

Artigo Técnico

Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial

Citric acid production by Aspergillus niger AN 400 from agroindustry waste

Nathália Magalhães¹ , Alyne Vasconcelos Cavalcante¹ , Luana Siebra Andrade¹ , Carlos Ronald Pessoa Wanderley¹ , Glória Marinho¹ , Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa^{1*} 

RESUMO

A agroindústria gera grandes volumes de resíduos com carga poluidora elevada, o que exige o desenvolvimento de tecnologias para minimização de impactos causados pela disposição inadequada desses resíduos no ambiente. A produção de ácido cítrico utilizando resíduos agroalimentares como substrato para fermentação é uma solução para a redução da carga orgânica desses poluentes, além de agregar valor econômico pela geração de produto rentável. *Aspergillus niger* AN 400 foi utilizado para produzir ácido cítrico a partir de soro de queijo. A pesquisa foi dividida em três fases, conforme adição de açúcar extra (50, 100 e 150 g.L⁻¹): Fase I, com glicose; Fase II, com sacarose; e Fase III, apenas com o soro de queijo, sem adição extra de açúcar. Os reatores permaneceram sob agitação de 150 rpm e a 30°C, por 10 dias. A maior concentração de ácido cítrico (2.379 mg.L⁻¹) foi observada quando da adição de 100 g.L⁻¹ de glicose. Porém, em termos de produtividade, os maiores valores foram registrados nos reatores com 50 (458 mg.L⁻¹.dia⁻¹) e 100 g.L⁻¹ (745 mg.L⁻¹.dia⁻¹) de sacarose, seguido pelo reator que continha apenas soro de queijo, sem adição de açúcar extra (313 mg.L⁻¹.dia⁻¹), demonstrando o potencial desse resíduo para a obtenção desse ácido de grande interesse comercial.

Palavras-chave: fermentação; soro de queijo; açúcar; *Aspergillus niger*.

ABSTRACT

The agro-industry generates large volumes of waste with high organic load, which requires the development of technologies to minimize the impacts caused by the improper disposal of this waste on the environment. The citric acid produced by agro food wastes as substrate for fermentation is a solution to reduce the organic load of these pollutants and add economic value by generating a profitable product. *Aspergillus niger* AN 400 was used to produce citric acid from cheese whey. The study was divided in three phases according to the addition of extra sugar (50, 100, 150 g.L⁻¹): Phase I, with glucose; Phase II, with sucrose, and Phase III, with cheese whey only, without adding extra sugar. The reactors remained under agitation 150 rpm and at 30°C for 10 days. The highest concentration of citric acid (2,379 mg.L⁻¹) was observed upon the addition of 100 g.L⁻¹ of glucose. However, the greatest yields were recorded in the reactors with 50 (458 mg.L⁻¹.day⁻¹) and 100 g.L⁻¹ (745 mg.L⁻¹.day⁻¹) of sucrose, followed by the reactor that contained only cheese whey, without adding extra sugar (313 mg.L⁻¹.day⁻¹), demonstrating the potential of this waste to obtain citric acid with a great commercial interest.

Keywords: fermentation; cheese whey; sugar; *Aspergillus niger*.

INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é um ácido tricarboxílico, metabólito comum de plantas e animais, cuja formação biológica puramente enzimática decorre da transformação do substrato original por micro-organismos em razão da operação defeituosa no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

Esse ácido, assim como outros ácidos orgânicos, é amplamente utilizado na indústria de alimentos, em que pode ser aplicado para acidificar alimentos, no intuito de controlar o crescimento de micro-organismos patogênicos, como a *Salmonella*, servindo como conservante e prolongando a vida útil dos alimentos (AL-NABULSI *et al.*, 2014). O ácido cítrico também pode ser encontrado na composição

de produtos farmacêuticos, de limpeza, cosméticos, higiene pessoal e, até mesmo, empregado na limpeza de metais pesados, por causa de sua propriedade quelante (BETIKU; ADESINA, 2013).

Em razão de sua vasta aplicação, conhecido como produto seguro e de baixa toxicidade para o homem, a produção de ácido cítrico vem aumentando, principalmente pelas possibilidades de expansão para a Biomedicina, produção de biopolímeros, entre outros, chegando a atingir a marca de 1,7 milhão de toneladas por ano, com taxa de crescimento anual de 5% (DHILLON *et al.*, 2011).

A produção comercial do ácido cítrico é feita em maior escala por fermentação submersa, preferencialmente por ação do *Aspergillus niger*, em meio contendo excesso de açúcar (VANDENBERGHE *et al.*, 2000),

¹Instituto Federal do Ceará - Fortaleza (CE), Brasil.

*Autor correspondente: kellyarpeessoa@gmail.com

Recebido: 29/07/2016 - Aceito: 11/10/2017 - Reg. ABES: 167153

contudo a maior produção do ácido cítrico está relacionada diretamente à quantidade e à qualidade do açúcar presente no substrato e à atividade metabólica da estirpe do micro-organismo empregado, sendo que entre os substratos sintéticos utilizados para a fermentação, a sacarose frequentemente é o mais usado (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

A natureza e a concentração da fonte de carbono influenciam fortemente na acumulação do ácido e varia em função do micro-organismo utilizado. Para *Aspergillus niger*, a sacarose é descrita como o substrato mais favorável entre os substratos de carbono facilmente metabolizados, seguido por glicose, frutose e galactose, e o melaço também é frequentemente utilizado como matéria-prima para a produção de ácido cítrico por essa espécie fúngica (YALCIN; BOZDEMIR; OZBAS, 2010).

Sabe-se, porém, que um dos maiores problemas para a fermentação de ácido cítrico está ligado ao custo do processo, pois o substrato a ser empregado para a fermentação apresenta valor elevado. Assim, para tentar reduzir os custos envolvidos, a tendência é buscar materiais menos onerosos e, neste aspecto, os resíduos agroindustriais se constituem em alternativa interessante como substrato para o meio de fermentação, sendo ainda fartamente disponíveis (BETIKU; ADESINA, 2013; DHILLON *et al.*, 2011; LEONEL; CEREDA, 1995).

A utilização de resíduos agroindustriais não é importante somente do ponto de vista econômico, mas também ambiental, pois, além de reduzir o impacto causado, ainda agrega valor aos resíduos agrícolas e agroindustriais (RODRIGUES, 2006).

Entre os resíduos da agroindústria com potencial para utilização na fermentação e na produção de ácido cítrico, tem-se o soro de queijo, ou lactossoro, o qual pode ser considerado como agente de poluição e impacto ambiental em razão de sua grande carga orgânica, podendo apresentar demanda química de oxigênio (DQO) de até 80 g.L⁻¹ (SERPA; PRIAMO; REGINATTO, 2009). Ressalta-se que, apesar de poder ser reaproveitado na própria indústria para a produção de produtos lácteos, a alternativa do descarte ocorre com frequência em razão de sua produção ser muito elevada, haja vista que para cada 10 kg de leite são obtidos 9 kg de soro e apenas 1 kg de queijo. Logo, o descarte em corpos hídricos torna-se, *a priori*, solução menos onerosa (ZIMMER, 2006).

O soro de queijo possui teor elevado de lactose, o que o torna um resíduo de grande potencial tecnológico (BARBOSA *et al.*, 2010), principalmente para fermentação de ácido cítrico.

Em busca de maior produtividade e baixo custo na geração de tecnologia, produção e aproveitamento de resíduos, estudos vêm sendo realizados para utilização de subprodutos da agroindústria, assim como a busca de micro-organismos mais eficientes e adaptados aos processos fermentativos para a fermentação do ácido cítrico (RODRIGUES, 2006).

Nesse contexto, a presente pesquisa consistiu da avaliação da eficiência do soro de queijo como substrato para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400, na presença e na ausência de co-substrato (glicose ou sacarose), adicionado ao meio nas concentrações de 50, 100

e 150 g.L⁻¹. Os experimentos foram conduzidos em reatores em batelada sob agitação de 150 rpm, a temperatura de 30°C, durante 10 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

A espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 foi cultivada em placas de Petri contendo meio *Sabouraud*, previamente esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm, durante 20 minutos, como descrito em Rodrigues e Marinho (2012).

Após 10 dias de cultivo, nos quais as placas foram mantidas a uma temperatura de 28°C, os esporos foram removidos com a ajuda de solução isotônica Tween 80 (0,5%), gerando assim uma suspensão que foi armazenada em frasco estéril para posterior contagem de esporos. A contagem dos esporos ocorreu com auxílio de microscópio óptico trinocular Bioval L1000 utilizando Câmara de *Neubauer*, conforme procedimentos descritos em Sampaio (2005).

Substrato

O substrato utilizado na presente pesquisa para o processo de fermentação foi o soro de queijo. As coletas do soro foram realizadas em uma indústria de laticínios da região metropolitana de Fortaleza, Ceará. As amostras coletadas foram acondicionadas em gelo até a chegada ao laboratório, tendo-se procedido imediatamente a execução das análises para a sua caracterização, tanto na forma integral quanto na desproteïnizada.

Para a desproteïnização do soro, seu pH foi ajustado para 4,6, utilizando-se H₂SO₄ P.A. Logo depois, o soro foi aquecido a 90°C por cerca de 30 minutos e, após atingir temperatura ambiente, foi filtrado em membrana de fibra de vidro de 0,45 µm e, em seguida, adicionados nutrientes essenciais para o desenvolvimento fúngico, cujas concentrações foram adaptadas de Pastore (2010) (g.L⁻¹): sulfato de amônio (0,1); sulfato de magnésio (1,0) e fosfato de potássio (1,0).

Montagem e operação dos reatores

Foram utilizados como reatores *Erlenmeyers* de 250 mL que receberam 200 mL do substrato — soro desproteïnizado, filtrado e adicionado de nutrientes, inóculo de *Aspergillus niger* AN 400, na forma de suspensão de esporos (2 x 10⁶ esporos.mL⁻¹). O meio foi previamente esterilizado antes da adição do inóculo em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os testes tiveram o pH inicial ajustado para 3,5, com uso de H₂SO₄ P.A. A pesquisa foi conduzida em três fases: com adição de glicose ao soro (Fase I); com adição de sacarose ao soro (Fase II) e sem adição de fonte externa de açúcar (Fase III). A adição de glicose e a sacarose ocorreram nas concentrações de 50, 100 e 150 g.L⁻¹.

Assim, na Fase I, a glicose foi aplicada em reatores denominados RFG (reatores com fungos e glicose), de modo que foram montados 10 reatores para cada uma das concentrações mencionadas, totalizando 30 reatores.

Na Fase II, a sacarose foi utilizada em reatores denominados RFS (reatores com fungos e sacarose), totalizando 30 reatores, sendo montados 10 reatores para cada uma das concentrações mencionadas.

Na Fase III, foram montados 10 reatores do tipo RF (reatores com fungo). Nessa fase, não houve adição de fonte externa de carbono, o único açúcar disponível no meio foi a lactose natural do soro.

O experimento em batelada ocorreu ao longo de 10 dias. A cada 24 horas, um reator era colocado fora de operação em cada uma das fases e para cada uma das concentrações empregadas, estudando-se tempos de reação de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 dias.

Os reatores foram incubados em mesa agitadora a 150 rpm, a uma temperatura de 30°C. Na Tabela 1, são apresentados os reatores em função da concentração do cossubstrato e dos tempos reacionais.

As análises físico-químicas determinadas foram oxigênio dissolvido (OD), utilizando medidor portátil de oxigênio dissolvido Quimis Q-758P; pH, pelo pHmetro de bancada Quimis Q-400AS; e ácido cítrico, pelo método modificado de Marier e Boulet (1958).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O soro de queijo usado nos reatores durante o período estudado apresentava as características conforme a Tabela 2.

A composição do soro pode variar muito dependendo da qualidade do leite e do tipo de queijo produzido. A DQO do soro pode apresentar

Tabela 1 - Reatores em função da concentração do cossubstrato e dos tempos reacionais estudados.

Reator	Cossubstrato (g.L ⁻¹)	Composição do meio reacional
RF	-	Reator com fungo e sem adição extra de açúcar
RFGI	50	Reator com fungos e glicose
RFGII	100	
RFGIII	150	
RFSI	50	Reator com fungos e sacarose
RFSII	100	
RFSIII	150	

RF: reatores com fungo; RFG: reatores com fungos e glicose; RFS: reatores com fungos e sacarose.

Tabela 2 - Características do soro de queijo utilizado nos reatores.

Variável	Concentração média ± desvio padrão
pH	6,47 ± 0,06
DQO (g.L ⁻¹)	94,07 ± 8,21
Sólidos totais (g.L ⁻¹)	68,6 ± 1,19
Sólidos suspensos (g.L ⁻¹)	7,2 ± 1,60

DQO: demanda química de oxigênio.

intervalo de 50 a 102 g.L⁻¹ e os sólidos em suspensão, entre 1,3 e 22 g.L⁻¹ (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). Essas características tornam o soro de queijo um poluente em potencial para o ambiente, por seu alto volume produzido e elevada carga orgânica (SISO, 1996).

Sem adição de cossubstrato (RF), a maior produção de ácido cítrico ocorreu em 9 dias de fermentação, a qual foi de 1.106 mg.L⁻¹. Em contrapartida, nos reatores em que havia soro e glicose, chegou-se a concentrações de 1.965 mg.L⁻¹ (10º dia), 2.379 mg.L⁻¹ (10º dia) e 502 mg.L⁻¹ (3º dia), respectivamente, em RFGI, RFGII e RFGIII, indicando que a concentração ótima de glicose foi de 100 g.L⁻¹, a qual, junto à fonte de carbono que se constitui o soro, resultou em uma DQO inicial de 211 g.L⁻¹.

Entretanto, quando a fonte complementar de carbono foi a sacarose, observou-se a maior concentração de ácido cítrico em RFSIII (1.803 mg.L⁻¹), no 10º dia de fermentação. Nos demais reatores que receberam sacarose, foram registradas concentrações de 1.373 mg.L⁻¹ (RFSI) e 1.092 mg.L⁻¹ (RFSII), ambos no terceiro dia. Esses resultados apontaram para tendência do aumento da eficiência de produção de ácido cítrico na presença de glicose e sacarose como cossubstratos, visto que foram capazes de impulsionar a produção do ácido em concentrações específicas. Para a sacarose, a maior produção foi obtida utilizando-se 150 g.L⁻¹ do açúcar, enquanto para a glicose, a maior produção ocorreu quando esta foi adicionada em 100 g.L⁻¹, sobrepondo os resultados dos demais reatores.

Na Figura 1 é apresentada a variação da produção de ácido cítrico nos reatores em estudo — RF, RFGI, RFGII e RFGIII (A) e RF, RFSI, RFSII e RFSIII (B).

No entanto, um aspecto importante que deve ser avaliado é a produtividade, ou seja, a avaliação da produção da maior quantidade de ácido gerado pontualmente ao longo do tempo, considerando-se ainda sua concentração inicial no substrato de fermentação e a maior produção dele em menores tempos de reação.

A importância de se avaliar a produção no ponto da produtividade reside também em minimizar gastos desnecessários que poderiam contribuir para onerar o processo de produção, pois um tempo maior de fermentação e a adição desnecessária de substâncias extras podem reduzir o retorno econômico.

Assim, as melhores produtividades foram alcançadas pelo reator RFSII, o qual apresentou 745 mg.L⁻¹.dia, conforme Tabela 3, seguido de RFSI (458 mg.L⁻¹.dia) e de RF (313 mg.L⁻¹.dia).

Em termos de produtividade, a adição da sacarose no meio mostrou ser mais vantajosa, o que vai ao encontro da literatura, pois, segundo reportaram alguns autores (GREWAL; KALRA, 1995; HOSSAIN; BROOKS; MODDAX, 1984), entre os açúcares utilizados, a sacarose é a mais favorável à fermentação para produção do ácido cítrico, e a natureza e as concentrações dos açúcares presentes no meio podem exercer influência direta na produção do referido ácido.

Uma vez que a sacarose é um açúcar de peso molecular relativamente baixo, o que facilita seu transporte e hidrólise por enzimas intracelulares e favorece seu uso como principal fonte comercial de carbono (KUBICEK; ROHR, 1986; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

No entanto, com adição de 150 g.L⁻¹ de sacarose, houve diminuição da produtividade do ácido cítrico, o que estaria relacionado à inibição por excesso de substrato. Uma quantidade maior de açúcar no meio não resulta necessariamente em maior produção, o que pode ser observado no trabalho de Santos (2005). O autor fez uso da linhagem de *Aspergillus niger* 10v10, junto ao meio sintético contendo 50, 100 e 150 g.L⁻¹ de açúcar (xilose e glicose). A maior produção foi observada na presença de 50 g.L⁻¹ dos açúcares (7,55 g.L⁻¹ de ácido cítrico), enquanto as demais concentrações

tiveram valores decrescentes à medida que se aumentava a quantidade de açúcares no meio.

Nessa pesquisa, a adição de sacarose demonstrou ser benéfica nas concentrações de 50 e 100 g.L⁻¹, pois promoveu as maiores produtividades de ácido cítrico, o que é reforçado pelo trabalho de Yaykasli, Demirel e Yasar (2005), que também obtiveram bons resultados utilizando sacarose como fonte de carbono para produção de ácido cítrico ao variarem a concentração desse açúcar de 100 e 180 g.L⁻¹, em meio com pH 2,0, a uma temperatura de 30°C. O micro-organismo empregado foi o *Aspergillus niger* A-9, imobilizado em gel de poliacrilamida. A concentração de 140 g.L⁻¹ de sacarose foi a que resultou nos maiores níveis de produção de ácido cítrico, um pouco mais de 1 g.L⁻¹ no 4º dia de fermentação.

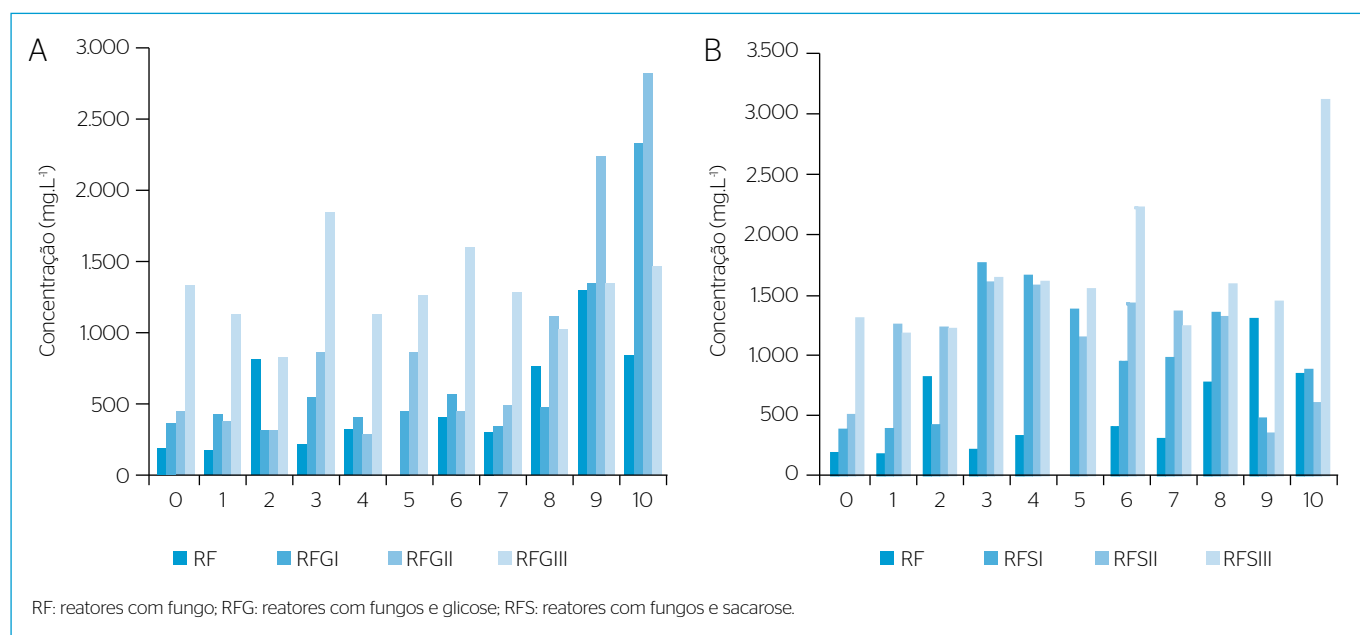


Figura 1 - Variação da concentração de ácido cítrico nos reatores.

Tabela 3 - Produtividade dos reatores em relação ao ácido cítrico ao longo do tempo de reação.

Tempo (dia)	Produtividade (mg/L.dia)						
	RF	RFGI	RFGII	RFGIII	RFSI	RFSII	RFSIII
1	*	66	*	*	5	745	*
2	313	*	*	*	18	360	*
3	9	61	141	167	458	364	111
4	35	10	*	*	318	267	76
5	*	16	85	*	198	128	48
6	37	31	2	44	95	153	153
7	17	*	6	*	85	122	*
8	73	13	83	*	121	101	35
9	123	108	200	*	10	*	15
10	65	197	238	12	50	10	180

RF: reatores com fungo; RFG: reatores com fungos e glicose; RFS: reatores com fungos e sacarose; * não ocorreu produção de ácido cítrico, apenas seu consumo do meio.

Embora a adição de sacarose favoreça maior produção do ácido cítrico, por outro lado, o uso do soro de leite sem qualquer adição de fonte extra de carbono demonstrou viabilidade elevada, uma vez que a produtividade alcançada nos reatores RF foi a terceira melhor registrada, superando inclusive a produtividade alcançada pelos reatores que receberam adição de glicose, RFGI, RFGII e RFGIII, nos quais os maiores valores para essa variável foram os mais baixos entre os demais reatores, respectivamente, 197 mg.L⁻¹.dia⁻¹ (10º dia), 238 mg.L⁻¹.dia⁻¹ (10º dia) e 167 mg.L⁻¹.dia⁻¹ (terceiro dia).

Assim, em termos de produtividade, a adição extra de glicose tendo soro de queijo como substrato não demonstrou ser viável, pois nos reatores que receberam apenas o soro como substrato a produtividade foi cerca de 1,3 vezes superior à registrada nos reatores RFGII que obtiveram o maior rendimento entre os reatores que receberam glicose, endossando o potencial desse agrosresíduo para a produção rentável do ácido cítrico.

O rendimento nos reatores RF, nos quais o soro foi empregado sem adição de açúcar, foi inferior apenas ao alcançado pelos reatores que receberam sacarose RFSI e RFSII que apresentaram produtividade de 1,5 e 2,4 vezes superior à encontrada no reator RF. Esse fato é explicado pela maior afinidade que os fungos teriam pela sacarose como fonte de carbono para a produção do ácido, em detrimento da lactose (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003), açúcar naturalmente presente no soro. Isso assemelhou-se ao trabalho de pesquisa de López Ríos *et al.* (2006) que, em uma parte do estudo, utilizaram *Aspergillus niger* NRRL 2270 em soro de leite hidrolisado e conseguiram obter produção média de 5,88 g.L⁻¹ de ácido cítrico, utilizando somente a lactose, mas quando suplementaram o hidrolisado de soro de leite com 90 g.L⁻¹ de sacarose, obtiveram concentração média de até 8,41 g.L⁻¹.

Isso, em parte, corroborou com os resultados obtidos neste estudo, já que os reatores que receberam adição extra de sacarose tiveram melhor rendimento quanto à produção do ácido cítrico, no entanto a influência da lactose neste estudo se destacou com relação aos reatores contendo glicose, diferentemente do estudo de Dhillon *et al.* (2011).

Dhillon *et al.* (2011) utilizaram vários resíduos da agroindústria para produção de ácido cítrico, entre eles o soro de leite. Os resultados foram alcançados utilizando-se em seu experimento, independentemente do substrato empregado, as mesmas condições de fermentação, de modo que o soro de leite foi o que apresentou menor produção. Os autores atribuíram a produtividade baixa nesses meios em razão da galactose, componente da lactose, e seus produtos metabólicos que tenderiam a inibir a produção de ácido cítrico e taxa de utilização de glicose. No estudo já citado, foram utilizadas como inóculo duas linhagens diferentes de *Aspergillus niger* (NRRL 567 e NRRL 2001). Os reatores receberam inóculo na concentração de 10⁷ esporos/25 mL, mantendo-se o meio sob agitação de 200 rpm, ao longo de 4 dias. Para soro de leite, houve produção de 6,5 e 6,9 g.L⁻¹ de ácido cítrico, respectivamente, por *A. niger* NRRL 567 e *A. niger* NRRL 2001.

Na presente pesquisa, a maior concentração de ácido cítrico registrada foi de 2,3 g.L⁻¹, nos reatores RFGII, menos da metade da registrada por Dhillon *et al.* (2011), porém, como a produção desse ácido é cíclica ao longo do tempo, com picos de produção alternando-se com seu consumo, a avaliação em termos de rendimento do processo requer a análise da produtividade, o que não foi possível de verificar no trabalho de Dhillon *et al.* (2011).

Ainda em relação à produtividade, os maiores valores registrados nesta pesquisa foram obtidos nos primeiros dias, o que encontrou apoio nos relatos de Pastore, Hasan e Zempulski (2011), que apontaram o primeiro dia como tempo reacional ótimo para atingir as maiores produtividades de ácido cítrico. Particularmente, no caso dos reatores RF em relação aos RFSI, embora a produtividade tenha sido menor no primeiro, esta foi registrada em tempo menor, um dia antes do maior valor de produtividade apresentado por RFSI.

Além disso, as variações de produção de ácido cítrico em um meio com condições otimizadas são influenciadas, entre outros fatores, pela estirpe fúngica utilizada e pela composição do substrato (MOURYA; JAUHRI, 2000), uma vez que são diretamente relacionadas às concentrações dos açúcares e sua natureza (GREWAL; KALRA, 1995; MOURYA; JAUHRI, 2000).

Outra variável de grande relevância para a produção do ácido cítrico é o oxigênio dissolvido, o qual, dependendo da espécie envolvida, constitui-se em fator limitante para a eficiência do processo.

Gómez, Schnabel e Garrido (1988) afirmaram que para *Aspergillus niger* não existe diferença morfológica para obtenção de boa eficiência na produção do ácido cítrico, contanto que os níveis de oxigênio dissolvido no meio não fiquem abaixo de 40% de saturação. No trabalho de Santos (2005), a produção de ácido cítrico caiu quando o oxigênio dissolvido no meio ficou abaixo de 10% da saturação.

Nesta pesquisa, apesar de todos os reatores terem sido submetidos à mesma agitação orbital (150 rpm), o oxigênio dissolvido do meio se manteve em níveis mais altos em RF, registrando-se média acima de 40% da saturação, que é o recomendado pela literatura. Os demais reatores apresentaram tendências a níveis mais baixos, variando de 19 a 25% da saturação de ar, em média.

De acordo com Sankpal, Joshi e Kulkarni (2001), a falta parcial ou total de aeração do meio, mesmo que por um espaço curto de tempo, é prejudicial e pode levar ao atraso o período de fermentação e, conseqüentemente, a rendimentos baixos do ácido. Em contrapartida, em meios que possuem maiores concentrações de oxigênio dissolvido e maior agitação, a presença de ácido cítrico é maior (SANTOS, 2005).

A produção de ácido cítrico ocorre durante a fermentação aeróbia, de modo que, ao longo desse processo, o micro-organismo cresce lentamente quando o oxigênio dissolvido é fornecido em concentração baixa (YUGUO; ZHAO; XIAOLONG, 1999). Ainda é importante mencionar que o oxigênio funciona como um regulador da produção

e sua interrupção, mesmo que seja por pouco tempo, pode reduzir a velocidade de formação do ácido cítrico durante o processo (KUBICEK; ROHR, 1986).

Segundo Grewal e Kalra (1995), os valores críticos de oxigênio dissolvido para a fase de crescimento fica entre 9 e 10% da saturação com ar. Por outro lado, é importante também que o meio não apresente concentração excessiva de oxigênio dissolvido, pois nessa condição o acúmulo de ácido cítrico também será limitado (YUGUO; ZHAO; XIAOLONG, 1999), conforme observado no trabalho de Lu, Brooks e Maddox (1997), que, ao utilizarem taxas de ar elevadas, resultando em maior aeração, a produção de ácido cítrico foi prejudicada.

Outro fator a considerar é o pH do meio, que deve apresentar valores mais baixos, pois assim ocorre a inibição da proliferação de bactérias oportunistas. O pH, durante o processo de fermentação, tende a alterar-se à medida que há consumo ou liberação de ácidos orgânicos no meio, sendo que, na presente pesquisa, na maioria dos reatores, o valor do pH tendeu a aumentar em média 0,26 unidades nas primeiras 24 horas e, com o passar dos dias, atingiu valores mais baixos, inferiores a 3,0, em todos os reatores. Esses valores de pH baixo, segundo Papagianni (2007), inibem a produção de ácidos orgânicos indesejáveis, como o ácido glucônico e o ácido oxálico, cuja presença no meio reprime a excreção do ácido cítrico.

Mesmo que a sacarose tenha resultado em boa produtividade, em comparação com a série de reatores sem adição de hidratos de carbono externo, este ainda pode ser considerado mais viável sob o ponto de vista econômico, pois a utilização de fonte extra, além de tornar o processo mais oneroso, aumenta a carga orgânica do resíduo, podendo

gerar resíduo final com carga orgânica superior à que se tinha antes de se iniciar o processo de produção do ácido.

CONCLUSÃO

O soro de queijo demonstrou ser um substrato potencial para produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400, obtendo-se, em apenas dois dias, 625,4 mg.L⁻¹ desse ácido, resultando na segunda melhor produtividade (313 mg.L⁻¹.dia⁻¹), entre as composições estudadas, sem adição de qualquer outra fonte de carbono e/ou fonte extra de nitrogênio.

A sacarose demonstrou ser importante para o aumento da produtividade, particularmente, quando adicionada ao meio na concentração de 100 g.L⁻¹, em que foi registrado o maior rendimento, de 745 mg.L⁻¹.dia⁻¹, sendo preferível em relação à glicose, a qual ao ser adicionada ao soro, principal substrato de fermentação, não resultou em resposta satisfatória quanto à produtividade do ácido cítrico.

Porém, é de grande importância ajustar e testar novas combinações em relação à suplementação do meio, tanto em relação ao tipo e à concentração do açúcar, substrato auxiliar, quanto de nutrientes, bem como outros fatores interferentes, a fim de que o processo de produção do ácido cítrico seja otimizado, de modo a se obter maiores rendimentos.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Instituto Federal do Ceará pelo Edital do Programa de Financiamento a Propostas para Apoio a Projetos de Implantação de Infraestrutura (PROINFRA).

REFERÊNCIAS

- AL-NABULSI, A.A.; OLAIMAT, A.N.; OSAILI, T.M.; SHAKER, R.R.; ELABEEDEN, N.Z.; JARADAT, Z.W.; ABUSHELAIBI, A.; HOLLEY, R.A. (2014) Use of acetic and citric acids to control *Salmonella* Typhimurium in tahini (sesame paste). *Food Microbiology*, v. 42, p. 102-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.020>
- ANGUMEENAL, A.; VENKAPPAYYA, D. (2013) An overview of citric acid production. *Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 367-370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>
- BARBOSA, A.S.; FLORENTINO, L.R.; FLORÊNCIO, I.M.; ARAÚJO, A.S. (2010) Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. *Revista Verde*, v. 5, n. 1, p. 7-25.
- BETIKU, E.; ADESINA, O.A. (2013) Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate. *Biomass and Bioenergy*, v. 55, p. 350-354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.034>
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. (2013) Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the Environment*, v. 445-446, p. 385-396. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- DHILLON, G.S.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D. (2011) Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 54, n. 2, p. 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.02.002>
- GÓMEZ, R.; SCHNABEL, I.; GARRIDO, J. (1988) Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 10, n. 3, p. 188-191. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90086-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90086-5)
- GREWAL, H.S.; KALRA, K.L. (1995) Fungal production of citric acid. *Biotechnology*, v. 13, n. 2, p. 209-234. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)00002-8](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)00002-8)

- HOSSAIN, M.; BROOKS, J.D.; MODDAX, I.S. (1984) The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 19, n. 6, p. 393-397. <https://doi.org/10.1007/BF00454376>
- KUBICEK, C.P.; ROHR, M. (1986) Citric acid fermentation. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, v. 3, n. 4, p. 331-373.
- LEONEL, M.; CEREDA, M.P. (1995) Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. *Scientia Agricola*, Itacambá, v. 52, n. 2, p. 299-304. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90161995000200016>
- LÓPEZ RÍOS, C.A.; MENESES, A.Z.; PENAGOS, S.N.H.; COLORADO, A.A.R.; PÉREZ, V.I.M. (2006) Producción de ácido cítrico com *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *Dyna*, v. 73, n. 150, p. 39-57.
- LU, M.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. (1997) Citric acid production by solid-state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, n. 6, p. 392-397. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00048-3)
- MARIER, J.R.; BOULET, M.J. (1958) Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride. *Journal of Dairy Science*, v. 41, n. 12, p. 1683-1692. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(58\)91152-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(58)91152-4)
- MOURYA, S.; JAUHRI, K.S. (2000) Production of citric acid from starch-hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Microbiological Research*, v. 155, n. 1, p. 37-44. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80020-8](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80020-8)
- PAPAGIANNI, M. (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 3, p. 244-263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>
- PASTORE, N.S. (2010) *Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por Aspergillus niger usando manipueira como substrato*. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.
- PASTORE, N.S.; HASAN, S.M.; ZEMPULSKI, D.A. (2011) Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. *Engvista*, v. 13, n. 3, p. 149-159. <http://dx.doi.org/10.22409/engevistav13i3.306>
- RODRIGUES, C. (2006) *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica*. 93 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- RODRIGUES, K.; MARINHO, G. (2012) *Fungos e águas residuárias industriais: nova tecnologia*. Recife: Imprima. 200 p.
- SAMPAIO, G.M.M.S. (2005) *Remoção de metil parathion e atrazine em reatores com fungos*. 115 f. Tese (Doutorado em Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- SANKPAL, N.V.; JOSHI, A.P.; KULKARNI, B.D. (2001) Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: influence of morphology and fermenter conditions on productivity. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 11, p. 1129-1139. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00155-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00155-8)
- SANTOS, R. da S. (2005) *Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator*. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena.
- SERPA, L.; PRIAMO, W.L.; REGINATTO, V. (2009) Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION. KEY ELEMENTS FOR A SUSTAINABLE WORLD: ENERGY, WATER AND CLIMATE CHANGE, 2., São Paulo, Brasil. *Anais...*
- SISO, M.I.G. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, v. 57, n. 1, p. 1-11. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2-3, p. 205-218. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00133-X)
- VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.-M. (2000) Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 2, p. 175-178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00107-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00107-8)
- YALCIN, S.K.; BOZDEMIR, M.T.; OZBAS, Z.Y. (2010) Citric acid production by yeasts: Fermentation conditions, process optimization and strain improvement. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, v. 2, p. 1374-1382.
- YAYKASLI, O.Y.; DEMIREL, G.; YASAR, A. (2005) Influence of alcohols on citric acid production by *Aspergillus niger* A-9 entrapped in polyacrylamide gels. *Journal of Food Engineering*, v. 70, n. 4, p. 518-522. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.006>
- YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. (1999) Citric acid production from the mash of dried sweet potato with its dregs by *Aspergillus niger* in an external-loop airlift bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 3, p. 237-242. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00055-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00055-2)
- ZIMMER, T.R. (2006) *Influência da carga orgânica e do tempo de enchimento sobre a estabilidade e eficiência do reator anaeróbio em batelada sequencial com biomassa granulada tratando soro de queijo*. 160 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.