OTIMIZAÇÃO DO MEIO E CONDIÇÕES DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

MÔNICA BEATRIZ KOLICHESKI*

CARLOS RICARDO SOCCOL**

O ácido cítrico é um aditivo muito importante na indústria de alimentos, sendo produzido em grande parte por fermentação submersa, através de cepas de *Aspergillus niger*. Neste trabalho teve-se como objetivo otimizar a concentração de sais inorgânicos para a produção de ácido cítrico, em meio líquido, pela cepa *A. niger* LPB 21, utilizando o método estatístico de planos fatoriais fracionários. Os resultados obtidos foram satisfatórios, sendo que o rendimento inicial de 6,6% passou para 18% após a otimização.

1 INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é muito utilizado na indústria alimentícia como acidulante, antioxidante, aromatizante e dispersante; e na indústria farmacêutica em preparados efervescentes, xaropes e loções (ADRIAN, 1990; BENDER, 1982). Atualmente, são produzidos por ano mais de 300.000 toneladas (MEERS e MILSON, 1991), sendo que a maior parte é obtida pelo processo de fermentação submersa. Os rendimentos variam, de acordo com a cepa utilizada, de 80 a 85% em relação ao açúcar inicial, após 8 a 9 dias de fermentação, a temperatura de 25 a 35°C (PELLER e PERLMAN, 1979). O meio de cultura para fermentação submersa é constituído de carboidratos e sais inorgânicos (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (PRESCOTT e DUNN, 1977).

* Aluna do Curso de Pós-graduação em Tecnologia Química, Área de Concentração Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.

** Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

Diversos autores citam que a presença de traços de íons metálicos podem favorecer a produção de ácido cítrico, principalmente os de ferro, cobre, zinco e manganês (PRESCOTT e DUNN, 1977; MÜLLER, 1981; LOCKWOOD, 1979; BERRY et al, 1977).

Como o número de variáveis é grande, um plano de experiências deve ser utilizado. O plano de experiência constitui-se numa metodologia de escolha pela avaliação global de um problema, mas sua utilização implica em restringir o número de condições a fim de se obter com o mínimo de experiências, grande número de informações válidas (De MEO et al, 1989).

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de meio de cultivo ótimo para a cepa Aspergillus niger LPB 21, utilizando planos fatoriais fracionários para otimizar o processo fermentativo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Foi utilizada a cepa LPB 21 do fungo filamentoso da espécie Aspergillus niger. A cepa foi conservada, por repicagem, em meio de Malte Czapek Agar (MCz), sendo incubada a 26 - 28°C pelo período de 10 dias e então conservada a 4°C durante cerca de seis meses.

2.2 Preparo do Inóculo

O inóculo utilizado nas fermentações foi obtido de uma suspensão de esporos. Os esporos foram inoculados em placas de Petri com o meio MCz e incubadas a 26 - 28°C por 10 dias. Estes foram coletados com alça de platina em câmara de fluxo laminar e colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada e 0,1 mL de Tween 80, previamente esterilizados. Para determinar a concentração, a suspensão foi diluída em água destilada na razão de 1:10⁻³ e os esporos contados em placa de Malassez. Após a contagem a suspensão com 10⁶ esporos/mL, foi armazenada a 4°C.

2.3 Cinética de Crescimento da Cepa Aspergillus niger LPB 21

Nesta etapa realizou-se uma cinética de crescimento da cepa estudada. O meio de cultivo base foi composto de 140 g/L de sacarose; 2,23 g/L de NH₄NO₃; 1 g/L de KH₂PO₄; 0,23 g/L de MgSO₄.7H₂O e o pH foi acertado entre 1,6 e 2,2 com solução de HCl 1N (PRESCOTT e DUNN, 1977). Este foi distribuído em Erlenmeyers de 250 mL na proporção de 150 mL por frasco e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização o

meio foi resfriado a aproximadamente 30°C e inoculado com 1,5 mL da suspensão com 10^8 esp./mL. Os frascos foram incubados durante 10 dias em "shaker", a 28°C e 100 rpm.

2.4 Otimização do Meio de Cultura

Este experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira foi verificado quais os constituintes do meio eram essenciais para a produção de ácido cítrico. A segunda etapa consistiu na pesquisa de modelo que permitisse determinar os efeitos dos diferentes fatores escolhidos como essenciais. Portanto, foi utilizada na primeira etapa uma matriz de Hadamard que permite estudar o efeito simultâneo dos efeitos de k fatores com N experiências ($N = k+1$) (PHAN-TAN-LUU, 1983). Na segunda etapa, foi utilizada matriz de experiência fatorial fracionária do tipo 2^{k-p} para refinar a otimização dos fatores essenciais (PHAN-TAN-LUU, 1983).

Em ambos os casos utilizou-se dois níveis (-1 e 1) e a resposta foi avaliada em acidez total e biomassa produzida após 8 dias de fermentação em incubador tipo "shaker", a 26°C e 120 rpm.

2.5 Análises

A concentração de ácido cítrico foi determinada por análise espectrofotométrica através da reação com piridina e anidrido acético (HARTFORD, 1962). A concentração total de açúcares foi obtida hidrolizando-se a amostra, seguida pela reação de DNS (MILLER, 1959), sendo a amostra previamente tratada com soluções saturadas de acetato de chumbo e sulfato de sódio. A biomassa foi determinada pela diferença de peso após filtração a vácuo, sob papel filtro, previamente pesado. O pH foi determinado por leitura direta em peagâmetro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cinética de Crescimento da Cepa *Aspergillus niger* LPB 21

Os resultados obtidos em biomassa, açúcar consumido, ácido cítrico produzido e pH, após 10 dias de fermentação, estão apresentados no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA CEPA *Aspergillus niger* LPB 21

Rendimento = Ácido cítrico produzido/Açúcar consumido

Pode-se observar rendimento máximo de 6,6%, no oitavo dia de fermentação, o qual é muito baixo, pois consegue-se aproximadamente 80%, dependendo da cepa utilizada (PRESCOTT e DUNN, 1977). Porém, sabe-se que estes rendimentos são obtidos com a utilização de pré-inóculo e com período de fermentação de 28 a 30 dias.

3.2 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

3.2.1 Plano Experimental - Documento 1

Na primeira etapa da otimização verificou-se se os íons de zinco, cobre, ferro e manganês afetavam a produção de ácido cítrico na cepa LPB 21, bem como a quantidade de esporos, o pH e a qualidade da água. A matriz utilizada está apresentada na Quadro 1. O domínio experimental do Documento 1 está representado na Tabela 1, bem como os coeficientes b_1 e b_1' calculados para cada fator. Os resultados experimentais estão demonstrados na Tabela 2. Cinco fatores têm valor positivo na produção de ácido cítrico: NH_4NO_3 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e o pH. Estes resultados revelam também que para a produção de biomassa são importantes os seguintes fatores: sacarose; NH_4NO_3 ; KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; a quantidade de esporos e a qualidade da água. O $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e o $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ são prejudiciais tanto para a produção de ácido como para o desenvolvimento de biomassa, portanto foram eliminados do meio de cultura.

QUADRO 1 - MATRIZ DE EXPERIÊNCIAS UTILIZADA NO DOCUMENTO 1

N	Fatores Estudados										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Utilizou-se água destilada e a quantidade de esporos foi mantida constante em 10^6 esp./mL. Estes valores foram adotados por serem fatores negativos na produção de ácido cítrico mas essenciais para a produção de biomassa.

TABELA 1 - DOMÍNIO EXPERIMENTAL DO DOCUMENTO 1 E COEFICIENTES DE RESPOSTA

nº	Fator	Concentração em g/L ao nível		Coeficientes b_1 e b_1' calculados para resposta em	
		-1	+1	Biomassa	Ácido Cítrico
1	Sacarose	70,0000	210,0000	+1,60	-0,01
2	NH ₄ NO ₃	1,1150	3,3450	+0,18	+0,94
3	KH ₂ PO ₄	0,5000	1,5000	+0,67	-0,63
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1150	0,3450	+0,21	+0,43
5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1250	0,3750	+0,06	+0,31
6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0000	0,0002	+0,20	+0,16
7	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,0007	0,0020	-0,27	-0,14
8	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0005	0,0014	-0,22	-0,32
9	Esporos	10^5	10^7	+0,71	-0,11
10	pH	1,0	3,0	-0,19	+0,10
11	Água	destilada	potável	+1,10	-0,41
				$b_0 = 4,53$	$b_0' = 2,62$

TABELA 2 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - DOCUMENTO 1

Experimento n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Biomassa (g/frasco)	5,18	3,76	5,44	2,40	3,52	3,41	4,06	7,04	6,47	3,40	8,59	1,04
Ácido cítrico (g/L)	6,41	2,49	1,54	4,78	1,59	2,88	2,25	1,20	2,56	2,11	1,11	2,52

3.2.2 Plano Experimental - Documento 2

Neste plano foi avaliada a influência dos cinco fatores positivos para a produção de ácido cítrico, bem como a concentração de sacarose e KH_2PO_4 que são necessários para o crescimento do fungo.

Um plano fatorial fracionário 2^{7-4} foi utilizado com $N=8$ e a matriz utilizada está representada no Quadro 2. O domínio experimental do documento 2 e os coeficientes b_1 e b_1' calculados, estão na Tabela 3. A Tabela 4 mostra os resultados experimentais.

QUADRO 2 - MATRIZ DE EXPERIÊNCIAS UTILIZADA NOS DOCUMENTOS 2, 3 E 4

N	Fatores Estudados						
	1	2	3	4	5	6	7
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Como é possível observar através dos resultados (Tabelas 3 e 4) a produção de ácido aumentou. Isto fica claro no valor da constante b_0' que passou de 2,62 para 5,17. Utilizando-se os mesmos fatores realizou-se novo estudo para verificar a possibilidade de se aumentar a produção de ácido cítrico. Foram utilizados níveis menores de KH_2PO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e pH mais ácido, bem como níveis maiores de sacarose, NH_4NO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

TABELA 3 - DOMÍNIO EXPERIMENTAL E COEFICIENTES DE RESPOSTA DO DOCUMENTO 2

nº	Fator	Concentração em g/L		Coeficientes b_1 e b_1' calculados para resposta em	
		-1	+1	Biomassa (b_1)	Ácido Cítrico (b_1')
1	Sacarose	50,0000	70,0000	+0,29	+1,11
2	NH ₄ NO ₃	3,3450	4,4600	-0,06	+1,63
3	KH ₂ PO ₄	0,2000	0,5000	+0,04	-0,21
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3450	0,4600	+0,29	+1,20
5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,3750	0,5000	-0,26	-0,43
6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0002	0,0004	+0,17	-0,41
7	pH	3,0	4,0	+0,17	-0,51
				$b_0 = 2,33$	$b_0' = 5,17$

TABELA 4 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - DOCUMENTO 2

Experimento nº	1	2	3	4	5	6	7	8
Biomassa (g/frasco)	2,09	2,95	1,39	2,73	2,70	1,83	2,00	2,98
Ácido cítrico (g/L)	3,50	3,17	4,18	10,6	3,75	3,75	4,83	7,53

3.2.3 Plano Experimental - Documento 3

O plano e a matriz utilizados nesta etapa foram idênticos aos do documento 2. O domínio experimental e os resultados são mostrados nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5 - DOMÍNIO EXPERIMENTAL E COEFICIENTES DE RESPOSTA DO DOCUMENTO 3

nº	Fator	Concentração em g/L		Coeficientes b_1 e b_1' calculados para resposta em	
		-1	+1	Biomassa (b_1)	Ácido Cítrico (b_1')
1	Sacarose	70,0000	140,0000	+0,18	-0,37
2	NH ₄ NO ₃	4,4600	5,0000	+0,21	-1,86
3	KH ₂ PO ₄	0,1000	0,2000	+0,32	+1,07
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4600	0,5000	+0,03	+0,12
5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2000	0,3750	+0,17	+1,00
6	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0000	0,0002	+0,28	-1,60
7	pH	2,0	3,0	+0,16	-0,77
				$b_0 = 1,84$	$b_0' = 5,71$

TABELA 6 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - DOCUMENTO 3

Experimento nº	1	2	3	4	5	6	7	8
Biomassa (g/frasco)	1,45	1,72	1,57	1,33	1,52	1,82	2,12	3,21
Ácido cítrico (g/L)	7,15	2,65	4,84	3,91	8,95	11,53	3,31	3,31

Estes resultados indicam pequena melhora na produção de ácido, a constante b_0' passou de 5,17 para 5,71. Novo plano foi realizado para verificar se o aumento da concentração de KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e a diminuição do pH e da concentração de sacarose, NH_4NO_3 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, iria favorecer a produção de ácido cítrico.

3.2.4 Plano Experimental - Documento 4

Neste documento o plano e a matriz utilizados são idênticos aos do documento 2. O domínio experimental e os resultados são mostrados nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 - DOMÍNIO EXPERIMENTAL E COEFICIENTES DE RESPOSTA DO DOCUMENTO 4

nº	Fator	Concentração em g/L ao nível		Coeficientes b_1 e resposta em	b_1' calculados para
		-1	+1		
				Biomassa (b_1)	Ácido Cítrico (b_1')
1	Sacarose	70,0000	100,0000	+0,07	-0,18
2	NH_4NO_3	4,4600	4,6600	-0,07	+0,20
3	KH_2PO_4	0,2000	0,3000	-0,03	-0,24
4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5000	0,5500	+0,13	-0,24
5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3750	0,4000	+0,10	+0,10
6	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0000	0,0001	+0,02	-0,01
7	pH	2,0	3,0	+0,03	-0,22
				$b_0 = 1,96$	$b_0' = 2,99$

TABELA 8 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS - DOCUMENTO 4

Experimento nº	1	2	3	4	5	6	7	8
Biomassa (g/frasco)	2,22	1,95	1,84	1,97	1,97	1,97	1,56	2,22
Ácido cítrico (g/L)	3,18	2,87	3,83	3,04	2,27	2,84	3,39	2,49

Os resultados mostraram queda na constante b_0' (de 5,71 para 2,99) indicando que o plano anterior (documento 3) apresentava as condições ótimas para a produção de ácido cítrico com a cepa de Aspergillus niger LPB 21.

Em função dos resultados obtidos, a composição otimizada para a produção de ácido foi a seguinte: sacarose (70 g/L); NH_4NO_3 (4,46 g/L); KH_2PO_4 (200 mg/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (500 mg/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (375 mg/L); ajustando-se o pH com HCl 1N para 2,0. O volume foi completado com água destilada e a inoculação feita numa razão de 10^6 esp./mL.

A experiência de controle efetuada em "shaker" nas mesmas condições de temperatura e agitação dos ensaios anteriores, permitiu obter, com o meio otimizado, biomassa de 1,88 g/frasco e concentração de ácido cítrico de 10,5 g/L após 8 dias de fermentação.

4 CONCLUSÃO

Foi possível com este trabalho otimizar o meio para a produção de ácido cítrico com a cepa de Aspergillus niger LPB 21. Esta produzia 6,0 g/L de ácido cítrico, e com o meio contendo: sacarose (70 g/L); NH_4NO_3 (4,46 g/L); KH_2PO_4 (200 mg/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (500 mg/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (375 mg/L); e ajustando o pH para 2,0 com HCl 1N, passou a produzir 10,5 g/L no mesmo período, com quantidade menor de sacarose. Portanto o rendimento passou de 6,6% para 18% em relação ao açúcar consumido, após a otimização do meio de cultivo.

Novos estudos devem ser realizados testando-se outras fontes de carbono ou purificando-se a sacarose utilizada, que pelo estudo realizado mostra-se inibidora da produção de ácido cítrico.

Abstract

Citric acid is a very important additive for food industry being produced mainly by submerged fermentation of Aspergillus niger strain. This work aims to optimize the concentration of inorganic salts for production of citric acid in liquid medium by the strains of A. niger LPB 21, using the fractionary factorial statistic plan. The results showed efficient increasing from 6.6% to 18.0% after the optimization.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ADRIAN, J., FRANGNE, R. La Ciencia de los Alimentos de la A a la Z. Zaragoza : Acribia, 1990. 214p.
- 2 BENDER, Arnold. E. Dicionário de nutrição e tecnologia de alimentos. São Paulo : Roca, 1982. 358 p.
- 3 BERRY, D. R., CHMIEL, A., AL OBAIDI, Z. Citric acid production by Aspergillus niger. In: SMITH, J. E. , PATEMAN, J. A. Genetics and Physiology of Aspergillus. London : Academic Press, 1977. p. 405-426.

- 4 De MEO, M. et al. Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation. BioSciences, v. 4, n. 4, p. 99-102, 1985.
- 5 PHAN-THA-LUU, Roger, FENEUILLE, Daniel, MATHIEU, Didier. Methodologie de la recherche experimentale. Marseille : L.P.R.A.I. I.U.T., 1983. 4 v.
- 6 PRESCOTT, Samuel Cate, DUNN, Cecil Gordon. Microbiologia industrial. 2. ed. Madri : Aguilar, 1952. p. 582 - 613.
- 7 HARTFORD, C. G. Rapid spectrophotometric method for the determination of itaconic, citric, aconic and fumaric acids. Anal. Chem. v. 34, p. 426-428, 1962.
- 8 LOCKWOOD, Lewis B. Production of organic acids by fermentation. In: PELLER, H. J., PERLMAN, D. Microbial technology. 2. ed. New York : Emic Press, 1979. p. 356-367.
- 9 MEERS, J. L., MILSON, P. E. Acidos orgánicos y aminoácidos. In: BU'LOCK, J, KRISTIANSEN, B. Biotecnologia basica. Zaragoza : Acribia, 1991. p.359-366.
- 10 MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. v. 31, n. 3, p. 426 - 428, 1959.
- 11 MÜLLER, Gunther. Microbiologia de los alimentos vegetales. Zaragoza : Acribia, 1981. 291 p.