

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANÁLISE DOS MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO
CÍTRICO POR LINHAGENS DE *Aspergillus niger*

Parcer

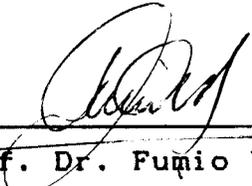
LILIANA AGUDELO ACOSTA ^{n.º 70,}

Este exemplar corresponde a redação final da tese depositada por Liliana Agudelo Acosta e aprovada pela Comissão Julgadora em 30.03.94.

Tese apresentada à faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador Dr. FUMIO YOKOYA †

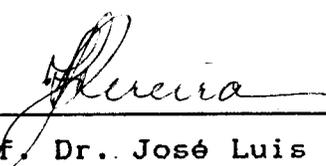
BANCA EXAMINADORA



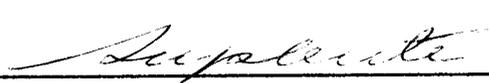
Prof. Dr. Fumio Yokoya
(membro)



Prof. Dr. Lucia Regina Durrant
(membro)



Prof. Dr. José Luis Pereira
(membro)



Prof. Dr. Ranulfo M. Alegre
(membro)

Campinas, março 30 de 1994

A minha mãe,
a quem amo mais do que sou capaz de dizer,
Ao meu Alvaro,
pela presença, força, apoio e amor,
A meu filho,
pela felicidade de sua chegada.

AGRADEÇO

Ao prof. Dr. Fumio Yokoya pela oportunidade que me deu para realizar o presente trabalho, por sua orientação e corretas recomendações.

À todo o pessoal do laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial a Rosa e Jackeline por sua constante colaboração.

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", pela doação dos microrganismos.

Às funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, em especial a Creuza Kasume Nomura pela correção das referências bibliográficas.

As entidades CAPES, CnPq e FAEP, por seu auxílio financeiro.

À todas as pessoas que, de uma forma ou outra, ofereceram sua colaboração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, mesmo de longe me incentivaram com sua torcida e confiança.

À Yuko, Mari, Raquel, Miriam, Liliana, Cristina (novas amizades), que compartilharam das alegrias e tristezas, conquistas e frustrações decorrentes desse trabalho.

À minha amiga Miriam Daza pelas esclarecedoras contribuições durante a elaboração dessa dissertação.

À Gisella e ao Gerson, pela amizade e auxílio incansável durante a correção deste trabalho.

TODOS LOS ACONTECIMIENTOS DE TU VIDA, ESTAN AHÍ PORQUE TU LO HAS CONVOCADO, DE TI DEPENDE LO QUE RESUELVAS HACER CON ELLOS.

BACH.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABELAS	IV
RESUMO	VIII
SUMMARY	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. GENERALIDADES	4
2.2. FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS NO ACÚMULO DE ÁCIDO CÍTRICO	10
2.3. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO CÍTRICA	11
2.4. FATORES QUE INFLUENCIAM O ACÚMULO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FUNGOS	12
2.5. MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	16
2.6. APLICAÇÕES DO ÁCIDO CÍTRICO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. MICRORGANISMOS	19
3.2. PREPARO DO INÓCULO	21
3.3. MEIOS DE CULTURA	22
3.3.1. MEIO SINTÉTICO	22
3.3.2. MEIO SÓLIDO	22
3.3.3. MEIO NATURAL	22
3.3.3.1. PRIMEIRA FASE	23
3.3.3.2. SEGUNDA FASE	23
3.3.3.3. TERCEIRA FASE	23
3.3.3.4. TRATAMENTOS	24

3.3.3.4.1. TRATAMENTO COM ÓXIDO DE CÁLCIO (CaO)	24
3.3.3.4.2. TRATAMENTO COM FOSFATO TRICÁLCICO (TPC)	24
3.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO	25
3.4.1. FERMENTAÇÃO SUBMERSA E DE SUPERFÍCIE	25
3.4.2. MÉTODO DO TUBO HORIZONTAL	26
3.4.3. TÉCNICA DA PLACA PETRI	26
3.5. OBTENÇÃO DO ÁCIDO CÍTRICO.	27
3.5.1. SELEÇÃO DO FUNGO	27
3.5.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE FERROCIANETO DE POTÁSSIO E DO TIPO DE TRATAMENTO	28
3.5.3. EFEITO DE METAIS	28
3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS	29
3.6.1. DETERMINAÇÃO DO pH	29
3.6.2. DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA	29
3.6.3. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL (% ACIDEZ)	30
3.6.4. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR	30
3.6.5. DETERMINAÇÃO DO FERROCIANETO DE POTÁSSIO (FCN) RESIDUAL.	31
3.6.6. CROMATOGRAFIA DE PAPEL	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. FASE 1	33
4.1.1. FERMENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE E SUBMERSA	33
4.1.2. TÉCNICAS DA PLACA PETRI E DO TUBO HORIZONTAL	39
4.1.3. ANÁLISE DE SIMILARIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO ENTRE AS DIFERENTES FORMAS E MEIOS DE FERMENTAÇÃO, UTILIZANDO O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON	43
4.1.4. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS E MEIOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO-SE AS MÉDIAS DE PORCENTAGEM DE ACIDEZ (GRAMAS DE ÁCIDO CÍTRICO/100 mL)	44
4.2. FASE 2	46
4.3. TERCEIRA FASE	57
5. CONCLUSÕES	62

6. SUGESTÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES:	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. APÊNDICE	71

INDICE DE TABELAS

TABELA 1. Linhagens de <i>Aspergillus niger</i> utilizadas neste trabalho	20
TABELA 2. Valores de massa seca (g/frasco) na fermentação em superfície, a 30°C.	35
TABELA 3. Valores de porcentagem de acidez (gramas de ácido cítrico/100mL) na fermentação em superfície, a 30°C	36
TABELA 4. Valores de massa seca (g/frasco) na fermentação submersa, a 30° C.	37
TABELA 5. Valores obtidos de porcentagem de acidez (g de ácido cítrico/100mL) na fermentação submersa, a 30°C.	38
TABELA 6. O diâmetro da colônia-diâmetro do halo e a distância do crescimento da colônia-distância da troca da cor.	39
TABELA 7. Valores obtidos do diâmetro da colônia (cm) e do diâmetro do halo.	41
TABELA 8. Valores da distância do crescimento da colônia (cm) e a distância da viragem da cor na técnica do tubo horizontal.	42
TABELA 9. Coeficiente de correlação de Pearson dos diferentes meios e técnicas empregadas.	45

TABELA 10. Parâmetros de fermentação em superfície obtidos por <i>Aspergillus niger</i> FTPT 906 em melão de cana-de-açúcar, tratado com óxido de cálcio (CaO) adicionando-se diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN).49
TABELA 11. Parâmetros de fermentação em superfície obtidos por <i>Aspergillus niger</i> FTPT 906 em melão de cana-de-açúcar, tratado com fosfato tricálcico, adicionando-se diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN).	50
TABELA 12. Parâmetros de fermentação em superfície obtidos por <i>Aspergillus niger</i> FTPT 1762, em melão de cana-de-açúcar, tratado com óxido de cálcio (CaO) adicionando-se diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN).51
TABELA 13. Parâmetros de fermentação em superfície obtidos por <i>Aspergillus niger</i> FTPT 1762, em melão de cana-de-açúcar, tratado com fosfato tricálcico (TPC), adicionando-se diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN).	52
TABELA 14. Parâmetros de fermentação submersa, obtidos por <i>Aspergillus niger</i> FTPT 1762, em melão de cana-de-açúcar, tratado com fosfato tricálcico (TPC) adicionando-se diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN).	53

- TABELA 15. Parâmetros de fermentação submersa,
 obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 1762,
 em melão de cana-de-açúcar,
 tratado com óxido de cálcio (CaO),
 adicionando-se diferentes níveis
 de ferrocianeto de potássio (FCN). 54
- TABELA 16. Parâmetros de fermentação submersa,
 obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 488,
 em melão de cana-de-açúcar,
 tratado com óxido de cálcio (CaO),
 adicionando-se diferentes níveis
 de ferrocianeto de potássio (FCN). 55
- TABELA 17. Parâmetros de Fermentação Submersa,
 obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 488,
 em melão de cana-de-açúcar,
 tratado com fosfato tricálcico (TPC),
 adicionando-se diferentes níveis
 de ferrocianeto de potássio (FCN). 56
- TABELA 18. Parâmetros de fermentação cítrica,
 obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 906,
 em melão de cana-de-açúcar,
 tratado com óxido de cálcio (CaO),
 e 30 ppm de ferrocianeto de
 potássio (FCN) suplementado com
 NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, adicionando-se
 diferentes concentrações de metais,
 cultivado durante 10 dias,
 a 30°C em fermentação em superfície. 59

TABELA 19. Características obtidas pela linhagem FTPT 906,
com respeito à produção de ácido cítrico,
determinado mediante cromatografia de papel. . . . 61

RESUMO

Foi acompanhado o comportamento de vinte linhagens de *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico, quando cultivadas em diferentes formas e meios de fermentação.

Observou-se que as exigências nutricionais de *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico dependem da linhagem e do processo do cultivo. Dentre as linhagens estudadas e nas condições experimentais - fermentação em superfície e submersa em meio natural, escolheram-se as cepas FTPT 906 para a fermentação em superfície, FTPT 488 para fermentação submersa e FTPT 1762 como cepa aleatória, porque demonstraram maior capacidade de produção de ácido cítrico.

Verificou-se a necessidade de tratamento do melaço de cana-de-açúcar com óxido de cálcio (CaO) e ferrocianeto de potássio (FCN), visando a remoção e precipitação de ions que contaminam os substratos evitando, assim, sua ação inibidora na fermentação cítrica. Observou-se que a quantidade de FCN requerida em excesso é determinado principalmente pela linhagem do fungo e qualidade do substrato.

Aspergillus niger FTPT 906 demonstrou, nas condições de fermentação em superfície em meio natural, maior capacidade de produção de ácido cítrico. A adição de ions ferro e cobre em conjunto ao meio de cultura não favorece a produção de ácido; o mesmo aconteceu quando adicionou-se ion cobre no processo. O crescimento celular não foi influenciado pela adição de ions metálicos no meio de cultura.

SUMMARY

Twenty citric acid producing strains of *Aspergillus niger* were tested regarding their capacity to produce citric acid in various media composition under surface and submerged growth conditions. Nutritional requirement for their growth and acid production varied from strain to strain. Strain FTPT 906 was selected for further studies by surface culture method because of its hability to produce highest amount of acid. Strain FTPT 488 produced highest amount of acid in submerged culture and strain FTPT 1762 produced reasonable amounts of acid in both cultivation methods.

The treatment with calcium oxide and potassium ferrocyanate (FCN) was requered for the precipitation of metallic ions from molasses media to reduce inhibition of citric acid production. The excess of FCN required for highest citric acid production varied according to the fungus strain and qualites of substrate. Addition of iron and copper ions to the media did not enhance acid production. The growth of fungus was not affected by those metallic ions.

1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico (ácido 2 hidróxi-propano-1,2,3-tricarboxílico), foi descoberto por SCHEELE (citado por ROHR et alii, 1983), como um constituinte de frutas cítricas. WEHMER (citado por KUBICEK et alii, 1986), foi o primeiro a relatar que o ácido cítrico era produzido através da fermentação por fungos, por ele denominados *Citromyces pfefferians* e *C. glaber*, atualmente classificados no gênero *Penicillium*.

Um grande número de ácidos orgânicos são acumulados por fungos e por bactérias através de fermentação. O fungo filamentoso *Aspergillus niger*, pode acumular sob determinadas condições e dependendo das linhagens selecionadas, dois tipos de ácidos orgânicos de interesse industrial: o ácido cítrico e o glucônico. Desses, o ácido cítrico tem um grande valor devido a sua alta solubilidade, palatibilidade e baixa toxicidade. Possui muitas aplicações na indústria de alimentos, na farmacêutica e também em outros campos industriais. Atualmente, sua produção mundial é de aproximadamente 300.000 toneladas/ano (KUBICEK & ROHR, 1986).

Após a descoberta de suas aplicações a produção a larga escala tornou-se objetivo de muitas empresas, que desenvolveram algumas técnicas para sua extração de produtos naturais e procesos sintéticos. O processo fermentativo mostrou-se mais viável, sendo no momento o mais utilizado para a produção de ácido cítrico.

As exigências nutricionais de *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico dependem da linhagem e do processo de cultivo. Influências dos constituintes do meio na produção de ácido cítrico têm sido estudadas e os trabalhos publicados mostram diferentes condições para uma ótima produção.

No processo fermentativo para a produção de ácido cítrico emprega-se, principalmente, a sacarose e a glicose, como substrato na forma pura, ou presente nos produtos naturais brutos, como: amido hidrolizado, caldo de cana e sub-produtos (melaço de cana-de-açúcar e beterraba).

Diversas pesquisas são realizadas com a finalidade de viabilizar matérias-primas alternativas, objetivando a utilização de substratos mais baratos. O melaço tem a vantagem de ser uma matéria-prima de baixo custo e disponível em grandes quantidades no Brasil. Contudo, alguns de seus componentes podem causar inibição do crescimento e da fermentação cítrica. Os níveis relativamente elevadas de alguns íons metálicos, especialmente ferro, cobre, zinco e manganês podem apresentar um significativo efeito inibidor da fermentação. Diversos métodos são empregados para neutralizar o efeito negativo destes metais.

Considerando a necessidade de viabilizar de maneira eficiente o processo fermentativo para a indústria e a disponibilidade da matéria-prima, o presente trabalho tem como objetivos:

- 1 - Comparar o comportamento de vinte linhagens de *Aspergillus niger* quanto ao crescimento e produção de ácido cítrico utilizando-se fermentação submersa e fermentação em superfície, nos meios sintético e natural e técnicas de placa da Petri e tubo horizontal no meio sólido (FASE I).
- 2 - Verificar o efeito de várias concentrações de ferrocianeto de potássio, no meio natural, em fermentação submersa e em superfície, estabelecendo o tratamento e concentração mais adequados para obter rendimentos satisfatórios (FASE II).

3 - Avaliar o melaço de cana-de-açúcar tratada como meio de cultura para produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* pelo processo de fermentação em superfície, realizando análise comparativa, com destaque ao efeito de traços de metais (FASE III).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES

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

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

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

A primeira fábrica citada por sua notável produção de ácido cítrico em escala industrial foi construída na Bélgica pela Sociedade de Produtos Orgânicos Tirlemont, em 1919. Posteriormente, entre os anos de 1923 e 1938, foram construídas diversas indústrias de produção na Inglaterra, USA, USSR e Alemanha.

Originalmente, as fermentações cítricas foram desenvolvidas por fermentações em superfície. SZUCS (E.U.A. Pat.

2.353.771, 1944), realizou importantes investigações utilizando processo submerso, o qual foi posteriormente sucedido pelas investigações de SHU & JOHNSON (1947).

Estudos similares foram reportados utilizando como substratos, o melão de cana (SHU & JOHNSON, 1947; WOODWAR, 1949; MOYER, 1953), melões de beterraba (STEEL et alii, 1955); amido (MOYER, 1953) e xaropes de glicose (SCHWEIGER & SNELL, 1949)

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

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

Em 1961, novas espécies (*Penicillium janthinellum* e *P. restrictum*) foram descritas em uma patente concedidas para KINOSHITA com apreciáveis rendimentos.

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

Muitas espécies de leveduras do gênero *Candida*, podem produzir ácido cítrico em quantidades apreciáveis, tais como: *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. fibriae* *C. subtropicalis*, *C. oleophila* (ROHR et alii, 1983). Uma das principais limitações do

emprego destas leveduras, é o acúmulo de quantidades significativas de ácido isocítrico, que é um subproduto indesejável (MARCHAL et alii, 1980) quando se utiliza glicose e hidrocarbonetos como substratos.

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

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

A fermentação em superfície é um dos processos mais conhecidos e empregados na produção de ácido cítrico. Foi introduzido em 1919 por Societé des Produits Organique na Bélgica; em 1923 por Chas. Pfizer & co. nos USA. é muito usado porque é um processo menos sofisticado e requer instalações mais simples, comparado com a fermentação submersa (KUBICEK, e ROHR, 1986).

O cultivo em superfície é feito em bandejas de alumínio criando uma grande superfície em relação ao volume, uma vez que a conversão de açúcar se dá intracelularmente, após a sua passagem para o interior da célula. O aumento na velocidade do processo é conseguido pela aceleração da difusão, pelo fato da película de fungos ser superficial.

Sendo a fermentação cítrica aeróbica, há necessidade de suprimento de oxigênio ao micélio, através de sua superfície (LIMA, 1975).

Geralmente, o material cru empregado neste tipo de fermentação é o melão de beterraba (MILSON, 1987). Também tem sido empregado com sucesso o melão da cana-de-açúcar (PANDA et alii, 1984; KUNDU et alii, 1984).

Segundo LIMA et alii (1975), os melões são diluídos para obter uma concentração de açúcar de 14-20% (p/v) e aquecidos para eliminar os microrganismos contaminantes. Depois de adicionados os nutrientes necessários, o meio é inoculado com uma cultura selecionada de *Aspergillus niger* e ajustado o suprimento de ar para controlar a temperatura e oxigênio no meio. A fermentação é feita entre 9 e 12 dias, depois o micélio é lavado para remover o ácido cítrico. Muito pouco se tem publicado a respeito da fermentação em superfície, porque as usinas mantêm os conhecimentos em segredo.

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

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

crescendo na forma filamentosa (TAKAHASHI, 1965).

Na escala microscópica é mencionado o micélio que apresenta um crescimento na forma de "pellets" resistentes, com hifas curtas ramificadas e entrelaçadas e que caracteriza-se como sendo essencial para a produção de ácido cítrico na fermentação submersa, SCHWERGER (E.U.A. Pat. 2.476.159, 1961).

A maioria da produção mundial de ácido cítrico é obtida pelo processo submerso (SODECK et alii, 1981). De acordo com KUBICEK e ROHR (1986), o processo submerso é conduzido em fermentadores de diferentes tipos, desde que possuam condições para proporcionar a aeração necessária e que sejam construídos de material resistente à corrosão. O processo é conduzido por um período de cinco a oito dias.

Outro tipo de fermentação empregado é o processo Koji, originalmente desenvolvido no Japão. Consiste em uma fermentação em meio sólido, geralmente empregando-se farelo de arroz ou resíduos de frutas que, após tratamento, são inoculados com uma suspensão de esporos espalhados na superfície. Sob condições ótimas, o processo é completado em 90 horas (KUBICEK e ROHR, 1986).

Muitos estudos estão sendo efetuados utilizando células imobilizadas em suportes inertes. VAIJA et alii (1982), imobilizaram "pellets" de *Aspergillus niger* em bandas de gel de alginato de cálcio e estudaram a produção de ácido cítrico em um sistema contínuo. TSAY & TO (1987) também imobilizaram conídios de *Aspergillus niger* TMB 2022 em gel de alginato de cálcio. Eles usaram uma suspensão contendo $2,32 \times 10^8$ conídios/mL.

Já que os fabricantes de ácido cítrico mantêm suas linhagens em segredo, a informação sobre a origem e os programas de seleção para linhagens industriais não estão geralmente disponíveis.

Parece que a maioria de tais linhagens, tem sido empiricamente selecionados, através do isolamento de habitats naturais, usualmente o solo.

De acordo com WENDEL (citado por ROHR et alii, 1983) há dois métodos principais para selecionar porções variadas de certa população: as técnicas de "single-spore" e "passage method".

Na técnica "single-spore", uma diluição de esporos convenientemente preparada e culturas de esporos simples são feitas e testados em ensaios separados. A idéia é que existe uma heterogeneidade de uma dada população de conídios e, conseqüentemente, devem existir indivíduos com alto rendimento dentro desta população. É óbvio que tal método requer ensaio sensível do produto obtido diretamente da placa de cultivo. Assim, JAMES et alii em 1956, introduziu indicadores de pH como meio de detectar rapidamente a formação de colônias altamente produtoras de ácido. Para obter somente uma difusão limitada de ácido cítrico, recomenda-se o uso de filtros de papel embebidos com um tipo de meio de fermentação de ácido cítrico. A desvantagem deste método é que ácidos orgânicos (oxálico e glucônico) simulam a presença de ácido cítrico. KUBICEK et alii (1979) melhoraram recentemente este método, pela incorporação de um corante específico para ácido cítrico (p-dimetilamino benzaldeído), em vez do indicador. Por esta técnica, um valor semiquantitativo de rendimento de ácido cítrico pode ser calculado, simplesmente comparando-se o diâmetro da zona de ácido cítrico com o diâmetro da colônia. Esta técnica não é aplicada para altas concentrações de ácido cítrico. Uma vantagem deste método, é que a sua aplicabilidade na re-seleção de linhagens "degeneradas", i.é. aquelas que têm perdido sua capacidade de produzir uma grande quantidade de ácido cítrico de um sub-cultivo prolongado.

A técnica "passage method", basicamente, consiste em inocular população em placas, contendo concentrações variadas de

substâncias que inibem a população com respeito ao tempo de germinação ou taxa de crescimento. Isto resulta na seleção de frações de população como uma função do crescimento das concentrações de agentes seletivos. Não existe nenhuma literatura disponível sobre o uso do método de passagem para melhorar linhagens produtoras de ácido cítrico.

Segundo MILSON (1987), nem todos os tipos de linhagens de *Aspergillus niger* são convenientes para a produção de ácido cítrico, mesmo sob condições ótimas de fermentação. Linhagens produtoras podem ser melhoradas mediante mutação. Suspensões de esporos podem ser tratados por agentes mutagênicos como: luz ultravioleta, raios X, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina e outros agentes químicos.

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

2.2. FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS NO ACÚMULO DE ÁCIDO CÍTRICO

O ciclo de ácido cítrico é o mecanismo pelo qual o acetato é oxidado em duas moléculas de CO_2 , sendo liberados da célula. De maneira normal, uma molécula de acetato é condensada com uma molécula de oxaloacetato, dando uma molécula de citrato. O citrato é metabolizado via isocitrato para oxaloacetato, perdendo uma molécula de CO_2 para produzir α -cetoglutarato, o qual, por sua vez, perde, posteriormente, uma molécula de CO_2 , dando succinato. O succinato é metabolizado via fumarato e malato para regenerar oxaloacetato. Se o ciclo de ácido cítrico é interrompido, nenhum oxaloacetato é regenerado para condensar com acetil-CoA, e assim

formar citrato. Daí, é necessário fazer agir a chamada reação anaplerótica, produzindo axaloacetato (Apêndice figuras 1A e 2A).

Segundo KUBICEK e ROHR (1986), do ponto de vista metabólico, o acúmulo de ácido cítrico é caracterizado por três processos distintos:

- 1) Oxidação de hexoses a piruvato e acetil-CoA através da glicólise.
- 2) A formação anaplerótica de oxaloacetato a partir de piruvato e fixação de CO₂.
- 3) Acúmulo de ácido cítrico no ciclo de ácido tricarboxílico.

O ciclo de ácido tricarboxílico é complexo e envolve várias enzimas. A aconitase, por exemplo, é sensível a altas concentrações de íons metálicos, como o Fe⁺⁺⁺ KUBICEK e ROHR (1985), estudaram a atividade de aconitase durante a fermentação cítrica, comparando diferentes concentrações de íons Fe⁺⁺⁺ e Cu⁺⁺.

A fixação de CO₂ por *Aspergillus niger* durante a produção de ácido cítrico e a presença de piruvato carboxilase foram estudadas por WARONICK & JOHNSON (1960).

2.3. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO CÍTRICA

Poucos trabalhos envolvendo cinética da fermentação cítrica são encontrados na literatura. Segundo ROHR (1981), a fermentação apresenta uma primeira fase caracterizada pelo crescimento rápido do fungo; uma segunda fase em que o crescimento diminui significativamente e a produção de ácido cítrico é máxima, constituindo um processo bifásico. Dependendo da velocidade do crescimento, há significativa formação de produto durante a fase

inicial. Na fase estacionária, a formação de produto é máxima. Os mesmos autores, em 1986, concluíram que a produção de ácido cítrico é realizada em uma pequena proporção por células em crescimento e, na maior parte, por células em fase estacionária.

2.4. FATORES QUE INFLUENCIAM O ACÚMULO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FUNGOS

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

O crescimento de *Aspergillus niger*, é ilimitado em meios de cultura ricos, sendo o mínimo o volume de ácido cítrico produzido. Por outro lado, se o crescimento é restrito a vias apropriadas, o ácido cítrico é produzido em volumes equivalentes a 70 - 90% de sacarose fornecida (MILSON, 1987).

A fermentação cítrica por *Aspergillus niger* deve ser conduzida e temperatura em torno de 30°C. segundo SODECK et alii (1981), citado por PRATA (1989), em temperaturas acima do limite máximo, ocorre formação de ácido oxálico; abaixo de 28°C ocorre diminuição significativa da produção de ácido cítrico.

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

Vários trabalhos tem sido publicados, utilizando altos pH (PANDA et alii 1984).

Quando o substrato é sacarose ou glicose (meio sintético), as fermentações são conduzidas em pH abaixo de 5.0 (SANCHEZ et alii 1963; GOMES et alii 1987).

Em processos de fermentação em superfície, poucos têm controlado o pH, uma vez que a fermentação seja iniciada. Em processos submersos, ao contrário, (MILSON, 1987), muitos valores de pH têm sido mencionados na literatura.

Em geral, apenas os açúcares que são assimilados rapidamente por fungos são utilizados como fontes de carbono na fermentação cítrica (sacarose, frutose, glicose). Segundo KUBICEK e ROHR (1986), a principal fonte de carbono empregada é a sacarose, seja na forma pura ou na forma presente nos melaços de cana-de-açúcar ou beterraba. A concentração de açúcar no meio é importante para obter rendimentos ótimos de ácido cítrico, e deve estar compreendida entre 14 - 22% (p/v).

Diversos trabalhos têm sido publicados mostrando as concentrações ótimas em sacarose para a fermentação cítrica. JERNEJ et alii, (1982), obtiveram um rendimento máximo de 82% em um meio sintético contendo 140 g/l de sacarose. HOSSAIN e colaboradores, em 1984, estudaram o efeito da fonte de carbono na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, obtendo um rendimento de 48% com sacarose como substrato; 35% com glicose; 25% com frutose; 7,5% com lactose e 0% com galactose.

A oxigenação por aeração é um problema significativo somente em fermentação submersa (MILSON, 1987). O consumo de oxigênio causa um aumento no consumo de açúcar e no crescimento do micélio. O oxigênio funciona como um regulador da produção. Uma interrupção do seu fornecimento faz com que a velocidade de

produção seja alterada completamente, dependendo da fase em que o processo se encontra (de crescimento do fungo, ou de acúmulo de ácido). O aumento da produção de ácido cítrico é relacionado proporcionalmente com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

Os meios de cultura para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, além de apresentar uma fonte de carbono, necessitam também nutrientes básicos: fonte de nitrogênio, de fosfatos, de sulfatos, adição de concentrações adequadas de metais como o ferro, cobre, zinco e manganês.

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

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

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

SHU & JOHNSON (1948) e KUBICEK e ROHR (1977), por outro lado, demonstraram que a produção de citrato é possível na presença de um excesso de nitrogênio no meio, onde fosfato é limitado. O mecanismo que explica esse efeito não tem sido elucidado. No entanto, tal mecanismo é necessário para explicar a produção de

ácido cítrico usando melaços de beterraba, ricos em nitrogênio.

Segundo MILSON (1987), a limitação de nitrogênio ou fosfato não é a única restrição que deve ser aplicada na cultura de *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico. Também se faz necessário restringir o fornecimento de certos traços de metais (Fe, Cu, Mn, Zn). Por outro lado, é bem conhecido que *Aspergillus niger* requer uma certa quantidade de todos os traços de elementos para o seu crescimento (STEINBERG, 1939).

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

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

Como tem sido demonstrado, a contaminação dos carboidratos crus por traços de metais é um fator que incide em seu emprego na fermentação cítrica. Para removê-los, existem diferentes métodos tais como a troca de cátions, complexação e precipitação com ferrocianeto.

2.5. MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DE ACIDO CITRICO

Os *Aspergillus* do grupo *niger* são provavelmente mais comuns do que qualquer outro grupo dentro do gênero. Eles apresentam uma ampla distribuição geográfica, e ocorrem em uma grande variedade de substratos, sendo abundantes nos solos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (BARACHO e COELHO, 1978).

Segundo SIEBERT e SCHUZ, em 1979, os substratos mais utilizados nos processos de fermentação por fungos são sacarose, o melão de cana-de-açúcar e o melão de beterraba. MILSON e MEERS (1985), incluíram o xarope de glicose.

KUBICEK e ROHR (1986), citaram também como substrato para a fermentação cítrica o caldo da cana-de-açúcar e vários hidrolizados.

Tem sido utilizadas outras matérias-primas como substratos para fermentação cítrica por fungos: o soro de queijo, o resíduo da indústria de algodão, o pó de semente de tamarindo, o resíduo de cervejaria, a polpa de batata-doce e água da lavagem de abacaxis. Atualmente, utilizam-se também os resíduos agrícolas e de madeiras (PRATA, 1979).

É necessário o tratamento do melão, pois apresenta níveis altos de metais como zinco, ferro e manganês, que atuam como interferência na fermentação cítrica. Diferentes métodos são empregados para removê-los: tratamento com ácido sulfúrico, com ferrocianeto de potássio (HCF), com fosfato tricálcico (TPC) e resinas de troca iônica. O tratamento com ferrocianeto de potássio é o mais utilizado (MILSON, 1987).

Segundo ROHR et alii (1983), o HCF tem um duplo efeito: precipita e complexa traços de metais (Fe, Cu, Mn e Zn) em excesso; atua como inibidor metabólico, restringindo o crescimento e promovendo produção de ácido cítrico. É necessário, portanto, manter um certo excesso de HCF no meio de fermentação.

A quantidade de HCF necessária para a solução de melações depende fortemente do tipo e qualidade do melação disponível. A quantidade de HCF requerida em excesso é determinada principalmente pela linhagem do fungo. Na prática, prefere-se determinar o excesso mediante investigações da fermentação em diferentes escalas. A quantidade total de HCF a ser adicionada é determinada simplesmente variando quantidade de HCF, e testando o excesso de HCF pelo método de MARIER e CLARK (1960).

O excesso de HCF varia de 10 mg a 100 mg HCF-ion/litro em melações de beterraba e 10 mg a 200 mg HCF-ion/litro em melação de cana-de-açúcar. Tem sido demonstrado que o *Aspergillus niger* tolera menos HCF durante a fermentação submersa, do que durante a fermentação superficial (KUBICEK e ROHR, 1986).

HOSSAIN et alii (1984) e TAHA (1959) estudaram o efeito de diferentes tipos de álcoois (metanol, etanol e propanol) e seu antagonismo com a contaminação por traços de metais nos carboidratos crus. A bioquímica deste efeito ainda não foi explicada, mas é obviamente relacionada como o efeito bioquímico exercido pelo manganês.

2.6. APLICAÇÕES DO ACIDO CITRICO

Segundo MILSON e MEERS (1985), existem três áreas principais de aplicação de ácido cítrico:

a) Na indústria alimentícia: Cobrindo 75% da produção mundial, o ácido cítrico é o acidulante mais versátil, utilizado em bebidas, geléias, doces em compotas; possui a capacidade de se agregar com metais pesados, o que leva a ser largamente empregado como estabilizante de óleos e gorduras, evitando sua oxidação.

b) Na indústria farmacêutica: Seu uso se torna ideal pelo seu poder capitulante e pelo seu poder efervescente, quando combinado com carbonatos e bicarbonatos, forma uma grande variedade de sais, tais como citrato trissódico, que é empregado para preservar o sangue e como substituto de fosfatos em detergentes.

c) Com propósitos técnicos: O ácido cítrico, com sua capacidade de agregar metais e com seu baixo poder de ataque a aços especiais, é amplamente aplicado na limpeza de diversos tipos de instalações industriais, além de outras aplicações industriais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMOS

Foram utilizadas neste estudo, vinte linhagens de *Aspergillus niger* proveniente da coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tossello" FTPT.

As designações dos microrganismos utilizados estão indicadas na tabela 1.

As culturas de *Aspergillus niger* foram mantidas em meio de esporulação e meio de batata-glicose-ágar (PDA), ágar inclinado a 4°C e repicadas cada mês. Como método efetivo e duradouro de manutenção de cepas, empregou-se a técnica de sílica gel e manutenção em água esteril para fungos filamentosos (BARRETO FIGUEIREDO, 1967).

TABELA 1. Linhagens de *Aspergillus niger* utilizadas neste trabalho.

Linhagens de <i>Aspergillus niger</i>	
ORIGEM	
FTPT	488
FTPT	905
FTPT	906
FTPT	907
FTPT	910
FTPT	911
FTPT	914
FTPT	915
FTPT	916
FTPT	917
FTPT	918
FTPT	919
FTPT	920
FTPT	922
FTPT	1213
FTPT	1220
FTPT	1435
FTPT	1762
FTPT	1884
FTPT	1904

FTPT: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello".

MEIO DE ESPORULAÇÃO	g/L
Sacarose	140,00
Ágar	20,00
KH_2PO_4	1,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25
NH_4NO_3	2,50
Extrato de Malte	1,50
Traços de metais	mg/L
Cu^{++}	0,14
Zn^{++}	1,40
Fe^{+++}	2,20
PDA	g/l
Batata (em infusão)	100,00
Glicose	40,00
Ágar	20,00

3.2. PREPARO DO INÓCULO

Uma suspensão de esporos não germinados obtida mediante cultivo em ágar inclinado, por um período de 10 dias, a uma temperatura de 30°C, foi utilizada como inóculo. O tubo, contendo a cultura esporulada, foi agitado vigorosamente em agitador (Cyclo Mixer da Clay Adams Vol. II), para destruição de aglomerados de esporos.

Após a contagem em Câmara de Newbauer, procedeu-se a diluição da suspensão para se obter de 1×10^7 a 2×10^7 esporos/mL.

3.3. MEIOS DE CULTURA

O presente trabalho foi desenvolvido em três fases, nas quais utilizou-se três tipos de meios de cultura:

3.3.1. MEIO SINTÉTICO

Constituído por: sacarose (140g/L); KH_2PO_4 (1g/L); MgSO_4 (0,25 g/L); NH_4NO_3 (2,5g/L); traços de metais: Cu^{++} (0,06 mg/L); Zn^{++} (0,25 mg/L); Fe^{+++} (0,45 mg/L). O pH ajustado com HCl para 2,3.

3.3.2. MEIO SÓLIDO

Constituído por: sacarose (140 g/L); KH_2PO_4 (1 g/L); Fe^{+++} 0,45 mg/L); ágar (15 g/L); indicador verde de bromocresol (0,02 g/L).

3.3.3. MEIO NATURAL

Empregou-se melão de cana-de-açúcar, fornecido pela Usina Santa Bárbara, Piracicaba, SP. O produto foi embalado e armazenado sob refrigeração, para o desenvolvimento da pesquisa.

3.3.3.1. PRIMEIRA FASE

O melão foi diluído com H₂O potável, de forma a obter-se uma quantidade de sólidos solúveis de 20°Brix. O pH foi ajustado para 5,4. Adicionou-se (NH₄)₂SO₄ (2 g/L); MgSO₄ (0,6 g/L); KH₂PO₄ (0,4g/L); K₄Fe(CN)₆.3H₂O (0,04 g/L).

3.3.3.2. SEGUNDA FASE

O melão da cana-de-açúcar utilizado como meio natural, foi submetido a dois tipos de tratamento com óxido de cálcio (item 3.3.3.4.1) e com fosfato tricálcico (item 3.3.3.4.2), visando a eliminação de elementos traços e impurezas prejudiciais à fermentação cítrica. Após tratamento, adicionou-se: NH₄NO₃ (1 g/L); KH₂PO₄ (0,6 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,16 g/L).

3.3.3.3. TERCEIRA FASE

Utilizou-se o melão de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio (CaO) e adicionado de 30 ppm de ferrocianeto de potássio (K₄Fe(CN)₆.3H₂O). Adicionou-se: NH₄NO₃ (1 g/L); KH₂PO₄ (0,6 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,16 g/L); traços de metais: Cu⁺⁺ (0,03; 0,06; 0,12 mg/L); Fe⁺⁺⁺ (0,22; 0,45; 0,90 mg/L).

3.3.3.4. TRATAMENTOS

3.3.3.4.1. TRATAMENTO COM ÓXIDO DE CÁLCIO (CaO)

Dilui-se o melão de cana-de-açúcar para obter uma quantidade de sólidos solúveis de 20° Brix, ajustando-se o pH entre uma faixa de 7,0 a 7,5 com CaO (10%), e aquecimento a 60° C por 30 minutos. Deixou-se em repouso por quatro horas. Posteriormente, pegou-se o sobrenadante e adiciona-se: 30 ppm, 100 ppm e 150 ppm de ferrocianeto de potássio ajustando-se novamente o pH entre 4,0 e 4,5 com HCl, seguido de um aquecimento a 80° C por 30 minutos. A amostra ficou em repouso por aproximadamente quatro horas e em seguida, foi centrifugada em centrífuga refrigerada (MLW Electronick 80) a 3.000 rpm. Logo procede-se a determinação do FCN residual pelo método de MARIER e CLARK (1960).

3.3.3.4.2. TRATAMENTO COM FOSFATO TRICÁLCICO (TPC)

Para o segundo tratamento utilizou-se o procedimento descrito por PANDA et alii (1984). Primeiramente dilui-se o melão para obter uma concentração de 20° Brix. A amostra foi aquecida a 40° C por cinco horas, centrifugada (centrífuga refrigerada) a 2.000 rpm por cinco minutos. ajustou-se o pH a 7,0 com NaOH, adicionou-se fosfato tricálcico (2%) e colocou-se na autoclave a 105° C por cinco minutos. A mistura foi esfriada e centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos. O precipitado produzido foi descartado. Posteriormente, pegou-se o sobrenadante após a adição da concentração de

ferrocianeto de potássio em concentrações de 30 pmm - 100 pmm e 150 pmm. O pH foi novamente ajustado a 2,0 com HCl 0,1N. Em seguida foi decantado por seis horas, e então centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos. Este meio natural foi empregado na fermentação com adição respectiva de nutrientes básicos (posteriormente descritos) e determinação do FCN residual pelo método de MARIER e CLARK (1960).

3.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos.

3.4.1. FERMENTAÇÃO SUBMERSA E DE SUPERFÍCIE

Os experimentos foram conduzidos em fermentação submersa e em fermentação em superfície utilizando frascos erlenmeyer de 250 mL de meio de cultura. O pH foi ajustado para 5,4 (fermentação submersa), 2,3 (fermentação em superfície); incubadas a uma temperatura de 30° C.

No caso de fermentação submersa, os frascos foram incubados sob agitação de 200 rpm em incubador agitador New brunswick Scientific G-25, enquanto que para fermentação em superfície foram incubadas sem agitação. Os experimentos foram conduzidos com 2 ou 3 repetições. Após período de 5 a 10 dias, foram retiradas amostras para fazer as respectivas análises.

3.4.2. MÉTODO DO TUBO HORIZONTAL

O experimento foi conduzido em tubos padronizados (FERRAZ e DURAN, 1989) de 40 cm de comprimento e 11 cm de diâmetro, com as bordas curvadas a um ângulo de 45° , tampados com algodão.

O meio de cultura e os tubos (em duplicata) foram esterilizados separadamente a 120° C por 15 minutos. adicionou-se 10 mL de meio sólido a cada tubo, e o inóculo colocado no extremo do tubo. Em seguida as culturas foram incubadas a uma temperatura de 30° C, medindo-se (em cm) diariamente o avanço da fronteira micelial da cultura, e a troca da cor do corante sobre o meio sólido apropriado, por um período de tempo de 12 dias.

Determinou-se a Unidade do ácido (UA) relacionando-se a distância do avanço micelial (C) com a distância da troca do pH do meio (A), obtendo-se $UA = A/C$.

3.4.3. TÉCNICA DA PLACA PETRI

As vinte culturas de *aspergillus niger* foram testadas em placa de Petri (em duplicata). Adicionou-se o inóculo na metade da placa com uma agulha. As culturas foram incubadas a 30° C por um período de 4 dias.

Relacionou-se o halo formado pela troca da cor (indicando troca do pH) com o diâmetro do crescimento micelial e calculou-se um valor semi-quantitativo de acidez em cm, traduzido em unidades de ácido (UA), mediante a relação do diâmetro da zona da troca da cor (A), sobre o diâmetro da colônia (C) $A/C = UA$.

3.5. OBTENÇÃO DO ACIDO CITRICO.

3.5.1. SELEÇÃO DO FUNGO

Inicialmente (fase I), os experimentos foram conduzidos com o objetivo de comparar o crescimento e a capacidade de produção de ácido de 20 cepas de *Aspergillus niger*, utilizando fermentação submersa e de superfície em meios sintético e natural (melaço sem tratamento), verificando o comportamento das culturas mediante as técnicas da placa da Petri e do tubo horizontal.

Posteriormente (fase II), empregou-se como meio de cultura o melaço de cana-de-açúcar tratado com CaO e TPC, avaliando-se diferentes concentrações de FCN, e determinando-se a concentração mais adequada para maior produção de ácido cítrico.

Na fase III, utilizou-se a linhagem FTPT 906 de *Aspergillus niger*, cultivando-se em melaço de cana-de-açúcar tratado com CaO (10%) e adicionado de 30 ppm de FCN, verificando-se o efeito de diferentes concentrações de traços de metais: íons de Cu^{++} e íons de Fe^{+++} , no crescimento e produção de ácido cítrico.

3.5.2. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE FERROCIANETO DE POTÁSSIO E DO TIPO DE TRATAMENTO

Para se determinar o nível ideal de ferrocianeto de potássio a ser empregado nas fermentações, avaliaram-se três níveis desse composto (30-100-150 ppm) adicionado ao melaço da cana-de-açúcar tratado com fosfato tricálcico (TPC) e óxido de cálcio (CaO).

Posteriormente, determinou-se o tratamento e o nível ideal para a fermentação com melaço de cana-de-açúcar. Após 5 a 10 dias de fermentação, coletaram-se amostras de micélio para a determinação de peso seco. Determinou-se no filtrado: pH, % de acidez e consumo de açúcar.

3.5.3. EFEITO DE METAIS

O efeito dos metais foi avaliado adicionando-se os íons Fe^{+++} em concentrações: 0,22, 0,45 e 0,90 mg/l e Cu^{++} 0,03, 0,06 e 0,12 mg/L e suas combinações, na forma de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ao melaço de cana-de-açúcar tratado com CaO adicionado de 30 ppm de ferrocianeto de potássio e suplementado com NH_4NO_3 (1g/l); KH_2PO_4 (0,6 g/l); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,16 g/l). Após dez dias de fermentação em superfície, coletaram-se amostras de micélio filtrado para as respectivas determinações de peso, pH, % de acidez, consumo de açúcar e ácido cítrico.

3.6. MÉTODOS ANALITICOS

Os testes foram realizados em duplicata e triplicata, realizando-se as seguintes determinações:

3.6.1. DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH (concentração hidrogeniônica) foi feita com potenciômetro Corning Scientific Instr. modelo 110 calibrado com soluções tampão a pH 7,0 e 4,0, sendo o pH das amostras determinado nas mesmas condições de temperatura.

3.6.2. DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA

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

O filtrado recolhido foi submetido às análises e o micélio lavado várias vezes com água destilada: a seguir procedeu-se a secagem em uma estufa de 55° C, até peso constante.

3.6.3. DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ TOTAL (% ACIDEZ)

Um volume de 1 mL de amostra foi completado para 10 mL com água destilada recentemente fervida e, em seguida, titulado com NaOH 0,1N usando fenolftaleína com indicador até viragem para coloração rosa. Para padronização de NaOH foi utilizado biftalato de potássio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) dessecado a 120°C por duas horas antes de usado.

Os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico/100mL.

Acidez total (g ácido cítrico/100 mL=

$$\frac{\text{NNaOH} \times \text{VNaOH} \times \text{Pm.eq.H} \times 100}{\text{V (amostra)}}$$

V (amostra)

3.6.4. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCAR

Os açúcares reductores (AR) e os açúcares reductores totais (ART), foram determinados utilizando-se a metodologia DNS; redução do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

Na determinação de ART, foi feita uma hidrólise ácida da amostra misturando-se 1 mL da amostra com 2 mL de HCl 1N, aquecendo-se a 100°C (água fervente) durante 10 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 2 mL de NaOH 1N e procedeu-se a determinação de ART pelo método já mencionado.

Fez-se a curva de calibração com glicose na faixa de 0,1 a 10 g/l. A absorbância foi lida em espectrofotômetro Bausch & Lomb Espectronic 20, utilizando um comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados foram expressos em gramas de açúcares totais por litro de meio, calculados como glicose.

3.6.5. DETERMINAÇÃO DO FERROCIANETO DE POTÁSSIO (FCN) RESIDUAL)

Inicialmente, 1 mL da amostra (melaço) contendo as concentrações de ferrocianeto de potássio (30-100-150 ppm) foi diluída com água destilada para obter um volume de 5 mL. Adicionou-se 2 mL da solução de ácido cítrico a 50%, e 1 mL da solução de cloreto férrico a 0,6% (para remover o ferrocianeto de potássio residual), misturando-se bem.

Deixou-se em repouso durante 60 minutos a temperatura ambiente. Depois foram feitas as leituras de absorbância em espectrofotômetro Bausch e Lom Espectronic 20, utilizando-se um comprimento de onda de 690 nm.

Para corrigir a cor escura do melaço, preparou-se um tubo (com melaço), e se continuou o processo como foi descrito anteriormente, mas substituindo 1 mL de H₂O por solução de cloreto férrico (0,6%). Determinou-se a absorbância das amostras testadas.

Fez-se a curva de calibração com ferrocianeto de potássio (FCN) na faixa de 200 ppm a 2 ppm.

3.6.6. CROMATOGRAFIA DE PAPEL

A determinação de ácido cítrico foi feita mediante cromatografia de papel, nas seguintes condições: papel de filtro Whatman No 1 com dimensões de 36 x 20 cm, em técnica ascendente, por oito horas a temperatura ambiente, o volume das amostras de 25 microlitros e o solvente: butanol, ácido fórmico e água em uma proporção de 10:2:5.

Aplicou-se 0,1N de soluções ácidas padrões (ácido cítrico, oxálico, málico e láctico).

A posição dos ácidos orgânicos no cromatograma foi revelada mediante o uso do indicador verde de bromocresol, 400 mg/l em 95% álcool (STARK et alii, 1951).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FASE 1

4.1.1. FERMENTAÇÃO EM SUPERFÍCIE E SUBMERSA

Foi constatada uma considerável variação quanto ao comportamento traduzido em massa seca (gramas/frasco) e porcentagem de acidez (gramas de ácido cítrico/100 mL) das vinte linhagens de *Aspergillus niger* durante a fermentação em superfície e fermentação submersa, a qual pode ser verificada na análise das tabelas 2, 3, 4 e 5.

As tabelas 2 e 3 mostram os resultados obtidos para massa seca e % de acidez da fermentação em superfície, em meios sintético e natural, durante um tempo de 5 a 10 dias. Observou-se que, aos 10 dias as linhagens FTPT 906, 920, 911 e 914 apresentaram os mais altos valores de porcentagem de acidez no meio natural, no entanto no meio sintético o maior porcentagem correspondem as cepas 916, 906 e 1762.

As tabelas 4 e 5, apresentam os valores referentes à fermentação submersa nos meios sintético e natural. No final do período da fermentação observou-se que, as linhagens FTPT 488, 910 e 1762 (no meio natural) e as linhagens FTPT 1762, 918 e 922 (no meio sintético), apresentaram maior quantidade de produto acumulado no meio de cultura.

Comparando-se o crescimento celular estimado pela massa seca e a capacidade de produção de ácido das vinte linhagens de *Aspergillus niger*, observou-se que algumas destas linhagens crescem e produzem ácido durante todo o período de fermentação, sendo que outras só crescem até o dia 5, produzindo ácido até o fim da fermentação, conforme relatado por ROHR e KUBICEK (1981), os quais caracterizaram a fermentação cítrica em duas fases: uma de crescimento rápido do fungo com pouca formação de produto, e uma segunda fase em que o crescimento é restrito e a produção de ácido é máxima, constituindo um processo bifásico.

TABELA 2. Valores de massa seca (g/frasco) na fermentação em superfície, a 30°C.

LINHAGENS FTPT	MEIO NATURAL		MEIO SINTÉTICO	
	Massa seca (g/frasco)			
	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias
488	1,23	1,28	2,35	2,54
905	2,65	2,96	1,70	1,80
906	2,00	2,01	1,07	2,32
907	0,95	1,20	0,02	2,52
910	1,39	1,98	2,03	2,26
911	2,40	2,42	1,89	2,43
914	2,12	3,63	1,86	2,10
915	1,00	1,90	2,34	2,40
916	2,02	2,67	1,60	2,72
917	1,82	2,41	1,18	1,60
918	2,29	3,78	1,46	1,63
919	1,95	2,31	1,13	1,20
920	1,99	2,45	1,69	1,88
922	0,93	0,95	1,70	2,00
1213	1,98	2,81	1,16	1,51
1220	0,96	1,56	2,16	2,50
1435	0,80	1,35	1,77	2,32
1762	1,67	1,79	1,31	1,89
1884	2,29	2,36	2,71	2,78
1904	2,27	3,93	1,56	1,57

TABELA 3. Valores de porcentagem de acidez (gramas de ácido cítrico/100 mL em fermentação em superfície, a 30°C.

LINHAGENS FTPT	MEIO NATURAL		MEIO SINTÉTICO	
	% Acidez (g ácido cítrico/100 mL)			
	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias
488	1,70	1,44	3,77	4,46
905	0,94	1,04	1,75	2,00
906	1,55	3,02	0,29	4,24
907	0,85	0,95	2,35	2,54
910	1,78	0,20	3,20	2,45
911	2,50	1,96	2,76	2,07
914	1,90	1,92	3,66	4,14
915	1,00	0,94	1,25	1,47
916	1,51	1,50	4,21	6,60
917	1,13	1,07	1,07	2,29
918	1,88	0,90	4,35	3,26
919	1,38	0,68	0,61	0,98
920	2,33	2,34	2,42	3,87
922	0,81	0,99	2,63	2,98
1213	0,85	1,35	0,28	0,54
1220	0,97	0,97	2,65	3,02
1435	0,69	0,14	0,59	1,20
1762	1,28	1,85	0,68	4,14
1884	1,27	1,05	1,28	1,71
1904	2,96	1,91	0,79	0,75
Média	1,46	1,31	2,03	2,74

TABELA 4. Valores de massa seca (g/frasco) na fermentação em submersa, a 30°C.

LINHAGENS FTPT	MEIO NATURAL		MEIO SINTÉTICO	
	Massa seca (g/frasco)			
	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias
488	2,78	2,80	1,21	2,10
905	1,92	2,69	1,82	1,84
906	1,77	2,58	2,03	2,09
907	2,92	3,00	1,17	1,72
910	2,41	3,18	2,12	2,35
911	1,52	3,13	1,67	2,91
914	2,05	2,66	1,80	2,04
915	2,77	2,89	1,29	2,02
916	2,35	3,23	1,65	1,76
917	1,58	2,09	1,79	1,95
918	2,17	2,70	1,65	1,80
919	1,43	1,93	1,48	2,02
920	3,10	3,15	0,99	2,27
922	3,33	2,82	1,15	1,75
1213	2,19	2,80	1,27	2,08
1220	2,27	2,32	1,16	1,59
1435	1,95	2,62	0,79	0,96
1762	3,18	3,50	0,88	2,08
1884	3,07	3,10	1,59	2,80
1904	1,79	2,51	1,51	2,39

TABELA 5. Valores obtidos de porcentagem de acidez (gramas de ácido cítrico/100 mL) na fermentação submersa, a 30° C.

LINHAGENS FTPT	MEIO NATURAL		MEIO SINTÉTICO	
	% Acidez (g ácido Cítrico/100 mL)			
	5 dias	10 dias	5 dias	10dias
488	0,82	1,69	0,54	1,33
905	0,65	0,70	1,15	0,70
906	0,82	0,97	1,20	0,73
907	1,52	1,40	1,06	1,27
910	0,55	1,27	1,06	1,33
911	0,60	1,00	2,85	1,73
914	0,57	1,00	2,53	1,54
915	0,70	0,97	0,76	1,23
916	0,91	0,84	1,40	2,72
917	0,66	0,21	2,20	1,33
918	0,76	1,32	2,08	1,87
919	0,79	0,24	0,85	0,52
920	1,08	1,22	0,73	0,70
922	0,97	1,04	0,47	1,82
1213	0,57	0,61	0,40	0,24
1220	0,58	0,91	0,30	1,64
1435	0,64	0,15	0,39	0,70
1762	1,05	1,27	0,63	1,99
1884	0,85	0,94	1,00	0,94
1904	0,75	1,12	1,14	0,70
Média	0,79	0,95	1,11	1,19

4.1.2. TÉCNICAS DA PLACA PETRI E DO TUBO HORIZONTAL

Na técnica da placa petri, foi determinada a Unidade de Ácido (UA) das vinte linhagens de *Aspergillus niger*, dividindo o diâmetro do halo produzido pelo diâmetro da colônia (tabela 7).

Na técnica do tubo horizontal, a unidade de ácido (UA) foi calculada dividindo a distância da viragem da cor produzida pela distância do crescimento da colônia (tabela 8).

Foram calculados os coeficientes de correlação entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia e entre a distância da troca da cor e a distância do crescimento da colônia, cujos resultados estão apresentados na tabela 6.

TABELA 6. O diâmetro da colônia-diâmetro do halo e a distância do crescimento da colônia-distância da troca da cor.

TÉCNICA	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO
Diâmetro da colônia/diâmetro do halo	0,80696
Distância do crescimento da colônia/distância da viragem da cor	-0,56555

O valor do coeficiente de correlação, obtido na técnica da placa Petri é significativo ($p=0,05\%$), indicando que existe uma relação alta e direta entre o diâmetro do halo

diâmetro da colônia.

No caso do tubo horizontal, obteve-se um valor de r significativo ($p=0,05\%$), indicando também que existe relação entre a distância de crescimento micelial e a distância da troca da cor, porém sendo uma relação baixa e inversa. Tal observação poderia indicar a correlação de um carácter morfológico, no caso lento desenvolvimento da colônia com a maior produção de ácido (hipótese defendida por GANHER et alii, 1956).

Entre tanto HANNAN (1972) analisou um certo número de linhagens de *Aspergillus niger*, mostrando que tal carácter morfológico não estava sempre ligada com a propriedade de alta produção.

Muitos autores, trabalhando com diversos microrganismos industriais, procuraram também estabelecer correlação entre certos caracteres morfológicos e a produção. No presente trabalho, analisando-se os resultados obtidos, não se encontrou uma característica morfológica que pudesse ser associada ao carácter de produção.

TABELA 7. Valores obtidos do diâmetro da colônia (cm) do diâmetro do halo

LINHAGENS	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo (cm)	UA
488	11,0	53,5	4,9
905	8,0	45,5	5,7
906	10,0	56,5	5,7
907	11,0	51,5	4,7
910	5,0	45,0	9,0
911	7,5	47,5	6,3
914	6,0	47,5	7,9
915	7,0	46,5	6,6
916	5,0	44,0	8,0
917	7,5	44,5	5,9
918	10,5	59,5	5,7
919	5,0	33,0	6,6
920	4,0	27,0	6,8
922	7,0	49,0	7,0
1213	8,0	50,0	6,3
1220	7,5	48,8	6,4
1435	5,3	44,5	8,4
1762	8,0	47,5	5,9
1884	6,5	47,5	7,3
1904	9,5	51,0	5,3
Média			6,6

TABELA 8.

Valores da distância do crescimento da colônia (cm) e a distância da viragem da cor na técnica do tubo horizontal

LINHAGENS	Distância do crescimento da colônia (cm)	Distância da viragem da cor (cm)	UA
488	31,0	167,0	5,4
905	30,0	158,0	5,3
906	43,0	167,0	3,9
907	43,0	162,0	3,8
910	40,0	169,0	4,2
911	41,0	161,0	3,9
914	40,0	169,0	4,2
915	44,0	165,0	3,8
916	26,9	171,9	6,6
917	28,0	162,0	5,8
918	30,0	166,0	5,5
919	28,0	167,0	6,0
920	25,0	171,0	6,8
922	30,0	162,0	5,4
1213	38,0	151,0	4,0
1220	30,0	164,0	5,5
1435	50,0	154,0	3,1
1762	22,0	176,5	8,0
1884	56,0	156,0	2,8
1904	48,0	161,0	3,4
Média			4,9

3.1.3. ANALISE DE SIMILARIDADE DE PRODUÇÃO DE ACIDO ENTRE AS DIFERENTES FORMAS E MEIOS DE FERMENTAÇÃO, UTILIZANDO O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

Os resultados comparando os meios: natural, sintético, sólido e as formas de fermentação: submersa, em superfície, em placa Petri e tubo horizontal, foram analisados estatisticamente, utilizando coeficiente de correlação de Pearson como mostra a tabela 9, no tempo de 10 dias. observou-se que, em geral, estes valores são baixos, e a maioria não são significativos ($p= 0,05$). Isto significa que as linhagens apresentaram um comportamento de produção de ácido dependente do meio e da forma de fermentação.

Para sustentar o anteriormente assinalado, pode-se estudar o comportamento quanto a acidez das linhagens de maior produção em meios naturais (melaço de cana-de-açúcar). A linhagem FTPT 906 é a que apresenta maior produção na fermentação em superfície (tabela 3), porém sua produção diminui em 67,9% quando a fermentação é submersa no mesmo meio (tabela 5), esta redução se faz maior ainda em fermentação submersa em meio sintético (75,8%), representado na tabela 5. No entanto, a fermentação em superfície e meio sintético favorece sua produção (40,4% de incremento), não sendo, porém, a linhagem de maior produção nessa modalidade de fermentação (tabela 3).

A situação com respeito a linhagem FTPT 488 é similar, apresentando maior nível de acidez em fermentação submersa e meio natural (tabela 5), reduzindo sua produção em 14,8% quando é cultivada em fermentação em superfície e meio natural (tabela 3), e 20% em fermentação submersa e meio sintético. Esta linhagem aumenta sua produção (164%), em fermentação superficial e em meio

sintético (tabela 3), comportamento similar a linhagem 906, já mencionado.

Por outro lado, existem algumas linhagens cujo comportamento quanto a produção de ácido não se observa grandemente afetada pela forma e meio de fermentação. Por exemplo, a linhagem 1762 que apresenta uma produção média de ácido, sob qualquer modalidade de fermentação.

4.1.4. COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS E MEIOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO-SE AS MÉDIAS DE PORCENTAGEM DE ACIDEZ (GRAMAS DE ÁCIDO CÍTRICO/100 mL)

Observou-se que a fermentação em superfície e meio sintético, apresentou uma média de 2,7% mais ácido, comparado com as demais formas de fermentação nos diferentes meios de cultura num tempo de 10 dias. O fato do meio sintético estar desprovido de impurezas e interferências metálicas deve ser um dos fatores para o aumento na produção de ácido cítrico.

TABELA 9. Coeficiente de correlação de Pearson dos diferentes meios e técnicas empregados

Meios técnicos (*)	Coeficiente de correlação (r)
1 e 2	0,31044
1 e 3	0,42124
1 e 4	-0,03609
1 e 5	-0,32502
1 e 6	0,15917
2 e 3	0,45929
2 e 4	0,45573
2 e 5	-0,28911
2 e 6	0,11146
3 e 4	0,49029
3 e 5	0,15651
3 e 6	0,55016
4 e 6	0,01821
4 e 6	0,35153
5 e 6	-0,06853

- (*) 1 - Meio natural, fermentação em superfície
 2 - Meio natural, fermentação submersa
 3 - Meio sintético, fermentação em superfície
 4 - Meio sintético, fermentação submersa
 5 - Meio sólido, placa Petri
 6 - Meio sólido, tubo horizontal

4.2. FASE 2

Tendo em vista a necessidade de se adicionar ferrocianeto de potássio (FCN) ao meio de cultura, foram conduzidos experimentos para verificar o efeito das várias concentrações de FCN (30-100-150 ppm), num tempo de 0 a 10 dias, avaliando-se a concentração (item 3.5.2) e o tratamento mais adequado (item 3.3.3.4) para obter-se resultados satisfatórios quanto a massa seca (gramas/frasco), porcentagem de acidez (gramas de ácido cítrico) e consumo de açúcar (g/L) nas linhagens selecionadas: FTPT 906 para fermentação em superfície, FTPT 488 para fermentação submersa e 1762 como cepa aleatória, testada nas duas formas de fermentação (tabelas 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17).

Comparando-se os resultados obtidos quanto a porcentagem de acidez e massa seca das cepas testadas, observou-se que o tratamento com óxido de cálcio do meio de cultura com melão de cana-de-açúcar, resultou ser mais eficiente que o tratamento com fosfato tricálcico (TPC).

Com o objetivo de obter com maior precisão quanto ao nível de ferrocianeto de potássio (FCN) no meio de cultura, determinou-se o ferrocianeto residual pelo método de MARIER e CLARK (1960), encontrando-se: na adição de 30 ppm, o ferrocianeto residual foi de 5 ppm ; na adição de 100 ppm, o ferrocianeto residual foi de 17 ppm e na adição de 150 ppm, o ferrocianeto residual foi de 50 ppm.

Nota-se que os valores obtidos para a cepa FTPT 906 de porcentagem de acidez ao final de fermentação, quando se utilizaram 30 ppm de ferrocianeto de potássio, foram superiores aos obtidos nas demais concentrações. Este nível foi considerado ideal para favorecer a fermentação do melão de cana-de-açúcar nas condições

estudadas.

Comparando-se o crescimento de massa celular nos níveis alto (150 ppm) e baixo (30 ppm) de ferrocianeto de potássio na mesma cepa, observou-se, que no nível alto, a produção de massa celular é maior e a produção de ácido é menor. Tal fato indica que a produção de ácido está diretamente relacionada com a inibição do crescimento do fungo, conforme relatado por HORITSU e CLARK (1966). Segundo esses autores, o ferrocianeto de potássio controla o crescimento de *Aspergillus niger* em fermentação de melão, alterando sua capacidade de produção de ácido cítrico.

Verificou-se que a cepa 1762 utilizada como cepa aleatória, teve um comportamento diferente nos dois tipos de fermentação. Observou-se que no meio tratado com CaO num tempo de 10 dias, nas condições de fermentação em superfície, a mesma foi mais eficiente quanto a produção de acidez (3,27%) do que quanto a fermentação submersa (1,92%), como mostram as tabelas 12 e 15, o que está de acordo com as observações de KUBICEK e ROHR (1986), os quais afirmaram que *Aspergillus niger* tolera menos ferrocianeto de potássio durante a fermentação submersa do que durante a fermentação superficial. A massa celular produzida coincide com as observações feitas para a cepa 906, pois no tempo que há maior produção, o crescimento celular tende a inibir-se quanto a formação de ácido.

O nível de ferrocianeto de potássio com maior eficiência foi alto (150 ppm), com ferrocianeto residual de 50 ppm nos dois tipos de fermentação e com o meio de cultura tratado com óxido de cálcio (CaO). Quando o meio de cultura foi tratado com fosfato de tricálcico (TPC), o nível de FCN de maior eficiência foi de 100 ppm com um ferrocianeto residual de 17 ppm. Conforme relatado por ROHR et alii (1983), o ferrocianeto de potássio tem um duplo efeito: precipita-se e complexa traços de metais e atua como inibidor metabólico, restringindo o crescimento e promovendo produção de

metabólico, restringindo o crescimento e promovendo produção de ácido cítrico. Portanto, faz-se manter um certo excesso de ferrocianeto de potássio no meio de fermentação.

As características morfológicas observadas na fermentação submersa pode ter sido resultado na ação do ferrocianeto de potássio no melaço de cana-de-açúcar, no sentido de manter os íons manganês num nível inferior ao que proporciona o crescimento do fungo em forma filamentosa.

Os valores de massa celular e de porcentagem de acidez obtidos na cepa FTPT 488 para os dois tratamentos foram inferiores aos obtidos nas outras duas cepas. Notou-se a inibição tanto do crescimento como da produção de ácido, sugerindo que o fungo *Aspergillus niger* é geralmente mais sensível à troca de metais e a mudanças nas condições do meio de cultura na fermentação submersa do que na fermentação em superfície (aspecto importante citado por ROHR et alii, 1983).

Foi feito o procedimento para determinar a melhor concentração de ferrocianeto de potássio (item 3.5.2), encontrando-se os níveis de ferrocianeto residual correspondente a cada adição (valores na faixa de 5 a 30 ppm). Os dados obtidos foram comparados com as observações de KUBICEK e ROHR (1986), que relataram ser impossível predizer o nível correto de ferrocianeto de potássio necessário para o tratamento de matérias-primas contaminadas com metais, o qual deve ser determinado por testes preliminares. Os autores relataram também que a quantidade necessária de adição de ferrocianeto de potássio ao meio de melaço, situa-se na faixa de 10 a 200 ppm, dependendo da qualidade da matéria-prima.

TABELA 10. Parâmetros de fermentação em superfície, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 906, em melão de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio (CaO), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (DIAS)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/L)
0	30	0,00	0,31	0,00
	100	0,00	0,41	0,00
	150	0,00	0,43	0,00
2	30	1,33	0,31	44,00
	100	1,47	0,47	17,50
	150	0,99	0,46	4,30
4	30	1,85	0,47	98,00
	100	1,70	0,70	21,70
	150	2,37	1,20	47,50
6	30	4,17	1,47	115,00
	100	2,76	1,36	60,10
	150	2,39	2,16	82,50
8	30	4,19	3,30	120,00
	100	5,03	1,83	64,80
	150	2,47	1,84	94,70
10	30	4,21	4,50	138,00
	100	5,04	0,88	75,90
	150	2,59	2,15	98,00

TABELA 11. Parâmetros de fermentação em superfície, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 906, em melaço de cana-de-açúcar tratado com fosfato tricálcico (TPC), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (DIAS)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/L)
0	30	0,00	0,2831	0,00
	100	0,00	0,3841	0,00
	150	0,00	0,463	0,00
2	30	0,69	0,29	11,50
	100	0,18	0,44	8,80
	150	1,06	0,64	20,80
4	30	1,45	0,52	59,50
	100	0,24	0,79	17,30
	150	2,73	1,00	32,90
6	30	2,32	0,90	115,50
	100	2,42	1,25	62,70
	150	3,26	1,92	77,20
8	30	2,86	1,53	130,00
	100	2,86	1,42	89,00
	150	3,66	2,02	81,30
10	30	2,94	1,27	132,00
	100	3,37	0,41	97,40
	150	4,28	2,00	84,80

TABELA 12.

Parâmetros de fermentação em superfície; obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 1762, em melaço de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio (CaO), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (Dias)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/l)
0	30	0,00	0,43	0,00
	100	0,00	0,50	0,00
	150	0,00	0,33	0,00
2	30	1,78	0,43	13,40
	100	1,01	0,50	13,20
	150	2,00	1,02	15,40
4	30	5,25	0,94	28,14
	100	2,05	0,70	25,90
	150	2,07	2,71	66,10
6	30	5,32	1,10	37,00
	100	2,81	1,61	57,70
	150	2,26	2,70	73,20
8	30	5,40	1,64	70,68
	100	5,79	2,10	62,50
	150	2,32	3,07	122,30
10	30	5,47	1,58	90,00
	100	5,80	3,05	123,10
	150	2,35	3,27	124,00

TABELA 13. Parâmetros de fermentação em superfície, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 1762, em melão de cana-de-açúcar tratado com fosfato tricálcico (TPC), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (Dias)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/l)
0	30	0,00	0,42	0,00
	100	0,00	0,30	0,00
	150	0,00	0,27	0,00
2	30	1,03	0,76	4,70
	100	0,42	0,30	8,80
	150	0,24	0,34	15,40
4	30	1,57	1,09	13,90
	100	1,65	0,70	17,40
	150	1,34	0,55	66,10
6	30	3,80	1,03	22,70
	100	2,32	1,40	62,70
	150	2,02	1,61	73,60
8	30	3,77	1,28	52,30
	100	2,32	2,13	71,70
	150	2,96	1,64	84,30
10	30	4,78	1,09	128,50
	100	3,21	2,68	82,10
	150	3,04	2,06	88,30

TABELA 14. Parâmetros de fermentação submersa, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 1762, em melão de cana-de-açúcar tratado com fosfato de tricálcico (TPC), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (DIAS)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/L)
0	30	0,00	0,43	0,00
	100	0,00	0,50	0,00
	150	0,00	0,21	0,00
2	30	1,53	0,50	12,50
	100	1,70	0,53	8,90
	150	1,50	0,94	27,40
4	30	1,63	0,82	40,0
	100	2,03	0,94	21,70
	150	2,12	1,07	53,40
6	30	2,43	1,30	71,60
	100	2,30	1,23	38,20
	150	1,91	1,28	88,70
8	30	2,46	1,08	115,00
	100	2,22	1,16	61,30
	150	1,97	0,79	112,10
10	30	2,66	1,12	128,40
	100	3,09	1,60	75,80
	150	1,97	0,25	118,10

TABELA 15. Parâmetros de fermentação submersa, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 1762, em melão de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio (CaO), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (DIAS)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/L)
0	30	0,00	0,43	0,00
	100	0,00	0,29	0,00
	150	0,00	0,27	0,00
2	30	1,73	1,06	32,40
	100	1,50	0,52	8,50
	150	0,98	0,30	17,50
4	30	2,59	1,96	89,90
	100	1,97	1,77	16,90
	150	1,24	1,75	45,20
6	30	3,21	1,66	110,50
	100	2,36	1,79	25,00
	150	1,96	1,79	64,80
8	30	3,33	1,52	123,50
	100	2,73	1,96	44,30
	150	2,33	2,51	115,40
10	30	3,47	0,74	126,60
	100	2,81	1,29	48,10
	150	2,89	1,92	118,80

TABELA 16. Parâmetros de fermentação em submersa, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 488, em melaço de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio (CaO), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (DIAS)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/L)
0	30	0,00	0,38	0,00
	100	0,00	0,41	0,00
	150	0,00	0,49	0,00
2	30	2,24	0,77	27,20
	100	1,54	0,83	9,10
	150	2,15	1,22	50,60
4	30	2,90	1,04	69,00
	100	1,86	1,22	26,70
	150	2,63	1,39	70,20
6	30	3,00	0,99	105,40
	100	3,20	1,75	99,70
	150	2,74	1,66	80,40
8	30	3,20	0,93	127,20
	100	3,40	1,19	122,90
	150	3,35	1,13	110,0
10	30	3,80	0,64	128,20
	100	3,58	0,48	128,70
	150	3,36	0,54	128,00

TABELA 17. Parâmetros de fermentação submersa, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 488, me melão de cana-de-açúcar tratado com fosfato tricálcico (TPC), adicionado de diferentes níveis de ferrocianeto de potássio (FCN)

TEMPO (DIAS)	FCN (ppm)	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR(g/L)
0	30	0,00	0,26	0,00
	100	0,00	0,40	0,00
	150	0,00	0,46	0,00
2	30	0,12	0,88	4,60
	100	0,65	0,79	30,90
	150	2,00	1,18	53,10
4	30	0,16	0,88	97,00
	100	1,83	1,06	70,50
	150	2,20	1,50	78,40
6	30	0,20	0,90	134,20
	100	1,86	1,67	97,70
	150	2,40	1,14	126,90
8	30	0,21	0,30	134,40
	100	2,89	0,85	118,10
	150	2,04	0,96	129,70
10	30	0,75	0,18	123,30
	100	2,97	0,33	124,60
	150	2,50	0,46	131,00

4.3. TERCEIRA FASE

É bem conhecido que *Aspergillus niger* requer, além dos nutrientes, traços de metais (Fe, Cu, Zn, Mn), aspecto amplamente discutido na literatura. Em diferentes pesquisas, é citada a importância e o controle de cada um dos elementos para o processo de fermentação cítrica.

No presente trabalho, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de íons ferro (Fe^{+++}) e cobre (Cu^{++}) e suas combinações sobre a fermentação cítrica (tabela 18).

O efeito mais marcante quanto a porcentagem de acidez foi observado no meio 8, com uma concentração de 0,90 mg/L de ferro, indicando ser a melhor concentração nas condições do meio de cultura testado. Nas demais concentrações de ferro testados (0,45 e 0,22 mg/L), a porcentagem de acidez diminuiu em 3,6 e 21,6% respectivamente. SHU e JOHNSON (1947), citado por KUBICEK e ROHR (1986), observaram efeito positivo da adição de Fe^{+++} isoladamente sobre a fermentação cítrica por *Aspergillus niger*, em meio sintético.

Observou-se uma diminuição da produção em 34,6% quando se adicionaram os dois elementos em conjunto (meio 5). No caso dos meios onde adicionou-se Cu^{++} 0,03; 0,06 e 0,10 mg/L, observou-se uma diminuição de 18,1; 32,1 e 20,62% respectivamente de acidez. Isto pode ser atribuído ao fato do meio de cultura, estar contaminado com metais interferentes especialmente manganês, conforme relato de CLARK et alii (1966), os quais observaram que o manganês em níveis acima de dois ppb, leva ao crescimento de *Aspergillus niger* em forma filamentosa, diminuindo sua capacidade de produção de ácido cítrico. SCHWEIGER (E.U.A Pat. 2.980.084. , 1961), mostrou que íons de cobre (Cu^{++}) podem contra-atacar com sucesso à adição de

manganês no meio de fermentação. Estas observações foram confirmadas por recentes investigações que ions de Cu^{++} são inibidores do acúmulo de manganês celular. Neste trabalho, a inibição pode ser atribuída, talvez, ao fato de que as concentrações de Cu^{++} empregadas não foram suficientes para contrabalançar o manganês presente no meio de cultura.

A obtenção de valores de porcentagem de acidez superiores aos demais, no meio 8, indica a necessidade dos metais em estudo a concentrações que proporcionam as condições fisiológicas para obter maior capacidade do acúmulo de ácido cítrico pelo fungo. Também, o efeito positivo do ion Fe^{+++} (90,9 mg/L), pode indicar que o tratamento a que foi submetido o melaço de cana-de-açúcar foi adequado para reduzir o respectivo teor a nível tal que, com sua posterior suplementação, obteve-se uma concentração capaz de proporcionar aumento de produção de ácido pelo fungo *Aspergillus niger* FTPT 906.

TABELA 18. Parâmetros de fermentação cítrica, obtidos por *Aspergillus niger* FTPT 906, em melão de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio (CaO) e 30 ppm de FCN, suplementado com NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e MgSO_4 , adicionado de diferentes concentrações de metais, cultivado durante 10 dias em superfície

MEIO	pH	MASSA SECA (g/frasco)	ACIDEZ (g/100mL)	CONSUMO DE AÇÚCAR (g/L)
1	2,85	3,45	4,49	84,5
2	2,73	3,59	3,93	88,0
3	2,82	3,27	3,26	85,0
4	2,76	3,60	3,81	103,5
5	2,85	3,40	3,14	92,0
6	2,69	3,87	3,81	87,0
7	2,79	3,00	4,61	108,00
8	2,72	3,78	4,80	105,5

Meio 1: melão de cana-de-açúcar (meio padrão)

Meio 2: meio 1 + Cu^{++} (0,03 mg)

Meio 3: Meio 1 + Cu^{++} (0,06 mg)

Meio 4: Meio 1 + Cu^{++} (0,12 mg)

meio 5: Meio 1 + Cu^{++} (0,06 mg) + Fe^{+++} (0,45 mg)

Meio 6: Meio 1 + Fe^{+++} (0,22 mg)

Meio 7: Meio 1 + Fe^{+++} (0,45 mg)

Meio 8: Meio 1 + Fe^{+++} (0,90 mg)

A determinação de ácido cítrico foi feita mediante cromatografia de papel, cujos resultados são mostrados na tabela 19, onde se observa sua presença em grande quantidade.

Observou-se também a presença, em menor quantidade, de ácido oxálico, que pode estar relacionado com o relatado por SODECK et alii (1981) citado por PRATA (1989), em que a temperaturas acima de 30°C ocorre formação de ácido oxálico. O ácido láctico observado no vinho estava presente no mosto ao começo da fermentação indicando que não era formado no processo. Não observou-se presença de ácido málico.

TABELA 19.

Características obtidas pela linhagem *Aspergillus niger* FTPT 906, com respeito a produção de ácido cítrico, determinado mediante cromatografia de papel

Meio	A. Málico	A. cítrico	A. oxálico	A. Láctico
1	-	+	-	+
2	-	+++	+	+
3	-	+++	+	+
4	-	+++	+	+
5	-	+++	+	+
6	-	+++	+	+
7	-	+++	+	+
8	-	+++	+	+

+++ Mancha muito forte

+ Mancha débil

- Não tem

5. CONCLUSÕES

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

As diferentes linhagens de *Aspergillus niger* testadas comportam-se de forma distinta diante de uma determinada composição do meio e da condição do cultivo utilizadas.

O melão de cana-de-açúcar é um material promissor e adequado a fermentação cítrica, desde que seja submetido a um tratamento, visando a remoção de metais. No caso, tratamento com óxido de cálcio e ferrocianeto de potássio. A quantidade de FCN requerida em excesso, é determinada, principalmente, pela linhagem do fungo, numa faixa de 30 a 150 ppm.

Aspergillus niger FTPT 906, apresentou as melhores características de desenvolvimento e maior produção de ácido, quando comparada com as demais linhagens testadas no meio natural e fermentação em superfície.

A adição de íons ferro e cobre em conjunto, proporcionou um decréscimo na porcentagem de acidez de 34,6% (com respeito ao meio padrão). As concentrações de cobre provocaram também um decréscimo de 21,6; 32,1 e 18,1%. O íon ferro não teve efeito inibidor da fermentação nas concentrações: 0,90 e 0,45%. Os íons mencionados não provocaram influência no crescimento celular.

Os resultados gerais deste estudo mostram que, nas condições de fermentação utilizadas, os tratamentos de clarificação do melão de cana-de-açúcar não foram suficientes para ter maiores aumentos nos rendimentos fermentativos.

6. SUGESTÕES PARA ESTUDOS POSTERIORES:

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

- Avaliar outros tratamentos do meio natural, melão de cana-de-açúcar, visando ter um melhor controle nos metais interferentes.
- Desenvolver outros experimentos, variando-se as concentrações dos metais e nutrientes no meio de cultura.
- Selecionar outras linhagens de *Aspergillus niger* empregando técnicas de melhoramento genético.
- Aplicar outros métodos de manutenção de cepas para evitar perdas da capacidade do acúmulo de ácido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARACHO, J.R. & COELHO, W.R. - Proporção de conídios binucleados em *Aspergillus niger*. Ci. e Cul. 30(5): 605-608, 1988.
2. BARACHO, I.R. - Utilização da luz ultra-violeta no melhoramento de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico. R. Microbiol. 14: 84-89, 1983.
3. BARRETO FIGUEIREDO, M. - Estudos sobre aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. O. Biológico. 23: 9-13, 1967.
4. BONATELLI, R.Jr.; AZEVEDO, J.L.; UMBEZEIRO, V.G. - Parasexuality in a citric acid production strain of *Aspergillus niger*. R. Bras. Genét. 6: 339, 1983.
5. CLARK, D.S.; ITO, K.; HORITSU, H. - Effect of manganese and other heavy metals on submerged acid fermentation of the molasses. Biotechnol. Bioeng. 8: 465, 1966.
6. CURRIE, J.N. - The citric acid fermentation. Biol. Chem. 31: 15-37, 1917.
7. DAWSON, M.; MADDOX, I.S.; BROOKS, J.O. - Evidence for catabolic repression during citric acid production by *Aspergillus niger* under phosphate limited growth conditions. Biotechnol. Bioeng. 33: 1500-1504, 1989.
8. E.U.A. Pat. 2.973.303. S. Kinoshita; K. Tanaka; S. Akita. Citric acid. 1961.

9. E.U.A. Pat. 2.492.673 J.C. Woodmard; R.L. Snell;
R.S.Nicholl. Citric acid fermentation. July 1949.
10. E.U.A. Pat. 2.980.084 L.B. Schweiger. Citric acid fermentation. Nov 1961.
11. E.U.A. Pat. 2.476.159 L.B. Schweiger. Method of production citric acid by fermentation. 1949.
12. E.U.A. Pat. 2.353.771 J. Szucs. Citric acid by fermentation. 6 May 1944.
13. FERRAZ, A. & DURAN, N. - Effect of various conditions on the *Crysonilia Sitophila* TFB 27441 growth. R. Microbiol. 20:(2): 240-245, 1989.
14. GARDENER, J.F.; JAMES, L.V.; RUBBO, S.D. - Production of citric acid by mutans of *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol. 14:228-237, 1956.
15. GOMES, R.; SCHNABEL, I.; GARRIDO, J. - Pellete growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. Enz. Microbiol. Technol. 10: 181-188, 1987.
16. HANNAN, M.A. - Variants of *Aspergillus niger* induced by gamma rays. Indian. J. Exp. Biol. 10: 379-381, 1972.
17. HARTFORD, C.G. - Rapid spectrophotometric method for the determination of itaconic, citric, aconitic and fumaric acids. Anal. Chem. 34: 426, 1962.
18. HORITSU, H. & CLARK, D.S. - Effect of ferrocyanide on growth and citric acid production by *Aspergillus niger*. Can. J. Microbiol. 12: 901-907, 1966.

19. HOSSAIN, M.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. - The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biohecnol. 19: 293-297, 1984.
20. JAMES, L.V.; RUBBO, S.D.; GARDNER, J.F. - Isolation of high yielding mutants of *Aspergillus niger* by a paper culture selection tecnique. J. Gen. Microbiol. 14: 223, 1956.
21. JERNEJC, K.; CIMERMAN, A.; PERDIH, A. - Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14: 29-33, 1982.
22. KAROW, E.O. & WAKSMAN, S.A. - Production of citric sumerged culture. Ind. Eng. Chem. 39: 821, 1947.
23. KAPOOR, K.K.; CHAUDHARRY, K.; TAKUO, P. - Citric acid. In: REED, G. "Prescott e Dunn's industrial microbiology". 4 ed. Westport, AVI, 1982. 709-747.
24. KUBICEK, C.P. & ROHR, M. -Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. Eur. J. Appl. Microbiol. 4: 167, 1977.
25. _____ & _____ - Aconitase and citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Appl. Environm. Microbiol. 50(5): 1336-1338, 1985.
26. _____ & _____ - Citric acid fermentation. Crit. Rev. Biohecnol. 3(4): 331-337, 1986.

27. KUBICEK, C.P.; ZCHENTGRUBER, O.; ROHR, M. - An indirect method for studying the fine control of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Biothecnol. Lett. 1: 47, 1979.
28. KUNDU, S.; PANDA, T.; MAJUNDAR, S.K.; GUHA, B.; BANDYO-PADHYAY, K.K. - Pretreatment of indian cane molasses for increases production of citric acid. Biotechnol. Bioeng. 26(9); 1114-1121, 1984.
29. LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. - Tecnologia das fermentações. São Paulo, Edgar Blucher, p. 81-82. 1975 (Biotecnologia, v.1).
30. MARSHALL, R.; METCHE, E.; VANDECASTEELE, J.P. -Intracellular concentration of citric acid isocitric acids in culture of the citric acid excreting yeast of *Candida lipolytica* grown on alkanes. J. Gen. Microbiol. 6:535-539, 1980.
31. MARIER, J.R. & BOULET, M. - Direct detrmination of citric acid in milk with an improved pyridine, acetic anhydride method. J. Dairy Sci. 41: 1683-1692, 1958.
32. MARIER, J.R. & CLARK, D.S. - An improved colorimetric method for determination ferrocyanide ion and its application to Molasses. Analysis 85: 574-578, 1960.
33. MILLER, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428, 1959.

34. MILSON, P.E. - Organic acids by fermentation, especially citric acid. In: KING, R.D. & CHEETHAM, P.S.J. Ed. Food biotechnology. London, Elsevier Applied Science, 1987. Chapt 7, p. 273-307.
35. MILSON, P.E. & MEERS, J.L. - Citric acid. In: MOOYOUNG, M. ed. comprehensive biotechnology. London, Pergamon Press, 1985, pag 665-680.
36. MOYER, A.J. - Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. Fermentation of crude carbohydrates. Appl. Microbiol. 1: 7-13, 1953.
37. PANDA, T; KUNDU, S.; MAJUNDAR, S.K. - Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using treated Indian cane molasses. Proc. biochem. 19(5): 183-187, 1984.
38. PERLMAN, D. & SIH, C.J. - Fungal synthesis of citric, fumaric, and itaconic acids. In: HOCKENHULL, D.I.D. ed. Progress and industrial microbiology. London, Hymood. 1960. V. 2. pags 167-168.
39. PRATA, A.M.R. - Avaliação do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de ácido cítrico. Viçosa, 1989. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) -Fac. Eng. Alim.-Universidade Federal de Viçosa.
40. ROHR, M. & KUBICEK, C.P. - Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Proc. Biochem. 16: 34-37, 1981.
41. ROHR, M. KUBICEK, C.P. & KOMINEK, J. Citric acid. In: DELLWEG, H. ed. Biotechnology. Weinhein, Verlag chemie, 1983. v. 3, pag. 419.

42. SANCHEZ-MARROQUIN, A.; CARRENO, R.; LEDEZMA, M. - Effect of trace elements on citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. 20(6):888-892, 1970.
43. SHU, P. & JOHNSON, M.J. - Effect of the composition of the sporulation medium on citric acid production by *Aspergillus niger* in submerged culture. J. Bacteriol. 54:161-167, 1947.
44. _____ & _____ - The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. J. Bacteriol. 56: 577-585, 1948.
45. SIEBERT, D. & SCHUTZ, G. - Citric acid production by fermentation. In: INTERNATIONAL MICROBIOLOGICAL FOOD INDUSTRY CONGRESS, Paris, 1979. Pags 55-71.
46. SODECK, G.; MODEL, J.; KOMINEK, J.; SALZBRUNN, W. - Production of citric acid according to the submerged fermentation process. Proc. biochem. V. (3): 9-11, Oct/Nov, 1981.
47. SOMKUTI, G.A. & BENCIVENGO, M.M. - Citric acid fermentation in whey permeat. Dev. Ind. Microbiol. 22: 557-563, 1981.
48. STARK, J.B.; GOODBAN, A.E.; OWENS, H.S. - Paper chromatography of organic acids. Anal. Chem. 23(3): 413-415, 1951.
49. STEEL, R.; LENTZ, C.P.; MARTIN, S.M. - Sumerged citric acid fermentation of sugar beet molasses increase in scale. Can. J. Microbiol. 1: 299, 1955.

50. STEINBERG, R.A. - Effect of nitrogen compounds and trace elements on growth of *Aspergillus niger*. J. Agric. Res. 59:731, 1939.
51. TAHA, E.F. & EL-ZAINY, T.A. - The mutual influence of methanol and trace elements on mycological production of citric acid. Archiv. Mikrobiol. 33: 124- 127, 1959.
52. TAKANASHI, J.; HIDAKA, H.; YAMADA, K. - Effect of mycelial forms on citric acid fermentation in submerged mold culture. Agric. Biol. Chem. 29(4): 331-336, 1965.
53. TSAY, S.S. & TO, K.Y. - Citric acid production using immobilized conidia of *Aspergillus niger* TMB 2022. Biotechnol. bioeng. 20(3): 297-304, 1987.
54. TRUMPHY, B.H. & MILLIS, N.F. - Nutritional requirements of an *Aspergillus niger* mutant for citric acid production. J. Gen. Microbiol. 30: 381-394, 1963.
55. VAIJA, J.; LINKO, Y.Y.; LINKO, P.C. - Citric acid production with alginate bead entrapped *Aspergillus niger* ATCC 9142. Appl. Biochem. Biotechnol. 7: 51-54, 1982.
56. WARONICK, C.L. & JOHNSON, M.J. - Carbon dioxide fixation by cell free extracts of *Aspergillus niger*. J. biol. chem. 235(1):9-15, 1960.

8. APÉNDICE

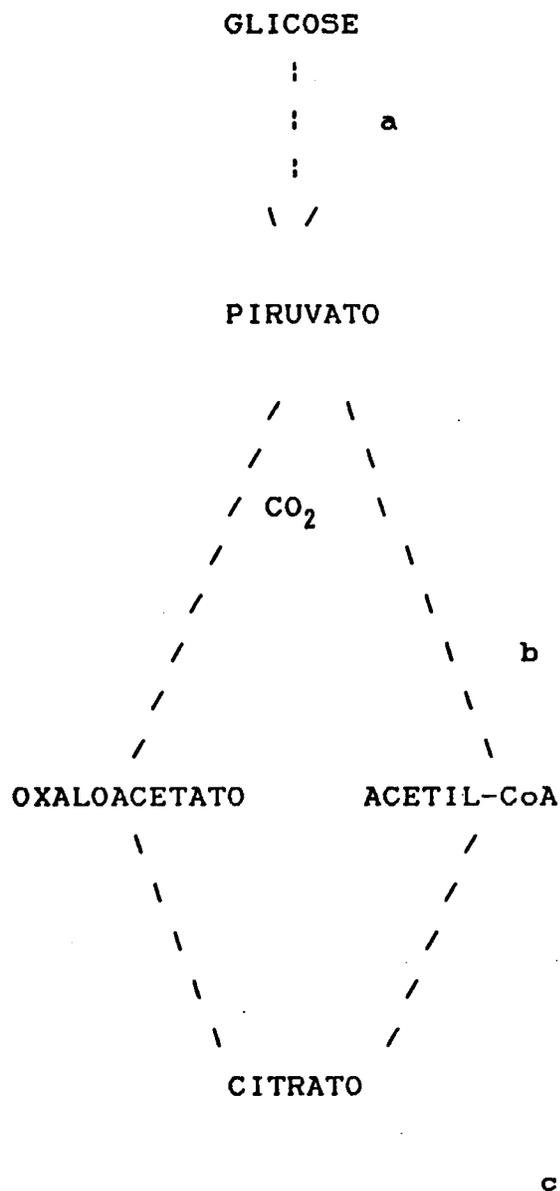


FIGURA 1A. Esquema generalizado do fluxo de Carbono até Citrato em *Aspergillus niger*. (a) Via glicolítica. (b) Descarboxilação oxidativa e carboxilação do Piruvato. (c) Ciclo do Ácido Tricarboxílico (KUBICEK e ROHR, 1986)

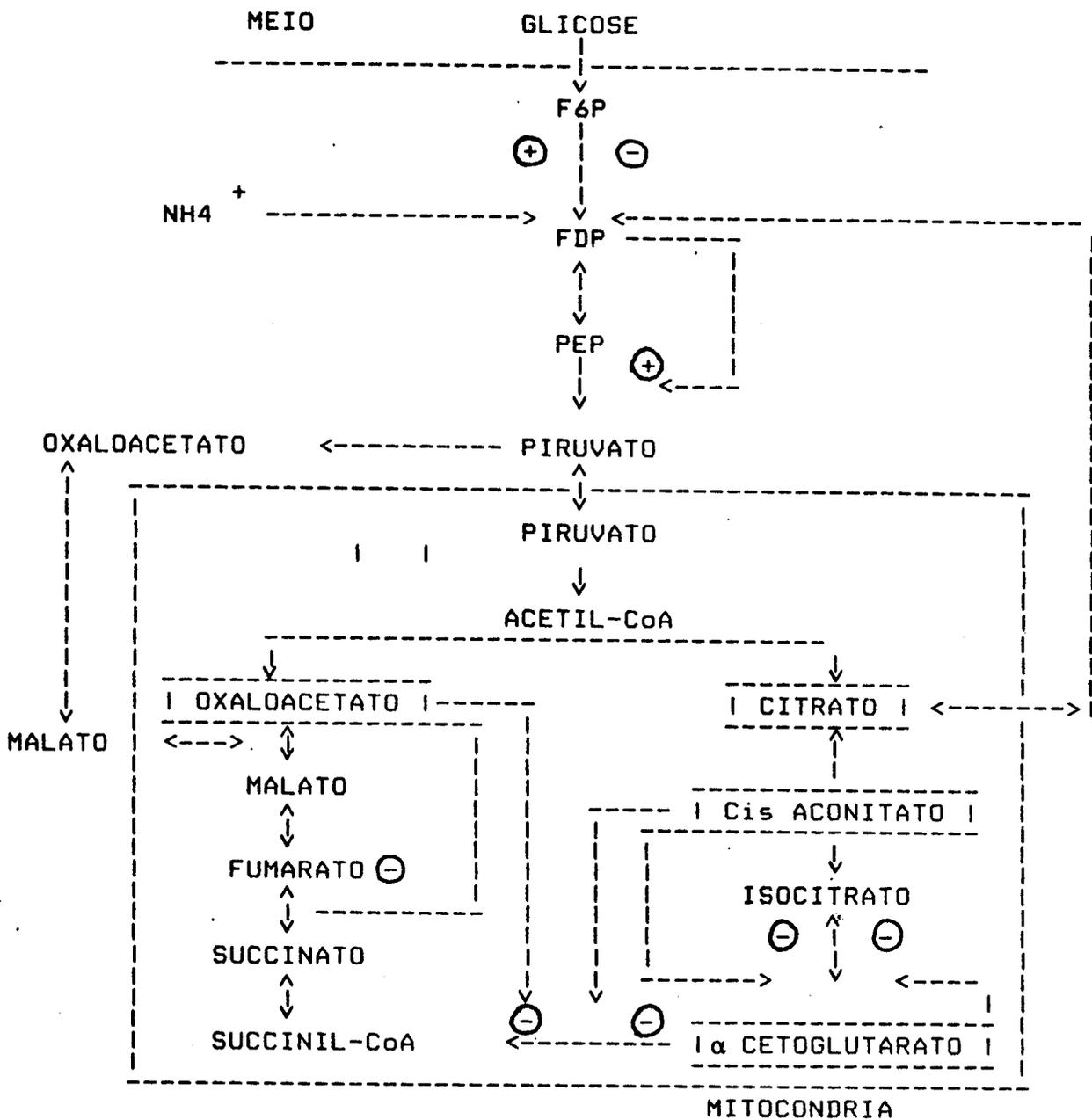


FIGURA 2A. Esquema metabólico das interrelações no acúmulo e ácido cítrico: + indica activação pelo respectivo metabolito; - inibição (KUBICEK e ROHR, 1986).