

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - FEA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - DEA

ESTUDO DA RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO
NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
***Candida lipolytica* Y 1095**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Fábía Renata Guidolin aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de agosto de 1998.

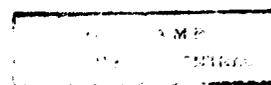
Campinas, 24 de agosto de 1998.


Profa. Dra. MARIA I. RODRIGUES
Presidente da Banca

Fábía Renata Guidolin
Engenheira de Alimentos Unesp/1995
Prof^a Dr^a Maria Isabel Rodrigues
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

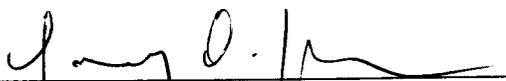
Campinas - 1998



BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Isabel Rodrigues
(Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka
(Membro)



Prof. Dr. Fumio Yokoya
(Membro)

Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta
(Suplente)

Campinas, de

de 1998.

**"É melhor tentar e falhar, que
preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que
sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em
dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em
conformidade viver..."**

(Martin Luther King)

**Ao Marco pelo amor...
e a Marió pela amizade.**

Agradecimentos

À Profª Maria Isabel Rodrigues, pela confiança, amizade, compreensão e orientação na realização deste trabalho.

À Jifa pela paciência, e acima de tudo pela amizade.

Pais (Agostinho e Sueli) vocês cumpriram sua missão. Consegui! E eu os agradeço eternamente. Obrigado!

Aos meus irmãos: Fábio e Juliana pela paciência na volta ao convívio...

À Mi e à Elaine ... eternamente amigas...

Nina, Gi, Mã, Ligi, Cris, Si e Porp's! A amizade está por cima das idéias. A amizade não se desfaz com a adversidade. Se nasceu, já não pode morrer. Até sua lembrança é eterna... Obrigada pela força de vocês, minha eternas amigas de "Jbirce"!

Aos mais que colegas de laboratório: Lia, Eliana, Yemiko, Suzana, Oscar, Marco, Marlei e Dona Maria.

À minha escravinha Sílvia... espero que tenhamos "nos" contribuído!

**Ao Caco pela amizade que foi crescendo, crescendo...
Flávio nem preciso dizer o quanto você é especial...**

À Marília pelas risadas e pelos bons momentos...

Apesar dos "entretantos" ... adorei as sugestões, Kity!

Aos grandes amigos... Mauro, Gustavo, André, Janaína, Márcia, Mari, Alfredo, Rose.... e todos os que conviveram comigo nesses dois anos.

Espero que um dia possamos nos encontrar novamente em qualquer tempo, em qualquer espaço, em qualquer direção. Mas que sejam vocês... essas pessoas maravilhosas que eu conheci... nesse tempo, nesse espaço, e nesse lugar.....

Fábia

ÍNDICE

ÍNDICE GERAL	i
RESUMO	iv
SUMMARY	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Aspectos gerais	4
2.2. Propriedades	5
2.3. Mecanismo de acúmulo de ácido cítrico	6
2.4. Cinética da fermentação	10
2.5. Microrganismos	13
2.6. Matéria-Prima	16
2.7. Condições de Fermentação	20
2.7.1. Fonte de carbono	20
2.7.2. Fonte de nitrogênio	23
2.7.3. Fonte de fósforo	27
2.7.4. pH da fermentação	29
2.7.5. Aeração e Agitação	30
2.7.6. Traços de elementos	33
2.7.7. Considerações gerais	35
2.7. Processo Industrial	37

2.7.1. Processo em superfície	38
2.7.2. Processo Koji	40
2.7.3. Processo submerso	41
2.8 Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
<hr/>	
3.1. Introdução	48
3.2. Condução da fermentação	51
3.2.1. Microrganismo	51
3.2.2. Preparo do meio de inóculo	51
3.2.3. Pré-fermentação	52
3.2.4. Fermentação	53
3.3. Métodos analíticos	55
3.3.1. Determinação de açúcares redutores	55
3.3.1.1. Preparo dos reagentes	55
3.3.1.2. Preparo da curva padrão	55
3.3.1.3. Preparo das amostras	56
3.3.1.4. Interferentes	56
3.3.2. Determinação de nitrogênio	57
3.3.2.1. Preparo dos reagentes	57
3.3.2.2. Preparo da curva padrão	58
3.3.2.3. Preparo das amostras	58
3.3.2.4. Interferentes	59
3.3.3. Determinação de ácidos cítrico e isocítrico	59
3.3.3.1. Fase móvel	60
3.3.3.2. Preparo da curva padrão	60
3.3.3.3. Preparo das amostras	60
3.3.3.4. Injeção das amostras no sistema HPLC	61
3.3.3.5. Identificação e Quantificação das Amostras	61
3.3.4. Determinação da massa seca (MS) produzida	61
3.3.4.1. Preparo da curva padrão	61

3.3.4.2. <i>Preparo das amostras</i>	62
3.3.5. <i>Determinação da viabilidade celular das leveduras</i>	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Resultados dos testes preliminares	64
4.2. Cinéticas das fermentações	66
4.3. Viabilidade celular e morfologia	73
4.4. Resultados do Planejamento Fatorial	74
5. CONCLUSÃO	86
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE A	97
APÊNDICE B	101
APÊNDICE C	106

RESUMO

O ácido cítrico é um ácido orgânico produzido industrialmente por alguns microrganismos, principalmente pelo fungo *Aspergillus niger*. Este produto encontra grande aplicação na indústria de alimentos, e também nas indústrias químicas e farmacêuticas.

Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da concentração de carbono e nitrogênio nas fase de crescimento e produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 em fermentações submersas em meio contendo glicose como fonte de carbono através da Metodologia de Planejamento Fatorial.

A escolha de uma levedura baseou-se na facilidade operacional quando comparada aos processos utilizando fungos. Além disso, o uso de reciclo de células, possível com as leveduras análogo ao que se faz na indústria de fermentação contínua de álcool, aumentando consideravelmente a produtividade e rendimento, torna atrativo o desenvolvimento de um processo nacional onde o melaço de cana de açúcar ou a sacarose sejam utilizados como fonte de carbono como alternativa de produto para as indústrias sucro-alcooleiras. Um dos inconvenientes é a produção simultânea de ácido isocítrico, a qual é afetada pelas condições de cultivo.

Através da análise das superfícies de resposta e efeitos das variáveis verificou-se a queda no rendimento de ácido cítrico com o aumento na concentração de nitrogênio na fase de produção de ácido cítrico, evidenciando a repressão catabólica exercida por este composto. A influência do nitrogênio é maior na excreção do ácido cítrico em relação ao ácido isocítrico, sendo que a variação na concentração de NH_4Cl de 2,6 para 5,4 g L^{-1} no meio de crescimento e de 0,1 para 0,5 g L^{-1} no meio de produção provocaram um aumento nos rendimentos de ácidos cítrico e isocítrico de 8,5 (0,032 a 0,271 g g^{-1}) e 5,0 (0,119 a 0,582 g g^{-1}) vezes, respectivamente.

Em todas as condições de ensaio estudadas não foi possível inibir a enzima aconitase responsável pela produção de ácido isocítrico indicando a falta de algum composto para esse fim. Verificou-se ainda que a excreção de ácido cítrico ocorreu sob condições estacionárias de crescimento como reportado na literatura.

SUMMARY

Citric acid is an organic acid industrially produced by some microorganisms, mainly by the fungi *Aspergillus niger*. This product has been used in food, chemical and pharmaceutical industries for many propose.

The objective of this study was to evaluate, by Factorial Experimental Design, the influence of the carbon and nitrogen concentrations on the growth of *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 and citric acid production phases by submerged fermentation in a medium composed by glucose as carbon source.

The choice of this specific yeast was based on the fact that it is easier to operate the system when compared to another using the fungi. Besides, it is possible to reuse the yeast cells in many fermentations in the same way that is practiced in ethyl alcohol fermentation. This may creates an alternative technology to the sugar cane industry, which could use sugar cane molasses or sucrose, as a carbon source to produce citric acid. However, the yeast produces simultaneously isocitric acid depending on the culture conditions.

Through the statistical technique of surface response and variable effect it was verified a drop in citric acid yield, with an increase in nitrogen concentration during citric acid production process, what could be an indication of catabolite repression. Nitrogen influenced is more in the citric acid excretion than in isocitric acid. The variation in NH_4Cl concentration from 2,6 to 5,4 gL^{-1} in the growth medium and from 0,1 to 0,5 gL^{-1} in the production medium caused an increase in the citric and isocitric acid yield of 8,5 (0,032 to 0,271 gg^{-1}) and 5,0 (0,119 to 0,582 gg^{-1}) folds, respectly.

It was impossible to inhibit the aconitase enzyme responsible by isocitric acid production, in all conditions of the experiments carried out in this research. The results showed that the citric acid excretion occurred during the stationary phase of growth for *Candida lipolytica* NRRL Y 1095, as reported in a literature.

1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico (ácido 2 hidroxi-propeno 1,2,3 tricarboxílico) é o principal constituinte das frutas cítricas. Através da microbiologia, foi possível obter esse ácido por fermentação, reduzindo o custo de obtenção e possibilitando um grande aumento do uso em escala industrial, diferenciando-se de outros produtos que previamente foram elaborados por métodos microbiológicos e atualmente são produzidos por via química .

A produção mundial deste ácido ultrapassa 736 000 toneladas ao ano, sendo os maiores produtores os Estados Unidos e a Europa. A maior planta pertencente a Pfizer com capacidade superior a 80 000 toneladas/ano. Do total produzido, 75% é consumido pela indústria de alimentos e o restante na indústria farmacêutica (10%) e outras (15%). Seu emprego em alimentos representa 55-65% do mercado total de acidulantes, contra 20-25% pelo ácido fosfórico (bebidas de cola) e 5% correspondente ao ácido málico (GOLDBERG *et al.*, 1991; MATTEY, 1992; Química e Derivados, 1997).

O mercado de ácido cítrico está crescendo constantemente (de 3,5 a 4% ao ano) com um aumento no número de aplicações deste composto, e principalmente devido a preferência mundial crescente por bebidas cítricas, cujas formulações necessitam do insumo como acidulante e estimulante de aromas para conferir melhor palatibilidade e ajuste de acidez, em relação aos refrigerantes do tipo cola, que utilizam o ácido fosfórico em suas formulações (Química e Derivados, 1997).

Devido à facilidade de assimilação, palatibilidade e baixa toxicidade, o ácido cítrico é um dos ácidos mais utilizado como acidulante e antioxidante na indústria de alimentos. Tanto o ácido como seus sais são empregados como tampões no preparo de compotas, geléias e gelatinas e, também como estabilizantes em vários produtos alimentícios.

Na indústria farmacêutica seu uso torna-se ideal pelo poder sequestrante e poder efervescente. Quando combinado com carbonatos e bicarbonatos forma uma

grande variedade de sais como citrato trissódico, utilizado para preservar o sangue e como substituto de fosfatos em detergentes.

O ácido cítrico tem a 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.

Existe uma grande variedade de fungos capazes de produzir o ácido cítrico, no entanto, linhagens selecionadas de *Aspergillus niger* são comumente usadas. Apesar dos processos fermentativos com fungos serem bastante atrativos, um longo período de tempo é requerido para obtenção de ácido, encarecendo sua produção.

Uma alternativa é a utilização de leveduras do gênero *Candida* capazes de produzir ácido cítrico em quantidades apreciáveis, e apresentando algumas vantagens sobre os fungos incluindo uma maior tolerância à altas concentrações de substratos, maior taxa de conversão, maior produtividade e melhor controle do processo devido à natureza unicelular da levedura. Entretanto, a produção de ácido cítrico por leveduras é acompanhada da produção simultânea de ácido isocítrico, um subproduto indesejável, com a razão ácido cítrico : ácido isocítrico podendo variar de 1 : 1 a 20 : 1, dependendo do organismo, fonte de carbono, concentração de micronutrientes, agitação, aeração, temperatura, e outros.

O estudo da viabilidade de sua produção com o desenvolvimento de uma tecnologia nacional é interessante devido a sua grande demanda comercial nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, podendo ser uma grande alternativa para as indústrias sucro-alcooleiras.

Na literatura encontram-se muitos estudos sobre a produção de ácido cítrico através do fungo *Aspergillus*. Verifica-se no entanto, o crescente interesse pelo uso de leveduras na produção deste ácido devido à maior facilidade operacional ao se trabalhar com leveduras ao invés de fungos.

Foi feita uma extensa revisão na literatura verificando-se que não há nenhum estudo sistemático usando a técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta para otimização da produção de ácido cítrico em níveis de rendimento e produtividade para esta espécie de levedura.

A produção do ácido cítrico ocorre em duas fases: crescimento e produção. Resultados da literatura indicam que a razão de ácido cítrico/ácido isocítrico está diretamente relacionada com a concentração de carbono e de nitrogênio nas duas fases de fermentação.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da relação carbono/nitrogênio nestas duas fases sobre o rendimento e a produtividade de ácido cítrico e ácido isocítrico, utilizando *Candida lipolytica* Y 1095 em fermentações em batelada através da Metodologia do Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais

A produção de ácidos orgânicos em escala industrial é obtida por processo microbiológico, sendo este o grupo de compostos na qual a produção biológica tem uma vantagem econômica sobre a síntese química (MATTEY, 1992).

A maioria dos ácidos orgânicos produzidos por microrganismos podem ser localizados em dois grupos principais, dependendo do seu metabolismo de origem: ácidos da sequência metabólica principal dos organismos aeróbicos (ciclo do ácido tricarbóxico e glicólise) - ácido cítrico, ácido láctico e ácido málico - e ácidos originados da oxidação direta da glicose - ácido glucônico e ácido 2 oxo-glucônico (MATTEY, 1992).

Embora sejam ácidos hidroxil alifáticos, eles diferem em relação ao comportamento químico e efeitos organolépticos. A seleção do ácido a ser empregado em determinado alimento é feita primeiramente através da avaliação do custo e funcionalidade, seguidos por: solubilidade, ponto de fusão, propriedades de modificação de sabor e efeitos sinérgicos com outros ácidos ou componentes do alimento e, facilidade de manuseio e estocagem, devido a higroscopicidade (GOLDBERG *et al.*, 1991; MILSOM, 1987).

Da produção total de ácido cítrico, 75% é consumido na indústria de alimentos e bebidas, 10 % na indústria farmacêutica e 15% em uma variedade de aplicações industriais (MATTEY, 1992). A preferência pelo emprego deste ácido ocorre devido em grande parte a sua disponibilidade, agradável sabor ácido, baixa toxicidade, e facilidade de assimilação (STONE, 1949).

Seu uso depende de três propriedades: acidez, sabor e formação de sal. Na Tabela 2.1 encontram-se resumidas as principais aplicações do ácido cítrico (MATTEY, 1992).

TABELA 2.1. Aplicações do ácido cítrico.

Aplicações	Propriedades utilizadas
Indústria de alimentos	
Bebidas	Acidulante, flavorizante
Geleias, compotas e outras conservas	Flavorizante, acidulante
Óleos e gorduras	Antioxidante (complexação de metais)
Alimentos congelados	Antioxidante
Farmacêuticas	
Produtos efervescentes	Acidulante, flavorizante
Preparados de vitamina	Antioxidante
Anticoagulantes	Sequestrante, tamponante
Preparados de ferro	Formação de sal
Cosméticos	Tamponante, antioxidante
Industrial	
Limpeza (metais)	Sequestrante
Detergentes	Tamponante, sequestrante
Reagentes fotográficos	Tamponante

2.2. Propriedades

A estrutura do ácido cítrico, 2-hidroxi-1, 2, 3 ácido propano tricarboxílico, está apresentada na Figura 2.1 (STONE, 1949).

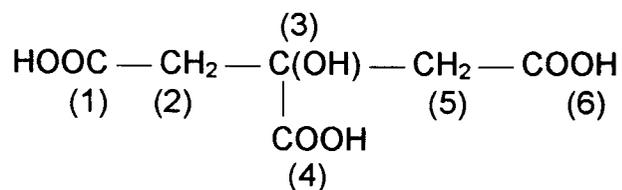


FIGURA 2.1. Estrutura do ácido cítrico (STONE, 1949).

Ocorre em duas formas estáveis: ácido cítrico monohidrato ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), obtido pela cristalização de soluções aquosas frias, sendo composto por 91,42% de ácido cítrico anidro e 8,58% de água, e ácido cítrico anidro ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), o qual cristaliza

a partir de soluções aquosas quentes e concentradas. Ácido cítrico é inodoro, com agradável sabor ácido, altamente solúvel em água e etanol, e ocorre como cristais translúcidos e incolores, ou na forma granular a pó fino e branco. É um ácido orgânico forte, como indica a constante de dissociação do primeiro átomo de hidrogênio cujo valor é $8,2 \cdot 10^{-4}$ a 18°C . As constantes de dissociação do segundo e terceiro átomos de hidrogênio são $1,77 \cdot 10^{-5}$ e $3,9 \cdot 10^{-6}$, respectivamente. Possui um raro isômero estrutural sem importância comercial é o ácido isocítrico (1-hidroxi-1, 2, 3 ácido propano tricarbóxico) (MILSOM, 1987; GOLDBERG *et al.*, 1991; STONE, 1949).

O ácido cítrico forma uma ampla faixa de sais metálicos, incluindo complexos com ferro, cobre, manganês, magnésio e cálcio, razão pela qual é usado como agente sequestrante em processos industriais e como um preservativo anticoagulante do sangue. Os sais são também a base de suas propriedades antioxidantes em óleos e gorduras reduzindo a oxidação catalisada por traços de metais, como ferro, ao atuar como agente quelante (MATTEY, 1992).

2.3. Mecanismo de acúmulo de ácido cítrico

O ciclo do ácido cítrico (ou tricarbóxico) é o mecanismo pelo qual o acetato é oxidado a duas moléculas de dióxido de carbono, na maioria das células vivas. No caminho normal, uma molécula de acetato é condensada com uma molécula de oxaloacetato formando uma molécula de citrato. O citrato é metabolizado via isocitrato a oxalosuccinato, o qual é desidrogenado com a perda de uma molécula de CO_2 , resultando na formação de α -cetoglutarato. Com nova perda de CO_2 , este último transforma-se em succinato, o qual é transformado em oxaloacetato, via fumarato e malato, através de três passos catalisados enzimaticamente (MILSOM, 1987).

Se o ciclo do ácido tricarbóxico for interrompido no ácido cítrico, não há formação de oxaloacetato para se condensar com a molécula de acetil coenzima A e formar citrato, sendo necessário conduzir a formação de oxaloacetato por outra via, denominada reação anapleurótica (MILSOM, 1987). Com *Aspergillus niger* e

Candida lipolytica a reação anapleurótica é a carboxilação do piruvato pela enzima piruvato carboxilase (AIBA & MATSUOKA, 1979; MILSOM, 1987).

Na maioria dos organismos, em particular leveduras, a glicólise é regulada pela enzima fosfofrutoquinase, responsável pela conversão irreversível da molécula D-frutose 6-fosfato em D-frutose 1-6-difosfato (UYEDA, 1979, citado por SOKOLOV *et al.*, 1996; MATTEY, 1992; LEHNINGER, 1984). A seguinte reação irreversível da glicólise consiste na conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato pela enzima piruvatoquinase, a qual parece ser responsável pelo equilíbrio das reações que separam essas duas etapas irreversíveis. A concentração de intermediários, como diidroxiacetona fosfato, pode aumentar e a redução deste composto e subsequente desfosforilação do glicerol-3-fosfato pode ser responsável pela formação de glicerol (HONECKER *et al.*, 1989).

Um aumento na concentração de citrato inibe a atividade da enzima fosfofrutoquinase, através de interação direta e diminuição da concentração livre de íons de magnésio, quando esta atua como agente quelante, diminuindo a taxa de conversão do substrato na glicólise (UYEDA, 1979, citado por SOKOLOV *et al.*, 1996; MATTEY, 1992). Entretanto, certas variedades de fungos e leveduras crescendo em glicose são capazes de acumular consideráveis quantias de ácido cítrico no meio (MATTEY, 1992). Em *Candida lipolytica*, uma levedura produtora de ácido cítrico, a atividade de fosfofrutoquinase foi observada durante a fase estacionária do crescimento quando ocorre mais intensamente a síntese de ácido cítrico, enquanto que em variedades não produtoras a atividade desta enzima decresceu rapidamente neste estágio (FINOGENOVA, 1989 citado por SOKOLOV, 1996).

Em leveduras crescendo sob condições limitadas em nitrogênio, ocorre um aumento na taxa de ATP/AMP e no conteúdo de NADH das células, atuando como inibidores da enzima isocitrato desidrogenase, permitindo o acúmulo de citrato. Estudos comparativos desta enzima com variedades produtoras e não produtoras de ácido cítrico não detectaram diferenças fisiológicas capazes de explicar a capacidade de algumas espécies em acumular este ácido. Este fato conduz a hipótese de que as leveduras acumuladoras de ácido cítrico apresentam um

mecanismo regulado pela enzima fosfofrutoquinase, e não pela isocitrato desidrogenase, pois o fluxo de substrato para o metabolismo do ciclo do ácido cítrico nestas leveduras é rápido via glicólise sob condições limitadas em nitrogênio (SOKOLOV *et al.*, 1995).

SOKOLOV *et al.* (1996) demonstraram, em *Yarrowia lipolytica*, que a atividade da enzima fosfofrutoquinase aumentou com concentrações de ATP superiores a 1 mM e decresceu com um aumento adicional na concentração deste, sendo completamente inibida em concentrações de 10 mM, concluindo que o ATP atua como substrato e inibidor alostérico desta enzima. O efeito inibitório de ATP em concentrações de 5 mM é acentuado na presença de citrato indicando a presença de sinergismo entre o citrato e o ATP. Verificaram ainda, que a presença de íons amônia aumenta a afinidade da enzima fosfofrutoquinase pelo substrato (D-frutose 6-fosfato) e suprime o efeito inibitório do citrato na presença de ATP. A conclusão dos estudos demonstra uma maior susceptibilidade da enzima fosfofrutoquinase à inibição por citrato em variedades produtoras deste ácido.

Outras enzimas importantes na fermentação de ácido cítrico são, por fungos, aconitase e isocitrato desidrogenase, e por leveduras, aconitase (aconitase hidratase), responsável pela formação do ácido isocítrico (KAPOOR *et al.*, 1982; RÖHR & KUBICEK, 1983). A adição de ferro (Fe^{++}) aumenta a atividade de aconitase provocando a diminuição de citrato e aumento de isocitrato. Na fermentação de leveduras, a adição de inibidores de aconitase, tal como fluoroacetato, conduzem a privação de ferro, e ao acúmulo de citrato (KAPOOR *et al.*, 1982).

Em *Saccharomycopsis lipolytica*, ácidos cítrico e isocítrico são metabolizados na mitocôndria, podendo ser oxidados através do ciclo do ácido tricarbóxico. Entretanto, uma porção de ácido isocítrico é transportado para o citoplasma onde é convertido a glutamato ou metabolizado através do ciclo glioxalato, mostrando a existência de um sistema seletivo para o transporte de ácido isocítrico da mitocôndria para o citoplasma, onde podem ser acumulados em concentrações maiores do que esperado com base nas constantes de equilíbrio termodinâmico para os ácidos cítrico e isocítrico. Este transporte deve ser menor durante o crescimento

em fonte de carbono por não requerer que o ciclo glioxalato seja ativo. A concentração global interna de ambos os ácidos aumenta quando a biossíntese é interrompida pela limitação de nitrogênio, ocorrendo então a excreção para o meio externo, provavelmente por difusão passiva (MARCHAL *et al.*, 1980; AIBA & MATSUOKA, 1978).

Segundo ROUKAS (1991) o aumento na velocidade de agitação de 300 para 600 rpm resulta em mudanças na atividade das enzimas associadas ao acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* ATCC 9142, sendo que a atividade da citrato sintetase diminuiu e da aconitase e isocitrato desidrogenase aumentaram. Os resultados apresentados indicam que o acúmulo de ácido cítrico é acompanhada por um aumento na atividade de citrato sintetase e diminuição nas atividades de aconitase e isocitrato desidrogenase, responsáveis pela degradação de ácido cítrico em isocitrato e α -cetoglutarato. AIBA & MATSUOKA (1979) analisaram os caminhos metabólicos da produção de ácido cítrico a partir de glicose por *Candida lipolytica* considerando três modelos. O modelo que coordena a carboxilação do piruvato com o ciclo do ácido tricarboxílico, ignorando o ciclo glioxalato foi considerado satisfatório pois o fluxo de carbono calculado foi aceitável. Os modelos, aonde foi omitido a carboxilação do piruvato e a desidrogenação do 2-oxoglutarato, respectivamente, forneceram valores de fluxos negativos, devendo portanto serem descartados. A *Candida lipolytica* crescendo em acetato ou n-alcano (compostos C₂) como fonte de carbono requer o ciclo glioxalato como sequência anapleurótica para suprimento de compostos C₄ para o ciclo do ácido tricarboxílico (MATSUOKA *et al.*, 1980). Na Figura 2.2 encontra-se descrito o esquema metabólico simplificado para a produção de citrato por *Candida lipolytica* a partir de glicose como fonte de carbono, segundo YOKOYA (1992) e MILSOM (1987).

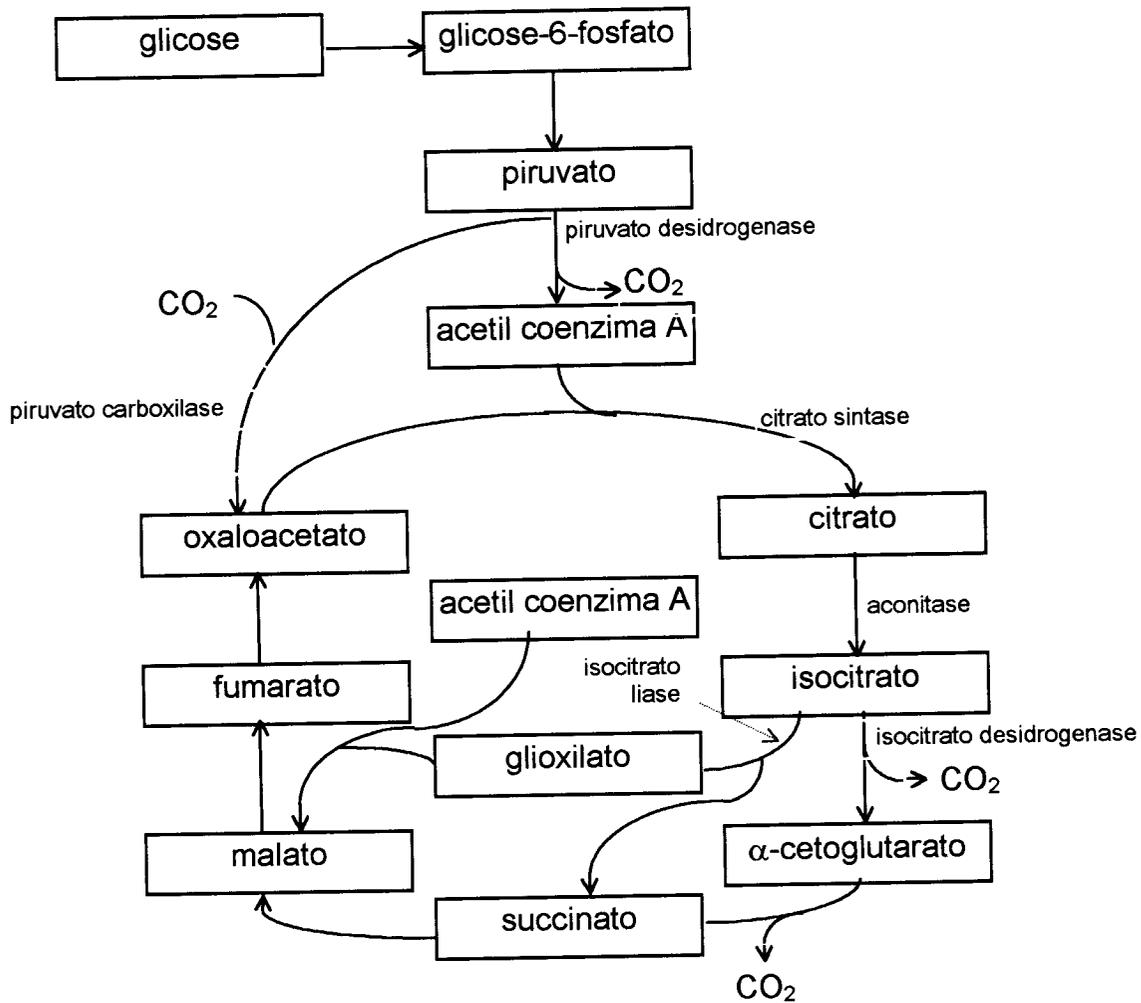


FIGURA 2.2. Esquema metabólico simplificado da produção de citrato por *Candida lipolytica* (YOKOYA, 1992; MILSOM, 1987).

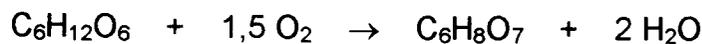
2.4. Cinética da fermentação

De acordo com o esquema de GADEN (1955) o processo de fermentação por *Aspergillus niger* é caracterizado por duas taxas máximas em relação ao crescimento e formação de produto. Na primeira fase da fermentação (tropofase) o açúcar é utilizado para o crescimento, acompanhado por mínima formação de produto, enquanto na segunda fase (idiofase) a formação de produto é máxima e a taxa de crescimento é baixa. Resultados semelhantes descrevendo a fermentação

de *Aspergillus niger* caracterizada por duas fases foram obtidos por GARG & SHARMA (1991) e PANDA & SHARMA (1984).

BRIFFAUD & ENGASSER (1979) analisaram as cinéticas de crescimento e produção de ácido cítrico de *Saccharomycopsis lipolytica* D 1805 em glicose em um fermentador de tanque agitado. Na cinética de crescimento observaram, que após uma fase lag de poucas horas, a levedura cresceu primeiramente de forma exponencial, finalizando com o completo consumo de amônia. Durante as 10 horas seguintes verificaram uma fase de crescimento linear, inicialmente na presença de nitrogênio extracelular e intracelular, sendo que após o esgotamento do nitrogênio extracelular o conteúdo de nitrogênio celular decresceu de 8,5 para 4%, finalizando a fase de crescimento. A taxa de consumo de oxigênio foi aproximadamente igual à taxa de produção de dióxido de carbono durante toda a fase de crescimento. A excreção de ácido cítrico iniciou-se aproximadamente depois de 20 horas de fermentação, quando o conteúdo de nitrogênio celular encontrava-se em níveis baixos. Durante esta fase adicionou-se periodicamente glicose ao fermentador visando manter sua concentração entre 10 e 40 gL⁻¹. A quantia de ácido cítrico e isocítrico excretados aumentaram numa taxa constante durante 70 a 90 horas alcançando concentrações finais de 95 gL⁻¹ de ácido cítrico e 10 gL⁻¹ de ácido isocítrico, finalizando após 150 horas.

Os autores BRIFFAUD & ENGASSER (1979) descreveram a fase de excreção celular pelas seguintes equações estequiométricas:



Verificou-se o consumo de oxigênio como sendo constante durante a fase de excreção, mas reduzido em relação ao consumo para o crescimento celular. Durante a fase linear de excreção, a respiração para manutenção celular representou um consumo de 60 e 35% respectivamente de oxigênio e glicose, como mostra a segunda equação. A taxa de produção de CO₂ e ácido seguem dependências do tipo Michaelis-Menten na concentração de oxigênio, entretanto com uma constante

muito menor para produção de CO₂ do que para ácido ($K_{\text{ácido}} = 0,9$ e $K_{\text{CO}_2} = 0,15 \text{ mgL}^{-1}$) (BRIFFAUD & ENGASSER, 1979).

MARCHAL *et al.* (1980) verificaram baixa concentração intracelular de ácido cítrico e isocítrico durante o ciclo de crescimento de *Saccharomyces lipolytica* 102 em alcanos, seguido por um aumento linear na fase de excreção.

KLASSON *et al.* (1991) utilizaram os resultados do bioprocesso em batelada para modelar o crescimento e produção de ácido cítrico por *Saccharomyces lipolytica* Y 7576, baseando-se somente na concentração inicial de células e amônia. O modelo obtido para a fase de produção prediz o começo da formação de ácido com boa precisão, tão bem como a separação das fases de crescimento e de formação de produto.

KAUTOLA *et al.* (1992) verificaram que na fermentação de *Yarrowia lipolytica* D101 em glicose pura a produção de ácido cítrico iniciou-se no final da fase exponencial de crescimento, entretanto em sacarose invertida iniciou-se no meio desta fase e em melaço de beterraba invertido uma pequena produção de ácido cítrico foi observada anteriormente, durante a fase de crescimento, podendo ser devido a presença de algumas células em um diferente estado fisiológico ou de traços de nutrientes em melaços.

RANE & SIMS (1995) observaram mudanças na morfologia celular de *Candida lipolytica* Y 1095 em função do tempo de fermentação em sistemas com reciclo de células. Em tempos de fermentação inferiores a 300 horas as células apresentavam-se na forma esférica para elipsoidal, enquanto em estágios posteriores tomaram-se alongadas e finalmente filamentosas. A mudança pode ser explicada pelo crescimento das células sob condições deficientes em nutrientes e/ou oxigênio excessivo. A transição das células da fase de crescimento para a fase de produção em meio deficiente em nitrogênio pode ser associada com atraso na síntese de proteínas e mudanças na mitocôndria, na estrutura citoplasmática e nos peroxissomos.

2.5. Microrganismos

O ácido cítrico, como um produto do metabolismo primário, provavelmente não é excretado sob condições naturais em notáveis quantidades. Assim, uma apreciável excreção deveria ser considerada como resultado de alguma irregularidade severa do metabolismo, causado por deficiências genéticas, ou por desigualdades metabólicas drásticas. Por estas razões que, somente poucas classes ou ainda gêneros de microrganismos - bactérias e/ou fungos - tem sido descritos como capazes de excretar quantias substanciais de ácido cítrico em meio de fermentação sob certas condições (RÖHR *et al.*, 1983).

Os microrganismos mais comumente utilizados nos processos fermentativos para produção de ácido cítrico são selecionados de variedades de *Aspergillus niger*. Apesar destes processos fermentativos com *Aspergillus niger* serem atrativos, muitas dificuldades estão presentes como a degeneração da produção natural de ácido cítrico sobre um período de tempo, e com maior importância, o fato de ser requerido um longo período, geralmente maior do que 7 dias, para a produção de grandes quantidades deste ácido. Este longo tempo de fermentação é o maior fator de custo na produção, assim, o desenvolvimento de processo fermentativo em menores tempos é de considerável importância comercial (GUTCHO, 1973).

As principais vantagens do uso destes microrganismos são a facilidade de manuseio, habilidade para fermentar uma ampla variedade de matéria-prima barata e fornecer altos rendimentos (GREWAL & KALRA, 1995). Segundo ATKINSON & MAVITUNA (1983) os rendimentos de ácido cítrico para processos tradicionais de fermentação submersa usando *Aspergillus niger* dependem da fonte de carbono utilizada, com valores típicos sendo obtidos entre 60 a 70% (citado por RANE & SIMS, 1993).

RUGSASEEL *et al.* (1993) utilizaram *Aspergillus niger* WU - 2223 L, um grande produtor de ácido cítrico, e variedades mutantes para avaliar a produtividade de ácido cítrico em amido. Obtiveram como resultado que as variedades mutantes

produziram menor quantidade de ácido cítrico quando comparada com a variedade pai.

AVARANTINOS-ZAFARIS *et al.* (1994) examinaram a fermentação de três variedades de *Aspergillus niger*, NRRL 567, NRRL 599 e NRRL 364, em resíduo do processamento de laranja para a produção de ácido cítrico, obtendo como maior produtor a variedade NRRL 599.

Além de fungos, certas variedades de leveduras do gênero *Candida* tem capacidade para acumular quantias substanciais de ácido cítrico durante a fermentação aeróbica em meio aquoso contendo carboidratos. A vantagem do uso de leveduras sobre fungos filamentosos deve-se a tolerância destas à altas concentrações de substrato, a possibilidade de taxas de conversão mais rápida (alta produtividade devido o término da fermentação em metade do tempo requerido para *Aspergillus niger*), a insensibilidade à íons de metais presentes em meios de melaço bruto (e portanto mais barato) permitindo o uso sem pré tratamento custoso, e ainda ao melhor controle do processo devido a natureza unicelular das leveduras (MILSOM, 1987; MATTEY, 1992). Uma vantagem adicional ao uso da levedura na produção de ácido cítrico, quando comparado ao *Aspergilli*, é o enorme potencial para desenvolvimento de um processo contínuo (KAPOOR *et al.*, 1982). MIAL & PARKER (Ger. Pat. 2,429,224) (1975) patentearam um processo contínuo para a produção de ácido cítrico usando espécies de *Candida* (citado por KAPOOR *et al.*, 1982).

O aumento de estudos relacionado a secreção de ácido cítrico por levedura é devido também a acessibilidade ao melhoramento das variedade através de métodos genéticos, e seu potencial em resistir longas e contínuas operações numa alta velocidade de conversão sob elevadas condições aeróbicas (SHAH *et al.*, 1993). Através de sucessivas mutações da variedade *Candida* sp. Y-1, TANI *et al.* (1990) obtiveram a variedade mutante MA 92, a qual apresenta produtividade de ácido cítrico superior e atividade de aconitase inferior a variedade selvagem.

Entretanto, a maior desvantagem da utilização de leveduras é a produção simultânea de ácidos cítrico e isocítrico. A taxa de ácido cítrico : isocítrico pode variar de 1 : 1 a 20 : 1 dependendo dos organismos, fonte de carbono e

concentração de micronutrientes. Para maximizar a produção de ácido cítrico por levedura, deve-se selecionar um organismo que tenha elevada taxa de ácido cítrico : isocítrico para minimizar as quantias de ácido isocítrico produzida (RANE & SIMS, 1993).

As variedades de leveduras conhecidas como produtoras de ácido cítrico a partir de diversas fontes de carbono são espécies de *Candida* (*Saccharomycopsis*), *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Nematospora*, *Kloeckera*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*. As espécies de *Candida* são amplamente utilizadas em estudos para a produção de ácido cítrico e incluem *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides*, *C. fibrae*, *C. oleophila*, *C. citrica*, *C. guilliermondii*, entre outras (KAPOOR *et al.*, 1982).

MORESI (1993) estudou a produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* ATCC 20346 em meio baseado em glicose e em fermentações operando como batelada alimentada. Observou-se que, a variedade em questão é capaz de igualar a melhor variedade mutante de *Aspergillus niger* usada industrialmente em produtividade de ácido cítrico ($1,05\text{gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$). Através da análise dos rendimentos (9,2% (w/v) de ácido cítrico, 1,56% de ácido isocítrico, 0,175% de ácido pirúvico e 0,055% de ácido fumárico) obtidos com concentração de glicose igual a 190gL^{-1} na fase de produção, verificou que esta variedade não iguala em seletividade, visto que o ácido cítrico representou somente 85,5 % do total de ácido cítrico e isocítrico excretados e 83,7 % do total de ácido excretado.

RANE & SIMS (1993) avaliaram o crescimento de *Candida lipolytica* Y 1095, *Yarrowia lipolytica* Y 7576, *Candida guilliermondii* Y 488 e *Saccharomycopsis lipolytica* DRL 99 em cultura em batelada. Baseado nos resultados verificou-se que *Candida lipolytica* Y 1095 pode ser utilizada para produção de ácido cítrico com rendimentos e produtividade comparados aos geralmente obtidos com *Aspergillus niger* em cultura em batelada (rendimento de 0,56 g de ácido cítrico g^{-1} de glicose consumida e produtividade volumétrica de 0,27 g de ácido cítrico $\text{L}^{-1}\text{h}^{-1}$). Esta variedade de levedura produziu aproximadamente duas vezes mais ácido cítrico e dois terços de ácido isocítrico comparada com a *Yarrowia lipolytica* Y 7576 sob condições similares de produção.

WOJTATOWICZ *et al.* (1993) analisaram a produção de ácido cítrico e isocítrico em n-hexadecano pela variedade A 101 de *Yarrowia lipolytica* e pelas variedades mutantes. Verificaram que nenhuma destas variedades produziram alta quantidade de ácido cítrico neste substrato, e que as mutantes excretaram predominantemente ácido isocítrico quando crescendo neste meio.

RANE & SIMS (1994) obtiveram na fermentação de *Candida lipolytica* Y 1095 uma taxa de ácido cítrico : isocítrico de 13 : 1, que é consideravelmente melhor do que os valores previamente reportados para outros tipos selvagens de leveduras.

6. Matéria-Prima

Várias fontes de carboidratos bruto, tais como melão, féculas e hidrocarbonos, têm sido empregados como substrato para a produção comercial de ácido cítrico por fungos (RÖHR *et al.*, 1983). O fator crítico na determinação de qual fonte será utilizada é o custo do material e de pré-tratamentos que venham a ser necessário (MATTEY, 1992).

Extremas diferenças de rendimento e produtividade são obtidos pela utilização de melões de diferentes origens, sendo que a composição do material determina sua capacidade para a fermentação de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (GREWAL & KALRA, 1995). Quando melões são usados na fermentação por fungos, o açúcar deve ser diluído para concentrações de 15 a 20% com ácido sulfúrico diluído e o pH ajustado entre 5,5 e 6,5 (KAPOOR *et al.*, 1982).

Melões de cana com um alto conteúdo de resíduos (7 a 10%) e orgânicos não açúcares (20 a 25%), são considerados menos adequados para a produção de ácido cítrico por fungos, particularmente em processos em superfície (RÖHR *et al.*, 1983). O rendimento de ácido cítrico produzido por *Aspergillus niger* em meio contendo melões de beterraba é maior do que em meio de cana devido ao maior conteúdo neste último, de traços de metais (cálcio, magnésio, manganês, ferro e zinco), os quais retardam a síntese de ácido cítrico (GREWAL & KALRA, 1995).

A fermentação de ácido cítrico com *Aspergillus niger* usando melaço e caldo de cana de açúcar foi estudada por QAZI *et al.* (1989). Concluíram que o caldo de cana pode ser considerado como uma alternativa para matéria-prima, apresentando rendimentos de 0,70 (g de ácido cítrico g⁻¹ de glicose inicial) com uma seletividade de aproximadamente 0,75, e que melaços, apesar do baixo custo, não são favoráveis para a produção submersa, apresentando rendimento de ácido cítrico e seletividade 20% e 30% menores, respectivamente. Durante a fermentação não foram detectados outros ácidos como subprodutos, assim a menor seletividade pode ser devido a utilização da fonte de carbono para crescimento e manutenção celular.

GEORGIEVA *et al.* (1988) concluíram que somente após hidrólise ácida ou enzimática do amido, ocorre a biossíntese de ácido cítrico pela variedade *Aspergillus niger* IM 13 (citado por NGUYEN *et al.*, 1992). Anteriormente, MOYER, A.J. (1953) havia obtido bons rendimentos ao utilizar amido hidrolisado (citado por RUGSASEEL *et al.*, 1993).

XU *et al.* (1989) e RUGSASEEL *et al.* (1993) consideraram que as fermentações de ácido cítrico por variedades de *Aspergillus niger* resultaram em rendimentos insuficientes para a produção prática de ácido cítrico de amido solúvel, indicando a necessidade de indução das enzimas, especificamente as de interesse com o catabolismo desta fonte de carbono.

Meios de cultura contendo diferentes concentrações de amido (3,6 e 6%) como substrato para a fermentação de *Aspergillus niger* 155 foram comparados por NGUYEN *et al.* (1992). Os resultados indicaram que as atividades das enzimas intracelulares foram similares, com exceção à amilase, cuja produção foi influenciada pela aeração. Assim, o meio contendo menor concentração de amido (3,6%) forneceu maior rendimento de ácido cítrico do que o meio com 6,0% (rendimentos de 62 e 52%, respectivamente), por possibilitar uma maior aeração e conseqüentemente maior nível de amilase para hidrolisar o amido do meio suprindo glicose.

O liquor da prensa de esgotamento da casca de laranja foi utilizado por ARAVANTINOS-ZAFIRIS *et al.* (1994) como meio de fermentação para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* NRRL 599. Verificaram que condições de

fermentação e pré-tratamentos (térmico ou ácido) para diminuição de traços de metais do liquor aumentaram a produção. Sob condições ótimas o rendimento de ácido cítrico baseado no total de açúcar consumido foi de 730 g kg⁻¹.

HOSSAIN *et al.* (1983) obtiveram baixo rendimento (baseado no açúcar utilizado) de ácido cítrico (aproximadamente 23%) utilizando soro de leite (lactose) como substrato em fermentações por *Aspergillus niger*, provavelmente devido a variedade do microrganismo utilizado, a natureza da fonte de açúcar e outros nutrientes presentes, como íons metálicos (citado por HOSSAIN *et al.*, 1984). Os mesmos autores demonstraram que a natureza da fonte de açúcar exerce um forte efeito nos níveis de atividades enzimáticas e produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* MH 15-15 (HOSSAIN *et al.*, 1984).

Uma variedade de substrato tem sido utilizado para produção de ácido cítrico por leveduras. Estes incluem glicose, acetato, hidrocarbonos, melaços, álcoois, ácidos graxos e óleos naturais. Nestas fermentações o ácido cítrico é produzido juntamente com ácido isocítrico, conduzindo a tentativas de desenvolvimento de mutantes que acumulem somente ácido cítrico em altas concentrações, sem acúmulo de ácido isocítrico (KAPOOR *et al.*, 1982).

Açúcares obtidos na hidrólise da hemicelulose - xilose, arabinose, manose e galactose – foram utilizados por MADDOX *et al.* (1985) na fermentação de ácido cítrico por *Aspergillus niger* MH 15-15, um mutante da variedade *Aspergillus niger* IMI 41874, e *Saccharomycopsis lipolytica* IFO 1658. Os resultados indicaram que para a levedura somente manose poderia ser utilizada, resultando em açúcares residuais no efluente do processo. A variedade de fungo, entretanto, foi capaz de assimilar e produzir ácido cítrico de todos os açúcares obtidos na hidrólise da hemicelulose, contudo a produção de ácido cítrico foi pequena no caso da utilização de galactose, como foi demonstrado por outros autores.

Hidrocarbonos tem servido como substrato para a produção de ácido cítrico por leveduras, porém em vista da disponibilidade e aumento no preço destes, as indústrias baseadas nesses substratos têm substituído os carboidratos de alimentação (GREWAL & KALRA, 1995).

Yarrowia lipolytica A 101 produz ácidos cítrico e isocítrico a partir de n-alcenos, óleos naturais, glicose, amido hidrolisado e etanol. Contudo, a taxa entre estes ácidos não é econômica quando os organismos crescem em etanol, n-alceno e vários óleos (WOJTATOWICZ *et al.*, 1993).

FRIED, J H (US Patent 3,632,476) (1969) verificou que diversas variedades de leveduras, incluindo *Candida lipolytica*, forneceram níveis de rendimento significativos de ácido cítrico a partir de melação de cana de açúcar (alto conteúdo de cinzas (7 a 10%) e orgânicos não açúcares (20 a 25%)) (citado por SHAH *et al.*, 1993).

SHAH *et al.* (1993) investigaram a excreção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* DS 1, isolada a partir de *Yarrowia lipolytica* Y 1094, em frutose, sacarose, sacarose invertida, melação de cana de açúcar, melação invertida, hidrol e amido hidrolisado de tapioca. Baseado na produção de ácido cítrico e isocítrico, concluíram que a variedade DS 1 utiliza somente amido hidrolisado de mandioca e hidrol como fonte alternativa para glicose, produzindo comparáveis eficiências de conversão (75%). Contrário aos resultados obtidos por FRIED (1969) a variedade DS 1 foi insuficiente em utilizar melação, devido ao alto teor de nitrogênio presente (0,6%). Apesar do melação não ser satisfatório para a variedade DS, o seu custo torna-o promissor devendo ser desenvolvida uma estratégia para minimizar o problema relacionado com o alto teor de nitrogênio.

A produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* A-101 em melação de açúcar de beterraba invertido foi avaliada por KAUTOLA *et al.* (1992). Os resultados mostraram um aumento no coeficiente de rendimento de ácido total, baseado no açúcar consumido, durante o cultivo em glicose e melação de beterraba invertido de $0,6 \text{ gg}^{-1}$ para $0,95 \text{ gg}^{-1}$. O maior rendimento ($1,05 \text{ gg}^{-1}$) foi obtido em sacarose pura invertida. Os valores de produtividade volumétrica de ácido cítrico foram $0,98 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ em glicose, $0,75 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ em sacarose invertida e $0,71 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ em melação invertido, indicando melações como sendo convenientes para a produção de ácido cítrico.

2.7. Condições de Fermentação

A produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* e levedura envolve um “estágio de crescimento” e um “estágio de produção”. Os organismos precisam portanto de elementos tais como carbono, nitrogênio, fósforo, e enxofre em adição a vários traços de elementos para o crescimento e produção deste ácido. A concentração de todos estes constituintes, a aeração, a temperatura e o pH têm um profundo efeito no rendimento de ácido cítrico (KAPOOR *et al.*, 1982; GREWAL & KALRA, 1995).

O rendimento teórico para ácido cítrico anidro é de 107 g de ácido cítrico por 100 g de sacarose (100% de rendimento molar, isto é, moles de ácido cítrico produzido por mol de glicose utilizado x 100), entretanto, parte da fonte de carbono é utilizada para crescimento e manutenção celular. Assim, rendimentos reportados de laboratórios e plantas pilotos variam entre 70 e 90% de conversão para ácido cítrico, em fermentações com *Aspergillus niger* crescendo em meio rico em carboidrato (GOLDBERG *et al.*, 1991).

2.7.1. Fonte de carbono

Em geral, somente açúcares que são rapidamente metabolizados pelos fungos são interessantes fontes de carbono, com preferência por sacarose ou melaço, e algumas aplicações de glicose (da hidrólise de polissacarídeos) ou frutose. Normalmente, polissacarídeos não são empregados visto que sua hidrólise pelos microrganismos parece ser a fase limitante para o transporte de açúcar, com a glicose sendo utilizada lentamente pelo fluxo do metabolismo (RÖHR *et al.*, 1983).

Segundo KOVATS (1960) a concentração inicial de açúcar tem sido determinante na quantidade de ácido cítrico e também de outros ácidos orgânicos produzidos por *Aspergillus niger*. Normalmente, variedades de *Aspergillus niger* precisam de alta concentração inicial de açúcar (15 a 18%) no meio, sendo que

concentrações superiores a estas levam a maiores quantias de açúcar residual, tornando o processo não econômico; enquanto baixas concentrações de açúcar conduzem a baixos rendimentos de ácido cítrico (citado por KAPOOR *et al.*, 1982). XU *et al.* (1989^b) e RÖHR *et al.* (1983) também consideram a concentração de açúcar como sendo a variável chave para o acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

XU *et al.* (1989^a) verificaram que sob as mesmas condições de cultivo, sacarose, glicose, maltose e frutose, não causaram acúmulo de ácido cítrico em concentrações inferiores a 2,5%, em fermentação submersa por *Aspergillus niger* B 60. Em altas concentrações, ácido cítrico foi produzido, alcançando níveis máximos em concentrações de 10 a 14% de açúcar, apresentando ótimo rendimento a 10% de açúcar com exceção à glicose que forneceu máximos rendimentos a 7,5%. De acordo com RÖHR *et al.* (1983) a máxima produção de ácido cítrico é obtida a concentrações de açúcar de 14 a 22%. Os autores notaram uma superioridade na utilização de sacarose e maltose, sobre os correspondentes monossacarídeos glicose e frutose.

HOSSAIN *et al.* (1984) também identificaram sacarose como sendo o substrato mais favorável para a produção de ácido cítrico por fermentação submersa de *Aspergillus niger*, seguido por glicose e frutose, e então lactose. Nenhum ácido cítrico foi produzido de galactose. A superioridade da sacarose sobre glicose e frutose pode ser explicada pela alta taxa de utilização de açúcar causada pelo simultâneo consumo dos monossacarídeos depois da hidrólise. Resultados similares foram ainda obtidos por CHEN (1993) que relacionou sacarose, apesar do similar crescimento micelial, como sendo a fonte de carbono preferível para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus foetidus* CCRC 30206, seguida de glicose, lactose e maltose, respectivamente.

Segundo HONECKER *et al.* (1989), células imobilizadas de *Aspergillus niger* variedade 1039 necessitam de uma concentração inicial de sacarose menor do que células livres para obter máximos rendimentos de produção de ácido cítrico (200 gL⁻¹ para células livres e 120 gL⁻¹ para células imobilizadas). Altas concentrações iniciais

de sacarose (acima de 140 gL^{-1}) levaram a redução no rendimento e aumento na formação de polióis (glicerol e arabitol).

A produção de ácido cítrico por variedades mutantes de *Candida lipolytica* ATCC 20346 foram estudadas por IKENO *et al.* (1975) em diferentes fontes de carbono obtendo bons rendimentos (g de ácido cítrico anidro/g de fonte de carbono adicionada) de n-parafina (161%), de vários óleos naturais (óleo de coco, 99,6%; óleo de palma, 155%; óleo de oliva, 119%), ácidos graxos (ácido oleico, 107%; ácido esteárico, 105%) e glicerol (58,8%).

MADDOX *et al.* (1985) determinaram os rendimentos de ácido cítrico na fermentação de *Aspergillus niger* MH 15-15 e *Saccharomycopsis lipolytica* IFO 1658 em diversas fontes de carbono: glicose, manose, galactose, xilose e arabinose. Os resultados obtidos para *Aspergillus niger* e *Saccharomycopsis lipolytica* correspondem, respectivamente, a 14 e 8 dias de fermentação em frascos incubados a 30°C e operando à velocidade de 180 rpm. Os melhores rendimentos obtidos para a produção de ácido cítrico pelo fungo foram de $0,45 \text{ gg}^{-1}$ (60 gL^{-1} de açúcar consumido e 27 gL^{-1} de ácido cítrico produzido) em glicose e $0,31 \text{ gg}^{-1}$ (71 gL^{-1} de açúcar consumido e 22 gL^{-1} de ácido cítrico produzido) em xilose. Com a levedura obtiveram $0,41 \text{ gg}^{-1}$ (22 gL^{-1} de açúcar consumido e 9 gL^{-1} de ácido cítrico produzido) em manose e $0,30 \text{ gg}^{-1}$ (20 gL^{-1} de açúcar consumido e 6 gL^{-1} de ácido cítrico produzido) em glicose, não havendo utilização das demais fontes de carbono.

A máxima produção de ácido cítrico ($4,6 \text{ gL}^{-1}$) pela levedura *Candida* MA 92, uma mutante fluoroacetato resistente da variedade *Candida* sp. Y-1 crescendo na presença de fluoroacetato em metanol como substrato, após 4 dias de fermentação foi obtida por TANI *et al.* (1990). A variedade mutante apresentou atividade de aconitase inferior a variedade selvagem (4,5 unidades/mg de proteína contra 16,5 unidades/mg de proteína) em meio de fermentação ausente de fluoroacetato, um inibidor de aconitase, sendo que ácido isocítrico não foi detectado como subproduto no caldo desta cultura.

KAUTOLA *et al.* (1992) obtiveram a máxima concentração de ácido cítrico de 87 gL^{-1} na fermentação de *Yarrowia lipolytica* A-101 após 98 horas de cultivo em glicose pura e 170 horas em sacarose invertida, sendo que ácido cítrico

representava aproximadamente 90% do total de ácido cítrico e isocítrico excretados. Em sacarose invertida, glicose foi primeiro convertida em ácido cítrico, atingindo um nível de 45 gL^{-1} , iniciando então o consumo de frutose.

Assim como obtido por HOSSAIN *et al.* (1984) para *Aspergillus niger*, GUTIERREZ *et al.* (1993) demonstraram que a levedura *Candida guilliermondii* IMK 1, uma mutante de *Candida guilliermondii* NRRL Y-448, utiliza lactose hidrolisada, ou seja, uma mistura de glicose e galactose, como substrato da fermentação, mas não utiliza lactose. Os resultados obtidos evidenciaram a repressão catabólica quando a levedura cresceu na presença dos dois açúcares simultaneamente, com o consumo de galactose iniciando após concentração residual de glicose inferior a 4 gL^{-1} . Entretanto as concentrações máximas (13 gL^{-1}) obtidas após 5 a 6 dias de incubação foram aproximadamente iguais para glicose, galactose e para a mistura de glicose e galactose, representando um rendimento de 0,37 a 0,38 baseado na concentração de açúcar consumido.

MORESI (1994) observou que a formação de subprodutos como ácido α -cetoglutárico, málico, cis-aconítico e pirúvico, na produção de ácido cítrico pela variedade *Yarrowia lipolytica* ATCC 20346, podem ser minimizados pela alimentação de níveis de açúcar de 180 a 200 gL^{-1} , reduzindo os custos com recuperação e purificação de ácido cítrico.

2.7.2. Fonte de nitrogênio

Convencionalmente, nitrogênio é fornecido na forma de sulfato de amônio ou nitrato. Os compostos de amônio são preferidos fisiologicamente, visto que durante seu consumo há uma diminuição no pH, o qual é um pré-requisito da fermentação de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (RÖHR *et al.*, 1983).

A faixa de concentração de nitrogênio varia de 1 a 3 gL^{-1} , com a adição de maiores quantias de sais de amônio durante o processo sugerida por SHEPHARD (U.S. Pat 308, 3144; 1963), não sendo econômica na prática industrial (citado por MATTEY, 1992). Outras informações encontradas na literatura sugerem que a

concentração de íons de amônio não deveriam ser limitadas, variando sobre uma faixa de 0,3 a 1,5 g de NH_4^+ por litro (RÖHR *et al.*, 1983). XU *et al.* (1989^b) determinaram as concentrações ótimas de sulfato de amônio como sendo 5,0 e 2,5 g L^{-1} (correspondente a 1,8 e 0,9 g NH_4^+ por litro, respectivamente), para a fermentação submersa de *Aspergillus niger* B 60.

No caso da utilização de melaços como fonte de carbono, a concentração de nitrogênio presente pode ser suficiente para o crescimento e produção de ácido, sendo necessário somente a adição de outros sais como fosfato (MILSOM, 1987).

Restrições do crescimento de *Aspergillus niger* por nitrogênio ou fósforo para a produção de ácido cítrico tem sido objeto de controvérsias. DAWSON *et al.* (1989) demonstraram, em culturas de *Aspergillus niger* ATCC 64065, que o aumento no conteúdo de nitrogênio aumenta o consumo de açúcar, o qual provavelmente é convertido em estocagem de carboidrato e dióxido de carbono, e não em ácido cítrico. Verificaram também que após esgotamento de fosfato, aproximadamente no quarto dia de fermentação, não há consumo de nitrogênio. As diferenças nas concentrações de biomassa observadas nas culturas, as quais apresentaram um consumo de nitrogênio e fósforo similares, pode ser devido as quantias de carboidratos estocados na biomassa.

NGUYEN *et al.* (1992) obtiveram em fermentações de *Aspergillus niger* 155 utilizando amido como substrato e meio contendo altas concentrações de minerais, alto crescimento e baixo rendimento de ácido cítrico. Estes resultados, observados na presença de excesso de uréia e outros componentes minerais, foram parcialmente revertidos pelo aumento da aeração no meio.

CHEN (1993) verificou que nitrato de amônio e uréia resultaram em um substancial aumento no consumo de açúcar, crescimento micelial e rendimento de ácido cítrico quando comparados a cloreto de amônio, em sete dias de fermentação conduzidas com *Aspergillus foetidus* CCRC 30206. Os resultados indicaram um rápido consumo de açúcares e grande crescimento vegetativo, com atraso no início da produção de ácido cítrico em meios contendo altos níveis de NH_4NO_3 (2,0 g L^{-1}) e KH_2PO_4 (1,4 g L^{-1}). Em estudos posteriores, o autor verificou que níveis ótimos de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo variavam com o período das fermentações.

Meios contendo baixos níveis iniciais de NH_4Cl e KH_2PO_4 conduziram à rápida produção de ácido cítrico, atingindo o ótimo em aproximadamente seis dias, por *Aspergillus foetidus* CCRC 30206, nos estágios iniciais da fermentação. Durante estágios mais longos de fermentação, maiores produções de ácido cítrico (mínimo de seis dias) foram obtidas em meios contendo altos níveis iniciais destes compostos (CHEN, 1994).

Resultados similares foram obtidos por RANE & SIMS (1996) para levedura *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 crescendo em glicose. As fermentações foram conduzidas em três etapas, sendo que a primeira correspondeu ao crescimento, e as outras duas a produção de ácido, com adição de novo meio de produção para a segunda fase após o esgotamento da glicose da primeira fase de produção. Através do estudo da influência da concentração da biomassa e de nitrogênio no rendimento de ácido cítrico pela levedura, os autores demonstraram que menores rendimentos foram obtidos a altas concentrações de biomassa, devido a alta energia requerida para a manutenção celular. Porém, durante a segunda fase de produção, as produtividades volumétrica e específica no meio contendo $0,070 \text{ gL}^{-1}$ de nitrogênio (concentrações de nitrogênio como NH_4Cl e extrato de levedura) foram 100% superiores aos valores obtidos a $0,017 \text{ gL}^{-1}$ de nitrogênio. Isto ocorre devido a maior viabilidade celular à altas concentrações de nitrogênio, e ao menor tempo de fermentação em condições de biomassa elevadas. Os coeficientes de rendimento de massa celular e ácido cítrico obtidos foram similares para concentrações de nitrogênio de $0,070$ e $0,017 \text{ gL}^{-1}$, mas a quantia de ácido isocítrico produzido durante a fase inicial de produção foi maior sob alta concentração de nitrogênio.

YIGITOGU & MCNEIL (1992) determinaram que o tempo ótimo para a adição de sulfato de amônio estava na faixa de 40 e 75 horas, e concentrações entre $0,25$ e $0,5 \text{ kgm}^{-3}$. Nessas condições obtiveram um aumento de 12 % na máxima concentração relativa de ácido cítrico em fermentação por *Aspergillus niger* B 60.

A produção de ácido cítrico por leveduras ocorre somente sob condições limitadas de nitrogênio, na qual o crescimento e a reprodução celular são cessados (RANE & SIMS, 1995). Para proporcionar uma produção suficiente de biomassa no fermentador anteriormente a fase de excreção de ácido cítrico, um meio rico em

nitrogênio deve ser utilizado promovendo o crescimento celular e a formação da biomassa (RANE & SIMS, 1993).

A produtividade de ácido cítrico pelas leveduras *Candida* sp. Y-1 e sua mutante *Candida* MA 92 diminuíram rapidamente para valores inferiores a $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de ácido cítrico sob concentrações de nitrogênio acima de 0,2% de NH_4NO_3 , sendo esta a melhor concentração, fornecendo valores de $0,8 \text{ gL}^{-1}$ de ácido cítrico (TANI *et al.*, 1990).

KLASSON *et al.* (1991) demonstraram que a produção de ácido cítrico por *Saccharomycopsis lipolytica* Y 7576 geralmente inicia a baixas concentrações de amônia, e após o esgotamento desta, o crescimento celular é reduzido e o organismo rapidamente alcança sua fase estacionária. A produção continua enquanto açúcar estiver presente no meio.

A adição de 0,1% de cloreto de amônia ao meio de produção contendo glicose como fonte de carbono para *Yarrowia lipolytica* A-101 proporciona uma diminuição na concentração de ácido cítrico de 14%, enquanto que frutose na presença de nitrogênio provoca um aumento de 19% na produção (KAUTOLA *et al.*, 1992).

MORESI (1994) verificou que a excreção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* ATCC 20346 iniciou somente após uma mudança na composição do nitrogênio da levedura. A concentração de nitrogênio celular foi aproximadamente constante durante toda a fase de produção de ácido cítrico, afetando diretamente a taxa de formação do ácido.

McKAY *et al.* (1994) verificaram que a levedura *Yarrowia lipolytica* IMK 2, derivada da IFO 1658, somente acumula ácido cítrico com o crescimento celular restrito por limitações de nutrientes específicos. O acúmulo de citrato apresentou-se vinculado à capacidade das células em manter uma alta taxa de utilização de glicose sob limitação do crescimento por nitrogênio ou enxofre, sendo a maior quantidade de citrato produzida igual a 230 mM após 168 horas de fermentação, e taxa específica de acúmulo igual a $0,50 \mu\text{mol de citrato h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de peso seco. Os resultados indicaram que a restrição no crescimento celular através da limitação por nitrogênio, enxofre, fósforo (em níveis duas vezes maior que nitrogênio e enxofre) e magnésio

(altas concentrações) resultaram no acúmulo de 50 mM ou mais de ácido cítrico após 168 horas, e num aumento na taxa específica de utilização de glicose durante a fase de produção. Nessas condições foi observada a formação de manitol e 2-oxoglutarato.

RANE & SIMS (1995) verificaram que a cultura *Candida lipolytica* Y 1095 permaneceu estável por aproximadamente 600 horas em um fermentador com reciclos de células, indicando que a variedade é tolerante às condições de deficiência de nitrogênio requeridas para a produção de ácido cítrico por leveduras, e que pode resistir aos impactos mecânicos causados pelo bombeamento no reciclo de células. A perda inicial da viabilidade celular, após 150 a 175 horas, não afetou a produção de ácido cítrico.

2.7.3. Fonte de fósforo

Além de carbono e nitrogênio, a presença de fosfato no meio tem um profundo efeito no rendimento de ácido cítrico (GREWAL & KALRA, 1995). Não existem muitos estudos em relação a esse aspecto, porém, usualmente estes são adicionados fornecendo uma concentração final entre 1 e 2,5 gL⁻¹, provavelmente ótimo para o crescimento balanceado (MATTEY, 1992). Segundo KAPOOR *et al.* (1982) a concentração de fosfato adequada varia de 0,1 a 0,2%.

XU *et al.* (1989^b) observaram que, para a ótima produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* B 60 em fermentação submersa, baixas quantias de fosfato foram requeridas e níveis elevados inibiram a produção.

HONECKER *et al.* (1989) verificaram que a restrição do crescimento de *Aspergillus niger* 1039 por limitação de fosfato (ótimo de 75 a 100 mgL⁻¹ de diidrogenofosfato de potássio) é preferível em relação a limitação de nitrogênio com respeito a produção de ácido cítrico por células imobilizadas, sendo que um aumento na concentração de KH₂PO₄ de 25 para 150 mgL⁻¹ provocou um decréscimo na produtividade específica de ácido cítrico de 3,6 gg⁻¹ por dia.

Resultados opostos foram obtidos por FIEDUREK *et al.* (1996) que obteve o máximo rendimento de ácido cítrico ($68,3 \text{ gL}^{-1}$) sob alta concentração de fosfato ($0,8 \text{ gL}^{-1}$ de diidrogenofosfato de potássio) em fermentação submersa de *Aspergillus niger* em meio contendo sacarose.

McKAY *et al.* (1994) obtiveram significativo acúmulo de ácido cítrico (130 mM) por *Yarrowia lipolytica* IMK 2 sob limitações de fósforo ($0,3 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$), a uma taxa específica de acúmulo de $0,21 \text{ } \mu\text{mol de citrato h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de peso seco. Nenhum ácido cítrico foi produzido em células crescendo em $0,15 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$.

Segundo DAWSON *et al.* (1989) o pico da taxa de produção de ácido cítrico observado em fermentações por *Aspergillus niger* em batelada é mantido por um longo período quando operado em batelada alimentada através da adição limitada de nitrogênio resultando num aumento da produtividade do fermentador. A adição de nitrogênio é feita devido ao esgotamento desse nutriente enquanto os demais permanecem em excesso no meio. Os autores propuseram a extensão desta técnica operando através da alimentação controlada, em função da taxa de crescimento, de nitrogênio e fósforo após o esgotamento simultâneo desses nutrientes no meio; supondo que nenhum crescimento ocorreria caso apenas um dos nutrientes fosse adicionado.

Estes processos podem ser vantajosos comercialmente, devido aos níveis mínimos de nutrientes no caldo no final do processo, reduzindo custos no tratamento de resíduos, e podendo evitar a repressão catabólica do nitrogênio observada sob condições limitadas de fósforo (DAWSON *et al.*, 1989; CHEN, 1993).

McKAY *et al.* (1994) obtiveram significativo acúmulo de ácido cítrico (130 mM) por *Yarrowia lipolytica* IMK 2 sob limitações de fósforo ($0,3 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$), a uma taxa específica de acúmulo de $0,21 \text{ } \mu\text{mol de citrato h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de peso seco. Nenhum ácido cítrico foi produzido em células crescendo em $0,15 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$.

CHEN (1993) verificou, para fermentação em batelada de *Aspergillus foetidus* CCRC 30206, que o meio contendo altos níveis de nitrato de amônio ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) e diidrogenofosfato de potássio ($1,4 \text{ gL}^{-1}$) propiciou um consumo rápido de açúcar e grande crescimento vegetativo, com atraso no início da produção de ácido cítrico.

Em meio contendo baixos níveis destes compostos observou-se que o crescimento micelial e o consumo de açúcar foram menores, mas a produção de ácido cítrico ocorreu em menor tempo, porém, cessando rapidamente e deixando conteúdos residuais de glicose de 4 a 6% no meio. Altos rendimentos foram obtidos em meios com baixa concentração de fósforo ($0,2 \text{ gL}^{-1}$ de KH_2PO_4) e alta concentração de nitrogênio ($2,0 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4NO_3), e com alta concentração de fósforo ($1,4 \text{ gL}^{-1}$ de KH_2PO_4) e baixa concentração de nitrogênio ($0,5 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4NO_3), em meio contendo 120 gL^{-1} de glicose. Assim, o baixo rendimento e o alto crescimento micelial foram obtidos na presença de grandes quantidades dos dois compostos ($2,0 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4NO_3 e $1,4 \text{ gL}^{-1}$ de KH_2PO_4), indicando que o nitrogênio exerce forte repressão catabólica somente no meio rico em fósforo, e vice-versa.

2.7.4. pH da fermentação

Em fermentações por fungos, a manutenção de valores de pH baixo é extremamente importante. Em geral, a valores de pH menores do que 3, o ácido cítrico é o maior produto da fermentação de *Aspergillus niger*, ao passo que para altos valores de pH, quantias substanciais de ácidos oxálico e glucônico podem ser produzidos. O pH ótimo para a fermentação fúngica está entre 1,7 e 2,0 (RÖHR *et al.*, 1983).

Nos processos em superfície utilizando fungos, melaços são diluídos para a concentração requerida, aproximadamente 15% de açúcar e o pH é ajustado entre 5,0 e 7,0. Este pH inicial é usado porque esporos de *Aspergillus niger* não germinam a valores baixos em melaços (MATTEY, 1992). Em fermentações submersas com *Aspergillus niger*, o pH inicial é ajustado entre 2,5 e 3,0 (RÖHR *et al.*, 1983). PANDA & SHARMA (1984) obtiveram o máximo rendimento de ácido cítrico em fermentações em superfície de *Aspergillus niger* T 55 em melaço de cana tratado a um pH inicial de 7,0.

XU *et al.* (1989^b) determinaram o pH inicial ótimo como sendo ao redor de 4,0 a 5,0 para fermentações submersas de *Aspergillus niger* B 60.

AVARANTINOS-ZAFARIS *et al.* (1994) verificaram que um aumento do pH inicial de 3,0 para 4,0 teve um efeito positivo no acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* NRRL 599 em resíduo do processamento de laranja, e aumentos adicionais no pH não influenciaram no rendimento máximo.

MIALL & PARKER (Br. Pat. 1,481,561, 1975) descreveram um processo contínuo para fermentação submersa com leveduras, no qual o pH é mantido a 3,5 com hidróxido de amônio (citado por MATTEY, 1992).

A produção de ácido cítrico por variedades de leveduras requerem a manutenção do pH do meio acima de 5,5, o qual pode ser reduzido durante a fermentação (GREWAL & KALRA, 1995). Segundo MATTEY (1992) nos processos fermentativos com leveduras incorpora-se carbonato de cálcio ao meio para manter o pH neutro e geralmente pH acima de 5,5 são utilizados.

TABUCHI & HARA (1970) verificaram a produção de polióis, principalmente manitol e eritritol, em lugar de ácido cítrico, em valores de pH abaixo de 5,5 na fermentação por leveduras (citado por MATTEY, 1992).

RANE & SIMS (1993) observaram que sob uma faixa de valores de pH estudados (2,4 a 4,8) em fermentações de ácido cítrico por leveduras *Candida guilliermondii* Y 488, *Candida lipolytica* Y 1095 e *Yarrowia lipolytica* Y 7576, a produção de biomassa pareceu não ser afetada pelo pH inicial.

2.7.5. Aeração e Agitação

A fermentação de ácido cítrico é um processo essencialmente aeróbico e os organismos requerem abundante suprimento de oxigênio para crescimento.

Nos processos de fermentação em superfície sua importância se deve ao cumprimento de duas funções - oxigenação e remoção de calor - em adição ao seu papel na inoculação de esporos (MATTEY, 1992).

Segundo GREWAL & KALRA (1995), o aumento nas taxas de aeração levam a um aumento no rendimento de ácido cítrico e redução do tempo de fermentação.

Valores de oxigênio dissolvido de 9 a 10% e 12 a 13% de saturação para as fases de crescimento e produção por *Aspergillus niger*, respectivamente, foram reportados por KUBICEK *et al.* (1980), que também observaram um aumento na produção com valores de oxigênio dissolvido de 20 a 75% de saturação (citado por GREWAL & KALRA, 1995).

Em processo de fermentação submersa, a aeração é extremamente crítica, sendo que a produção de ácido cítrico é estimulada por um aumento na aeração. O efeito na produção de ácido cítrico quando cessa a aeração depende da fase na qual a interrupção ocorre e da duração desta. Uma interrupção da aeração por 20 minutos durante a idiofase não reduz a viabilidade celular, mas destrói irreversivelmente a habilidade para produção e acúmulo de ácido cítrico (RÖHR *et al.*, 1983).

QAZI *et al.* (1990) observaram que a uma velocidade de agitação menor que 91 rpm, ocorre uma transferência insuficiente de oxigênio para o caldo conduzindo a uma baixa produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Estas condições também levam ao crescimento micelial e a um caldo mais viscoso.

ROUKAS (1991) obteve as maiores concentrações de ácido cítrico (28 gL^{-1}) por *Aspergillus niger* ATCC 9142 em melão de beterraba, em culturas agitadas a 300 rpm, enquanto agitações de 400, 500 e 600 rpm resultaram numa diminuição da concentração de 7, 21 e 28%, respectivamente. A concentração de oxigênio dissolvido aumentou com a variação da velocidade de agitação do nível inferior para o superior. Nos dois primeiros dias de fermentação a concentração de oxigênio dissolvido decresceu rapidamente devido ao rápido aumento na concentração de biomassa, aumentando suavemente após esse período.

Contrário a esse resultados, CLARK & LENTZ (1963) reportaram, para *Aspergillus niger* NRC A-1-233 crescendo em melão de beterraba, a máxima concentração de ácido cítrico a alta velocidade de agitação (600 rpm) (citado por ROUKAS, 1991). As possíveis razões para essas diferenças incluem a composição química, a variedade do microrganismo utilizado e fatores físicos da fermentação, tal como tensão superficial de oxigênio dissolvido.

OKOSHI *et al.* (1987) verificaram que o acúmulo de ácido cítrico por *Candida tropicalis* OT - 1 aumentou sob concentração de oxigênio dissolvido ao redor de 60 ppm e diminuiu rapidamente em níveis superiores a esse. Em contraste, o acúmulo de ácido isocítrico diminuiu com o aumento na concentração de oxigênio dissolvido e tornou-se desprezível ao redor de 50 ppm. A quantia total de ácido produzido (cítrico e isocítrico) permaneceu aproximadamente constante (ao redor de 30 gL⁻¹), sendo independente da concentração de oxigênio dissolvido.

Células de *Candida sp.* Y-1 apresentaram alta produtividade de ácido cítrico somente sob elevadas condições aeróbicas, indicando o estímulo do ciclo do ácido tricarbóxico nestas condições (TANI *et al.*, 1990).

RANE & SIMS (1994) observaram na fermentação, em batelada alimentada, de *Candida lipolytica* Y 1095 que a taxa específica de consumo de oxigênio foi menor durante a fase de produção inicial de ácido cítrico, quando comparado com a fase de crescimento. Em geral, o rendimento de ácido cítrico foi menor a alta concentração de biomassa, enquanto que a produtividade volumétrica foi maior, devido ao curto tempo de fermentação requerido nessas condições. Durante a fase de produção, a uma concentração de biomassa de 5% w/v, o consumo de oxigênio específico e a produtividade específica de ácido cítrico aumentaram de 230 e 82%, respectivamente, com o aumento da concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 80% de saturação. Enquanto que, para uma concentração de biomassa de 3% w/v, o aumento no consumo de oxigênio específico e na produtividade específica de ácido cítrico foi de 160 e 71%, respectivamente, para a mesma variação de oxigênio dissolvido. Verificaram também uma diminuição de 2 a 3 dias para a fermentação conduzida a 5% w/v de biomassa. Os rendimentos de ácido isocítrico pareceram ser independentes da concentração de oxigênio dissolvido.

Estudando a produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* Y 1095 em fermentador com reciclo de células, RANE & SIMS (1995) verificaram que um aumento na concentração de oxigênio dissolvido reflete num aumento na produtividade específica de ácido cítrico e no consumo de oxigênio específico. O rendimento de ácido cítrico aumentou de 0,45 gg⁻¹ a 20% de oxigênio dissolvido para 0,68 gg⁻¹ a 60% de saturação, sendo que acima desta porcentagem, permaneceu

relativamente uniforme. A maior produtividade volumétrica, $1,32 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$, foi obtida com 80% de oxigênio dissolvido. Os resultados obtidos indicaram que a produção de ácido cítrico sobre ácido isocítrico é favorecida a altas concentrações de oxigênio dissolvido. No fermentador de batelada alimentada, a produtividade volumétrica aumentou 100% com a variação de oxigênio dissolvido de 20 para 80% de saturação.

2.7.6. Traços de elementos

Aspergillus niger precisam de uma variedade de traços de elementos divalentes, tais como ferro, cobre, zinco, magnésio e manganês, para crescimento e produção de ácido cítrico. Entretanto, a produção de ácido cítrico é sensível a concentrações desses íons presentes no meio de cultura, e os resultados da fermentação dependem do controle dos níveis desses elementos (KAPOOR *et al.*, 1982).

Diversas reações enzimáticas relacionadas ao crescimento e produção de ácido cítrico por fungos requerem íons de magnésio, cujas concentrações para máxima produção variam de 0,02 a 0,025% (KAPOOR *et al.*, 1982).

Dentre os traços de metais presentes, manganês diminui drasticamente o rendimento de ácido cítrico em fermentações fúngicas, enquanto ferro ou zinco foram menos efetivo (RÖHR *et al.*, 1983). Alguns autores divergem em relação à concentração exata destes últimos para a máxima produção de ácido cítrico, mas concordam que em altas concentrações permite-se o alto crescimento vegetativo e deficiência na excreção de ácido (KAPOOR *et al.*, 1982).

Segundo FINOGENOVA *et al.* (1996), o aumento na demanda de zinco por leveduras durante cultivo em etanol pode ser associado com a ativação e/ou aumento na quantia de álcool desidrogenase em células de levedura.

Assim como na fermentação de *Aspergillus niger*, a concentração de íon férrico no meio afeta o acúmulo de ácido cítrico e isocítrico por leveduras. Um

aumento na concentração de citrato e diminuição de isocitrato pode ser conseguido pela manutenção de baixos conteúdos de ferro no meio (KAPOOR *et al.*, 1982). Devido à dificuldade em manter essas condições em um meio complexo, variedades de *Candida lipolytica* sensíveis a fluoroacetato, com baixa atividade em aconitase, tem sido desenvolvidas, produzindo altas quantias de citrato a partir de n-parafinas (AKIYAMA *et al.*, 1972)

McKAY *et al.* (1994) concluíram que limitações por potássio e magnésio na fermentação de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMK 2 resultaram numa lenta taxa inicial de ácido cítrico. Pequenas quantidades de citrato (acima de 6 mM) foram obtidas sob várias limitações de potássio em concentrações superiores a 0,1 mM de KCl. Sob limitações de magnésio, concentrações de 15 μM de MgCl_2 , pouco citrato foi acumulado, mas um aumento para 50 μM de MgCl_2 , resultou no acúmulo de 50 mM de citrato com uma taxa específica de produção de 0,22 μmol de citrato $\text{h}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de peso seco. As células crescendo sob limitação de potássio revelaram depósitos intracelular de glicogênio.

A dependência da síntese de ácidos cítrico e isocítrico pela levedura *Yarrowia lipolytica* N1 em processos contínuos sob diferentes concentrações de íons férricos foi estudada por KAMZOLOVA *et al.* (1996). Em culturas com controle do crescimento por limitação de nitrogênio, o aumento no conteúdo de ferro na biomassa de 0,13 para 2,5 mgg^{-1} de biomassa seca provocou um aumento na concentração de ácido cítrico e isocítrico sintetizados de 10,7 para 32,1 gL^{-1} , favorecendo o acúmulo de ácido cítrico sobre isocítrico (2 : 1). Concentrações de ferro de 2,5 a 4,8 mgg^{-1} de biomassa seca provocaram o decréscimo do conteúdo de ambos os ácidos, com predominante produção de ácido isocítrico, e abaixo de 0,14 mgg^{-1} de biomassa seca quantias iguais de ácido cítrico e isocítrico foram produzidos (1 : 0,95). Atividade de aconitase hidratase de 0,06 μmol mg^{-1} de proteína min^{-1} foi observada sob condições de rápida síntese de ácido cítrico, sob baixo nível de íon férrico na biomassa (0,2 mgg^{-1}), sendo que em condições de maior suprimento desses íons (2,5 a 4,8 mgg^{-1}) ocorreu a predominância da formação de ácido isocítrico com a atividade da enzima aumentando para 0,48 a 0,69 μmol mg^{-1} de proteína min^{-1} .

FINOGENOVA *et al.* (1996) verificaram a influência da concentração de íons de zinco variando de 0,2 a 3,5 mgL⁻¹ no parâmetro de crescimento e síntese de ácidos cítrico e isocítrico por *Yarrowia lipolytica* N 1 em meio contendo etanol como substrato. Os resultados indicaram que a limitação do crescimento por concentração de 0,2 mgg⁻¹ de íons de zinco conduz a um aumento no acúmulo de biomassa para 5,5 gL⁻¹ e uma insignificante síntese de ácido cítrico. A mudança no conteúdo de íons zinco na biomassa de 0,23 para 1,0 mgg⁻¹ resulta no aumento da síntese de ácido cítrico de 5,4 para 21,6 gL⁻¹ e de ácido isocítrico de 0,5 para 6,4 gL⁻¹. Concentrações maiores causaram um decréscimo na síntese de ácido, com mudança na densidade da biomassa. Os autores concluíram que sob condições de limitação do crescimento celular por zinco, a taxa específica de síntese de ácido foi insignificante (0,002 h⁻¹), porém a limitação do crescimento por nitrogênio e o aumento do conteúdo de zinco para 1,0 mgg⁻¹, provocaram um aumento na taxa de síntese de ácidos cítrico e isocítrico (15 vezes), com mudança na densidade da biomassa.

2.7.7. Considerações gerais

Aspergillus niger e outros fungos utilizados na fermentação de ácido cítrico apresentam temperatura ótima entre 25 e 30°C (KAPOOR *et al.*, 1982). Segundo DOELGER & PRESCOTT (1934) um aumento na temperatura de incubação acima de 30°C proporciona uma diminuição no rendimento de ácido cítrico e aumento no acúmulo de ácido oxálico (citado por KAPOOR *et al.*, 1982). Fermentações conduzidas por leveduras requerem temperaturas entre 22 e 30°C (KAPOOR *et al.*, 1982).

PANDA & SHARMA (1984) obtiveram a temperatura de 28°C como sendo a mais conveniente para o crescimento micelial e formação de produto em fermentações em superfície de *Aspergillus niger* T 55.

O tempo ótimo de incubação para a máxima produção de ácido cítrico varia com o organismo e condições de fermentação. Fermentações por fungos, em

culturas em superfície são finalizadas entre 7 e 10 dias, enquanto sob condições submersas o período é reduzido para 4 ou 5 dias. O tempo de fermentação para leveduras variam entre 3 e 6 dias (KAPOOR *et al.*, 1982)

PANDA *et al.* (1984) verificaram que a adição de 3% (v/v) de metanol no meio de fermentação em superfície de *Aspergillus niger* T 55 restringiu o crescimento micelial, sendo que em níveis superiores foram prejudiciais.

Substâncias viscosas adicionadas ao meio de fermentação de *Aspergillus niger* Yang nº 2, como gelatina, aumenta a produtividade de ácido cítrico em culturas submersas, porém não causa nenhuma influência em culturas estáticas (semi-sólida e superfície). Este resultado indica que essas substâncias atuam como protetoras do micélio contra o *stress* fisiológico causado pela agitação (RUGSASEEL *et al.*, 1995).

A adição de fluoroacetato no meio de fermentação proporcionou um aumento na produtividade de ácido cítrico por *Candida* sp. Y-1 e sua mutante *Candida* MA 92, contudo concentrações acima de 0,5 mM conduziram a um decréscimo na produtividade segundo estudos efetuados por TANI *et al.* (1990). AKIYAMA *et al.* (1973) também verificaram uma alteração na taxa de acúmulo de citrato : isocitrato de 60 : 40 para 85 : 15 com a adição de 0,1% de monofluoroacetato em fermentações de *Candida lipolytica* ATCC 20114 crescendo em n-parafinas. O monofluoroacetato é convertido enzimaticamente a monofluorocitrato, o qual causa uma inibição competitiva na atividade da aconitase, resultando na baixa produtividade de ácido isocítrico.

Segundo TABUCHI & HARA (1973) a concentração de tiamina, quando o meio de fermentação utiliza n-parafinas como fonte de carbono, influencia a quantia de ácidos cítrico e isocítrico excretados. Com suficiente tiamina no meio, grande quantia de ácido cítrico é produzido, enquanto que em condições restritas de tiamina, ocorre o acúmulo de α -cetoglutarato com reduzida produção de citrato (citado por KAPOOR *et al.*, 1982). Em meio contendo glicose, a adição de ferrocianeto de potássio ou a deficiência de tiamina causam um declínio na atividade de isocitrato desidrogenase e aumento no acúmulo de citrato em relação a isocitrato (TABUCHI *et al.*, 1973, citado por YOKOYA, 1992).

ROUKAS (1991) verificou na fermentação de *Aspergillus niger* ATCC 9142 em melão de beterraba, sob condições de agitação igual ou superior a 300 rpm, a formação de *pellets* com 2 a 3 mm de diâmetro num período de 24 a 48 horas após inoculação, os quais se aglomeraram posteriormente em pedaços de micélio com 100 a 250 µm de comprimento, com essas hifas formando uma suspensão homogênea dispersa no caldo de fermentação. Os resultados indicaram um aumento na concentração da biomassa com o aumento da velocidade de agitação de 300 a 600 rpm, entretanto a viscosidade aparente diminuiu com esse aumento, o que pode ser explicado pelo cisalhamento dos *pellets* filamentosos, indicando a morfologia da cultura como sendo o maior determinante das propriedades reológicas do caldo.

2.7. Processo Industrial

A produção comercial de ácido cítrico iniciou-se em aproximadamente 1826 na Inglaterra a partir de citrato de cálcio, obtido de suco de limão importado da Itália. O monopólio virtual italiano pelos próximos 100 anos resultou num produto caro, conduzindo à fontes alternativas para obtenção de ácido cítrico - o caminho químico e o microbiológico (MATTEY, 1992).

WEHMER, em 1983, observou a presença de ácido cítrico como um subproduto de oxalato de cálcio produzido por uma cultura de *Penicillium glaucum* fermentando açúcar. Estudos subseqüentes levaram-no a isolar duas variedades de fungo, incorporadas no gênero *Citromyces* (agora *Penicillium*). Foram feitas tentativas de aplicação em escala industrial que não obtiveram resultados, devido a problemas de contaminação e duração da fermentação (RÖHR *et al.*, 1983).

A produção industrial iniciou-se através do trabalho de CURRIE em 1917 aonde foi detectado uma variedade de *Aspergillus niger* capaz de acumular quantidades significativas de ácido cítrico em um meio composto de açúcar. Como pioneiro na otimização da fermentação, o estudo determinou que altas concentrações de açúcar favoreciam a ótima produção e altos rendimentos eram atingidos quando o desenvolvimento do micélio era limitado (RÖHR *et al.*, 1983).

Este trabalho formou a base da indústria produtora de ácido cítrico implantada por Chas. Pfizer & Co. Inc, em 1923 (RÖHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992).

Originalmente fermentações de ácido cítrico foram conduzidas em cultura em superfície, com o desenvolvimento da fermentação submersa no ano de 1940 (MATTEY, 1992; RÖHR *et al.*, 1983).

Em 1965 descobriu-se que certas leveduras, principalmente do gênero *Candida*, excretavam ácido cítrico crescendo em carboidratos e, em seguida, em n-alcenos (RÖHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992). Com isto foram obtidos novos caminhos para utilização industrial, a serem investigados. Entretanto, industrialmente, *Aspergillus niger* junto com carboidratos como substrato ainda são dominantes, com uma constante expansão da fermentação submersa (RÖHR *et al.*, 1983).

Portanto, o desenvolvimento de processos para fermentação de ácido cítrico dividiu-se em três fases. Na primeira fase a produção de ácido cítrico foi restrita a espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* sob condições de cultura em superfície. A segunda fase, iniciada por volta de 1930, consistiu do desenvolvimento de processos de fermentação submersa utilizando *Aspergillus niger*. O terceiro estágio, originado recentemente, envolveu o desenvolvimento de técnicas de fermentação de cultura em estado sólido, contínuas e multi-estágios para a produção de ácido cítrico. A seguir encontram-se descritos os três principais métodos disponíveis para a produção de ácido cítrico através de fungos e leveduras (KAPOOR *et al.*, 1982).

2.7.1. Processo em superfície

Este é o método original empregado em grande escala e foi introduzido ao redor de 1920. Apesar do desenvolvimento de métodos mais sofisticados este processo continua sendo empregado devido aos menores custos de energia requeridos em relação aos processos submersos. Entretanto, os custos relacionados a mão de obra são maiores (MATTEY, 1992).

Na produção, o micélio cresce como uma esteira na superfície de bandejas rasas, normalmente com capacidade de 50 a 100 litros. As bandejas de alumínio de alta pureza ou aço de grau especial são empilhadas em estantes em câmaras de fermentação (RÖHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992; GREWAL & KALRA, 1995).

As fontes de carboidratos que formam o meio de fermentação são sacarose refinada ou crua, xarope de cana *high test* (obtido por evaporação parcial do suco de cana de açúcar invertido) ou melaços de beterraba (GREWAL & KALRA, 1995).

Melaços, quando usados, são diluídos para concentrações requeridas de aproximadamente 15% de açúcar, e o pH ajustado entre 5,0 e 7,0 (RÖHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992; GREWAL & KALRA, 1995). Depois da adição de nutrientes, o meio é esterilizado por 15 a 45 minutos. Subseqüentemente, hexacianoferrato de potássio é adicionado à solução quente para precipitar ou complexar traços de metais (ferro, manganês, zinco, etc.); em excesso ele atua como metabólito inibidor, restringindo o crescimento e promovendo a produção de ácido, sendo portanto conveniente manter um certo excesso do composto no caldo. A solução de melaço é resfriada para aproximadamente 40°C e distribuída nas bandejas (RÖHR *et al.*, 1983).

A inoculação é feita pela introdução de um número alto de esporos, adicionados como uma suspensão ou pela injeção de ar sobre as bandejas (MATTEY, 1992; GREWAL & KALRA, 1995).

Na fermentação a aeração é importante fornecendo oxigênio para os organismos e controlando a temperatura, entre 28 e 30°C, e a umidade relativa, entre 40 e 60% (GREWAL & KALRA, 1995). O requerimento de oxigênio varia com o estágio de crescimento, sendo que no início baixa taxa de ar estéril é fornecida para prevenir contaminação durante a germinação e fase inicial de crescimento; em seguida, visando dispersar o calor, taxas acima de 10 m³m⁻³ de meio min⁻¹ são requeridas, e embora não necessite esterilidade, o ar é usualmente filtrado (MATTEY, 1992).

Com o progresso da fermentação, o pH diminui abaixo de 2,0, e caso aumente para 3,0, ácido oxálico e glucônico podem ser formados em consideráveis quantias (RÖHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992; GREWAL & KALRA, 1995).

A duração do processo varia entre 8 a 15 dias dependendo da variedade e de níveis iniciais de açúcar, sendo a produtividade (aproximadamente 1 kgm^{-2} por dia) e o rendimento (aproximadamente 75%) influenciados por fatores como aeração, umidade, profundidade do meio, pH, concentração de traços de metais e temperatura influenciam (MATTEY, 1992).

Depois de finalizada a fermentação, o liquor fermentado é retirado das bandejas e o micélio é separado para processos adicionais. Os rendimentos das fermentações situam-se numa faixa de 70 a 75% (GREWAL & KALRA, 1995).

2.7.2. Processo Koji

O processo Koji, desenvolvido no Japão, é o processo mais simples para a produção de ácido cítrico. Este processo é o estado sólido equivalente ao processo em superfície e as matérias-primas utilizadas são resíduos fibrosos de batata doce, farelo de arroz ou resíduos de frutas (RÖHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992; GREWAL & KALRA, 1995).

As fontes de carboidratos, principalmente amido e celulose, são esterilizadas por vaporização e a pasta semi-sólida resultante, com aproximadamente 70% de água, e pH de aproximadamente 5,5, é inoculada por pulverização dos esporos. A temperatura de incubação é de 30°C ; e o processo é completado entre 4 e 5 dias (RÖHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992).

Neste processo observa-se baixos rendimentos devido a dificuldade de se controlar traços de metais e os parâmetros da fermentação. Os fungos produzem quantidades suficientes de amilases e celulasas para quebrar o substrato, embora os baixos rendimentos possam refletir as taxas de limitações desta etapa (MATTEY, 1992).

Sistemas de fermentação submersa, em superfície e em superfície em estado sólido (SSF ou Koji) para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* KCU 520 a partir de melaços de cana de açúcar clarificado, foram comparados por GARG &

SHARMA (1991). Aproximadamente 65, 72 e 80% de melaço de açúcar foram convertidos em ácido cítrico em 14, 12 e 10 dias de fermentação, com rendimentos diários de ácido cítrico iguais a $5,8 \text{ gL}^{-1}$, $7,6 \text{ gL}^{-1}$ e $9,8 \text{ gL}^{-1}$, através de processo submerso, em superfície e em superfície em estado sólido, respectivamente. Os resultados sugeriram portanto, o sistema SSF como sendo o melhor. Nesse sistema, o bagaço é utilizado como material sólido para absorver melaços e fornecer superfície sólida para crescimento do fungo, sendo as possíveis razões para a eficiência deste processo a grande superfície para crescimento do microrganismo fornecido pelo bagaço e uma melhora na aeração, além da absorção de impurezas pelo bagaço tornando o sistema menos susceptível à impurezas do melaço.

2.7.3. Processo submerso

No processo submerso o micélio do fungo é disperso por toda a fase líquida, e apesar da maior dificuldade de operação do que o processo em superfície, a produção de ácido cítrico por fermentação submersa está aumentando constantemente (RÖHR *et al.*, 1983; MILSOM, 1987). Este processo tem sido preferido porque requer menos mão-de-obra para operação, fornece altas taxas de produção e utiliza menor espaço (MATTEY, 1992). As vantagens do método incluem ainda a possibilidade do uso de uma ampla faixa de substrato e melhor controle da fermentação. Substratos usados nesse processo incluem glicose, sacarose, melaços de beterraba e de cana (MILSOM, 1987).

A preparação do meio deve ser no geral similar ao descrito para o processo em superfície, mas maiores precauções devem ser tomadas para assegurar a esterilidade (MILSOM, 1987).

A fermentação pode ser conduzida em reatores agitados ou fermentadores em torre. Este último apresenta várias vantagens, como menores preços, possibilidade de construção de grandes reatores, operação sem grandes unidades rotativas com menor risco de contaminação e melhor condição de trabalho com sólidos suspensos (RÖHR *et al.*, 1983).

A matéria-prima utilizada determina o método de operação do processo na fermentação submersa utilizando fungos.

No caso de substrato contendo açúcar puro a fermentação é geralmente conduzida como um processo de batelada normal e a preparação do meio consiste na diluição do açúcar para 15 a 27% (w/v), adição de nutrientes e agentes anti espumantes, correção do pH para 2,5 a 3,0 e esterilização na linha ou no bioreator. A inoculação é realizada adicionando a suspensão de esporos ou pelo pré-cultivo do micélio. Quando esporos são usados eles precisam ser dispersos no meio, sendo necessária a adição de um surfactante. Para micélio pré-cultivado a medida do inóculo é de aproximadamente 10% do meio fresco. A aeração é estabelecida em 0,1 a 0,4 vvm (volume de ar por volume de meio para fermentação), por motivos econômicos, mas como descrito anteriormente, um aumento nas taxas de aeração pode ser benéfico para a produtividade. A fermentação se completa entre 5 e 10 dias sob condições ótimas, dependendo do processo específico (RÖHR *et al.*, 1983; GREWAL & KALRA, 1995).

Outro caso, é a utilização de matéria-prima relativamente "impura" por serem relativamente baratas, como amido hidrolisado não-filtrado, xaropes crus de beterraba ou cana de açúcar e seus correspondentes melaços. Na fermentação submersa os fungos são mais sensíveis a traços de metais e a outras derivações de condições do meio ambiente, então, a matéria-prima é tratada com hexacianoferrato, porém o excesso necessário tolerado pelo fungo é muito menor do que na fermentação em superfície (RÖHR *et al.*, 1983).

Quando o acúmulo de ácido cítrico cessa numa taxa econômica, a fermentação é concluída e o liquor separado do micélio através de um filtro à vácuo rotativo, centrífuga de disco ou outro processo apropriado (MILSOM, 1987).

Reatores de torre são usados para leveduras do mesmo modo que para *Aspergillus niger*, mas com uma maior eficiência de resfriamento devido a taxa de calor produzida ser maior como resultado dos processos mais curtos. As leveduras crescem em reatores pequenos fornecendo um inóculo apropriado para a produção no reator. A temperatura é mantida na faixa de 25 a 37°C dependendo da variedade

e o pH inicial acima de 5,5, embora possa baixar durante o processo (MATTEY, 1992).

Estes reatores se adequam também para a produção a partir de n-alcenos, mas no caso desta matéria-prima, tanto nestes como em reatores de tanque agitado, grandes capacidades de refrigeração são requeridas. Uma característica dos processos com n-alceno é a insolubilidade desses substratos e para aumentar a conversão são minuciosamente dispersos (MATTEY, 1992).

As fermentações podem ser realizadas em batelada, batelada alimentada ou processos contínuos. Fermentações em batelada são principalmente usadas com materiais de glicose (RÖHR *et al.*, 1983). As indústrias de biotecnologia utilizam predominantemente fermentadores de batelada em tanque agitado, apesar das vantagens fornecidas pelos sistemas de fermentação contínua ou semi-contínua (batelada alimentada), sobretudo o aumento na produtividade do reator. A natureza unicelular das leveduras, a tolerância às condições de deficiência de nitrogênio requerida para a produção de ácido cítrico e à resistência mecânica a bombeamento devem ser considerados para o desenvolvimento de um processo de fermentação contínuo para a produção de ácido cítrico (RANE & SIMS, 1995).

Os sistemas de fermentação para a produção de ácido cítrico por leveduras deveriam ser projetados de modo que a concentração da biomassa no fermentador fosse mantida constante. Isto porque a produção de ácido cítrico por leveduras ocorre somente sob condições limitadas de nitrogênio, na qual o crescimento e a reprodução celular estão suspensos (RANE & SIMS, 1995).

Visando melhorar a produtividade de ácido cítrico obtidos de melaços de cana, GUPTA & SHARMA (1994) desenvolveram um processo de fermentação contínua combinando cultura submersa com células imobilizadas em alginato de cálcio, com cultura em superfície com células livres de *Aspergillus niger* KCU 520. Os resultados fornecidos por este processo foram superiores aos obtidos por GARG & SHARMA (1991), sendo produtividade igual a $1,7 \text{ kgm}^{-3}\text{h}^{-1}$, concentração de ácido cítrico de 110 kgm^{-3} e 91% de rendimento.

RANE & SIMS (1995) avaliaram a produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* Y 1095 em sistemas de fermentação com reciclo de células, batelada e

batelada alimentada. O rendimento de ácido cítrico obtido foi um pouco maior no fermentador em batelada (0,70 g de ácido cítrico g⁻¹ de açúcar). Entretanto, produtividades volumétricas foram 13 e 16% maiores nos fermentadores operando em batelada alimentada e com reciclo de células, respectivamente. As taxas de ácido cítrico : isocítrico obtidas foram similares em todos os fermentadores. Na fermentação com reciclo de células de *Candida lipolytica* Y 1095, os maiores rendimento (0,72 g ácido cítrico g⁻¹ de glicose), produtividade volumétrica (1,16 gL⁻¹h⁻¹) e produtividade específica (19,3 mgg⁻¹h⁻¹ de célula) de ácido cítrico numa taxa de diluição de 0,06 h⁻¹. O rendimento de ácido cítrico nesta taxa de diluição foi de 7 e 11% maior do que o obtido a 0,03 h⁻¹ e 0,10 h⁻¹, respectivamente, e a produtividade volumétrica e específica foram aproximadamente 45 e 80% maiores do que nestas mesmas taxas.

O desenvolvimento de sistemas de produção contínuo e semi contínuo para a produção de ácido cítrico estão relacionados ao uso de células de leveduras imobilizadas (KAUTOLA *et al.*, 1991). FÖSTER *et al.* (1994) utilizaram células de *Yarrowia lipolytica* EH 59 e H 181 encapsuladas para síntese de ácido cítrico a partir de glicose em processos de fermentação contínua. KAUTOLA *et al.* (1991) compararam diferentes métodos de imobilização de células de *Yarrowia lipolytica* - ativa e passiva - para produção de ácido cítrico em sistemas de batelada e *air-lift*. MADDOX & KINGSTON (1983) obtiveram menores taxas de produção de ácido cítrico por células de *Saccharomycopsis lipolytica* IFO 1658 imobilizadas em gel poliácridamido em comparação com células livres no fermentador.

Nos sistemas fermentativos em batelada e contínuo uma significativa fração de substrato que poderia ser despendido para a formação de produto é utilizada para o crescimento celular. Reatores com reciclo de células permitem operações a alta densidade celular, manutenção do substrato devido a conservação da massa celular e manutenção da produtividade específica, sob condições de limitação de nitrogênio. ENZMINGER & ASENJO (1986) obtiveram rendimento igual a 0,86 g ácido g⁻¹ glicose consumida e produtividade volumétrica de 1,16 g ácido h⁻¹L⁻¹, como resultados da produção de ácido cítrico por *Saccharomycopsis lipolytica* NRRL Y 7576 nestes reatores.

2.8 Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta

A maioria dos trabalhos previamente reportados na literatura para a fermentação de ácido cítrico utilizam a técnica univariável, ou seja, a análise de uma variável por vez, mantendo as demais constantes. Entretanto, este procedimento conduz a falhas na localização da região de ótima resposta ao desconsiderar os efeitos de interação dos fatores na resposta. Uma alternativa seria dispor todas as combinações das variáveis em uma matriz (Método da Matriz) tendo-se a vantagem de explorar completamente a superfície experimental, mas requerendo um número de experimentos muito grande.

O Planejamento Fatorial e a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) são preferidos ao permitirem considerar simultaneamente vários fatores em diferentes níveis e as interações entre eles, utilizando um pequeno número de experimentos. E ainda, técnicas de inferência estatística podem ser aplicadas para estimar a importância de fatores individuais, a sensibilidade da resposta para cada fator e a magnitude do erro experimental (MASON *et al.*, 1989).

Recentemente, a Metodologia de Superfície de Resposta tem sido empregada para resolver problemas multivariados e otimizar várias respostas em muitos tipos de experimentos.

A influência da taxa de crescimento (taxa de diluição) e tensão de oxigênio dissolvido na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* ATCC 64065, sob condições limitadas em fósforo, foi estudada por DAWSON *et al.* (1989) através de um planejamento experimental 3^2 . Os resultados obtidos indicaram uma relação negativa entre rendimento de ácido cítrico e taxa de crescimento específico ($r = -0,96$), e entre rendimento de ácido cítrico e taxa de consumo de nitrogênio ($r = -0,97$) evidenciando a repressão catabólica na produção de ácido cítrico pelo nitrogênio. Contrário aos resultados obtidos em fermentações limitadas em nitrogênio, nas quais ambos, taxa de crescimento e tensão de oxigênio dissolvido exercem uma forte influência na produção de ácido cítrico, nenhuma relação entre produção de ácido

cítrico e tensão de oxigênio dissolvido foi obtido para essas culturas limitadas em fósforo.

Os efeitos das concentrações de fósforo e nitrogênio para a produção de ácido cítrico por diversas variedades de *Aspergillus niger* foram analisados por PINTADO *et al.* (1993) utilizando um planejamento fatorial ortogonal completo 2^2 . Os resultados descreveram três situações distintas em relação aos efeitos dos nutrientes na resposta: certas variedades apresentaram uma melhora na produção com um decréscimo de ambos os nutrientes, outras com um aumento no nível de nitrogênio e decréscimo de fósforo, e ainda, algumas com o aumento do nível dos dois nutrientes.

CHEN (1994) conduziu experimentos seguindo um planejamento Box-Behnken, para a análise de 3 fatores a 3 níveis com o objetivo de determinar as concentrações ótimas de carbono, nitrogênio e fósforo para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus foetidus* CCRC 302065. O modelo de 1ª ordem obtido para a produção de ácido cítrico foi altamente significativo com satisfatório coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9615$), entretanto para a massa micelial seca o baixo valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,8426$) sugeriram a inclusão de outros fatores além de carbono, nitrogênio e fósforo para obtenção de um melhor modelo. A análise estatística dos resultados mostraram que a fonte de nitrogênio tem um efeito negativo maior (isto é, forte repressão catabólica) na produção de ácido cítrico do que a fonte de fósforo. As superfícies de resposta indicaram que um aumento nas concentrações de fósforo e nitrogênio ocasionaram um aumento na massa micelial seca.

CHEN (1996) verificou através da Metodologia de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta que a produção de ácido cítrico por *Aspergillus foetidus* CCRC 30206 foi mais sensível a mudanças na concentração de fósforo do que de nitrogênio.

RYMOWICZ *et al.* (1993) otimizaram a composição do meio de produção de ácido cítrico utilizando a Metodologia de Planejamento Experimental. As variáveis independentes, estudadas através de fermentações em batelada por *Yarrowia lipolytica* A 101, foram concentrações de carbono, fósforo, magnésio e cobre, e

obtiveram como resposta as seguintes concentrações otimizadas: 100 gL^{-1} de glicose; $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de dihidrogenofosfato de potássio; $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de magnésio e 38 mgL^{-1} de sulfato de cobre. A equação de regressão obtida para rendimento de ácido cítrico é função da concentração de glicose e íons de cobre, e apresentou um coeficiente de correlação de 0,89.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Introdução

A produção de ácido cítrico por leveduras ocorre em duas fases: uma de crescimento microbiano e outra de produção propriamente dito. A regulação de uma ou outra fase está na composição do meio de cultura e condições operacionais do processo. Na primeira fase há um favorecimento do crescimento por um meio com composição adequada, enquanto que na segunda fase o meio é limitado em nitrogênio ou fósforo, resultando num crescimento pequeno, porém, com alto acúmulo de ácido cítrico. A produção indesejável de ácido isocítrico, um dos problemas a serem resolvidos, pode ser regulada também pela composição do meio e condições de cultura. Desta forma, neste trabalho utilizou-se a Metodologia do Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta para verificar de uma forma sistemática o efeito da relação carbono/nitrogênio nas fases de crescimento e de produção na razão de ácido cítrico e isocítrico produzidos na fermentação.

A Metodologia de Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta foi escolhida por ser uma ferramenta importante, podendo-se avaliar o efeito de cada variável individualmente, bem como as interações (efeito sinérgico ou antagônico) entre elas. Um outro fator positivo no uso desta técnica é a possibilidade de otimizar mais de uma resposta simultaneamente, caso muito comum em processos multivariáveis como os bioquímicos. Por exemplo, quando se deseja otimizar o rendimento de um processo, geralmente a produtividade decresce devido ao tempo gasto para o máximo de conversão. No entanto, através desta metodologia é possível definir através dos modelos probabilísticos obtidos, as superfícies de resposta e as faixas ótimas de operação garantindo o máximo rendimento, minimizando os prejuízos na produtividade.

A Análise de Superfície de Resposta tem como base o método de planejamento fatorial e consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (por exemplo rendimento e produtividade) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas. Essas técnicas são usadas para elucidar as seguintes questões:

- como uma resposta é efetuada sobre uma região de interesse por um dado conjunto de variáveis de entrada;
- quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão num produto dentro das especificações desejadas;
- quais os valores das variáveis de entrada que levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto.

Para aplicar o método de Análise de Superfície de Resposta é necessário realizar primeiramente ensaios através de um planejamento fatorial. Esse método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para n variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^n .

Com os resultados obtidos do planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre a resposta, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear ou de 1ª ordem, correlacionando as variáveis e as respostas.

Se o modelo de 1ª ordem não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais é possível completar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais $2n$ ensaios segundo configuração “estrela” para obter modelo quadrático ou de 2ª ordem.

Para avaliar se os modelos empíricos obtidos através de regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, (BOX *et al.*, 1978) sugere a realização de uma análise estatística, utilizando como

parâmetros o coeficiente de correlação da regressão e o valor estimado para o teste F

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais. Quanto mais próximo da unidade estiver o valor do coeficiente de correlação, melhor será o ajuste dos modelos aos pontos experimentais.

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o valor estimado para F a partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se existe relação entre as variáveis e a resposta. Segundo BARROS *et al.* (1995), quando não há relação entre a resposta e a variável, pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos (MQR/MQr) segue uma distribuição F (hipótese nula). Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi devida exclusivamente a fatores aleatórios. A hipótese nula pode ser testada comparando o valor efetivamente calculado para MQR/MQr com o valor de F tabelado. Se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para questionar a hipótese nula. Então pode-se afirmar que a equação de regressão não é significativa.

Por outro lado, se a razão MQR/MQr é maior que o F tabelado, pode-se afirmar que a equação é estatisticamente significativa e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto. Entretanto, pode acontecer que uma regressão, embora significativa do ponto de vista do teste F, não seja útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Assim, BARROS *et al.* (1995) sugerem que para que a regressão seja estatisticamente significativa e preditiva, o valor da razão MQR/MQr deve ser no mínimo 4 a 5 vezes o valor de F tabelado.

3.2. Condução da fermentação

3.2.1. Microrganismo

Utilizou-se cepa da levedura *Candida lipolytica* Y 1095, fornecida pelo Northern Regional Research Laboratory. Este microrganismo foi selecionado com base nos resultados obtidos por RANE & SIMS (1993), nos quais produtividade e rendimento de ácido cítrico foram similares aos fornecidos por *Aspergillus niger*.

As linhagens das culturas foram mantidas inclinadas em tubos de ensaios contendo meio YM (*yeast malt agar*) a 4°C, imersas em óleo mineral.

3.2.2. Preparo do meio de inóculo

A utilização de alçadas da cultura de levedura proporciona uma variação no número de microrganismos inoculados em cada ensaio, portanto visando diminuir essa variação, foi realizada uma fermentação em *shaker* para padronização do inóculo.

O inóculo foi preparado por transferência asséptica da colônia (de 3 a 4 dias de idade) em YM para 200 mL de caldo YM, cuja composição está descrita na Tabela 3.1, em *erlenmeyer* aletados de 1000 mL (RANE & SIMS, 1993).

A suspensão de células foi incubada a temperatura de 27°C em *shaker* a 200 rpm. Após 48 horas, distribuiu-se 5 mL de meio fermentado em tubos de ensaio estéreis contendo 5 mL de solução glicerol 40%, formando uma solução com concentração final de 20% de glicerol. Os tubos de ensaio foram mantidos congelados e utilizados como inóculo para cada experimento.

TABELA 3.1. Composição do meio YM de inóculo.

Componentes	gL ⁻¹
glicose	10
extrato de levedura	3
extrato de malte	3
peptona	5

Os componentes dos meios de cultura foram diluídos em água destilada e esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

3.2.3. Pré-fermentação

Cada tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo congelado foi utilizado para inocular um erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 mL do meio de pré-fermentação (10% do volume inicial do fermentador). Após 24 horas de incubação em *shaker* a 200 rpm e 27°C o conteúdo de um frasco foi transferido como inóculo para o fermentador. A composição do meio de pré-fermentação encontra-se descrita na Tabela 3.2.

TABELA 3.2.. Composição do meio de pré-fermentação.

Componentes	Composição (gL ⁻¹)
glicose	30
NH ₄ Cl	2
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,41
extrato de levedura	2
tiamina (*)	5 . 10 ⁻⁴

(*) adicionada após esterilização através de filtro *millipore* 0,2 µm estéril.

3.2.4. Fermentação

As fermentações foram conduzidas em fermentadores Bioflo III - Bath/Continuous Fermentator (New Brunswick Scientific Co., Inc) com 1,25 L de volume útil, equipados com controladores de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e anti-espumante. O controle de pH entre 5,0 e 6,0 foi obtido utilizando-se NaOH 2M e HCl 1M, e o excesso de espuma controlado pela adição de solução 5 % de anti-espumante. A temperatura foi fixada em 27°C, agitação em 500 rpm e fluxo de ar em 1 vvm. As condições de fermentação - pH, fluxo de ar, agitação e temperatura - foram mantidas constantes durante a fase de crescimento e produção. O condensador do fermentador foi mantido refrigerado com água a 10°C para reduzir a evaporação.

As fermentações foram conduzidas em duas etapas: fase de crescimento e fase de produção, diferenciadas pela concentração de nitrogênio. O fermentador contendo 1000 mL de meio de crescimento foi inoculado com o meio de pré-fermentação. Após esgotamento da glicose, adicionou-se 200 mL de meio de produção. O problema da variação de volume do meio de crescimento, devido a evaporação e a espuma, foram minimizados pela adição de água destilada estéril ao fermentador juntamente com a adição do meio de produção. A composição destes meios encontra-se descrita na Tabela 3.3. O meio de produção foi preparado considerando-se a diluição final no fermentador de 1,2 litros.

TABELA 3.3. Composições dos meios de crescimento e produção.

Componentes	Meio de crescimento (gL ⁻¹)	Meio de Produção (gL ⁻¹) ^(**)
glicose	30	150
NH ₄ Cl	planejamento experimental	planejamento experimental
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,41	0,41
extrato de levedura	2	0,03
tiamina ^(*)	5 . 10 ⁻⁴	5 . 10 ⁻⁴

^(*) adicionada ao meio esterilizado através de filtro 0,2 µm.

^(**) considerar a diluição destes componentes no volume total do fermentador (1,2 L).

As variáveis estudadas foram: relação carbono/nitrogênio no meio de crescimento e no meio de produção, cujos valores codificados e decodificados (reais) encontram-se descritos nas Tabela 3.4 e 3.5, respectivamente. Os valores apresentados na Tabela 3.5 correspondem as concentrações de NH_4Cl , sendo que as concentrações de nitrogênio são obtidas multiplicando esses valores por 0,262, correspondente a % de nitrogênio presente na molécula.

Neste trabalho foram realizados 4 ensaios (2^2) para verificação dos efeitos principais e de interação na respostas e três ensaios no ponto central para determinação do erro experimental.

Foram tomadas amostras em função do tempo (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas) para análise do ácido cítrico e isocítrico, consumo de açúcar e de nitrogênio, crescimento e viabilidade celular.

TABELA 3.4. Planejamento Experimental para a condução da fermentação de ácido cítrico.

Ensaio	Relação carbono/nitrogênio	
	meio de crescimento	meio de produção
1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1
3	- 1	+ 1
4	+ 1	+ 1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

TABELA 3.5. Faixa de valores estudados no Planejamento Experimental para condução da fermentação de ácido cítrico.

Nível	Glicose (gL^{-1})/ NH_4Cl (gL^{-1})	
	meio de crescimento ⁽¹⁾	meio de produção ⁽¹⁾
- 1	30/2,6	150/0,5
0	30/4	150/0,3
+1	30/5,4	150/0,1

3.3. Métodos analíticos

As amostras das fermentações (5 mL) foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos e utilizou-se o sobrenadante para determinação de açúcar e nitrogênio amoniacal residuais e ácidos cítrico e isocítrico produzidos, e o precipitado para determinação da massa seca e viabilidade celular. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados encontram-se descritos no Apêndice B.

3.3.1. Determinação de açúcares redutores

Para a determinação da glicose residual na fermentação utilizou-se o método enzimático glicose-oxidase (*kit* de glicose da marca Laborlab S/A).

3.3.1.1. Preparo do reagente

O reagente foi obtido pela diluição em água deionizada de três soluções - reativo enzimático (enzimas glicose-oxidase e peroxidase), reativo de cor 1 (4 aminofenazona e tampão tris) e reativo de cor 2 (fenol) - nas proporções indicadas no catálogo. Este reagente é estável por 1 mês, quando refrigerado e acondicionado em frasco âmbar.

3.3.1.2. Preparo da curva padrão

A relação entre a concentração de glicose e a densidade ótica é linear até concentração de $4,5 \text{ gL}^{-1}$, portanto as concentrações de glicose para preparo da curva padrão foram inferiores a esse valores.

Adicionou-se 5 mL de reativo de trabalho a tubos de ensaio contendo 50 μL de soluções de glicose em concentrações de 0,36 a $1,8 \text{ gL}^{-1}$. Preparou-se ainda, um branco com 5 mL do reagente de trabalho sem adição de glicose para calibrar o aparelho em absorbância. Os tubos foram incubados por 10 minutos em banho-

maria a 37°C, e em seguida fez-se leitura em espectrofotômetro a 505 nm. A cor é estável por 60 minutos.

Obteve-se uma curva padrão para cada reativo de trabalho preparado. As equações que correlacionam a concentração de glicose (gL^{-1}) e densidade ótica utilizadas para determinar o consumo de açúcar nas fermentações são apresentadas no Apêndice A.

3.3.1.3. Preparo das amostras

Após efetuada as diluições necessárias, de modo que a concentração final estivesse dentro da faixa utilizada na construção da curva padrão (0,36 a $1,8 \text{ gL}^{-1}$), colocou-se em um tubo de ensaio 50 μL de amostra adicionando-se 5 mL de reativo padrão. Para cada amostra foi feito um branco com 5 mL do reagente de trabalho para calibrar o aparelho em absorbância. Os tubos foram incubados por 10 minutos em banho-maria a 37° C, e em seguida foi feita a leitura a 505 nm.

A concentração de glicose em cada amostra foi determinada a partir da equação que relaciona a concentração de glicose *versus* densidade ótica obtida pela construção da curva padrão.

3.3.1.4. Interferentes

Os detergentes, metais pesados e cianetos são inibidores enzimáticos, sendo necessária uma perfeita limpeza da vidraria utilizada. A preparação do reativo de trabalho requer água deionizada ou destilada recentemente. O nível de água no banho maria deve ser superior aos dos tubos de ensaio que contém as reações, sendo que a temperatura e o tempo de reação não são críticos podendo variar entre $37^\circ\text{C} \pm 2$ e 10 a 12 minutos.

3.3.2. Determinação de nitrogênio

Para a determinação da amônia residual na fermentação utilizou-se o método enzimático colorimétrico (*kit* nitrogênio da marca Labtest) baseado na hidrólise da uréia a íons amônia e CO_2 pela enzima urease. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação da cor é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

No meio de fermentação é adicionado cloreto de amônio, que em solução está presente na forma de íons amônia, não sendo portanto, necessária a adição da enzima urease.

3.3.2.1. Preparo dos reagentes

Para o preparo da solução tampão diluiu-se o conteúdo do reagente tampão (composto por tampão fosfato 300 mmolL^{-1} , salicilato de sódio 300 mmolL^{-1} , nitroprussiato de sódio $17,5 \text{ mmolL}^{-1}$, estabilizadores e preservativos) à 400 mL de água destilada. A solução é estável por 12 meses quando conservada em frasco âmbar entre 2 e 8°C .

O oxidante de uso foi preparado pela mistura do reagente oxidante (hidróxido de sódio $3,5 \text{ mmolL}^{-1}$, hipoclorito de sódio 180 mmolL^{-1} , estabilizadores e preservativos) a 475 mL de água destilada. A estabilidade da solução é de 12 meses em frasco plástico, entre 2 e 8°C .

A solução de urease tamponada é preparada pela adição de 1,0 mL de urease (tampão fosfato 10 mmolL^{-1} , EDTA 6 mmolL^{-1} e urease 268 kUL^{-1}) a 20 mL da solução tampão. Entretanto, como descrito acima, não é necessário a adição desta solução, mas do tampão sem urease para garantir o pH alcalino. A solução é estável por 21 dias em frasco âmbar mantido entre 2 e 8°C .

3.3.2.2. Preparo da curva padrão

Soluções de cloreto de amônio nas concentrações de 0,2 a 2,0 gL⁻¹ foram preparadas diluindo-as em solução de cloreto de sódio 0,85 %. Adicionou-se 2 mL da solução tampão em tubos de ensaio contendo 20 µL das soluções de cloreto de amônia. Utilizou-se ainda, um branco com 2 mL da solução tampão para calibrar o aparelho em absorbância. Os tubos foram incubados por 5 minutos em banho-maria a 37°C.

Retirou-se as amostras do banho-maria, adicionando-se em cada tubo 2 mL do oxidante de uso, sendo novamente incubados durante 5 minutos a 37°C. Em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro a 600 nm. A cor é estável por 120 minutos.

Obteve-se uma curva padrão para cada reagente preparado, correlacionando os valores de absorbância com a concentração de nitrogênio presente na solução de cloreto de amônio. Estes valores foram obtidos, multiplicando-se os valores das concentrações das soluções de cloreto de amônia por 0,262, correspondente a porcentagem de nitrogênio presente na molécula de NH₄Cl.

As equações utilizadas para determinação do consumo de nitrogênio nos ensaio são apresentadas no Apêndice A.

3.3.2.3. Preparo das amostras

Colocou-se em um tubo de ensaio 20 µL de amostra adicionando-se 2 mL da solução tampão, após efetuada as diluições necessárias em solução de cloreto de sódio 0,85 %, de modo que a concentração final de cloreto de amônio na amostra estivesse dentro da faixa utilizada na construção da curva padrão (0,2 a 2,0 gL⁻¹). Para cada amostra foi feito um branco com 2 mL da solução tampão para calibrar o aparelho em absorbância. Os tubos foram incubados por 5 minutos em banho-maria a 37°C.

Retirou-se as amostras do banho-maria, adicionando-se em cada tubo 2 mL do oxidante de uso, sendo novamente incubados durante 5 minutos a 37°C. Em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro a 600 nm.

3.3.2.4. *Interferentes*

A preparação dos reagentes requer água livre de amônia, devendo ter uma resistividade maior ou igual a 2 megaohms ou uma condutividade menor ou igual a 0,5 microsiemens e concentração de silicatos inferiores a 0,1 mgL⁻¹.

3.3.3. **Determinação de ácidos cítrico e isocítrico**

Para determinação dos ácidos cítrico e isocítrico produzido na fermentação foi utilizada a metodologia de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Utilizou-se um cromatógrafo modelo Varian 9010, constituído de um sistema de bombeamento de solvente ternário e válvula injetora Rheodyne modelo 7010-067, com alça de amostragem de 100 µL de capacidade. Empregou-se um detector de índice de refração Varian modelo RI - 4. O sistema estava acoplado ao software Millennium Chromatography Manager (Waters), para aquisição e processamento de dados e geração de relatórios.

A identificação dos compostos da fermentação foi feita no cromatógrafo a líquido com base nos tempos de retenção na coluna e no perfil dos espectros de absorção no refratômetro através da comparação com os padrões. Empregou-se para tanto uma coluna cromatográfica de fase normal, Bondesil NH₂ (Analytichem International), tamanho 4,6 mm x 52 cm, partículas esféricas de 5 µm. A coluna foi mantida em forno termostático Spark Holland 99.

3.3.3.1. Fase móvel

Como fase móvel empregou-se solução ácida constituída de 0,05% de ácido acético (Merk p.a.), ajustando-se o pH para 2,5 com ácido sulfúrico (Merk p.a.). A água empregada no preparo das soluções foi obtida através de sistema de purificação e filtração Millipore.

O eluente foi filtrado em sistema Millipore de filtração à vácuo, utilizando membranas de 0,5 μm (millipore) e degaseificado em ultrassom Eurosonic modelo SX durante 40 minutos anteriormente a utilização.

3.3.3.2. Preparo da curva padrão

Foram empregados padrões comerciais de ácidos cítrico e isocítrico (Sigma Chemical Co.) e de glicose (Merk p.a.) para construção da curva padrão.

Preparou-se soluções dos padrões para construção da curva de calibração nas concentrações de 0,06 a 0,2 gL^{-1} para quantificação de ácido cítrico e 0,4 a 1,4 gL^{-1} para quantificação de ácido isocítrico e glicose. As soluções foram preparadas diluindo-se os padrões de ácido cítrico, ácido isocítrico e glicose no eluente e tiveram o pH ajustado para 2,5 com ácido sulfúrico. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 μm e em seguida injetadas (90 μL), em duplicata, no cromatógrafo.

A coluna foi mantida em forno termostático a 30°C, e os compostos foram eluídos desta pela passagem da fase móvel. Obteve-se o perfil das curvas, as equações correspondentes e os coeficientes de correlação através do software Millenium. As curvas padrões para quantificação de ácido cítrico e ácido isocítrico estão apresentadas no Apêndice A.

3.3.3.3. Preparo das amostras

As amostras foram diluídas no eluente de modo que a concentração final estivesse dentro da faixa utilizada na construção da curva padrão e tiveram o pH ajustado para 2,5 com ácido sulfúrico. Em seguida foram filtradas em membrana de

0,45 μm (Millipore). Alguns cromatogramas das amostras das fermentações encontram-se ilustrados no Apêndice C.

3.3.3.4. Injeção das amostras no sistema HPLC

As amostras foram injetadas em coluna Bondesil NH_2 nas seguintes condições de operação:

- temperatura ambiente: 22-24°C
- temperatura do forno: 30°C
- temperatura do índice de refração: 40°C
- volume de injeção: 90 μL
- fluxo do eluente: 0,3 mLmin^{-1}

3.3.3.5. Identificação e Quantificação das Amostras

As amostras foram identificadas, integradas e quantificadas utilizando um software Millennium de aquisição de dados, tendo como base a curva padrão do item 3.3.3.2.

3.3.4. Determinação da massa seca (MS) produzida

Na determinação da massa celular produzida na fermentação, foi adotado o método indireto (curvas que correlacionam densidade ótica *versus* massa celular).

3.3.4.1. Preparo da curva padrão

A fermentação foi conduzida em 2 *erlenmeyers* de 1000mL com 200mL de meio de pré fermentação estéril, conforme descrito no item 3.2.3, a 27°C, 200 rpm, por 48 horas. Após juntar o conteúdo dos dois *erlenmeyers*, pesou-se 250g destes meios e centrifugou-se por 10 minutos, a 10000 g em tubos de 250mL.

As células foram ressuspensas em 100mL de água destilada e filtradas a vácuo, utilizando o filtro Millipore (1,2 μm) previamente pesado e seco (P_1). As amostras foram secas numa estufa a 100°C até que o peso permanecesse constante (P_2). O valor da massa seca foi calculado pela diferença de peso ($P_1 - P_2$), convertendo o valor final em g de massa seca/250g de caldo fermentado (porcentagem peso/peso).

Centrifugou-se 50mL deste caldo fermentado a 10 000 g, por 10 minutos. Após a lavagem das células, estas foram ressuspensas em 50mL de água destilada e, a partir desta solução, foram feitas diluições convenientes para a construção da curva de calibração. Fez-se a leitura das amostras em espectrofotômetro a 600nm.

A partir da massa seca total determinou-se indiretamente as concentrações de massa seca para cada diluição e construiu-se a curva padrão, apresentada no Apêndice A, que relaciona a concentração de massa seca em gL^{-1} versus densidade ótica.

3.3.4.2. Preparo das amostras

As células precipitadas na centrifugação foram ressuspensas em 5mL de água destilada e, a partir desta solução, foi feita uma diluição para que a leitura da absorbância estivesse dentro da faixa da curva de calibração. Leu-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 600nm. A partir da equação da curva de calibração determinou-se a concentração de massa seca de cada amostra.

3.3.5. Determinação da viabilidade celular das leveduras

Para a determinação da viabilidade celular das leveduras foi utilizado o método de coloração por azul de metileno segundo LEE *et al.* (1981).

As células foram ressuspensas em 5 mL de água e, a partir desta solução, preparou-se uma suspensão de levedura adequadamente diluída (amostra). A

diluição da amostra deve ser tal que cerca de setenta células de levedura sejam encontradas por quadrículo da câmara de Neubauer. Misturou-se 0,1 mL da amostra com 0,9 mL da solução corante (azul de metileno).

A amostra foi transferida para a câmara de Neubauer determinando-se a porcentagem de células viáveis, através da contagem das células incolores e das coloridas em azul em microscópio de campo claro utilizando-se a objetiva de imersão (40 x). As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) apresentam-se coloridas de azul.

Foram escolhidos os quadrículos dos extremos superiores, inferiores e central para serem contados (total de cinco quadrículos contados). A porcentagem de células viáveis (IV%) foi calculada pela seguinte equação:

$$IV(\%) = \frac{\text{numero total de celulas incolores (vivas)}}{\text{numero total de celulas incolores} + \text{numero total de celulas coloridas}} \times 100(\%)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resultados dos testes preliminares

É relevante relatar os problemas surgidos no início deste trabalho, pois o estudo da produção de ácido cítrico é uma linha de pesquisa nova no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos sendo este o primeiro trabalho neste tema. Assim, optou-se inicialmente pela realização de testes preliminares em “shaker”, devido a possibilidade de realização de vários experimentos ao mesmo tempo, visando determinar as condições de fermentação e composição do meio de cultura para a produção de ácido cítrico por leveduras.

Entretanto, com a realização de alguns ensaios em shaker para determinação da metodologia de análise e conhecimento do comportamento do microrganismo verificou-se uma série de dificuldades, descritas a seguir, que conduziram a alterações na metodologia inicialmente proposta.

Nestes testes preliminares estudou-se uma forma de controle de pH, uma variável importante na fermentação pois o produto do metabolismo é um ácido, e com sua excreção ocorre o abaixamento do pH do meio. Conseqüentemente a viabilidade das leveduras é afetada, acarretando o final da fermentação sem a produção de uma quantidade de ácido que tornaria o processo economicamente viável.

O controle de pH em shaker é possível, como descrito na literatura, através da utilização de um agente tamponante, como por exemplo solução de carbonato de cálcio. Assim, foram realizados ensaios variando a concentração (10 e 20g/l de carbonato de cálcio no meio de fermentação) e o agente tamponante (carbonato de cálcio, fosfato e sem adição) selecionando aquele que mantivesse por aproximadamente 10 dias o pH ao redor de 5,5.

Com a utilização de tampão fosfato observou-se queda no pH de 5,7 para 3,47 após 18 horas de fermentação e sem adição de tampão o abaixamento do pH ocorreu após 14 horas. Verificou-se portanto que este tamponante não é adequado para esta função.

Nos experimentos cujo controle foi obtido através da adição de carbonato de cálcio, e ajustando-se o pH para 5,5 através da adição de ácido clorídrico, o pH manteve-se estável por aproximadamente 30 horas, período em que havia excesso deste. Porém, a utilização desta solução tamponante impossibilita uma análise sistemática uma vez que não permite que todos os ensaios estejam sob as mesmas condições de pH e concentração de precipitado de carbonato. Além disso, foram observadas interferências provocadas pela presença desta solução na determinação de ácido cítrico (método de titulação), de açúcares redutores (método de DNS), massa seca (densidade ótica) devido a presença de precipitado do excesso de carbonato e viabilidade celular (método de LEE), não sendo, portanto, viável sua aplicação.

Assim, devido a dificuldade em se utilizar shaker para condução das fermentações optou-se pela utilização de fermentador para um melhor controle de pH e oxigênio dissolvido, outra variável importante no processo.

Efetou-se ainda modificações nas metodologias de análises. A metodologia para determinação de açúcar residual foi alterada para método enzimático, devido a interferência do citrato no método de DNS.

Para a quantificação de ácidos cítrico e isocítrico optou-se pela utilização de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), por ser uma técnica muito mais confiável, fornecendo resultados mais precisos, e quantificando simultaneamente o ácido cítrico e o ácido isocítrico.

4.2. Cinética das Fermentações

Na fermentação de ácido cítrico a formação do produto está relacionada à utilização do carboidrato suprindo energia para crescimento, mas a associação é menos direta; a formação do produto não é estequiometricamente relacionada a utilização do carboidrato durante todo o tempo da fermentação. O crescimento do microrganismo (tropofase) é separado no tempo da formação do produto (idiofase), embora o mesmo carboidrato esteja suprindo a energia para o crescimento e o carbono para a formação do produto. A absorção do carboidrato é rápida em duas fases do ciclo de fermentação, uma correspondente ao período de máximo crescimento e a outra ao período de máxima formação de produto. No início da fermentação, o carboidrato é utilizado para crescimento até que outros nutrientes sejam esgotados; sendo depois metabolizado, de modo que a quantidade de ácido cítrico que se acumula está relacionada à quantidade de carboidrato utilizado (AIBA *et al.*, 1971).

Assim, neste trabalho estas duas fases foram conduzidas em meio contendo diferentes concentrações de carbono e nitrogênio para verificar o efeito inibitório na produção de ácido cítrico.

Os microrganismos foram inoculados, após uma pré-fermentação de 24 horas, em fermentadores contendo o meio de crescimento. Esta fase foi realizada variando-se a concentração de nitrogênio entre 5,4 e 2,6 gL⁻¹ de NH₄Cl, mantendo-se constante a concentração de glicose em 30 gL⁻¹. A fase de produção foi iniciada após o esgotamento da glicose da fase de crescimento através da adição do meio de produção contendo 150 gL⁻¹ de glicose, com concentrações de nitrogênio variando entre 0,1 e 0,3 gL⁻¹ de NH₄Cl. A composição completa destes meios está apresentada no item 3.2.4.

Durante o período da fermentação foram determinados as concentrações de glicose, de massa seca, de nitrogênio, de ácido cítrico, de ácido isocítrico e viabilidade celular, cujos valores estão apresentados no Apêndice B. As cinéticas

para os ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental encontram-se relacionadas nas Figuras 4.1 a 4.7.

Analisando as cinéticas de crescimento microbiano e consumo de nitrogênio nos sete ensaios realizados, pode-se verificar um comportamento semelhante nas condições dos ensaios 2, 4 a 7 (Figuras 4.2, 4.4 a 4.7, respectivamente). Observa-se um crescimento exponencial nas primeiras 50 horas, onde ocorre o esgotamento do nitrogênio e da glicose. Nestas condições de experimentos a concentração de nitrogênio no meio de crescimento correspondia ao nível superior do planejamento ($5,4 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl nos ensaios 2 e 4, e $4,0 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl nos ensaios 5,6 e 7).

Nos ensaios 1 e 3, Figuras 4.1 e 4.3 respectivamente, a concentração de nitrogênio no meio de crescimento está na condição inferior do planejamento ($2,6 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl). O consumo de nitrogênio se dá também nas primeiras 50 horas, e após o seu esgotamento não ocorre consumo significativo de glicose. Portanto, o esgotamento da glicose em menor tempo ocorre sob maiores concentrações de nitrogênio, verificando-se que na fase de crescimento a glicose é consumida somente na presença de nitrogênio.

Através da modelagem da cinética da tropofase MORESI (1994) obteve resultados similares ao verificar que a levedura *Candida lipolytica* ATCC 20346 tende a crescer exponencialmente durante a fase de crescimento enquanto a fonte de nitrogênio encontra-se presente no meio, entrando na fase de declínio quando a taxa carbono/nitrogênio tende a zero.

Como descrito na metodologia (item 3.2.4) o meio de produção era adicionado quando a concentração de glicose na fase de crescimento encontrava-se abaixo de 4 gL^{-1} . Nesta etapa, o aumento na concentração de glicose, e conseqüentemente o aumento drástico da razão C/N de 18 : 1 para 2300 : 1, favorece a excreção de ácido cítrico em detrimento a formação de biomassa. No entanto, em todos os ensaios com exceção do 1 e 3, algum crescimento celular ainda foi observado no início da produção de ácido cítrico entre 96 e 120 horas, devido ao residual de nitrogênio presente no meio de produção.

No ensaio 1 observa-se o crescimento celular durante a fase de produção, e não a morte celular como no ensaio 3, pois uma concentração maior de nitrogênio ($0,5 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) é adicionada ao meio do ensaio 1. No final, menor quantidade de ácido foi excretado nesta condição. No ensaio 3 ($0,1 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl), onde verifica-se uma estabilidade no crescimento, após a fase de declínio celular, foi excretado maior quantidade de ácido cítrico quando comparado com o ensaio 1. Conclui-se portanto que a produção de ácido cítrico ocorre sob condições de crescimento estacionário, concordando com Kono & Asai (1966) os quais propuseram um modelo cinético de formação de ácido cítrico por fermentação como sendo associado apenas à atividade das células que não se reproduzem.

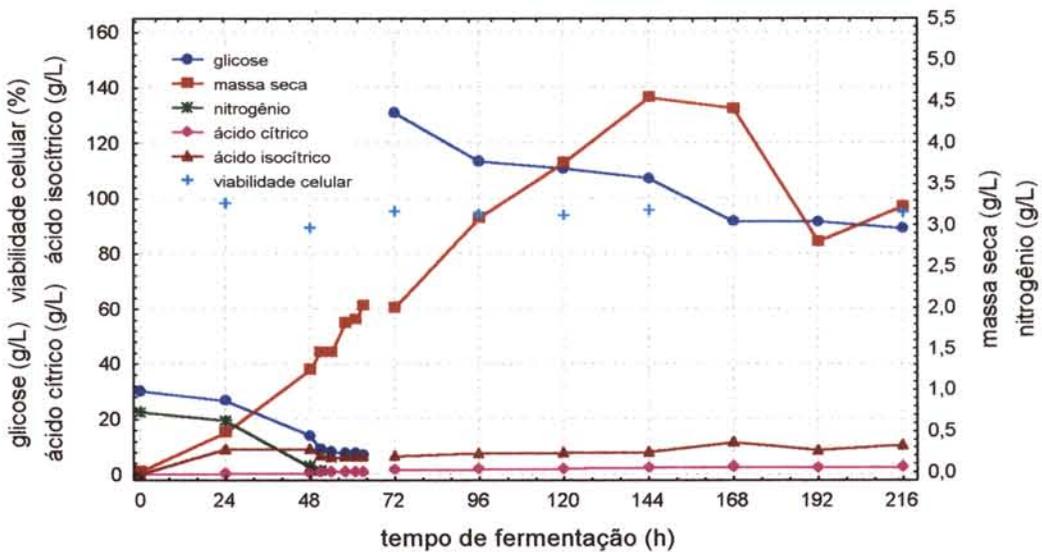


FIGURA 4.1. Cinéticas de crescimento, de produção de ácidos cítrico e isocítrico, de consumo de glicose e de nitrogênio, e de viabilidade celular nas fases de crescimento (30 gL^{-1} de glicose e $2,6 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e de produção (150 gL^{-1} de glicose e $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) (Ensaio 1).

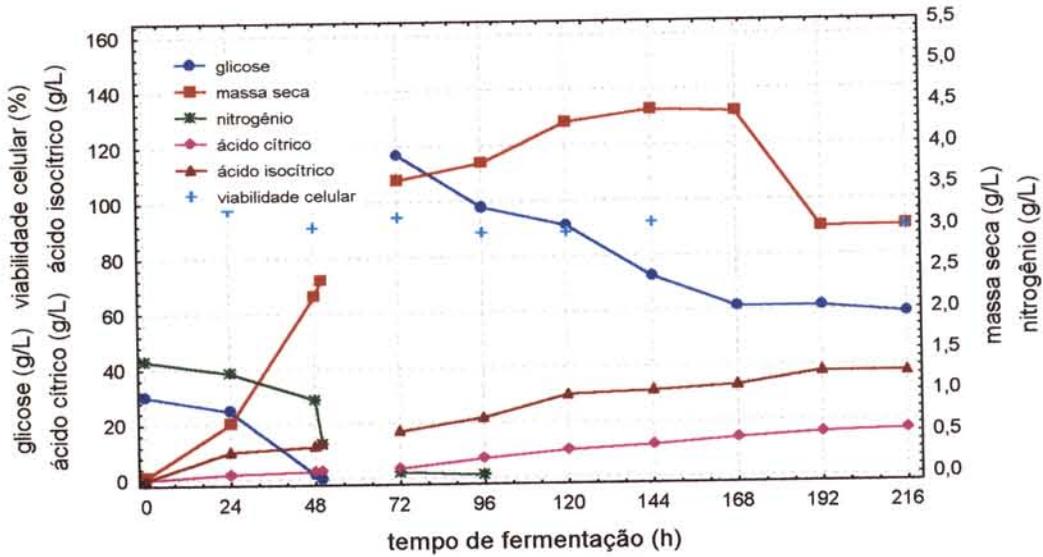


FIGURA 4.2. Cinéticas de crescimento, de produção de ácidos cítrico e isocítrico, de consumo de glicose e de nitrogênio, e de viabilidade celular nas fases de crescimento (30 gL^{-1} de glicose e $5,4 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e de produção (150 gL^{-1} de glicose e $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) (Ensaio 2).

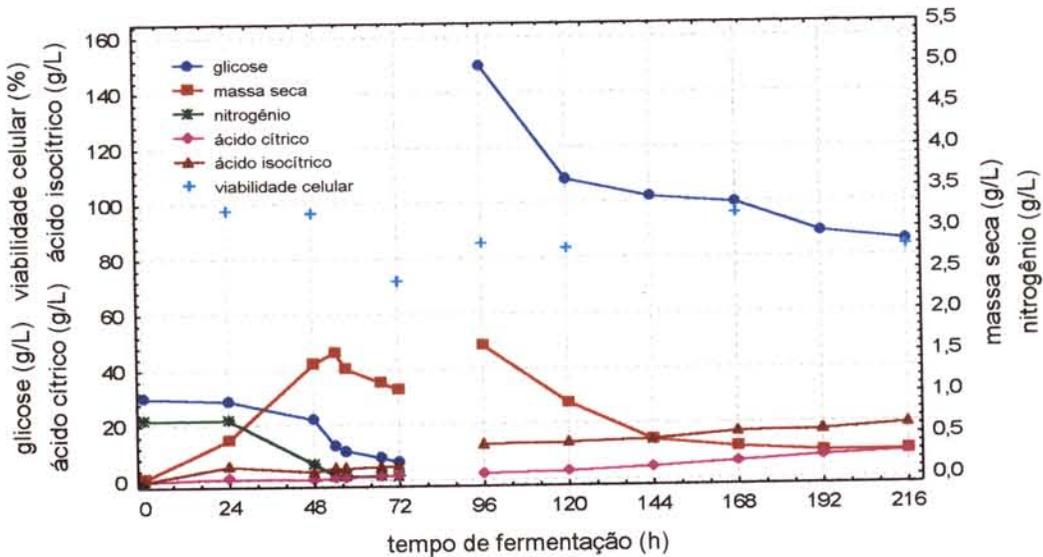


FIGURA 4.3. Cinéticas de crescimento, de produção de ácidos cítrico e isocítrico, de consumo de glicose e de nitrogênio, e de viabilidade celular nas fases de crescimento (30 gL^{-1} de glicose e $2,6 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e de produção (150 gL^{-1} de glicose e $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) (Ensaio 3).

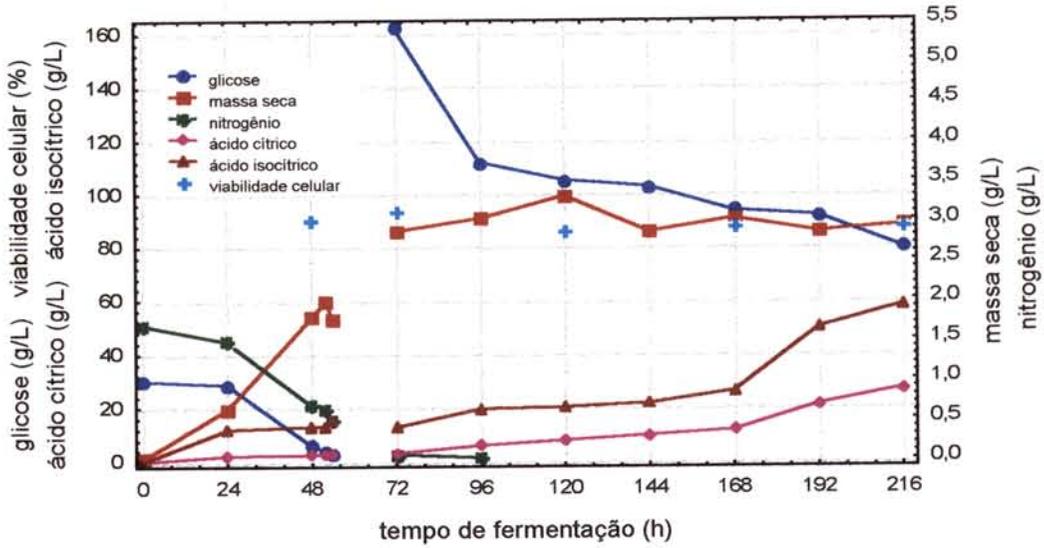


FIGURA 4.4. Cinéticas de crescimento, de produção de ácidos cítrico e isocítrico, de consumo de glicose e de nitrogênio, e de viabilidade celular nas fases de crescimento (30 gL^{-1} de glicose e $5,4 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e de produção (150 gL^{-1} de glicose e $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) (Ensaio 4).

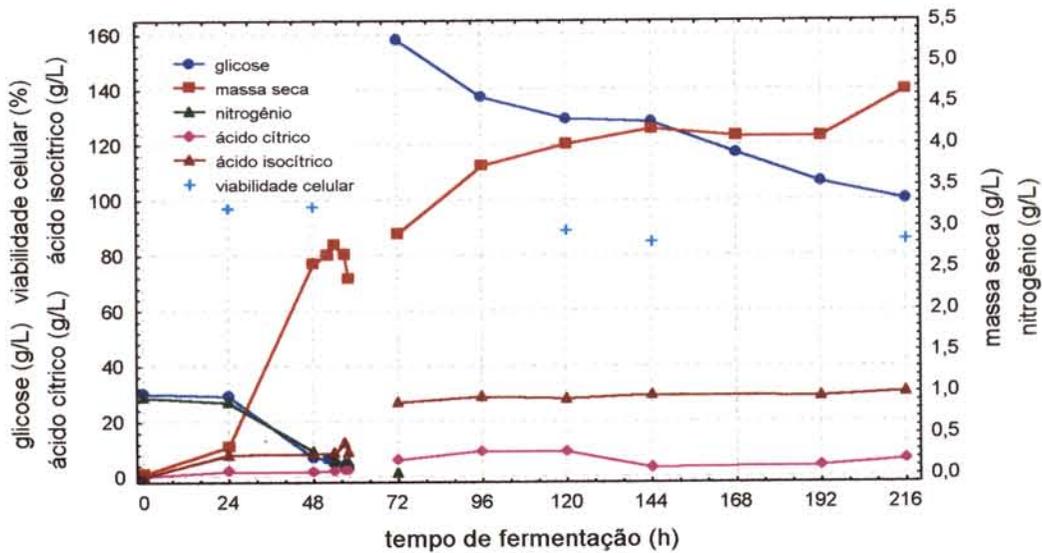


FIGURA 4.5. Cinéticas de crescimento, de produção de ácidos cítrico e isocítrico, de consumo de glicose e de nitrogênio, e viabilidade celular nas fases de crescimento (30 gL^{-1} de glicose e $4,0 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e de produção (150 gL^{-1} de glicose e $0,3 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) (Ensaio 5).

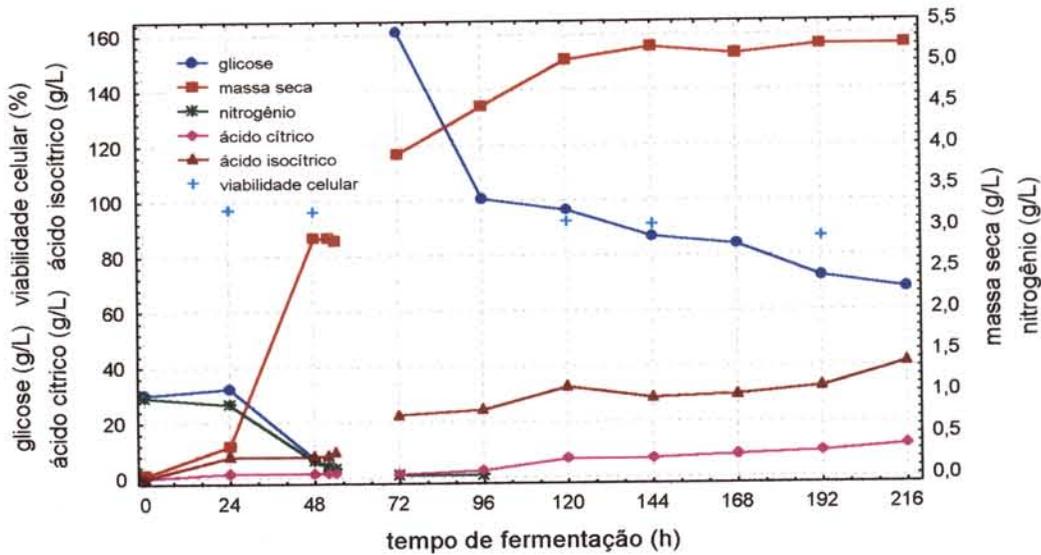


FIGURA 4.6. Cinéticas de crescimento, de produção de ácidos cítrico e isocítrico, de consumo de glicose e de nitrogênio, e viabilidade celular nas fases de crescimento (30 gL^{-1} de glicose e $4,0 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e de produção (150 gL^{-1} de glicose e $0,3 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) (Ensaio 6).

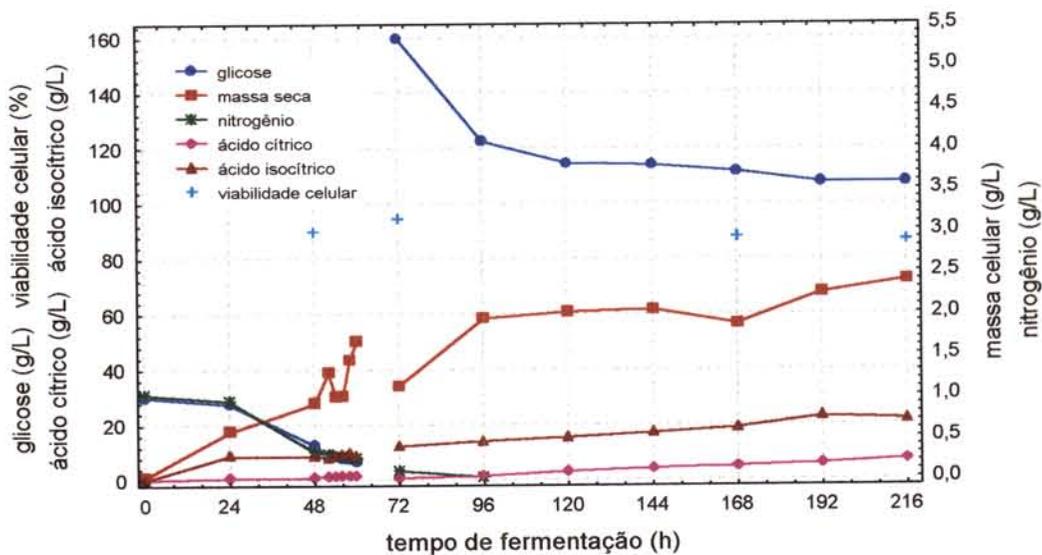


FIGURA 4.7. Cinéticas de crescimento, de produção de ácidos cítrico e isocítrico, de consumo de glicose e de nitrogênio, e viabilidade celular nas fases de crescimento (30 gL^{-1} de glicose e $4,0 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e de produção (150 gL^{-1} de glicose e $0,3 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) (Ensaio 7).

Nos trabalhos encontrados na literatura os autores relatam que a produção de ácido cítrico ocorre somente após a interrupção do crescimento devido a exaustão do nitrogênio do meio. Apesar do meio de crescimento ter sido formulado com a finalidade de propiciar o crescimento celular sem a excreção de ácido, pela análise das cinéticas apresentadas nas Figuras 4.1 à 4.7 verifica-se uma pequena formação de produto nesta fase, ainda na presença de nitrogênio. Assim, a conversão de glicose em ácidos cítrico e isocítrico pode ter sido um dos fatores responsáveis pelo baixo rendimento celular, uma vez que a glicose não foi utilizada somente para crescimento e manutenção celular. Consequentemente obteve-se baixo rendimento de ácido cítrico na fase de produção.

Os baixos rendimentos de ácido cítrico e massa seca podem também ser devido a utilização de uma fonte de nitrogênio inadequada. CHEN (1993) verificou para *Aspergillus foetidus* CCRC 30 206 crescendo em glicose, que as menores concentrações de ácido cítrico ($1,20 \text{ gL}^{-1}$) e massa celular ($4,44 \text{ gL}^{-1}$) foram obtidos em meio contendo $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl como fonte de nitrogênio. Resultados superiores – $6,81 \text{ gL}^{-1}$ de ácido cítrico e $10,61 \text{ gL}^{-1}$ de massa seca e, $10,2581 \text{ gL}^{-1}$ de ácido cítrico e $12,10 \text{ gL}^{-1}$ de massa seca – foram conseguidos utilizando-se a mesma concentração de nitrato de amônia e uréia, respectivamente.

Durante a fase de produção verifica-se que com o aumento na acumulação de citrato aproximadamente após 120 horas de fermentação, a taxa de consumo de glicose diminui. Segundo AIBA & MATSUOKA (1978) este fato pode ser explicado pelo controle de retroalimentação da glicólise pelo citrato (citado por RÖHR *et al.*, 1983).

Segundo RANE & SIMS (1993) em fermentações efetuadas sob baixa concentração de glicose espera-se que uma maior quantidade de glicose consumida possa ser utilizada para manutenção celular, obtendo-se baixos rendimentos de ácido cítrico. Assim, os baixos rendimentos de ácido cítrico obtidos nesses ensaios não podem ser associados a utilização de baixa concentração de glicose no meio de produção, uma vez que a concentração final de glicose foi muito

alta, provavelmente devido a inibição pelo substrato com o agravante da pequena massa celular obtida na fase de crescimento.

4.3. Viabilidade celular e morfologia

A viabilidade celular foi monitorada durante as fermentações para correlacionar os efeitos da limitação de nitrogênio na produção de ácido cítrico.

A análise das Figuras 4.1 a 4.7 indicam uma diminuição na viabilidade celular com o esgotamento do nitrogênio do meio de crescimento. Entretanto, com a introdução do meio de produção ao fermentador neste período de fermentação, e conseqüentemente a adição de nova fonte de nitrogênio, a viabilidade volta a aumentar, permanecendo constante até o final da fermentação. Nos ensaios 1 e 3 (Figuras 4.1 e 4.7) os microrganismos permaneceram sob condições de deficiência de nitrogênio durante um tempo maior, enquanto esperava-se o esgotamento da glicose do meio de crescimento para adição do meio de produção, ocasionando um decréscimo maior na viabilidade, correspondente a 10 e 25% respectivamente, em relação aos demais ensaios.

Os resultados demonstram ainda, que apesar do decréscimo na viabilidade ocorrido nos ensaios a concentração de ácido cítrico continua aumentando indicando que esta queda inicial não afeta a produção deste ácido. Resultados semelhantes demonstrando que o decréscimo na viabilidade não influencia a excreção de ácido cítrico foram obtidos por RANE & SIMS (1995) em fermentações com reciclo de células.

Verificou-se, através de análise microscópica, modificações na morfologia celular como uma função do tempo nas fermentações. Durante a fase de crescimento, a maioria das células encontram-se em reprodução assexuada através do processo de gemulação, com a forma variando de esférica a elipsoidal. No início da fase de produção algumas gêmulas ainda foram observadas, entretanto com o decorrer da fermentação a reprodução cessou, e a forma de algumas células foram

tornando-se alongadas e finalmente filamentosas, enquanto outras permaneceram esféricas, mas com tamanho bastante inferior ao apresentado na fase de crescimento. Estas observações são consistentes com as descritas por KOCKOVA-KRATOCHVILOVA (1990) para leveduras crescendo sob condições deficientes em nutrientes.

4.4. Resultados do Planejamento Fatorial

Neste item serão discutidos os resultados obtidos na realização do Planejamento Experimental, apresentados na Tabela 4.1. Os valores de rendimento foram calculados em relação a concentração de glicose consumida durante as fermentações para o tempo de fermentação de 216 horas.

Pode-se verificar na Tabela 4.1 que ao variar a concentração de nitrogênio de 2,6 para 5,4 gL⁻¹ de NH₄Cl no meio de crescimento e de 0,5 para 0,1 gL⁻¹ de NH₄Cl no meio de produção (condição do ensaio 1 em relação ao ensaio 4), os rendimentos de ácido cítrico e de ácido isocítrico aumentaram em 8,5 (0,032 a 0,271 gg⁻¹) e 5,0 (0,119 a 0,582 gg⁻¹) vezes, respectivamente, e a produtividade de ácido cítrico em 9,7 (0,013 a 0,126 gL⁻¹h⁻¹) vezes. Observa-se então que a concentração de nitrogênio exerceu uma influência maior na produção de ácido cítrico em relação ao ácido isocítrico.

TABELA 4.1. Resultados obtidos para o Planejamento Experimental na produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095.

Ensaio	Glicose/NH ₄ Cl meio de crescimento	Glicose/NH ₄ Cl meio de produção	Rendimento ácido cítrico (gg ⁻¹)	Rendimento ácido isocítrico (gg ⁻¹)	Produtividade ácido cítrico (gL ⁻¹ h ⁻¹)
1	- 1 (30/2,6)	- 1 (150/0,5)	0,032	0,119	0,013
2	+ 1 (30/5,4)	- 1 (150/0,5)	0,138	0,312	0,077
3	- 1 (30/2,6)	+ 1 (150/0,1)	0,101	0,206	0,044
4	+ 1 (30/5,4)	+ 1 (150/0,1)	0,271	0,582	0,126
5	0 (30/4,0)	0 (150/0,3)	0,080	0,385	0,030
6	0 (30/4,0)	0 (150/0,3)	0,105	0,370	0,054
7	0 (30/4,0)	0 (150/0,3)	0,103	0,304	0,034

Concentrações de nitrogênio são obtidas multiplicando as concentração de NH₄Cl por 0,262. Valores reais (concentrações de glicose/NH₄Cl em gL⁻¹) entre parênteses.

Para melhor visualização as Figuras 4.8 e 4.9 apresentam os resultados de ácido cítrico e de ácido isocítrico, permitindo verificar que a melhor condição de fermentação foi a realizada no ensaio 4, com o meio contendo 5,4 gL⁻¹ de NH₄Cl na fase de crescimento e 0,1 gL⁻¹ de NH₄Cl na fase de produção.

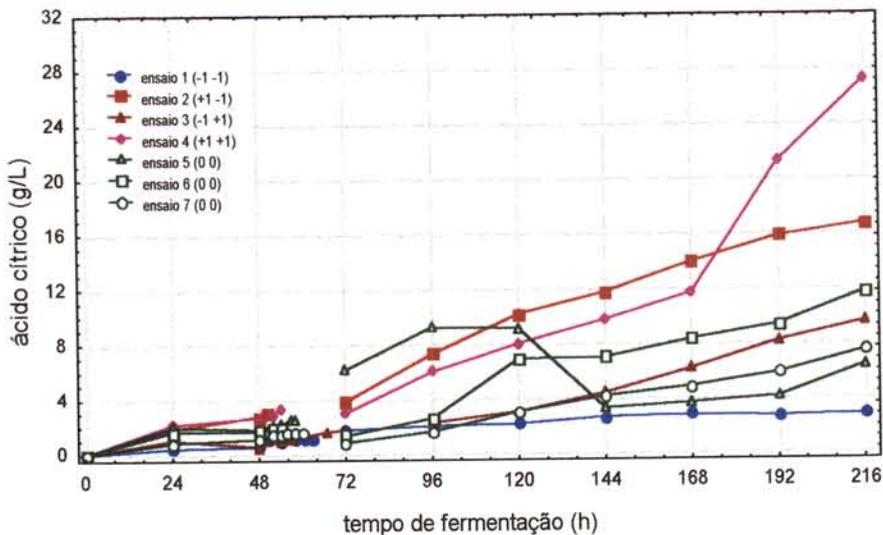


FIGURA 4.8. Produção de ácido cítrico nas diferentes condições do Planejamento Experimental.

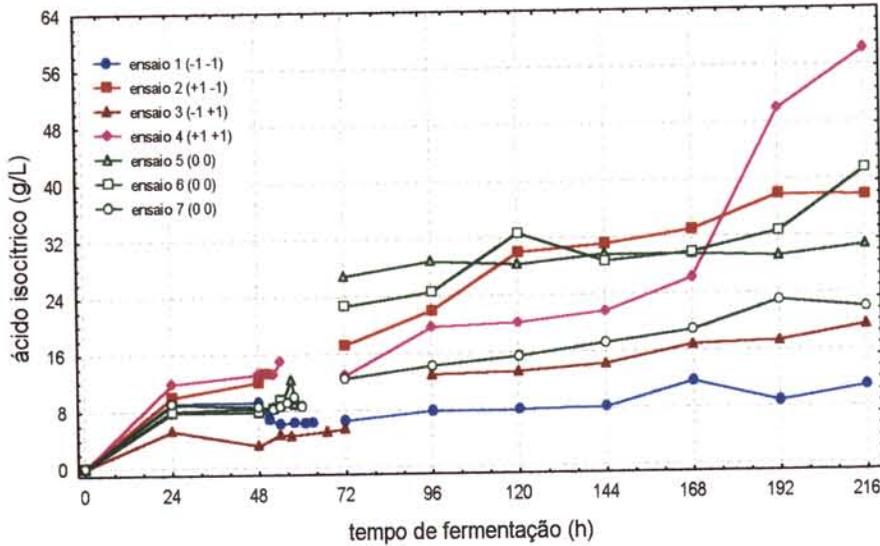


FIGURA 4.9. Produção de ácido isocítrico nas diferentes condições do Planejamento Experimental.

Os resultados obtidos (Tabela 4.1, Figuras 4.8 e 4.9) indicam que a excreção de ácido isocítrico foi superior ao ácido cítrico, com a taxa de ácido isocítrico : ácido cítrico variando aproximadamente de 2 : 1 à 5 : 1. Os nutrientes adicionados ao meio não foram suficientes para interromper o ciclo do ácido tricarbóxico no ácido cítrico, como mostra a Figura 4.10. Em trabalhos posteriores sugere-se o estudo da influência da concentração de fósforo, monofluoroacetato e tiamina visando minimizar a excreção de ácido isocítrico. Segundo TABUCHI *et al.* (1973) a deficiência de tiamina, quando as fermentações são conduzidas em meio contendo glicose, causa um declínio na atividade de isocitrato desidrogenase e aumento no acúmulo de citrato em relação a isocitrato (citado por YOKOYA, 1992). TANI *et al.* (1990) e AKIYAMA *et al.* (1973) verificaram que a adição de monofluoroacetato no meio de fermentação proporciona um aumento na produtividade de ácido cítrico devido a inibição competitiva da aconitase pelo monofluorocitrato, derivado do monofluoroacetato.

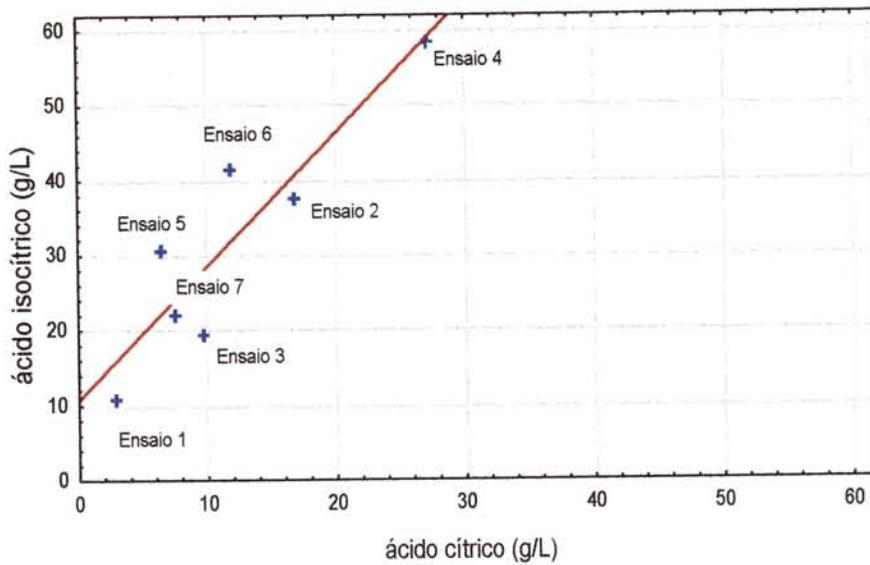


FIGURA 4.10. Concentração de ácido cítrico *versus* ácido isocítrico.

Sendo este o primeiro trabalho realizado nesta linha de pesquisa no Laboratório de Bioengenharia/FEA, o objetivo principal era estabelecer as condições de produção do ácido cítrico, a metodologia analítica e avaliar os efeitos principais da razão C/N no rendimento do processo, sem a pretensão de otimizar as condições do meio de cultivo e operacionais nesta primeira etapa.

A Tabela 4.2 apresenta os efeitos principais e de interação da razão C/N nas fases de crescimento e de produção nas respostas rendimento de ácido cítrico e de ácido isocítrico, e produtividade de ácido isocítrico. Observa-se que o aumento de nitrogênio do nível -1 ($2,6 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) para o +1 ($5,4 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) na fase de crescimento provoca um aumento médio de $0,1380 \text{ gg}^{-1}$ de ácido cítrico, $0,2845 \text{ gg}^{-1}$ de ácido isocítrico e $0,0731 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ na produtividade de ácido cítrico. Na fase de produção a variação do nível -1 ($0,5 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) ao +1 ($0,1 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) indica o mesmo comportamento. No entanto, é relevante salientar que neste caso a concentração de nitrogênio do nível -1 ao +1 é diminuída. Como era de se esperar pelos resultados relatados na literatura, a diminuição da concentração de nitrogênio deveria causar o aumento do ácido cítrico.

Os efeitos de interação entre as variáveis não apresentaram efeitos estatisticamente significativos, sendo desconsiderados no modelo.

TABELA 4.2. Efeitos principais e de interação calculados para o Planejamento Experimental na produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* Y 1095.

Variáveis	Rendimento ácido cítrico (gg ⁻¹)	Rendimento ácido isocítrico (gg ⁻¹)	Produtividade ácido cítrico (gL ⁻¹ h ⁻¹)
Média Global	0,1186	0,3254	0,0540
C/N _{fase de crescimento}	0,1380 (116,4%)	0,2845 (87,4%)	0,0731 (135,4%)
C/N _{fase de produção}	0,1010 (85,2%)	0,1785 (54,8%)	0,0398 (73,7%)
C/N _{crescimento} * C/N _{produção} ^(*)	0,0320 (26,98%)	0,0915 (28,11%)	0,0088 (16,29%)

Valores entre parênteses correspondem a variação média em porcentagem nas respostas em relação a média global.

(*) Efeitos estatisticamente não significativos

A partir dos resultados obtidos do planejamento experimental é possível estabelecer um modelo de 1ª ordem que descreva a tendência do processo através da análise de superfície de resposta.

As equações que relacionam o rendimento de ácido cítrico e de ácido isocítrico e produtividade de ácido cítrico em função das variáveis codificadas são:

$$\eta_{\text{ácido cítrico}} = 0,1186 + 0,0690 * (C/N)_{\text{fase de crescimento}} + 0,0505 * (C/N)_{\text{fase de produção}} \quad (4.1)$$

$$\eta_{\text{ácido isocítrico}} = 0,3254 + 0,1422 * (C/N)_{\text{fase de crescimento}} + 0,0892 * (C/N)_{\text{fase de produção}} \quad (4.2)$$

$$P_{\text{ácido cítrico}} = 0,0540 + 0,0365 * (C/N)_{\text{fase de crescimento}} + 0,0199 * (C/N)_{\text{fase de produção}} \quad (4.3)$$

A validade dos modelos é verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.3.

TABELA 4.3. Análise da variância para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados.

Modelo	Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
η ácido cítrico						
	Regressão	0,0292	2	0,0146	14,32	6,94
	Resíduos	0,0041	4	0,0010		
	Falta ajuste	0,0037	2	0,0018		
	Erro puro	0,0004	2	0,0002		
	Total	0,0333	6			
% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 87,68$						
% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 98,84$						
Coeficiente de correlação: $R = 0,936$						
η ácido isocítrico						
	Regressão	0,1118	2	0,0559	15,12	6,94
	Resíduos	0,0148	4	0,0037		
	Falta ajuste	0,0111	2	0,0055		
	Erro puro	0,0037	2	0,0019		
	Total	0,1266	6			
% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 88,32$						
% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 97,06$						
Coeficiente de correlação: $R = 0,940$						
P ácido cítrico						
	Regressão	0,0069	2	0,0035	8,99	6,94
	Resíduos	0,0015	4	0,0004		
	Falta ajuste	0,0001	2	0,0006		
	Erro puro	0,0003	2	0,0002		
	Total	0,0085	6			
% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 81,81$						
% máxima de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{EP})/SQ_T = 96,10$						
Coeficiente de correlação: $R = 0,904$						

O valor do teste F calculado foi comparado ao valor tabelado para a distribuição F(5%) com os respectivos graus de liberdade (BARROS *et al.*, 1995). Verificou-se para o rendimento de ácido cítrico que $F(\text{regressão/resíduos}) = 14,32$ é maior que o $F_{0,95; 2; 4} = 6,94$, indicando que a regressão é significativa ao nível de 95% de confiança. Esta conclusão aplica-se também para o rendimento do ácido isocítrico e produtividade de ácido cítrico, como pode verificado pela análise do valor de F.

As figuras 11 a, b e c apresentam os valores observados (experimentais) em função dos valores previstos (modelo). Observa-se que o modelo de 1ª ordem pode prever razoavelmente o comportamento das respostas frente a variação nas variáveis estudadas.

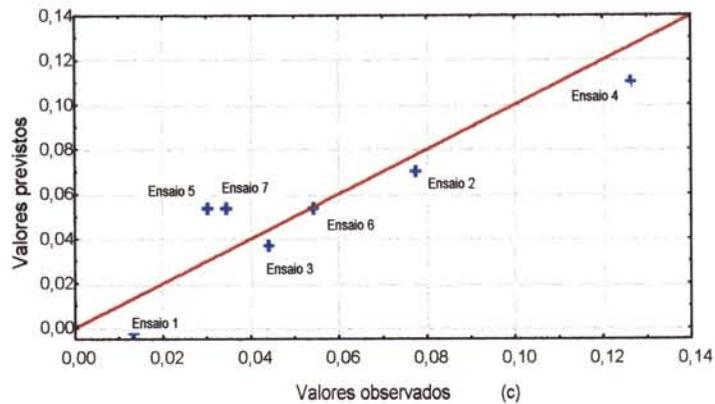
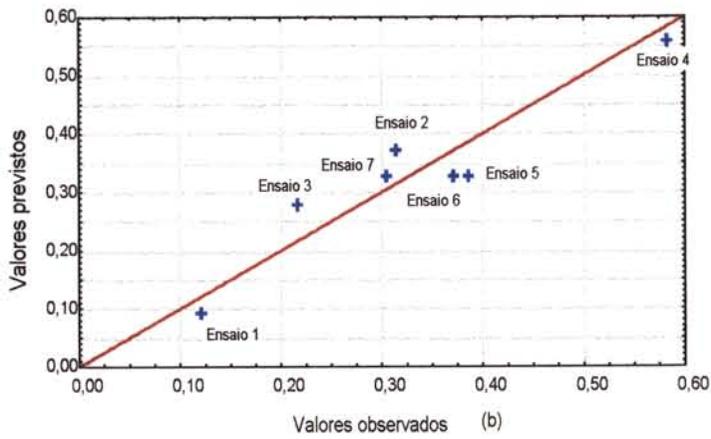
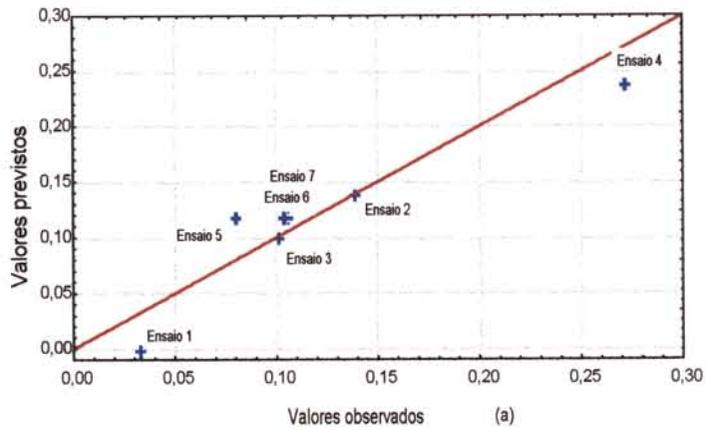


FIGURA 4.11. Valores observados *versus* Valores preditos para: (a) rendimento de ácido cítrico; (b) rendimento de ácido isocítrico e (c) produtividade de ácido cítrico.

A análise das superfícies de respostas, como mostram as Figuras 4.12 e 4.13, vem confirmar que os maiores rendimento e produtividade de ácido cítrico são obtidos à alta concentração de nitrogênio na fase de crescimento ($5,4 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e baixa concentração na fase de produção ($0,1 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl), concordando com os dados reportados na literatura que indicam a repressão catabólica exercida pelo nitrogênio na produção de ácido cítrico.

O rendimento do ácido isocítrico segue o mesmo comportamento do ácido cítrico, mas a inclinação da reta, como mostra a Figura 4.14, indica uma menor influência da relação carbono/nitrogênio na fase de produção, como verificado anteriormente pela análise dos efeitos (Tabela 4.2).

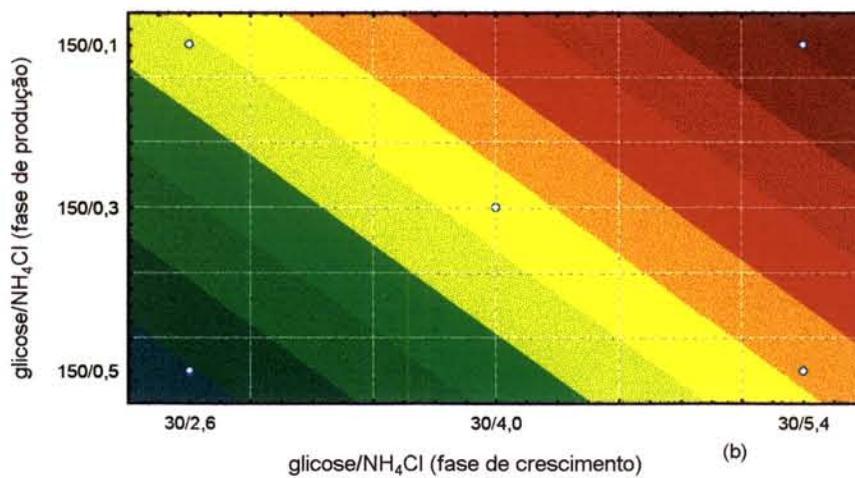
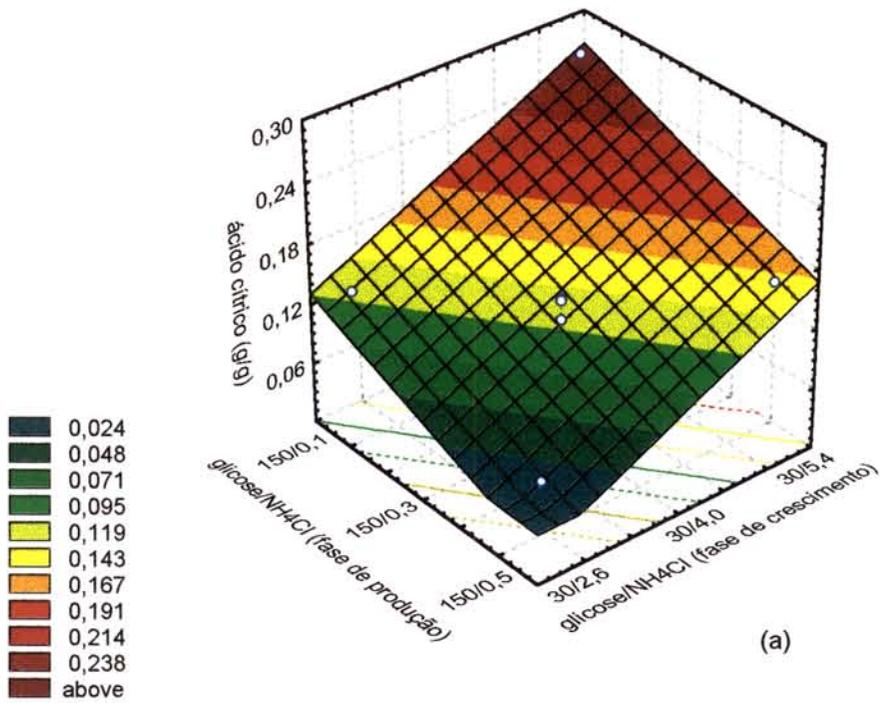


FIGURA 4.12. Rendimento de ácido cítrico em função da concentração de glicose/ NH_4Cl na fase de crescimento e produção. (a) superfície de resposta; (b) curvas de contorno.

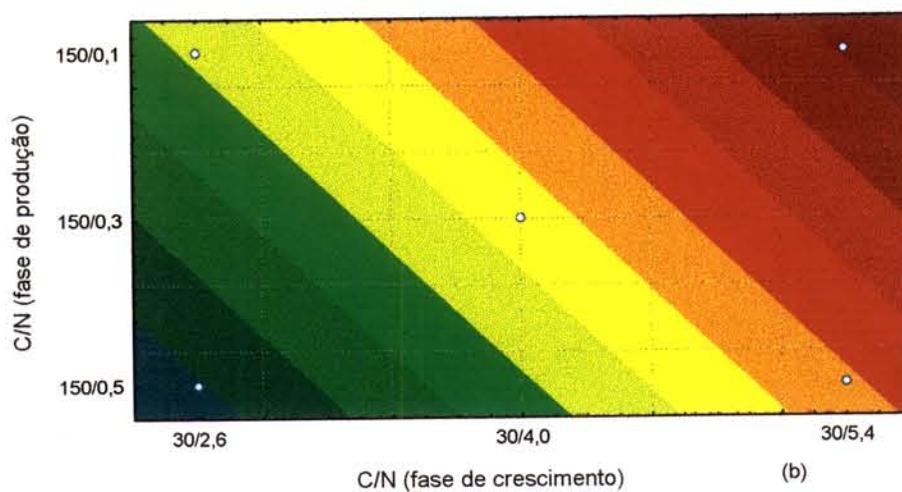
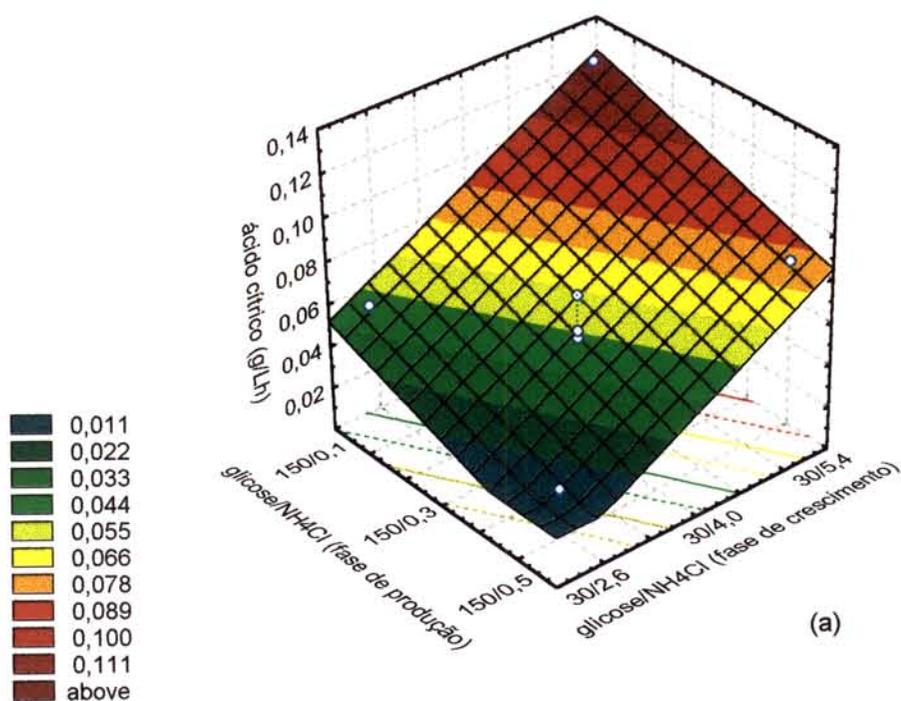


FIGURA 4.13. Produtividade de ácido cítrico em função da concentração de glicose/ NH_4Cl na fase de crescimento e produção. (a) superfície de resposta; (b) curvas de contorno.

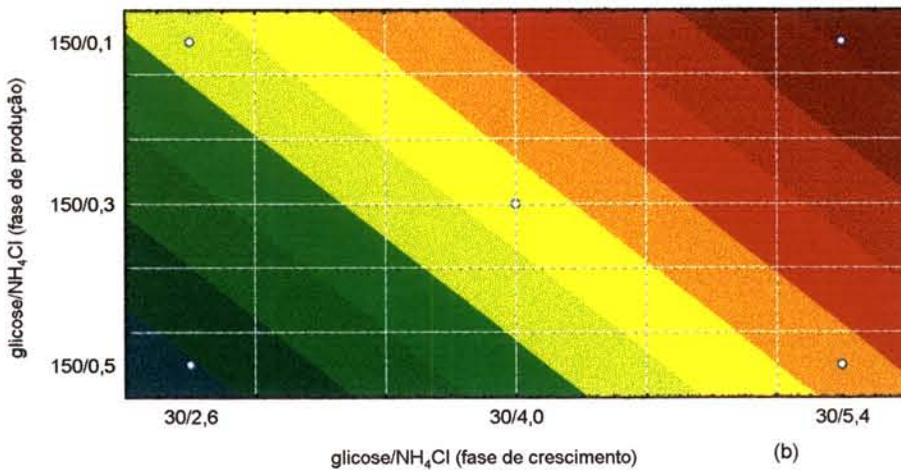
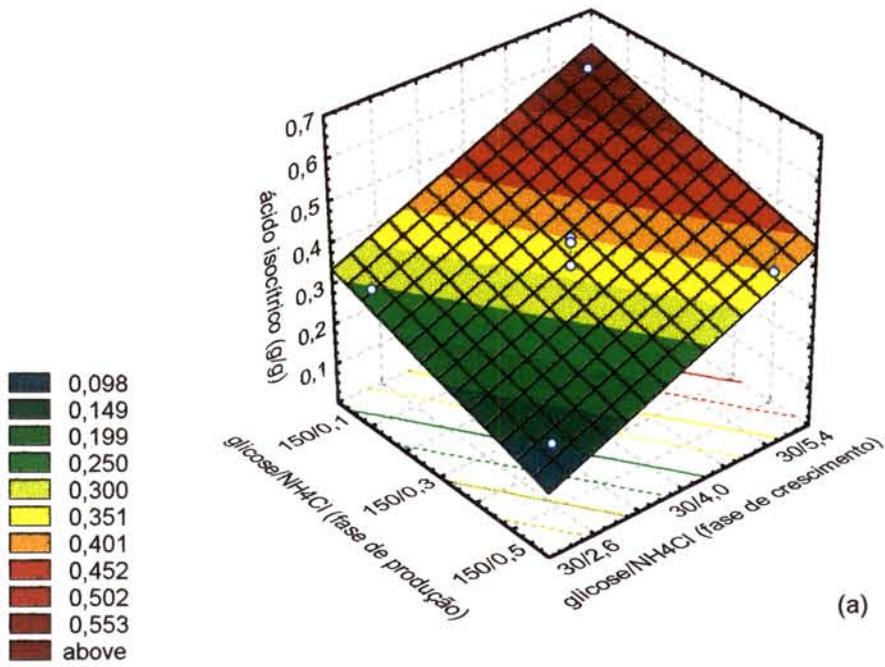


FIGURA 4.14. Rendimento de ácido isocítrico em função da concentração de glicose/ NH_4Cl na fase de crescimento e produção. (a) superfície de resposta; (b) curvas de contorno.

5. CONCLUSÃO

Os estudos realizados com a finalidade de verificar a influência da relação carbono/nitrogênio na fase de crescimento e produção sobre o rendimento e a produtividade de ácido cítrico e ácido isocítrico, levaram as seguintes conclusões:

- O crescimento microbiano ocorre enquanto nitrogênio estiver presente no meio, sendo que o consumo de glicose diminui após o esgotamento deste. Condições prolongadas de deficiência de nitrogênio nesta fase provocam um decréscimo na massa celular.
- A produção de ácido cítrico é favorecida sob condições de crescimento estacionário.
- A baixa conversão de glicose durante a fase de produção pode ser explicada pelo baixo rendimento celular obtido na fase de crescimento.
- A concentração celular na fase de crescimento foi afetada pela conversão de glicose para a formação de ácidos cítrico e isocítrico, e não apenas para crescimento e manutenção celular.
- Os maiores rendimento e produtividade de ácido cítrico foram obtidos à alta concentração de nitrogênio na fase de crescimento ($5,4 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl) e baixa concentração na fase de produção ($0,1 \text{ gL}^{-1}$ de NH_4Cl), indicando a repressão catabólica exercida pelo nitrogênio na produção de ácido cítrico.
- Apesar da excreção de ácido isocítrico seguir o mesmo comportamento do ácido cítrico, a influência da concentração de nitrogênio é menor sobre este quando comparada com a exercida sobre a produção de ácido cítrico.
- A excreção de ácido isocítrico em relação ao ácido cítrico foi favorecido pela alta atividade da enzima aconitase, indicando a falta de um composto para sua inibição.

- Em todas as condições de ensaios uma grande quantidade de glicose residual foi observada, indicando provavelmente inibição pelo substrato.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar condições operacionais e de cultivo que favoreçam uma maior concentração celular na fase de crescimento, inclusive a adição de oxigênio puro nesta etapa.
- Verificar compostos que possam inibir a enzima aconitase, responsável pela conversão do ácido cítrico em ácido isocítrico.
- Incluir num próximo planejamento experimental outros fatores que influenciam a produção de ácido cítrico, tais como concentração de fósforo, de nitrogênio, de tiamina, de ferro, de monofluoroacetato, de oxigênio dissolvido, pH e temperatura.
- Estudar o mecanismo de inibição pelo substrato propondo uma possível alternativa, como sistema em batelada alimentada.
- Estudar a viabilidade de um processo contínuo com reciclo de células.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S.; MATSUOKA, M. Identification of metabolic model: citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. Biotechnology and Bioengineering, v. 21, p. 1373-1386, 1979.
- AIBA, S.; HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. As vias de fermentação. In: Aiba, S.; Humphrey, A. E.; Millis, N. F. Engenharia Bioquímica. Campinas: Fundação Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos, 1971. p. 43-77.
- AKIYAMA, S.; SUZUKI, T.; SUMINO, Y.; NAKAO, Y.; FUKUDA, H. Production of citric acid from η -paraffins by fluoroacetato sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry Journal, v. 36, n. 2, p. 339-341, 1972.
- AKIYAMA, S.; SUZUKI, T.; SUMINO, Y.; NAKAO, Y.; FUKUDA, H. Induction and citric acid productivity of fluoroacetate-sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry Journal, v. 37, n. 4, p. 879-884, 1973.
- ARAVANTINOS-ZAFIRIS, G.; TZIA, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D. Fermentation of orange processing wastes for citric acid production. Journal of the Science of Food and Agriculture, Great Britain, v. 65, p. 117-120, maio, 1994.
- BARROS, N.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 1ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 299p.
- BRIFFAUD, J.; ENGASSER, M. Citric acid production from glucose. I. Growth and excretion kinetics in a stirred fermentor. Biotechnology and Bioengineering, v. 21, p. 2083-2092, 1979.
- CHEN, H.C. Citric acid production by *Aspergillus foetidus* in batch and fed-batch cultures. Food Biotechnology, v. 7, n. 3, p. 221-234, 1993.

- CHEN, H.C. Response surface methodology for optimizing citric acid fermentation by *Aspergillus foetidus*. Process Biochemistry, v. 29, p. 399-405, 1994.
- CHEN, H.C. Optimizing the concentrations of carbon, nitrogen and phosphorus in a citric acid fermentation with response surface method. Food Biotechnology, v. 10, n. 1, p. 13-27, 1996.
- DAWSON, M.W.; MADDOX, I.S.; BROOKS, J.D. Evidence for nitrogen catabolite repression during citric acid production by *Aspergillus niger* under phosphate-limited growth condition. Biotechnology and Bioengineering, v. 33, p. 1500-1504, 1989.
- ENZMINGER, J.D.; ASENJO, J.A. Use of cell recycle in the aerobic fermentative production of citric acid by yeast. Biotechnology Letters, v. 8, n. 1, p. 7-12, 1986.
- FIEDUREK, J; PLUTA, B; SZCZODRAK, J; JAMROZ, J; Relationship between citric acid and extracellular acid phosphatase production by *Aspergillus niger*. Acta Biotechnology, v.16, n. 2-3, p. 207-213, 1996.
- FINOGENOVA, T.V; KAMZOLOVA, S.V; SHISHKANOVA, N.V; IL'CHENKO, A.P; DEDYUKHINA, E.G. Influence of the specific growth rate and zinc ions on the synthesis of citric and isocitric acids and on the biomass composition of *Yarrowia lipolytica* N 1 yeast. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 32, n. 1, p. 34-38, 1996.
- FÖSTER, M.; MANSFIELD, J.; SCHELLENBERGER, A.; DAUTZENBERG, H. Immobilization of citrate-producing *Yarrowia lipolytica* cells in polyelectrolyte complex capsules. Enzyme and Microbial Technology, v. 16, p. 777-784, setembro, 1994.
- GADEN, E.L. Fermentation kinetics and productivity. Chemistry and Industry, p. 154-159, fevereiro, 1955.
- GARG, K.; SHARMA, C.B. Repeated batch production of citric acid from sugarcane molasses using recycled solid-state surface culture of *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, v. 13, n. 12, p. 913-916, dezembro, 1991.

- GOLDBERG, I.; PELEG, Y.; ROKEM, J.S. Citric, fumaric and malic acids. In: Goldberg, I.; Williams, R. Biotechnology and food ingredients. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p. 349-374.
- GREWAL, H.S.; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. Biotechnology Advances, USA, v. 13, n. 2, p. 209-234, 1995.
- GUPTA, S.; SHARMA, C.B.; Continuous production of citric acid from sugarcane molasses using a combination of submerged immobilized and surface stabilized cultures of *Aspergillus niger* KCU 520. Biotechnology Letters, v. 16, n. 16, p. 599-604, junho, 1994.
- GUTIERREZ, N.A.; McKAY, I.A.; FRENCH, C.E.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. Repression of galactose utilization by glucose in the citrate-producing yeast *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology, v. 11, p. 143-146, 1993.
- GUTCHO, S.J. Organic acids. Chemical by Fermentation, p. 46-57, 1973. Chemical Technology Review n° 19.
- HONECKER, S.; BISPING, B.; YANG, Z.; REHM, H.J. Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 31, p. 17-24, 1989.
- HOSSAIN, M.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 19, p. 393-397, 1984.
- IKENO, Y.; MASUDA, M.; TANNO, K.; OOMORI, I.; TAKAHASHI, N. Citric acid production from various raw materials by yeasts. Journal of Fermentation Technology, v. 53, n. 10, p. 752-756, 1975.
- KAPOOR, K.K.; CHAUDHARY, K.; TAURO, P. Acid citric. In: Reed, G. Prescott e Dunn's Industrial Microbiology. 4ª edição. Westport: AVI Publishing Co. Inc., 1982. p. 709-747.
- KAMZOLOVA, S.V.; SHISHKANOVA, N.V.; IL'CHENKO, A.P.; DEDYUKHINA, E.G.; FINOGENOVA, T.V. Effects of iron ions on biosynthesis of citric and isocitric

- acids by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under conditions of continuous cultivation. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 32, n. 1, p. 39-42, 1996.
- KAUTOLA, H.; RYMOWICZ, W.; LINKO, Y.; LINKO, P. Production of citric acid with immobilized *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 35, p. 447-449, 1991.
- KAUTOLA, H.; RYMOWICZ, W.; LINKO, Y.; LINKO, P. The utilization of beet molasse in citric acid production with yeast. Sciences des aliments, v. 12, p. 383-392, 1992.
- KLASSON, K.T.; ACKERSON, M.D.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. Modeling lysine and citric acid production in terms of initial limiting nutrient concentrations. Journal of Biotechnology, v. 21, p. 271-282, 1991.
- KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, A; Properties of yeast populations. In: KOCKOVA-KRATOCHVILOVA, A. Yeast and yeast-like organisms. New York: VCH Publishers, 1990. P.1-74.
- LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and Bioengineering Symposium, n.11, p.641-649, 1981.
- LEHNINGER, A.L. O ciclo do ácido cítrico. In: LEHNINGER, A.L. Lehninger: princípios de bioquímica. 5. Edição. São Paulo: Sarvier, 1989. 311-333.
- MADDOX, I.S.; KINGSTON, P.J. Use of immobilized cells of the yeast, *Saccharomyces lipolytica*, for the production of citric acid. Biotechnonolgy letters, v. 5, n. 12, 795-798, 1983.
- MADDOX, I.S.; SPENCER, K.; GREENWOOD, J.M.; DAWSON, M.W.; BROOKS, J.D. Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces lipolytica*. Biotechnology letters, v. 7, n. 11, p. 815-818, 1985.
- MARCHAL, R.; METCHE, M.; VANDECASTEELE, J.P. Intracellular concentrations of citric and isocitric acids in cultures of the citric acid-excreting yeast *Saccharomyces lipolytica* grown on alkanes. Journal of General Microbiology, Great Britain, v. 116, p. 535-538, 1980.

- MASON, R.L.; GUNST, R.F.; HESS, J.L. Statistical design and analysis of experiments: with applications to engineering and science. 2ª edição. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1989. 689p. (Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics).
- MATTEY, M. The production of organic acids. Critical Reviews in Biotechnology, v. 12, n. 1/2, p. 87-132, 1992.
- McKAY, I.A.; MADDOX, I.S.; BROOKS, J.D. High specific rates of glucose utilisation under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK2. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 41, p. 73-78, 1994.
- MILSON, P.E. Organic acids by fermentation, especially citric acid. In: KING, R.D.; CHEETHAN, P.S.J. Food Biotechnology. New York: Elsevier Applied Science, 1987. v. 2, p. 273-293.
- MORESI, M. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. Journal Chemical Technology Biotechnology, v. 60, p. 387-395, 1994.
- NGUYEN, T.K.; MARTÍNKOVÁ, L.; SEICHERT, L.; MACHEK, F. Citric acid production by *Aspergillus niger* using media containing low concentrations of glucose or corn starch. Folia Microbiologia, v. 37, n. 6, p. 433-441, 1992.
- OKOSHI, H.; SATO, S.; MUKATAKA, S.; TAKAHASHI, J. Citric acid production by *Candida tropicalis* under high dissolved oxygen concentrations. Agricultural and Biological Chemistry, v. 51, n. 1, p. 257-258, 1987.
- PANDA, K.; SHARMA, C.B. Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using treated indian cane molasses. Process Biochemistry, v. 19, n. 5, p.183-187, outubro, 1984.
- PINTADO, J; MURADO, M.A; GONZALEZ, M.P; MIRON, J; PASTRANA, L. Joint effect of nitrogen and phosphorus concentrations on citric acid production by different strains of *Aspergillus niger* grown on an effluent. Biotechnology Letter, v. 15, n. 11, p. 1157-1162, novembro, 1993.
- QAZI, G.N.; GAIND, C.N.; CHATURVEDI, S.K.; CHOPRA, C.L.; TRÄGER, M.; ONKEN, U. Pilot-scale citric acid production with *Aspergillus niger* under several

- conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 69, n. 1, p. 72-74, 1990.
- QUÍMICA E DERIVADOS. setembro, p. 29-30, 1997.
- RANE, K.D.; SIMS, K.A. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: effect of glucose concentration on yield and productivity. Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 646-651, agosto, 1993.
- RANE, K.D.; SIMS, K.A. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095. Biotechnology and Bioengineering, v. 43, p. 131-137, 1994.
- RANE, K.D.; SIMS, K.A. Citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. Biotechnology and Bioengineering, v. 46, n. 4, p. 325-332, maio, 1995.
- RANE, K.D.; SIMS, K.A. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*: effect of nitrogen and biomass concentration on yield and productivity. Biotechnology Letters, v. 18, n. 10, p. 1139-1144, agosto, 1996.
- RYMOWICZ, W; KAUTOLA, H; WOJTATOWICZ, M; LINKO, Y.Y; LINKO, P. Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 39, p. 1-4, 1993.
- RÖHR, M.; KUBICEK, C.P.; KOMINEK, J. Citric acid. In: REHM, H.J.; REED, G. Biotechnology. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. v. 3, p. 419-454.
- ROUKAS, T. Influence of impeller speed on citric acid production and selected enzyme activities of the TCA cycle. Journal of Industrial Microbiology, v. 7, p. 221-226, 1991.
- RUGSASEEL, S.; KIRIMURA, K.; USAMI, S. Selection of mutants of *Aspergillus niger* showing enhanced productivity of citric acid from starch in shaking culture. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 75, n. 3, p. 226-228, 1993.
- RUGSASEEL, S.; MORIKAWA, S.; KIRIMURA, K.; USAMI, S. Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substances in shake culture. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 42, p. 839-843, 1995.

- SHAH, D.N.; CHATTOO, B.B.; BARODA; KOTHARI, R.M.; PATIALA; HEGDE, M.V. Starch hydrolysate, an optimal and economical source of carbon for the secretion of citric acid by *Yarrowia lipolytica* (DS-1). Starch/Stärke, Weinheim, v. 45, n. 3, p. 81-120, março, 1993.
- SOKOLOV, D.M; SOLODOVNIKOVA, N.Y; SHARYSHEV, A.A. The role of NAD: isocitrate dehydrogenase in the biosynthesis of citric acid by yeasts. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 31, n. 5, p. 450-454, 1995.
- SOKOLOV, D.M; SOLODOVNIKOVA, N.Y; SHARYSHEV, A.A. The role of phosphofrutokinase in the regulation of citric acid biosynthesis by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 32, n. 3, p. 315-319, 1996.
- STONE, G.B. Citric acid. In: KIRK, E.R.; OTHMER, D.F. KIRK-OTHMER : Encyclopedia of Chemical Technology. New York: The interscience encyclopedia, Inc., 1949. v. 4, p. 8-23.
- TANI, Y.; SAKAI, Y.; SHIN-GEN, C. Production of citric acid from methanol by a fluoroacetate-resistant mutant of *Candida* sp. Y-1. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 34, p. 5-9, 1990.
- XU, D.B.; KUBICEK, C.P.; RÖHR, M. A comparison of factors influencing citric acid production by *Aspergillus niger* grown in submerged culture and on filter paper. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 444-449, 1989^b.
- XU, D.B.; MADRID, C.P.; RÖHR, M.; KUBICEK, C.P. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 553-558, 1989^a.
- YIGITOGU, M.; McNEIL, B. Ammonium ion & citric acid supplementation in batch cultures of *Aspergillus niger* B 60. Biotechnology Letters, v. 14, n. 9, p. 831-836, setembro, 1992.
- WOJTATOWICZ, M.; MARCHIN, G.L.; ERICKSON, L.E. Attempts to improve strain A-101 of *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from n-paraffins. Process Biochemistry, England, v. 28, p. 452-460, 1993.

YOKOYA, F. Bioquímica da produção de ácido cítrico por levedura. In: YOKOYA, F. Fermentação cítrica. 1ª edição. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1992. p. 29-31.

APÊNDICE A

Curvas Padrões

(Glicose, Nitrogênio, Ácido cítrico, Ácido isocítrico, e Massa seca)

1. Determinação de açúcares redutores

As equações que correlacionam a concentração de glicose (gL^{-1}) e densidade ótica utilizadas para determinar o consumo de açúcar nas fermentações são:

concentração de açúcar = coeficiente linear + coeficiente angular * densidade ótica

$[\text{glicose}] = -0,116 + 4,064 * \text{D.O.}$	$r = 0,990$	Curva 1
$[\text{glicose}] = -0,033 + 4,179 * \text{D.O.}$	$r = 0,998$	Curva 2
$[\text{glicose}] = 0,000 + 3,701 * \text{D.O.}$	$r = 0,996$	Curva 3
$[\text{glicose}] = 0,076 + 4,077 * \text{D.O.}$	$r = 0,991$	Curva 4
$[\text{glicose}] = 0,142 + 3,527 * \text{D.O.}$	$r = 0,998$	Curva 5
$[\text{glicose}] = 0,034 + 3,197 * \text{D.O.}$	$r = 0,999$	Curva 6
$[\text{glicose}] = 0,074 + 2,990 * \text{D.O.}$	$r = 0,994$	Curva 7

2. Determinação de nitrogênio

As equações utilizadas para determinação do consumo de nitrogênio nos ensaios são:

concentração de nitrogênio = coeficiente linear + coeficiente angular * densidade ótica

$[\text{N}] = 0,011 + 0,528 * \text{D.O.}$	$r = 0,998$	Curva 1
$[\text{N}] = -0,003 + 0,523 * \text{D.O.}$	$r = 0,999$	Curva 2

3. Determinação de ácidos cítrico e isocítrico

Para quantificação de ácido cítrico e ácido isocítrico utilizou-se as seguintes curvas padrões:

$$[\text{ácido cítrico}] = 7,45 \cdot 10^6 \cdot \text{área do cromatograma} - 5,28 \cdot 10^4 \quad R^2 = 0,995$$

$$[\text{ácido isocítrico}] = 3,78 \cdot 10^6 \cdot \text{área do cromatograma} - 2,75 \cdot 10^5 \quad R^2 = 0,998$$

As Figuras A1 e A2 ilustram o tempo de retenção na coluna e o perfil dos espectros de absorção no refratômetro das soluções padrões individuais de ácido cítrico e ácido isocítrico e na Figura A3 está representado o cromatograma para uma solução padrão de glicose, ácido cítrico e ácido isocítrico.

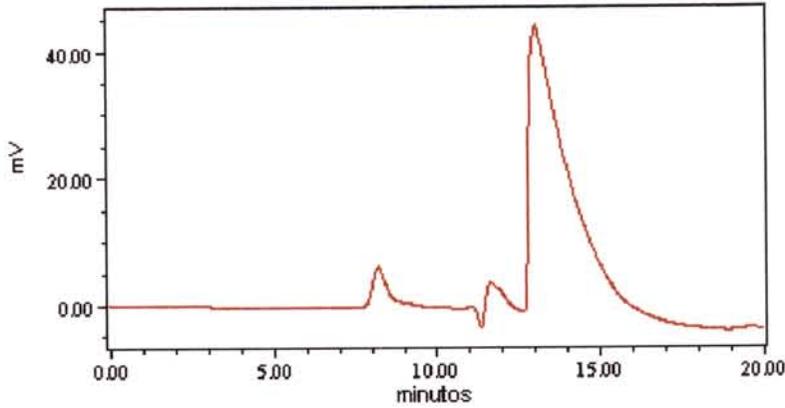


FIGURA A1: Cromatograma de solução padrão de ácido cítrico (1 gL^{-1}). Coluna Bondesil NH_2 ; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de $0,3 \text{ mLmin}^{-1}$.

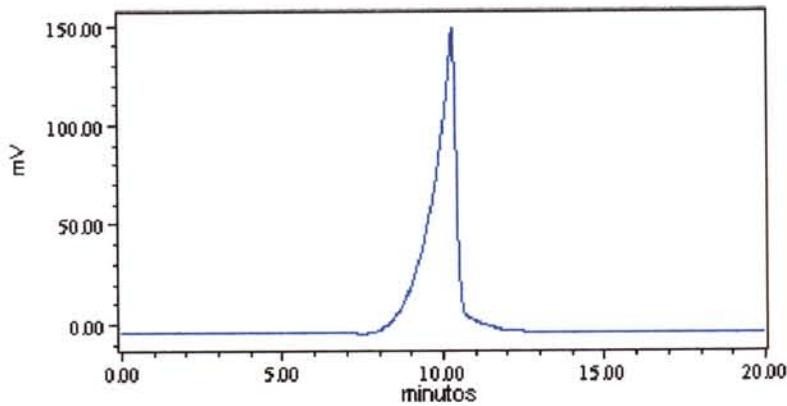


FIGURA A2: Cromatograma de solução padrão de ácido isocítrico (2 gL^{-1}). Coluna Bondesil NH_2 ; fase móvel: solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de $0,3 \text{ mLmin}^{-1}$.

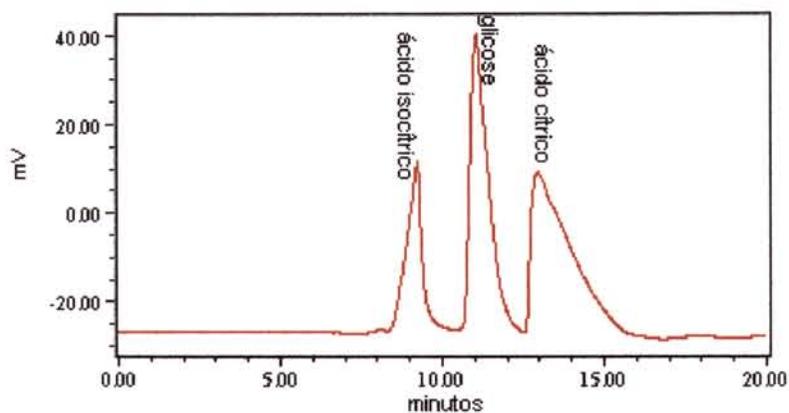


FIGURA A3: Cromatograma de solução padrão $0,4 \text{ gL}^{-1}$ de ácido cítrico, ácido isocítrico e glicose. Coluna Bondesil NH_2 ; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de $0,3 \text{ mLmin}^{-1}$.

4. Determinação da massa seca (MS) produzida

A equação que correlaciona a concentração de massa seca (gL^{-1}) e densidade ótica utilizada para determinar o crescimento do microrganismo nas fermentações é:

$$\text{MS} = \text{coeficiente angular D.O.} + \text{coeficiente linear}$$

$$\text{MS} = 1,272 * \text{D.O.} - 0,092 \quad r = 0,997$$

APÊNDICE B

Tabelas de Resultados dos Ensaios do Planejamento Experimental

Tabela B1: Resultados referentes ao ensaio 1.

Tempo (h)	Concentrações (gL ⁻¹)					IV (%)
	glicose	massa seca	nitrogênio	ácido cítrico	ácido isocítrico	
0	30,00	0,00	0,722	0,00	0,00	
24	26,65	0,48	0,620	0,39	9,05	98
48	14,09	1,24	0,059	0,56	9,24	89
51	9,11	1,46	0,014	1,13	6,79	
54	8,26	1,45		1,00	6,09	
58	7,68	1,81		1,09	6,35	
61	7,61	1,85		1,10	6,28	
63	7,08	2,02		1,17	6,37	
72	130,94	2,00		1,74	6,55	95
96	113,31	3,09		2,04	7,79	94
120	110,84	3,75		2,18	7,94	94
144	107,31	4,54		2,61	8,21	96
168	91,80	4,41		2,79	11,68	
192	91,64	2,80		2,68	8,79	
216	89,24	3,23		2,83	10,84	95

Tabela B2: Resultados referentes ao ensaio2.

Tempo (h)	Concentrações (gL ⁻¹)					IV (%)
	glicose	massa seca	nitrogênio	ácido cítrico	ácido isocítrico	
0	30,00	0,00	1,409	0,00	0,00	
24	24,84	0,65	1,261	1,85	9,94	97
48	1,82	2,19	0,934	2,78	12,00	91
50	0,34	2,39	0,392	3,07	13,22	
72	117,01	3,58	0,049	3,85	17,25	94
96	97,97	3,79	0,013	7,30	22,00	89
120	91,26	4,28		10,15	30,10	89
144	72,77	4,42		11,75	31,20	92
168	61,59	4,39		13,90	33,05	
192	61,59	2,99		15,80	37,90	
216	59,03	3,00		16,70	37,70	90

Tabela B3: Resultados referentes ao ensaio 3.

Tempo (h)	Concentrações (gL ⁻¹)					IV (%)
	glicose	massa seca	nitrogênio	ácido cítrico	ácido isocítrico	
0	30,00	0,00	0,703	0,00	0,00	
24	28,76	0,47	0,702	1,00	5,24	98
48	22,18	1,38	0,173	0,54	3,18	97
54	12,62	1,52	0,031	0,97	4,69	
57	10,73	1,32	0,025	1,13	4,47	
67	8,26	1,15	0,023	1,62	5,04	
72	6,76	1,07	0,023	1,74	5,40	72
96	149,68	1,60		2,25	12,90	85
120	108,37	0,90		3,05	13,30	83
144	102,02	0,44		4,40	14,25	
168	99,73	0,35		6,15	16,85	96
192	88,97	0,29		8,15	17,35	
216	85,80	0,30		9,55	19,45	84

Tabela B4: Resultados referentes ao ensaio 4.

Tempo (h)	Concentrações (gL ⁻¹)					IV (%)
	glicose	massa seca	nitrogênio	ácido cítrico	ácido isocítrico	
0	30,00	0,00	1,676	0,00	0,00	
24	28,68	0,63	1,467	2,19	11,89	
48	5,86	1,77	0,664	2,67	13,11	90
52	4,03	1,97	0,619	2,90	13,17	
54	3,36	1,74	0,487	3,32	14,99	
72	162,33	2,86	0,052	3,00	12,95	94
96	111,90	3,02	0,014	6,00	19,65	
120	105,37	3,30		8,00	20,20	86
144	102,90	2,85		9,75	21,70	
168	93,91	3,02		11,70	26,30	88
192	91,97	2,85		21,20	49,95	
216	79,98	2,93		27,15	58,25	88

Tabela B5: Resultados referentes ao ensaio 5.

Tempo (h)	Concentrações (gL ⁻¹)					IV (%)
	glicose	massa seca	nitrogênio	ácido cítrico	ácido isocítrico	
0	30,00	0,00	0,933	0,00	0,00	
24	29,26	0,33	0,869	2,00	7,95	97
48	6,98	2,55	0,279	1,81	8,37	97
52	6,37	2,65		0,00	0,00	
54	5,21	2,78	0,157	2,21	8,72	
57	4,06	2,66	0,142	2,51	12,38	
58	3,67	2,37	0,136	2,50	8,88	
72	158,04	2,91	0,010	6,15	26,95	
96	137,25	3,73		9,25	28,95	
120	129,30	4,00		9,15	28,35	89
144	128,08	4,18		3,30	29,75	85
168	117,07	4,10		0,00	0,00	
192	106,47	4,08		4,10	29,25	86
216	100,15	4,65		6,40	30,75	

Tabela B6: Resultados referentes ao ensaio 6.

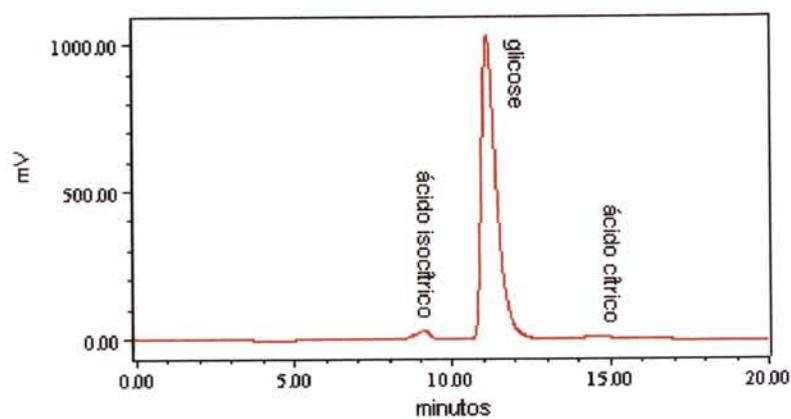
Tempo (h)	Concentrações (gL ⁻¹)					IV (%)
	glicose	massa seca	nitrogênio	ácido cítrico	ácido isocítrico	
0	30,00	0,00	0,942	0,00	0,00	
24	32,45	0,35	0,860	1,65	7,84	97
48	6,98	2,88	0,172	1,69	7,81	96
52	3,40	2,88	0,101	1,87	8,31	
54	2,57	2,84	0,083	1,85	9,48	
72	161,30	3,89	0,004	1,35	22,75	
96	100,69	4,47	0,001	2,60	24,60	
120	96,65	5,03		6,90	32,75	92
144	87,08	5,19		7,00	28,70	91
168	84,09	5,10		8,30	29,90	
192	72,43	5,20		9,35	32,75	87
216	68,25	5,21		11,75	41,40	

Tabela B7: Resultados referentes ao ensaio 7.

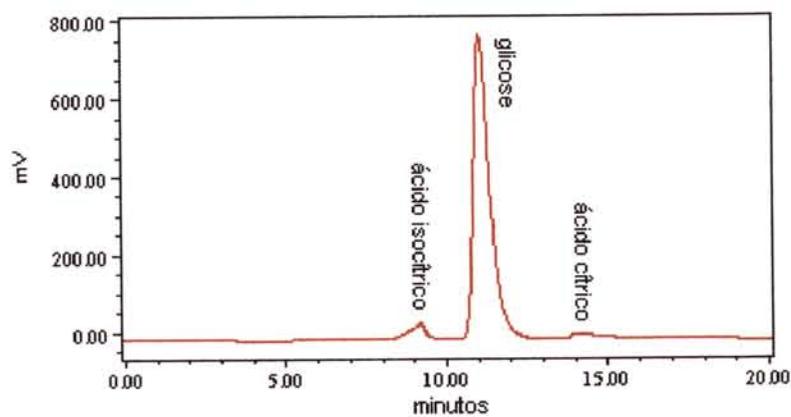
Tempo (h)	Concentrações (gL ⁻¹)					IV (%)
	glicose	massa seca	nitrogênio	ácido cítrico	ácido isocítrico	
0	30,00	0,00	1,007	0,00	0,00	
24	27,67	0,56	0,933	0,84	8,95	
48	12,72	0,90	0,308	1,09	8,56	90
52	8,49	1,28	0,280	1,43	8,22	
54	8,47	0,98	0,255	1,44	8,57	
56	8,00	0,99	0,260	1,52	9,14	
58	7,68	1,42	0,235	1,56	9,88	
60	6,74	1,65	0,233	1,59	8,64	
72	160,04	1,11	0,075	0,80	12,45	94
96	122,48	1,93	0,000	1,60	14,15	
120	114,54	2,00		3,05	15,45	
144	113,84	2,04		4,15	17,25	
168	111,45	1,86		4,85	18,95	88
192	107,57	2,24		5,85	23,05	
216	107,57	2,39		7,45	22,00	86

APÉNDICE C

Cromatogramas – HPLC



(a)



(b)

FIGURA C1. Cromatograma relacionado ao ensaio 01: (a) 96h de fermentação; (b) 216h de fermentação. Diluição das amostras: 1/25; Coluna Bondesil NH₂; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de 0,3 mLmin⁻¹.

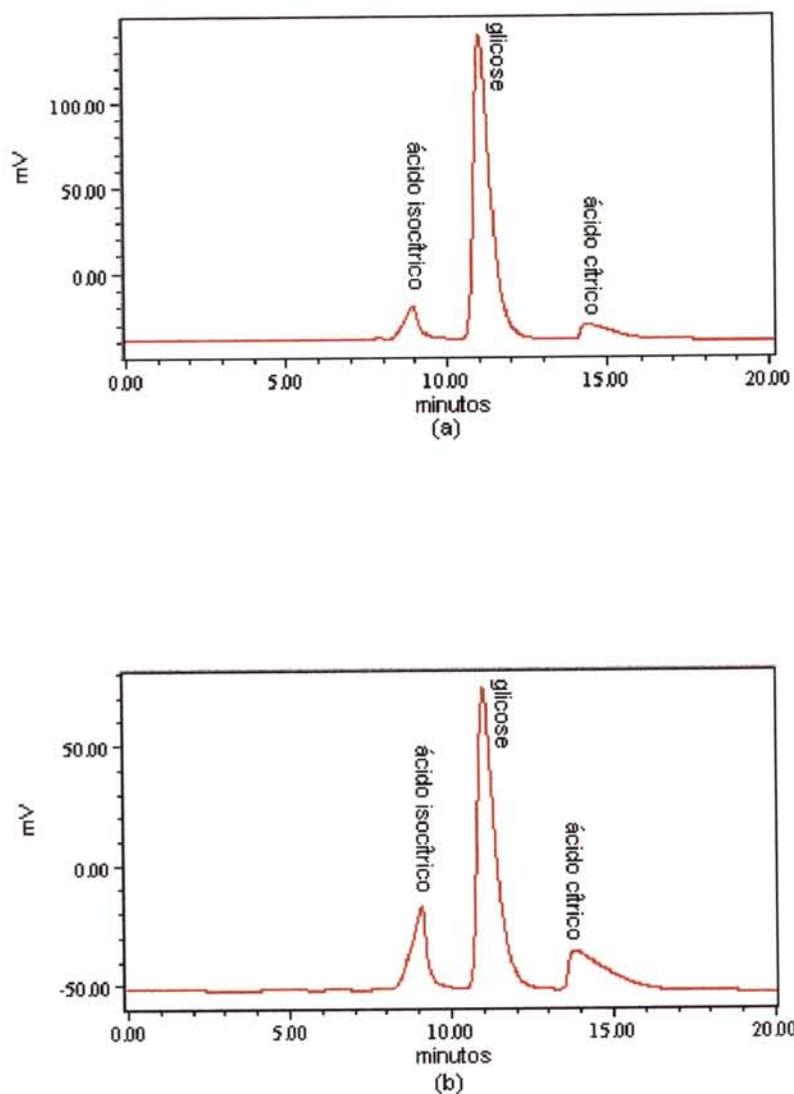


FIGURA C2. Cromatograma relacionado ao ensaio 02: (a) 96h de fermentação; (b) 216h de fermentação. Diluição das amostras: 1/100; Coluna Bondesil NH_2 ; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de $0,3 \text{ mLmin}^{-1}$.

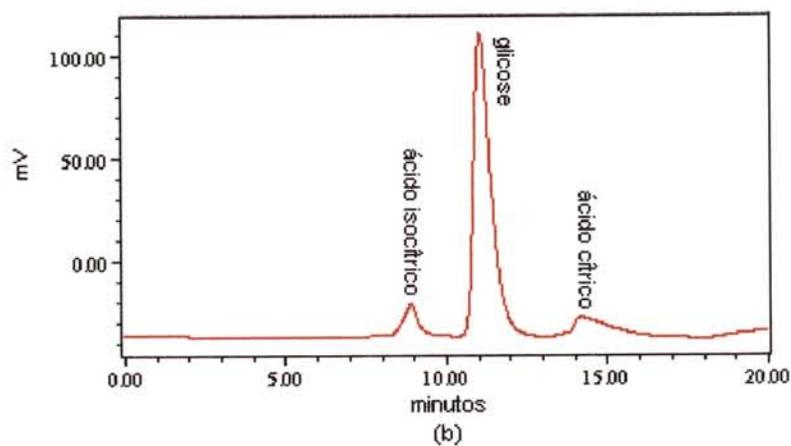
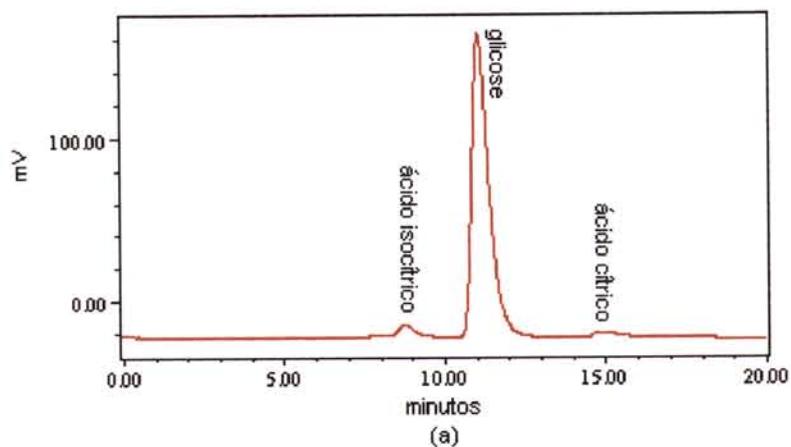


FIGURA C3. Cromatograma relacionado ao ensaio 03: (a) 96h de fermentação; (b) 216h de fermentação. Diluição das amostras: 1/100; Coluna Bondesil NH_2 ; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de $0,3 \text{ mLmin}^{-1}$.

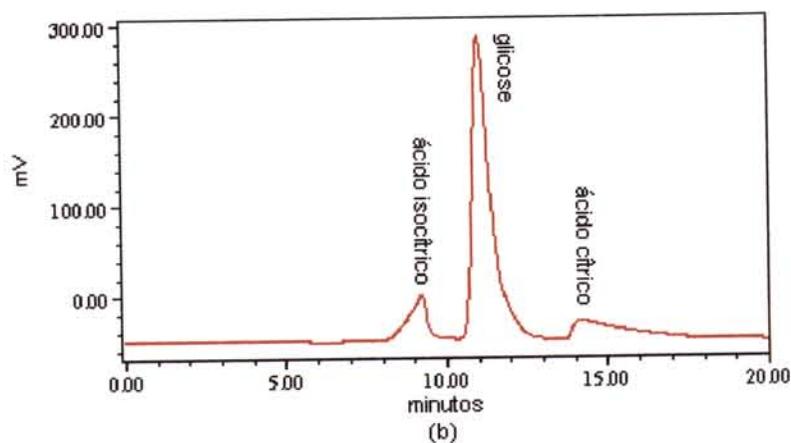
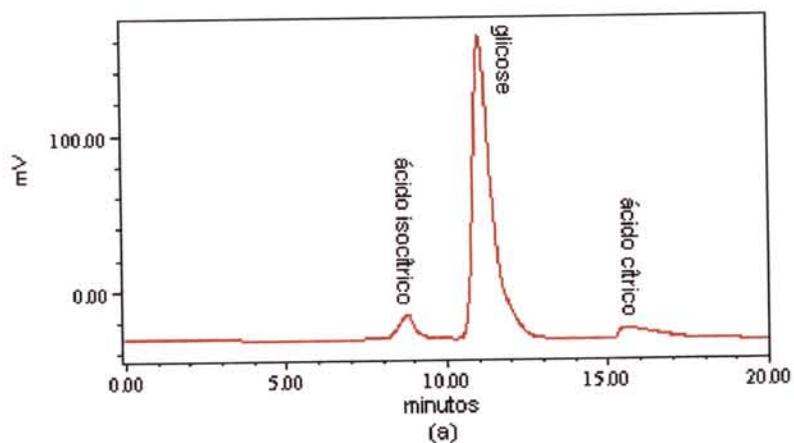
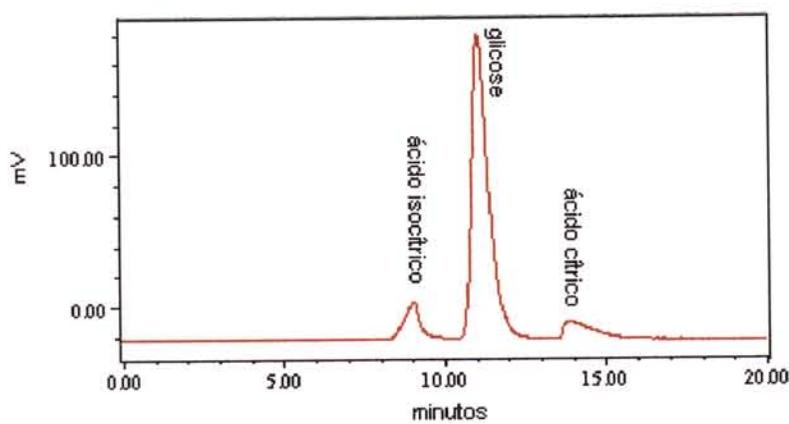
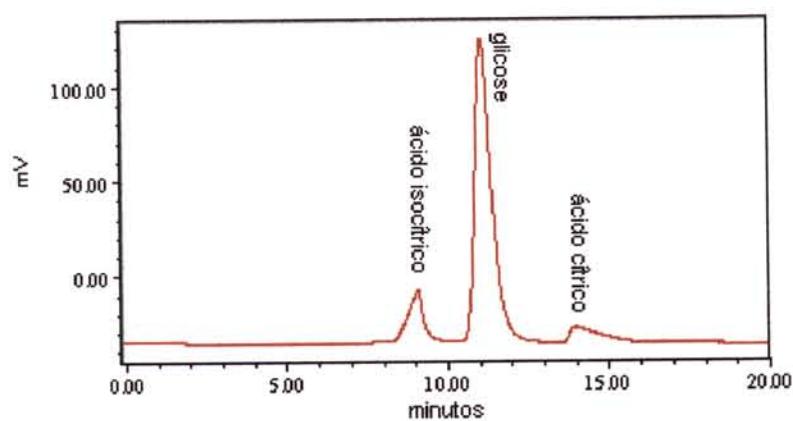


FIGURA C4. Cromatograma relacionado ao ensaio 04: (a) 96h de fermentação; (b) 216h de fermentação. Diluição das amostras: 1/100; Coluna Bondesil NH₂; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de 0,3 mLmin⁻¹.



(a)



(b)

FIGURA C5. Cromatograma relacionado ao ensaio 05: (a) 96h de fermentação; (b) 216h de fermentação. Diluição das amostras: 1/100; Coluna Bondesil NH₂; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de 0,3 mLmin⁻¹.

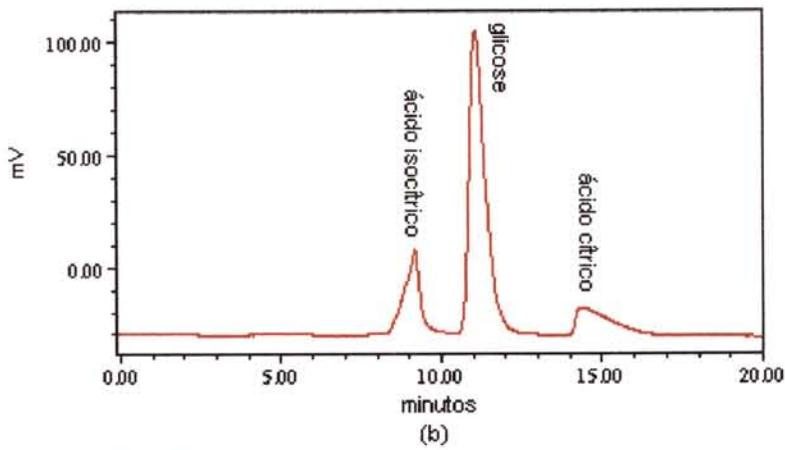
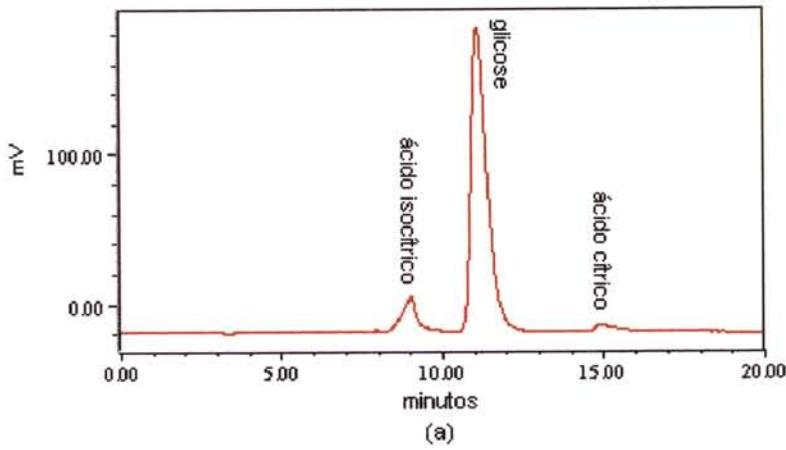


FIGURA C6. Cromatograma relacionado ao ensaio 06: (a) 96h de fermentação; (b) 216h de fermentação. Diluição das amostras: 1/100; Coluna Bondesil NH₂; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de 0,3 mLmin⁻¹.

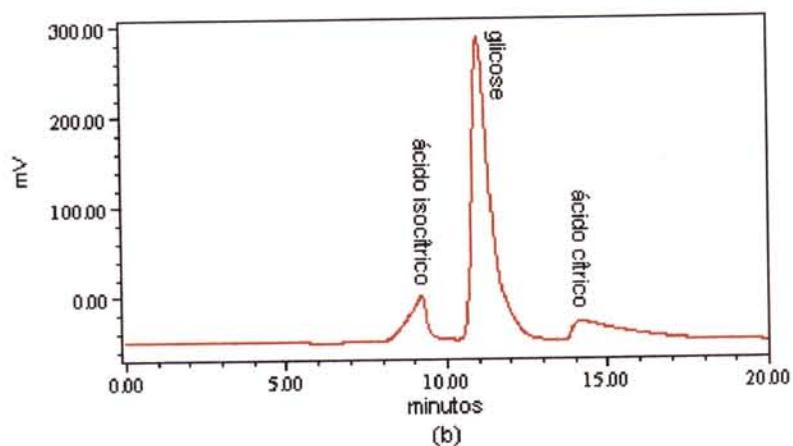
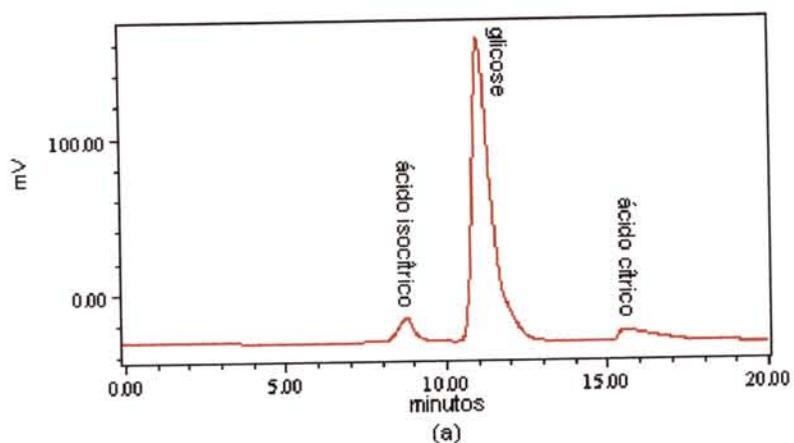


FIGURA C7. Cromatograma relacionado ao ensaio 07: (a) 96h de fermentação; (b) 216h de fermentação. Diluição das amostras: 1/100; Coluna Bondesil NH₂; fase móvel solução de ácido sulfúrico e ácido acético pH 2,5; fluxo de 0,3 mLmin⁻¹.