

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO  
POR *Candida lipolytica* NRRL Y 1095**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Luciano Armiliato, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de outubro de 2000.

Campinas, 03 de outubro de 2000



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues  
Presidente da Banca

**Luciano Armiliato**

Engenheiro de Alimentos  
UFSC, 1997

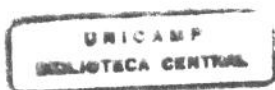
**Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues**

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, 2000

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**



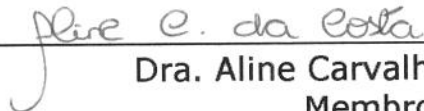
200012342

## **Banca Examinadora**



---

Professora Dra. Maria Isabel Rodrigues  
Orientadora



---

Dra. Aline Carvalho da Costa  
Membro



---

Professor Dr. Francisco Maugeri Filho  
Membro

---

Professor Dr. Fumio Yokoya  
Suplente

Campinas, 03 de outubro de 2000.

“Não existe arte patriótica, nem ciência patriótica.  
Ambas pertencem, como todo sublime bem, ao mundo  
inteiro, e só podem ser fomentadas pelo intercâmbio  
geral e livre de todos, em constante respeito pelo que nos  
foi transmitido e nos é conhecido do passado.”

Goethe

Dedico este trabalho a meus pais, Arlindo e Elsa, e meus irmãos, Juliano e Leandro, pelo incentivo e por tudo que abriram mão por minha causa.



Dedico este trabalho também a todos os trabalhadores,  
humildes e analfabetos, que sempre pagaram meus  
estudos.

## **Agradecimentos**

A meus pais e irmãos que souberam entender e me apoiar no caminho que resolvi escolher.

À professora Maria Isabel Rodrigues pela orientação, paciência e, principalmente, pelo carinho e amizade.

À Fifa, por toda ajuda, amizade, disponibilidade, paciência e atenção.

Ao professor Francisco Maugeri Filho, pelos conselhos, palpites e por toda ajuda prestada durante a execução deste trabalho.

A Larissa e Juliana, obrigado pela ajuda. Vocês engrandeceram muito esse trabalho.

À Estelinha por ser, simplesmente, tão especial.

A todo pessoal do laboratório: André, Bernardo, Daniel, Eliana, Guiga, Helen, Helena, Janaína, Lia, Márcio, Maria, Rafael, Reinaldo, Susana e Yemiko pela amizade, ajuda e por todos os momentos felizes que passamos juntos.

Aos meus amigos Karina, Daniela, Luciano, Renan e Thaiz por terem me ajudado muitas vezes, mesmo sem saber, a tocar o barco pra frente.

Aos meus amigos de São Marcos, Nildo, Ricardo, Seco, Flávia, Lauro, Leni, Osmar, Patrícia, Evandro e Cris pelos churrascos, canastras, acampamentos e carinho que sempre me dedicaram e pela alegria com que sempre me receberam.

Ao meu grupo de Emaús pelo carinho, amizade, orações e apoio que me mantiveram no Rumo Certo. Vocês são muito especiais e sempre foram um porto seguro para mim. Shalom!

Aos meus padrinhos, Lourenço e Vana e minhas primas Cláudia e Carla pela confiança e por sempre acreditarem em mim.

Aos amigos do PF, Maurício, Danilo, Cláudio, Carlão, Marcelo, Whashington, Erick, Luciano, Fábio, Márcio e Alessandra pelas brincadeiras, discussões, guerras e lerdagens em geral.

À FAPESP pela bolsa de estudos, e suporte financeiro de todo o projeto.

E a Deus, que tornou possível tudo isso.

# ÍNDICE

|                                            |             |
|--------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO</b>                              | <b>XI</b>   |
| <b>SUMMARY</b>                             | <b>XIII</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                       | <b>1</b>    |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>            | <b>4</b>    |
| 2.1. GENERALIDADES                         | 4           |
| 2.2. PROPRIEDADES                          | 7           |
| 2.3. MECANISMO DE ACÚMULO DE ÁCIDO CÍTRICO | 8           |
| 2.4. CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO               | 9           |
| 2.5. MICRORGANISMOS                        | 10          |
| 2.6. MATÉRIA-PRIMA                         | 12          |
| 2.7. CONDIÇÕES DE CULTIVO                  | 13          |
| 2.7.1. FONTES DE CARBONO                   | 13          |
| 2.7.2. FONTE DE NITROGÊNIO                 | 14          |
| 2.7.3. FONTE DE FÓSFORO                    | 14          |
| 2.7.4. PH DE FERMENTAÇÃO                   | 15          |
| 2.7.5. AERAÇÃO E AGITAÇÃO                  | 15          |
| 2.7.6. METAIS                              | 16          |
| 2.7.7. OUTROS                              | 17          |
| 2.8. PROCESSO INDUSTRIAL                   | 18          |
| 2.8.1. PROCESSO EM SUPERFÍCIE              | 18          |
| 2.8.2. PROCESSO KOJI                       | 19          |

|                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.8.3. PROCESSO SUBMERSO                                                                                                     | 19        |
| 2.9. TRANSPORTE DE MASSA EM PROCESSOS FERMENTATIVOS                                                                          | 20        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                                                 | <b>23</b> |
| 3.1. INTRODUÇÃO                                                                                                              | 23        |
| 3.2 . PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL                                                                                              | 23        |
| 3.3. CONDUÇÃO DA FERMENTAÇÃO                                                                                                 | 25        |
| 3.3.1. MICRORGANISMO                                                                                                         | 25        |
| 3.3.2. PREPARO DO INÓCULO                                                                                                    | 25        |
| 3.3.3. PRÉ-FERMENTAÇÃO                                                                                                       | 26        |
| 3.3.4. ENSAIOS PRELIMINARES                                                                                                  | 27        |
| 3.3.5. ENSAIOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL                                                                                  | 30        |
| 3.3.6. FERMENTAÇÃO COM CONTROLE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO                                                                       | 31        |
| 3.3.7. ESTUDO DE FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA CRESCIMENTO<br>CELULAR DE <i>CANDIDA LIPOLYTICA</i> Y 1095 | 31        |
| 3.3.8. TESTE DE UMA NOVA CEPA DE LEVEDURAS                                                                                   | 34        |
| <b>3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS</b>                                                                                               | <b>36</b> |
| 3.4.1. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO                                                                                            | 36        |
| 3.4.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS CÍTRICO, ISOCÍTRICO E GLICOSE                                                                  | 37        |
| 3.4.3. DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA PRODUZIDA                                                                                  | 37        |
| 3.4.4. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS LEVEDURAS                                                                     | 37        |
| 3.4.5. DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO                                                                           | 38        |
| 3.4.6. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO<br>DISSOLVIDO PARA A FASE LÍQUIDA ( $K_LA$ )     | 38        |

|                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                        | <b>41</b> |
| 4.1. ENSAIOS PRELIMINARES                                                                                               | 41        |
| 4.2. RESULTADOS DOS TESTES DA ETAPA DE CRESCIMENTO E DE PRODUÇÃO UTILIZANDO FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO E NITROGÊNIO | 47        |
| 4.3. ENSAIOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL                                                                               | 53        |
| 4.4. FERMENTAÇÃO COM CONTROLE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO                                                                    | 59        |
| 4.5. TESTE COM UMA NOVA CEPA DE LEVEDURA                                                                                | 60        |
| <b>5. CONCLUSÕES</b>                                                                                                    | <b>64</b> |
| <b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>                                                                              | <b>66</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                    | <b>67</b> |
| <b>ANEXO A</b>                                                                                                          | <b>73</b> |
| <b>ANEXO B</b>                                                                                                          | <b>82</b> |

## Resumo

O ácido cítrico (2-Hidroxi-1,2,3 ácido propano tricarboxílico) é o principal constituinte das frutas cítricas. Com o emprego de técnica de processos microbiológicos foi possível obter esse ácido por fermentação, reduzindo-se o custo de obtenção e possibilitando um grande aumento do uso em escala industrial, o que o diferencia de outros produtos que previamente foram elaborados por métodos microbiológicos e atualmente se produzem por via química. Atualmente o ácido cítrico é um dos mais importantes ácidos orgânicos produzidos por via microbiana. Sozinho, ele representa cerca de 60% do mercado de acidulantes nas indústrias de alimentos. No entanto, seu preço bastante elevado se deve, principalmente, ao fato de que sua produção industrial é feita por *Aspergillus niger*, um fungo que tem um tempo de fermentação muito grande, geralmente maior do que sete dias. Uma alternativa a esse método de produção é a utilização de leveduras em lugar dos fungos, o que tornaria o processo fermentativo mais atrativo economicamente devido às maiores facilidades operacionais (processo contínuo e com reciclo de células, por exemplo). Verificou-se que leveduras do gênero *Candida* têm uma taxa de produção de ácido cítrico semelhante aos fungos. A maior desvantagem da levedura é a produção simultânea de altos teores de ácido isocítrico, um produto com baixo valor comercial. A excreção de ácido isocítrico pode ser controlada através da manipulação dos meios de cultura e das condições de agitação e aeração. Neste trabalho foi realizado um planejamento experimental  $2^2$  com três ensaios no ponto central analisando-se as variáveis agitação e aeração estudadas numa faixa de 460 a 740 rpm e 0,4 a 0,9 vvm, respectivamente. A relação de ácido cítrico : isocítrico foi de 1 : 1, e as análises não revelaram nenhuma significância das variáveis na faixa estudada. Além da variação das condições operacionais do processo, também foram estudadas fontes alternativas de carbono e nitrogênio para o crescimento celular e também para a produção de ácido cítrico. Como alternativa à glicose, foram utilizados melaço de cana e sacarose, e em

substituição ao  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foram utilizados água de maceração de milho, sulfato de amônia e uréia. Os testes preliminares indicaram que a água de maceração de milho combinada com o melaço apresenta um bom crescimento celular, mas afetam significativamente a produção de ácido cítrico, levando esta a níveis muito baixos.

## Summary

Citric acid (2-hydroxy-1,2,3-propane tricarboxylic acid) is found in many citric fruits. Using microbiological techniques it has been possible to obtain this acid by fermentation using *Aspergillus niger*, increasing its industrial application, differencing of others products previously obtained by microbiological process and actually obtained by chemical method. Today, citric acid is one of the most important organic acids produced by microbiological technique, responding for 60% of the total acidulant used in food industries. Indeed, it is a very expensive product, especially because the long fermentation time required, more than seven days. A alternative method is to use yeasts instead of fungi in the fermentative process, reducing the citric acid cost due to the fact that it is easier to operate when compared to another using fungi. Yeasts belonging to the genus *Candida* have citric acid production rates similar to fungi. However, the yeasts produce simultaneously isocitric acid, depending on the culture conditions. In this work an Experimental Design  $2^2$  with 3 central points was accomplished, changing the agitation (from 460 to 740 rpm) and the aeration (from 0.4 to 0.9 vvm). The ratio citric : isocitric acid found was about 1 and the statistical analysis showed no significant effect of this variables in the ratio studied. Besides, alternative sources of carbon and nitrogen, such as sugar cane molasses and sucrose (carbon source) and urea,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and corn syrup (nitrogen source), were studied. The results showed that sugar cane molasses combined with corn syrup present a high cellular growth but interfere in the citric acid production phase.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



## 1. Introdução

Atualmente a produção mundial de ácido cítrico supera anualmente as 800.000 toneladas (CARGILL BRASIL, 2000), sendo que seu consumo aumenta em cerca de 3,5 a 4,0% ao ano (Química e Derivados, 1997). Os maiores produtores são os Estados Unidos e a Europa e quase toda a produção é feita por via microbiológica. Do total de ácido cítrico produzido, 70% é consumido pela indústria de alimentos e representa cerca de 60% do mercado total de acidulantes e, do restante, cerca de 18% são utilizados na indústria farmacêutica (MATTEY, 1992).

O ácido cítrico é encontrado de forma abundante na natureza, pois resulta do metabolismo que ocorre naturalmente nos ciclos energéticos de todos os organismos vivos (BLAIR *et al*, 1993). O fato de o ácido cítrico ser muito utilizado na indústria de alimentos é devido às suas características, tais como baixa toxicidade, palatabilidade e por ser facilmente assimilável pelo organismo. Também é utilizado, juntamente com os seus sais, como tampão no preparo de compotas, geléias e gelatinas e também como estabilizante em vários produtos alimentícios (ROHR *et al*, 1983).

Devido ao seu poder seqüestrante e poder efervescente, é muito utilizado na indústria farmacêutica. Ao se combinar com carbonatos e bicarbonatos forma sais como o citrato trissódico, que é utilizado para preservar o sangue e como substituto de fosfato em detergentes. O ácido cítrico também é utilizado na limpeza de instalações industriais, pois possui baixo poder de ataque à superfície de aços especiais e possui a capacidade de agregar metais. Devido à sua grande demanda comercial, é interessante que se estude a possibilidade e viabilidade de produção do ácido cítrico de forma mais barata e eficiente que a forma atual, substituindo as culturas de fungos por culturas de leveduras,

aumentando a produtividade e minimizando os custos.

O ácido cítrico é considerado "GRAS" (Generally Recognized as Safe), ou seja, reconhecido como seguro para o uso em alimentos e é o principal acidulante usado em bebidas, como refrigerantes, chás, vinhos, sucos, pó para refrescos e isotônicos (BRADLEY *et al*, 1992).

O aumento do uso do ácido cítrico em escala industrial deveu-se à diminuição do custo de obtenção. Essa diminuição foi possível com o emprego da microbiologia e a conseqüente produção do ácido por fermentação.

Vários fungos são capazes de produzir o ácido cítrico. Normalmente são utilizadas algumas variedades de *Aspergillus niger* para sua produção. Esse processo, apesar de ser bastante atrativo, ainda é muito caro, pois requer um tempo muito grande de fermentação para a obtenção do ácido cítrico.

Muitos estudos têm mostrado que leveduras do gênero *Candida* podem produzir ácido cítrico em quantidades apreciáveis. As leveduras apresentam ainda algumas vantagens em relação aos fungos, como maior tolerância a altas concentrações de substrato, maior taxa de conversão, maior produtividade e permitem um maior controle do processo por serem de natureza unicelular (MATTEY, 1992).

As leveduras, no entanto, têm o inconveniente de produzir, simultaneamente ao ácido cítrico, o ácido isocítrico, um subproduto indesejável. Não existe nenhuma referência à produção de ácido isocítrico por *Aspergillus niger*, embora os padrões puros (Sigma) de origem fúngica utilizados como padrões cromatográficos em nossos experimentos indicaram a presença de 10% desse ácido. A razão de produção de ácido cítrico : ácido isocítrico por leveduras pode variar de 1 : 1 a 20 : 1 (esta conseguida com leveduras do gênero *Candida*).

Esta variação deve-se ao tipo de levedura utilizada, fontes de carbono, concentração de micronutrientes, agitação, aeração, temperatura etc (RANE & SIMS, 1993).

O desenvolvimento de uma tecnologia nacional na produção de ácido cítrico é muito importante, pois poderá ser uma grande alternativa para as indústrias de álcool e açúcar. A produção de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus* já foi muito estudada e encontra-se farto material na literatura sobre esse assunto. No entanto, nota-se uma crescente demanda de estudos sobre a produção de ácido cítrico por leveduras, devido a maiores vantagens de se trabalhar com leveduras ao invés de fungos. Estes estudos revelam que a *Candida lipolytica* Y 1095 sobressaiu-se em relação às outras leveduras, apresentando uma melhor produtividade (RANE & SIMS, 1993).

Este trabalho teve como objetivo estudar a influência da agitação e aeração na fase de produção de ácido cítrico, bem como o estudo de fontes alternativas de carbono (melaço de cana de açúcar e sacarose) e nitrogênio (uréia, sulfato de amônio e água de maceração de milho) nas fases de crescimento celular e produção de ácido cítrico.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Generalidades

A produção biológica de ácidos orgânicos é amplamente utilizada em escala industrial, sendo limitada a ácidos de origem microbiana e apresenta vantagens econômicas sobre a síntese química destes compostos (MATTEY, 1992).

Quando se decide o ácido a ser empregado em um alimento, deve-se levar em conta primeiramente seu custo e funcionalidade, seguidos da facilidade de manuseio e estocagem, propriedades de modificação de sabor, efeitos sinérgicos com outros ácidos ou outros componentes do alimento (GOLDBERG *et al.*, 1991). A sobrevivência das companhias produtoras de ácido depende muito do baixo custo de produção por se tratar de um mercado de preços bastante suscetível, com uma ligeira margem de lucro, aumento constante do número de companhias produtoras, expansão da produção pelas já existentes e constante aumento de produtos sintetizados quimicamente. Devido a esse quadro, deve-se buscar uma otimização da fermentação no que diz respeito ao rendimento (moles de ácido produzido por moles de carbono utilizado), produtividade (gramas de ácido produzido por litro de caldo de fermentação por hora) e concentração final de ácido (gramas por litro) obtido (GOLDBERG *et al.*, 1991).

Cerca de 70% do total de ácido cítrico produzido é utilizado na indústria de alimentos e, do restante, cerca de 18% utilizado na indústria farmacêutica e outras. Seu emprego representa 55-65% do mercado total de acidulantes, contra 20-25% do ácido fosfórico e 5% que corresponde ao ácido málico. O motivo do ácido cítrico ser tão utilizado na indústria de alimentos se deve ao fato de possuir

sabor ácido agradável, baixa toxicidade, facilidade de manuseio, estocagem e assimilação pelo organismo (MATTEY, 1992).

Seu uso depende de três propriedades: acidez, sabor e formação de sal. As aplicações são resumidas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Aplicações do ácido cítrico (MATTEY, 1992)

| Tipos de Indústria |                          | Propriedades Utilizadas   |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|
| Alimentos:         | Bebidas;                 | Acidulante, Flavorizante; |
|                    | Geléias, Compotas e      | Acidulante, Flavorizante; |
|                    | Conservas;               |                           |
|                    | Óleos e Gorduras;        | Antioxidante              |
|                    | Alimentos Congelados     | Antioxidante              |
| Farmacêutica:      | Produtos Efervescentes;  | Acidulante, Flavorizante; |
|                    | Preparados de Vitaminas; | Antioxidante;             |
|                    | Anticoagulantes;         | Seqüestrante, Tamponante; |
|                    | Preparados de Ferro;     | Formação de Sal;          |
|                    | Cosméticos               | Tamponante, Antioxidante; |
| Outros:            | Limpeza (metais)         | Seqüestrante;             |
|                    | Detergentes;             | Seqüestrante, Tamponante; |
|                    | Reagentes Fotográficos   | Tamponante                |

Em 1826 começou na Inglaterra a produção comercial de ácido cítrico a partir do citrato de cálcio preparado do suco de limão, importado da Itália. Criou-se então uma espécie de monopólio, o que resultou num produto caro. Outras fontes de obtenção de ácido cítrico começaram então a ser pesquisadas, como por via química e microbiológica (MATTEY, 1992).

Em 1893, WEHMER foi o primeiro a observar a presença de ácido cítrico como um subproduto de oxalato de cálcio produzido por uma cultura de *Penicillium glaucum* fermentando açúcar (citado por ROHR *et al.*, 1983). Posteriormente conseguiu isolar variedades de fungos mas, devido a problemas de contaminação e duração da fermentação, não foi possível transferir para a prática industrial (ROHR *et al.*, 1983).

Em 1913, ZAHOROSKY obteve a patente de produção de ácido cítrico usando *Sterigmatocystis nigra* (*Aspergillus niger*) (citado por ROHR *et al.*, 1983).

CURRIE, em 1917 (citado por ROHR *et al.*, 1983), ao detectar uma variedade de *Aspergillus niger* que podia acumular uma quantidade significativa de ácido cítrico a partir de um meio composto de açúcar, abriu caminho para a produção industrial. O autor determinou que altas concentrações de açúcar eram favoráveis para a ótima produção e que altos rendimentos eram atingidos quando o desenvolvimento do micélio era limitado (ROHR *et al.*, 1983).

A primeira planta industrial a produzir ácido cítrico com sucesso foi erguida na Bélgica em 1919. Depois dessa, em 1923, na cidade de New York, foi erguida a planta da *Pfizer*, baseada no trabalho desenvolvido por CURRIE (ROHR *et al.*, 1983).

O desenvolvimento da cultura submersa ocorreu somente em 1940, sendo que a produção de ácido cítrico era feita, inicialmente, em cultura de superfície (MATTEY, 1992; ROHR *et al.*, 1983).

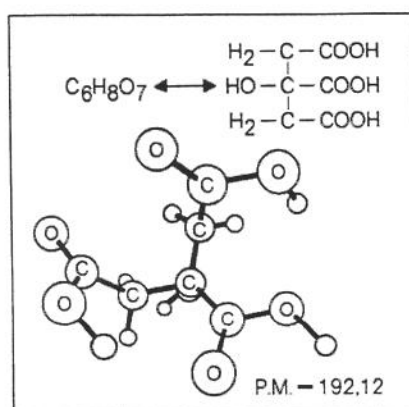
Somente em 1965 foi observado que leveduras, principalmente do gênero *Candida*, produziam quantias consideráveis de ácido cítrico e isocítrico crescendo em meio de carboidratos e, posteriormente, em n-alcanos (MATTEY, 1992; ROHR *et al.*, 1983). Mais tarde descobriu-se que esses microrganismos produziam ácido cítrico a partir de glicose e outras fontes de carbono semelhantes. Apesar deste fato ter despertado novas investigações para utilização industrial, ainda hoje culturas de *Aspergillus niger* com carboidratos como substrato são as práticas dominantes para a obtenção do ácido cítrico (ROHR *et al.*, 1983).

É utilizado como agente seqüestrante em processos industriais e como um preservativo anticoagulante do sangue, devido à capacidade de formar sais e complexar metais como ferro, cobre, manganês, magnésio e cálcio. O ácido cítrico é utilizado também como antioxidante em óleos e gorduras, reduzindo a oxidação catalisada por metais como ferro, atuando como agente quelante (MATTEY, 1992).

Atualmente no Brasil, o consumo de ácido cítrico é de 48 kg/hab/ano, enquanto que nos Estados Unidos esse valor chega a 240 kg/hab/ano (REVISTA CARGILL, 2000).

## 2.2. Propriedades

O ácido cítrico, quimicamente, é 2-Hidroxi-1,2,3 ácido propano tricarboxílico. Ocorre em duas formas estáveis: ácido cítrico mono-hidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) e ácido cítrico anidro ( $C_6H_8O_7$ ). Apresenta-se como cristais translúcidos e incolores, ou como pó granular fino e branco. É inodoro e com agradável sabor ácido. Cristaliza-se em soluções aquosas quentes e concentradas e solubiliza-se em água e etanol (MATTEY, 1992). Possui três  $pK$ 's, que, a 20 °C, apresentam os seguintes valores:  $pK_1 = 3,14$ ,  $pK_2 = 4,77$  e  $pK_3 = 6,39$ . A estrutura do ácido cítrico está apresentada na figura 1 (BLAIR *et al* 1993).



**Figura 3.1.** Estrutura do ácido cítrico

### 2.3. Mecanismo de Acúmulo de Ácido Cítrico

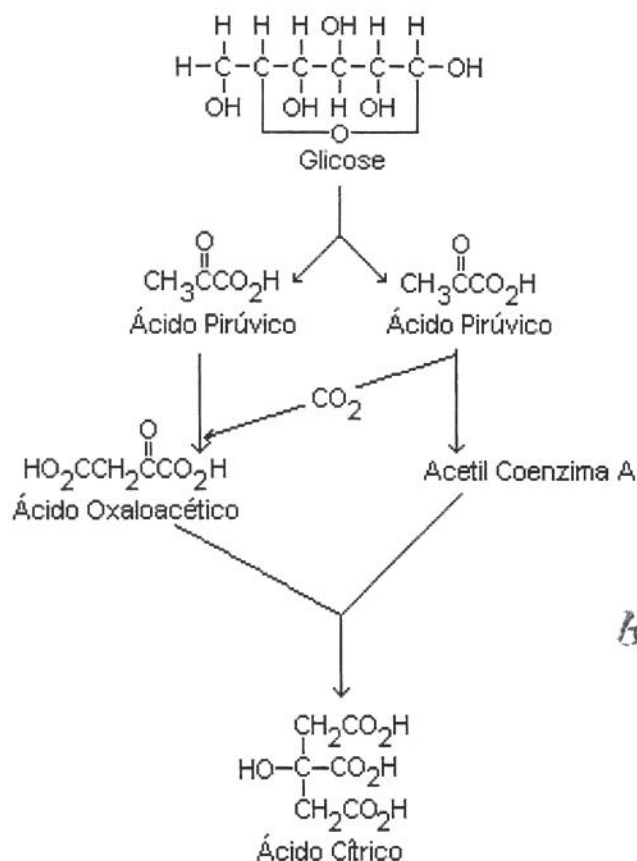
No ciclo do ácido cítrico, o acetato é oxidado a duas moléculas de óxido de carbono. Através de uma série de reações, o acetato forma uma molécula de citrato. Este é metabolizado, o que resulta na formação de  $\alpha$ -cetoglutarato, que depois é transformado em oxalacetato via fumarato (MILSON, 1987).

Para a formação de ácido cítrico, algumas enzimas desempenham um papel chave. Nos fungos essas enzimas são a aconitase e isocitrato dehidrogenase e, nas leveduras, a aconitase, responsável pela produção de ácido isocítrico (KAPOOR *et al.*, 1982; ROHR *et al.*, 1983). A adição de Ferro ( $\text{Fe}^{++}$ ) diminui o acúmulo de citrato e aumenta o de isocitrato, pois aumenta a atividade da aconitase. Em leveduras, a diminuição na concentração de ferro provoca uma inibição da aconitase e um acúmulo de citrato (KAPOOR *et al.*, 1982).

ROUKAS, em 1991, afirmou que o aumento da agitação resulta num aumento da atividade enzimática e acumulação de ácido cítrico por *Aspergillus niger* ATCC 9142, diminuindo a atividade de citrato sintetase e aumentando a atividade de aconitase e isocitrato dehidrogenase.

Um esquema de conversão da glicose em ácido cítrico está representado na figura 3.2 (BRADLEY *et al.*, 1992).





**Figura 3.2.** Conversão da Glicose em Ácido Cítrico

Foram analisados os caminhos metabólicos de produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* considerando-se três modelos. O modelo mais plausível foi o que coordena a carboxilação do piruvato com o ciclo do ácido tricarboxílico, ignorando o ciclo glioxilato (AIBA & MATSUOKA, 1979).

## 2.4. Cinética da Fermentação

Segundo GADEN (1955) o acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* se dá em duas fases distintas: numa primeira fase, onde o meio se encontra suprido de nitrogênio ocorre um crescimento celular sem que ocorra um acúmulo de ácido cítrico, enquanto que, num segundo momento, com o meio limitado em

nitrogênio, o crescimento celular é praticamente nulo e o ácido cítrico é excretado em grande quantidade.

As cinéticas de crescimento e de produção de ácido cítrico por *Saccharomycopsis lipolytica* D 1805 tendo glicose como substrato num fermentador de tanque agitado foram estudadas por BRIFFAUD & ENGASSER (1979). Foi verificado que a fase de crescimento exponencial termina com o esgotamento do nitrogênio amoniacal do meio e ocorre após uma fase lag de poucas horas. A produção de ácido cítrico iniciou após 20 horas de fermentação em que o nível de nitrogênio no meio encontrava-se muito baixo. Na fase de produção, o consumo de oxigênio se manteve constante, mas constatou-se ser menor do que na fase de crescimento celular.

Foram observadas mudanças morfológicas nas células de *Candida lipolytica* Y 1095 em função do tempo de fermentação em sistemas com reciclo de células. Num tempo inferior a 300 horas as células se apresentaram em forma esférica para elipsoidal, enquanto em estágios posteriores tornaram-se alongadas e depois filamentosas (RANE & SIMS, 1995).

## **2.5. Microrganismos**

Devido ao fato de o ácido cítrico ser um produto do metabolismo primário, não é excretável em quantidades apreciáveis em condições naturais. Por este motivo, uma excreção apreciável deveria ser considerada como uma irregularidade do metabolismo, causada por mutações genéticas, ou por desigualdades metabólicas drásticas. Assim, somente alguns microrganismos produzem o ácido cítrico em quantidades apreciáveis - fungos e leveduras em meio de fermentação sob determinadas condições (ROHR *et al.*, 1983).

É importante que se busque uma alternativa ao processo fermentativo tradicional que emprega culturas de *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico. Este processo, apesar de ser amplamente utilizado, apresenta alguns problemas, como a degeneração do ácido cítrico depois de um determinado período de tempo, e, mais importante, a necessidade de um longo período de fermentação para produção de quantidades apreciáveis de produto (maior do que sete dias), o que acaba por encarecê-lo (GUTCHO, 1973).

Algumas variedades de leveduras do gênero *Candida* têm capacidade de produzir quantidades apreciáveis de ácido cítrico em fermentação aeróbia em meio aquoso de carboidratos sem, no entanto, serem tão eficientes como as variedades produtoras de *Aspergillus niger* (GUTCHO *et al.*, 1973). A vantagem do uso de leveduras sobre fungos está na capacidade destas em suportar grandes concentrações de substrato, taxa de conversão mais rápida, uso de melaço de grau bruto sem prévio tratamento devido à insensibilidade de íons presentes nesse meio e permitir um melhor controle do processo fermentativo por serem as leveduras de natureza unicelular. Outra grande vantagem do uso de leveduras é que estas permitem o desenvolvimento de um processo contínuo de fermentação (MATTEY, 1992; MILSON, 1987).

Outro fator de considerável importância no processo fermentativo por leveduras é a facilidade em se conseguir um melhoramento genético desses microrganismos aumentando assim a sua produtividade e também em resistir a longas e contínuas operações numa alta velocidade de conversão sob elevadas condições aeróbicas (SHAH *et al.*, 1993).

No entanto, as leveduras apresentam uma desvantagem em relação aos fungos, que é a produção simultânea de ácido cítrico e isocítrico, este último um subproduto indesejável. A taxa de ácido cítrico : ácido isocítrico varia entre 1: 1 a 20 : 1. Esta variação está relacionada com o tipo de microrganismos, fonte de

carbono, aeração, temperatura, pH e concentração de micronutrientes. Diversas variedades de leveduras são utilizadas para a produção de ácido cítrico, porém as espécies de *Candida* são as mais utilizadas em estudos para a produção de ácido cítrico. A produção de ácido cítrico foi avaliada utilizando-se quatro tipos de levedura (*Candida lipolytica* Y 1095, *Yarrowia lipolytica* Y 7576, *Candida guilliermondii* Y 488 e *Saccharomycopsis lipolytica* DRL 99) em batelada. Os resultados obtidos mostraram que a variedade *Candida lipolytica* Y 1095 pode apresentar rendimentos comparáveis aos obtidos com *Aspergillus niger* em cultura em batelada (RANE & SIMS, 1993). Em 1994 os mesmos pesquisadores obtiveram uma taxa de ácido cítrico : isocítrico da ordem de 13 : 1 para *Candida lipolytica* Y 1095, um resultado muito melhor do que os conseguidos com variedades selvagens de leveduras.

## **2.6. Matéria-prima**

Para a produção comercial de ácido cítrico têm-se empregado diversas fontes de carboidrato, como materiais feculentos, melaço e hidrocarbonos (ROHR *et al.*, 1983). Os fatores que determinam qual o material a ser utilizado são o seu custo e também os pré-tratamentos que este material venha a requerer para poder ser utilizado (MATTEY, 1992). A utilização de melaço de diferentes origens causa uma diferença considerável na produção de ácido cítrico. A concentração de açúcares em melaço deve ser diluída para cerca de 15 a 20 % e o seu pH ajustado para cerca de 5,5 a 6,5 (KAPOOR *et al.*, 1982). Tem-se verificado que melaço de beterraba apresenta um rendimento maior na produção de ácido cítrico do que o melaço de cana, devido ao fato deste possuir traços de metais que retardam a síntese de ácido cítrico (GREWAL & KALRA, 1995). Para a produção de ácido cítrico por leveduras, tem-se utilizado uma variedade de substrato que incluem glicose, acetato, hidrocarbonos, melaços, álcoois, ácidos graxos e óleos naturais. Verificou-se, porém a produção simultânea de ácido isocítrico, o que

acabou por conduzir a tentativas de desenvolvimento de espécies mutantes que acumulem somente ácido cítrico (KAPOOR *et al.*, 1982).

## **2.7. Condições de Cultivo**

O processo fermentativo para produção de ácido cítrico compreende dois estágios, um de crescimento e outro de produção. Para se desenvolverem, os organismos necessitam de micronutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e ainda, no caso de produção de ácido cítrico, adição de vários elementos para a produção do mesmo (KAPOOR *et al.*, 1982). O rendimento de ácido cítrico está relacionado diretamente com a concentração destes elementos. O processo fermentativo também é influenciado por outros fatores, como aeração, temperatura e pH (GREWAL & KALRA, 1995).

### **2.7.1. Fontes de Carbono**

Geralmente, os açúcares representam a fonte de carbono mais facilmente metabolizada por microrganismos. A glicose ou sacarose são os açúcares mais utilizados. Para *Aspergillus niger*, a quantidade inicial de açúcar tem se mostrado como fator determinante na quantidade de ácido cítrico produzido, bem como também na produção de outros ácidos orgânicos. Estudos demonstraram que a natureza da fonte de açúcar empregada influencia a atividade enzimática e a produção de ácido cítrico. Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a produção de ácido cítrico por leveduras, dentre elas podem ser citados n-parafinas, óleos naturais, ácidos graxos, glicerol, etanol, glicose, sacarose e lactose. Essas fontes de carbono oferecem resultados diferentes dependendo da variedade de levedura com a qual se está trabalhando (MATTEY, 1992).

### 2.7.2. Fonte de Nitrogênio

O nitrogênio é fornecido, geralmente, na forma de sulfato de amônio, extrato de levedura ou nitrato. Segundo MATTEY (1992), a concentração ideal de nitrogênio varia de 1 a 3 g/L, e a adição de quantidades maiores provavelmente não é economicamente viável. Outros estudos mostraram que a produção de ácido cítrico por *Candida* sp. Y-1 e sua mutante *Candida* MA92 diminui rapidamente com o aumento da concentração de nitrogênio. A produção de ácido cítrico por leveduras ocorre somente sob condições limitadas de nitrogênio, na qual a reprodução e o crescimento celular são eliminados.

Foi verificado também que culturas de *Candida lipolytica* Y 1095 permaneceram estáveis por aproximadamente 600 horas em um fermentador com reciclo de células. Isto indica que a levedura é capaz de suportar as deficiências de nitrogênio requeridas para a produção de ácido cítrico, e que é resistente aos impactos mecânicos requeridos para o bombeamento no reciclo de células (RANE & SIMS, 1995).

Estudos recentes realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Unicamp mostraram que a quantidade ideal de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para o crescimento celular é 1,0 g/L, enquanto que para o extrato de levedura, a quantidade ideal é 5,0 g/L (COSTA, 2000).

### 2.7.3. Fonte de Fósforo

Outro importante fator na produção de ácido cítrico diz respeito à presença de fosfato no meio de fermentação. Altas concentrações de fosfato aumentam o crescimento celular e diminuem a produção de ácido cítrico (GREWAL & KALRA, 1995). Não existem muitos estudos a respeito, mas a concentração ótima de fosfato no meio provavelmente se encontra entre 1 e 2,5 g/L (MATTEY, 1992). Estudos ainda não publicados, realizados no Laboratório de

Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp dão conta de que a concentração ideal de fosfato se encontra na faixa de 0,2 a 0,5 g/L. Através de um Planejamento Fatorial Fracionado (COSTA, 2000), verificou-se que para o meio de pré-fermentação e de crescimento a variação de 0,2 a 1 g/L de fosfato de potássio não teve nenhum efeito significativo na produção de células. Assim, em termos econômicos a concentração de 0,2 g/L deste sal é a mais adequada.

#### 2.7.4. pH de Fermentação

O pH é extremamente importante para a produção de ácido cítrico. Valores baixos de pH conduzem à formação de ácido cítrico, enquanto que valores mais elevados levam à formação de ácido oxálico e glucônico (ROHR *et al.*, 1983). Geralmente, a faixa de pH varia entre 1,5 e 8,0 em se tratando de leveduras, sendo que o ótimo se localiza na faixa entre 2,0 e 7,0 (GUTCHO, 1973). A produção de biomassa não sofreu alteração para um pH entre 2,4 e 4,8 em fermentação de ácido cítrico por leveduras do gênero *Candida* (RANE & SIMS, 1993). Estes mesmos pesquisadores conseguiram resultados bastante satisfatórios em fermentação conduzida a pH 5,5 e que foi utilizado em nosso trabalho.

#### 2.7.5. Aeração e Agitação

A produção de ácido cítrico é estimulada por um aumento na aeração em fermentação submersa. O efeito na produção de ácido cítrico quando se interrompe a aeração depende da fase na qual a aeração foi interrompida e também da duração da interrupção (ROHR *et al.*, 1983). Em fermentação em batelada alimentada com *Candida lipolytica* Y 1095, observou-se um consumo maior de oxigênio durante a fase de crescimento e uma diminuição na fase de produção inicial de ácido cítrico. O ácido isocítrico aparentemente não sofre nenhuma alteração devido à mudança na concentração de oxigênio. Pesquisas



comprovaram que um aumento na concentração de oxigênio dissolvido, em culturas de *Candida lipolytica* Y 1095 em fermentador com reciclo de células, se reflete num aumento na produção de ácido cítrico e no consumo de oxigênio específico. Também foi verificado que a produção de ácido cítrico se sobressaiu sobre o ácido isocítrico para altas concentrações de oxigênio dissolvido (RANE & SIMS, 1994).

#### 2.7.6. Metais

Analisando-se traços de metais como zinco, ferro e manganês, percebeu-se que somente o manganês causou uma redução drástica na produção de ácido cítrico, enquanto que os outros dois não se mostraram muito prejudiciais (ROHR *et al.*, 1983).

A concentração do íon férrico afeta a produção de ácido cítrico e isocítrico por leveduras. Pesquisas realizadas com *Yarrowia lipolytica* N 1 revelam que para concentrações de íons férricos menores do que 0,05 mg/L não ocorre formação de ácido cítrico ou isocítrico. Para concentrações até 0,14 mg/L a produção de ácido cítrico e isocítrico se dá na proporção 1 : 0,95. Com concentrações de ferro entre 0, 14 a 2,5 mg/L a proporção passa para 2 : 1 e para concentrações acima de 4,8 g/L a produção de ácido isocítrico é maior que a de ácido cítrico, chegando à proporção de 3 : 1. Essas diferenças são atribuídas à *aconitase hidratase*. A atuação dessa enzima depende da concentração de ferro no meio. Para concentrações menores do que 0,2 mg/L a atividade enzimática fica em torno de 0,06  $\mu\text{mol/min}$  por grama de proteína e ocorre uma formação maior de citrato. Em concentrações maiores de ferro, entre 2,5 e 4,8 g/L, a atividade enzimática chega a 0,48-0,68  $\mu\text{mol/min}$  por grama de proteína e forma-se predominantemente isocitrato. Esse fato é explicado pela formação de peróxido na ausência de ferro, que inibe a ação da *aconitase* (KANZOLOVA *et al.*, 1996).



Meios limitados por potássio e magnésio resultaram numa lenta taxa inicial de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* IMK2. Ainda se verificou uma diminuição no acúmulo de citrato em meios limitados por potássio, sendo que as células que cresceram nesse meio apresentaram um acúmulo de glicogênio intracelular (McKAY *et al.*, 1994).

#### 2.7.7. Outros

A temperatura ótima de fermentação de ácido cítrico para *Aspergillus niger* situa-se entre os 25 e 30 °C. Um aumento na temperatura de incubação acima de 30 °C provoca uma diminuição na quantidade de ácido cítrico produzido. Em se tratando de leveduras, a fermentação deve ser conduzida na faixa entre 22 e 30 °C, sendo o tempo de fermentação em torno de 3 a 6 dias (KAPOOR *et al.*, 1982). A temperatura ideal para o crescimento de *Candida lipolytica* Y 195 foi estudada e verificou-se que a 27 °C o crescimento é mais favorecido (RANE & SIMS, 1993).

Foram obtidos aumentos na produtividade em variedades de *Candida* com a adição de fluoroacetato no meio de fermentação (TANI *et al.*, 1990). Também a quantidade de tiamina no meio influencia a excreção de ácido cítrico por leveduras, sendo que em quantidade suficiente é produzida uma grande quantia de ácido cítrico e, em condições restritas, ocorre uma redução de produção de ácido cítrico com um acúmulo de  $\alpha$ -cetoglutarato (KAPOOR *et al.*, 1982).

JIANLONG *et al.* (1998) observaram que a adição de fitato ao meio de produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* aumenta a produção de ácido cítrico e o consumo de açúcares redutores totais, além de aumentar a atividade da enzima piruvato carboxilase que favorece o acúmulo de ácido cítrico. O efeito da adição de fitato depende da concentração e do estágio da fermentação em que é

adicionado. A concentração ideal se situa em torno de 10 g/L e resulta num aumento de 3,1 vezes na acumulação de ácido cítrico (JIANLONG *et al.*, 1998).

## **2.8. Processo Industrial**

Para a produção de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* podem ser usados métodos submerso, em superfície líquida ou por estado sólido, também chamado de processo Koji.

### **2.8.1. Processo em Superfície**

Em escala industrial de larga escala, foi o primeiro método a ser empregado, sendo introduzido por volta de 1920. Métodos mais sofisticados foram desenvolvidos com um custo de mão-de-obra menor. Apesar disso, este método ainda é bastante utilizado devido aos custos com energia serem menores (MATTEY, 1992). Este método consiste em se inocular os fungos em um grande número de bandejas rasas que são empilhadas em estantes em câmaras de fermentação. As fontes de carbono mais utilizadas são sacarose refinada ou crua, xarope de cana "high test" ou melaços de beterraba. A incubação é feita inoculando-se os esporos, adicionados como uma suspensão ou introduzidos com uma injeção de ar sobre as bandejas. Usa-se normalmente um grande número de esporos para a inoculação, enquanto a temperatura é mantida em torno dos 28-30 °C e a umidade relativa entre 40-60 %.

Devido ao curso normal da fermentação, o pH normalmente cai em torno de 2,0. se esse valor for menor do que 3,0 pode ocorrer a formação de ácido glucônico e oxálico. A aeração é um fator importante, pois além de fornecer oxigênio para os microrganismos, também controla a umidade relativa e a temperatura da fermentação. A duração da fermentação pode ser de 8 a 15 dias, dependendo da variedade e dos níveis iniciais de açúcar. O rendimento do

processo é profundamente influenciado por fatores como aeração, umidade, profundidade do meio, pH, traços de metais e temperatura. Os rendimentos para este processo são na faixa de 70-75% (ROHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992; GREWAL & KALRA, 1995).

#### 2.8.2. Processo Koji

É um processo semelhante ao processo de superfície. Foi desenvolvido no Japão e é o processo mais simples para a obtenção do ácido cítrico. Farelo de arroz, resíduos fibrosos de batata doce e resíduos de frutas são as matérias-primas mais utilizadas. O pH é mantido na faixa de 5,5, com temperatura em torno dos 30 °C. O processo é completado entre 4 e 5 dias e a inoculação é feita por meio de pulverização dos esporos. Neste processo os rendimentos são relativamente baixos, por causa da dificuldade de se controlar os parâmetros de fermentação e traços de metais (ROHR *et al.*, 1983; MATTEY, 1992; GREWAL & KALRA, 1995).

#### 2.8.3. Processo Submerso

A utilização deste processo está aumentando consideravelmente. Dentre as vantagens, destacam-se as altas taxas de produção alcançadas, a necessidade de menos mão-de-obra para operação e utilização de um espaço menor para produção (MATTEY, 1992). No processo submerso existe a possibilidade de uma faixa maior de substrato e de um melhor controle de fermentação. Neste processo o micélio do fungo fica submerso e disperso por toda a fase líquida. Os substratos utilizados nesse processo incluem glicose, sacarose, melaços de cana e de beterraba (MILSOM, 1987). Podem ser utilizados reatores agitados ou fermentadores em torre. As fermentações são realizadas em batelada, batelada alimentada ou em processos contínuos. Geralmente as indústrias utilizam-se do processo em batelada com tanque agitado (ROHR *et al.*, 1983).

Para o desenvolvimento de um processo contínuo de produção de ácido cítrico por leveduras, devem ser levados em conta alguns fatores, a saber: a natureza unicelular das leveduras, sua tolerância a deficiências de nitrogênio e resistência mecânica ao bombeamento. A concentração de biomassa no fermentador deve ser mantida constante, visto que as leveduras só produzem ácido cítrico em condições limitadas de nitrogênio, quando a reprodução e o crescimento celular estão suspensos. Foi feita uma avaliação da produtividade de ácido cítrico em três tipos de fermentadores, batelada, batelada alimentada e com reciclo de células, utilizando *Candida lipolytica* Y 1095. O fermentador em batelada apresentou um rendimento um pouco maior quando comparado aos outros dois, enquanto que a produtividade volumétrica foi 13% maior em batelada alimentada e 16% maior em fermentador com reciclo de células. As taxas de ácido cítrico : isocítrico não apresentaram diferenças significativas entre os três tipos de fermentadores. Os maiores rendimentos, produtividade volumétrica e produtividade específica ocorreram numa taxa de diluição de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  em fermentação com reciclo de células (RANE & SIMS, 1995).

## **2.9. Transporte de massa em processos fermentativos**

Em fermentações submersas, deve ser facilitado o suprimento ao microrganismo de quantidades adequadas de nutrientes existentes no líquido e de oxigênio existente nas bolhas de ar. No caso do transporte de oxigênio temos as seguintes resistências:

- Resistência da fase gasosa entre o seio do gás na bolha e a interface gás-líquido ( $1/k_1$ );
- Resistência da interface gás-líquido ( $1/k_2$ );
- Resistência da fase líquida, desde a interface até o seio do líquido ( $1/k_3$ );

- Resistência através da fase líquida ( $1/k_4$ );
- Resistência entre o líquido e a interface líquido-célula ( $1/k_5$ );
- Resistência intercelular ( $1/k_6$ );
- Resistência à reação do oxigênio com as enzimas respiratórias das células ( $1/k_7$ ).

A quantidade de oxigênio ( $N$ ) que atravessa cada um desses estágios por unidade de tempo de área associada ao estágio é inversamente proporcional à sua resistência e diretamente proporcional à diferença de concentração de oxigênio através dele.

$$N = k\Delta C \quad (3.1)$$

Quando a área das interface não pode ser medida, substitui-se, na expressão anterior,  $N$  pelo produto  $Na$ , medindo-se, desse modo, a quantidade de oxigênio trocada por unidade de tempo e de volume de líquido, escrevendo-se, portanto,

$$Na = ka\Delta C \quad (3.2)$$

Nesse caso, o produto  $ka$  é usado como se fosse uma variável só, sendo  $Na$  a quantidade de oxigênio trocada na unidade de tempo e de volume do líquido.

Em regime permanente, o fluxo de matéria ( $Na$ ) deve ser o mesmo através dos sete estágios citados; os valores de  $ka$  e de  $(\Delta C)$  para cada um devem, pois, ajustar-se de que seu produto fique constante em todos eles.

Geralmente, algumas resistências à passagem de oxigênio são agrupadas de maneira a facilitar seu estudo, pois muitas vezes é difícil, ou mesmo impossível, medir as diferenças de concentração em cada estágio. Assim,  $1/k_1$ ,  $1/k_2$ ,  $1/k_3$  são comumente consideradas em conjunto, e um coeficiente global é definido:

$$Na = K_L a (C^* - C) \quad (3.3)$$

Nesta expressão,  $C^*$  é a concentração de oxigênio, na fase líquida, que estaria em equilíbrio com a quantidade de gás existente na fase gasosa, e  $C$  é a concentração média de oxigênio dissolvido na fase líquida.

As resistências  $1/k_4$  a  $1/k_7$  dependem pouco do estado de agitação, desde que esta não seja muito pequena.

Quando se trabalha acima de uma concentração crítica de oxigênio dissolvido, denominada, concentração crítica, a velocidade de respiração é independente da concentração de oxigênio dissolvido disponível no meio e proporcional à concentração de células presentes no instante.

Considerando-se o que se disse sobre a velocidade de respiração de microrganismos, pode-se estabelecer um balanço material de oxigênio líquido. Essa fase recebe oxigênio das bolhas, de acordo com a equação 3.3 e perde oxigênio devido à respiração das células. Sendo  $C_m$  a concentração de células no líquido, o oxigênio consumido é dado por  $k_r C_m$ , onde  $k_r$  é uma constante de proporcionalidade denominada velocidade específica de respiração. Em regime permanente, sendo constante a quantidade de oxigênio dissolvida no líquido deve-se ter

$$K_L a (C^* - C) = k_r C_m \quad (3.4)$$

Se a velocidade de consumo de oxigênio pelas células for diferente da velocidade com que o oxigênio é dissolvido, o regime estacionário, e o balanço material de oxigênio será descrito por (BRUNELLO & CONCONE, 1986):

$$\frac{dC}{d\theta} = K_L a (C^* - C) - k_r C_m \quad (3.5)$$

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Introdução**

A produção de ácido cítrico por leveduras ocorre em duas fases: uma de crescimento e outra de produção propriamente dita. A regulação de uma ou de outra fase está relacionada à 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, a Metodologia do Planejamento Experimental foi utilizada para verificar o efeito da agitação e aeração nas fases de crescimento e de produção de ácido cítrico e isocítrico produzidos na fermentação.

Os meios de crescimento e produção foram otimizados em frascos aletados, através de planejamento experimental (COSTA, 2000). Estes meios otimizados foram utilizados para o estudo em fermentador, variando-se os parâmetros agitação e aeração, fundamentais no estudo de produção do ácido cítrico. Também foram feitos estudos com fontes alternativas de carbono e nitrogênio para se verificar o crescimento celular e também sua interferência na produção de ácido cítrico.

#### **3.2 . Planejamento Experimental**

A Metodologia do Planejamento Experimental e Análise de Superfície de Resposta é 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 e 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 afetada 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.

### **3.3. Condução da fermentação**

#### **3.3.1. Microrganismo**

Utilizou-se a cepa da levedura *Candida lipolytica* Y 1095, fornecida pelo Northern Regional Research Laboratory. As linhagens das culturas são mantidas inclinadas em tubos de ensaio contendo meio YM (*yeast malt agar*) a 4°C.

#### **3.3.2. Preparo do inóculo**

A utilização de alçadas da cultura de levedura proporciona uma variação no número de microrganismos inoculados em cada ensaio. Visando diminuir essa variação, foi realizada uma fermentação em “shaker” para padronização do inóculo. Este foi preparado por transferência asséptica da colônia (de 3 a 4 dias de idade) em YM agar (tabela 1) para 100 mL de meio, cuja composição está descrita na tabela 4.2, em erlenmeyer aletado de 500 mL (COSTA, 2000). A suspensão de células foi incubada à temperatura de 27°C em “shaker” a 150 rpm. Após 48 horas, 5 mL de meio fermentado foram distribuídos 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 4.1. Meio YM agar.

| <b>Componentes</b>  | <b>Composição (gL<sup>-1</sup>)</b> |
|---------------------|-------------------------------------|
| Glicose             | 10,0                                |
| Peptona             | 5,0                                 |
| Extrato de malte    | 3,0                                 |
| Extrato de levedura | 3,0                                 |
| Agar                | 20,0                                |

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

### 3.3.3. Pré-fermentação

Dois tubos de ensaio, contendo 10 mL de caldo congelado, foram utilizados para inocular um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de pré-fermentação, resultando em um volume final de 120 mL. Este procedimento foi realizado em duplicata, sendo que a porcentagem do volume de inóculo para o volume inicial do fermentador foi de 10 %. Após 48 horas de incubação em “shaker” a 150 rpm e 27°C, o conteúdo dos frascos foi transferido como inóculo para o fermentador. A composição do meio de pré-fermentação foi otimizado em trabalhos anteriores e encontra-se descrita na tabela 4.2 (COSTA, 2000).

Tabela 4.2. Composição do meio de pré-fermentação.

| <b>Componentes</b>              | <b>Composição (gL<sup>-1</sup>)</b> |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| Glicose                         | 50,0                                |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 1,0                                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,2                                 |
| Extrato de levedura             | 5,0                                 |

A fase de crescimento foi otimizada em Planejamentos Experimentais anteriores (Costa, 2000). Verificou-se, pelos resultados desses planejamentos,

que o meio ideal de crescimento celular, isto é, que depois de 48 h de incubação apresenta uma concentração mínima de glicose e nitrogênio residual e um crescimento celular máximo é o mesmo utilizado na pré-fermentação encontra-se descrito na tabela 4.2.

#### 3.3.4. Ensaios Preliminares

Foram realizadas quatro fermentações preliminares em fermentador com o objetivo de familiarização com os equipamentos e de avaliar a melhor faixa de agitação e aeração para posterior realização de um planejamento experimental envolvendo essas duas variáveis.

Todos os ensaios em fermentador foram feitos utilizando-se um fermentador BioFlo III Batch/Continuous Fermentator (New Brunswick Scientific Co., Inc.) equipado com controle de agitação, temperatura, pH, oxigênio dissolvido (menos para os quatro ensaios preliminares) e anti-espumante, e todos os componentes das fermentações foram diluídos em H<sub>2</sub>O destilada e esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

A primeira fermentação foi conduzida em um fermentador de 1,5 L. Como o volume deste se mostrou pequeno e ocorreu formação de espuma na fase de crescimento, optou-se, a partir da segunda fermentação, por um fermentador maior, com volume útil de 3 L e adicionar-se anti-espumante ao meio.

Nas duas últimas fermentações o meio de produção foi alterado em virtude do mesmo ter sido otimizado neste período em frascos aletados através de planejamento experimental (Costa, 2000).

As condições de agitação, aeração e pH, assim como, a composição do meio de produção utilizado em cada uma das fermentações, encontram-se

descritos na tabela 4.3, sendo que estes eram adicionados ao meio quando a glicose se encontrava esgotada. O meio de crescimento utilizado foi o mesmo descrito na tabela 4.2.

A temperatura foi mantida em 27 °C, o controle do pH foi feito através da adição de NaOH 2 N não sendo necessária a adição de ácido, visto que neste processo fermentativo o pH tende apenas a baixar. Este controle, no entanto, não foi possível na primeira fermentação, pois ocorreram problemas com o eletrodo de pH.

Para a primeira fermentação preparou-se um meio de 100 mL de inóculo para 1 L de volume do fermentador.

Após o crescimento o meio foi drenado até 900 mL e 200 mL de meio de produção foram adicionados ao volume anterior, resultando em 1,1 L de volume final.

Para a segunda fermentação utilizou-se um fermentador maior, de 3 L, com 2,2 L de meio. A adição de anti-espumante (Aratrop), permitiu uma maior agitação. Houve a adição de dois meios de crescimento, sendo o segundo adicionado no tempo 96 h. O primeiro e o segundo meio de produção foram acrescentados nos tempos 167 h e 303,5 h, respectivamente.

Na terceira fermentação ocorreu troca do meio de produção após o esgotamento da glicose e do nitrogênio, preparou-se então uma solução com meio concentrado, num volume de 200 mL, o qual foi adicionado a 2 L de meio de crescimento no fermentador, resultando num volume final de 2,2 L. O primeiro e o segundo meio de produção foram adicionados nos tempos 71,5 h e 189,5 h respectivamente.

Para a quarta fermentação o procedimento seguido foi o mesmo descrito para a terceira, variando-se apenas a aeração, que passou para 0,5 vvm. 100 mL do meio foram retirados do fermentador a cada adição de meio e transferidos assepticamente para um frasco de 500 mL aletado e encubado em “shaker” a 27 °C e 150 rpm a fim de se comparar os dois processos.

Tabela 4.3 Condições de Fermentação dos Ensaio Preliminares

| Meio de produção     |                                   |                             | Condições                                             |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|
| Componentes          | Concentração (g L <sup>-1</sup> ) |                             |                                                       |
| Primeira Fermentação | Glicose                           | 54,55                       | Agitação = 500 rpm                                    |
|                      | Ext. Lev.                         | 0,016                       |                                                       |
|                      | NH <sub>4</sub> Cl                | 0,055                       |                                                       |
|                      | Tiamina                           | 2,73 x 10 <sup>-4</sup>     | Aeração = 1vvm                                        |
|                      | MgSO <sub>4</sub>                 | 0,11                        |                                                       |
|                      | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   | 0,25                        |                                                       |
| Segunda Fermentação  | Idem à Primeira Fermentação       | Idem à Primeira fermentação | Agitação = 700 rpm<br>Aeração = 0,25 vvm<br>pH = 5,35 |
| Terceira Fermentação | Glicose                           | 75                          | Agitação = 700 rpm<br>Aeração = 0,25 vvm<br>pH = 5,35 |
|                      | MgSO <sub>4</sub>                 | 0,2                         |                                                       |
|                      | Tiamina                           | 0,8 x 10 <sup>-4</sup>      |                                                       |
| Quarta Fermentação   | Idem à Terceira Fermentação       | Idem à Terceira Fermentação | Agitação = 700 rpm<br>Aeração = 0,5 vvm<br>pH = 5,35  |

### 3.3.5. Ensaio do Planejamento Experimental

As fermentações do planejamento experimental foram realizadas utilizando-se um fermentador de 3 L com um volume útil de 2 L. O inóculo e a pré-fermentação foram realizados como descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.3. O meio de crescimento utilizado encontra-se descrito na tabela 4.2, e o meio de produção era composto somente de 75 g/L de glicose (COSTA, 2000). O pH foi mantido em 5,50

(RANE & SIMS, 1994) pela adição de NaOH 2 N e a espuma foi controlada pela adição de anti-espumante comercial Aratrop.

A agitação e aeração foram variadas de acordo com a técnica de planejamento experimental, como descrito na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Matriz do Planejamento Experimental

| Ensaio | Agitação | Aeração | Agitação (rpm) | Aeração (vvm) |
|--------|----------|---------|----------------|---------------|
| 1      | -1       | -1      | 460            | 0,40          |
| 2      | 1        | -1      | 740            | 0,40          |
| 3      | -1       | 1       | 460            | 0,90          |
| 4      | 1        | 1       | 740            | 0,90          |
| 5      | 0        | 0       | 600            | 0,65          |
| 6      | 0        | 0       | 600            | 0,65          |
| 7      | 0        | 0       | 600            | 0,65          |

### 3.3.6. Fermentação com controle de oxigênio dissolvido

Foi realizada também uma fermentação na qual o oxigênio dissolvido no meio foi controlado e mantido em 70% através da variação da agitação.

As condições de inóculo, meio de crescimento, produção, pH e temperatura foram as mesmas do item 4.3.5 e a aeração mantida em 2,0 vvm.

### 3.3.7. Estudo de fontes alternativas de carbono e nitrogênio para crescimento celular de *Candida lipolytica* Y 1095

Paralelamente aos ensaios realizados em fermentador, foram realizados testes em "shaker" com o objetivo de verificar o crescimento de *Candida lipolytica* Y 1095 utilizando-se matérias-primas alternativas e mais baratas, como melaço de cana e sacarose como fontes de carbono; e uréia,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e água de maceração de milho como fontes de nitrogênio. Os meios

utilizados com esses nutrientes encontram-se descritos na tabela 4.5. As porcentagens de carbono e nitrogênio nos meios modificados foram mantidas de acordo com o meio padrão (tabela 4.2), sendo que foram substituídos a glicose e o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Para cada ensaio preparou-se 200 mL de meio, os quais foram divididos em dois frascos aletados de 500 mL, tamponados com 10 g/L de  $\text{CaCO}_3$  (HAMISSA *et al.*, 1980) e incubados por 48 h a 27°C e 150 rpm.

A análise do melaço indicou 65% de açúcares redutores totais (análise realizada em laboratório). A água de maceração de milho foi previamente centrifugada a 10000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi adicionado ao meio como contendo 3% de nitrogênio (BIANCHI, 1990).

As amostras foram retiradas após 48 h e o  $\text{CaCO}_3$  foi solubilizado pela adição de HCl. Após a solubilização (pH 2,5) foi feita a leitura da densidade ótica para a determinação da massa seca produzida.



Tabela 4.5. Meios alternativos utilizados para o teste de crescimento.

|                                                 | Composição dos meios            |                                   |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
|                                                 | Componentes                     | Concentração (g L <sup>-1</sup> ) |
| Meio Padrão                                     | Glicose                         | 50                                |
|                                                 | Extrato de levedura             | 5                                 |
|                                                 | NH <sub>4</sub> Cl              | 1                                 |
|                                                 | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,2                               |
| Meio 1                                          |                                 |                                   |
| Fonte de Carbono: Sacarose                      | Sacarose                        | 50                                |
| O restante, igual ao meio padrão.               |                                 |                                   |
| Meio 2                                          |                                 |                                   |
| Fonte de Carbono: Melaço                        | Melaço                          | 76,92                             |
| O restante, igual ao meio padrão.               |                                 |                                   |
| Meio 3                                          |                                 |                                   |
| Fonte de Nitrogênio: Uréia                      | Uréia                           | 0,56                              |
| O restante, igual ao meio padrão.               |                                 |                                   |
| Meio 4                                          |                                 |                                   |
| Fonte de Nitrogênio: Sulfato de Amônio          | Sulfato de amônio               | 1,24                              |
| O restante, igual ao meio padrão.               |                                 |                                   |
| Meio 5                                          |                                 |                                   |
| Fonte de Nitrogênio: Água de Maceração de Milho | Água de Maceração de Milho      | 8,72                              |
| O restante, igual ao meio padrão.               |                                 |                                   |
| Meio 6                                          |                                 |                                   |
| Fonte de Nitrogênio: Água de Maceração de Milho | Água de Maceração de Milho      | 8,72                              |
| Fonte de Carbono: Melaço                        |                                 |                                   |
| O restante, igual ao meio padrão.               | Melaço                          | 76,92                             |

Devido ao resultado satisfatório apresentado no ensaio que utilizava melaço e água de maceração de milho quanto ao crescimento celular (item 5.2), foi realizado um teste em frascos agitados a fim de se avaliar a viabilidade de se trabalhar essas fontes alternativas de carbono e nitrogênio no que diz respeito à produção de ácido cítrico quando comparados com a produção do meio padrão utilizados em nossos ensaios. Os ensaios foram conduzidos em frascos aletados de 500 mL com um volume de meio de 100 mL e incubados a 27 °C e 150 rpm por 190 horas. A composição dos meios encontra-se descrita na tabela 4.6.

Tabela 4.6. Meios de crescimento e produção

| Meios de Crescimento                                   | Meios de Produção               |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Melaço: 76,92 gL <sup>-1</sup>                         | Glicose: 75 gL <sup>-1</sup>    |
| Extrato de Levedura: 5 gL <sup>-1</sup>                |                                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 0,2 gL <sup>-1</sup> | Melaço: 115,38 gL <sup>-1</sup> |
| AMM: 8,72 gL <sup>-1</sup>                             |                                 |
| Glicose: 50 gL <sup>-1</sup>                           | Glicose: 75 gL <sup>-1</sup>    |
| Extrato de Levedura: 5 gL <sup>-1</sup>                |                                 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 0,2 gL <sup>-1</sup> | Melaço: 115,38 gL <sup>-1</sup> |
| NH <sub>4</sub> Cl: 1,0 gL <sup>-1</sup>               |                                 |

### 3.3.8. Teste de uma nova cepa de leveduras

Para uma melhor comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com os da literatura, foram realizados dois ensaios paralelos utilizando a metodologia proposta por RANE & SIMS (1994) com duas cepas de leveduras de *Candida lipolytica* Y 1095, uma adquirida em 1998 utilizada em todos os ensaios anteriores, e a outra em maio de 2000, adquiridas junto ao Northern Regional Research Laboratory, a fim de se verificar algum problema com a cepa que vinha sendo utilizada.

Os meios de inóculo, crescimento e produção foram os mesmos utilizados por RANE & SIMS (1994) e se encontram na tabela 4.7. As condições operacionais também foram as utilizadas por esses dois pesquisadores, a saber: o inóculo foi conduzido em dois erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de meio. Após seis dias de incubação mantidos a 27 °C e 200 rpm, o inóculo foi transferido assepticamente para o fermentador contendo 1,8 L de meio, resultando num volume total de 2,0 L. O fermentador foi equipado com controle de espuma, pH, temperatura e oxigênio dissolvido. A agitação foi fixada em 800 rpm, a aeração em 2 vvm e o pH em 5,50 controlado através da adição de NaOH 2 N ao meio. A espuma foi controlada pela adição de anti-espumante Aratrop.

Tabela 4.7. Composição dos meios para os ensaios utilizando a metodologia de RANE & SIMS (1994)

| Tipo de Meio        | Componente                      | gL <sup>-1</sup>     |
|---------------------|---------------------------------|----------------------|
| Meio de Inóculo     | Glicose                         | 50,0                 |
|                     | Extrato de Levedura             | 0,1                  |
|                     | NH <sub>4</sub> Cl              | 0,5                  |
|                     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,3                  |
|                     | MgSO <sub>4</sub>               | 0,2                  |
|                     | Tiamina*                        | 1x10 <sup>-5</sup>   |
| Meio de Crescimento | Glicose                         | 30,0                 |
|                     | Extrato de Levedura             | 2,0                  |
|                     | NH <sub>4</sub> Cl              | 2,0                  |
|                     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,5                  |
|                     | MgSO <sub>4</sub>               | 0,2                  |
|                     | Tiamina*                        | 5x10 <sup>-4</sup>   |
| Meio de Produção    | Glicose                         | 50,0                 |
|                     | Extrato de Levedura             | 0,015                |
|                     | NH <sub>4</sub> Cl              | 0,05                 |
|                     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,25                 |
|                     | MgSO <sub>4</sub>               | 0,1                  |
|                     | Tiamina*                        | 2,5x10 <sup>-4</sup> |

\* adicionada ao meio esterilizado através de filtro 0,2 µm

### 3.4. Métodos Analíticos

As amostras das fermentações (5 mL) foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação de açúcar residual, nitrogênio e ácidos cítrico e isocítrico produzidos.

#### 3.4.1. Determinação de nitrogênio

Para a determinação da amônia residual na fermentação foi utilizado o método enzimático colorimétrico baseado na hidrólise da uréia a íons amônia e CO<sub>2</sub> pela enzima urease. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e

### 3.4.5. Determinação dos Coeficientes de Rendimento

Os coeficientes de rendimento (Y) foram calculados de acordo com a equação 4.1.

$$Y = \frac{P_2 - P_1}{S_1 - S_2} \quad (4.1)$$

Onde:

$P_1$  = quantidade de ácido no meio no momento da adição do meio de produção;

$P_2$  = quantidade máxima de ácido produzido;

$S_1$  = quantidade de glicose presente no meio após a adição do meio de produção;

$S_2$  = quantidade de glicose presente no meio na máxima produção de ácido.

### 3.4.6. Determinação do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio Dissolvido para a fase líquida ( $K_L a$ )

Partindo-se da equação 3.5, e tomando uma fermentação em regime estacionário, temos (BRUNELLO & CONCONE, 1986):

$$K_L a(C^* - C) = k_r C_m \quad (4.2)$$

Levando-se em conta a figura 4.1, para o período em que se inicia a aeração temos, de acordo com a equação 3.5:

$$\frac{dC}{d\theta} = K_L a(C^* - C) - k_r C_m$$

Admitindo que o sistema seja homogêneo e que o eletrodo esteja medindo uma concentração média de oxigênio dissolvido, e tomando paralelamente um valor médio para  $C^*$ , então

$$C = -\frac{1}{K_L a} \left( \frac{dC}{d\theta} + k_r C_m \right) + C^* \quad (4.3)$$

Como  $C^*$  e  $K_r C_m / K_L a$  são constantes, fazemos

$$C^* - \left( \frac{k_r C_m}{K_L a} \right) = A \quad (4.4)$$

substituindo-se a equação 4.4 na equação 4.3 e integrando, temos:

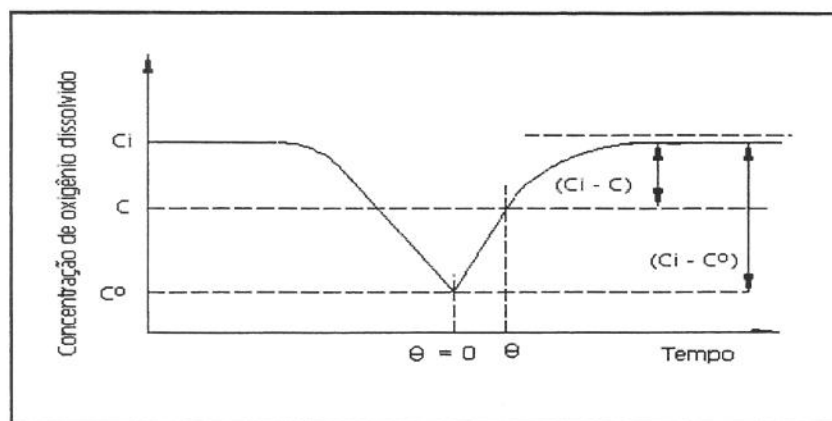
$$\ln \frac{(A - C^0)}{(A - C)} = K_L a \theta \quad (4.5)$$

No regime estacionário temos, pela equação 4.2 que  $K_L a(C^* - C) = k_r C_m$  onde  $C$  tem um valor particular, chamado de  $C_i$ . Portanto, isolando  $C_i$ :

$$C^* - \left( \frac{k_r C_m}{K_L a} \right) = C_i = A \quad (4.6)$$

Substituindo a equação 4.6 na equação 4.5, temos:

$$\ln \left( \frac{C_i - C^0}{C_i - C} \right) = K_L a \theta \quad (4.7)$$



**Figura 4.1.** Variação da Concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, em regime variável

Onde:

$C_i$  = concentração de oxigênio dissolvido junto a interface

$C$  = concentração média de oxigênio dissolvido

$C^0$  = concentração média de oxigênio dissolvido no instante zero

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Ensaios preliminares

Inicialmente foram conduzidos alguns ensaios em fermentador para se avaliar as melhores condições para a realização do planejamento experimental. Estes quatro ensaios em fermentador de bancada foram bastante úteis para o aprendizado e familiarização com os equipamentos utilizados.

Os resultados obtidos nesta fase preliminar estão apresentados nas figuras 5.1 a 5.4d e nas tabelas A1 a A4 do Anexo A.

O primeiro ensaio foi conduzido com 1 L de meio. Durante a fase de crescimento ocorreram vários problemas devido, principalmente à excessiva formação de espuma e também à ineficácia do antiespumante utilizado. Sendo assim, a agitação não pôde ser mantida constante durante a realização do ensaio, tendo, portanto, de ser diminuída constantemente toda vez que o meio espumava. No tempo de 255 h de fermentação, ocorreu um vazamento no fermentador o que acarretou o abandono do ensaio sem que a glicose se esgotasse por completo. Neste ensaio houve problema também com o eletrodo para o controle do pH.

Para a segunda fermentação foram mantidas as condições do primeiro ensaio mas optou-se por aumentar a concentração de antiespumante e utilizar um fermentador de 3 L com 2,2 L de meio. Apesar dessas medidas, ocorreu um novo vazamento durante a fase de crescimento o que diminuiu drasticamente a concentração celular do meio, obrigando, com isso, a adição de um segundo meio de crescimento no tempo de 96 horas. O primeiro meio de produção foi adicionado com 167 horas de fermentação e o segundo num tempo de 305 horas.



Utilizando-se dos resultados obtidos por Costa (2000) no que diz respeito à otimização dos meios de crescimento e produção, foi conduzido um terceiro ensaio, no qual o antiespumante foi substituído por outro (Aratrop, adquirido junto a Usina Ester), possibilitando uma agitação mais elevada. Foram adicionados dois meios de produção, nos tempos de 71,5 e 189,5 horas. Verificou-se, no entanto, que a produção de ácido cítrico foi menor que a produção de ácido isocítrico.

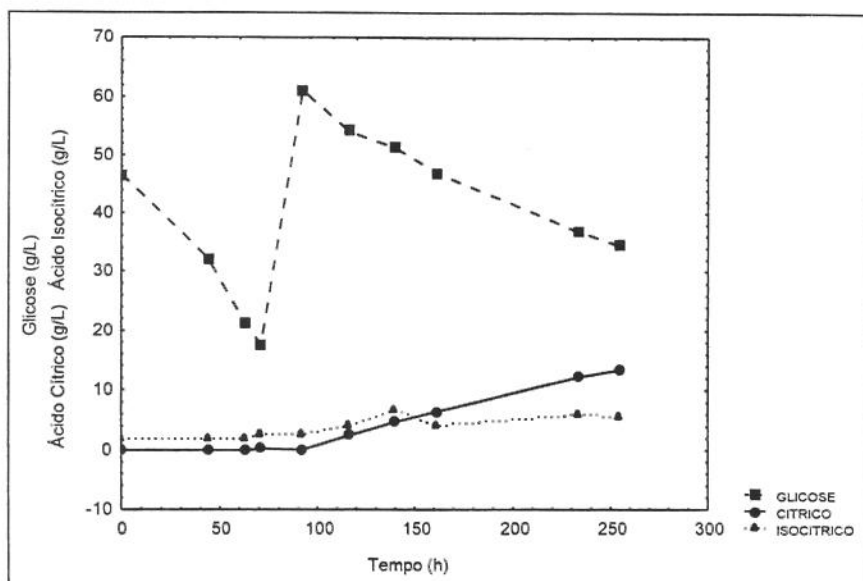
O quarto ensaio foi conduzido nas mesmas condições do terceiro, sendo que a aeração passou de 0,25 vvm para 0,5 vvm. O resultado mostrou uma melhora significativa na produção de ácido cítrico, sendo esta maior que a produção de ácido isocítrico. A razão de ácido cítrico/ácido isocítrico obtida neste ensaio foi de aproximadamente 1,60.

Durante este ensaio, foi medida a quantidade de NaOH (2N) consumida a fim de se manter o pH constante em 5,35. Os meios de produção foram adicionados nos tempos de 47,5 e 166 horas. Foi realizado um teste paralelo em frascos agitados. Assim, após cada adição, 100 mL de meio eram retirados assepticamente do fermentador e transferidos para frascos aletados de 500 mL que foram mantidos a 27 °C e 150 rpm a fim de se verificar possíveis diferenças que poderiam haver entre os dois tipos de fermentação. Percebeu-se, porém que o consumo de glicose, a produção de ácido cítrico e ácido isocítrico, bem como o perfil de concentração de massa seca foram o mesmo tanto no fermentador como em frascos agitados.

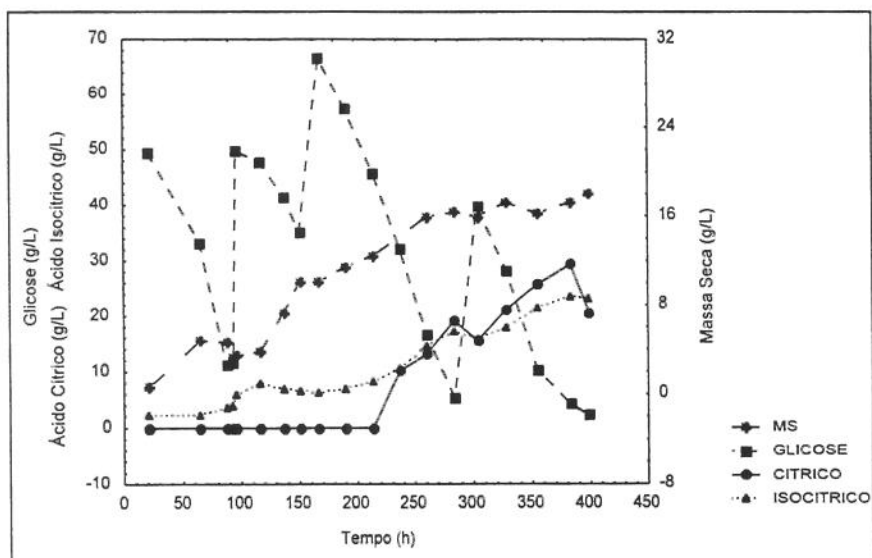
Como já havia sido observado que, após o esgotamento da glicose ocorria um acentuado aumento do pH, resolveu-se fazer o seguinte teste: após o

esgotamento do segundo meio de produção, em torno de 380 h, deixou-se o fermentador funcionando por cerca de 40 h. ao final desse período, quando a leitura do pH encontrava-se em 5,53, 100 ml de uma solução de glicose a 200 g/l foi adicionada ao meio, resultando numa concentração final de 10 g/l. no entanto, após algumas horas verificou-se que o pH continuava subindo. No tempo de 454 horas, quando o pH já se encontrava em 5,65, foi adicionada ao meio 350 mL de uma solução de 300 g/L de glicose, resultando numa concentração final de 45 g/L de glicose. O pH, então, tornou a baixar, estabelecendo-se novamente em 5,35. Durante o período em que a glicose se encontrava esgotada, foi possível observar que a concentração de ácido cítrico diminuiu em cerca de 7 g/L, enquanto que a concentração de ácido isocítrico permaneceu constante durante esse período, e que ambos voltaram a subir quando foi adicionada glicose ao fermentador.

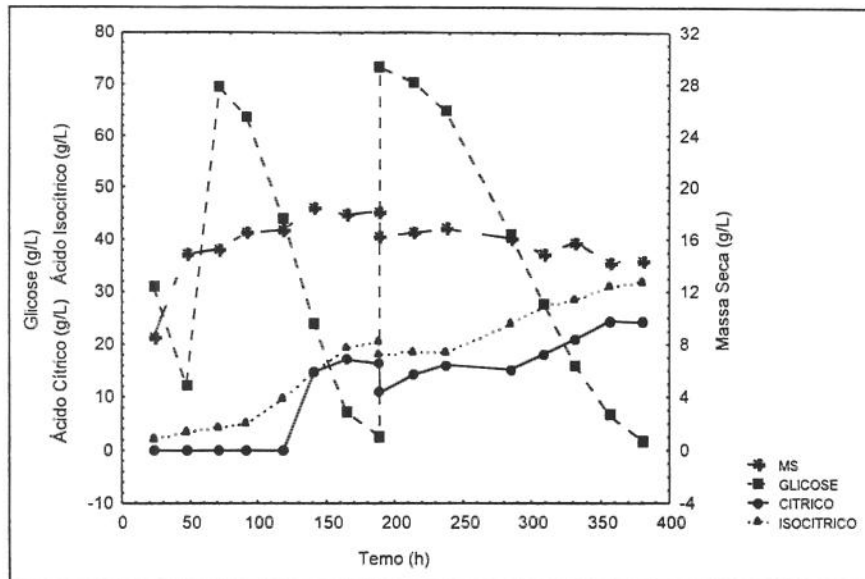
A viabilidade celular medida após o término dos ensaios, inclusive após as 500 horas de fermentação da quarta fermentação, indicou 100% de células viáveis, sendo que no início da fermentação as células apresentavam uma forma esférica, e, ao final da fermentação, uma forma alongada e filamentosa.



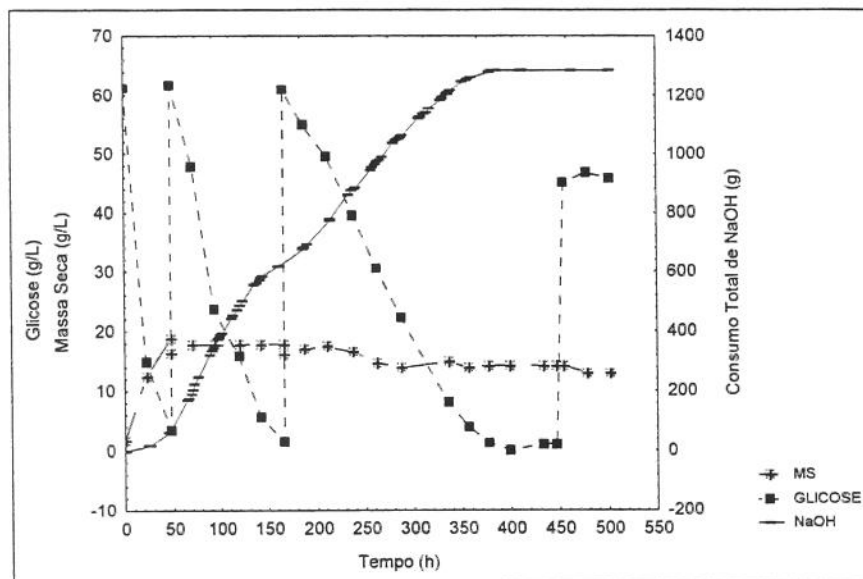
**Figura 5.1.** Consumo de glicose e produção de ácido cítrico e ácido isocítrico do primeiro ensaio preliminar em fermentador de bancada



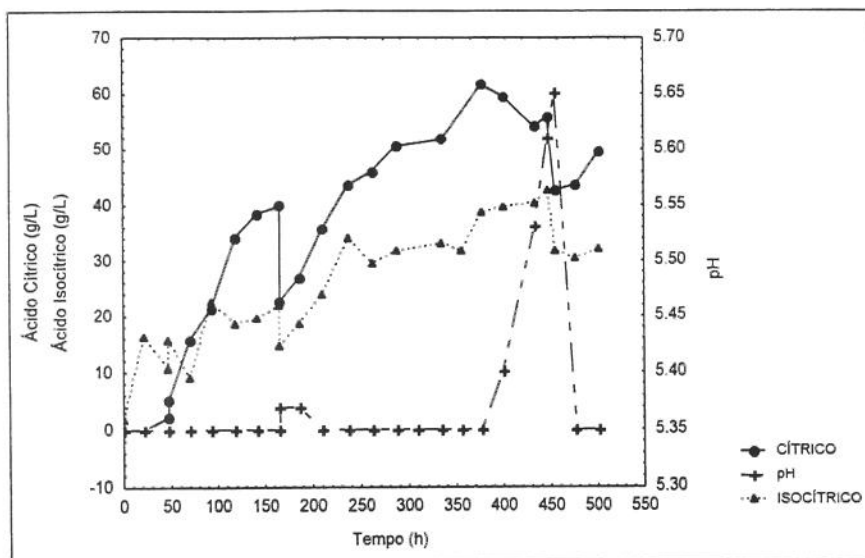
**Figura 5.2.** Consumo de glicose, evolução da massa seca e produção de ácido cítrico e ácido isocítrico do segundo ensaio preliminar em fermentador de bancada



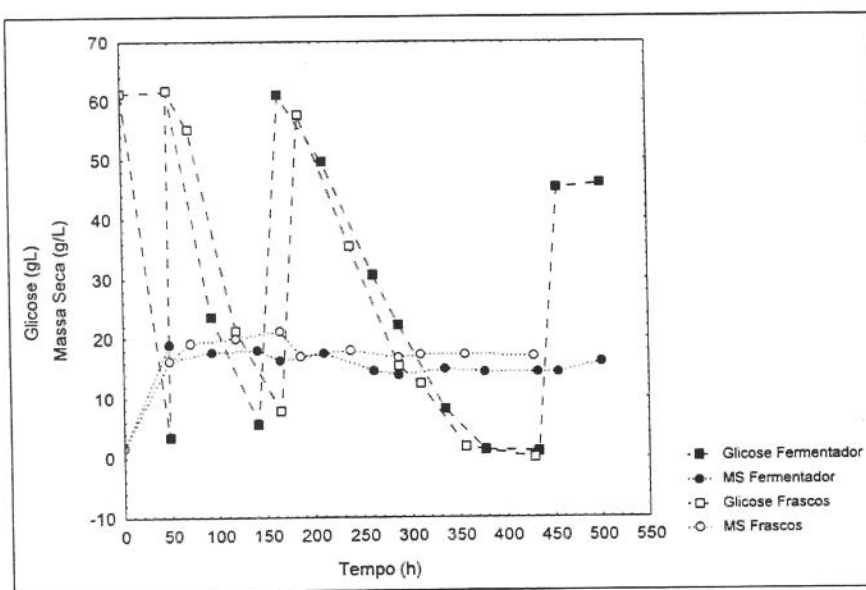
**Figura 5.3.** Consumo de glicose, evolução da massa seca e produção de ácido cítrico e ácido isocítrico do terceiro ensaio preliminar em fermentador de bancada



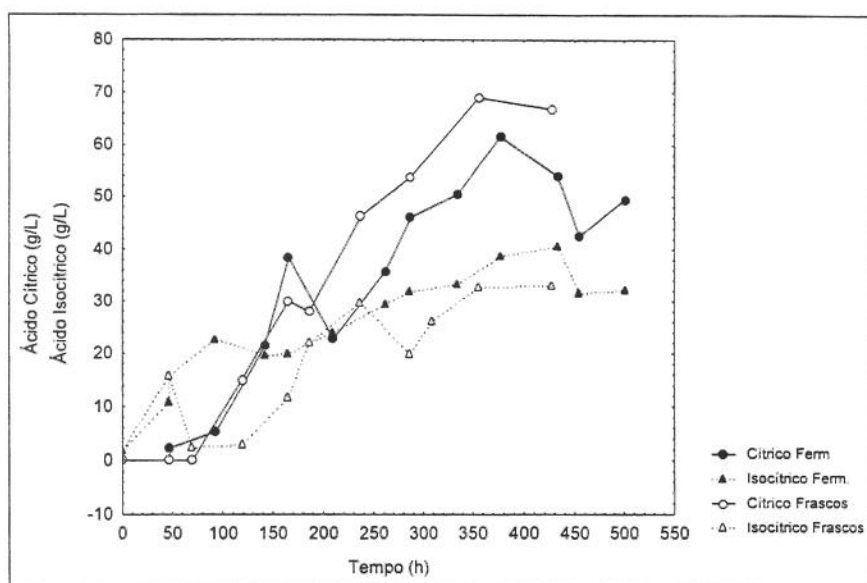
**Figura 5.4a.** Consumo de glicose e de NaOH e evolução da massa seca para a quarta fermentação preliminar em fermentador de bancada.



**Figura 5.4b.** Evolução do pH e produção de ácido cítrico e isocítrico para a quarta fermentação preliminar em fermentador de bancada.



**Figura 5.4c.** Comparação do consumo de glicose e massa seca em fermentador e frasco agitado da quarta fermentação preliminar.



**Figura 5.4d.** Comparação da quantidade de ácido cítrico e isocítrico produzidos em fermentador e em frascos agitados da quarta fermentação preliminar

A tabela 5.1 apresenta os coeficientes de rendimento para as 4 fermentações preliminares realizadas.

Tabela 5.1. Coeficientes de rendimento de ácido cítrico e ácido isocítrico das fermentações preliminares.

| Fermentação | $Y_{cit1}^*$ | $Y_{iso1}^*$ | $Y_{cit2}^{**}$ | $Y_{iso2}^{**}$ |
|-------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 1           | 0,50         | 0,11         | -               | -               |
| 2           | 0,31         | 0,18         | 0,14            | 0,19            |
| 3           | 0,25         | 0,25         | 0,19            | 0,19            |
| 4           | 0,57         | 0,10         | 0,65            | 0,40            |

\* Valores referentes ao primeiro meio de produção adicionado

\*\* Valores referentes ao segundo meio de produção adicionado

#### 4.2. Resultados dos testes da etapa de crescimento e de produção utilizando fontes alternativas de carbono e nitrogênio

No estudo da etapa de crescimento os resultados obtidos são apresentados na tabela 5.2. Observa-se que a sacarose não é metabolizada pela levedura e que a água de maceração de milho apresentou um resultado da mesma ordem de grandeza do meio padrão (cerca de 10 g/L), revelando-se uma boa alternativa ao  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , enquanto que o melão mostrou ser a melhor fonte alternativa de carbono.

Tabela 5.2. Resultado de concentração celular (massa seca) para os diferentes meios do teste de crescimento

| Meio              | MS (g L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|-------------------------|
| Padrão            | 10,31                   |
| Meio 1 (Sacarose) | 1,03                    |
| Meio 2 (Melão)    | 5,59                    |
| Meio 3 (Ureia)    | 7,11                    |
| Meio 4 (Sulfato)  | 7,10                    |
| Meio 5 (AMM)      | 10,81                   |

Baseado nestes resultados, um novo teste foi executado, dessa vez substituindo-se a glicose e o  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por melão e água de maceração de milho, respectivamente como apresentado na tabela 4.5 (Meio 6). As condições de agitação e temperatura foram as mesmas do teste anterior e os resultados estão apresentados na tabela 5.3.

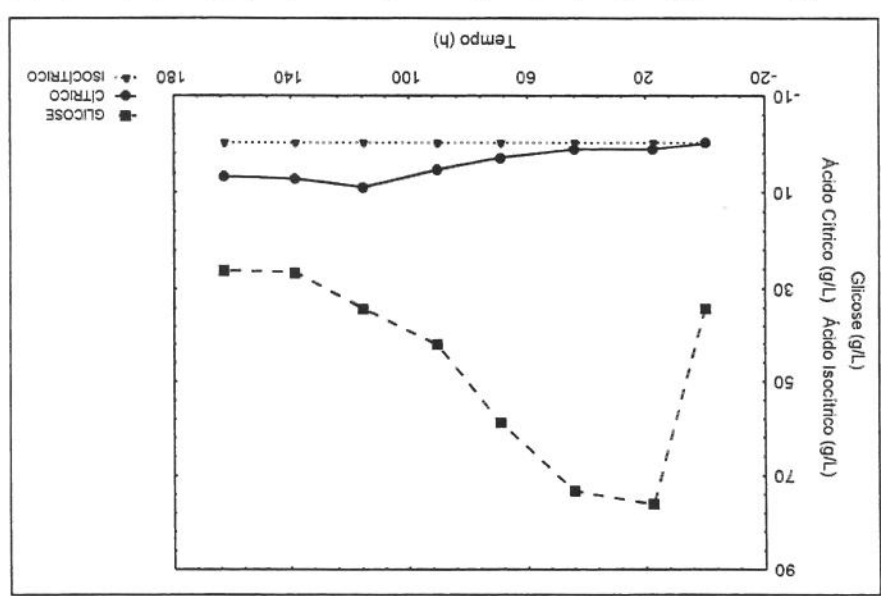
Tabela 5.3. Resultado de concentração celular (massa seca) para os diferentes meios do teste de crescimento

| Meio                 | MS (g L <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|-------------------------|
| Padrão               | 14,01                   |
| Meio 6 (Melão + AMM) | 13,04                   |

De acordo com a tabela 5.3, o meio contendo melão e água de maceração de milho mostrou-se viável para o desenvolvimento do microrganismo em estudo, sendo a massa seca produzida comparável ao meio padrão utilizado

Pode-se observar que houve uma produção de ácido cítrico muito pequena, o que indica a possibilidade do melão, ou a água de maceração de milho conterem inibidores (sais) em concentrações que prejudicam a produção de ácido cítrico.

**Figura 5.5.** Evolução da produção de ácido cítrico, ácido isocítrico e consumo de açúcar.  
Meio de crescimento: melão + AMM  
Meio de produção: glicose 75 g/L



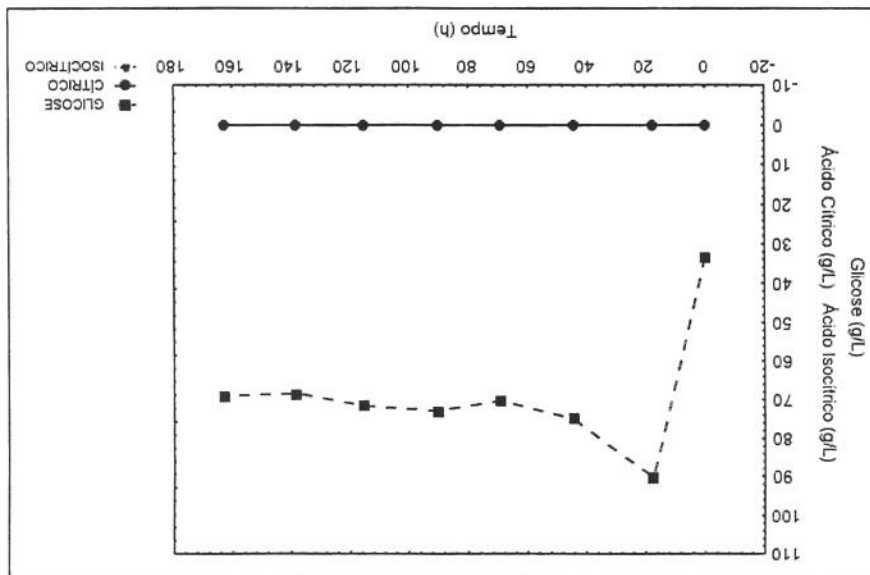
Os resultados desse teste são apresentados nas figuras 5.5 a 5.8.

foram realizados de acordo com o descrito no item 4.3.7. a influência que esse meio teria sobre a produção de ácido cítrico. Os ensaios cítrico. Assim, foram realizados quatro ensaios em frascos agitados para verificar maceração de milho podem conter sais que interferem na produção de ácido atualmente. No entanto, é importante salientar que o melão e a água de



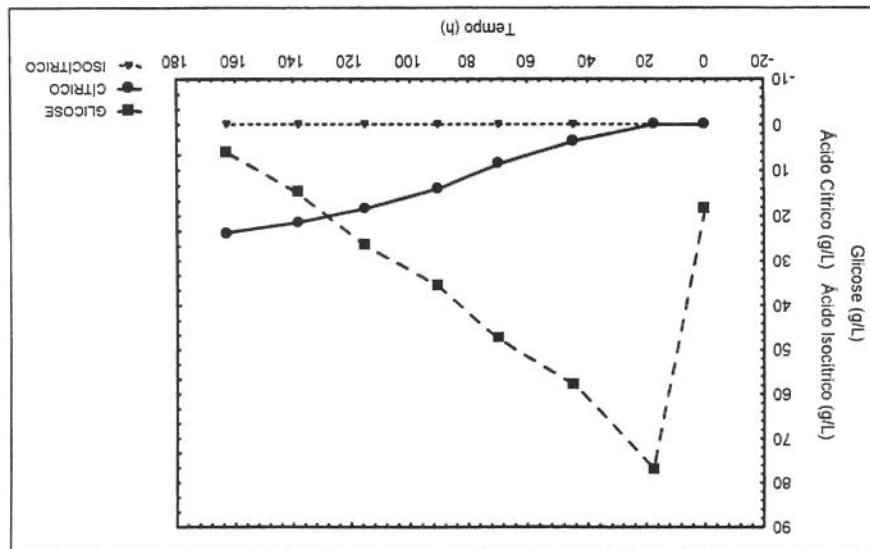
A figura 5.6 apresenta a fermentação na qual o meio de produção composto exclusivamente de glicose foi substituído por um contendo somente melão de cana de açúcar. A ausência de produção de ácido faz com que exista, de fato, algum inibidor no meio composto por melão.

**Figura 5.6.** Evolução da produção de ácido cítrico, ácido isocítrico e consumo de açúcar.  
Meio de crescimento: melão + AMM  
Meio de produção: melão 115,38 g/L



A figura 5.7 representa o meio padrão utilizado em nossos ensaios. Pode-se notar o esgotamento da glicose, a produção de ácido cítrico e a ausência de ácido isocítrico, fato este que pode ser explicado pelas condições de aeração e agitação dos frascos serem mais brandas do que as condições do fermentador.

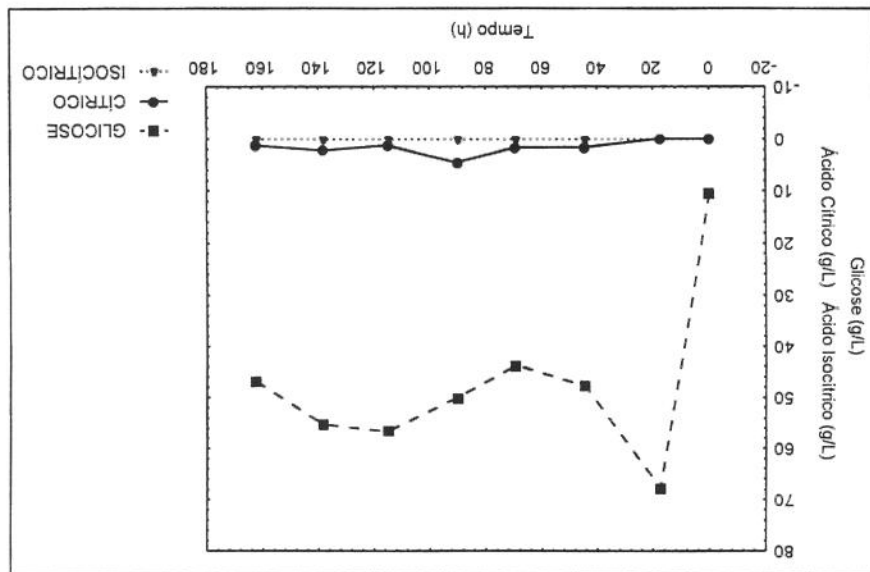
**Figura 5.7.** Evolução da produção de ácido cítrico, ácido isocítrico e consumo de açúcar.  
Meio de crescimento: padrão  
Meio de produção: glicose 75 g/L



Portanto, pode-se concluir que o melão de cana bruto e a água de maceração de milho não podem ser utilizados diretamente para a produção de ácido cítrico. Deve-se, portanto, em trabalhos futuros, continuar os estudos com esses nutrientes e, se for o caso, estudar um pré-tratamento do melão e de água de maceração de milho para que possam ser utilizados como fonte de carbono e nitrogênio pelos microrganismos, caso haja interesse comercial na utilização destes produtos.

Utilizando o melão somente como meio de produção e mantendo-se o meio padrão de crescimento, conduziu-se o ensaio mostrado na figura 5.8. Observa-se uma tímida produção de ácido cítrico logo após a adição do meio de produção, mas após algumas horas a produção cessa, permanecendo assim até o final do ensaio.

**Figura 5.8.** Evolução da produção de ácido cítrico, ácido isocítrico e consumo de açúcar.  
Meio de crescimento: padrão  
Meio de produção: melão 115,38 g/L



Pelas figuras pode-se observar que não ocorre crescimento celular durante a fase de produção de ácido cítrico, o que nos permite concluir, de fato, que o ácido cítrico só é excretado quando a reprodução celular se acha inibida. Observa-se também que até aproximadamente 100 horas de fermentação as quantidades de ácido cítrico e isocítrico produzidas são as mesmas sendo que, após esse período, ocorre um acúmulo maior de ácido cítrico. Os valores de  $K_La$  encontrados são da mesma ordem de grandeza dos valores encontrados por RANE & SIMS (1993) e pode-se observar que na fase de produção o valor do  $K_La$  é maior do que no início da fermentação, voltando a diminuir quando a glicose do meio começa a ser esgotada.

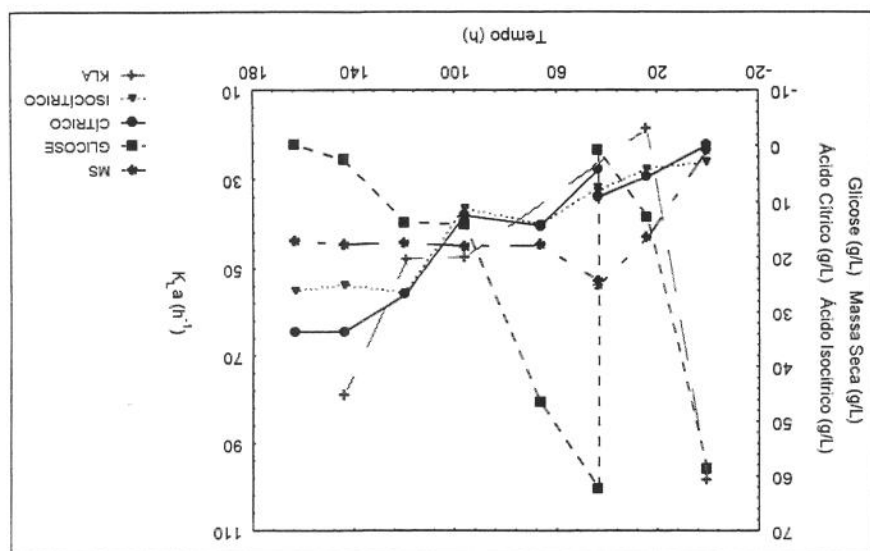
As figuras 5.9 a 5.15 e as tabelas A5 a A11 do Anexo A apresentam o consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico, massa celular e os valores de  $K_La$  das fermentações para os ensaios realizados no planejamento.

Foram realizados sete ensaios de acordo com um planejamento experimental  $2^2$  com três pontos centrais, sendo agitação e aeração as variáveis estudadas. Com a aquisição de um eletrodo para se medir o oxigênio dissolvido do meio, foi possível monitorar o nível de saturação do meio durante os ensaios e também realizar medidas do  $K_La$ .

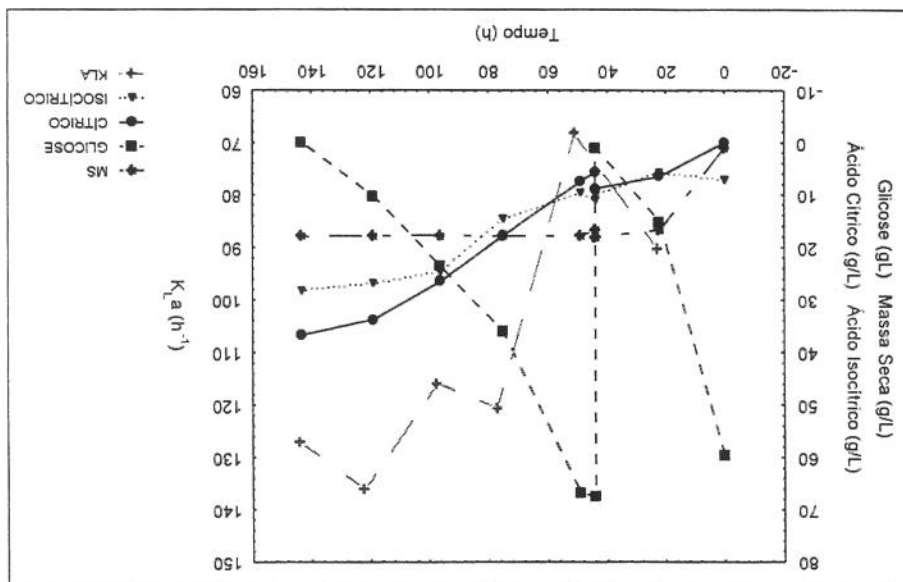
#### ***4.3. Ensaios do Planejamento Experimental***

Assim, estes testes foram importantes para o aprendizado e familiarização com os equipamentos (fundamentos e HPLC) e análises.

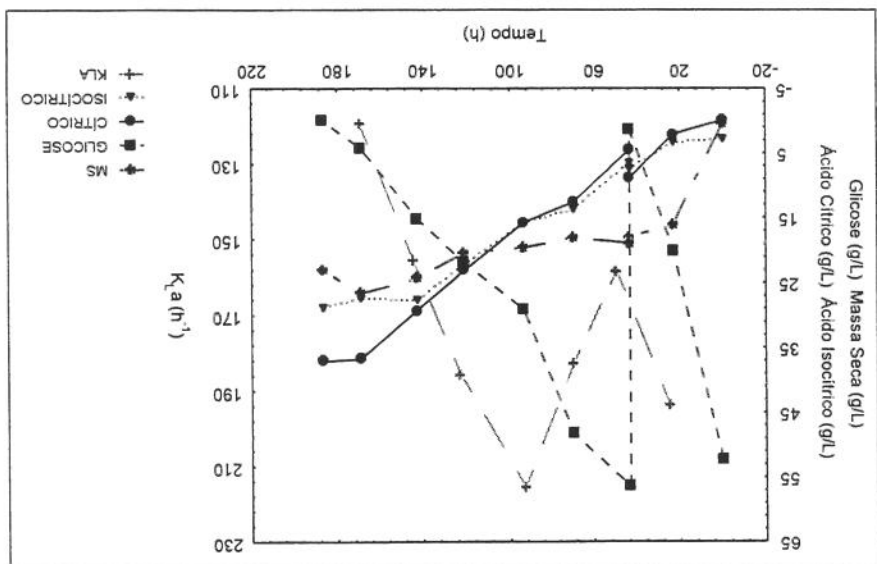
**Figura 5.9.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do primeiro ensaio do planejamento experimental (460 rpm e 0,40 vvm)



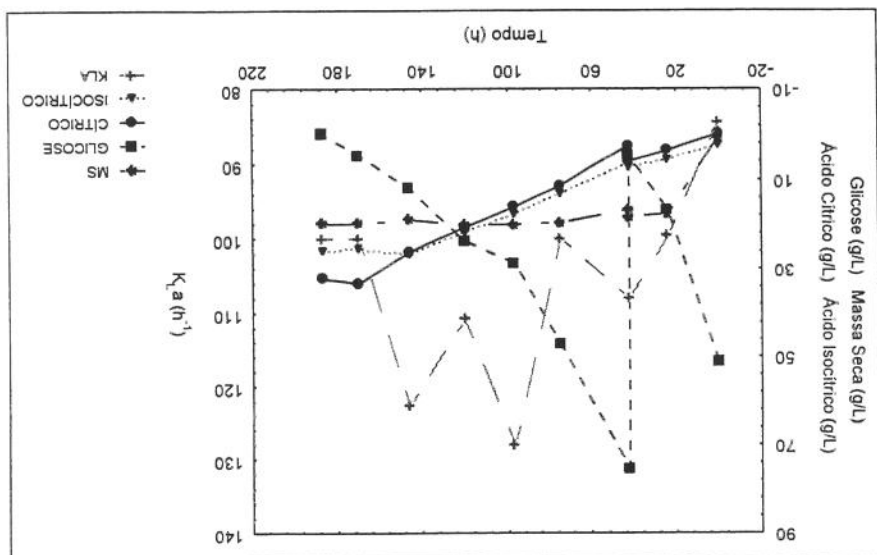
**Figura 5.10.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do segundo ensaio do planejamento experimental (740 rpm e 0,40 vvm)



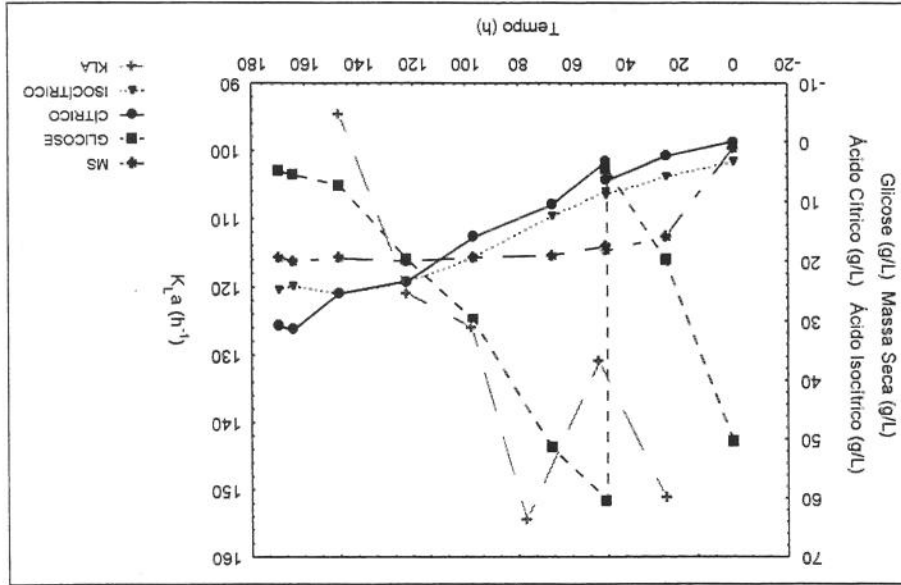
**Figura 5.12.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do quarto ensaio do planejamento experimental (740 rpm e 0,90 vvm)



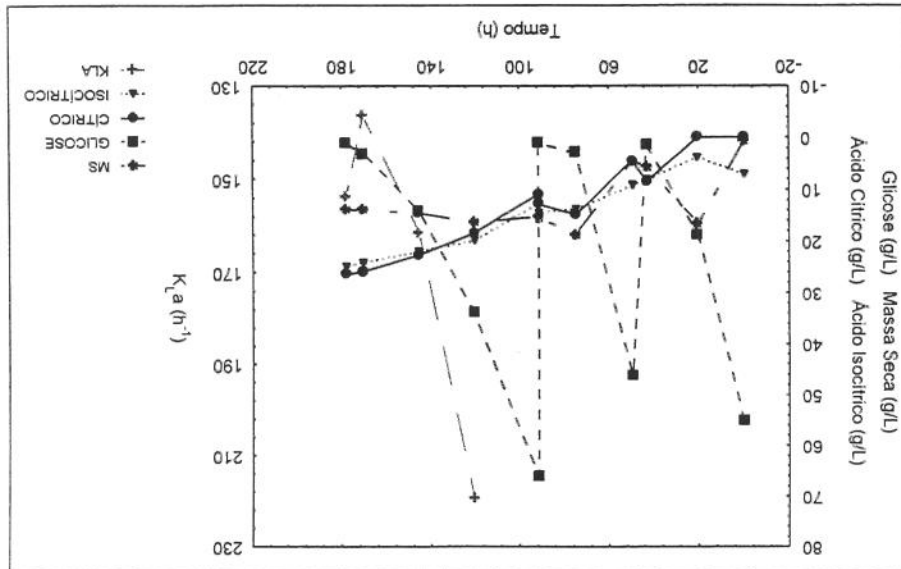
**Figura 5.11.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do terceiro ensaio do planejamento experimental (460 rpm e 0,90 vvm)



**Figura 5.14.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do sexto ensaio do planejamento experimental (600 rpm e 0,65 vvm)



**Figura 5.13.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do quinto ensaio do planejamento experimental (600 rpm e 0,65 vvm)

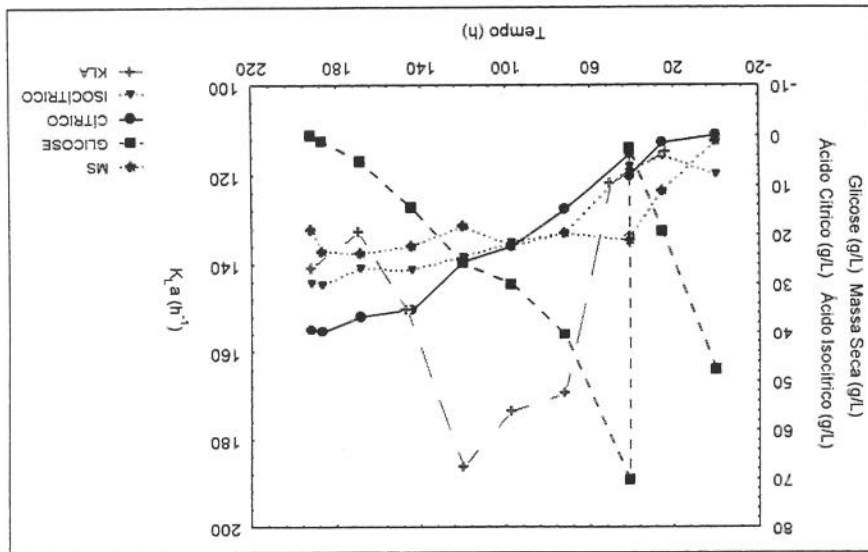


| Ensaio | Agitação Aeração |    | Agitação (rpm) | Aeração (vvm) | Cítrico (g/L) | Isocítrico (g/L) | MS (g/L) |
|--------|------------------|----|----------------|---------------|---------------|------------------|----------|
| 1      | -1               | -1 | 460            | 0,40          | 33,50         | 26,00            | 25,10    |
| 2      | 1                | -1 | 740            | 0,40          | 36,69         | 28,13            | 18,11    |
| 3      | -1               | 1  | 460            | 0,90          | 32,31         | 26,06            | 18,36    |
| 4      | 1                | 1  | 740            | 0,90          | 37,08         | 28,98            | 18,08    |
| 5      | 0                | 0  | 600            | 0,65          | 26,46         | 24,70            | 18,65    |
| 6      | 0                | 0  | 600            | 0,65          | 30,92         | 24,86            | 18,20    |
| 7      | 0                | 0  | 600            | 0,65          | 39,43         | 29,73            | 21,11    |

Tabela 5.4. Respostas obtidas no planejamento experimental

A tabela 5.4 apresenta as respostas para massa seca celular, a concentração de ácido cítrico e ácido isocítrico final obtidas do planejamento experimental. Pelos resultados, pode-se observar que a variação da quantidade de ácido cítrico produzido entre um ensaio e outro é menor que o desvio padrão calculados através das replicatas no ponto central. Isso mostra que as respostas foram muito semelhantes entre si e que não houve diferença estatisticamente significativa entre os ensaios (tabela 5.5).

**Figura 5.15.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do sétimo ensaio do planejamento experimental (600 rpm e 0,65 vvm)





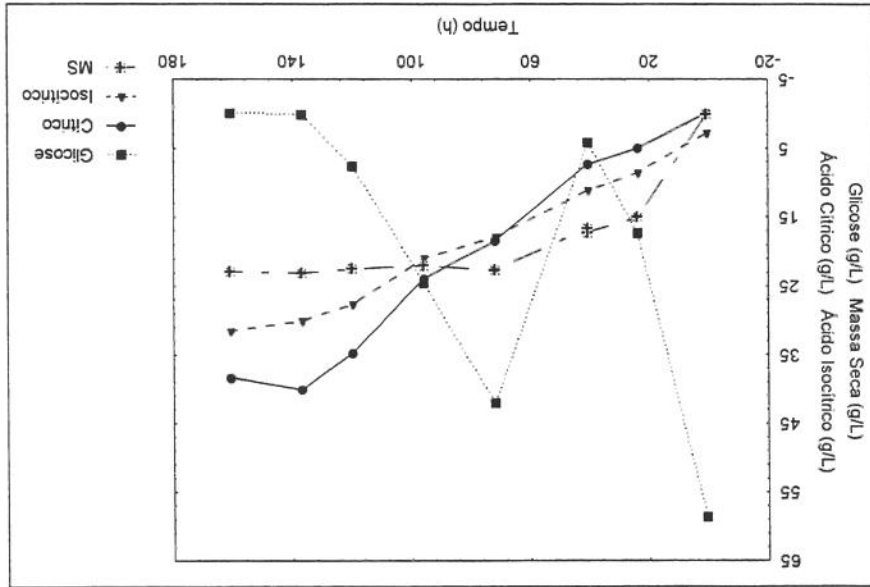
| Tabela 5.6. Coeficientes de rendimento do planejamento experimental |                       |                       |         |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Ensaio                                                              | $Y_{cit} (g\ g^{-1})$ | $Y_{iso} (g\ g^{-1})$ | Cit/iso |
| 1                                                                   | 0,47                  | 0,29                  | 1,62    |
| 2                                                                   | 0,47                  | 0,26                  | 1,80    |
| 3                                                                   | 0,39                  | 0,26                  | 1,50    |
| 4                                                                   | 0,58                  | 0,40                  | 1,45    |
| 5                                                                   | 0,46                  | 0,35                  | 1,31    |
| 6                                                                   | 0,50                  | 0,30                  | 1,67    |
| 7                                                                   | 0,51                  | 0,33                  | 1,55    |

A tabela 5.6 apresenta os coeficientes de rendimento determinados para as fermentações do planejamento experimental. RANE & SIMS (1993) conseguiram coeficientes de rendimento para o ácido cítrico entre 0,67 e 0,77 g g<sup>-1</sup> com um meio de produção com 50 g/L de glicose, enquanto que os coeficientes de rendimento do ácido isocítrico se mantiveram em torno de 0,07 g g<sup>-1</sup>. Os coeficientes conseguidos neste trabalho são maiores do que os conseguidos anteriormente por GUIDOLIN (1998), que obteve uma média de coeficientes de rendimento em torno de 0,12 g g<sup>-1</sup> para o ácido cítrico e 0,33 g g<sup>-1</sup> para o ácido isocítrico. Houve uma significativa melhora na produtividade de ácido cítrico, superando a produção de ácido isocítrico.

| Tabela 5.5. Efeito das variáveis estudadas (agitação e aeração) e erro padrão nas respostas analisadas de ácido cítrico e isocítrico. |               |             |                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|------------------|
| Fatores                                                                                                                               | Ácido Cítrico |             | Ácido Isocítrico |
|                                                                                                                                       | Efeitos       | Erro Padrão | Efeitos          |
| Média                                                                                                                                 | 33,77         | 2,49        | 26,92            |
| Agitação                                                                                                                              | 3,98          | 6,59        | 2,53             |
| Aeração                                                                                                                               | -0,40         | 6,59        | 0,46             |
| Agitação x Aeração                                                                                                                    | 0,79          | 6,59        | 0,39             |
|                                                                                                                                       |               |             | Erro Padrão      |
|                                                                                                                                       |               |             | 1,08             |
|                                                                                                                                       |               |             | 2,86             |
|                                                                                                                                       |               |             | 2,86             |
|                                                                                                                                       |               |             | 2,86             |

produção de ácido cítrico e isocítrico do ensaio conduzido com a concentração de oxigênio dissolvido mantido em 70%

**Figura 5.16.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e



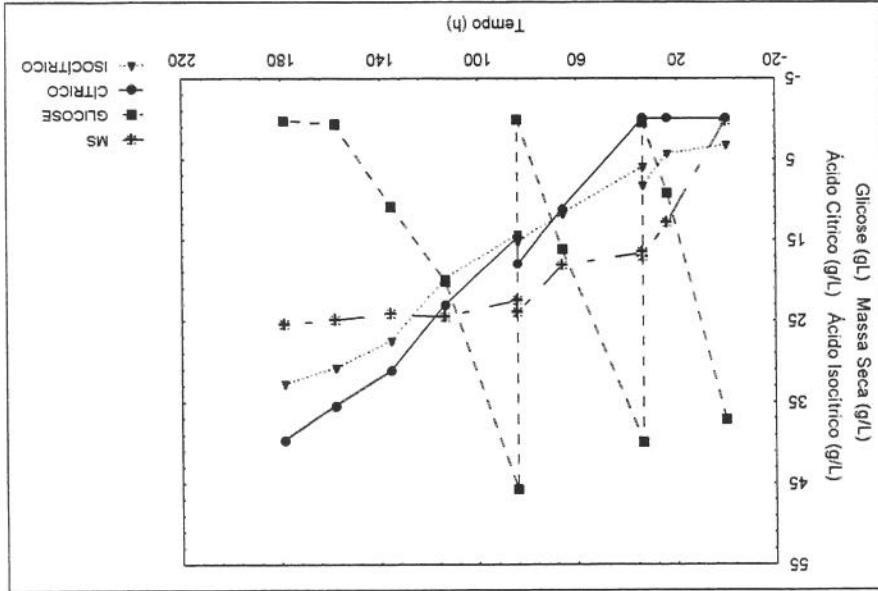
Devido aos resultados obtidos no planejamento experimental não terem apresentado uma proporção boa de ácido cítrico : ácido isocítrico produzidos, e por terem os ensaios apresentados, em sua maioria, taxas de oxigênio dissolvido elevadas no meio de fermentação, foi decidido conduzir uma fermentação na qual a quantidade de oxigênio dissolvido no meio não ultrapassasse os 70%. A cinética dessa fermentação é apresentada na figura 5.16. Pode-se constatar que o crescimento celular, consumo de glicose, produção de ácido cítrico e isocítrico são bem semelhantes aos resultados obtidos nos ensaios do planejamento experimental. Até o período de 100 horas o acúmulo de ácido cítrico e isocítrico se equivalem e, após esse período a produção de ácido cítrico é incrementada. O crescimento celular se manteve praticamente nulo na fase de produção confirmando as observações anteriores de que a excreção de ácido se dá com o crescimento celular estacionário.

#### 4.4. Fermentação com controle de oxigênio dissolvido

A proporção de ácido cítrico e isocítrico produzido foi 1,33, ou seja, no mesmo nível dos ensaios do planeamento. É um valor baixo, o que sugere que 70% de aerção ainda é um valor muito elevado para se ter uma boa produção.

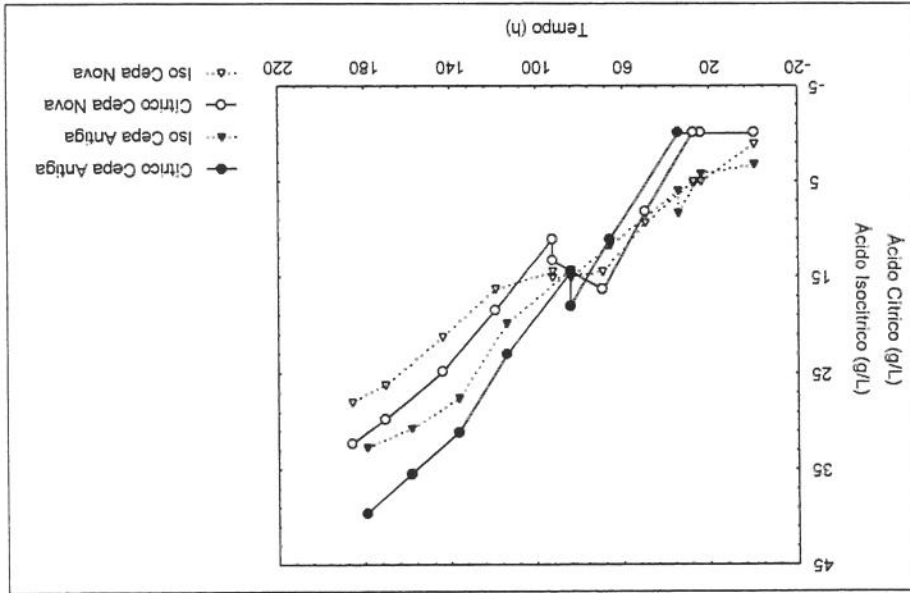
#### 4.5. Teste com uma nova cepa de levedura

A baixa relação de ácido cítrico : isocítrico produzidos no planeamento experimental e também no teste com oxigênio dissolvido controlado levou-nos a levantar suspeitas em relação à cepa de levedura que estava sendo utilizada. Decidiu-se então adquirir uma nova cepa de levedura da mesma linhagem, fornecida por Northern Regional Research Laboratory em maio de 2000 a fim de realizar duas fermentações comparativas, entre a nova cepa e a antiga, que estava sendo utilizada no laboratório para os ensaios. O teste foi conduzido como descrito no item 4.3.8, utilizando a metodologia proposta por RANE & SIMS (1993) e os resultados são apresentados nas figuras 5.17 a 5.19.

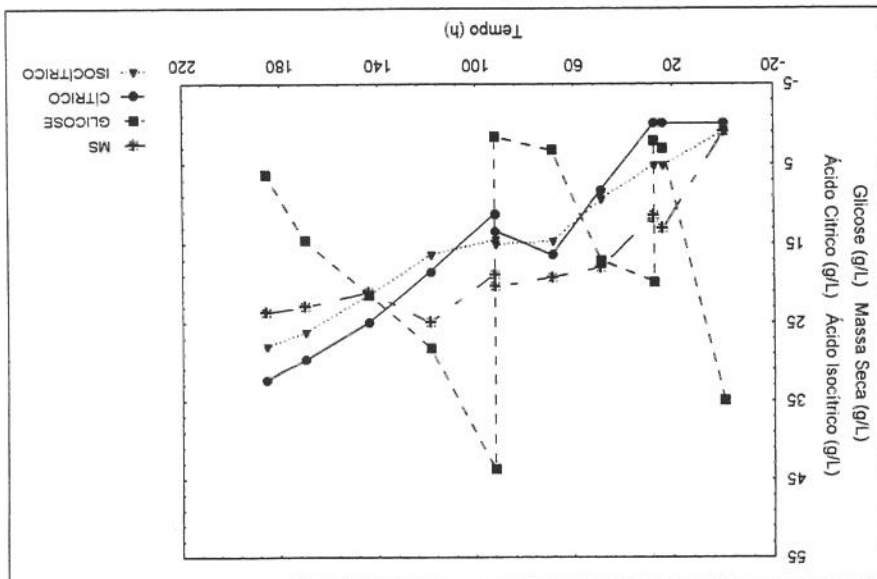


**Figura 5.17.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do ensaio conduzido utilizando a metodologia de RANE & SIMS (1993) com a cepa antiga de levedura

**Figura 5.19.** Comparação entre as quantidades de ácido produzidos nas fermentações utilizando a metodologia de RANE & SIMS (1993) utilizando diferentes cepas de levedura



**Figura 5.18.** Cinética do crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido cítrico e isocítrico do ensaio conduzido utilizando a metodologia de RANE & SIMS (1993) com a nova cepa de levedura



A tabela 5.7 e 5.8 mostram os resultados obtidos neste trabalho comparados com os resultados obtidos por RANE & SIMS (1993)

Tabela 5.7: Coeficientes de rendimento comparando as duas fermentações

| Parâmetro                                                    | RANE & SIMS (1993) | Cepa Antiga | Cepa Nova |
|--------------------------------------------------------------|--------------------|-------------|-----------|
| $Y_{cit}^1$                                                  | 0,67               | 0,33        | 0,45      |
| $Y_{iso}^1$                                                  | 0,07               | 0,24        | 0,23      |
| $Y_{cit}^2$                                                  | 0,77               | 0,57        | 0,55      |
| $Y_{iso}^2$                                                  | 0,06               | 0,36        | 0,40      |
| 1 Valores referentes ao primeiro meio de produção adicionado |                    |             |           |
| 2 Valores referentes ao segundo meio de produção adicionado  |                    |             |           |

Tabela 5.8: Comparação entre a quantidade de ácido produzida nos ensaios realizados neste trabalho e os reportados na literatura.

| RANE & SIMS (1993)         | Teste com Cepa Antiga      | Teste com Cepa Nova        |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Citríco Isocitríco Cit/Iso | Citríco Isocitríco Cit/Iso | Citríco Isocitríco Cit/Iso |
| 71,3 6,7 10,64             | 39,61 32,73 1,21           | 32,37 28,01 1,15           |

Analisando-se as figuras 5.17 e 5.18 as tabelas 5.7 e 5.8 pode-se

verificar que não existem diferenças significativas entre as quantidades de ácido produzidas pelas duas cepas de microrganismo. Isso significa que as condições sob as quais foram conduzidos os ensaios não são ideais, devendo-se, no futuro, analisar outras variáveis como o objetivo de incrementar a produção de ácido cítrico. No entanto, os resultados obtidos neste teste tanto com a cepa antiga como a nova em relação aos resultados de RANE & SIMS (1993), são bastante curiosos, já que a mesma cepa origem, *Candida lipolytica* NRRL Y 1095, foi usada neste trabalho e pelos autores citados. A única diferença neste teste para comparação dos resultados é a coluna cromatográfica empregada para a separação e quantificação dos ácidos, já que em todo este trabalho utilizou-se uma coluna cromatográfica específica para separação de isômeros. É de se levantar a hipótese de que a análise cromatográfica dos autores pode não ter separado corretamente os dois isômeros, já que os tempos de retenção são muito próximos e somente uma coluna tão específica como a utilizada neste trabalho

pode fazer esta detecção. Observa-se ainda que se somarmos as quantidades de ácido cítrico e isocítrico obtidas neste teste, a ordem de grandeza em  $\text{g L}^{-1}$  é a mesma da quantidade de ácido cítrico mais ácido isocítrico obtidas pelos autores citados.

Portanto, é relevante continuar estudando para elucidar esta questão que é um ponto crucial na produção de ácido cítrico por leveduras.

## 5. Conclusões

Os estudos realizados neste trabalho levaram às seguintes conclusões:

- No caso de interesse comercial na utilização do melão de cana de açúcar e da água de maceração de milho como fontes de nutrientes para a fermentação, os mesmos apresentaram bom potencial para serem utilizados como nutrientes para o crescimento de *Candida lipolytica* Y 1095. No entanto, uma diminuição na quantidade de ácido produzido foi verificada, necessitando, portanto, mais estudos de viabilidade quanto a um tratamento prévio para a eliminação de sais que provavelmente afetam a etapa de produção;

- Em todos os ensaios realizados verificou-se que a produção de ácido cítrico ocorre quando cessa o crescimento celular;

- Os coeficientes de rendimento obtidos neste trabalho superam os obtidos anteriormente por GUIDOLIN (1998), que obteve um máximo de  $0,271 \text{ gg}^{-1}$ , enquanto que neste trabalho, a média dos coeficientes chegou a  $0,5 \text{ gg}^{-1}$ ;

- O ácido cítrico é consumido quando a fonte de carbono do meio encontra-se esgotada verificando-se um aumento do pH;

- Dentro da faixa estudada, nem a agitação e nem a aeração tiveram efeito significativo sobre a produção de ácido cítrico ou de ácido isocítrico;

- Ao se comparar as quantidades de ácido cítrico e isocítrico produzidas por uma nova cepa de levedura não foi notada diferença significativa quando comparada com a cepa utilizada em todos os outros experimentos.



## 6. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar outras faixas de aeração e agitação que não foram utilizados neste trabalho que conduzam a valores menores de oxigênio dissolvido;
- Estudar um melhoramento genético da levedura com o objetivo de inibir a produção da aconitase hidratase para maximizar a produção de ácido cítrico;
- Conduzir novos estudos com melão de cana e água de maceração de milho a fim de se avaliar a viabilidades desses nutrientes na produção de ácido cítrico;
- Estudar o processo com reciclo de células num sistema com bombeamento e ultra-filtração.

## 7. Referências Bibliográficas

1. AIBA, S.; MATSUOKA, M. Identification of metabolic model: citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*, V. 21, p. 1373-1386, 1979.
2. BIANCHI, V. D. L. Produção da enzima proteolítica ácida por fermentação fúngica, *Tese de Mestrado*, DEA/FEA, Unicamp, Campinas, 1990.
3. BLAIR, G. T.; STAAL, P.W. Citric Acid. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, V. 6, 4<sup>th</sup> Ed., 1993.
4. BRADLEY, R.; JANSHEKAR, H.; YOSHIKAWA, S. Citric Acid CEH Marketing Research Report, Chemical Economics Handbook, 1992.
5. 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.
6. BRUNELLO, G.; CONCONE, B. R. V. Agitação e Aeração em Fermentadores. In: BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia*, V. 3, Editora Edgard Blücher Ltda., p. 137-167, São Paulo, 1986.

7. CARGILL BRASIL, fax enviado em maio de 2000.
8. CHEN, H. C. Response Surface Methodology for Optimizing Citric Acid Fermentation by *Aspergillus foetidus* Process Biochemistry V. 29, N.º 5 p. 399-405, 1994
9. COSTA, F.A.A., Estudo da Produção de Ácido Cítrico por *Candida lipolytica* Y 1095. Tese de Doutorado (no prelo)
10. GADEN, E. L. Fermentation Kinetics and Productivity, Chemistry and Industry, p. 154-159, 1955.
11. GOLDBERG, I.; PELEG, Y.; ROKEN, J.S. Citric, Fumaric and Malic acids. In: Goldberg, I.; Williams, R. Biotechnology and Food Ingredients. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 349-374, 1991.
12. GREWAL, H.S.; KALRA, K.L. Fungal Production of Citric Acid. Biotechnology Advances, V. 13, N.º 2, p. 209-234, 1995.
13. GUIDOLIN, F. Estudo da relação carbono/nitrogênio na produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* Y 1095 Tese de Mestrado, Campinas, 1998.

14. GUTCHO, S. J. Organic Acids. Chemical by Fermentation Chemical Technology Review N.º 19, p. 46-57, 1973.
15. HAMISSA, F. A.; ABOU-ZEID, A.-Z. A.; RADWAN, A. A., Influence of Micronutrients on Citric Acid Production by *Candida lipolytica* Y 1095, Zbl. Bakt. II, Abt. 135, p. 332-338, 1980.
16. JIANLONG, W.; PING, L. Phytate as a Stimulator of Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Process Biochemistry V. 33 N.º 3, p. 313-316, 1998.
17. JIANLONG, W. Improvement of Citric Acid Productio by *Aspergillus niger* with addition of Phytate to Beet Molasse Bioresource Technology V. 65 p.243-245, 1998.
18. KANZOLOVA, S. V.; SHISHKANOVA, N. V.; ILCHENCO, 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.º 1, p. 35-38, 1996.
19. KAUTOLA, H.; RYMOWICZ, W.; LINKO, P. The utilization of beet molasse in citric acid production with yeast. Sciences des aliments, V. 12, p. 383-392, 1992.

20. KAPOOR, K. K.; CHAUDHARY, K.; TAURO, P. Acid Citric. In: reed, G. Prescott e Dunn's Industrial Microbiology 4.<sup>a</sup> Ed. Westport: AVI Publishing Co. Inc., p. 709-747, 1982.

21. 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 *Saccharomycopsis lipolytica*. Biotechnology Letters, V. 7, n. 11, p. 815-8187 1985.
22. MATTEY, M. The Production of Organics Acids. Critical Reviews in Biotechnology, V. 12, N.º 1/2, p. 87-132, 1992.

23. 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.

24. MILSON, P.E. *in Food Biotechnology*, King, R.D. & Cheethan, P.S.J. Editors, Elsevier Applied Science, V. 1, Cap. 7, p. 273-307, 1987.

25. QUÍMICA E DERIVADOS, setembro, p. 29-30, 1997.

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

32. SHAH, D.N.; CHATTOO, B.B.; BARODA; KOTHARI, R.M.; PATIALA; BEGDE, M.V. Starch hydrolisate, 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. 104-109, 1993.
31. ROUKAS, T. Influence of Imeller Speed on Citric Acid Production and Selected Enzyme Activities of the TCA Cycle. Journal of Industrial Microbiology, V. 7, p. 221-226, 1991.
30. ROHR, M.; Kubicek, C.P.; KOMINEK, J. Citric Acid. In: REHM, H.J.; REED, G. Biotechnology. Weinheim: Verlag Chemie, V.3, p. 419-454, 1983.
29. REVISTA CARGILL, Cargill Brasil, **Nova Fábrica, Mais Produto**, Edição 109, maio/junho, 2000, <http://www.cargill.com.br/publi/index.htm>, acessado em 01/09/2000.
28. RANE, K.D.; SIMS, K.A. Citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. Biotechnology and Bioengineering, V. 46, N.º 4, p. 325-332, 1995.
27. RANE, K.D.; SIMS, K.A. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095. Biotechnology and Bioengineering, V. 43, p. 131-137, 1994.

33. STONE, G. B. Citric Acid In: KIRK, E. R.; OTHMER, D. F. KIRK-OTHMER: Encyclopedia of Chemical Technology. New York: The Interscience Encyclopedia, Inc., V. 4 p. 8-23, 1949.

34. TANI, Y.; SAKAY, 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.

## **Tabelas dos Ensaios Realizadas**

### **ANEXO A**



| Amostra | Tempo (h) | MS (g L <sup>-1</sup> ) | Glicose (g L <sup>-1</sup> ) | Citrício (g L <sup>-1</sup> ) | Isocitrício (g L <sup>-1</sup> ) | Cit/iso |
|---------|-----------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------|
| 1       | 20,5      | 0,63                    | 49,45                        | 0                             | 2,20                             | 0       |
| 2       | 64,5      | 4,74                    | 33,31                        | 0                             | 2,17                             | 0       |
| 3       | 87,5      | 4,67                    | 11,16                        | 0                             | 3,46                             | 0       |
| 4       | 93,2      | 3,25                    | 11,57                        | 0                             | 4,06                             | 0       |
| 5       | 96,0      | 3,38                    | 49,78                        | 0                             | 5,90                             | 0       |
| 6       | 116,5     | 3,78                    | 47,71                        | 0                             | 7,94                             | 0       |
| 7       | 136,5     | 7,32                    | 41,60                        | 0                             | 6,85                             | 0       |
| 8       | 150,0     | 10,04                   | 35,21                        | 0                             | 6,66                             | 0       |
| 9       | 167,0     | 10,12                   | 66,70                        | 0                             | 6,41                             | 0       |
| 10      | 189,5     | 11,43                   | 57,41                        | 0                             | 6,89                             | 0       |
| 11      | 213,5     | 12,47                   | 45,87                        | 0                             | 8,34                             | 0       |
| 12      | 236,5     | 7,82                    | 32,25                        | 10,12                         | 10,50                            | 0,97    |
| 13      | 260,5     | 15,98                   | 16,57                        | 13,19                         | 14,73                            | 0,89    |
| 14      | 284,0     | 16,33                   | 5,29                         | 19,17                         | 17,27                            | 1,11    |
| 15      | 303,5     | 15,98                   | 39,85                        | 15,47                         | 15,97                            | 0,97    |
| 16      | 328,0     | 17,23                   | 28,21                        | 21,24                         | 17,78                            | 1,19    |
| 17      | 354,5     | 16,25                   | 10,28                        | 25,70                         | 21,59                            | 1,19    |
| 18      | 382,5     | 17,26                   | 4,17                         | 29,38                         | 23,42                            | 1,25    |
| 19      | 399,0     | 18,08                   | 2,14                         | 20,68                         | 23,26                            | 0,89    |

Tabela A.2. Segunda fermentação preliminar.

| Amostra | Tempo (h) | Glicose (g L <sup>-1</sup> ) | Citrício (g L <sup>-1</sup> ) | Isocitrício (g L <sup>-1</sup> ) | Cit/iso |
|---------|-----------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------|
| 1       | 0         | 46,72                        | 0                             | 2                                | 0       |
| 2       | 44        | 32,21                        | 0                             | 1,97                             | 0       |
| 3       | 63        | 21,33                        | 0                             | 1,99                             | 0       |
| 4       | 71        | 17,56                        | 0,29                          | 2,75                             | 0,11    |
| 5       | 92        | 61,14                        | 0,09                          | 2,76                             | 0,03    |
| 6       | 116       | 54,22                        | 2,49                          | 4,15                             | 0,60    |
| 7       | 140       | 51,3                         | 4,81                          | 6,74                             | 0,71    |
| 8       | 162       | 46,99                        | 6,54                          | 4,12                             | 1,59    |
| 9       | 233       | 36,94                        | 12,19                         | 6,04                             | 2,02    |
| 10      | 255       | 34,48                        | 13,43                         | 5,56                             | 2,42    |

Tabela A.1. Primeira fermentação preliminar.

Tabela A.3. Terceira fermentação preliminar.

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso |
|---------|--------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------|
| 1       | 23           | 8,54                       | 30,98                           | 0                               | 2,36                               | 0,00    |
| 2       | 47           | 14,88                      | 12,16                           | 0                               | 3,39                               | 0,00    |
| 3       | 71,5         | 15,29                      | 69,39                           | 0                               | 4,32                               | 0,00    |
| 4       | 92           | 16,52                      | 63,76                           | 0                               | 5,16                               | 0,00    |
| 5       | 119          | 16,77                      | 43,83                           | 0                               | 9,83                               | 0,00    |
| 6       | 141,5        | 18,44                      | 23,77                           | 14,83                           | 14,71                              | 1,01    |
| 7       | 164,5        | 17,89                      | 7,24                            | 17,18                           | 19,26                              | 0,89    |
| 8       | 189          | 18,19                      | 2,64                            | 16,38                           | 20,71                              | 0,79    |
| 9       | 189,5        | 16,25                      | 73,24                           | 10,82                           | 18,01                              | 0,60    |
| 10      | 213,5        | 16,52                      | 70,53                           | 14,18                           | 18,52                              | 0,77    |
| 11      | 237,5        | 16,88                      | 64,85                           | 16,15                           | 18,65                              | 0,87    |
| 12      | 285          | 16,14                      | 41,20                           | 15,28                           | 24,12                              | 0,63    |
| 13      | 309,5        | 14,91                      | 27,75                           | 18,19                           | 27,37                              | 0,66    |
| 14      | 332          | 15,81                      | 15,91                           | 21,15                           | 28,58                              | 0,74    |
| 15      | 356,5        | 14,34                      | 6,58                            | 24,49                           | 30,95                              | 0,79    |
| 16      | 381          | 14,50                      | 1,66                            | 24,21                           | 31,86                              | 0,76    |

Tabela A.4. Quarta fermentação preliminar

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Citríco<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Isocitríco<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso |
|---------|--------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------|
| 1       | 0            | 1,70                       | 61,25                           | 0                               | 1,79                               | 0,00    |
| 2       | 21,5         | 12,40                      | 14,89                           | 0                               | 16,52                              | 0,00    |
| 3       | 47,5         | 18,90                      | 3,36                            | 2,29                            | 10,85                              | 0,21    |
| 4       | 47,5         | 16,33                      | 61,63                           | 5,31                            | 15,74                              | 0,34    |
| 5       | 70,0         | 17,86                      | 47,94                           | 15,83                           | 9,13                               | 1,73    |
| 6       | 93,0         | 17,73                      | 23,57                           | 21,36                           | 22,60                              | 0,95    |
| 7       | 119,0        | 17,84                      | 15,91                           | 34,23                           | 18,76                              | 1,82    |
| 8       | 142,0        | 17,89                      | 5,69                            | 38,44                           | 19,58                              | 1,96    |
| 9       | 166,0        | 17,89                      | 1,42                            | 39,92                           | 21,91                              | 1,82    |
| 10      | 166,0        | 16,22                      | 60,91                           | 22,73                           | 14,80                              | 1,54    |
| 11      | 186,0        | 17,07                      | 54,84                           | 26,91                           | 18,66                              | 1,44    |
| 12      | 210,0        | 17,45                      | 49,61                           | 35,72                           | 23,91                              | 1,49    |
| 13      | 237,0        | 16,52                      | 39,63                           | 43,72                           | 34,29                              | 1,28    |
| 14      | 261,5        | 14,67                      | 30,59                           | 46,06                           | 29,48                              | 1,56    |
| 15      | 287,0        | 13,93                      | 22,23                           | 50,56                           | 31,92                              | 1,58    |
| 16      | 335,0        | 14,88                      | 8,04                            | 51,77                           | 33,23                              | 1,56    |
| 17      | 356,0        | 13,87                      | 4,02                            | 50,57                           | 31,89                              | 1,59    |
| 18      | 377,0        | 14,26                      | 1,27                            | 61,69                           | 38,82                              | 1,59    |
| 19      | 399,5        | 14,26                      | 0,00                            | 59,62                           | 39,83                              | 1,50    |
| 20      | 433,0        | 14,26                      | 1,05                            | 54,06                           | 40,50                              | 1,33    |
| 21      | 446,5        | 14,26                      | 1,09                            | 55,92                           | 42,66                              | 1,31    |
| 22      | 454,5        | 14,26                      | 45,18                           | 42,66                           | 31,67                              | 1,35    |
| 23      | 477,0        | 13,03                      | 46,85                           | 43,82                           | 30,42                              | 1,44    |
| 24      | 501,0        | 13,03                      | 45,94                           | 49,48                           | 32,15                              | 1,54    |

Tabela A.5. Resultados do primeiro ensaio do planejamento experimental  
(Agitação: 460 rpm; Aeração: 0,40 vvm)

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso | O. D.<br>(%) | K <sub>L</sub> a<br>(h <sup>-1</sup> ) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|----------------------------------------|
| 1       | 0            | 0,81                      | 58,93                          | 0                              | 2,87                              | 0,00    | 65,1         | 98,28                                  |
| 2       | 24,0         | 16,52                     | 12,75                          | 5,59                           | 4,09                              | 1,37    | 63,8         | 18,72                                  |
| 3       | 43,5         | 25,10                     | 0,853                          | 9,19                           | 8,13                              | 1,13    | 65,5         | -                                      |
| 4       | 43,5         | 24,39                     | 62,33                          | 4,31                           | 7,69                              | 0,56    | 65,5         | -                                      |
| 5       | 66,5         | 17,94                     | 46,485                         | 14,40                          | 14,11                             | 1,02    | 67,0         | -                                      |
| 6       | 96,0         | 18,00                     | 14,14                          | 12,52                          | 11,31                             | 1,11    | 65,1         | 47,52                                  |
| 7       | 119,5        | 17,40                     | 13,725                         | 26,77                          | 26,34                             | 1,02    | 63,5         | 47,88                                  |
| 8       | 144,0        | 17,70                     | 2,66                           | 33,56                          | 25,05                             | 1,34    | 70,1         | 79,20                                  |
| 9       | 163          | 17,04                     | 0                              | 33,50                          | 26,00                             | 1,29    | 85,3         | -                                      |

Tabela A.6. Resultados do segundo ensaio do planejamento experimental  
(Agitação: 740 rpm; Aeração: 0,40 vvm)

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso | O. D.<br>(%) | K <sub>L</sub> a<br>(h <sup>-1</sup> ) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|----------------------------------------|
| 1       | 0            | 1,02                      | 59,49                          | 0                              | 7,01                              | 0,00    | 75,2         | -                                      |
| 2       | 22           | 16,77                     | 15,20                          | 6,54                           | 5,79                              | 1,13    | 64,3         | 90,36                                  |
| 3       | 44           | 18,11                     | 1,02                           | 8,82                           | 10,02                             | 0,88    | 88,8         | -                                      |
| 4       | 44           | 16,91                     | 67,48                          | 5,66                           | 11,12                             | 0,51    | 88,8         | -                                      |
| 5       | 49           | 17,84                     | 66,63                          | 7,61                           | 9,77                              | 0,78    | 83,3         | 68,40                                  |
| 6       | 75           | 17,92                     | 36,07                          | 17,85                          | 14,59                             | 1,22    | 87,8         | 120,60                                 |
| 7       | 96           | 17,78                     | 23,57                          | 26,50                          | 24,74                             | 1,07    | 86,8         | 115,92                                 |
| 8       | 119          | 17,86                     | 10,25                          | 33,85                          | 26,80                             | 1,26    | 87,1         | 136,08                                 |
| 9       | 143          | 18,03                     | 0,00                           | 36,69                          | 28,13                             | 1,30    | 91,9         | 127,08                                 |

Tabela A.7. Resultados do terceiro ensaio do planejamento experimental  
(Agitação: 460 rpm; Aeração: 0,90 vvm)

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso | O. D.<br>(%) | K <sub>L</sub> a<br>(h <sup>-1</sup> ) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|----------------------------------------|
| 1       | 0            | 0,95                      | 51,16                          | 0                              | 2,57                              | 0,00    | 92,3         | 84,6                                   |
| 2       | 24           | 17,73                     | 16,82                          | 3,70                           | 5,82                              | 0,64    | 51,5         | 99,72                                  |
| 3       | 42,5         | 18,36                     | 4,95                           | 6,16                           | 7,44                              | 0,83    | 90           | 108,00                                 |
| 4       | 42,5         | 16,81                     | 75,47                          | 2,64                           | 6,53                              | 0,40    | 90           | -                                      |
| 5       | 74,5         | 19,70                     | 47,15                          | 11,41                          | 13,29                             | 0,86    | 66,1         | -                                      |
| 6       | 97,0         | 20,01                     | 28,80                          | 16,11                          | 17,63                             | 0,91    | 76,7         | 128,16                                 |
| 7       | 120          | 20,20                     | 23,92                          | 20,81                          | 21,79                             | 0,96    | 79,0         | 110,88                                 |
| 8       | 146          | 19,07                     | 11,98                          | 26,33                          | 26,99                             | 0,98    | 80,9         | 122,76                                 |
| 9       | 170          | 19,89                     | 4,84                           | 33,36                          | 25,51                             | 1,31    | -            | -                                      |
| 10      | 187          | 19,93                     | 0,00                           | 32,31                          | 26,06                             | 1,24    | 92           | -                                      |

Tabela A.8. Resultados do quarto ensaio do planejamento experimental  
(Agitação: 740 rpm; Aeração: 0,90 vvm)

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso | O. D.<br>(%) | K <sub>L</sub> a<br>(h <sup>-1</sup> ) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|----------------------------------------|
| 1       | 0            | 0,61                      | 52,26                          | 0                              | 2,80                              | 0,00    | 99,0         | -                                      |
| 2       | 23           | 16,06                     | 20,09                          | 2,11                           | 3,39                              | 0,62    | 99,4         | 193,68                                 |
| 3       | 43,5         | 18,08                     | 1,38                           | 8,81                           | 7,41                              | 1,19    | 100,1        | 158,40                                 |
| 4       | 43,5         | 19,00                     | 56,48                          | 4,46                           | 6,51                              | 0,69    | 100,1        | -                                      |
| 5       | 69,5         | 18,14                     | 48,35                          | 12,68                          | 13,72                             | 0,92    | 102,6        | 182,88                                 |
| 6       | 93,5         | 19,64                     | 29,21                          | 15,81                          | 15,94                             | 0,99    | 104,8        | 215,64                                 |
| 7       | 121          | 20,44                     | 21,9                           | 23,16                          | 22,31                             | 1,04    | 105,8        | 185,76                                 |
| 8       | 142,5        | 24,32                     | 15,19                          | 29,31                          | 27,74                             | 1,06    | 106,7        | 155,52                                 |
| 9       | 169,5        | 26,67                     | 4,19                           | 36,78                          | 27,27                             | 1,35    | 109,4        | 119,52                                 |
| 10      | 186,5        | 23,03                     | 0,00                           | 37,08                          | 28,98                             | 1,28    | 110,6        | -                                      |

Tabela A.9. Resultados do quinto ensaio do planejamento experimental  
(Agitação: 600 rpm; Aeração: 0,65 vvm)

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso | O. D.<br>(%) | K <sub>La</sub><br>(h <sup>-1</sup> ) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|---------------------------------------|
| 1       | 0            | 0,71                      | 55,23                          | 0                              | 6,92                              | 0,00    | -            | -                                     |
| 2       | 20,0         | 16,71                     | 18,95                          | 0                              | 3,80                              | 0,00    | 88,8         | -                                     |
| 3       | 43,0         | 5,60                      | 1,42                           | 8,56                           | 8,10                              | 1,06    | 70,0         | -                                     |
| 4       | 49,5         | 4,64                      | 46,22                          | 4,48                           | 9,08                              | 0,49    | 70,0         | -                                     |
| 5       | 75,0         | 18,65                     | 2,94                           | 14,91                          | 13,96                             | 1,07    | 70,0         | -                                     |
| 6       | 91,5         | 15,51                     | 1,14                           | 12,93                          | 14,60                             | 0,89    | 93,6         | -                                     |
| 7       | 91,5         | 15,29                     | 66,21                          | 10,91                          | 12,72                             | 0,86    | 93,6         | -                                     |
| 8       | 120,5        | 16,50                     | 33,92                          | 18,52                          | 20,07                             | 0,92    | 80,5         | 219,24                                |
| 9       | 145,5        | 14,67                     | 14,30                          | 22,72                          | 22,15                             | 1,03    | 85,0         | 161,64                                |
| 10      | 170,5        | 14,01                     | 3,04                           | 25,87                          | 24,18                             | 1,07    | 92,6         | 136,44                                |
| 11      | 178          | 13,96                     | 1,19                           | 26,46                          | 24,70                             | 1,07    | -            | 153,72                                |

Tabela A.10. Resultados do sexto ensaio do planejamento experimental  
(Agitação: 600 rpm; Aeração: 0,65 vvm)

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso | O. D.<br>(%) | K <sub>La</sub><br>(h <sup>-1</sup> ) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|---------------------------------------|
| 1       | 0            | 0,96                      | 50,53                          | 0,00                           | 3,24                              | 0,00    | -            | -                                     |
| 2       | 25           | 15,89                     | 19,88                          | 2,40                           | 5,82                              | 0,41    | 74,0         | 151,20                                |
| 3       | 47           | 18,20                     | 4,64                           | 6,54                           | 9,08                              | 0,72    | 81,5         | 131,04                                |
| 4       | 47           | 17,53                     | 60,41                          | 3,16                           | 8,24                              | 0,38    | 81,5         | -                                     |
| 5       | 67,5         | 19,03                     | 51,49                          | 10,65                          | 12,60                             | 0,85    | 84,0         | 154,44                                |
| 6       | 97           | 19,38                     | 29,77                          | 16,08                          | 19,30                             | 0,83    | 88,0         | 126,00                                |
| 7       | 122          | 19,99                     | 19,77                          | 23,38                          | 23,59                             | 0,99    | 89,5         | 120,96                                |
| 8       | 147          | 19,55                     | 7,34                           | 25,44                          | 25,49                             | 1,00    | 92,6         | 94,68                                 |
| 9       | 164          | 20,01                     | 5,55                           | 31,49                          | 24,25                             | 1,30    | 99,7         | -                                     |
| 10      | 170          | 19,35                     | 5,00                           | 30,92                          | 24,86                             | 1,24    | -            | -                                     |

Tabela A.11. Resultados do sétimo ensaio do planejamento experimental  
(Agitação: 600 rpm; Aeração: 0,65 vvm)

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso | O. D.<br>(%) | K <sub>L</sub> a<br>(h <sup>-1</sup> ) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|--------------|----------------------------------------|
| 1       | 0            | 1,30                      | 47,72                          | 0,00                           | 7,72                              | 0,00    | 96,8         | -                                      |
| 2       | 25           | 11,25                     | 19,58                          | 1,51                           | 4,00                              | 0,38    | 78,1         | 114,84                                 |
| 3       | 41           | 20,69                     | 2,64                           | 8,12                           | 7,41                              | 1,10    | 97,5         | 122,04                                 |
| 4       | 41           | 21,11                     | 70,31                          | 3,89                           | 6,21                              | 0,63    | 97,5         | -                                      |
| 5       | 72           | 19,87                     | 40,57                          | 14,95                          | 19,84                             | 0,75    | 100,6        | 169,56                                 |
| 6       | 97           | 22,56                     | 30,06                          | 22,36                          | 21,57                             | 1,04    | 106,1        | 173,52                                 |
| 7       | 120          | 18,38                     | 25,89                          | 25,58                          | 24,43                             | 1,05    | 109,0        | 186,48                                 |
| 8       | 144          | 22,53                     | 14,69                          | 35,36                          | 27,15                             | 1,30    | 112,0        | 150,48                                 |
| 9       | 168,5        | 23,87                     | 5,32                           | 36,79                          | 27,02                             | 1,36    | 111,1        | 132,84                                 |
| 10      | 186,5        | 23,41                     | 1,20                           | 39,79                          | 30,26                             | 1,31    | 111,5        | -                                      |
| 11      | 192          | 18,86                     | 0,00                           | 39,43                          | 29,73                             | 1,33    | 112,0        | 140,76                                 |

Tabela A.12. Resultados da fermentação conduzida com  
oxigênio dissolvido controlado em 70%

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1       | 1            | 0,22                      | 58,68                          | 0                              | 2,87                              | 0,00    |
| 2       | 24           | 15,11                     | 17,29                          | 5,024                          | 8,58                              | 0,59    |
| 3       | 41           | 17,26                     | 4,21                           | 7,365                          | 11,2                              | 0,66    |
| 4       | 41           | 16,70                     | 50                             | 7,26                           | 11,12                             | 0,65    |
| 5       | 72           | 22,64                     | 42,04                          | 18,5                           | 17,95                             | 1,03    |
| 6       | 96           | 22,00                     | 24,58                          | 23,92                          | 20,95                             | 1,14    |
| 7       | 120          | 22,51                     | 7,64                           | 34,72                          | 27,68                             | 1,25    |
| 8       | 137          | 23,05                     | 0,16                           | 40,1                           | 30,04                             | 1,33    |
| 9       | 161          | 22,88                     | 0                              | 38,33                          | 31,52                             | 1,22    |

Tabela A.13. Resultados da fermentação conduzida de acordo  
Com a metodologia proposta por RANE & SIMS  
(1993) utilizando a cepa antiga de levedura

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1       | 0            | 0,21                      | 37,16                          | 0                              | 3,29                              | 0,00    |
| 2       | 24           | 12,83                     | 9,28                           | 0                              | 4,35                              | 0,00    |
| 3       | 34           | 17,10                     | 0,49                           | 0                              | 8,4                               | 0,00    |
| 4       | 34           | 16,62                     | 39,92                          | 0                              | 6,01                              | 0,00    |
| 5       | 66           | 18,22                     | 16,15                          | 11,19                          | 11,73                             | 0,95    |
| 6       | 84           | 24,00                     | 0,17                           | 18,07                          | 15,22                             | 1,19    |
| 7       | 84           | 22,52                     | 45,78                          | 14,67                          | 14,39                             | 1,02    |
| 8       | 113,5        | 24,59                     | 20,22                          | 23,03                          | 19,87                             | 1,16    |
| 9       | 136          | 24,23                     | 10,79                          | 31,14                          | 27,56                             | 1,13    |
| 10      | 158,5        | 24,91                     | 0,74                           | 35,43                          | 30,74                             | 1,15    |
| 11      | 179          | 25,47                     | 0,28                           | 39,61                          | 32,73                             | 1,21    |

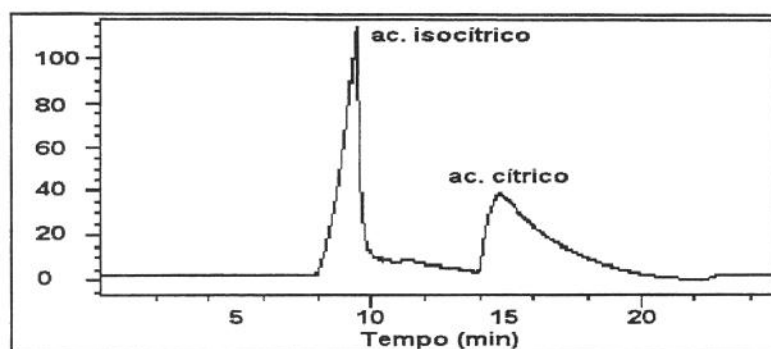
Tabela A.14. Resultados da fermentação conduzida de acordo  
Com a metodologia proposta por RANE & SIMS  
(1993) utilizando a cepa nova de levedura

| Amostra | Tempo<br>(h) | MS<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Glicose<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Isocítrico<br>(gL <sup>-1</sup> ) | Cit/Iso |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1       | 0            | -1,88                     | 35,02                          | 0                              | 1,09                              | 0,00    |
| 2       | 24           | 13,11                     | 3,1                            | 0                              | 5,17                              | 0,00    |
| 3       | 27,5         | 11,72                     | 2,08                           | 0                              | 5,23                              | 0,00    |
| 4       | 27,5         | 11,44                     | 42,5                           | 0                              | 5,14                              | 0,00    |
| 5       | 49,5         | 17,98                     | 17,05                          | 8,27                           | 9,44                              | 0,88    |
| 6       | 69           | 19,25                     | 3,29                           | 16,42                          | 14,67                             | 1,12    |
| 7       | 92,5         | 20,45                     | 1,65                           | 13,39                          | 15,14                             | 0,88    |
| 8       | 92,5         | 18,81                     | 43,74                          | 11,17                          | 14,49                             | 0,77    |
| 9       | 119          | 24,99                     | 28,23                          | 18,47                          | 16,3                              | 1,13    |
| 10      | 144          | 21,09                     | 21,38                          | 24,92                          | 21,39                             | 1,17    |
| 11      | 170          | 22,96                     | 14,57                          | 29,7                           | 26,14                             | 1,14    |
| 12      | 186          | 23,68                     | 6,28                           | 32,37                          | 28,01                             | 1,16    |

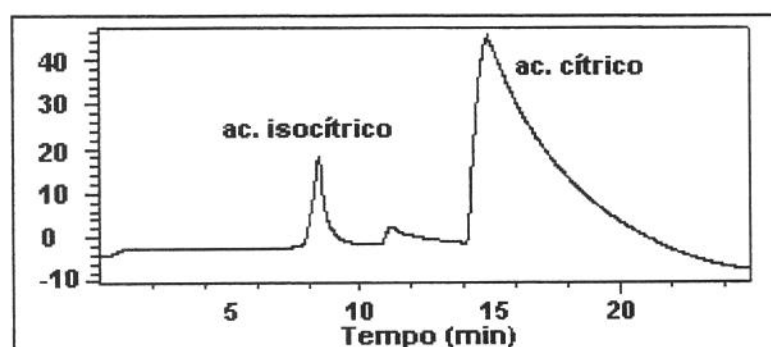


## **ANEXO B**

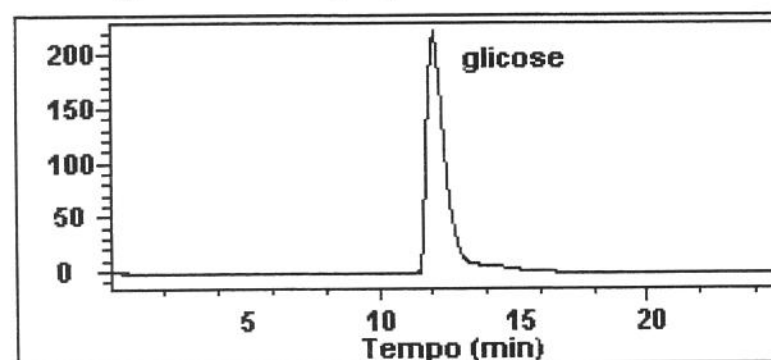
### **Exemplos de Cromatogramas**



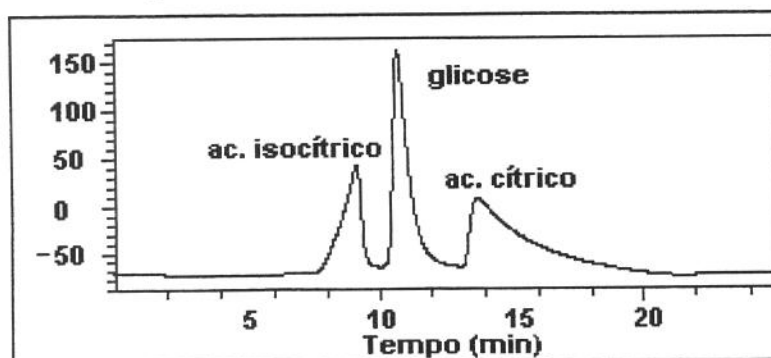
**Figura B.1.** Solução padrão de ácido isocítrico



**Figura B.2.** Solução padrão de ácido cítrico



**Figura B.3.** Solução padrão de glicose



**Figura B.4.** Amostra obtida do caldo fermentado