA 10 – PARÂMETROS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FES DO BAGAÇO DE MANDIOCA PELO *A niger*

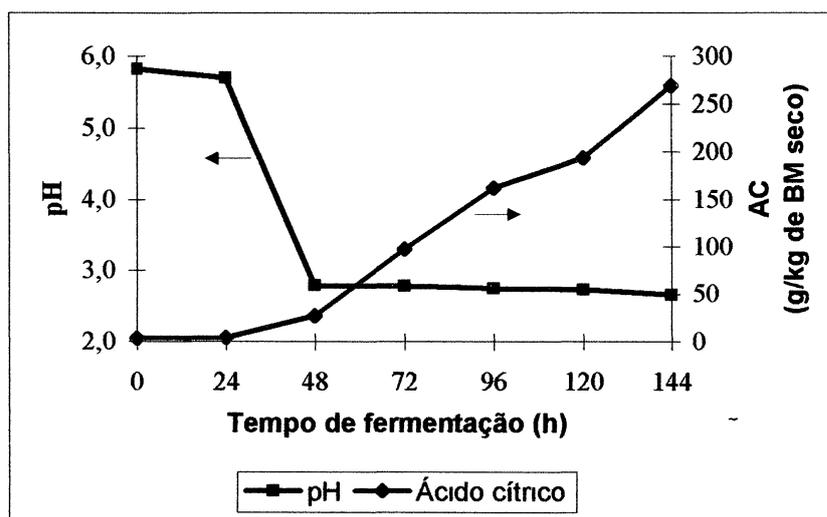
| Parâmetro | Tempo de fermentação (h) | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
| Acido cítrico (g/kg de BMS) | 3,25 | 3,73 | 27,14 | 96,76 | 161,56 | 193,56 | 268,94 |
| pH | 5,82 | 5,69 | 2,79 | 2,78 | 2,75 | 2,73 | 2,66 |
| Proteínas (g/100g de BMS) | 1,39 | 1,72 | 2,05 | 2,47 | 2,14 | 2,21 | 2,26 |
| Biomassa fungica (g/100 g de BMS) | 0,02 | 0,35 | 0,68 | 1,10 | 0,77 | 0,84 | 0,89 |
| Amido residual (g/100g de BMS) | 56,23 | 52,86 | 39,82 | 24,25 | 21,85 | 18,96 | 17,26 |
| Amido consumido (g/100g de BMS) | 0 | 3,37 | 16,41 | 31,98 | 34,38 | 37,27 | 38,97 |
| Açúcares redutores (g/100g de BMS) | 0,24 | 0,60 | 1,27 | 10,05 | 9,07 | 7,53 | 7,11 |

As figuras 20 e 21 mostram a evolução dos parâmetros cinéticos com o tempo de fermentação.

A redução do pH durante a fermentação, mostrada na figura 20, já era esperada devido à produção do AC e outros ácidos orgânicos. A maior queda do pH foi observada entre 24 e 48 h de fermentação. A partir daí, o pH manteve-se mais ou

menos constante entre 2,79 e 2,66. Exatamente nessa faixa de tempo em que houve uma queda mais acentuada no pH é que se observa o início do aumento na quantidade de AC produzido. Durante as primeiras 24 h de fermentação praticamente não foi observada a produção do metabólito. A maior produção de AC foi alcançada no intervalo de 120 e 144 h.

FIGURA 20 – EVOLUÇÃO DO pH E DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO NO DECORRER DA FERMENTAÇÃO



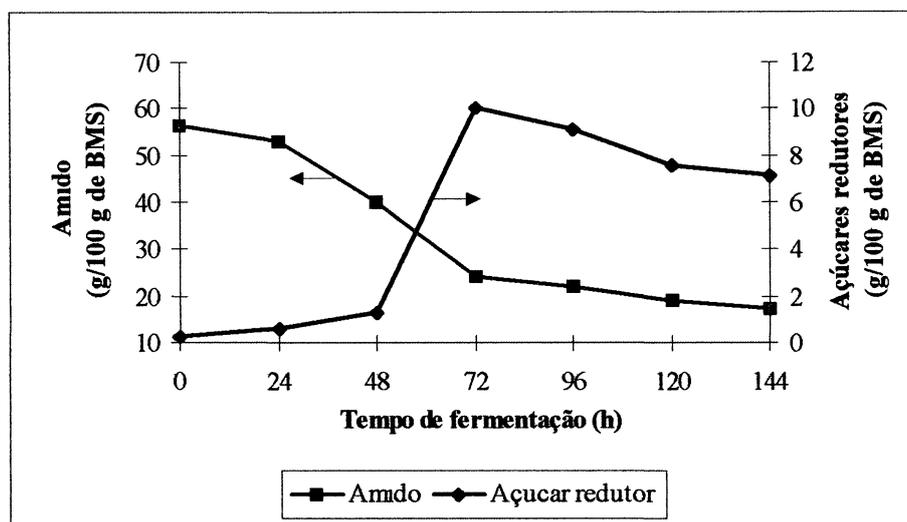
A redução de amido no decorrer da fermentação, mostrada na figura 21, foi causada pela quebra de suas moléculas em açúcares redutores pelo *A. niger*. Por esta razão, observa-se inicialmente um aumento na quantidade de glicose e logo após seu consumo pelo microrganismo. O maior aumento na quantidade de açúcares redutores, entre 48 e 72 h de fermentação, foi observado na mesma faixa de tempo em que houve maior consumo de amido.

4.6.2 Análise respirométrica

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 filamentoso penetram e se ligam fortemente ao substrato, dificultando sua separação do material e consequentemente a determinação direta da biomassa.

fúngica A biomassa celular pode ser estimada indiretamente através de medidas metabólicas O consumo de O_2 e a produção de CO_2 são resultado da respiração do fungo e estão associadas ao crescimento (RAIMBAULT, 1997)

FIGURA 21 – EVOLUÇÃO DOS TEORES DE AMIDO E AÇÚCARES REDUTORES NO DECORRER DA FERMENTAÇÃO



Para se estimar a taxa de consumo de O_2 (OUR) e a evolução da produção de CO_2 , em termos de fluxo volumétrico (l/h), foi realizado um balanço de massa Para um fluxo de ar na saída do fermentador F_S de 300 l/h e um fluxo de ar na entrada do fermentador de F_E , foram consideradas as seguintes equações

$$V_{O_2S} = \left(\frac{\%O_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (8)$$

$$V_{CO_2S} = \left(\frac{\%CO_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (9)$$

$$F_S = V_{O_2S} + V_{CO_2S} + V_{N_2S} \quad (10)$$

$$V_{N_2S} = \left(\frac{100 - \%O_{2S} - \%CO_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (11)$$

onde

V_{O_2S} = volume de O_2 na saída do biorreator,

$\%O_{2S}$ = porcentagem de O_2 na saída do biorreator,

V_{CO_2S} = volume de CO_2 na saída do biorreator,

$\%CO_{2S}$ = porcentagem de CO_2 na saída do biorreator,

V_{N_2S} = volume de N_2 na saída do biorreator

Sabendo-se que

$$V_{N_2E} = \frac{79}{100} \times F_E \quad (12)$$

$$V_{N_2E} = V_{N_2S} \quad (13)$$

onde

V_{N_2E} = volume de N_2 na entrada do biorreator,

chegou-se a seguinte equação que relaciona o fluxo de ar de entrada e de saída

$$F_E = \frac{(100 - \%O_{2S} - \%CO_{2S}) \times F_S}{79} \quad (14)$$

onde

V_{O_2CONS} = volume de O_2 consumido

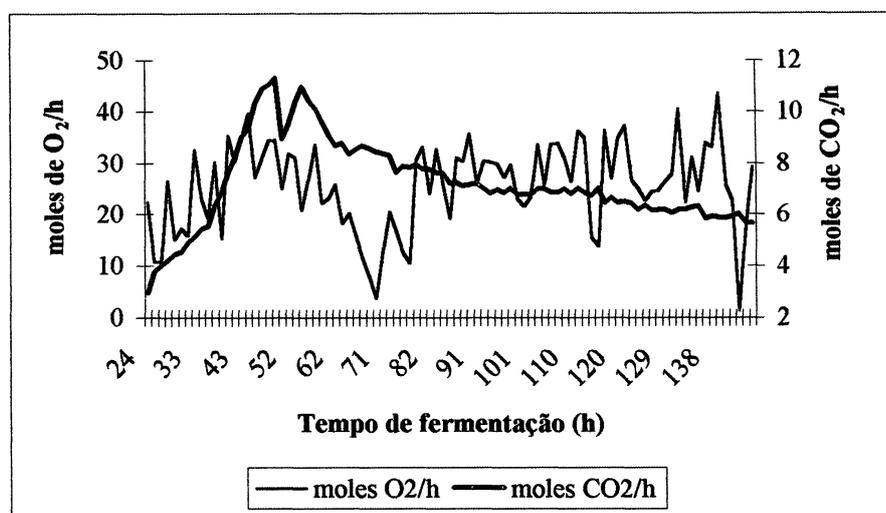
Para calcular o fluxo volumétrico de O_2 consumido fez-se um balanço de massa para o oxigênio obtendo-se a equação

$$V_{O_2CONS} = \left(\frac{21}{100} \right) \times F_E - \left(\frac{\%O_{2S}}{100} \right) \times F_S \quad (15)$$

Para estimar a taxa de consumo de O_2 e de produção de CO_2 , em moles/h, considerou-se o ar como gás ideal e os fluxos volumétricos V_{O_2CONS} e V_{O_2S} foram

corrigidos para a temperatura de 25°C. A evolução das taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ pelo *A. niger* no decorrer da fermentação estão na figura 22.

FIGURA 22 – PERFIL CINÉTICO DO CONSUMO DE O₂ E DA PRODUÇÃO DE CO₂ DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO



O modelo de consumo de oxigênio durante a fermentação completa em um sistema aeróbico é um modelo global que considera o consumo de O₂ para o crescimento e manutenção. A manutenção celular representa o metabolismo endógeno, sendo necessário realizar um balanço para o consumo de oxigênio (PANDEY *et al*, 2001).

Em termos gerais e considerando um processo no qual somente biomassa celular é produzida, e não metabólitos extra-celulares, pode-se dizer que

$$\begin{aligned} \text{O}_2 \text{ consumido} = & (\text{O}_2 \text{ empregado na síntese da biomassa celular} + \\ & \text{O}_2 \text{ empregado na manutenção da biomassa celular}) \end{aligned} \quad (16)$$

A taxa de consumo de oxigênio (OUR) em um processo é definida como

$$R_{\text{O}_2, \text{CONS}} = \frac{\Delta \text{O}_2}{\Delta t} \quad (17)$$

onde

$$R_{O_2,CONS} = O_2 \text{ consumido em um intervalo de tempo } \Delta t \text{ (gO}_2\text{/h)}$$

O oxigênio empregado na síntese da biomassa (O_2_{SINT}) é obtido pela expressão

$$R_{O_2,SINT} = \frac{\Delta O_2_{SINT}}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (18)$$

onde

$$R_{O_2,SINT} = O_2 \text{ empregado na síntese da biomassa celular (g O}_2\text{/h),}$$

$Y_{X/O}$ = rendimento baseado no consumo de oxigênio para síntese da biomassa celular no intervalo de tempo considerado (g de biomassa/g O_2),

ΔX = biomassa sintetizada durante o intervalo de tempo considerado (g),

Δt = intervalo de tempo considerado (h)

O oxigênio empregado no processo endógeno é estimado pela expressão definida por Monod na qual emprega-se o conceito de coeficiente de manutenção da biomassa celular (PANDEY *et al*, 2001)

$$m_X = \frac{1}{X} \times \left(\frac{dS}{dt} \right)_{ENDOG} \quad (19)$$

onde

m_X = coeficiente de manutenção da biomassa celular (g O_2 x g biomassa⁻¹ x h⁻¹),

X = biomassa celular em um tempo t (g),

Considerando o O_2 como substrato pode-se postular que

$$R_{O_2,ENDOG} = \frac{\Delta O_2_{ENDOG}}{\Delta t} \quad (20)$$

onde

$$R_{O_2,ENDOG} = O_2 \text{ empregado no processo endógeno (g O}_2\text{/h)}$$

Relacionando as equações (16) a (20) obtém-se a seguinte expressão

$$\frac{\Delta O_2}{\Delta t} = \frac{1}{Y_{X/O}} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} + m_X X \quad (21)$$

A equação (21) permite estimar a quantidade de biomassa celular que existe em um tempo t de fermentação através de dados do consumo de oxigênio por determinações finitas do seu consumo em intervalos de tempo particulares. Integrando a equação (21) pode-se afirmar que

$$\int_{t=0}^{t=n} R_{O_2,CONS} dt = \int_{t=0}^{t=n} \frac{1}{Y_{X/O}} dt + \int_{t=0}^{t=n} m_X X dt \quad (22)$$

O termo $\int R_{O_2,CONS}$ na equação (22) indica que o oxigênio consumido em um tempo t = n pode ser estimado da relação entre OUR versus tempo. Uma solução para a equação diferencial (22) foi postulada por métodos numéricos. Aplicando a regra do trapézio para a integração numérica do primeiro termo na expressão tem-se que

$$\int_{t=0}^{t=n} \frac{dO_2}{dt} dt \approx \frac{\Delta t}{2} \left\{ \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + 2 \left[\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=1} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=2} + \dots + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n-1} \right] + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right\} \quad (23)$$

onde

$$\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=1} = O_2 \text{ consumido no intervalo de tempo } 1 \text{ (g O}_2\text{/h)},$$

Δt = intervalo de tempo considerado na estimativa (h)

Considerando constante o rendimento baseado no consumo de O_2 ($Y_{X/O} = k$), obtém-se

$$\int_{t=0}^{t=n} \frac{1}{Y_{X/O}} dX = \frac{1}{Y_{X/O}} (X_n - X_0) \quad (24)$$

onde

X_0 = biomassa no início do intervalo de tempo Δt (g),

X_n = biomassa no final do intervalo de tempo Δt (g),

O valor do último termo da expressão (22) é obtido usando o mesmo procedimento para a obtenção da expressão (23) e considerando o coeficiente de manutenção da biomassa celular constante ($m_X = k$)

$$\int_{t=0}^{t=n} m_X X dt \approx m_X \frac{\Delta t}{2} [X_{t=0} + 2(X_{t=1} + X_{t=2} + \dots + X_{t=n-1}) + X_{t=n}] \quad (25)$$

Relacionando as equações (22) a (25) obtém-se a seguinte equação (SATO *et al*, 1983)

$$X_n = \left(Y_{X/O} \Delta t \left\{ \frac{1}{2} \left[\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right] + \sum_{i=1}^{i=n-1} \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} \right\} + \left(1 - \frac{a}{2} \right) X_0 - a \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right) / \left(1 + \frac{a}{2} \right) \quad (26)$$

onde

$$a = m_X Y_{X/O} \Delta t$$

A partir dos valores calculados para a taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 , foi feita uma estimativa dos parâmetros biotecnológicos. O procedimento para o cálculo da biomassa celular em tempo qualquer (X_n) consistiu em assumir valores para o rendimento de biomassa baseado no consumo de O_2 ($Y_{X/O}$) e no coeficiente de manutenção da biomassa celular (m_X). Foi utilizado nos cálculos um programa denominado FERSOL (RODRIGUEZ-LEÓN *et al*, 1988)

Foram considerados sete valores de biomassa fúngica determinados analiticamente nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h de fermentação. O programa permitiu determinar os coeficientes da equação por aproximação sucessiva. A partir dos valores da taxa de consumo de O_2 e produção de CO_2 , obtidos experimentalmente, o sistema determinou um rendimento de biomassa celular ($Y_{X/O}$) de 4,372 g de biomassa/g de O_2 consumido e um coeficiente de manutenção da biomassa celular (m_X) de 0,0162 g de O_2 consumido \times (g de biomassa)⁻¹ \times (h)⁻¹

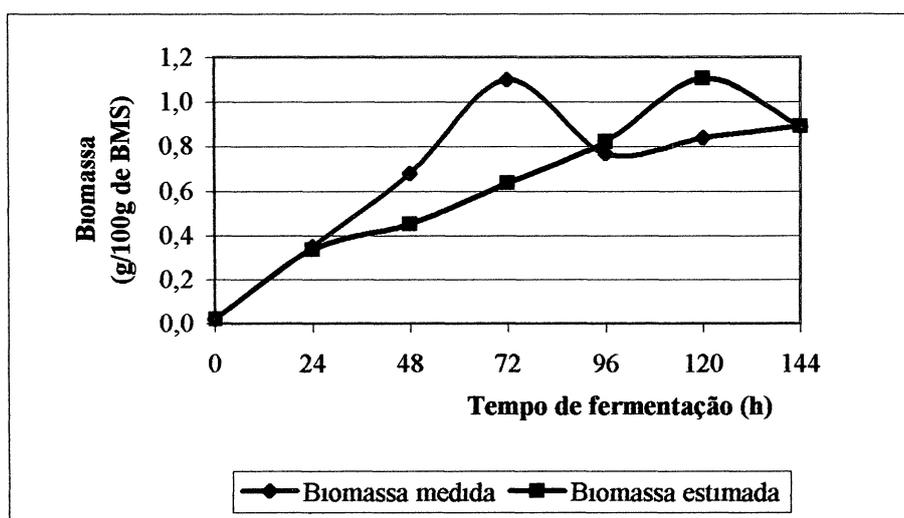
Na figura 23 são apresentados os resultados de biomassa fúngica obtidos analiticamente nos tempos considerados e determinados pela equação de X_n apresentada anteriormente. Com base nos dados de biomassa fúngica estimada, a

velocidade de crescimento específica para a fase de crescimento exponencial (μ_{max}) foi calculada por uma regressão de $\ln(X_n)$ pelo tempo de fermentação. Considerando os valores entre 24 e 72 horas de fermentação, foi obtido o valor de $0,055 \text{ h}^{-1}$, com um coeficiente de regressão de 1,0 e um desvio de 14,51%

A figura 23 mostra que as duas determinações de biomassa fúngica seguiram a mesma tendência ficando os picos de biomassa em torno de $1,1 \text{ g}/100\text{g}$ de BMS, porém, o pico de biomassa fúngica medida (72 h de fermentação) apresenta um certo “adiantamento” em relação ao pico de biomassa fúngica estimada (120 h)

A diferença observada entre biomassa fúngica estimada e medida, principalmente em 72 horas de fermentação (figura 23), é um indicativo de que o método indireto de determinação de biomassa celular, através do monitoramento em linha da produção de CO_2 , pode corrigir falhas apresentadas na determinação da biomassa celular por métodos analíticos

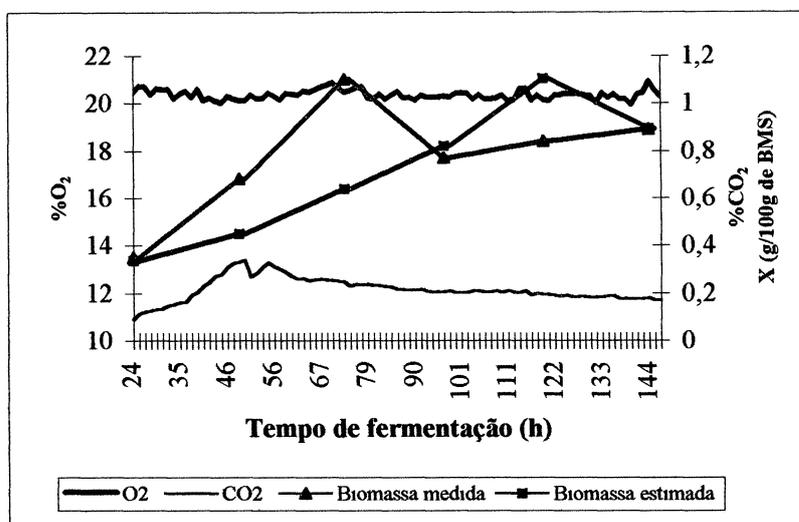
FIGURA 23 – COMPARAÇÃO ENTRE BIOMASSA FÚNGICA ESTIMADA E MEDIDA DURANTE A FERMENTAÇÃO DO BM PELO *A niger*



A solução nutritiva utilizada nas fermentações (VANDENBERGHE, 2000) foi eficientemente otimizada no sentido de maximizar a produção de ácido cítrico. Isto é

constatado pela produção de uma concentração mínima de biomassa fúngica (figura 23).

FIGURA 24 – EVOLUÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FES DO BAGAÇO DE MANDIOCA

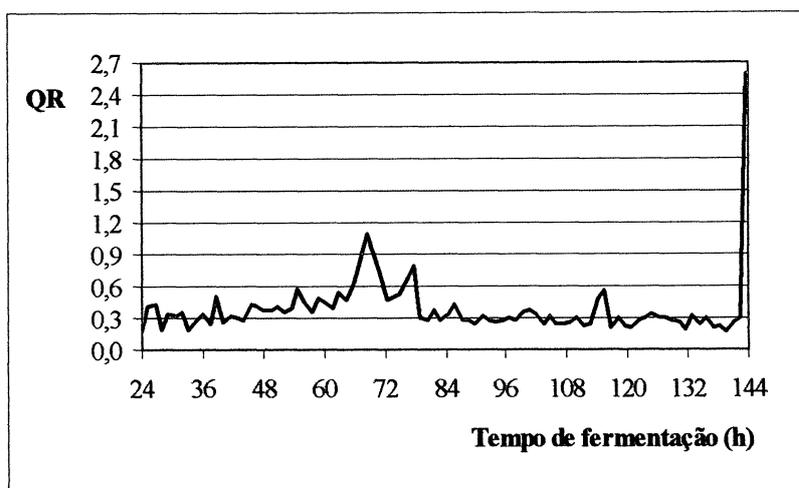


Na figura 24 percebe-se que a quantidade de O₂ utilizada para a produção de AC neste processo fermentativo foi pequena, mantendo-se próxima de 20,6%, e a quantidade de CO₂ liberada foi inferior a 0,4%. O pico da produção de CO₂ foi atingido em 50 h de fermentação, período em que a quantidade de AC produzida ainda estava próxima de 30g/kg de BMS. A produção de biomassa fúngica também foi baixa, não ultrapassando 1,2%.

Como a taxa de produção de CO₂ foi baixa, conseqüentemente a taxa de O₂ se manteve alta. Isto mostra que o microrganismo desvia seu metabolismo preferencialmente à produção de ácido cítrico, e não à formação de biomassa celular.

O coeficiente respirométrico (QR) do microrganismo foi determinado para avaliar o processo de fermentação em termos de CO₂ produzido e O₂ consumido. Os resultados do QR para cada tempo de fermentação são apresentados na figura 25.

FIGURA 25 – COEFICIENTE RESPIROMÉTRICO DO *A niger* DURANTE O PROCESSO DE FES DO BAGAÇO DE MANDIOCA



Observa-se na figura 25 que até um tempo de fermentação de 142 h, apesar de apresentar pequenas variações, o QR manteve-se em torno de 0,3. Isto significa que a quantidade de CO₂ produzida até este tempo de fermentação foi inferior à quantidade de O₂ consumida e, neste caso, o processo fermentativo apresentou as características de um sistema aeróbico. A partir daí, o QR começou a aumentar em virtude de um considerável aumento na produção de CO₂ em relação ao consumo de O₂.

4.6.3 Cálculo do rendimento

Com o decorrer da fermentação, a fonte de carbono presente no substrato foi consumida em quatro principais transformações (VANDENBERGHE, 2000)

- formação de biomassa celular,
- manutenção da biomassa celular,
- produção de metabólitos primários (ácido cítrico),
- produção de metabólitos secundários (negligenciável neste caso)

A biomassa celular do *A niger* utiliza a fonte de carbono para seu desenvolvimento. O rendimento proveniente desta transformação é representado por

$Y_{X/S}$ e medido em grama de biomassa celular por grama de substrato consumido Usando os dados da tabela 10, encontrou-se um valor para $Y_{X/S}$ de 0,023.

Para a energia utilizada na manutenção da biomassa celular, conhecida como coeficiente de manutenção (m_X) e dado em (grama de substrato consumido) x (grama de biomassa)⁻¹ x (h)⁻¹, foi encontrado um valor de 0,0162, como já foi visto anteriormente

A principal utilização da fonte de carbono, que é na produção de AC, é representada por $Y_{P/S}$ e dada em grama de AC produzido por grama de substrato consumido Da revisão de literatura (item 2 1 5), a glicose utilizada na síntese do AC seguiu duas vias reações de Embden Meyerhof Parnas (EMP), também chamada de via glicolítica, e reações do ciclo pentose-fosfato ou via das pentoses O rendimento teórico máximo da produção de AC pela via da glicólise, a qual converte uma molécula de glicose em uma molécula de AC, foi calculado por

$$Rdt = \frac{210}{180} = 1,167$$

Os cálculos foram feitos usando o peso molecular do AC monoidratado por ser a forma cristalina obtida industrialmente O rendimento teórico da produção de AC pela via das pentoses, na qual três moléculas de glicose são convertidas em duas e meia moléculas de AC, foi calculado por

$$Rdt = \frac{2,5 \times 210}{3 \times 180} = 0,9722$$

Considerando-se que 80% do substrato passou pela via glicolítica e 20 % pela via das pentoses (item 2 1 5), o rendimento teórico máximo, representado por $Y_{C/Smax}$ foi

$$Rdt = 0,80 \times 1,167 + 0,20 \times 0,9722 = 1,128$$

Feitas as considerações anteriores, a equação seguinte relaciona o rendimento teórico máximo baseado na quantidade de biomassa celular formada e substrato consumido

$$S = \frac{X}{Y_{X/S}} + m_X X t + \frac{C}{Y_{C/S_{max}}} \quad (27)$$

onde

S = substrato consumido (g/kg de fermentado seco),

X = biomassa celular formada (g/100g de fermentado seco),

$Y_{X/S}$ = coeficiente de conversão de substrato em biomassa celular,

m_X = coeficiente de manutenção da biomassa celular (g substrato x g biomassa⁻¹ x h⁻¹),

t = duração da fase estacionária (h),

C = AC produzido (g/kg de BMS),

$Y_{C/S_{max}}$ = rendimento teórico máximo

Rearranjando a equação 27

$$C = Y_{C/S_{max}} \left(S - \frac{X}{Y_{X/S}} - m_X X t \right) \quad (28)$$

Como o rendimento prático é $Y = C/S$, então

$$Y = \frac{Y_{C/S_{max}}}{S} \left(S - \frac{X}{Y_{X/S}} - m_X X t \right) \quad (29)$$

Conhecendo-se as variáveis $S = 389,7$ g/kg, $X = 0,89$ g/100g, $Y_{X/S} = 0,023$, $m_X = 0,0162$ g substrato x g biomassa⁻¹ x h⁻¹, $t = 72$ h e $Y_{C/S_{max}} = 1,128$, e substituindo na equação 29, chegou-se a um rendimento prático de

$$Y = \frac{1,128}{389,7} \left(389,7 - \frac{0,89}{0,023} - 0,0162 \times 0,89 \times 72 \right)$$

$$Y = 1,013 \text{ ou } 101,3\%$$

O rendimento global foi calculado pela seguinte relação

$$Y_G = \frac{AC \text{ produzido}}{\text{substrato consumido}} = \frac{268,94}{389,7} = 0,69$$

Na literatura não há dados em FES usando escala semipiloto para comparar a este valor. Assim, o rendimento global de 69% pode ser considerado satisfatório quando comparado ao rendimento teórico de 101,3%. Além disso, em escala laboratorial geralmente são obtidos rendimentos entre 70 e 90%. É natural que num aumento de escala o rendimento do processo caia um pouco.

5 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu avaliar o efeito da utilização de diferentes porcentagens de bagaço de mandioca termicamente tratado na produção de ácido cítrico pelo *Aspergillus niger*. A gelatinização do amido presente no substrato facilita seu consumo pelo fungo filamentososo e, conseqüentemente, a síntese de ácido cítrico.

Foram testados dois tipos diferentes de biorreatores em escala semipiloto: bandejas e tambor horizontal. A influência da porcentagem de bagaço de mandioca tratado apresentou maior relevância na produção de ácido cítrico em biorreator tipo tambor horizontal. No biorreator tipo bandeja, não há a necessidade de se utilizar porcentagens tão elevadas de bagaço de mandioca termicamente tratado. Neste caso, o fator de maior influência foi a espessura do leito. Espessuras de substrato maiores favoreceram a produção do ácido. Este fato também é um fator muito importante, pois permite o uso de maior volume útil no biorreator.

A maior produção de ácido cítrico, 268,94 g/kg de BM seco, foi atingida em biorreator tipo tambor horizontal com 100% de BM termicamente tratado. Apesar disto, a fermentação em bandejas apresentou algumas vantagens sobre o biorreator tipo tambor horizontal.

No biorreator tipo bandeja o gasto com energia foi inferior, o tempo de fermentação foi menor e houve maior simplicidade durante o processo fermentativo, principalmente no que diz respeito à manipulação do substrato. Estas vantagens superam a pequena diferença de 2% entre a maior produção do ácido em tambor horizontal e a maior produção em bandejas, que foi de 263,65 g/kg de BM seco com 80% de BM termicamente tratado e 4 cm de espessura de substrato. Observa-se ainda que nesta produção de ácido cítrico em bandejas foi utilizada uma menor porcentagem de bagaço de mandioca tratado (80%), quando comparado à produção em tambor horizontal (100%). Portanto, em termos de economia e simplicidade, o biorreator tipo bandeja foi o melhor modelo de reator utilizado neste estudo.

Da evolução de parâmetros cinéticos da fermentação do estado sólido do bagaço de mandioca pelo *Aspergillus niger*, como a taxa de produção de gás carbônico

e consumo de oxigênio, verificou-se que baixas taxas de respiração levam à produção de altas concentrações de ácido cítrico

Na melhor condição de fermentação, conduzida em biorreator tipo tambor horizontal, obteve-se um rendimento global de 69%. Em escala laboratorial são obtidos rendimentos entre 70 e 90%. É normal esta redução no rendimento, ao transferir o processo para uma escala maior, assim, o rendimento global obtido foi satisfatório

De modo geral, foram observadas grandes perspectivas na produção de ácido cítrico nos biorreatores em escala semipiloto do tipo tambor horizontal e tipo bandeja, usando o fungo *Aspergillus niger* LPB 21 e o bagaço de mandioca como substrato em fermentação no estado sólido

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- testar a produção de ácido cítrico em biorreator tipo bandeja usando 8 e 10 cm de espessura de substrato,
- realizar ensaios de extração do ácido cítrico produzido, usando diferentes tipos de solventes e variando fatores como tempo e velocidade de agitação, temperatura de extração, volume de solvente a ser utilizado,
- desenvolver um procedimento para recuperação e purificação do ácido cítrico produzido,
- após a extração do ácido cítrico, testar o resíduo do bagaço de mandioca fermentado como alimentação animal,
- misturar ao bagaço de mandioca outros tipos de substrato, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar, e testar a produtividade de ácido cítrico,
- verificar a possibilidade de se utilizar o substrato fermentado, constituído de ácido cítrico, como complemento de rações animais

REFERÊNCIAS

- ABOU-ZEID, A Z A , ASHY, M A Production of citric acid a review **Agricultural waste**, v 9, p 51-76, 1984
- ARAVANTINOS-ZAFIRIS, G , TZIA, C , OREOPOULOU, V , THOMOPOULOS, C D Fermentation of orange processing wastes for citric acid production **Journal of Science and Food Agriculture**, v 65, p 117-120, 1994
- BAILEY, J E, OLLIS, D F **Biochemical engineering fundamentals** 2 ed Singapore McGraw Hill Book Company, 1986
- BAYRAKTAR, E , MEHMETOGLU, U Production of citric acid using immobilized conidia of *Aspergillus niger* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v 87, p 117-125, 2000
- BENDER, A E **Dicionário de nutrição e tecnologia de alimentos** São Paulo Roca, 1982
- BEUX, M R , SOCCOL, C R , MARIN, B , TONIAL, T , ROUSSOS, S Cultivation of *Lentinus edodes* on the mixture of cassava bagasse and sugarcane bagasse In ROUSSOS, S , LONSANE, B K , RAIMBAULT, M , VINIEGRA-GONZALEZ, G **Advances in solid state fermentation** Dordrecht Kluwer Academic Publishers, p 499-511, 1995
- BLAIR, G T , ZIENTY, M F **Citric acid: properties and reactions** Indiana: Industrial Marketing Department – Citro-tech Division - Miles Laboratories Inc , 1979 84p
- 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
- CARGILL Produtos cítricos **Ácido cítrico anidro** Uberlândia, 2000 Catálogo de informações do produto
- CARTA, F S , SOCCOL, C R., RAMOS, L P ; FONTANA, J D Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse **Bioresource Technology**, v 68, p 23-28, 1999

- CEREDA, M P Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca In CEREDA, M P **Industrialização da mandioca no Brasil** São Paulo Paulicéia, p 11-50, 1994a
- CEREDA, M P Processing of cassava roots in Brazil safety implications **International Workshop on Cassava Safety** ISHS Acta Horticulturae 375, 1994b Disponível em <http://www.actahort.org/books/375/375_21.htm> Acesso em 11 nov 2002
- 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, p 27-40, 2001
- DASGUPTA, J , NASIM, S , KHAN, A W , VORA, V C Production of citric acid in molasses medium effect of addition of lower alcohols during fermentation **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 9, p 123-125, 1994
- DAWSON, M W , MADDOX, I S , BROOKS, J D Effect of interruption of oxygen supply on citric acid production by *Aspergillus niger* **Enzyme and Microbial Technology**, v 8, p 37-40, 1986
- DAWSON, M W , MADDOX, I S , BOAG, I F , BROOKS, J D Application of fed-batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger* the effect of dilution rate and dissolved oxygen tension **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p 220-226, 1988
- DURAND, A , BLANCHERE, H Solid state fermentation in the production of food **ASEAN Food Journal**, v 1, p 10-14, 1985
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Mandioca e Fruticultura Cruz das Almas, BA 2002 Disponível em <<http://www.cnpmf.embrapa.br>> Acesso em 02 out 2002
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations Food Outlook n 4, October 2001 p 11 Disponível em <<http://www.fao.org>> Acesso em 03 out 2002
- FRIESEN, D T , BABCOCK, W C , BROSE, D J , CHAMBERS, A R Recovery of citric acid from fermentation beer using supported-liquid membranes **Journal of Membrane Science**, v 56, p 1227-141, 1991
- GARG, N , HANG, Y D Microbial production of organic acids from carrot processing waste **Journal of Food and Science Technology**, v 32, p 119-121, 1995

- GONZÁLEZ-S, J M, FERNÁNDEZ-T, M A, PIZARRO, C Application of weakly basic copolymer polyacrylamide (acrylamide-co-N,N'-dimethylaminoethyl methacrylate) gels in the recovery of citric acid **European Polymers Journal**, v 33, p 475-485, 1997
- GRACE, M R **Cassava processing** FAO Plant Production and Protection Series Italy FAO, n 3, 1977
Disponível em < <http://www.fao.org/docrep/X5032E/x5032E01.htm#The%20plant>>
Acesso em 03 out 2002
- GREWAL, H S, KALRA, K L Fungal production of citric acid **Biotechnology Advances**, v 13, n 2, p 209-234, 1995
- HAMISSA, F A Effect of alcohol and related compounds on citric acid production from beet molasses by *Aspergillus niger* **Chemical Microbiology and Technology**, v 5, p 157-160, 1978
- HANG, Y D, WOODAMS, E E Apple pomace a potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* **Biotechnology Letters**, v 6, p 763-764, 1984
- 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 Microbial production of citric acid by solid-state fermentation of kiwifruit peel **Journal of Food Science**, v 52, p 226-227, 1987
- HANG, Y D, WOODAMS, E E Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger* **Bioresource Technology**, v 65, p 251-253, 1998
- HEYBERGER, A, PROCHÁZKA, J, VOLAUFOVA, E Extraction of citric acid with tertiary amine – third-phase formation **Chemical Engineering Science**, v 53, n 3, p 515-521, 1998
- HOSSAIN, M, BROOKS, J D, MADDOX, I S The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger* **Applied Microbial Biotechnology**, v 19, p 393-397, 1984
- IKRAM-UL-HAQ, KHURSHID, S, ALL, 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
- IKENO, Y, MASUDA, M, TANNO, K, OOMORI, I, TAKAHASHI, N Citric acid production from various raw materials by yeasts **Journal of Fermentation Technology**, v 53, p 752-756, 1975

INGRAM, L O , BUTTKE, T M Effects of alcohols on microorganisms **Advances in Microbiology and Physiology**, v 25, p 253, 1984

JEBSEN & JESSEN **Citric acid** Germany, 2002 Disponível em <[http //www citric-acid de/citric_acid_application htm](http://www.citric-acid.de/citric_acid_application.htm)> Acesso em 18 out 2002

JIANLONG, W Production of citric acid by immobilized *Aspergillus niger* using a rotating biological contactor (RBC) **Bioresource Technology**, v 75, n 3, p 245-247, 2000

JIANLONG, W , XIANGHUA, W , DING, Z Production of citric acid from molasses integrated with in-situ product separation by ion-exchange resin adsorption **Bioresource Technology**, v 75, p 231-234, 2000

KHARE, S K , JHA, K , GANDHI, A P Citric acid production from okara (soy-residue) by solid-state fermentation **Bioresource Technology**, v 54, p 323-325, 1995

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

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

LAKSHMINARAYANA, K , CHAUDHARY, K , ETHIRAJ, S , TAURO, P A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagasse **Biotechnology and Bioengineering** v 17, p 291-293, 1975

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

McGINNIS, M R., REX, J H (Ed) **DOCTOR FUNGUS CORPORATION** Supported by Pfizer and Merck 2002 Disponível em <[http //www doctorfungus org/ index htm](http://www.doctorfungus.org/index.htm)> Acesso em 18 nov 2002

McMURRY, J E., CASTELLION, M **Fundamentals of general, organic, and biological chemistry** 3 ed New Jersey Prentice-Hall Publishing Co , 1999 Disponível em <[http //cwx prenhall com/bookbind/pubbooks/mcmurrygob/media/lib/ media_portfolio/17 html](http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/mcmurrygob/media/lib/media_portfolio/17.html)> Acesso em 25 set 2002

MEDEIROS, A B P, PANDEY, A, CHRISTEN, P, FONTOURA, P S G, FREITAS, R J S, SOCCOL, C R Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 17, p 767-771, 2001

MEERS, J L, MILSON, P E Ácidos orgânicos y aminoácidos In BU'LOCK, J, KRISTIANSEN, B **Biología básica** Zaragoza Acribia, p 359-365, 1991

MILES LABORATORIES, INC, Alter, J E, Blumberg, R **Extraction of citric acid** Int C07C51/48 U S n 82,078, 05 Oct 1979, 17 Feb 1981

MORESI, M, SAPPINO, F Economic feasibility study of citrate recovery by electrodialysis **Journal of Food Engineering**, v 35, p 75-90, 1998

NATIONAL STARCH CHEMICAL CORPORATION NS – 00396/85⁵, 1985

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

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

OLIVEIRA, A J, CANOILAS, L M Enriquecimento protéico de resíduos da fabricação de farinha de mandioca pelo desenvolvimento de leveduras In CEREDA, M P **Industrialização da mandioca no Brasil** São Paulo Paulicéia, p 163-174, 1994

PAPAGIANNI, M, MATTEY, M, KRISTIANSEN, B The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture **Enzyme and Microbial Technology**, v 25, n 8-9, p 710-717, 1999

PANDEY, A, SOCCOL, C R, NIGAM, P, SOCCOL, V T, VANDENBERGHE, 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 **Solid-state fermentation in biotechnology – fundamentals and applications** New Delhi Asistech Publishers, 2001 221p

PAZOUKI, M, PANDA, T Recovery of citric acid – a review **Bioprocess Engineering**, v 19, p 435-439, 1998

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

PERA, L M , CALLIERI, D A Influence of calcium on fungal growth and citric acid production during fermentation of a sugarcane molasses-based medium by a strain of *Aspergillus niger* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v 15, p 647-649, 1999

PINTADO, J, TORRADO, A , GONZÁLES, M P , MURADO, M A Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams **Enzyme and Microbial Technology**, v 23, n 1-2, p 149-156, 1998

POPOSKA, F A , NIKOLOVSKI, K , TOMOVSKA R Kinetics, mechanism and mathematical modeling of extraction of citric acid with isodecanol/n-paraffins solutions of trioctylamine **Chemical Engineering Science**, v 53, p 3227-3237, 1998

QAZI, G N , GAIND, C N , CHATURVEDI, S K , CHOPRA, C L , TRAGER, M , ONKEN, U Pilot-scale citric acid production with *Aspergillus niger* **Journal of Fermentation Bioengineering**, v 69, p 72-74, 1990

RAIMBAULT, M G General and microbiological aspects of solid substrate fermentation In **International course in solid state fermentation** Curitiba, 6-10 out 1997

RANE, K D , SIMS, K A Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y-1095 effect of glucose concentration on yield and productivity **Enzyme of Microbial Technology**, v 15, p 646-651, 1993

RODRIGUEZ-LEÓN, J A , SASTRE, L , ECHEVARRIA, J , DELGADO, G , BECHSTEDT, W A mathematical approach for the estimation of biomass production rate in solid state fermentation **Acta Biotechnologica**, v 8, p 307-310, 1988

ROHR, M , KUBICEK, C P , KOMÍNEK, J Citric acid In REED, G , REHM, H J (Ed) **Biotechnology** Weihem Verlag Chemie, v 3, p 419-454, 1983

ROHM AND HAAS COMPANY Microorganism photo gallery, 2002 Disponível em <[http //www.rohmhaas com/rhcis/markets_and_products/gallery.html](http://www.rohmhaas.com/rhcis/markets_and_products/gallery.html)> Acesso em 25 set 2002

ROUKAS, T Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation **Enzyme and Microbial Technology**, v 24, n 1-2, p 54-59, 1999

ROUKAS, T , KOTZEKIDOU, P Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery wastes by *Aspergillus niger* **Enzyme Microbiology and Technology**, v 9, p 291-294, 1987

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

SATO, K , NAGATANI, M , NAKAMURA, K , SATO, S Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in solid-state fermentation with forced aeration **Journal of Fermentation Technology**, v 61, n 6, p 623-629, 1983

SEAB – Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná Departamento de Economia Rural e Divisão de Conjuntura Agropecuária Prognóstico Agropecuário, Mandioca 2001/2002 Disponível em <[http //www pr gov br/seab](http://www.pr.gov.br/seab)> Acesso em 03 out 2002

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

SHANKARANAND, V S AND 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 9, p 377-380, 1993

SHANKARANAND, V S , LONSANE, B K Coffee husk an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a 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 Developpement de bioprocedes pour la valorization post-recolt de produits et sous produits agricoles tropicaux Memoire (Présente en vue de l'Habilitation à Diriger des Rcherches) Umversité de Provence Marseille, 2001 59p

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

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, 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, 2002 (in press)

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

STRYER, L **Bioquímica** 4 ed RJ Guanabara Koogan, 1996 Disponível em <<http://www.icb.ufmg.br/~lbcd/grupof/reg.html>> Acesso em 12 dez 2002

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

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> Acesso em 18 out 2000

VANDENBERGHE, L P S **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** Compiègne, 2000 205 f These (Docteur de l'UTC) - Université de Technologie de Compiègne

VANDENBERGHE, 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 P S, SOCCOL, C R, PANDEY, A, LEBEAULT, J-M Cassava bagasse, an alternative substrate for citric acid production in solid state fermentation In 11th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2000, Berlin **Proceedings Frankfurt Dechema**, v 4, 2000a, p 153-155

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, 2000b

VERVACK, W **Analyse des aliments, méthodes courantes d'analyses** Louvain-la-
Neuve Laboratoire de Biochimie de la Nutrition, 1973

WENNERESTEN, R The extraction of citric acid from fermentation broth using a
solution of a tertiary amine **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**,
v 33b, p 85-94, 1983

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*
Applied Microbiology and Biotechnology, v 30, p 553-558, 1989

YI, M , PEN, Q , CHEN, D , PEN, L , ZHANG, M , WEN, R , MOU, X , WANG, W
Extraction of citric acid by N,N-disubstituted alkyl amides from fermentation aqueous
solution **Beijing Shifan Daxue Xuebao - Ziran Kexueban**, v 4, p 30-37, 1987

YOKOYA, F **Fermentação cítrica** Campinas Fundação Tropical de Pesquisas e
Tecnologia "André Tosello", 1992 79 p