

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

Produção de Ácido Cítrico por
Candida lipolytica NRRL Y 1095

Luciano Armiliato
Mestre em Engenharia de Alimentos, UNICAMP
Engenheiro de Alimentos, UFSC

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutor em Engenharia de Alimentos**

Campinas, 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Ar55p Armiliato, Luciano
Produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y
1095. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Ácido cítrico. 2.*Candida lipolytica*. 3.Planejamento
experimental. 4.Ácido isocítrico. I.Rodrigues, Maria Isabel.
II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

CARS-FEA

Banca examinadora

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

Orientadora – DEA/FEA/UNICAMP

Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa

DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta

CPQBA/UNICAMP

Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert

DQM/FURG

Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura

ZEA/FZEA/USP

Profa. Dra. Isabel Cristina Baddini Currello

UNIP

Venho do fundo das Eras
Quando o mundo mal nascia...
Sou tão antigo e tão novo
Como a luz de cada dia.

Mário Quintana

*Para meus pais, Arlindo e Elsa e
meus irmãos, Juliano e Leandro
que sempre me apoiaram e incentivaram
e para Ana Paula, meu grande amor.*

Agradecimentos

À professora Maria Isabel Rodrigues pela orientação, carinho, amizade e pela dedicação.

À Fifa, pessoa maravilhosa, sempre disponível e presente, obrigado pela ajuda e, principalmente, pela amizade.

Ao professor Francisco Maugeri que, com suas sugestões e conselhos, muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Ao Josemar, pelos anos de convivência e por todas as conversas filosóficas nas mesas de bar.

Aos amigos de Serramalte Michele, Helen, Márcio, Graça, Daniel *Friends*, Bel, Adri, Rafi e Lia por serem muito especiais sempre presentes.

Aos amigos que estão sempre ao nosso lado nos ajudando especialmente ao meu mano véio Leandro, Karina, Daniela, Luciano, Malu, Fê Koch, Gabi, Thaiz, Renan, Marcão, Maurício, Vanessa, Beto, Montagner, Wili e Thomas um muito obrigado bastante especial.

Aos meus amigos de São Marcos, Nildo, Maria, Ricardo, Seco, Nazareno, Flávio, Silvana, João Mário, Dilva, Monique e Natália. Shalom!

Aos meus padrinhos Lourenço e Vana e também à Cláudia e Carla pelo apoio em todos os momentos.

Aos amigos de laboratório Abraão, Bernardo, Carlos, Ciça, Edu, Eliana, Fernanda, Fernandinha, Guilherme, Olga, Raquel, Rodrigo, Saartje, Tihany e Yemiko

Aos amigos da Paralela, Alien, Shaolin, Panthro, noname e Dreammy pela ajuda para compreender o “real world” e sair da caverna.

À FAPESP pelo suporte financeiro do trabalho.

A Deus, que sempre iluminou meus caminhos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. GENERALIDADES	5
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
2.8. PROCESSO INDUSTRIAL	17
2.8.1. PROCESSO EM SUPERFÍCIE	18
2.8.2. PROCESSO KOJI	18
2.8.3. PROCESSO SUBMERSO	19
2.9. AGITAÇÃO E AERAÇÃO	20
2.10. JUSTIFICATIVAS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. INTRODUÇÃO	22
3.2. CONDUÇÃO DOS ENSAIOS	24
3.2.1. MICRORGANISMO	24
3.2.2. PREPARO DO INÓCULO	24
3.2.3. ENSAIOS EM FERMENTADOR	25
3.2.4. TESTE PARA SUBSTITUIÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA POR PRODEX LAC®	26
3.2.5. FERMENTAÇÕES COM DIFERENTES TIPOS DE IMPULSORES	27
3.2.6. FERMENTAÇÕES COM CONTROLE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO	27
3.2.7. TESTE COM ADIÇÃO DE CaCO_3 E PRODEX LAC® EM FERMENTADOR DE BANCADA	28

3.2.8. ENSAIOS COM DIFERENTES CEPAS DE LEVEDURA.	28
3.2.9. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE CaCO_3 , PRODEX LAC® E PH NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO.	28
3.2.10. ESTUDO COM ADIÇÃO DE EDTA	29
3.2.11. ESTUDO EM BATELADA ALIMENTADA	30
3.2.12. ESTUDO COM ADIÇÃO DE ANTI-ESPUMANTE FG10	30
3.2.13. ENSAIO PARA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	31
3.3.1 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO, ISOCÍTRICO E GLICOSE	31
3.3.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA (MS) PRODUZIDA	31
3.3.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS LEVEDURAS	32
3.3.4 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES COM Y. LIPOLYTICA NRRL YB 423, C. OLEOPHILA NRRL 2317, Y. LIPOLYTICA ATCC 8661, C. GUILLIERMONDII ATCC 9058	34
4.2. RESULTADOS DOS TESTES EM FRASCOS AGITADOS UTILIZANDO-SE PRODEX LAC® COMO FONTE DE NITROGÊNIO	37
4.2.1. NA ETAPA DE CRESCIMENTO CELULAR	37
4.2.2. NA ETAPA DE PRODUÇÃO	38
4.3. RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE COM DIFERENTES TIPOS DE IMPULSORES	39
4.4. RESULTADOS DO TESTE COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO	45
4.5. RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE COM ADIÇÃO DE PRODEX LAC® E CaCO_3	51
4.6. RESULTADOS OBTIDOS COM O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	55
4.7. RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE COM BATELADA ALIMENTADA	72
4.8. RESULTADOS DO TESTE COM ADIÇÃO DE EDTA NO MEIO	73
4.9. RESULTADOS DO TESTE DE ADIÇÃO DE ANTI-ESPUMANTE FG10	74
4.10. RESULTADOS DO ENSAIO PARA VERIFICAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	76

4.11. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTE TRABALHO COM AS PUBLICAÇÕES MAIS RECENTES	78
5. CONCLUSÕES	82
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

RESUMO

O ácido cítrico é, atualmente, um dos mais importantes ácidos orgânicos produzidos por via fermentativa. Devido às suas características é amplamente utilizado na indústria de alimentos (acidulante, flavorizante, antioxidante), na indústria farmacêutica (tamponante, seqüestrante, quelante) e outros. As leveduras apresentam algumas vantagens na produção de ácido cítrico sobre os fungos, porém, possuem o inconveniente de excretarem simultaneamente o ácido isocítrico. A produção de ácido cítrico ou isocítrico é influenciada pelos componentes do meio de cultivo e pelas condições operacionais do sistema. Foram testadas em frascos agitados 5 diferentes cepas de leveduras para avaliar a produção de ácido cítrico de cada uma. Os resultados mostraram que *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 é a mais eficiente nas condições estudadas. Também verificou-se que a adição de EDTA ao meio em frascos agitados não promoveu um aumento na quantidade de ácido cítrico acumulado. Foram realizados ensaios em fermentador para se avaliar o melhor tipo de impulsor e a melhor concentração de oxigênio dissolvido para a produção de ácido cítrico. Os resultados mostraram que o impulsor turbina de Rushton e concentrações altas de oxigênio dissolvido favorecem o acúmulo de ácido cítrico. Um outro teste foi realizado substituindo-se o anti espumante Aratrop (utilizado até então) por FG10. O ensaio foi realizado nas mesmas condições dos pontos centrais do planejamento. Os resultados evidenciaram o efeito inibitório do Aratrop, pois a concentração de ácido cítrico passou de 28 g/L em média para 49 g/L, chegando a relação ácido cítrico : isocítrico em 2,30, a maior relação obtida em nossos ensaios. Em ensaios preliminares em fermentador verificou-se que a adição de CaCO_3 e Prodex Lac® ao meio promove uma melhora na produção de ácido cítrico. Com base nesses ensaios, foi realizado um planejamento experimental fatorial com três variáveis (CaCO_3 , relação extrato de levedura/Prodex Lac® e pH). Os resultados mostraram que para concentrações mais elevadas de CaCO_3 (10 g/L) e Prodex Lac® (6 g/L) a produção de ácido cítrico é favorecida, chegando a um patamar de 60 g/L, e 37 g/L para o ácido isocítrico, mostrando que o extrato de levedura pode ser substituído por Prodex Lac® com redução do custo do meio de cultivo. O pH não apresentou efeito significativo na faixa estudada entre 4,5 e 5,5. Foi possível obter um modelo para a produção de ácido cítrico. A utilização de batelada alimentada mostrou não ser eficiente na concentração final de ácido cítrico e isocítrico.

SUMMARY

Citric acid is currently one of the most important organic acids produced through fermentation. Due to its characteristics, it is broadly used in the food industry (acidulant, flavoring, antioxidant) and pharmaceutical industry (buffering, sequestering) and others. Yeasts present some advantage in the production of citric acid over fungi, although they have the inconvenience of excreting isocitric acid simultaneously. The production of citric or isocitric acid is influenced by the medium components and the operational conditions of the system. Five different strains of yeast were tested in stirred flasks in order to evaluate the citric acid production of each of them. The results have shown that *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 presented a best result in the studied conditions. It was also verified that the addition of EDTA to the medium in stirred flasks did not promote an increase in the amount of accumulated citric acid. Assays in fermentors were carried out in order to evaluate the best type of impeller and the best concentration of dissolved oxygen for the production of citric acid. The results shown that the Rushton turbine impeller and high concentrations of dissolved oxygen favored the accumulation of citric acid. Another test was performed by substituting the antifoam Aratrop (used until then) by FG10 one. The assay was set in the same conditions as the main points of the planning. The results evidenced the inhibitory effect of the Aratrop, since the acid concentration increased from 28 g/L in average to 49 g/L, reaching the rate citric acid/isocitric acid of 2.30, the highest obtained in our assays. In preliminary assays in fermentors, it was verified that the addition of CaCO_3 and Prodex Lac® to the medium promotes an increase in citric acid production. Based on these results, an experimental factorial planning with three variables was performed (CaCO_3 , ratio yeast extract/Prodex Lac® and pH). The results shown that for higher concentrations of CaCO_3 (10 g/L) and Prodex Lac® (8 g/L) the production of citric acid is favored, reaching 60 g/L, and 37 g/L for the isocitric acid, showing that the yeast extract can be substituted for Prodex Lac®, reducing the cost of the cultivation medium. The pH did not present a meaningful effect in the studied range between 4.5 and 5.5. A mathematical model for the production of citric acid was obtained. A fed batch assay was also performed, where no positive effect in the final concentration of citric and isocitric acid was verified.

1. Introdução

A produção mundial de ácido cítrico em 2000 superou as 900.000 toneladas (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2000). Sabendo-se que seu consumo vinha aumentando em cerca de 3,5 a 4,0% ao ano (QUÍMICA & DERIVADOS, 1997), pode-se afirmar que hoje a produção mundial se situa em torno de 1 milhão de toneladas. Os maiores produtores são os Estados Unidos e a Europa sendo quase toda a produção 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). No Brasil, o consumo anual de ácido cítrico e citrato de sódio fica em torno das 30 mil toneladas ano (CARGILL, 2003).

O fato de o ácido cítrico ser muito apreciado na indústria de alimentos é devido às suas características, tais como baixa toxicidade, solubilidade, 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 ou como estabilizante em vários produtos alimentícios (RÖHR & KUBICEK, 1983). Devido ao seu poder seqüestrante e poder efervescente, é muito usado na indústria farmacêutica. Ao se combinar com carbonatos e bicarbonatos forma sais como o citrato trissódico, que é empregado 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 aumento do uso do ácido cítrico em escala industrial foi decorrência da diminuição do seu custo de produção. Essa diminuição foi possível com a produção por via fermentativa.

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. Estudos mostram que leveduras do gênero *Candida* podem produzir ácido cítrico em quantidades apreciáveis. Em geral, 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. A razão de produção de ácido cítrico : ácido isocítrico pode variar de 1 : 1 a 20 : 1 (esta conseguida com leveduras do gênero *Candida*). Esta variação deve-se ao tipo de levedura utilizado, 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 etanol e açúcar, visto que ambos podem ser utilizados como substratos para produção de ácido cítrico. A produção por *Aspergillus* já foi muito estudada e encontra-se vasta literatura sobre esse assunto. No entanto, percebe-se uma grande necessidade de trabalhos sobre a produção de ácido cítrico por leveduras, devido a maiores vantagens em utilizá-las ao invés de fungos. Neste sentido, estudos revelam que a *Candida lipolytica* Y 1095 sobressaiu-se no que se refere à produtividade (RANE & SIMS, 1993).

(COSTA, 2000) otimizou o meio de crescimento celular e de produção de ácido cítrico com *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 utilizando a técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta em frascos agitados. Foi possível um incremento de cerca de três vezes da massa celular durante a etapa de crescimento, quando comparado com a literatura para este mesmo microrganismo. A concentração final de ácido cítrico atingida foi de 26 g/L com um rendimento de 50%, não se verificando acúmulo de ácido isocítrico no meio.

Armiliato (2000) avaliou o efeito da aeração e agitação na produção de ácido cítrico em fermentador de bancada com os meios otimizados por Costa (2000).

Observou-se, pelos resultados obtidos, que a influência do oxigênio dissolvido e agitação são muito fortes na produção do ácido cítrico, com o aparecimento do ácido isocítrico, indesejável nesta fermentação, fato este que não é possível ser observado nos frascos agitados.

Tendo em vista a continuidade dessas pesquisas, este trabalho teve por objetivos principais:

- Verificar a produção de ácido cítrico por outras leveduras (*Candida oleophila* NRRL Y-2317, *Yarrowia lipolytica* NRRL YB-423; *Candida guilliermondii* ATCC 9058; *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661);
- Avaliar diferentes tipos de impulsores (turbina de Rushton, hélice naval e pás inclinadas) e sua influência na resposta de produção de ácido cítrico em reator de bancada;
- Estudar o efeito do CaCO_3 e do Prodex Lac® na produção de ácido

cítrico, isocítrico e no crescimento celular;

- Estudar outros níveis de oxigênio dissolvido.

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 apresentando vantagens econômicas sobre a síntese química destes compostos (MATTEY, 1992).

Quando se decide por qual ácido empregar em um alimento, deve-se levar em conta primeiramente seu custo e funcionalidade, seguido 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 suscetíveis, 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 empregado na indústria de alimentos e, do restante, cerca de 18% é absorvido pela 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. Seu uso depende de três propriedades: acidez, sabor e formação de sal. As aplicações estão resumidas na Tabela 2. 1.

Tabela 2. 1.: Aplicações do ácido cítrico (MATTEY, 1992)

Tipos de Indústria	Aplicação	Propriedades Utilizadas
Alimentos:	Bebidas;	Acidulante, Flavorizante;
	Geléias, Compotas e Conservas;	Acidulante, Flavorizante;
	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;
Outros:	Cosméticos	Tamponante, Antioxidante;
	Limpeza (metais)	Seqüestrante;
	Detergentes;	Seqüestrante, Tamponante;
	Reagentes Fotográficos	Tamponante

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, além de ser considerado “GRAS” (Generally Recognized as Safe) pelo FDA, ou seja, reconhecido como seguro para o uso em alimentos, sendo, portanto, o principal acidulante usado em bebidas, como refrigerantes, chás, vinhos, sucos, pó para refrescos e isotônicos (BRADLEY, 1992).

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. Posteriormente conseguiu isolar variedades de fungos, mas devido a problemas de contaminação e duração da fermentação não foi possível transferir para a prática industrial (RÖHR &

KUBICEK, 1983).

CURRIE, em 1917, 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 (RÖHR & KUBICEK, 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 construída a planta da *Pfizer*, baseada no trabalho desenvolvido por CURRIE (RÖHR & KUBICEK, 1983). Devido ao desenvolvimento da cultura submersa ocorrer somente em 1940, a produção de ácido cítrico era feita, inicialmente, em cultura de superfície (MATTEY, 1992); (RÖHR & KUBICEK, 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); (RÖHR & KUBICEK, 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 (RÖHR & KUBICEK, 1983).

2.2. Propriedades

O ácido cítrico é, quimicamente, 2-Hidroxi-1,2,3 ácido propano tricarbóxico. Ocorre em duas formas estáveis: ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 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 2. 1 (MCMURRY & CATELLION, 1999).

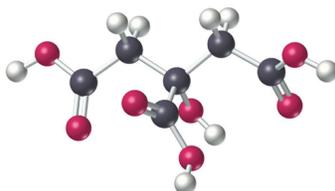


Figura 2. 1.: Estrutura do ácido cítrico

2.3. Mecanismo de Acúmulo de Ácido Cítrico

O processo pelo qual o acetato é oxidado a CO_2 se chama ciclo do ácido tricarboxílico, ou ciclo do ácido cítrico. Por ser um processo aeróbico, a evolução dessa seqüência metabólica só ocorreu depois do desenvolvimento da fotossíntese pelas plantas verdes, o que aumentou a concentração de oxigênio na atmosfera (LEHNINGER, 1989).

No ciclo do ácido cítrico, o acetato é oxidado a duas moléculas de dióxido de carbono. Através de uma série de reações, o acetato forma uma molécula de citrato. Este é metabolizado, o que resulta na formação de α -cetoglutarato, que depois é transformado em oxalacetato via fumarato e malato. No entanto, se o ciclo for interrompido no ácido cítrico, a formação de oxalacetato é conduzido por outra via, denominada reação anapleurótica (MILSON, 1988). A Figura 2. 2 ilustra essa reação.

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); (RÖHR & KUBICEK, 1983). A adição de Ferro (Fe^{++}) diminui o acúmulo de citrato e aumenta o de isocitrato, pois aumenta a atividade da aconitase. Em fermentação por leveduras, a adição de inibidores da aconitase, como fluoracetato, promovem um acúmulo de citrato no meio (KAPOOR et al., 1982).

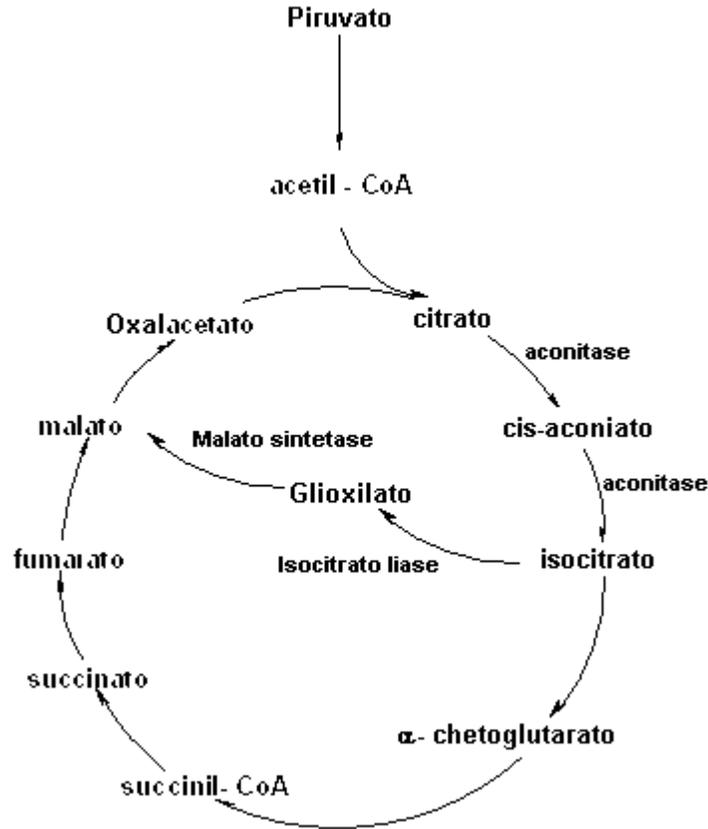


Figura 2. 2.: Ciclo do ácido cítrico mostrando a reação anapleurótica

Roukas (1991) afirmou que o aumento da agitação diminui a atividade de citrato sintetase e aumenta a atividade de aconitase e isocitrato desidrogenase, o que resulta numa diminuição do acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger* ATCC 9142.

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 & MITSUOKA, 1979).

2.4. Cinética da Fermentação

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 (GADEN, 1955).

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 (BRIFFAUD & ENGASSER, 1979a), (BRIFFAUD & ENGASSER, 1979b). Foi verificado que a fase de crescimento exponencial ocorre após uma fase lag de poucas horas e termina com o esgotamento do nitrogênio amoniacal do meio. A produção de ácido cítrico iniciou-se após 20 horas de fermentação, quando 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 (BRIFFAUD & ENGASSER, 1979a).

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 do ácido cítrico ser um produto do metabolismo primário, não é excretável em quantidades substanciais 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 grandes quantidades - fungos e leveduras em meio de fermentação sob determinadas condições (RÖHR & KUBICEK, 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 significativas de produto (maior do que sete dias), o que acaba por encarecê-lo (GUTCHO, 1973).

Diferentes cepas 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, 1973). A vantagem do uso de leveduras sobre fungos está na capacidade destas em suportar grandes concentrações de substrato, taxa de conversão mais rápida (produtividade mais elevada devido ao término da fermentação se dar em metade do tempo de fermentação dos fungos), 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, 1988).

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 sua resistência a longas e contínuas operações numa alta velocidade de conversão sob elevadas condições aeróbias (SHAH, 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. Diversas variedades de leveduras são utilizadas para a produção de ácido cítrico, porém as espécies de *Candida* são mais utilizadas.

Na Tabela 2. 2 estão listados alguns microrganismos produtores de ácido cítrico (GREWAL & KALRA, 1995).

Tabela 2. 2.: Microrganismos produtores de ácido cítrico.

Fungos	Leveduras	Bactérias
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Bacillus lincheniformis</i>
<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Arthrobacter paraffinens</i>
<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Candida oleophila</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Candida citroformans</i>	
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Hansenula anamola</i>	

Rane & Sims (1993) avaliaram a produção de ácido cítrico utilizando 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 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 tem-se empregado diversas fontes de carboidrato, como materiais feculentos, melão e hidrocarbonetos (RÖHR & KUBICEK, 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). O uso de melão de diferentes origens causa uma diferença considerável na produção de ácido cítrico. A concentração de açúcares em melão 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). Têm-se verificado que melão de beterraba apresenta um rendimento maior na produção de ácido cítrico do que o melão 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, hidrocarbonetos, 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 alguns 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).

Geralmente, os açúcares representam a fonte de carbono mais facilmente metabolizada por microrganismos. 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 empregado influencia na atividade enzimática e na 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).

O nitrogênio é fornecido, geralmente, na forma de sulfato de amônio,

extrato de levedura ou cloreto de amônio. 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 (MATTEY, 1992).

Foi verificado também que culturas de *Candida lipolytica* NRRL 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).

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). Através de um Planejamento Fatorial Fracionado Costa (2000) verificou 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.

O pH é extremamente importante para a produção de ácido cítrico. 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.

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 (RÖHR & KUBICEK, 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, de 20 para 80% de saturação em culturas de *Candida lipolytica* Y 1095 em fermentador com reciclo de células, provoca um aumento no valor da produtividade volumétrica e também numa aumento na relação ácido cítrico:isocítrico (RANE & SIMS, 1995).

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 significativas (RÖHR & KUBICEK, 1983).

A concentração do íon férrico afeta a produção de ácido cítrico e isocítrico por leveduras. Pesquisas realizadas com *Yarrowia lipolytica* N 1 crescendo em etanol 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. A concentrações de ferro entre 0,14 a 2,5 mg/L a proporção cítrico : isocítrico é de 2 : 1 e para concentrações acima de 4,8 mg/L a produção de ácido isocítrico é maior que a de ácido cítrico. 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 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por grama de proteína e ocorre uma formação maior de citrato. A maiores concentrações de ferro, entre 2,5 e 4,8 g/L, a atividade

enzimática chega a 0,48-0,68 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 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 produção 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).

A temperatura ótima de fermentação de ácido cítrico para *Aspergillus niger* situa-se entre os 25 e 30 °C. O aumento da 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 (KAPOOR et al., 1982). A temperatura ideal para o crescimento de *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 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 na excreção de ácido cítrico por leveduras, sendo que em quantidade suficiente é produzida uma grande quantidade de ácido cítrico e, em condições restritas, ocorre uma redução de produção de ácido cítrico com um acúmulo de α -cetogluturato (KAPOOR et al., 1982).

Jianlong & Ping (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 no acúmulo de ácido cítrico.

Estudos realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp em frascos agitados utilizando a técnica do planejamento experimental e análise de superfície de resposta mostraram que para a etapa de crescimento de *Candida lipolytica* NRRL Y 1095, o meio que apresenta a maior concentração de massa celular e a menor quantidade de glicose e nitrogênio residual depois de 48 horas de fermentação, é composto por glicose (50 g/L); extrato de levedura (5 g/L); NH_4Cl (1 g/L) e KH_2PO_4 (0,2 g/L). A tiamina, juntamente com alguns sais, como MgSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 foram analisados e os resultados revelaram que não tiveram efeito sobre o crescimento celular e na produção de ácido cítrico, indicando que a quantidade presente no extrato de levedura é suficiente para suprir as necessidades do microrganismo. O efeito do KH_2PO_4 não foi significativo na fase de crescimento e sua concentração foi mantida no nível mínimo (0,2 g/L), economicamente mais viável. Este meio de crescimento otimizado resultou num incremento de massa seca em torno de quatro vezes o valor relatado na literatura, chegando a uma concentração celular de 20 g/L. Também, através de planejamentos experimentais, foram avaliados os efeitos da tiamina, glicose e dos sais acima citados na etapa de produção de ácido cítrico. Destes, somente a glicose mostrou-se significativa, tendo sua concentração fixada em 75 g/L (COSTA, 2000). A concentração alcançada com a otimização do meio de produção resultou num acúmulo de 26 g/L de ácido cítrico, com um rendimento ao redor de 50%, ficando abaixo de outros rendimentos obtidos na literatura, da ordem de 70%, evidenciando a necessidade de mais estudos a respeito do processo.

2.8. Processo Industrial

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

2.8.1. Processo em Superfície

Foi o primeiro método de produção em larga escala, sendo introduzido por volta de 1920. Técnicas mais sofisticadas foram desenvolvidas 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 processo 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 cai em torno de 2,0. Se esse valor for inferior a 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 75 g de ácido cítrico por 100 g de glicose (RÖHR & KUBICEK, 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 (RÖHR & KUBICEK, 1983); (MATTEY, 1992); (GREWAL & KALRA, 1995).

2.8.3. Processo Submerso

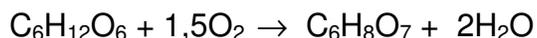
A utilização deste processo está aumentando consideravelmente. Dentre as vantagens, destacam-se as altas taxas de produção alcançadas, a necessidade de menos mão-de-obra para operação e utilização de um espaço menor para produção (MATTEY, 1992). No processo submerso existe a possibilidade de uma faixa maior de concentração 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 (MILSON, 1988). 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 (RÖHR & KUBICEK, 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 rendimento de ácido cítrico foi de 0,70 g/g em reator em batelada; 0,65 g/g no reator com reciclo de células e 0,56 g/g em batelada alimentada. Com relação à produtividade

volumétrica, o reator em batelada alimentada apresentou um valor de 1,29 g/(Lh); com reciclo de células foi obtido um valor de 1,32 g/(Lh) e no reator em batelada o valor da produtividade foi de 1,14 g/(Lh) (RANE & SIMS, 1995). No mesmo trabalho, os autores testaram três taxas de diluição: 0,03; 0,06 e 0,1 h⁻¹ para o reator com reciclo de células. Os melhores resultados, em relação ao rendimento e produtividades volumétrica e específica, foram obtidos à taxa de diluição de 0,06 h⁻¹.

2.9. Agitação e aeração

A agitação e a aeração são variáveis operacionais importantes para grande parte dos processos biotecnológicos industriais. O oxigênio é fator fundamental para o ciclo de Krebs e conseqüentemente na produção de ácido cítrico, como descrito abaixo (BRIFFAUD & ENGASSER, 1979a):



O efeito da concentração de oxigênio dissolvido nas fases de crescimento e produção foram estudados em fermentador de bancada (RANE & SIMS, 1994). Os resultados mostraram que aumentando-se a quantidade de oxigênio dissolvido de 20% a 80% da saturação, a produtividade específica de ácido cítrico aumentou 71% a uma concentração de biomassa de 3% (massa por volume). A uma concentração de 5% de biomassa a produtividade específica de ácido cítrico aumentou 82%. Neste trabalho, os autores constataram que o rendimento do ácido cítrico aparentemente é independente da concentração de oxigênio dissolvido na fase inicial de produção, no entanto, a produtividade volumétrica aumenta rapidamente com um aumento na concentração de oxigênio dissolvido.

Rane & Sims (1995) testaram três sistemas para produção de ácido cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095: batelada, batelada alimentada e com reciclo de células, variando a concentração de oxigênio dissolvido presente no

meio. Os resultados mostraram que a produtividade volumétrica de ácido cítrico aumenta ao se aumentar a concentração de oxigênio, de 20 a 80% da saturação. Os melhores resultados foram obtidos em fermentador com reciclo de células, cuja produtividade volumétrica do ácido cítrico variou de 0,36 a 1,32 g/(L.h). Outros resultados indicaram também que a produção de ácido cítrico é beneficiada em relação à produção de ácido isocítrico a altas concentrações de oxigênio dissolvido.

O efeito da agitação e aeração na produção de ácido cítrico foi estudado através de planejamento experimental (ARMILIATO, 2000). Neste estudo, a agitação variou de 460 a 740 rpm e a aeração de 0,40 a 0,90 vvm. Os resultados mostraram que essas duas variáveis, independente uma da outra, não alteram significativamente a resposta. O fator de maior importância é a concentração de oxigênio dissolvido presente no meio, que varia de acordo com a agitação e a aeração.

2.10. Justificativas

Apesar de se ter observado já há alguns anos a capacidade das leveduras em excretar ácido cítrico, existe pouco material relatado na literatura a respeito. Sendo assim, é importante que se promovam mais estudos sobre a produção de ácido cítrico por leveduras, visto ser este um importante insumo, amplamente utilizado nas indústrias de alimentos e farmacêutico. Também é importante ressaltar o fato de o Brasil ser um grande produtor de açúcar e etanol, que podem ser utilizados como substrato para a produção de ácido cítrico, sendo, por isso, importante o desenvolvimento de um processo nacional para a produção deste insumo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Introdução

O principal problema encontrado na produção de ácido cítrico por leveduras, é a produção indesejável de ácido isocítrico, que pode ser regulada pela composição do meio como também pelas condições de cultivo. Os ensaios deste trabalho foram desenvolvidos em frascos agitados e fermentador de bancada. Foram testadas cinco diferentes cepas de levedura relatadas como produtoras de ácido cítrico. Um outro passo foi um ensaio com adição de EDTA ao meio, além de um teste substituindo-se o extrato de levedura por Prodex Lac®. Em fermentador de bancada, foram testados três diferentes tipos de impulsores, três diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no meio, adição de CaCO_3 ao meio e substituição do extrato de levedura pelo Prodex Lac®. Após a análise dos resultados destes ensaios, foi verificado que a adição de CaCO_3 e Prodex Lac® promoveram um incremento na concentração final de ácido cítrico, motivo pelo qual foi realizado um planejamento experimental com essas duas variáveis além do pH. A partir destes ensaios, foi realizado um outro teste para verificação do resultado obtido no planejamento experimental.

Na Figura 3.1 está apresentado um fluxograma com as etapas desenvolvidas neste trabalho.

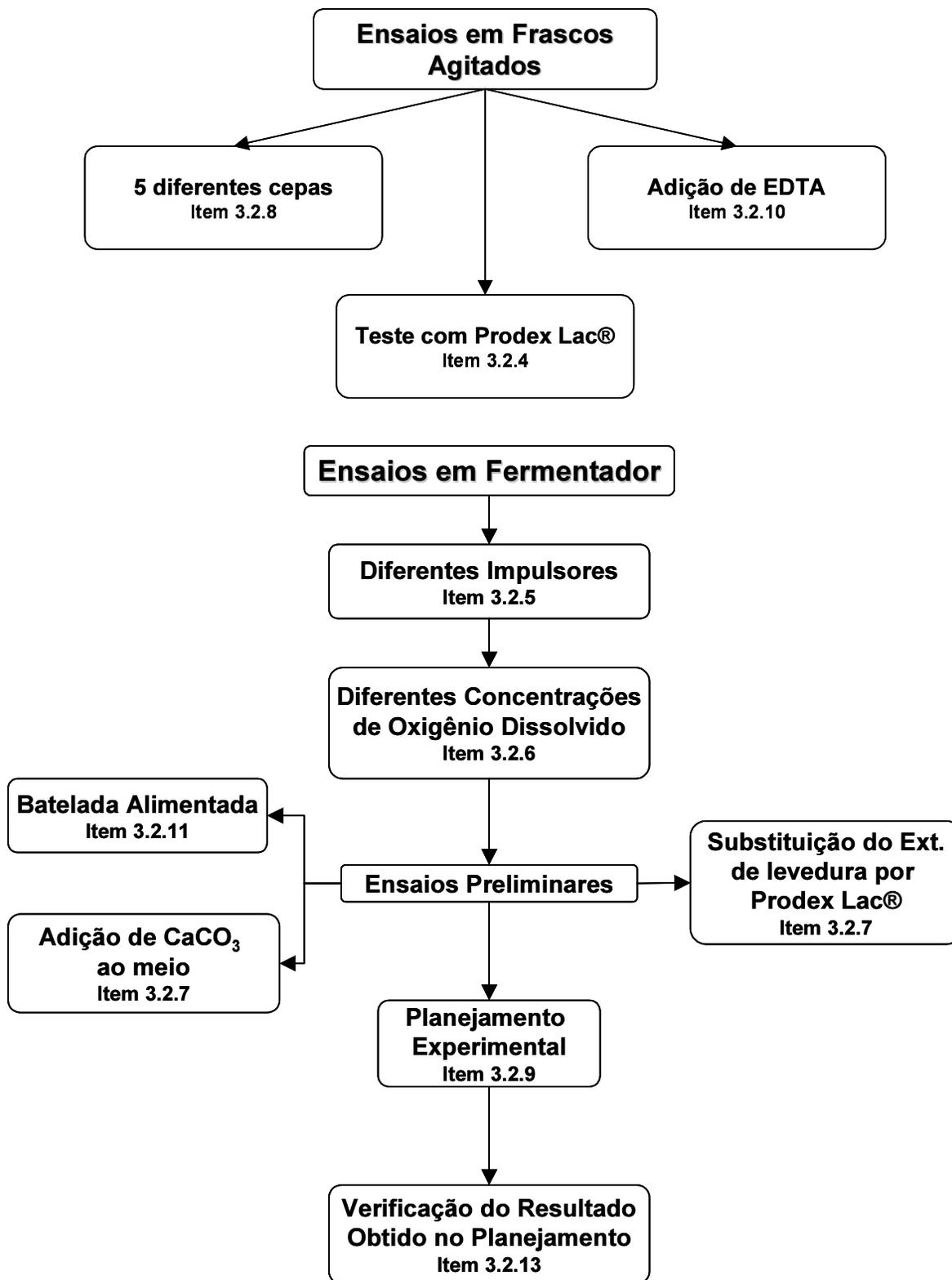


Figura 3.1.: Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho com ensaios em frascos agitados e fermentador de bancada

3.2. Condução dos ensaios

3.2.1 Microrganismo

Utilizou-se a cepa da levedura *Candida lipolytica* NRRL Y 1095, fornecida pelo Northern Regional Research Laboratory para os ensaios em fermentador. As linhagens das culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio YM (*yeast malt agar*) inclinado a 4 °C imersos em óleo mineral.

Outras linhagens foram utilizadas para se avaliar a produção de ácido cítrico:

- *Yarrowia lipolytica* NRRL YB 423, *Candida oleophila* NRRL 2317, adquiridas junto ao Northern Regional Research Laboratory, EUA.
- *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 e *Candida guilliermondii* ATCC 9058 foram adquiridas junto à Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, Campinas, SP.

3.2.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado por transferência asséptica da colônia (de 3 a 4 dias de idade) em YM agar (Tabela 3.1) para 100 mL de meio, cuja composição está descrita na Tabela 3.2, em erlenmeyer aletado de 500 mL (COSTA, 2000). A suspensão de células foi incubada à temperatura de 27 °C em frascos agitados a 150 rpm. Após 48 horas, foram retiradas alíquotas de 10 mL de caldo fermentado e transferidos para outros 5 frascos aletados contendo 100 mL de meio (Tabela 3.2). Após mais 48 horas de incubação a 27 °C e 150 rpm o conteúdo dos frascos foi transferido para o fermentador como inóculo.

Tabela 3.1.: Meio YM agar

Componentes	Composição (gL ⁻¹)
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.

Tabela 3.2.: Composição do meio de inóculo e crescimento

Componentes	Composição (gL⁻¹)
Glicose	50,0
NH ₄ Cl	1,0
KH ₂ PO ₄	0,2
Extrato de levedura	5,0

3.2.3. Ensaio em fermentador

Os ensaios foram realizados em biorreator BioFlo 3000 - Batch/Continuous Fermentator (New Brunswick Scientific Co., Inc), com volume útil de 5,0 L, equipado com eletrodos de pH e oxigênio dissolvido e controle de temperatura. A aeração foi feita através de ar comprimido injetado no fermentador através de um filtro de lã de vidro. O pH foi controlado e mantido em 5,5 (no planejamento experimental ou valores variaram) através da adição de NaOH 3 M, o excesso de espuma controlado pela adição de anti-espumante (Aratrop) e a temperatura foi fixada em 27 °C. Todos os componentes da fermentação foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 20 minutos.

A fermentação foi conduzida em duas etapas: fase de crescimento e fase de produção. Após esgotamento da glicose do meio de crescimento, adicionava-se o meio de produção. A composição do meio de crescimento encontra-se descrita na Tabela 3.2 e o meio de produção na Tabela 3.3 (COSTA, 2000).

Tabela 3.3.: Composição do meio de produção

Componentes	Composição (gL⁻¹)
Glicose	75,0

Para cada fermentação de 5 L preparou-se 500 mL de inóculo. Após o esgotamento da glicose na fase de crescimento, o meio foi drenado até 4,5 L e 500 mL de meio de produção concentrado foram adicionados ao volume anterior,

resultando em 5,0 L de volume final. As amostras foram retiradas diariamente e centrifugadas a 10000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação de glicose, ácido cítrico e isocítrico.

3.2.4. Teste para substituição do extrato de levedura por Prodex Lac®

Com o objetivo de diminuir os custos do meio de fermentação, foram realizados dois testes em frascos agitados, um de crescimento e outro de produção, utilizando o Prodex Lac® (extrato de levedura hidrolisado fornecido pela empresa Prodesa S.A.) em lugar do extrato de levedura. Análises fornecidas pelo fabricante revelaram que 1,3 g de Prodex Lac® possuem a mesma quantidade de nitrogênio que 1 g de extrato de levedura, de modo que na substituição, a quantidade de nitrogênio presente no meio foi mantida de acordo com o meio otimizado (Tabela 3.2). A substituição deste nutriente é economicamente interessante, visto que 1 kg de extrato de levedura (Difco) custa, em média, R\$ 700,00 enquanto que o kg do Prodex Lac® custa R\$ 21,58.

O teste de crescimento foi conduzido em 2 frascos aletados de 500 mL, sendo que um deles continha 100 mL do meio otimizado e o outro continha 100 mL do mesmo meio porém com a substituição do extrato de levedura por Prodex Lac®. A estes frascos foram adicionados 10 mL de inóculo (item 3.2.2), e foram incubados a 27°C e 150 rpm por 48 h. Após esse período de incubação, foi retirada uma amostra de cada frasco e lida a absorbância em 600 nm para determinação da massa seca. Este teste foi realizado em triplicata.

Os meios de crescimento utilizados no teste de produção estão descritos na Tabela 3.4 e foram adicionados de 10 g/L de CaCO₃ para impedir que o abaixamento do pH interferisse na produção de ácido cítrico (HAMISSA et al., 1980). A estes frascos foram adicionados 10 mL de inóculo (item 3.2.2), e foram incubados a 27 °C e 150 rpm por 48 h. Após esse período, 30 mL do meio de produção concentrado foi adicionado aos frascos resultando numa concentração de glicose de 75g/L. Este teste foi realizado em triplicata.

Tabela 3.4.: Meios utilizados para o teste de substituição do extrato de levedura por Prodex Lac®

Ensaio	Componentes	Concentração (g/L)
Primeiro Ensaio: Otimizado	Glicose	50
	Extrato de Levedura	5,0
	KH ₂ PO ₄	0,2
	NH ₄ Cl	1,0
Segundo Ensaio: Prodex Lac®	Glicose	50
	Prodex Lac®	6,5
	KH ₂ PO ₄	0,2
	NH ₄ Cl	1,0

3.2.5. Fermentações com diferentes tipos de impulsores

Visando avaliar a influência do tipo de agitador na produção de ácido cítrico e isocítrico, foram realizados três ensaios utilizando-se impulsores do tipo hélice naval, de pás inclinadas e turbina de Rushton.

As fermentações e o inóculo foram conduzidos de acordo com os itens 3.2.3 e 3.2.2, respectivamente. A aeração e a agitação foram de 1 vvm e 600 rpm, respectivamente e o pH controlado em 5,5.

Os resultados mostraram que o impulsor turbina de Rushton promoveu um maior incremento de oxigênio dissolvido no meio e apresentou os melhores resultados, quanto a produção de ácido cítrico, sendo por isso selecionado para a realização de testes com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido..

3.2.6. Fermentações com controle de oxigênio dissolvido

Utilizando o impulsor selecionado no item anterior (turbina de Rushton), foram realizadas três fermentações na qual o oxigênio dissolvido no meio foi fixado, através da variação da agitação, em 50, 60 e 70%, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos como descritos nos itens 3.2.2 e 3.2.3. Os resultados mostraram que abaixo de 70% de oxigênio dissolvido, o acúmulo de ácido cítrico é menor que o de ácido isocítrico.

3.2.7. Teste com adição de CaCO_3 e Prodex Lac® em fermentador de bancada

Foi realizado um ensaio no qual o extrato de levedura foi substituído por Prodex Lac®. Este ensaio foi conduzido de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.2.2 e 3.2.3, sendo que o oxigênio dissolvido no meio foi mantido constante em 70% e o extrato de levedura foi substituído por 6,5 g/L de Prodex Lac®, mantendo-se assim a mesma quantidade de nitrogênio residual.

Verificou-se que em frascos agitados a adição de carbonato de cálcio (CaCO_3) como tamponante do meio diminuía a produção de ácido isocítrico e provocava um incremento na produção de ácido cítrico. Realizou-se então um teste em fermentador de bancada com a adição de 10 g/L de CaCO_3 a fim de se avaliar se este possui alguma influência na produção. A metodologia utilizada foi a mesma descrita nos itens 3.2.2 e 3.2.3 e o oxigênio dissolvido no meio foi mantido constante a 70%.

3.2.8. Ensaio com diferentes cepas de levedura.

Foi realizado um ensaio com diferentes cepas de microrganismos para avaliar qual o melhor microrganismo produtor de ácido cítrico nas condições estudadas: *Yarrowia lipolytica* NRRL YB 423, *Candida oleophila* NRRL 2317, *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661, *Candida guilliermondii* ATCC 9058 e os resultados foram comparados com a produção de ácido cítrico obtido por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095. Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos aletados de 500 mL, contendo 100 mL de meio decrescimento (Tabela 3.2) e adicionados de 10 g/L de CaCO_3 para manutenção do pH em valores mais elevados. Após o inóculo, os frascos foram mantidos agitados a 27 °C, 150 rpm por 48 horas e, após esse tempo, foi adicionado o meio de produção, sendo mantidos nas mesmas condições por mais 120 horas.

3.2.9. Estudo da influência de CaCO_3 , Prodex Lac® e pH na produção de ácido cítrico.

Como mencionado anteriormente, CaCO_3 e Prodex Lac® acarretam

alterações na quantidade de ácido cítrico e isocítrico produzidos. Também é relatado que alterações de pH interferem na concentração final de ácido cítrico. Uma maneira eficiente de se avaliar essas influências é a utilização da técnica de planejamento experimental, variando esses parâmetros e calculando-se posteriormente os efeitos na produção final de ácido. Assim, foi realizado um planejamento fatorial completo (2^3 ensaios com 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes, totalizando 11 ensaios) em fermentador de bancada. Na Tabela 3.5 encontra-se descrito o planejamento codificado e os valores reais de cada ensaio realizado. As fermentações foram conduzidas de acordo com os itens 3.2.2 e 3.2.3. O meio de crescimento utilizado encontra-se descrito na Tabela 3.2, com exceção do extrato de levedura, que foi substituído gradativamente pelo Prodex Lac® e da adição de CaCO_3 ao meio. O pH foi variado segundo o planejamento experimental e controlado pela adição de NaOH 3 N. A aeração foi fixada em 1,5 vvm e a agitação variável até um máximo de 800 rpm para a manutenção da taxa de oxigênio dissolvido em 95%. A espuma foi controlada pela adição de anti-espumante comercial Aratrop.

Tabela 3.5.: Planejamento experimental (valores codificados e reais) para o estudo da influência de carbonato de cálcio, Prodex Lac® e pH na produção de ácido cítrico

Ensaio	Codificado			Valores reais		
	CaCO_3	EL/PL	pH	CaCO_3 (g/L)	EL/PL* (g/L/g/L)	pH
1	-1	-1	-1	0	5/0	4,5
2	1	-1	-1	10	5/0	4,5
3	-1	1	-1	0	0/6	4,5
4	1	1	-1	10	0/6	4,5
5	-1	-1	1	0	5/0	5,5
6	1	-1	1	10	5/0	5,5
7	-1	1	1	0	0/6	5,5
8	1	1	1	10	0/6	5,5
9	0	0	0	5	2,5/3	5,0
10	0	0	0	5	2,5/3	5,0
11	0	0	0	5	2,5/3	5,0

* Relação entre as concentrações de Extrato de Levedura (EL) e Prodex Lac® (PL) presentes no meio

3.2.10. Estudo com adição de EDTA

A literatura relata que o ferro atua como catalisador na reação

enzimática que promove a isomerização do ácido cítrico em isocítrico dentro do Ciclo de Krebs. Assim, com o objetivo de verificar o efeito de um seqüestrante adicionado ao meio, realizou-se ensaios com diferentes concentrações de EDTA (ácido etileno diamino tetracético) no meio: 0; 0,03; 0,05; 0,08 e 0,1 M. Os ensaios foram realizados em triplicata, em fermentador de bancada, sendo o meio de crescimento apresentado na Tabela 3.2 com 10 g/L de CaCO₃ e o meio de produção composto de 75 g/L de glicose com o EDTA.

3.2.11. Estudo em batelada alimentada

Visando aumentar a quantidade de glicose adicionada ao meio de produção, foi conduzido um ensaio em batelada alimentada. Em um fermentador de bancada de 5 litros, inicialmente com 1,8 litros de meio. 48 horas após a adição do meio de crescimento (200 mL, preparados como descrito no item 3.2.2), foi adicionado 500 mL do meio de produção, resultando uma concentração final de 40 g/L de glicose. No início da fase de produção, começou-se a alimentação do meio com uma solução de glicose a 200 g/L a uma taxa de 500 mL/dia durante 5 dias, ao final do qual o ensaio foi encerrado. As amostras foram coletadas a cada 24 horas para análise.

3.2.12. Estudo com adição de anti-espumante FG10

Foi verificado em outros experimentos realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (DEA/Unicamp) que o anti-espumante (Aratrop) poderia inibir a formação de produto e o crescimento de microrganismos no fermentador. A fim de avaliar essa influência, foi realizado um ensaio em que o anti-espumante utilizado foi o FG10, menos eficiente que o Aratrop. A fim de facilitar a comparação dos resultados obtidos, esse ensaio foi conduzido nas mesmas condições dos pontos centrais do Planejamento Experimental, conforme descrito no item 3.2.9.

3.2.13. Ensaio para validação dos resultados do planejamento experimental

Como os resultados obtidos no planejamento indicaram que a

quantidade de ácido cítrico acumulada aumentava com o aumento de pH e da concentração de Prodex Lac®. Foi realizado um ensaio em fermentador de bancada, com o meio de crescimento sendo: glicose, 50g/L; KH₂PO₄, 0,2 g/L; NH₄Cl, 1 g/L; Prodex Lac®, 8 g/L e pH 5,50. As demais condições são as descritas no item 3.2.9.

3.3. Métodos analíticos

As amostras das fermentações (5 mL) foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos a 5 °C, sendo o sobrenadante utilizado para determinação de açúcar residual e ácidos cítrico e isocítrico produzidos, e o precipitado para determinação da massa seca e viabilidade celular.

3.3.1 Determinação de ácido cítrico, isocítrico e glicose

Para determinação da glicose residual e dos ácidos cítrico e isocítrico produzidos na fermentação empregou-se a metodologia de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando-se uma coluna de NH₂, ácido acético 0,05% com pH ajustado para 2,5 pela adição de ácido sulfúrico como eluente, com fluxo de 0,3 mL/min, temperatura do detector de índice de refração de 40 °C, temperatura do forno 30 °C e temperatura ambiente entre 22 e 24 °C com um volume de injeção de 40 µL. A identificação, integração e quantificação dos compostos da fermentação foi feita através de um software Millennium de aquisição e processamento de dados, através da comparação com os padrões (COSTA, 2000).

3.3.2 Determinação da massa seca (MS) produzida

Na determinação da massa celular produzida na fermentação, foi adotado o método indireto (curvas que correlacionam densidade ótica *versus* massa celular), como mostrado na **Figura 3.2**.

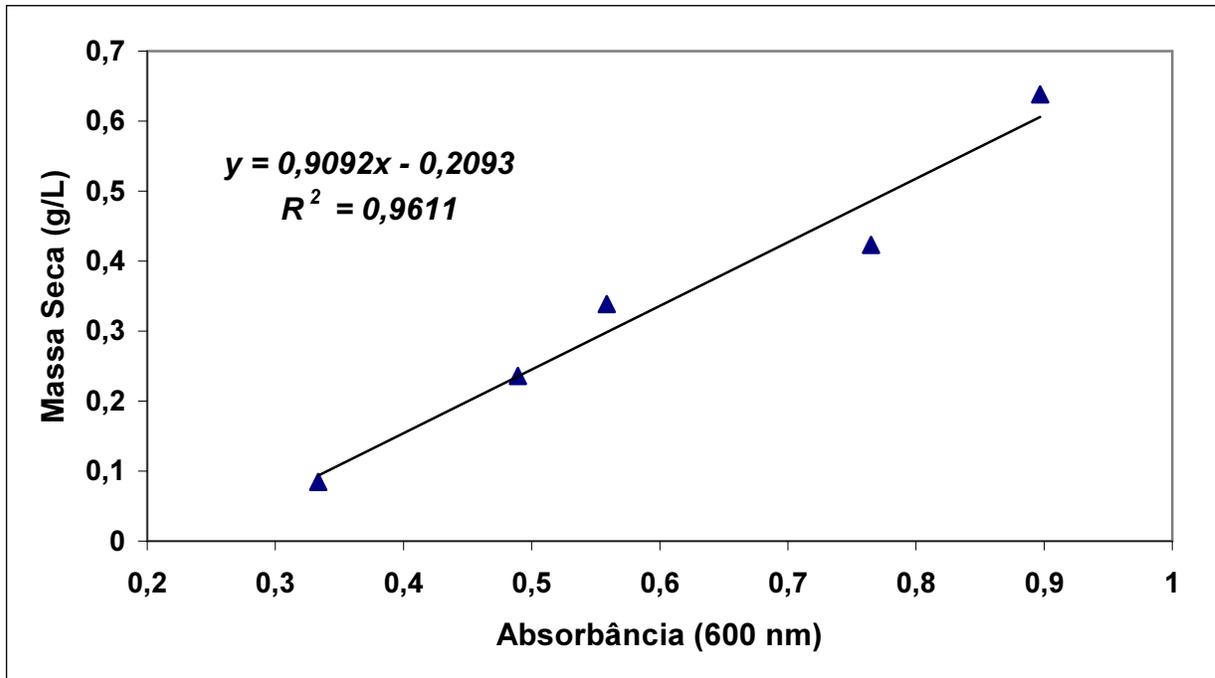


Figura 3.2.: Curva padrão para determinação da massa seca

3.3.3 Determinação da viabilidade celular das leveduras

Para a determinação da viabilidade celular das leveduras foi utilizado o método de coloração por azul de metileno segundo (LEE, 1981). Misturou-se uma amostra contendo uma quantidade conhecida de células e uma solução de azul de metileno. As células que não apresentaram atividade fisiológica ficaram coloridas e as células vivas incolores.

3.3.4 Determinação dos Coeficientes de Rendimento

Os coeficientes de rendimento (Y) foram calculados de acordo com as equações 4.1 e 4.2.

$$Y_{\text{Global}} = \frac{P_2 - P_1}{(S_C + S_P) - S_f} \quad (4.1)$$

$$Y_{\text{Prod}} = \frac{P_2 - P_P}{S_P - S_f} \quad (4.2)$$

Onde:

P_1 = quantidade de ácido no meio no início da fermentação;

P_2 = quantidade máxima de ácido produzido;

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

S_C = quantidade de glicose adicionada no meio de crescimento;

S_p = quantidade de glicose adicionada no meio de produção;

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

A produtividade foi calculada dividindo-se a concentração de produto pelo tempo total de fermentação até essa concentração ser atingida.

4. Resultados e Discussão

4.1. Resultados obtidos nos testes com *Y. lipolytica* NRRL YB 423, *C. oleophila* NRRL 2317, *Y. lipolytica* ATCC 8661, *C. guilliermondii* ATCC 9058

Foram realizados ensaios com diferentes cepas a fim de comparar a produção desses microrganismos com a produção de *C. lipolytica* Y 1095, utilizada em nossos ensaios. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o item 3.2.8. As **Figura 4.1**, 4.2 e 4.3 mostram as cinéticas de consumo de glicose e produção de ácidos cítrico e isocítrico obtidos nestes ensaios.

Pela **Figura 4.1** pode-se perceber que não houve grande diferença na cinética de consumo de glicose, sendo que a maioria apresenta perfil semelhante. A única exceção verificada foi *Candida guilliermondii* ATCC 9058 que teve um consumo de glicose rápido até 96 horas de fermentação e depois o nível de glicose no meio permaneceu constante. Como os ensaios foram interrompidos com 7 dias de fermentação, a glicose não foi consumida totalmente em nenhum dos ensaios.

Com relação à produção de ácido cítrico verifica-se pela **Figura 4.2**, que *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 foi a mais eficiente chegando a uma concentração de 20 g/L após 7 dias de fermentação, superior à produção obtida com *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 que alcançou 15 g/L. A produção de ácido cítrico por *Candida guilliermondii* ATCC 9058 ficou na faixa de 8 g/L. Não foi verificada produção de ácido cítrico pelos outros dois microrganismos estudados.

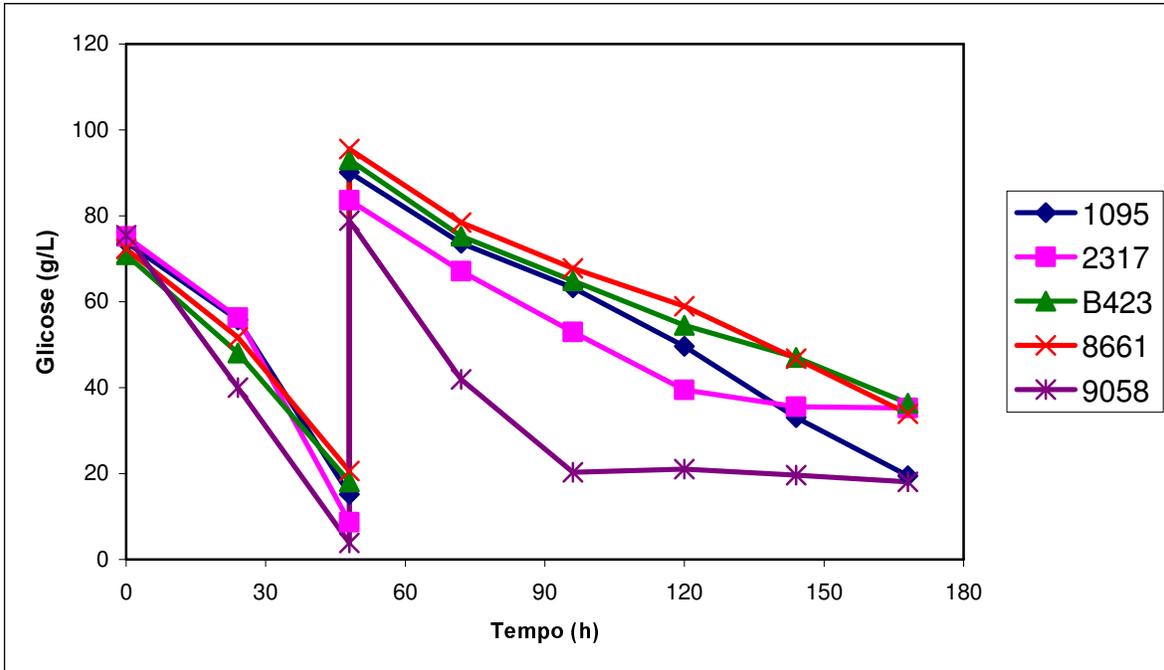


Figura 4.1.: Cinética de consumo de glicose para diferentes cepas de microrganismos

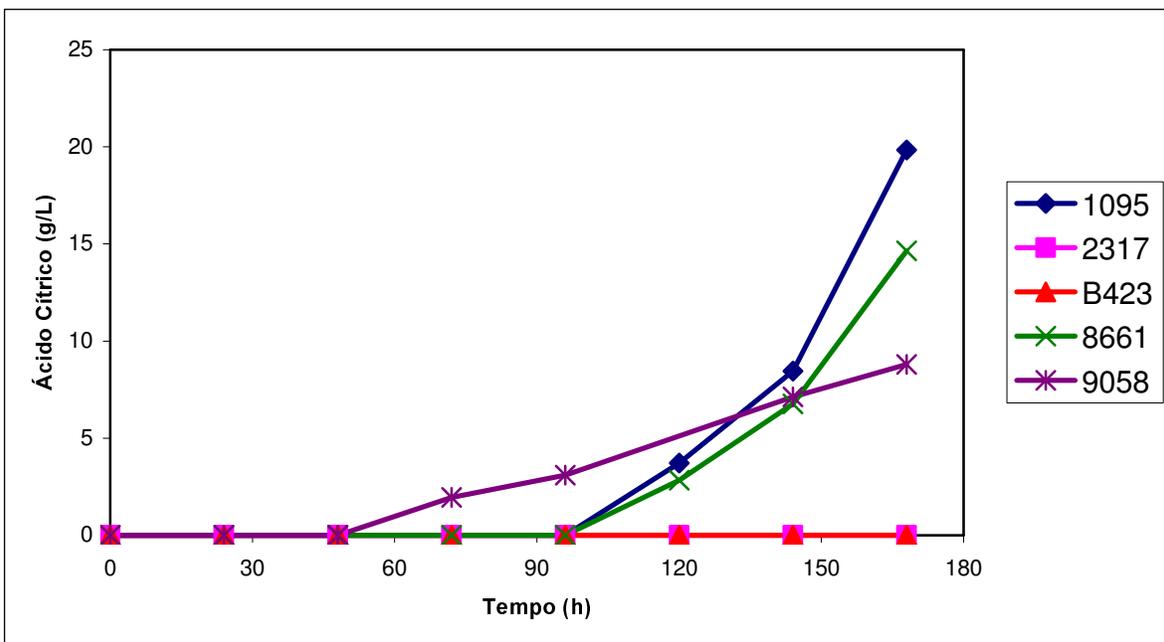


Figura 4.2.: Produção de ácido cítrico para diferentes cepas de microrganismos

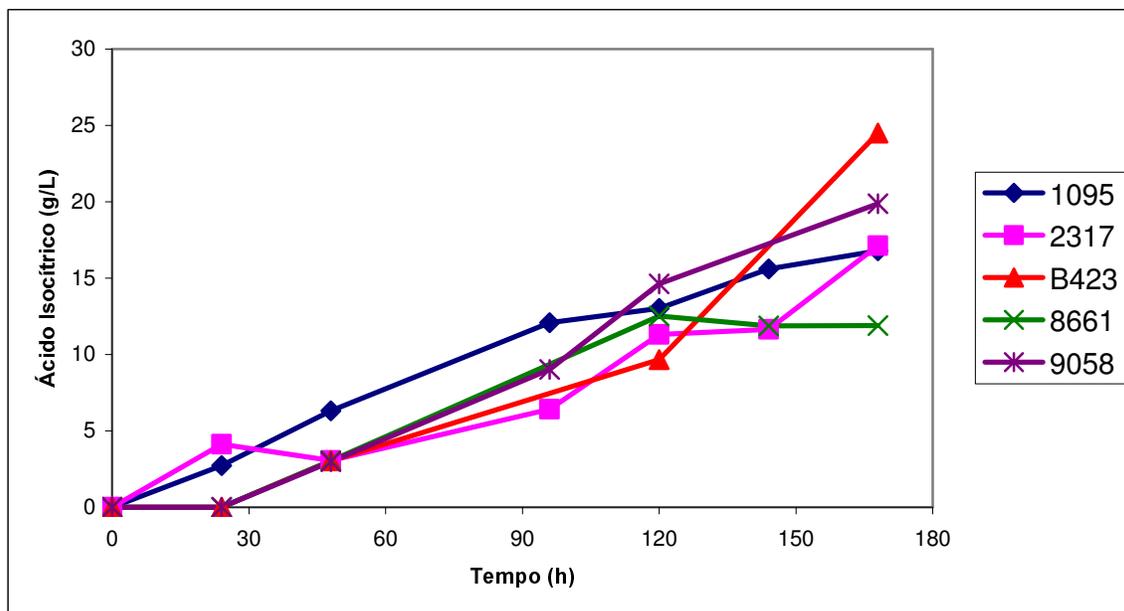


Figura 4.3.: Produção de ácido isocítrico obtida nos ensaios com diferentes microrganismos

Na Figura 4.3 observa-se que a produção de ácido isocítrico, após 168 horas de fermentação variou entre 10 e 25 g/L entre as cepas. *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 foi a cepa que apresentou a menor produção deste ácido, ficando em torno de 11 g/L ao final do ensaio, enquanto que a maior produção de ácido isocítrico se verificou na cepa *Yarrowia lipolytica* NRRL YB 423 que produziu 25 g/L. Na Tabela 4.1 está mostrada a relação entre ácido cítrico : isocítrico produzida pelas diferentes linhagens de levedura.

Tabela 4.1.: Relação cítrico : isocítrico produzida pelas diferentes cepas

Cepa	NRRL Y 1095	NRRL 2317	NRRL YB423	ATCC 8661	ATCC 9058
Cit/Iso	1,18	-	-	1,23	0,44

Pode-se notar que a razão cítrico : isocítrico para *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661 foi ligeiramente maior do que com *Candida lipolytica* NRRL Y 1095. A diferença não é significativa, indicando que essa levedura pode ser uma boa produtora de ácido cítrico, podendo ser estudada no futuro.

A Figura 4.4 apresenta a massa seca produzida em 48 horas de

fermentação em shaker a 27 °C e 150 rpm pelos diferentes microrganismos utilizados no ensaio.

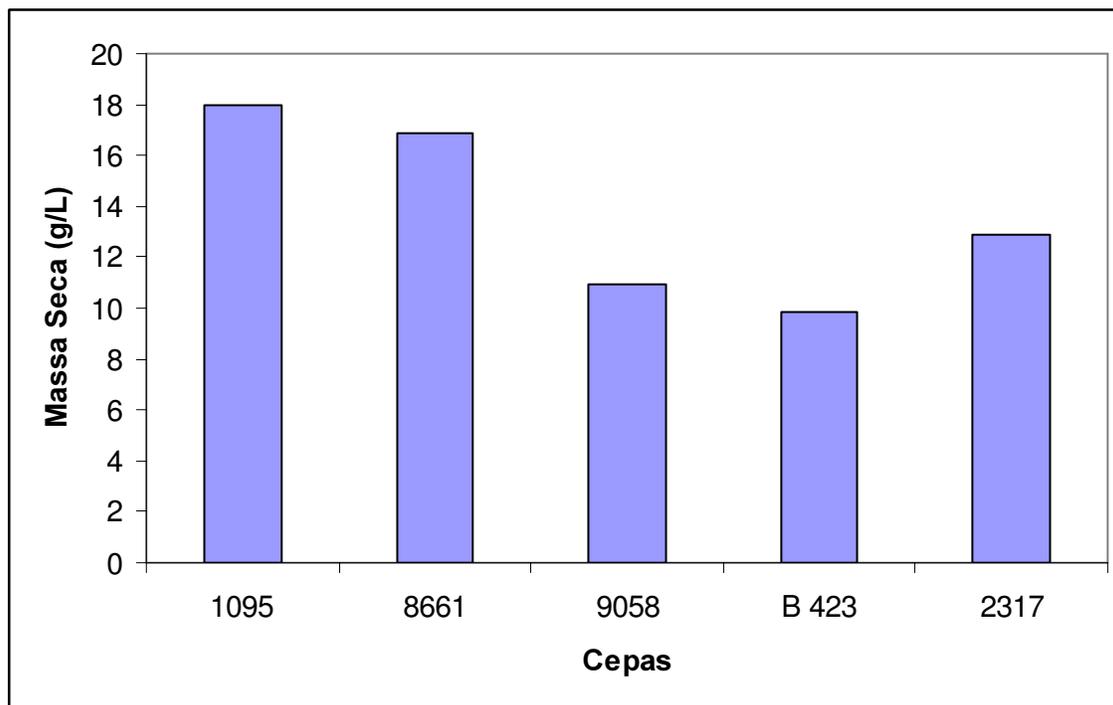


Figura 4.4.: Crescimento celular em frascos agitados para diferentes cepas após 48 h de fermentação

Pode-se notar que *Y. lipolytica* ATCC 8661 teve um crescimento celular da mesma ordem de grandeza que *C. lipolytica* NRRL Y 1095, em torno de 18 g/L. As cepas de *Y. lipolytica* NRRL Y B 423, *C. oleophila* NRRL 2317 e *C. guilliermondii* ATCC 9058 apresentaram um menor crescimento celular, entre 10 e 13 g/L.

4.2. Resultados dos testes em frascos agitados utilizando-se Prodex Lac® como fonte de nitrogênio

4.2.1. Na Etapa de Crescimento Celular

O teste de crescimento celular realizado com o Prodex Lac® foi conduzido de acordo com o item 3.2.4.

O objetivo deste teste foi verificar a viabilidade do Prodex Lac® para a fase de crescimento de *Candida lipolytica* NRRL Y 1095. Os resultados obtidos

para massa celular estão apresentadas na Tabela 4.2 e na Figura 4.5.

Tabela 4.2.: Massa seca produzida em cada meio de crescimento após 48 horas de incubação a 150 rpm e 27°C

Meio de Crescimento	Massa Seca (g/L)
Otimizado	21,87
Prodex Lac®	17,60

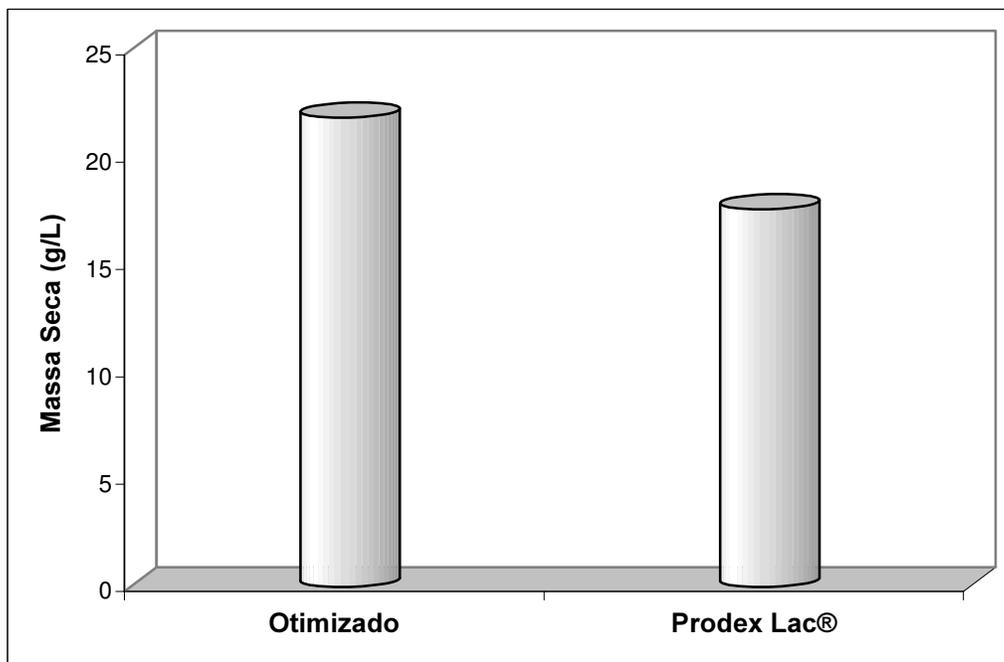


Figura 4.5.: Massa seca produzida em cada meio estudado

Analisando esses dados, observa-se que os valores de massa seca obtidos nos ensaios foram muito próximos, mostrando que o Prodex Lac® permite um bom crescimento do microrganismo atingindo 80% do valor obtido com o meio otimizado. Isso revela a viabilidade de utilização do Prodex Lac® como fonte de nitrogênio para a fase de crescimento celular do microrganismo.

4.2.2. Na Etapa de Produção

O teste de produção realizado com Prodex Lac®, foi conduzido de acordo com o item 3.2.4. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabela 4.3 e Tabela 4.4.

Comparando-se a produção de ácido cítrico nos dois meios, percebe-se que o meio com Prodex Lac® apresentou uma produção um pouco maior que a do meio otimizado, mostrando a viabilidade de substituição do extrato de levedura, principalmente devido ao baixo custo do Prodex Lac® quando comparado com o extrato de levedura.

Tabela 4.3.: Teste de Produção – Meio Otimizado

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)	
			Cítrico	Isocítrico
48	16,88	79,44	3,00	1,92
98	18,69	55,11	6,15	-
123	19,95	48,91	7,73	-
147	17,78	44,59	9,24	1,49
170	23,31	34,41	12,46	0,15

Tabela 4.4.: Teste de Produção – Meio com Prodex Lac®

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)	
			Cítrico	Isocítrico
48	5,47	79,91	2,82	-
98	6,59	60,31	6,13	-
123	7,14	52,18	8,46	-
147	6,54	50,03	10,27	0,37
170	8,17	41,74	13,55	-

4.3. Resultados obtidos no teste com diferentes tipos de impulsores

Foram realizados ensaios com três diferentes tipos de impulsores a fim de se verificar se havia alguma influência na produção de ácido cítrico e isocítrico. As fermentações foram conduzidas de acordo com o item 3.2.5. Os impulsores utilizados foram do tipo hélice naval, de pás inclinadas e turbina de Rushton.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4.5 a 4.7 e nas Figuras 4.6 a 4.8.

Turbina de Rushton

Tabela 4.5.: Fermentação com Turbina de Rushton - Aeração: 1 vvm – Agitação: 600 rpm

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
0	1,2	46,4	0	2,2	0,0
24	21,7	20,1	2,0	6,6	0,3
44	22,6	8,1	6,5	8,7	0,7
44	20,8	73,0	3,0	8,2	0,4
68	23,4	24,1	5,5	7,1	0,8
95	25,8	25,2	22,5	19,8	1,1
122	---	16,7	24,2	20,7	1,2
144	23,1	8,7	30,7	24,2	1,3
167	23,5	5,9	34,1	25,9	1,3
170	---	5,5	34,0	26,7	1,3

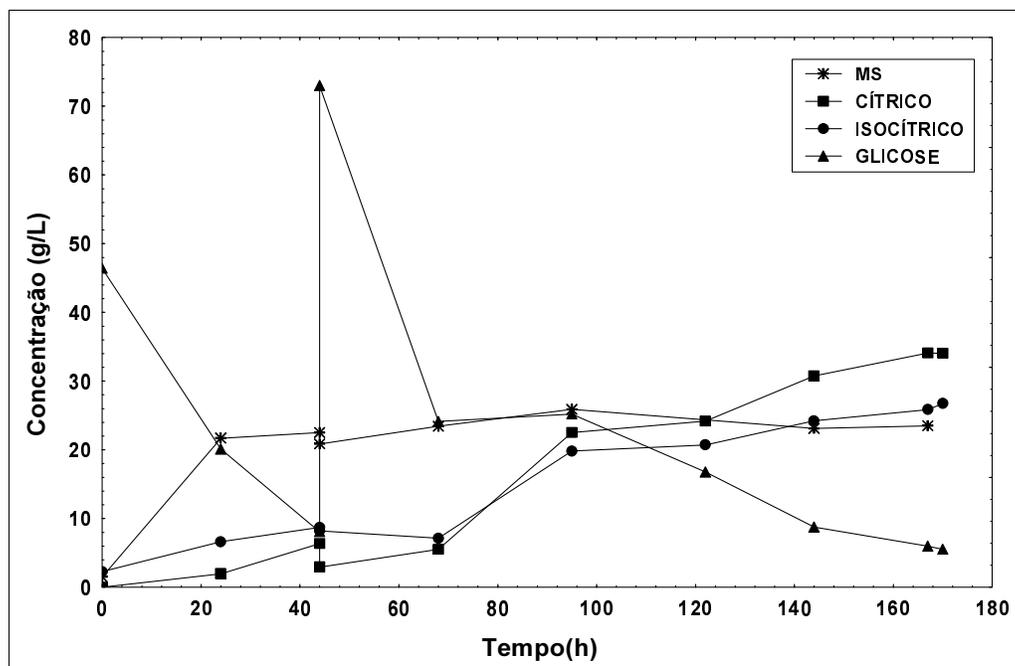


Figura 4.6.: Evolução da quantidade de ácidos cítrico e isocítrico produzidos, consumo de glicose e crescimento celular para o ensaio conduzido com impulsor tipo turbina de "Rushton".

Pela Figura 4.6 pode-se observar que a quantidade de ácido cítrico produzida foi de 34 g/L, superando a quantidade produzida de ácido isocítrico, que foi de 26 g/L numa relação cítrico : isocítrico de 1,3, após 170 horas de

fermentação, tempo no qual a glicose foi praticamente toda consumida. A massa celular manteve-se num mesmo patamar após a adição do meio de produção até o fim da fermentação.

Hélice Naval

Pode-se observar na Tabela 4.6 e Figura 4.7 que a quantidade de ácido cítrico produzida, 5 g/L, foi muito menor que a quantidade de ácido isocítrico, 32 g/L. A relação ácido cítrico : isocítrico foi muito baixa, ficando em 0,2 apenas. Observa-se que a um tempo de aproximadamente 190 horas, o consumo de glicose cessou e as quantidades de ácido cítrico e isocítrico diminuíram, possivelmente tendo sido metabolizados pelo microrganismo. Observa-se também que a produção de ácido cítrico iniciou-se após um tempo de 120 horas. A massa celular permanece constante após a adição do meio de produção, indicando não haver crescimento celular nesta fase do processo.

Tabela 4.6.: Fermentação com hélice naval - Aeração: 1 vvm – Agitação: 600 rpm

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
0	1,7	41,9	0	2,7	0
25	12,8	20,8	0	4,7	0
50	17,9	9,1	0	11,1	0
67	15,3	5,8	0	10,1	0
67	13,5	15,8	0	9,9	0
96	17,7	49,1	0	16,3	0
120	17,3	33,3	0,7	18,9	0,1
144	17,9	26,5	3,7	25,4	0,2
166	18,7	19,0	6,6	29,1	0,2
188	17,8	11,7	5,9	36,1	0,2
194	16,9	9,1	7,8	37,1	0,2
212	16,2	9,0	5,6	32,3	0,2

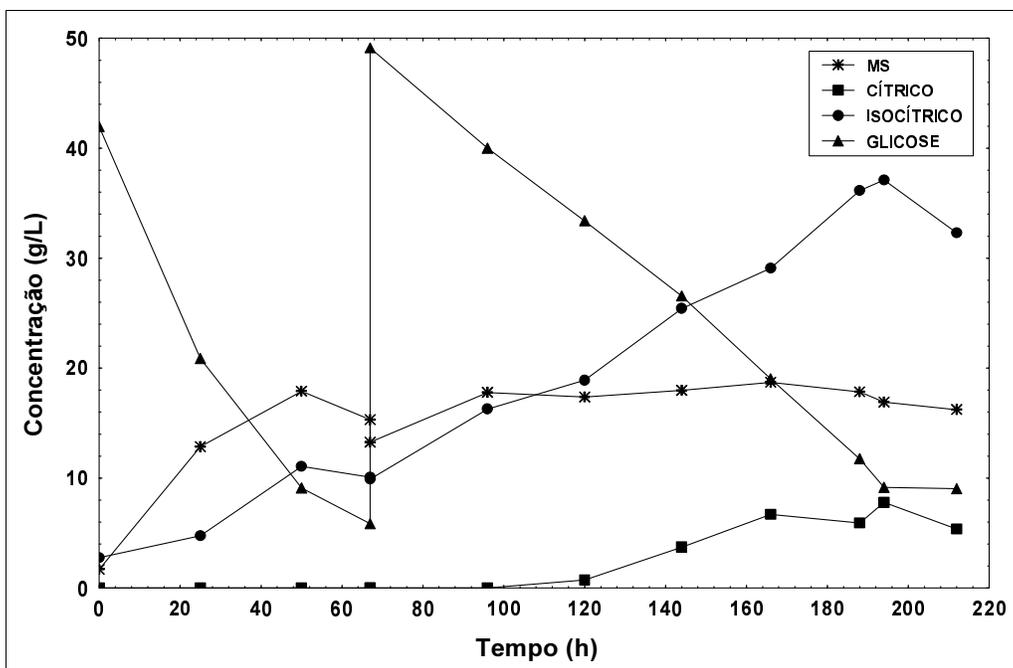


Figura 4.7.: Evolução da quantidade de ácidos cítrico e isocítrico produzidos, consumo de glicose e crescimento celular para o ensaio conduzido com impulsor tipo hélice naval

Pás Inclinadas

Na Figura 4.8 e na Tabela 4.7 percebe-se que a produção de ácido isocítrico chegou a 40 g/L, superando a produção de ácido cítrico, que não passou de 7 g/L ao final do ensaio. Da mesma forma que nos ensaios anteriores, percebe-se que a massa celular permanece praticamente constante após a adição do meio de produção. O esgotamento da glicose se dá num tempo de aproximadamente 280 horas, ou seja, 100 horas a mais que o ensaio conduzido com o impulsor tipo turbina de Rushton, indicando que a variação do oxigênio disponível no meio ocasionada pelo tipo de agitação que cada impulsor promove, afeta a quantidade de ácido cítrico e isocítrico excretadas.

O resultado do teste com o impulsor de pás inclinadas não apresentou um bom resultado, ficando a produção de ácido cítrico em 7,04 g/L enquanto que a produção de ácido isocítrico foi favorecida atingindo 42,13 g/L, com uma relação de 0,2.

Tabela 4.7.: Fermentação com impulsor de Pás inclinadas – Aer.: 1 vvm – Agitação: 600 rpm

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
0	3,5	76,2	0	2,1	0
23	10,8	45,4	0	4,2	0
46	13,6	36,3	0	5,0	0
67	16,6	14,8	5,4	8,9	0,6
89	15,1	8,2	6,2	10,1	0,6
89	14,2	97,4	2,7	10,1	0,3
120	15,9	80,2	7,7	15,6	0,5
144	16,6	65,4	9,7	19,6	0,5
168	16,7	52,1	7,9	24,6	0,3
192	16,1	34,4	-	28,2	-
215	17,7	25,2	5,4	30,3	0,2
256	19,8	10,4	5,8	36,8	0,2
281	14,3	0	7,0	42,1	0,2

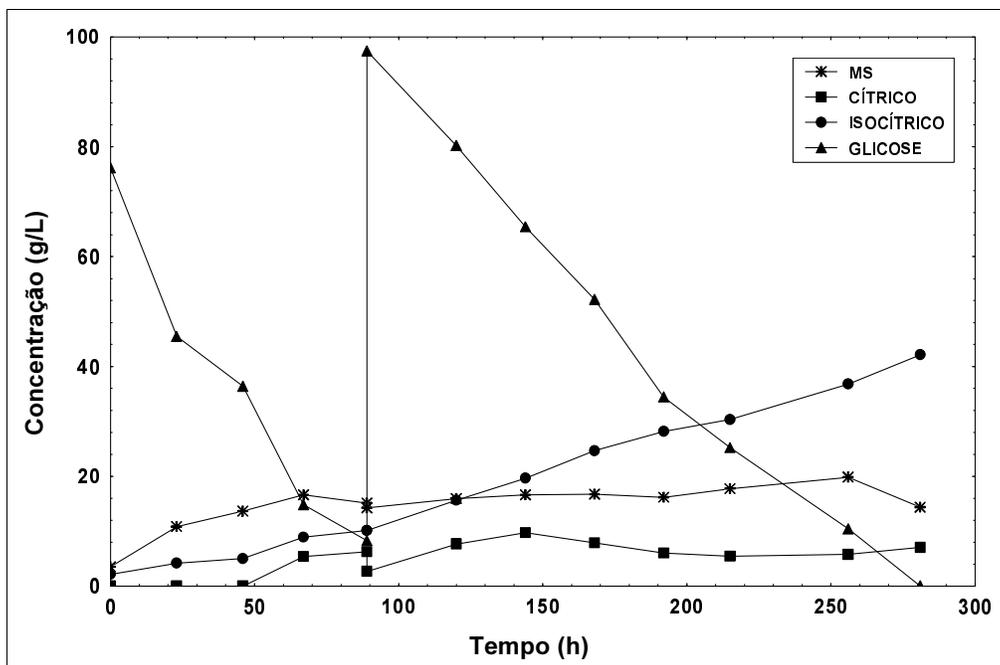


Figura 4.8.: Evolução da quantidade de ácidos cítrico e isocítrico produzidos, consumo de glicose e crescimento celular para o ensaio conduzido com impulsor de pás inclinadas

A Figura 4.9 mostra a comparação entre os resultados obtidos com os três tipos de impulsores.

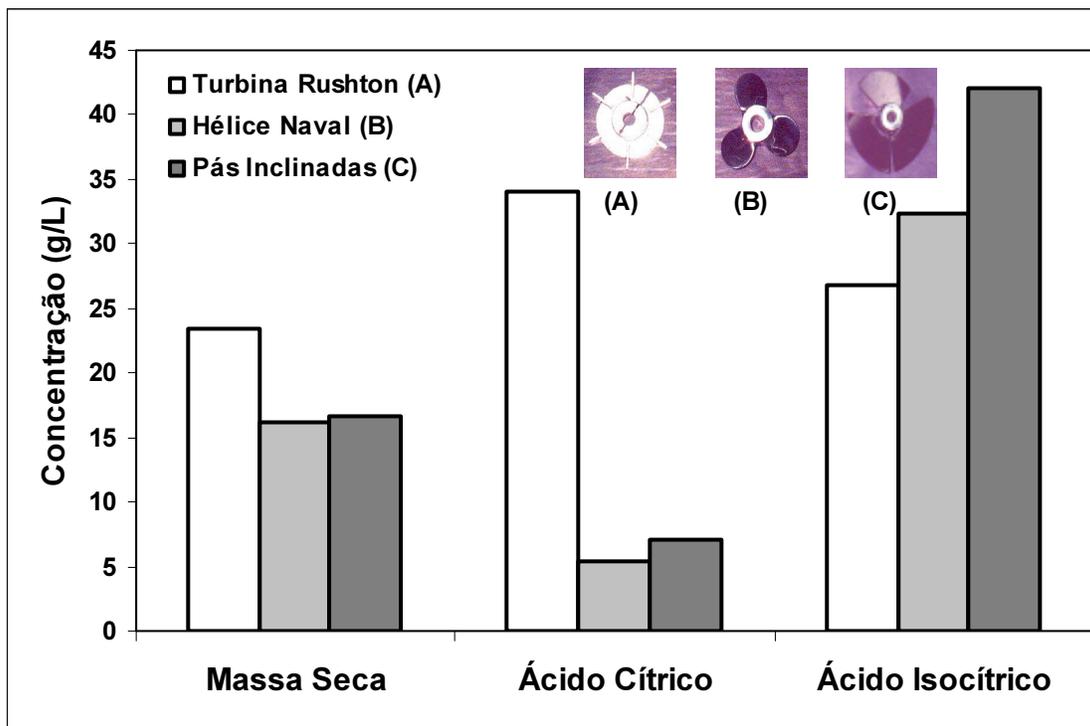


Figura 4.9.: Comparação entre massa celular, ácido cítrico e isocítrico produzidos com diferentes tipos de impulsores

O ensaio conduzido com o impulsor tipo turbina de Rushton apresentou um aumento na concentração final de ácido cítrico se comparado com os dois ensaios anteriores, atingindo 34,03 g/L e uma diminuição da quantidade de ácido isocítrico, que chegou a 26,74 g/L. A relação ácido cítrico : isocítrico neste ensaio foi de 1 : 0,8.

Foi constatado durante os três ensaios que a viabilidade celular manteve-se em praticamente 100%, não sendo alterada com a mudança de impulsor. A diferença de concentrações de ácidos entre os três ensaios pode ser atribuída pela variação da quantidade de oxigênio dissolvido no meio, causada pelos diferentes tipos de impulsor. A Figura 4.10 mostra a evolução do oxigênio dissolvido nos ensaios com os três tipos de impulsores.

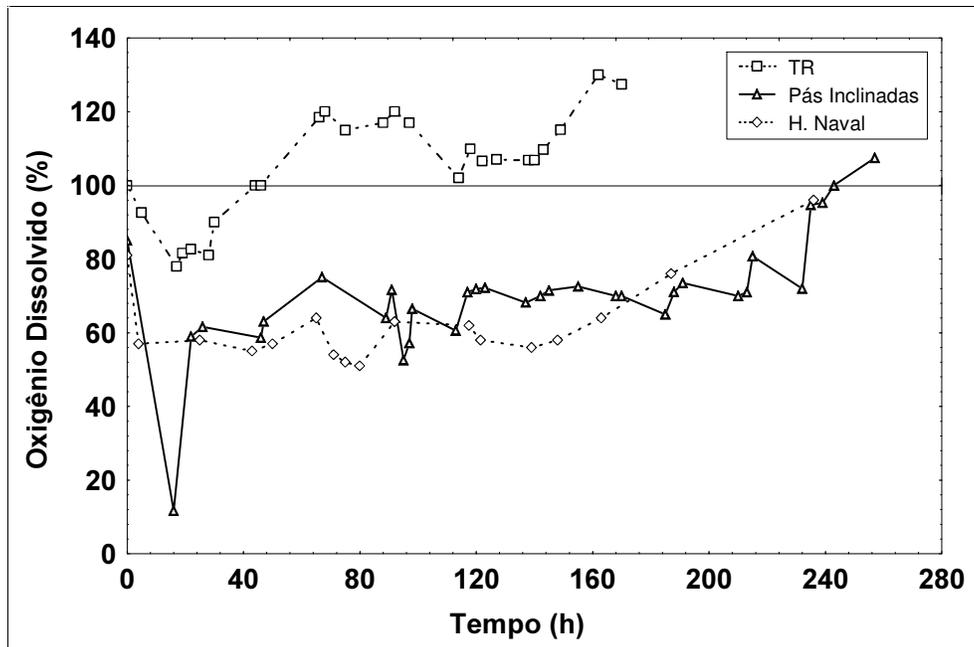


Figura 4.10.: Variação da concentração de oxigênio dissolvido para os 3 ensaios com diferentes tipos de impulsores

O ensaio com turbina de Rushton transcorreu em condições de supersaturação de oxigênio, num tempo de 170 horas, enquanto que no ensaio com impulsor de pás inclinadas essa concentração ficou entre 60 e 80%, só atingindo os 100% ao final da fermentação, de 250 horas. Isso mostra claramente a influência da quantidade de oxigênio do meio no metabolismo do microrganismo. Abaixo, são apresentados os coeficientes de rendimento de ácido cítrico para os três ensaios com diferentes impulsores:

$$Y_{\text{Hélice Naval}} = 0,13$$

$$Y_{\text{Pás Inclínadas}} = 0,07$$

$$Y_{\text{Turbina Rushton}} = 0,46$$

Visto que os resultados obtidos com o impulsor turbina de Rushton forneceram uma concentração final de ácido cítrico e coeficientes de rendimento superior aos demais impulsores, este foi escolhido para ser utilizado nos ensaios futuros.

4.4. Resultados do teste com diferentes concentrações de oxigênio

dissolvido

A fim de se avaliar o efeito da quantidade de oxigênio dissolvido sobre a produção de ácido cítrico e isocítrico, foi realizado um estudo com o impulsor tipo turbina de Rushton, mantendo-se a concentração de oxigênio dissolvido em 50, 60 e 70%. A Figura 4.11 e Tabela 4.8 mostram os resultados do ensaio no qual a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada a 50%.

Tabela 4.8.: Resultados da fermentação conduzida com oxigênio dissolvido mantido a 50%

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
0	2,3	38,8	0	1,9	0
25	11,4	17,8	0	5,1	0
47	15,9	5,9	0	10,2	0
47	15,5	50,5	0	-	-
73	16,1	46,3	0	12,4	0
96	17,3	45,2	0	13,1	0
122	18,5	44,1	0	13,9	0
144	19,0	41,3	0	15,8	0
168	18,2	37,3	0	17,3	0
192	21,3	32,9	0	19,7	0
225	21,0	26,5	2,8	24,9	0,1
240	23,6	21,4	7,0	25,8	0,3
264	20,8	18,4	7,3	32,6	0,2
288	22,9	10,5	8,1	37,5	0,2

Percebe-se, pela Figura 4.11, que o consumo de glicose na fase de produção é muito lento. O acúmulo de ácido cítrico inicia-se após 220 horas de fermentação, chegando a uma concentração final de 8 g/L. O ácido isocítrico começa a ser produzido já na fase de crescimento e, ao final da fase de produção, atinge uma concentração de 37 g/L, e uma relação de cítrico : isocítrico de 0,21. A massa celular ficou numa média de 20 g/L.

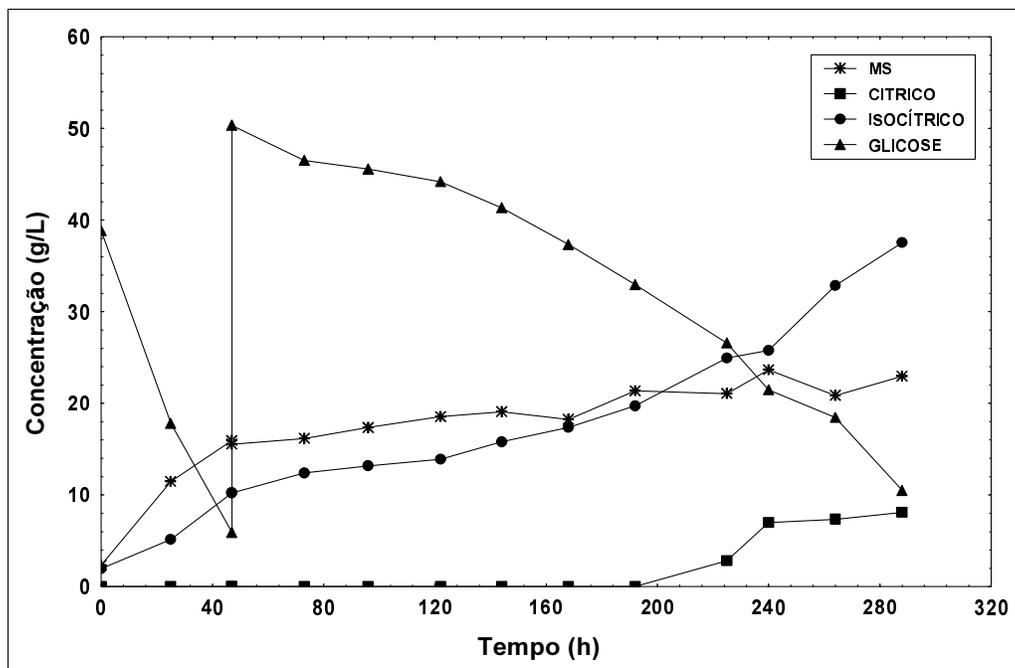


Figura 4.11.: Evolução da quantidade de ácidos cítrico e isocítrico produzidos, consumo de glicose e crescimento celular para o ensaio conduzido com 50% de oxigênio dissolvido no meio

Na Tabela 4.9 e Figura 4.12, encontra-se os resultados do ensaio com concentração de oxigênio dissolvido no meio mantido em 60%.

Pode-se verificar claramente que a glicose é rapidamente consumida, mas a concentração de ácido cítrico final continua baixa, em torno de 7 g/L. O acúmulo de ácido isocítrico, porém, é da ordem de 40 g/L, quase seis vezes superior ao ácido cítrico. A massa celular não apresentou alterações durante a fase de crescimento, ficando em torno de 16 g/L.

Tabela 4.9.: Resultados da fermentação conduzida com oxigênio dissolvido mantido a 60%

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
0	1,6	37,2	0	2,8	0
24	20,6	15,8	0	4,6	0
44	24,8	5,7	0	10,3	0
44	23,9	52,8	0	11,2	0
96	16,0	31,3	1,3	26,3	0,1
120	16,4	23,2	2,9	28,1	0,1
144	16,7	16,8	2,2	33,6	0,1
168	16,3	9,1	5,2	38,3	0,1
186	16,2	9,1	7,1	38,2	0,2

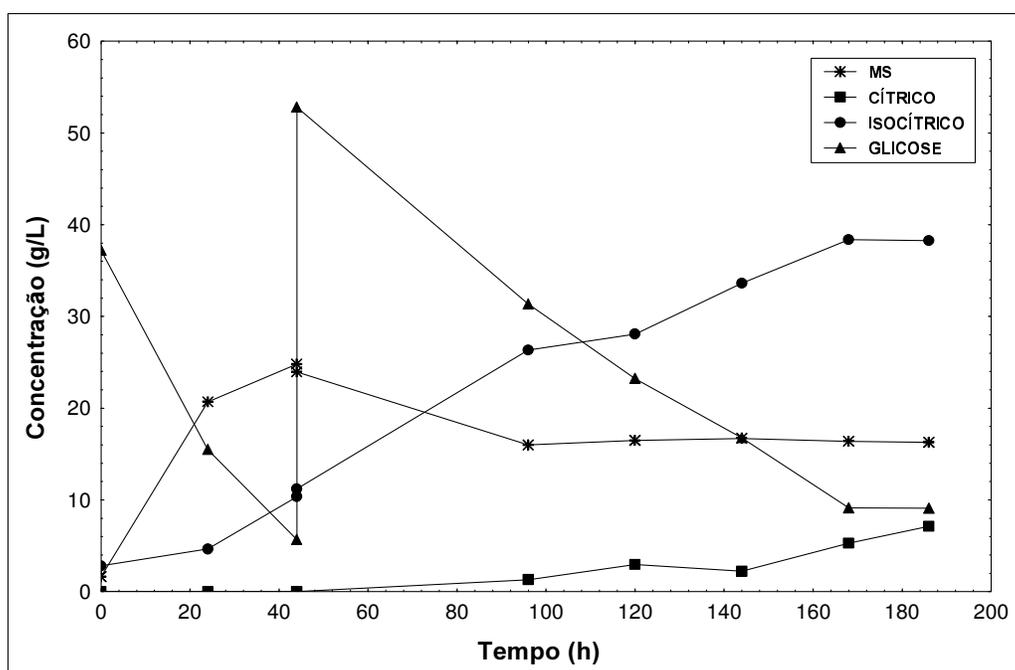


Figura 4.12.: Evolução da quantidade de ácidos cítrico e isocítrico produzidos, consumo de glicose e crescimento celular para o ensaio conduzido com 60% de oxigênio dissolvido no meio

O último ensaio com concentração de oxigênio dissolvido controlado está representado na Tabela 4.10 e Figura 4.13 para 70% de saturação.

Tabela 4.10.: Resultados da fermentação conduzida com oxigênio dissolvido mantido a 70%

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
1	0,2	58,8	0	2,8	0
24	15,1	17,3	5,0	8,8	0,6
41	17,2	4,2	7,3	11,2	0,7
41	16,7	50,0	7,26	11,2	0,7
72	22,6	42,0	18,5	17,9	1,0
96	22,0	24,5	23,9	20,9	1,1
120	22,5	7,6	34,7	27,8	1,2
137	23,1	0,2	40,1	30,1	1,3
161	22,9	0	38,3	31,5	1,2

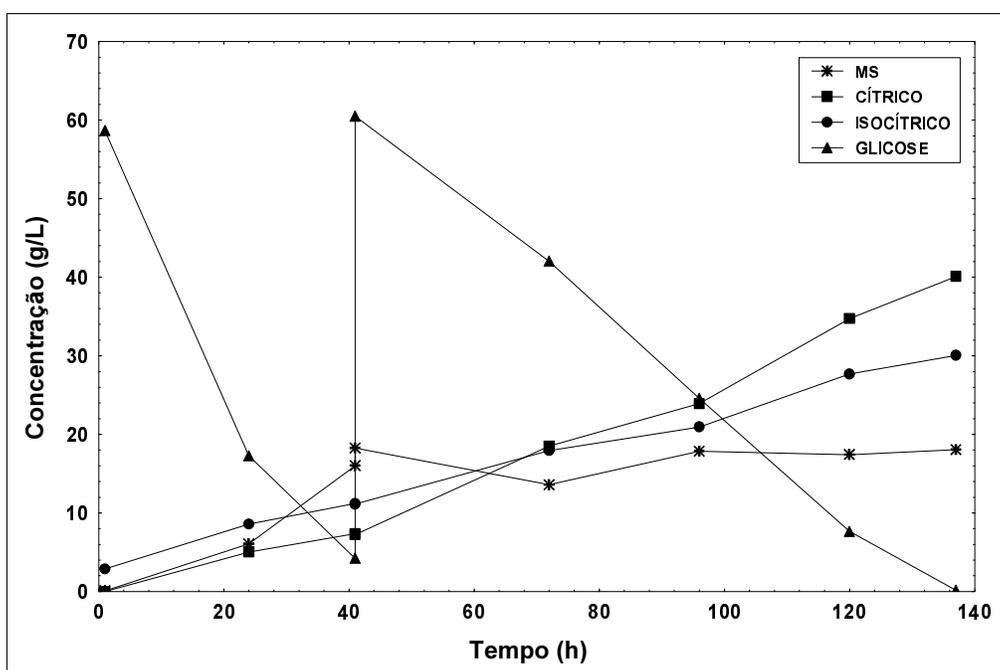


Figura 4.13.: Evolução da quantidade de ácidos cítrico e isocítrico produzidos, consumo de glicose e crescimento celular para o ensaio conduzido com 70% de oxigênio dissolvido no meio

Neste ensaio observa-se que a quantidade de ácido cítrico chegou a 40 g/L, superior à quantidade de ácido isocítrico (30 g/L). Novamente observa-se que a massa celular não sofreu alterações durante a fase de produção, ficando em torno de um valor de 17 g/L.

Analisando-se os três ensaios conjuntamente, pode-se notar que para o ensaio com concentração de 50% a produção de ácido cítrico foi de 8,09 g/L e a produção de ácido isocítrico de 37,53 g/L, sendo a relação ácido cítrico : isocítrico de 1:4,6. Com o aumento da quantidade de oxigênio dissolvido para 60%, a quantidade de ácido cítrico produzida foi de 7,12 g/L e a concentração final de ácido isocítrico chegou a 38,26 g/L, com uma relação de 1:5,4, ou seja, essa variação na quantidade de oxigênio dissolvido não influenciou significativamente a produção de ácido. Fixando-se o oxigênio dissolvido em 70%, percebeu-se uma diferença nas quantidades de ácido cítrico e isocítrico produzidos. O primeiro teve uma produção de 40,10 g/L, enquanto que o segundo apresentou uma concentração de 31,52 g/L. A relação ácido cítrico: isocítrico ao final da fermentação foi de 1 : 0,8.

Um comparativo entre estes ensaios pode ser verificado na Figura 4.14.

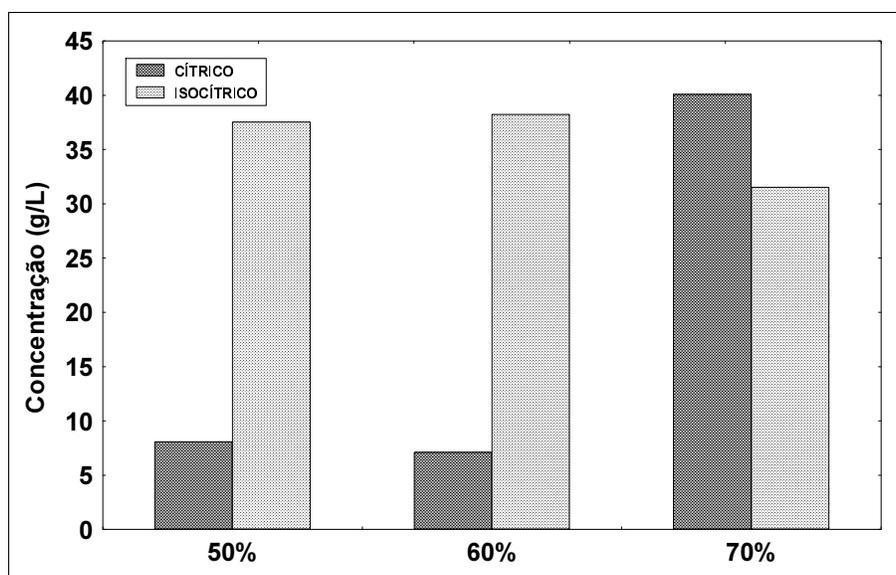


Figura 4.14.: Produção de ácido cítrico e isocítrico sob diferentes concentrações de oxigênio dissolvido

A Figura 4.14 evidencia a importância do oxigênio no acúmulo do ácido cítrico por leveduras, pois um incremento de 60 a 70 % na quantidade do gás dissolvido no meio fermentativo foi suficiente para aumentar a produção de ácido

cítrico em praticamente 6 vezes, passando de 7 g/L para 40 g/L, enquanto que a concentração de ácido isocítrico decaiu de 38 para 31 g/L.

Os coeficientes de rendimento para a produção total de ácido cítrico foram:

$$Y_{50\%} = 0,23$$

$$Y_{60\%} = 0,16$$

$$Y_{70\%} = 0,54$$

4.5. Resultados obtidos no teste com adição de Prodex Lac® e CaCO₃

Foram realizados ensaios com adição de carbonato de cálcio (CaCO₃) e substituição do extrato de levedura por Prodex Lac®. A concentração de oxigênio dissolvida foi mantida em 70%. Estes ensaios foram realizados de acordo com o item 3.2.7.

A Tabela 4.11 e a Figura 4.15 apresentam os resultados obtidos com a adição de 10 g/L de CaCO₃ ao meio de fermentação.

Pela Figura 4.15 constata-se que a produção de ácido cítrico chegou a 55 g/L, bem superior à produção de ácido isocítrico que ficou na ordem de 21 g/L. A relação ácido cítrico : isocítrico alcançada foi de 2,5, superior à obtida com o ensaio no 70% de oxigênio dissolvido no meio, que foi de 1,3.

Tabela 4.11.: Resultados da Fermentação conduzida com 10 g/L de CaCO₃

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
0	0,6	56,5	0	0,9	0
24	15,1	36,4	0	0,7	0
48	21,6	8,7	9,5	1,5	6,2
68	25,7	2,2	16,5	4,3	3,8
68	24,0	75,5	16,0	1,0	15,8
96	20,9	52,8	15,4	7,1	2,2
120	20,3	36,8	28,8	12,4	2,3
144	26,5	17,3	42,2	15,0	2,8
168	27,2	4,5	54,2	19,3	2,8
190	25,8	0	55,4	21,9	2,5

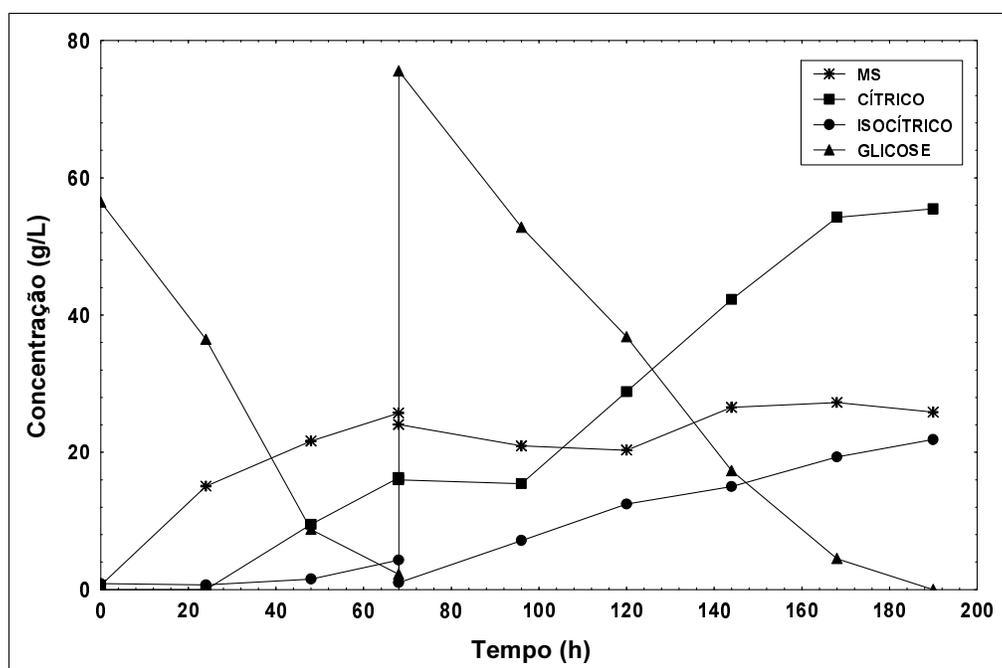


Figura 4.15.: Evolução da produção de ácido cítrico, isocítrico, massa celular e consumo de glicose para o ensaio com adição de CaCO₃

Outro teste foi a substituição do extrato de levedura do meio de crescimento por Prodex Lac®. A análise do teor de nitrogênio, fornecido pela empresa Prodesa S.A., fabricante do produto, foi determinado que 5 gramas de extrato de levedura podem ser substituídos por 6,5 gramas de Prodex Lac®. A

cinética deste ensaio encontra-se representada na Tabela 4.12 e Figura 4.16.

Tabela 4.12.: Resultados do ensaio com substituição do extrato de levedura pelo prodex Lac®

Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Glicose (g/L)	Produção (g/L)		
			Cítrico	Isocítrico	Cit/Iso
0	0,1	59,6	0	3,1	0
21	6,1	40,3	0	3,5	0
47	13,0	25,2	0	9,6	0
69	13,9	11,5	8,4	10,9	0,8
95	15,1	4,7	12,3	13,5	0,9
95	13,3	74,9	6,0	12,9	0,5
120	12,7	66,1	9,9	16,3	0,6
144	13,6	53,9	13,4	16,3	0,8
164	14,4	47,5	14,2	19,4	0,7
192	16,0	37,2	17,2	21,4	0,8
216	18,2	31,3	25,2	25,7	1,0
237	13,6	25,0	37,8	28,6	1,3
264	17,8	23,3	42,7	31,4	1,4

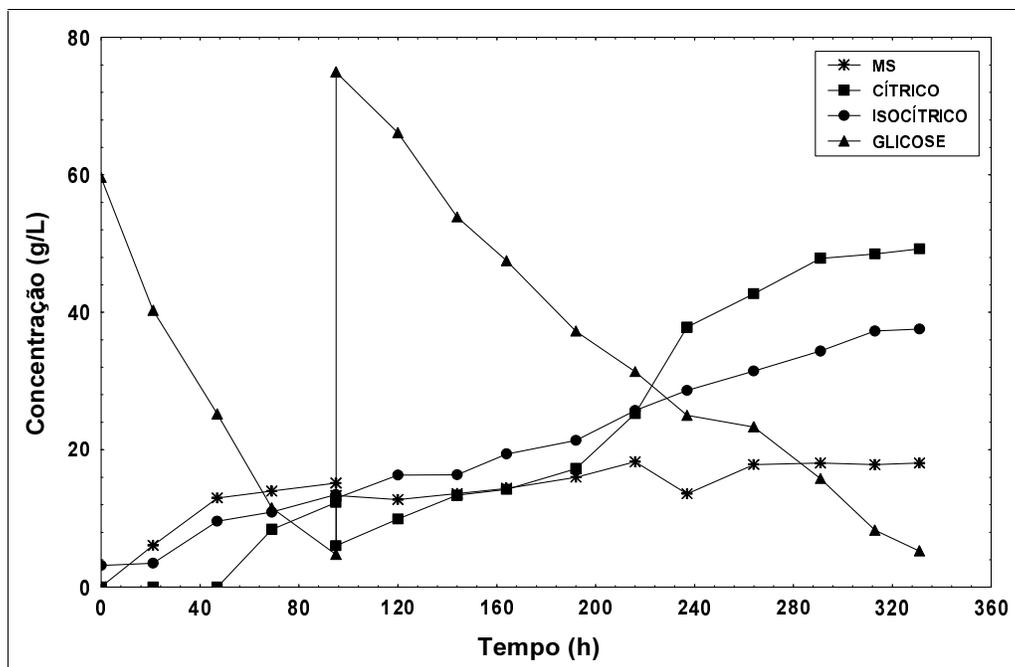


Figura 4.16.: Evolução da produção de ácido cítrico, isocítrico, massa celular e consumo de glicose para o ensaio com adição de Prodex Lac®.

A Figura 4.16 indica que o Prodex Lac® pode ser utilizado como

substituto do extrato de levedura na produção de ácido cítrico em fermentação de bancada. A concentração final do metabólito chegou a 42,7 g/L e o ácido isocítrico ficou em 31,4 g/L, numa relação cítrico : isocítrico de 1,36.

Na Figura 4.17 é apresentada uma comparação entre os ensaios com o meio otimizado, com Prodex Lac® e com carbonato de cálcio.

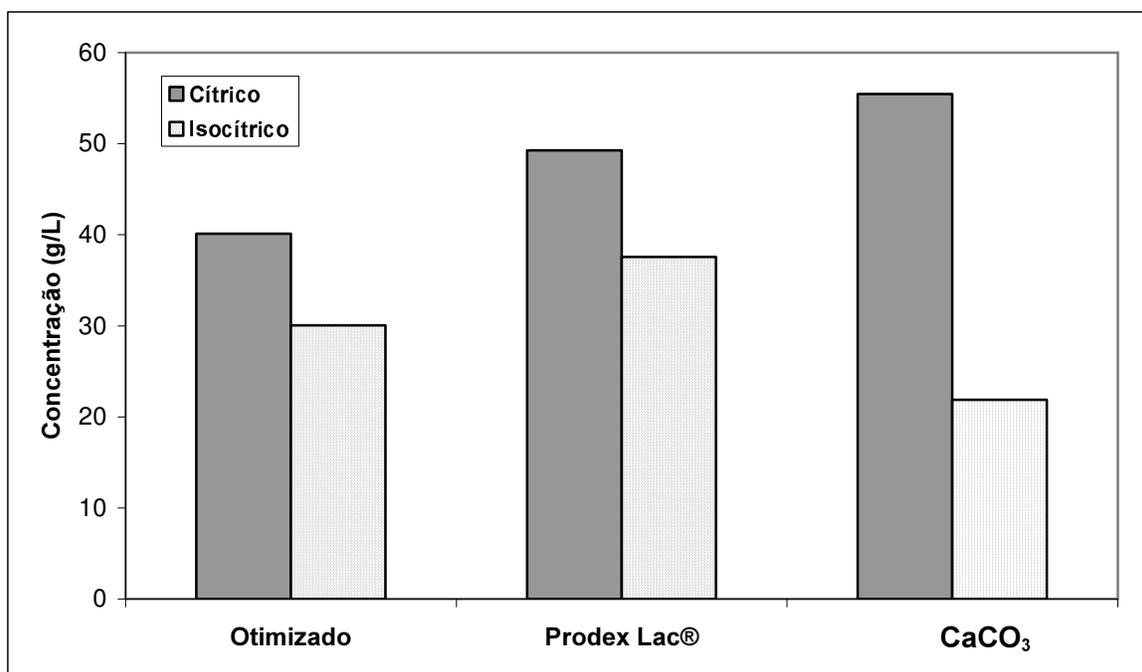


Figura 4.17.: Comparação das quantidades de ácido cítrico e isocítrico produzidos em meios com adição de Prodex Lac® e CaCO₃

Observa-se que a substituição do extrato de levedura por Prodex Lac® provoca um incremento tanto na produção de ácido cítrico como na produção de ácido isocítrico, sendo que o primeiro passa de 40 para 49 g/L, enquanto que o segundo passa de 30 para 37 g/L. A relação cítrico : isocítrico permaneceu inalterada sendo de 1,33 nos dois casos. Quando se adiciona 10 g/L de CaCO₃ ao meio, ocorre um acréscimo significativo na produção de ácido cítrico, que passa de 40 para 55 g/L, se comparada com o ensaio no qual foi utilizado somente o meio otimizado. Com o ácido isocítrico ocorreu o inverso, ou seja, uma redução na quantidade produzida, variando de 30 no primeiro ensaio para 22 g/L no segundo. A relação entre a quantidade de ácido cítrico e isocítrico produzida praticamente dobrou, de 1,33 para 2,50, indicando assim que o carbonato pode estar auxiliando

no acúmulo de ácido cítrico talvez por reagir com o ácido cítrico, formando citrato de cálcio, impedindo assim a formação do ácido isocítrico.

Os coeficientes de rendimento de ácido cítrico calculados para a fase de produção nos três ensaios são:

$$Y_{\text{Otimizado}} = 0,54$$

$$Y_{\text{Prodex Lac®}} = 0,62$$

$$Y_{\text{CaCO}_3} = 0,52$$

Analisando-se esses coeficientes de rendimento, percebe-se que o ensaio com CaCO_3 apresentou um rendimento menor em relação ao ácido cítrico que os ensaios com Prodex Lac® e com o meio otimizado. Por outro lado o ensaio nos mostra que, mesmo tendo um rendimento total menor, a proporção de ácido cítrico : isocítrico produzido foi maior que nos outros ensaios e a concentração final de ácido cítrico (55 g/L) foi maior que em todos os ensaios já realizados até então. Isto justifica a continuidade dos estudos com adição de CaCO_3 ao meio testando-se diferentes concentrações através de um planejamento experimental.

4.6. Resultados obtidos com o planejamento experimental

O planejamento experimental 2^3 com 3 pontos centrais foi realizado em fermentador de bancada, conforme descrito no item 3.2.9, onde foram estudadas as concentrações de CaCO_3 , a substituição do extrato de levedura pelo Prodex Lac® através da relação extrato de levedura/Prodex Lac® (EL/PL) e o pH do meio de fermentação. As condições de cada ensaio estão apresentadas na Tabela 3.5 e os resultados são mostrados na Tabela 4. 13.

Tabela 4. 13.: Planejamento experimental e respostas obtidas para o fermentador de bancada

Ensaio	Planejamento Decodificado			Respostas (g/L)			Coef. Rendimento (g glicose/g ácido)				Produtividade (g/Lh)		Respostas previstas pelo modelo	
	CaCO ₃	EL/PL	pH	Cítrico	Iso.	Cit/Iso	Y _{cit(Prod)}	Y _{iso(Prod)}	Y _{cit(global)}	Y _{iso(global)}	Cítrico	Iso.	Cítrico (g/L)	Desvio (%)
1	0	5/0	4,5	29,2	15,6	1,87	0,27	0,10	0,24	0,09	0,15	0,08	35,4	-21,4
2	10	5/0	4,5	30,3	23,9	1,27	0,25	0,17	0,23	0,15	0,18	0,14	27,8	8,4
3	0	0/6	4,5	21,6	26,2	0,82	0,41	0,31	0,23	0,18	0,11	0,14	17,5	18,8
4	10	0/6	4,5	19,7	16,0	1,23	0,33	0,27	0,17	0,14	0,09	0,07	24,5	-24,1
5	0	5/0	5,5	19,1	48,8	0,39	0,32	0,59	0,18	0,38	0,10	0,25	16,0	16,3
6	10	5/0	5,5	20,3	35,6	0,57	0,43	0,54	0,23	0,29	0,15	0,25	26,0	-27,9
7	0	0/6	5,5	15,1	46,6	0,32	0,23	0,65	0,16	0,45	0,06	0,17	19,3	-27,9
8	10	0/6	5,5	48,5	34,4	1,41	0,63	0,45	0,38	0,27	0,34	0,24	43,9	9,4
9	5	2,5/3	5,0	26,3	40,4	0,65	0,41	0,45	0,23	0,28	0,16	0,25	26,3	0,0
10	5	2,5/3	5,0	30,3	23,5	1,29	0,38	0,29	0,26	0,17	0,25	0,20	26,3	13,2
11	5	2,5/3	5,0	29,0	20,8	1,39	0,28	0,18	0,21	0,13	0,26	0,19	26,3	9,2

Pela **Tabela 4. 13** pode-se notar que houve uma grande variação nas quantidades de ácido cítrico e isocítrico produzidas, destacando-se o primeiro ensaio do planejamento, onde a relação cítrico : isocítrico chegou a 1,87, sendo esta a maior relação obtida no planejamento até então. Ao se analisar os outros ensaios, pode-se verificar que a relação entre a produção dos dois ácidos variou entre 0,3 a 1,4. A quantidade total de ácido cítrico produzida variou de 15 g/L a 48 g/L, enquanto que a concentração de ácido isocítrico variou de 15 a 49 g/L. O ensaio que apresentou, de maneira geral, os melhores resultados foi o ensaio número 8, onde a concentração de ácido cítrico chegou a 48 g/L e o coeficiente de rendimento na fase de produção atingiu 0,63, valores bem acima dos obtidos nos demais ensaios.

Na maioria dos ensaios, o coeficiente de rendimento global (Y_{Global}) para o ácido cítrico ficou em torno de 0,23, atingindo um máximo de 0,26. O coeficiente de rendimento para a fase de produção (Y_{prod}) do ácido cítrico variou de 0,25 a 0,63. Com relação aos coeficientes globais do ácido isocítrico, nota-se uma variação de 0,09 a 0,45, e o coeficiente de rendimento na fase de produção sofreu uma variação de 0,1 a 0,65.

A análise do planejamento experimental mostrou que, para as respostas ácido isocítrico, produtividades, relação ácido cítrico : isocítrico e coeficientes de rendimento nenhuma das variáveis foi significativa dentro da faixa estudada. Somente para a resposta concentração de ácido cítrico foi possível elaborar um modelo teórico que descreve o processo dentro da faixa estudada. Também na **Tabela 4. 13** estão apresentadas as respostas referentes ao ácido cítrico, bem como as respostas previstas pelo modelo e o seu desvio em relação aos resultados observados. Como pode-se observar, os desvios do modelo em relação às respostas observadas variam de zero a 28%. Através dos resultados obtidos é possível obter um modelo de 1^a ordem e verificar a validade do mesmo com a análise de variância (ANOVA) que está apresentada na Tabela 4.17. Na região de interesse, ou seja, onde as respostas têm valores mais elevados, o desvio em relação ao modelo fica na ordem de 8 a 9%.

As Tabelas 4.14, 4.15 e 4.16 mostram os efeitos principais e de interação das variáveis estudadas para as respostas ácido cítrico, ácido isocítrico e coeficientes de rendimento para a produção de ácido cítrico. Nessas tabelas podemos verificar que somente para a resposta concentração de ácido cítrico as variáveis foram significativas a 5% de significância.

Tabela 4.14.: Tabela de efeitos do plan. experimental para a produção de ácido cítrico

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t	p
Média*	26,3	0,6	42,3	0,000
CaCO₃*	8,5	1,5	5,8	0,028
EL/PL	1,5	1,5	1,0	0,417
pH	0,6	1,5	0,4	0,740
CaCO₃ x EL/PL*	7,3	1,5	5,0	0,038
CaCO₃ x pH*	8,8	1,5	6,0	0,026
EL/PL x pH*	10,6	1,5	7,2	0,019

* p < 0,05

Tabela 4. 15.: Tabela de efeitos do plan. experimental para a produção de ácido isocítrico

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t	p
Média*	29,9	3,39	8,8	0,012
CaCO ₃	-6,8	7,9	-0,9	0,483
EL/PL	-0,2	7,9	-0,0	0,983
pH	20,9	7,9	2,6	0,120
CaCO ₃ x EL/PL	-4,4	7,9	-0,5	0,638
CaCO ₃ x pH	-5,9	7,9	-0,7	0,537
EL/PL x pH	-1,5	7,9	-0,2	0,867

* p < 0,05

Tabela 4. 16.: Tabela de efeitos do planejamento experimental para o coeficiente de rendimento da produção de ácido cítrico

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t	p
Média*	0,2	0,02	10,1	0,010
CaCO ₃	0,1	0,04	2,2	0,161
EL/PL	0,0	0,04	0,1	0,910
pH	0,0	0,04	0,8	0,522
CaCO ₃ x EL/PL	0,0	0,04	1,2	0,367
CaCO ₃ x pH	0,1	0,04	2,1	0,176
EL/PL x pH	0,1	0,04	1,8	0,214

* p < 0,05

A equação codificada que expressa a produção de ácido cítrico em g/L em função das variáveis estudadas é:

Ácido cítrico =
 $26,30 + 4,25*[CaCO_3] + 3,65*[CaCO_3]*[EL/PL] + 4,41*[CaCO_3]*[pH] + 5,29*[EL/PL]*[pH]$

Tabela 4.17.: ANOVA para a produção de ácido cítrico

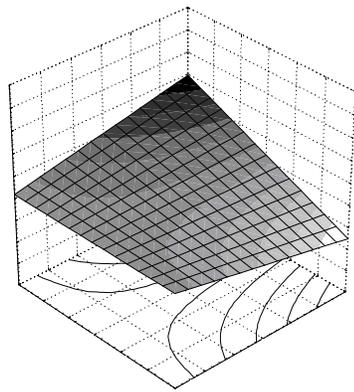
Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F Calculado	F_{0,95;4,6} (Tabelado)
Regressão	629,629	4	157,407	5,02	4,53
Resíduos	188,038	6	31,340		
Falta de Ajuste	179,524	4	44,881		
Erro Puro	8,514	2	4,257		
Total	817,667	10	81,767		

Resíduos = Falta de ajuste + erro puro

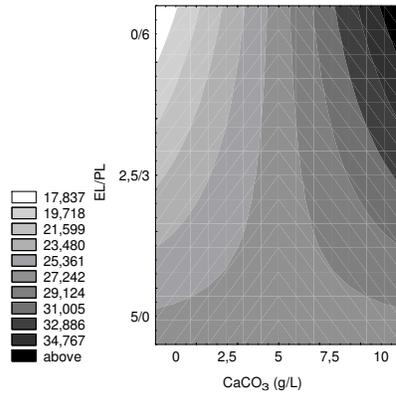
Coefficiente de correlação: R = 0,877

Pela ANOVA pode-se observar que o F calculado é maior que o valor tabelado de F. Analisando-se as respostas previstas pelo modelo e os desvios em relação às respostas obtidas experimentalmente, pode-se afirmar que o modelo é suficiente para avaliar a tendência dos resultados obtidos.

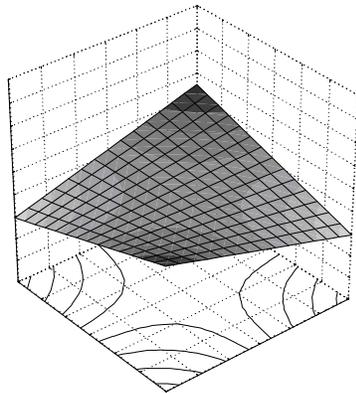
Ao se analisar as superfícies de resposta geradas pelo modelo obtido, pode-se perceber que todas as variáveis têm um efeito positivo sobre a produção de ácido cítrico. Ao passar as variáveis da condição -1 para a condição +1 ocorre um incremento no acúmulo final de ácido, especialmente em se tratando das variáveis Prodex Lac® e CaCO₃, indicando que o extrato de levedura pode ser substituído pelo Prodex Lac® e a adição de CaCO₃ pode ter promovido uma complexação do ácido cítrico, evitando a sua isomerização.



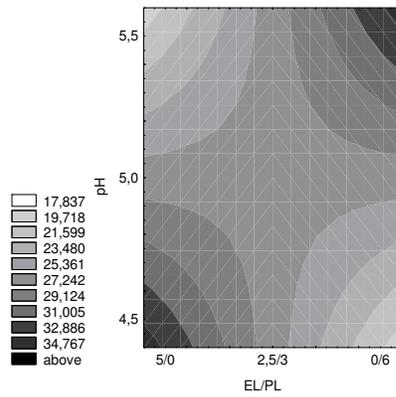
(a)



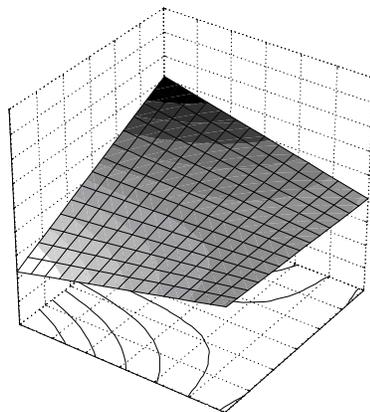
(b)



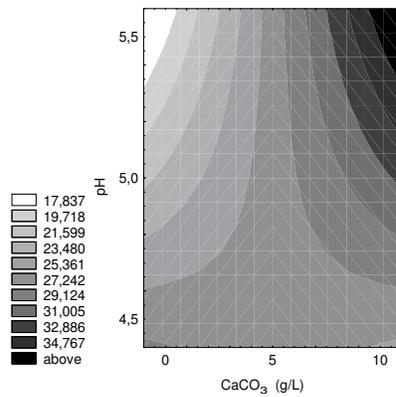
(c)



(d)



(e)



(f)

**Figura 4.18.: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a produção de ácido cítrico
 (a) e (b) em função da relação EL/PL x CaCO_3
 (c) e (d) em função do pH x relação EL/PL
 (e) e (f) em função do pH x CaCO_3**

Nas Figura 4.19 a 4.29 e nas Tabela 4.18 a 4.25 são apresentadas as cinéticas desses ensaios e os dados obtidos.

Primeiro ensaio:

Tabela 4.18.: Primeiro ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 0 \text{ g/L}$; EL/PL = 5/0; pH = 4,5)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	1,8	0	5,2	54,1
2	24	2,6	4,2	5,8	33,6
3	48	4,6	9,7	7,3	8,0
4	67	8,1	6,6	7,8	5,0
5	67	10,7	11,3	8,9	85,8
6	95	13,8	15,8	9,2	66,2
7	145	12,6	27,1	14,3	46,7
8	168	14,6	28,6	15,4	23,6
9	192	13,2	29,2	15,6	20,0

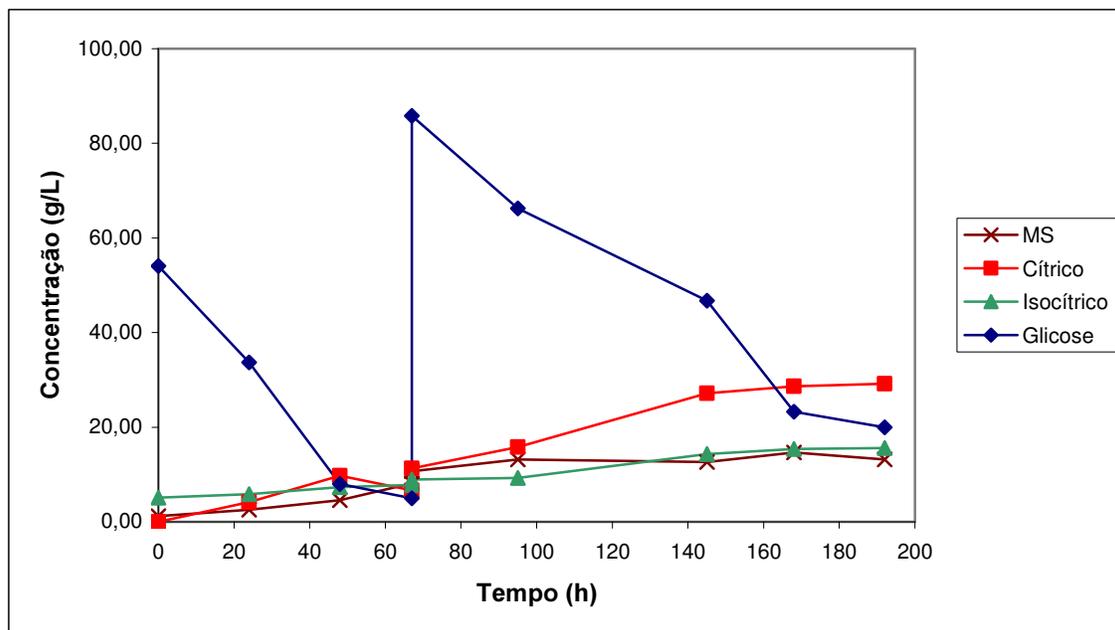


Figura 4.19.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o primeiro ensaio do planejamento

Neste ensaio foi verificado que a glicose não foi totalmente consumida ao término de praticamente 200 horas de fermentação. A quantidade de ácido cítrico produzida chegou ao redor de 30 g/L, enquanto que a quantidade de ácido isocítrico acumulada ficou em torno de 15 g/L.

Segundo ensaio:

Tabela 4.19.: Segundo ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 10 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 5/0$; $\text{pH} = 4,5$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	1,9	0,0	4,4	54,5
2	24	9,8	3,5	6,9	34,8
3	51	18,	13,5	13,4	8,9
4	51	19,3	10,0	9,9	85,1
5	74	20,9	13,7	10,7	53,6
6	96	20,1	17,5	15,2	43,7
7	146	23,0	20,0	22,1	22,1
8	168	25,4	30,3	23,9	15,1
9	194	25,1	28,8	24,0	8,2

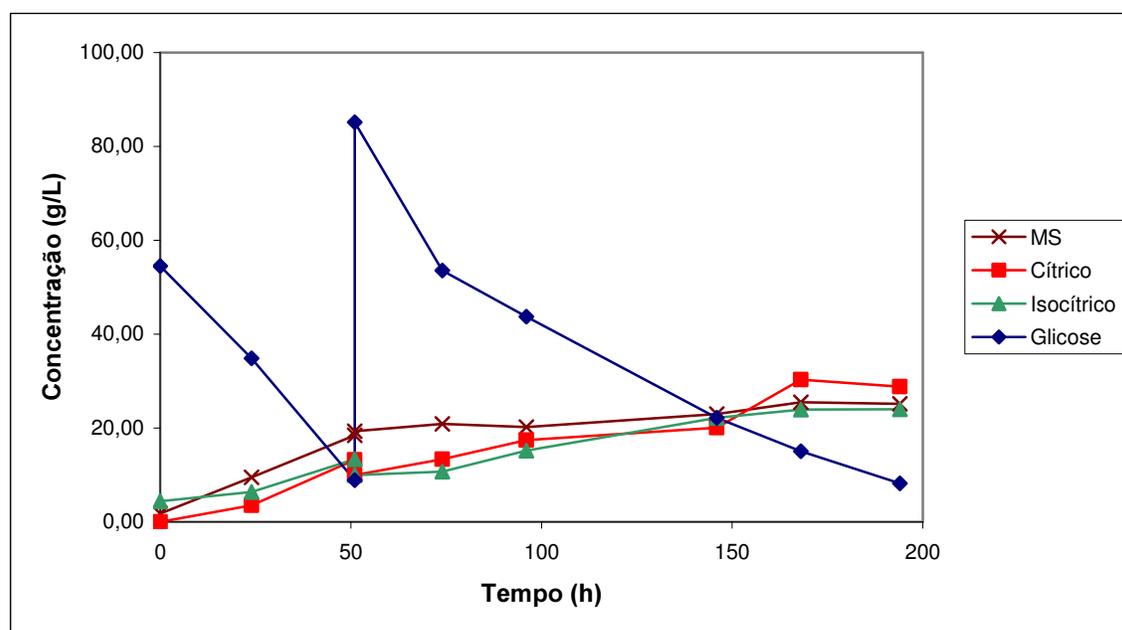


Figura 4.20.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o segundo ensaio do planejamento

A glicose não foi totalmente consumida neste ensaio de 200 horas de fermentação. No entanto, observa-se uma pequena queda na produção de ácido cítrico em relação ao tempo de 168 horas, mesmo sem o esgotamento total da glicose.

Terceiro ensaio:

Tabela 4.20.: Terceiro ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 0 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 0/6$; $\text{pH} = 4,5$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	0,8	0	9,5	46,1
2	27	5,8	0	9,7	23,6
3	50	12,2	0	12,8	9,1
4	73	12,2	0	11,5	3,5
5	73	10,8	1,9	11,5	57,5
6	96	14,5	3,5	14,6	52,8
7	120	16,6	5,3	16,5	42,7
8	145	15,6	8,9	17,6	28,6
9	169	16,7	8,6	22,0	19,7
10	192	16,5	21,6	26,2	10,1
11	217	19,4	20,9	31,9	7,5

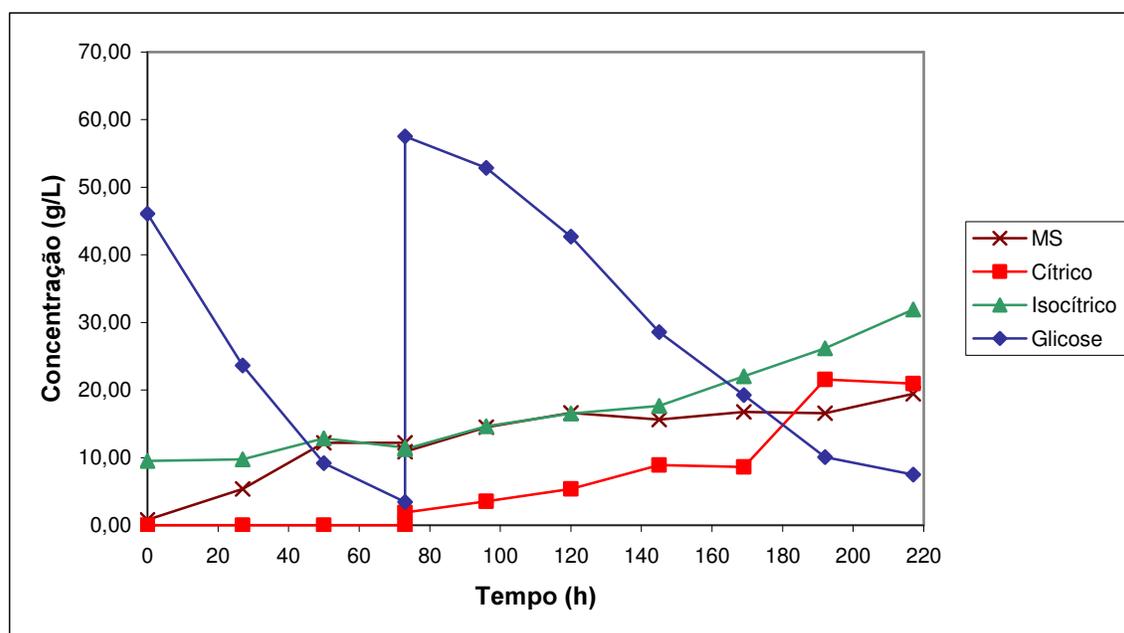


Figura 4.21.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o terceiro ensaio do planejamento

Neste ensaio a concentração final de ácido cítrico foi ligeiramente inferior do que a concentração de ácido isocítrico. Nota-se que a glicose não foi totalmente consumida e, no entanto, houve uma queda na produção de ácido cítrico. A relação ácido cítrico : isocítrico neste ensaio foi de 0,82.

Quarto ensaio:

Tabela 4.21.: Quarto ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 10 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 0/6$; $\text{pH} = 4,5$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	0,7	0	3,3	53,1
2	22	10,1	0	4,2	35,1
3	50	15,1	0	5,2	17,3
4	74	20,7	0	5,4	5,4
5	74	18,3	5,0	6,8	67,6
6	98	18,2	8,6	9,9	58,7
7	124	19,5	8,3	9,5	48,9
8	146	20,2	11,3	12,6	33,7
9	168	20,4	14,9	15,6	26,1
10	193	19,9	17,9	14,3	16,9
11	218	20,4	19,7	16,0	7,7

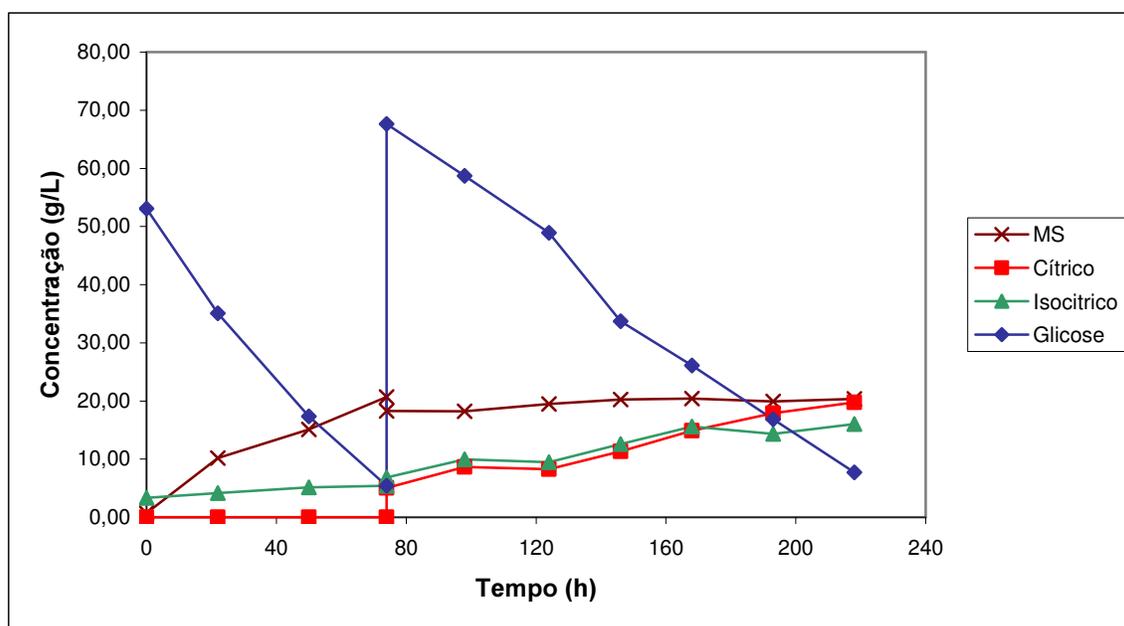


Figura 4.22.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o quarto ensaio do planejamento

Neste ensaio, a concentração final de ácido cítrico foi de 19,74 g/L, enquanto que a concentração de ácido isocítrico ficou em torno de 16 g/L. A relação entre a quantidade de ácido cítrico e isocítrico produzida foi de 1,23, porém a produtividade ficou baixa, sendo de 0,09 g/Lh.

Quinto ensaio:

Tabela 4.22.: Quinto ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 0 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 5/0$; $\text{pH} = 5,5$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	1,3	0	8,3	47,1
2	24	11,2	0	9,3	23,6
3	50	14,1	0	12,9	6,2
4	50	16,7	0	13,6	69,3
5	70	17,9	1,8	17,7	60,6
6	98	19,9	-	-	-
7	123	16,5	6,5	29,8	36,5
8	147	20,2	13,3	36,9	30,0
9	171	23,4	17,2	37,7	18,5
10	196	22,9	19,1	48,8	9,8

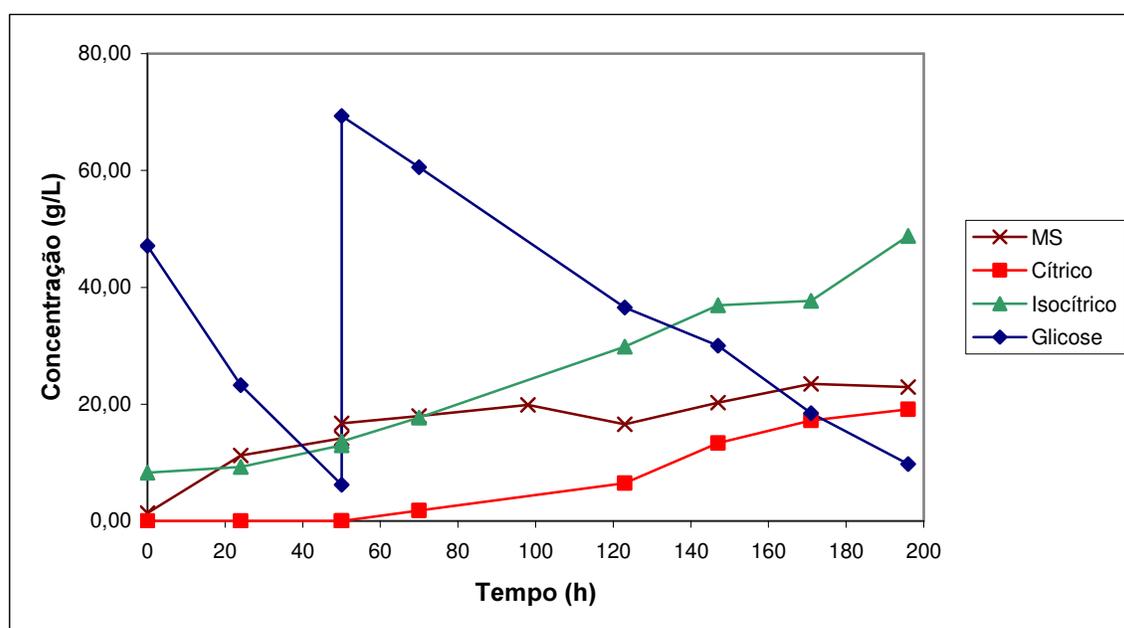


Figura 4.23.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o quinto ensaio do planejamento

O quinto ensaio do planejamento experimental transcorreu num tempo de aproximadamente 200 horas. Neste ensaio foi observada a maior concentração de ácido isocítrico dentre todos os experimentos realizados até o momento. Enquanto o ácido cítrico chegou a uma concentração de 19 g/L, o ácido isocítrico chegou a um patamar de quase 49 g/L, sendo a relação ácido cítrico : isocítrico de 0,39.

Sexto ensaio:

Tabela 4.23.: Sexto ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 10 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 5/0$; $\text{pH} = 5,5$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	1,5	0	10,6	39,9
2	25	9,4	0	-	22,5
3	43	15,4	0	7,9	4,2
4	43	15,5	0	10,3	51,3
5	66	16,7	3,3	18,8	43,5
6	92	17,5	9,7	27,3	24,9
7	115	15,8	15,8	33,6	6,2
8	140	16,5	20,3	35,6	4,3
9	162	16,6	13,0	40,6	0,0

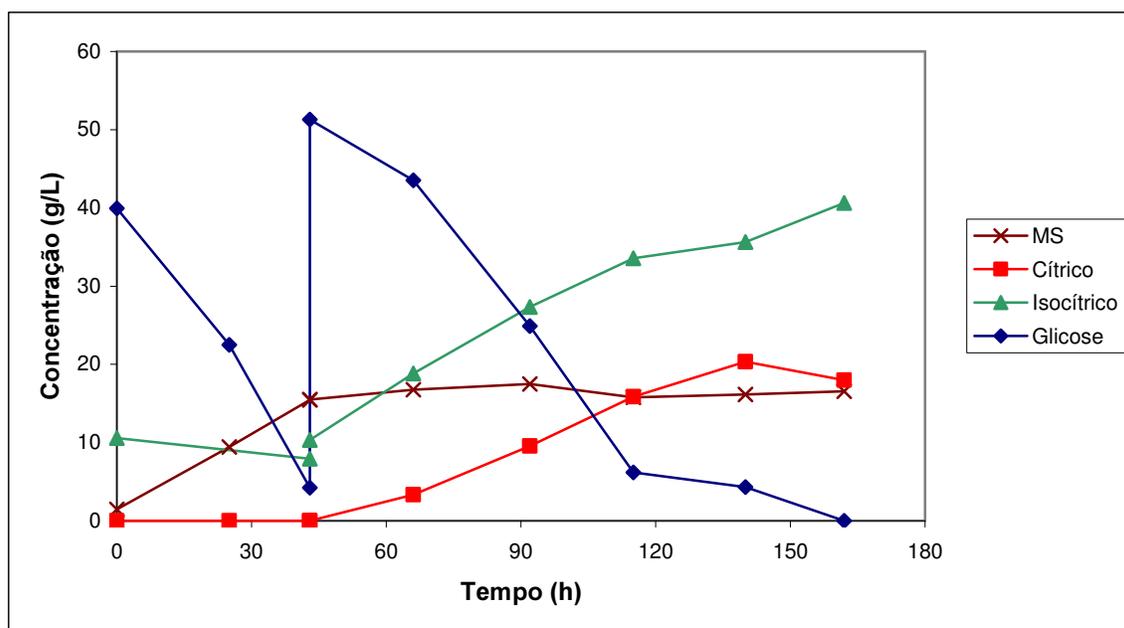


Figura 4.24.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o sexto ensaio do planejamento

No sexto ensaio do planejamento experimental também ocorreu uma maior produção de ácido isocítrico do que de ácido cítrico. A glicose foi praticamente consumida num tempo de 140 horas. A relação ácido cítrico : isocítrico foi de 0,57.

Sétimo ensaio:

Tabela 4.24.: Sétimo ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 0 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 0/6$; $\text{pH} = 5,5$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	0,4	0	6,3	52,5
2	25	8,1	0	5,4	49,7
3	49	15,7	0	9,6	29,1
4	75	8,8	4,2	14,3	14,9
5	103	14,1	7,7	19,4	4,8
6	103	14,1	5,3	18,7	64,0
7	124	16,1	6,5	22,3	61,1
8	146	19,7	10,5	26,7	51,7
9	170	17,7	12,5	31,8	46,2
10	220	17,6	11,7	30,2	40,1
11	245	18,2	13,6	38,9	30,1
12	268	17,9	15,1	46,6	21,2

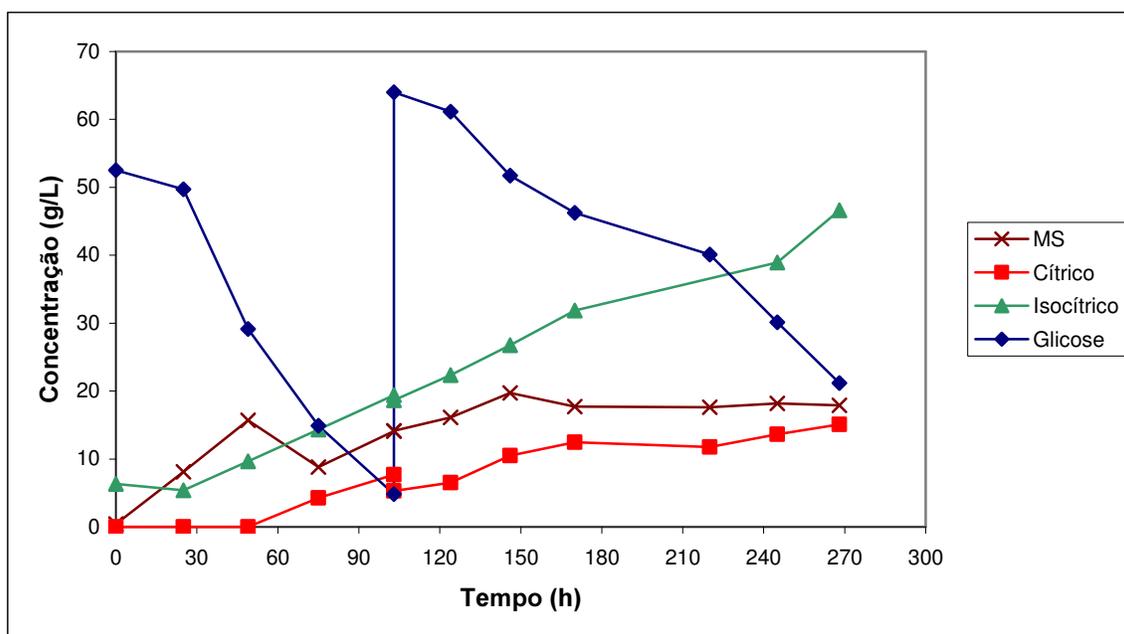


Figura 4.25.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o sétimo ensaio do planejamento

O sétimo ensaio do planejamento experimental transcorreu durante 268 horas, sendo que a quantidade de ácido cítrico produzida foi inferior à quantidade de ácido isocítrico. A relação de produção desses dois ácidos foi de 0,32.

Oitavo ensaio:

Tabela 4.25.: Oitavo ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 10 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 0/6$; $\text{pH} = 5,5$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	0,5	0	2,7	50,5
2	24	8,0	0	7,9	28,5
3	43	9,6	0	6,7	10,7
4	43	9,6	0	6,9	87,8
5	73	15,5	8,7	15,8	73,2
6	95	20,2	19,7	23,3	61,2
7	120	20,5	34,6	27,9	38,6
8	142	21,1	48,5	34,4	10,9

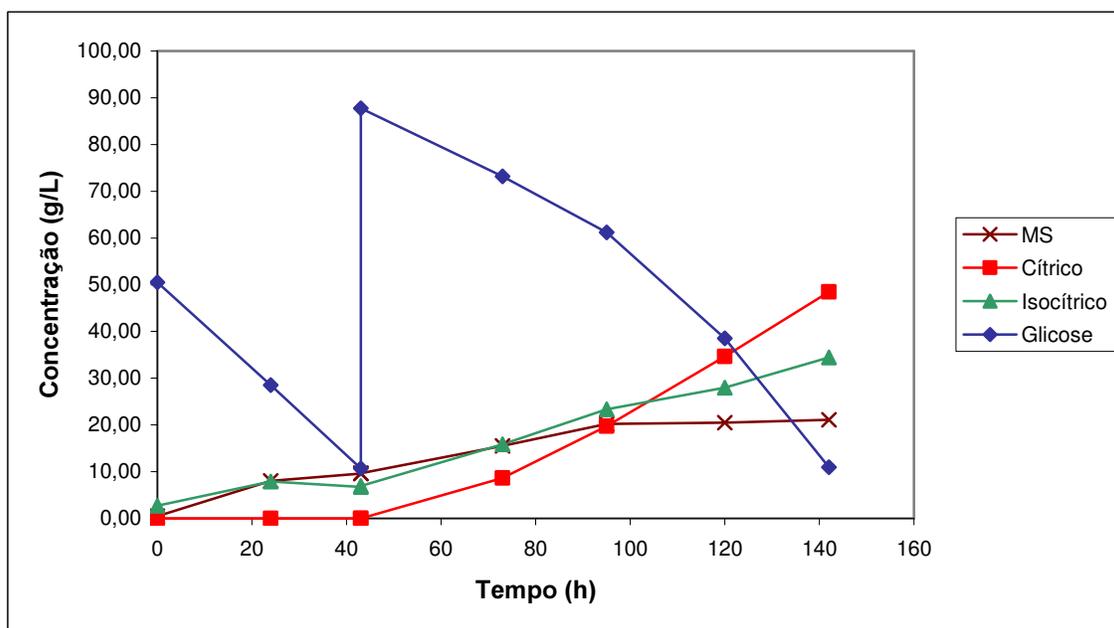


Figura 4.26.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o oitavo ensaio do planejamento

O oitavo ensaio do planejamento experimental apresentou uma relação entre a quantidade de ácido cítrico e isocítrico produzido de 1,41, num tempo de 142 horas. A concentração final de ácido cítrico foi de 48,47 g/L e de ácido isocítrico foi de 34,42 g/L. A produtividade de ácido cítrico ficou em 0,34 g/Lh e do ácido isocítrico de 0,24 g/Lh.

Nono ensaio:

Tabela 4.26.: Nono ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 5 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 2,5/3,0$; $\text{pH} = 5,0$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	1,2	0	7,5	53,1
2	24	4,0	0	-	27,5
3	47	10,8	0	15,2	3,7
4	55	12,2	0	12,9	2,8
5	55	8,9	0	11,9	63,4
6	96	16,8	6,6	24,1	46,2
7	117	19,0	20,7	27,0	26,5
8	144	19,3	25,7	33,3	17,2
9	162	21,3	26,2	40,3	0,0

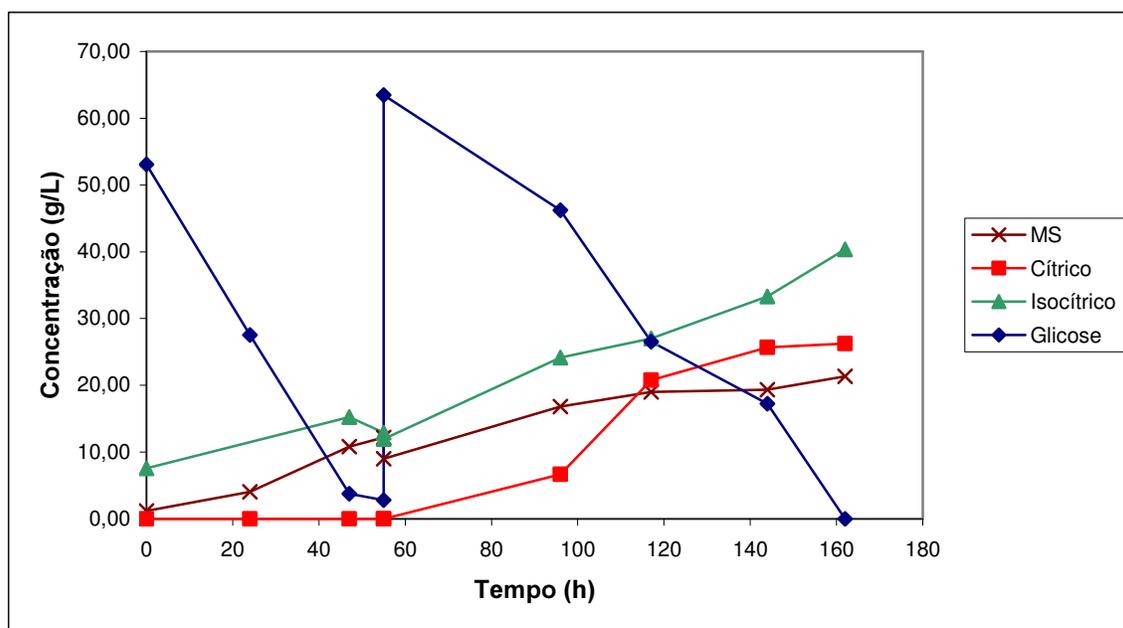


Figura 4.27.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o nono ensaio do planejamento

Neste ensaio, a glicose foi totalmente consumida num tempo de 162 horas. A quantidade de ácido cítrico produzida, no entanto, foi menor que a quantidade de ácido isocítrico, ficando a relação entre a quantidade de ácido cítrico : isocítrico em 0,65.

Décimo ensaio:

Tabela 4.27.: Décimo ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 5 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 2,5/3,0$; $\text{pH} = 5,0$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	1,5	0,0	3,9	52,2
2	24	9,9	5,4	6,3	28,8
3	46	18,1	10,1	8,2	5,7
4	46	15,8	5,5	4,3	71,2
5	72	20,8	18,7	13,9	47,1
6	96	20,0	30,3	20,9	21,3
7	120	20,6	30,3	23,7	5,3
8	144	20,8	28,3	23,6	0,0

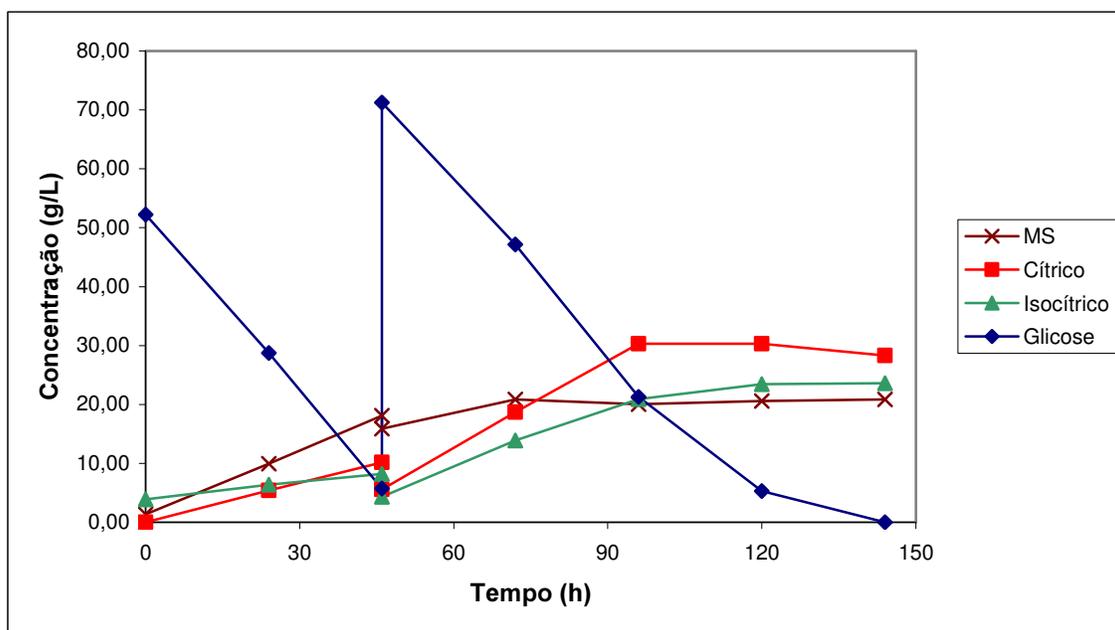


Figura 4.28.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o décimo ensaio do planejamento

O décimo ensaio do planejamento experimental transcorreu num tempo de 144 horas, sendo que a quantidade de ácido cítrico produzida foi maior que a quantidade de ácido isocítrico, num tempo de 120 horas. A relação ácido cítrico : isocítrico produzido foi de 1,29 e a glicose foi praticamente toda consumida durante o ensaio.

Décimo primeiro ensaio:

Tabela 4.28.: Décimo primeiro ensaio do planejamento ($\text{CaCO}_3 = 5 \text{ g/L}$; $\text{EL/PL} = 2,5/3,0$; $\text{pH} = 5,0$)

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	0,6	3,3	4,7	58,8
2	24	8,4	5,8	7,5	23,9
3	41	13,5	12,0	5,9	6,1
4	41	14,0	10,7	9,2	70,6
5	66	18,7	20,3	13,9	44,0
6	95	17,5	27,8	20,2	14,6
7	110	19,7	28,9	20,8	4,9
8	142	19,5	20,7	22,9	0,0

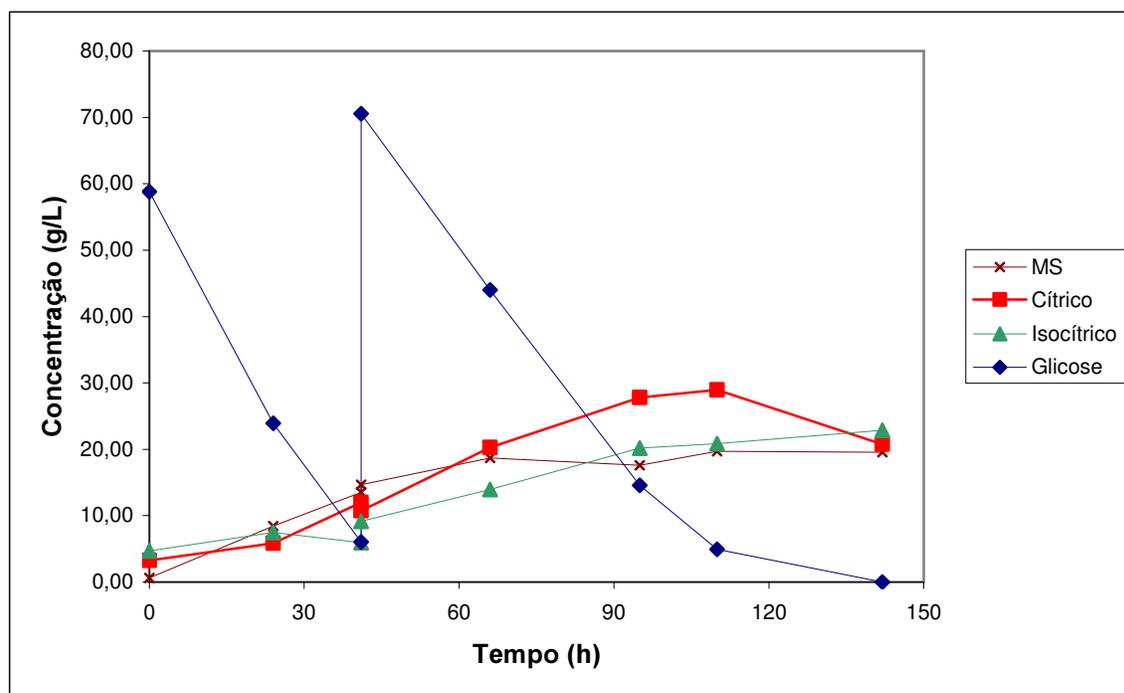


Figura 4.29.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular para o décimo primeiro ensaio do planejamento

Neste ensaio pode-se verificar que a relação de produção de ácido cítrico : ácido isocítrico foi de 1,39, ficando, mostrando que a concentração final de ácido cítrico foi superior à concentração de ácido isocítrico no tempo de 110 horas. O tempo total de fermentação foi de 142 horas e a glicose foi toda consumida. Novamente se verificou uma diminuição na quantidade de ácido cítrico produzido entre 110 e 142 horas.

4.7. Resultados obtidos no teste com batelada alimentada

Os resultados obtidos com a fermentação em batelada alimentada estão apresentados na Tabela 4.29 e na Figura 4.30.

Tabela 4.29.: Resultados do ensaio com batelada alimentada

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	0,6	0	2,5	52,2
2	23	7,1	0	5,3	20,6
3	46	13,9	0,4	9,6	5,6
4	46	8,5	-	6,5	40,5
5	71	11,9	5,3	11,6	39,0
6	94	13,8	11,1	15,1	39,4
7	118	16,9	12,8	15,1	-
8	142	13,6	13,1	15,5	57,7
9	166	15,5	11,2	15,3	76,0

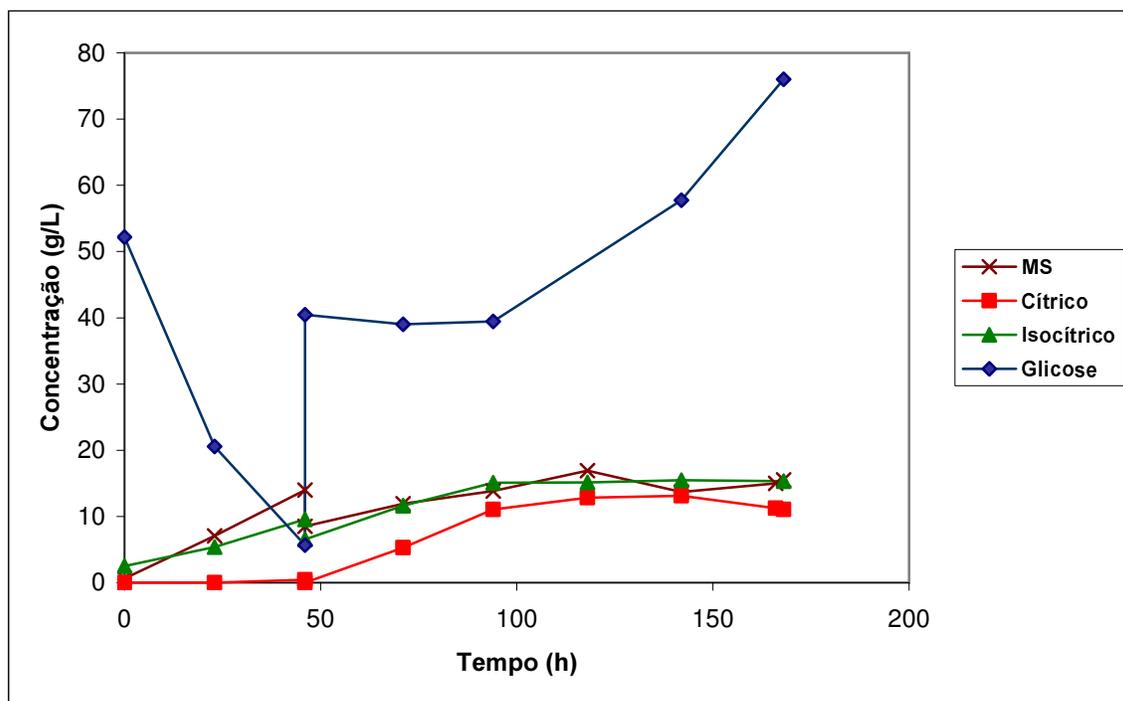


Figura 4.30.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular do ensaio conduzido em batelada alimentada

Pode-se observar que não houve um aumento na produção de ácido cítrico e isocítrico após o início da alimentação. A concentração de glicose

aumentou no meio, indicando que o microrganismo não estava consumindo o nutriente.

4.8. Resultados do teste com adição de EDTA no meio

O ferro atua como catalisador da enzima aconitase hidratase, enzima responsável pela isomerização do ácido cítrico em isocítrico. Baseado nisso, foi realizado um ensaio com adição de EDTA (um seqüestrante de ferro) ao meio de fermentação, visando assim inibir a atividade da aconitase e a produção do ácido isocítrico. Os resultados dos testes com adição de várias concentrações de EDTA obtidos após 168 horas de fermentação em frascos agitados estão apresentados na Tabela 4.30 e Figura 4.31. O meio utilizado foi o descrito na Tabela 3.2

Tabela 4.30.: Resultados obtidos nos ensaios com adição de EDTA ao meio após 168 horas

Molaridade do EDTA	Glicose (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)
0	37,5	23,5	8,3
0,03	35,8	21,4	12,7
0,05	37,7	20,7	14,3
0,08	40,6	21,6	12,2
0,10	40,6	21,6	15,1

Pode-se observar que não houve diferença significativa na concentração final de ácido cítrico em nenhum dos ensaios realizados. O ensaio que não continha EDTA, apresentou uma concentração de ácido cítrico ligeiramente maior do que os outros ensaios. Em relação ao ácido isocítrico, a menor concentração observada foi no ensaio sem adição de EDTA. Esses dados evidenciam que a adição de EDTA não contribui para aumentar a quantidade de ácido cítrico acumulado, tampouco para diminuir o acúmulo de ácido isocítrico.

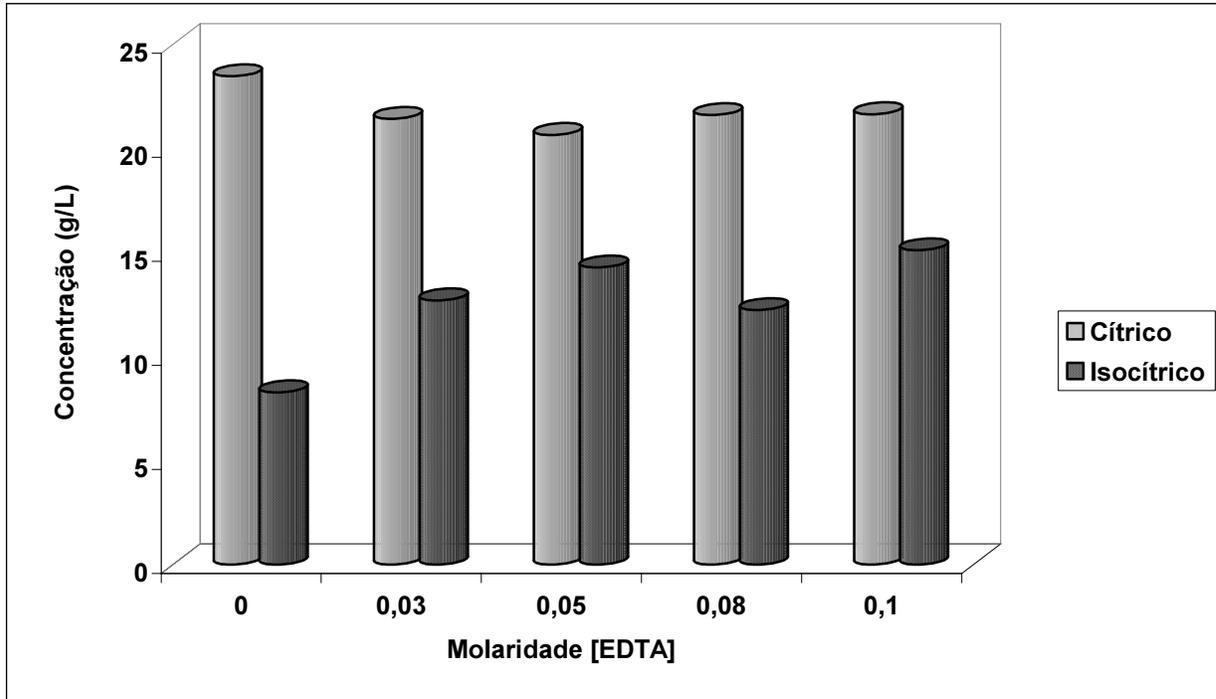


Figura 4.31.: Concentração de ácido cítrico e isocítrico após 168 horas de fermentação em meio contendo diferentes concentrações de EDTA

4.9. Resultados do teste de adição de anti-espumante FG10

Nos ensaios realizados, o anti-espumante era adicionado de tempos em tempos, numa quantidade fixa, devido ao fato de o meio aderir ao sensor de espuma e manter a bomba alimentadora ligada constantemente. Em trabalhos paralelos realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Unicamp constatou-se que o anti espumante Aratrop (utilizado em nossos ensaios) causava a inibição no crescimento de microrganismos produtores de inulinase e a conseqüente diminuição na quantidade de enzima acumulada. Buscando constatar se o mesmo efeito ocorre em fermentações com *Candida lipolytica*, realizou-se um ensaio nas mesmas condições dos pontos centrais do planejamento experimental utilizando o anti espumante FG10. Os resultados deste ensaio estão descritos na Tabela 4.31 e Figura 4.32.

Verificou-se, ao final de 212 horas de fermentação, uma concentração de 49,57 g/L de ácido cítrico e 21,87 g/L de ácido isocítrico, com uma relação cítrico : isocítrico de 2,27. Esta foi a maior relação obtida em nossos experimentos. Os coeficientes de rendimento e as produtividades estão apresentadas na Tabela

4.32.

Tabela 4.31.: Resultados do ensaio com adição de anti-espumante FG 10

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	-	-	3,2	53,2
2	0	1,1	-		54,1
3	25	4,7	-	2,3	26,6
4	53	1,5	5,4	6,1	4,1
5	65	1,3	6,4	7,9	2,4
6	65	0,3	-	6,1	78,6
7	97	4,4	-	7,9	58,5
8	124	4,4	8,7	11,3	55,2
9	143	4,6	31,2	12,6	37,7
10	168	8,4	35,8	-	23,6
11	193	9,4	41,6	21,9	14,7
12	212	8,7	49,5	21,8	0,5

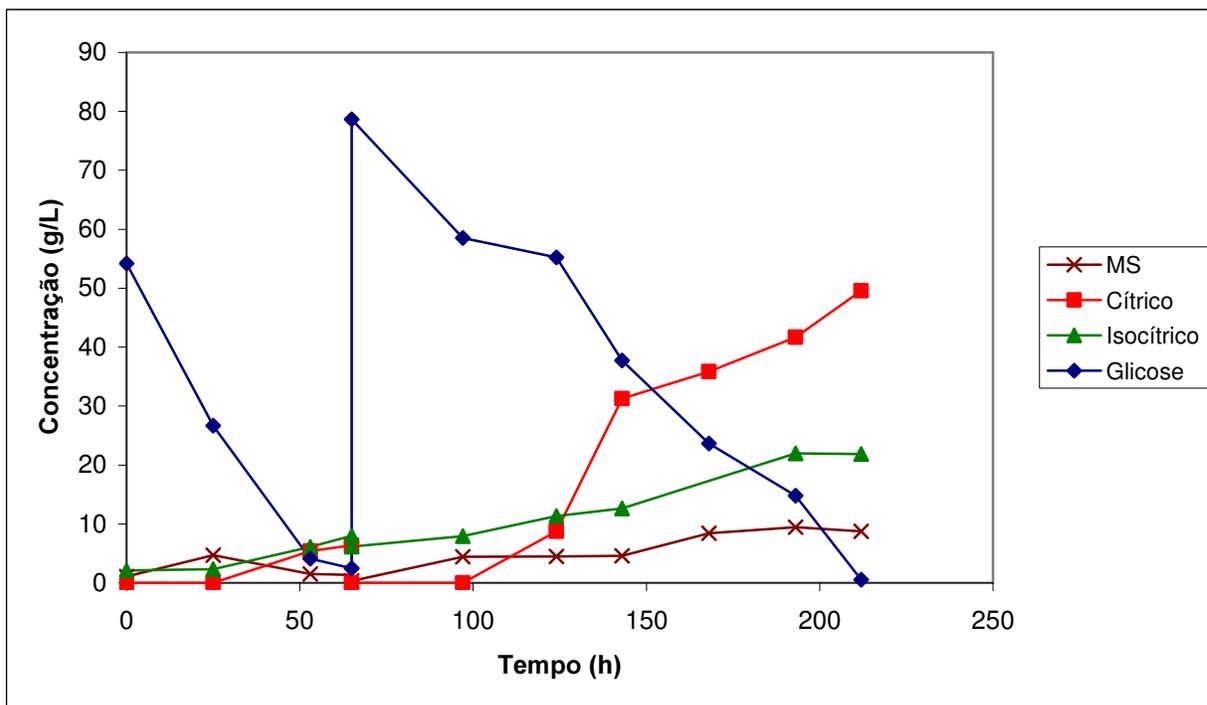


Figura 4. 32.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular do ensaio com adição anti-espumante FG10

Tabela 4.32.: Comparação entre os coeficientes de rendimento e produtividade obtidos nos ensaios com adição de anti-espumante FG 10 e a média dos pontos centrais

Ensaio	Produção (g/L)		Coef. Rendimento (g/g)		Produtividade (g/Lh)	
	Cítrico	Isocítrico	$Y_{cit(global)}$	$Y_{iso(global)}$	P_{Cit}	P_{Iso}
FG10	49,6	21,9	0,55	0,20	0,38	0,14
Pto. Central 1	26,3	40,4	0,41	0,45	0,16	0,25
Pto. Central 2	30,3	23,5	0,38	0,29	0,25	0,20
Pto. Central 3	29,0	20,8	0,28	0,18	0,26	0,19

Ao se comparar os resultados do experimento com o anti espumante FG10 com os resultados dos pontos centrais do planejamento experimental, observa-se um significativo aumento nos coeficientes de rendimento do ácido cítrico. Enquanto que o coeficiente de rendimento do ácido cítrico atingiu valores entre 0,28 e 0,41 nos ensaios do planejamento, no ensaio com FG10 atingiu o valor de 0,55. Para o ácido isocítrico, os coeficientes de rendimento que, no planejamento variou de 0,18 a 0,45, no ensaio com FG10 foi de 0,20. O valor da produtividade também sofreu alterações devido a troca do anti-espumante. Enquanto que o valor da produtividade de ácido cítrico nos ensaios do ponto central do planejamento variou de 0,16 a 0,26 g/(Lh), no ensaio com FG10 esse valor passou a 0,38 g/(Lh), sendo que também foi observado uma diminuição no valor da produtividade do ácido isocítrico, que, no planejamento variou de 0,25 a 0,19 g/(Lh), passou para 0,14 g/(Lh) no ensaio com FG10. Esses resultados evidenciam que possivelmente o anti espumante Aratrop, utilizado anteriormente, possui um efeito inibidor na produção de ácido cítrico, devendo seu uso ser descartado em trabalhos futuros.

4.10. Resultados do ensaio para verificação dos resultados obtidos através do planejamento experimental

Para se verificar a tendência de aumento na concentração de ácido cítrico, obtida do modelo do planejamento experimental, foi elaborado um ensaio em que o extrato de levedura foi substituído pelo Prodex Lac® e este foi adicionado numa concentração de 8 g/L. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.33 e na Figura 4.33.

Tabela 4.33.: Resultado do ensaio de validação do planejamento experimental

Amostra	Tempo (h)	Massa Seca (g/L)	Cítrico (g/L)	Isocítrico (g/L)	Glicose (g/L)
1	0	0,5	-	2,3	60,5
2	22	7,8	-	4,6	22,9
3	47	4,5	-	4,6	5,1
4	49	3,0	0,8	7,4	86,1
5	72	1,7	1,1	7,1	75,5
6	96	1,7	5,1	11,1	62,6
7	112	2,7	10,3	16,2	63,2
8	144	2,8	34,7	21,5	47,5
9	168	5,9	42,8	28,3	39,9
10	189	8,7	49,2	32,4	24,8
11	213	8,6	57,6	36,7	7,1
12	234	10,5	58,4	37,2	0,6

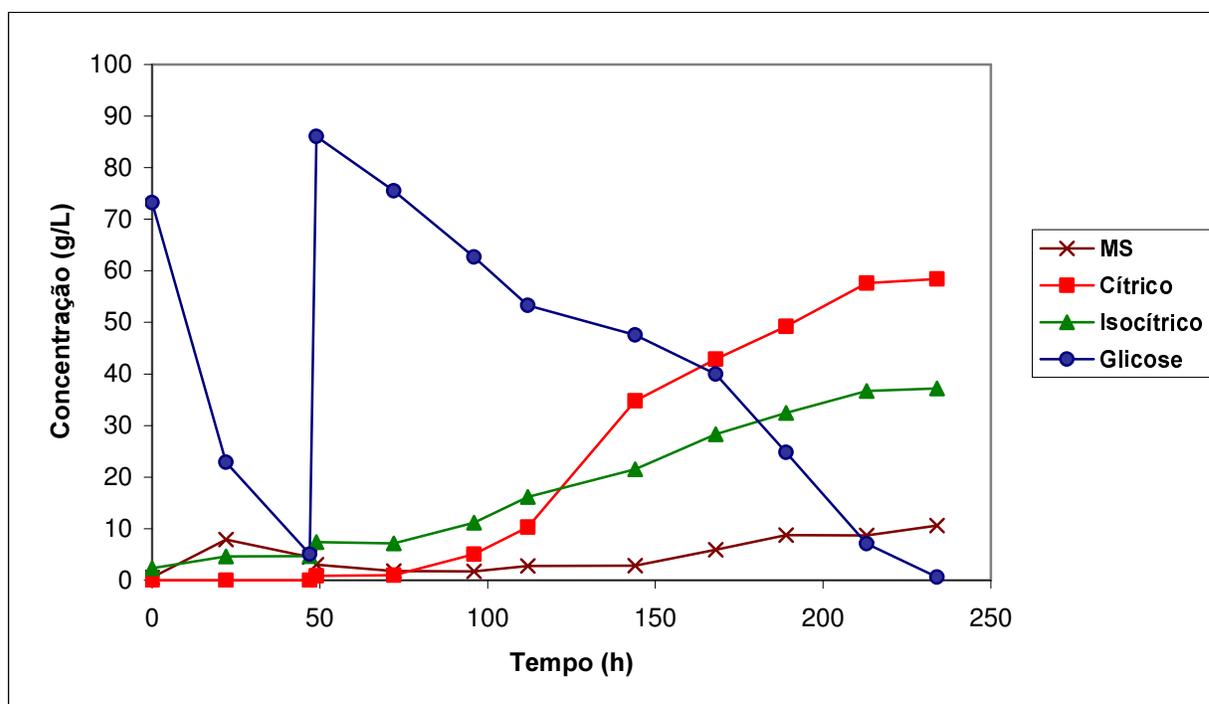


Figura 4.33.: Cinética de consumo de glicose, produção de ácido cítrico, isocítrico e massa celular do ensaio para validação do modelo obtido através do planejamento experimental

O CaCO_3 foi mantido na concentração de 10 g/L (nível +1) pois um incremento nesse valor causa um aumento na viscosidade do meio após algumas horas de fermentação, dificultando muito a aeração. O pH foi mantido no nível +1 (5,5), pois não apresentou efeito significativo na faixa estudada.

O modelo obtido no planejamento experimental aponta que, um aumento na quantidade de Prodex Lac® adicionado poderia provocar um aumento na quantidade de ácido cítrico produzida. Para verificar essa tendência, foi realizado o ensaio fixando o Prodex Lac® em 8 g/L. No planejamento experimental, o ensaio que apresentou a maior concentração de ácido cítrico foi o ensaio 8, com um acúmulo de 48 g/L. Neste teste foi obtido uma concentração de 58 g/L, confirmando a tendência fornecida pelo modelo obtido.

A relação cítrico : isocítrico, neste caso, foi de 1,57, maior do que as relações obtidas na maioria dos ensaios do planejamento experimental. O coeficiente de rendimento global para o ácido cítrico foi calculado em 0,40 e para o ácido isocítrico, 0,24. Os rendimentos da fase de produção apresentados foram de 0,67 para o ácido cítrico e 0,35 para o ácido isocítrico, sendo que a soma dos rendimentos resulta em 1,02, enquanto que o rendimento teórico é 1,06.

4.11. Comparação dos resultados obtidos neste trabalho com as publicações mais recentes

Ao se analisar os trabalhos publicados recentemente no tocante à produção de ácido cítrico por leveduras, percebe-se que a diferença fundamental em relação a este trabalho, é a metodologia de separação e identificação dos isômeros ácido cítrico e isocítrico. Crolla & Kennedy (2001), utilizando uma cepa de *Candida lipolytica* NRRL Y 1095 e 157 g/L de *n*-parafina como fonte de carbono obtiveram uma produção de ácido cítrico de 9,8 g/L. O artigo não faz comentários sobre a produção de ácido isocítrico, o qual foi calculado utilizando um método colorimétrico, pois a coluna cromatográfica utilizada pelos autores não consegue separar substâncias isômeras. Antonucci et al. (2001) numa fermentação em batelada com adição de dois meios de produção conseguiram na primeira adição de meio (150 g/L de glicose) uma produção de 35 g/L de ácido cítrico e 8 g/L de ácido isocítrico; na segunda adição (100 g/L de glicose) a produção total de ácido cítrico chegou a 60 g/L e a produção de ácido isocítrico chegou a 10 g/L utilizando

uma cepa de *Yarrowia lipolytica* e o coeficiente de rendimento para o ácido cítrico calculado foi de 0,384. Anastassiadis et al. (2002) utilizando uma cepa de *Candida oleophila* ATCC 20177 em fermentador com volume útil de 600 mL e agitação magnética de 1000 rpm conseguiram, para um meio de produção com 209 g/L de glicose, uma produção de 79,1 g/L de ácido cítrico e uma relação cítrico : isocítrico de 29,3 e um rendimento aproximado de 0,38. No entanto, o tipo de coluna cromatográfica utilizada na quantificação desses ácidos não garante a separação de isômeros. Finogenova et al. (2002) utilizando etanol como substrato e uma variedade de *Yarrowia lipolytica* chegaram a uma concentração de 19 g/L de ácido cítrico e 8,7 g/L de ácido isocítrico utilizando uma metodologia enzimática de quantificação de ácido isocítrico e a determinação do ácido cítrico sendo feita por método químico. Essas metodologias utilizadas nos trabalhos acima podem “mascarar” o resultado, pois não são específicas para compostos isômeros.

Neste trabalho, a metodologia empregada para a quantificação dos ácidos cítrico e isocítrico foi amplamente testada e desenvolvida a fim de não mascarar os resultados obtidos, pois a coluna cromatográfica utilizada é específica para separação de isômeros.

Os coeficientes de rendimento atingiram valores em torno de 0,6, superior aos trabalhos mais recentes relatados na literatura sobre a produção de ácido cítrico por leveduras, no entanto, inferior em relação ao trabalho publicado por Rane & Sims (1993), onde os autores conseguiram um rendimento de 0,82 e uma relação cítrico : isocítrico de 13 : 1 em fermentação em batelada.

É relevante ressaltar que a literatura não menciona a produção de ácido isocítrico por *Aspergillus niger*. No entanto, ao se observar os cromatogramas obtidos de padrões puros Sigma®, observa-se que este possui em torno de 5 a 10% de ácido isocítrico. Da mesma forma, os padrões de ácido isocítrico apresentam uma quantidade de ácido cítrico que podem chegar a 50% da amostra. As figuras 4.34 a 4.37 mostram os cromatogramas obtidos no HPLC, com a coluna para separação de isômeros, dos padrões de ácido cítrico, isocítrico, glicose e uma amostra obtida do fermentador.

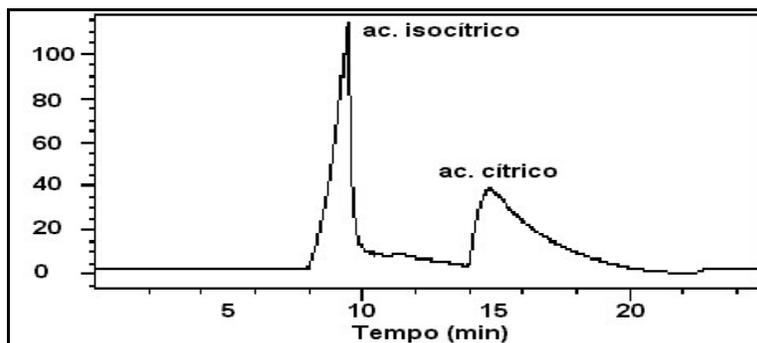


Figura 4. 34.: Solução padrão de ácido isocitríco

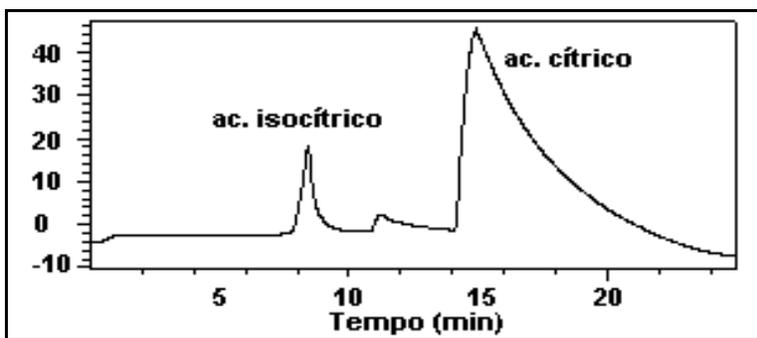


Figura 4. 35.: Solução padrão de ácido cítrico

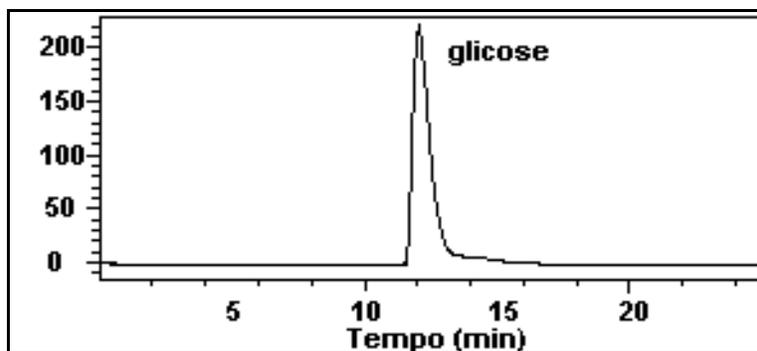


Figura 4. 36.: Solução padrão de glicose

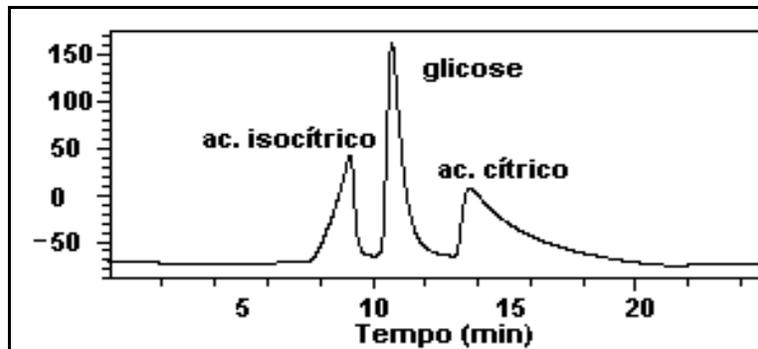


Figura 4. 37.: Amostra obtida do caldo fermentado

Diante desses resultados acredita-se que a metodologia analítica para separação de isômeros utilizada neste trabalho foi bastante específica e, portanto, mais confiável que os métodos normalmente utilizados. Com a utilização de outros métodos os rendimentos obtidos seriam bem superiores, chegando até 100% e a quantidade de ácido isocítrico presente na amostra seria bastante significativa. Na verdade, a presença de ácido isocítrico não é nenhum problema de contaminação. A questão fundamental é quanto ao seu valor comercial já que ele não tem poder acidificante como o seu isômero, o ácido cítrico.

5. Conclusões

- Em todos os ensaios realizados verificou-se que a produção de ácido cítrico ocorre quando cessa o crescimento celular;
- O uso de diferentes impulsores não interfere na viabilidade celular, mas provoca drásticas alterações na produção de ácido cítrico e isocítrico;
- O impulsor tipo turbina de Rushton proporcionou uma razão maior de ácido cítrico : isocítrico, enquanto que os impulsores tipo hélice naval e de pás inclinadas favoreceram um incremento na concentração de ácido isocítrico, devido a condições diferentes de oxigênio dissolvido no meio;
- As concentrações mais elevadas de oxigênio dissolvido no meio de fermentação favorecem o acúmulo de ácido cítrico. A concentrações de oxigênio dissolvido entre 50 e 60%, observa-se uma concentração de ácido isocítrico maior que a concentração de ácido cítrico. Para níveis de oxigênio dissolvido maiores do que 70% o acúmulo de ácido cítrico é favorecido, enquanto que a produção de ácido isocítrico não sofre grandes alterações;
- A adição de EDTA ao meio não provoca alterações significativas na produção de ácido cítrico e promove um aumento sensível na produção de ácido isocítrico;
- O anti espumante Aratrop inibe sensivelmente a produção de ácido cítrico e sua substituição por FG 10 proporciona uma melhora no processo;
- A substituição de extrato de levedura por Prodex Lac® no meio de cultivo provoca um aumento na quantidade final de ácido produzido, mas a relação ácido cítrico : ácido isocítrico permanece praticamente inalterada;
- A adição de 10 g/L de carbonato de cálcio (CaCO_3) ao meio de cultivo

promoveu um aumento na relação de ácido cítrico : isocítrico de 1,33 para 2,50 o que indica que o carbonato, em diferentes concentrações pode promover um incremento ainda maior na relação entre os dois ácidos.

- O extrato de levedura pode ser substituído pelo Prodex Lac® sem prejuízo no acúmulo de ácido cítrico;
- Através do Planejamento experimental foi possível concluir que:
 - O extrato de levedura pode ser substituído pelo Prodex Lac® diminuindo o custo do meio de cultivo;
 - A adição de CaCO_3 provoca um aumento na concentração final de ácido cítrico;
 - Dentro da faixa estudada, o pH não promove alterações significativas na quantidade de ácido cítrico acumulada.

6. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudar uma batelada alimentada através do controle do pH pela adição de glicose no fermentador;
- Estudar uma possível inibição da aconitase na fase de produção através da adição de um sal de cálcio;
- Estudar o efeito do acúmulo de células através de um sistema de reciclo de células.

7. Referências Bibliográficas

1. ADITIVOS & INGREDIENTES Cargill: O maior dos gigantes? **Aditivos & Ingredientes**, n.10, p.25-45, Setembro/outubro, 2000.
2. AIBA, S. e MITSUOKA, M. Identification of metabolic model: citrate production from glucose by *Candida lipolytica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.1373-1386, 1979.
3. ANASTASSIADIS, S.; AIVASIDIS, A. e WANDREY, C. Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.<http://link.springer.de/>, p.DOI 10.1007/s00253-002-1098-1, 2002.
4. ANTONUCCI, S.; BRAVI, M.; BUBBICO, R.; DI MICHELE, A. e VERDONE, N. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.28, p.189-195, 2001.
5. ARMILIATO, L. **Estudo da Produção de Ácido Cítrico por *Candida lipolytica* NRRL Y 1095**. Campinas, 2000. 98p. Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
6. BRADLEY, R. Citric Acid. **Chemical Economics Handbook**. SRI Internacional, 1992.
7. BRIFFAUD, J. e ENGASSER, M. Citric acid production from glucose I. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.2083-2092, 1979a.
8. BRIFFAUD, J. e ENGASSER, M. Citric acid production from glucose II. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.2093-2111, 1979b.
9. CARGILL Presente em vários produtos. **Revista Cargill**, 2003.

10. COSTA, F. A. A. **Estudo da Produção de Ácido Cítrico por Candida lipolytica Y 1095**. Campinas, 2000. Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
11. CROLLA, A. e KENNEDY, K. J. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. **Journal of Biotechnology**, v.89, p.27-40, 2001.
12. FINOGENOVA, T. V.; KAMZOLOVA, S. V.; DEDYUKHINA, E. G.; SHISHKANOVA, N. V.; IL'CHENKO, A. P.; MORGUNOV, I. G.; CHERNYAVSKAYA, O. G. e SOKOLOV, A. P. Biosynthesis of citric and isocitric acids from ethanol by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under continuous cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.493-500, 2002.
13. GADEN, E. L. Fermentation Kinetics and Productivity. **Chemistry and Industry**, p.154-159, 1955.
14. GOLDBERG, I.; PELEG, Y. e ROKEN, J. S. Citric, Fumaric and Malic acids. **Biotechnology and Food Ingredients**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p.349-374.
15. GREWAL, H. S. e KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v.12, n.2, p.209-234, 1995.
16. GUTCHO, S. J. Organic Acids. **Chemical Technology Review**, n.19, p.46-57, 1973.
17. HAMISSA, F. A.; ABOU-ZEID, A.-Z. A. e RADWAN, A. A. Influence of micronutrients on citric acid production by *Candida lipolytica* (Y 1095). **Zbl. Bakt. II Abt.**, v.135, p.332-338, 1980.
18. JIANLONG, W. e PING, L. Phytate as a stimulator of citric acid production by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.33, p.313-316, 1998.

19. KANZOLOVA, S. V.; SHISHKANOVA, N. V.; IL'CHENKO, A. P.; DEDYUKHINA, E. G. e FINOGENOVA, T. V. Effects of Iron Ions on Biosynthesis of citric and isocitric acids by mutant *Yarrowia lipolytica* N 1 under conditions of continuous cultivation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.32, n.1, p.35-38, 1996.
20. KAPOOR, K. K.; CHAUDHARY, K. e TAURO, P. Citric Acid. **Prescott e Dunn's Industrial Microbiology**. 4 ed. Westport: AVI Publishing Co. Inc., 1982. p.709-747.
21. LEE, S. S. Rapid Determination of Yeast Viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n.11, p.641-649, 1981.
22. LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 5.ed. São Paulo: Sarvier, 1989.
23. MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.12, n.1/2, p.87-132, 1992.
24. MCKAY, I. A.; MADDOX, I. S. e BROOKS, J. D. High specific rates of glucose utilization under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.73-78, 1994.
25. MCMURRY, J. e CATELLION, M. E. **Fundamentals of General, Organic & Biological Chemistry**. Third.ed. Prentice Hall, 1999.
26. MILSON, P. E. Organics acids by fermentation, especially citric acid. **Food Biotechnology**. Elsevier Applied Science, 1988. v. 1, p.273-307.
27. QUÍMICA&DERIVDOS Ácido cítrico: estudo prevê escassez mundial. **Química e Derivados**, p.29-30, Setembro, 1997.

28. RANE, K. D. e SIMS, K. A. Citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.46, p.325-332, 1995.
29. RANE, K. D. e SIMS, K. A. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095. **Biotechnology and Bioengineering**, v.43, p.131-137, 1994.
30. RANE, K. D. e SIMS, K. A. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y 1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.15, p.646-651, 1993.
31. RÖHR, M. e KUBICEK, C. P. Citric Acid. **Biotechnology**. 1983. v. 3, p.419-454.
32. ROUKAS, T. Influence of impeller speed on citric acid production and selected enzyme activities of the TCA cycle. **Journal of Industrial Microbiology**, v.7, p.221-226, 1991.
33. TANI, Y. S.; AKAI, Y. e CHOU, S. Production of citric acid from methanol by a fluoacetate-resistant mutant of *Candida* sp. Y-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.5-9, 1990.