

Utilização de Resíduo Agroindustrial como Matéria Prima Para a Produção de Ácido Cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404

G. K. C. Silva; S. A. Ramalho; N. C. Gualberto; E. B. Gomes;
R. C. M. Miranda; N. Narain

Laboratório de Flavor e Análises Cromatográficas, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se,
Brasil

ritamend@hotmail.com

(Recebido em 12 de fevereiro de 2012; aceito em 02 de maio de 2012)

A produção de ácido cítrico é de extrema importância para a indústria de alimentos, por isso a cada dia tem se buscado novas fontes para ser utilizada como substrato. Este trabalho objetiva a produção de ácido cítrico utilizando três resíduos agroindustriais em fermentação submersa pela levedura *Kluveromyces marxianus* URM 4404. As análises físico-químicas dos três resíduos testados demonstram que todos são nutricionalmente pobres por isso foi necessário um enriquecimento com glicose e extrato de levedura. Em relação a produção de ácido cítrico a levedura apresentou um maior potencial, quando o meio continha resíduo de acerola como principal substrato 4.1g/L, seguido da produção no meio contendo resíduo de graviola (2.3g/L) e mangaba (0.8g/L) respectivamente. Quando foi calculado o tempo de geração e a taxa máxima de crescimento os valores obtidos foram 2.3026h⁻¹ e 18min respectivamente. Em relação ao coeficiente de produção, o mais significativo foi encontrado quando o resíduo utilizado foi o da acerola enquanto que em relação ao fator de rendimento, o mais significativo foi apresentado quando o resíduo da mangaba foi utilizado. Após realização das análises de variância observou-se que não houve diferença estatística significativa na produção quando utilizado os resíduos de mangaba e graviola. Esses resultados demonstraram o potencial da levedura *K. marxianus* URM 4404 de produzir ácido cítrico utilizando resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: ácido cítrico, resíduo; *Kluveromyces marxianus*; mangaba; acerola; graviola

The citric acid production is extremely important for food industry, each day and has sought alternatives to the production of this compound are seeking new agencies and new sources to be used as a substrate. This work aims to citric acid production using agro-industrial residues in three submerged fermentation by yeast *Kluveromyces marxianus* URM 4404. Physico-chemical analysis of the three residues tested showed that all were nutritionally poor, because this need to have an enrichment of culture medium with glucose and yeast extract. In the production of citric acid the medium in which the yeast had the best potential for production was the residue containing acerola as substrate with 4.1 g / L citric acid followed by custard and mangaba with 2.3g / L and 0.8g / L respectively. When calculated the generation time and the maximum growth rate was obtained 2.3026h⁻¹ and 18min. As for the biggest coefiente production was found when the residue used acerola while the highest power factor was the mangaba. Among the residues tested, there was no statistically significant difference in residue production using acerola and graviola. These results demonstrate the potential of the yeast *K. marxianus* URM 4404 in producing citric acid using agro-industrial residues.

Keywords: citric acid; residue; *Kluveromyces marxianus*; mangaba; acerola; graviola

1. INTRODUÇÃO

O nordeste Brasileiro destaca-se pela produção de frutas tropicais, amplamente utilizadas no preparo de diversos produtos de interesse do consumidor como sucos e polpas. No processamento das frutas grande parte é descartada por não possuírem mais nenhum proveito, gerando dessa forma os resíduos agroindustriais. Uma alternativa para a diminuição no acúmulo desses resíduos é a sua utilização como substrato em processos fermentativos, auxiliando assim a redução dos problemas de poluição ambiental [1].

O composto 2- hidróxi-1,2,3-propanotricarboxílico (ácido cítrico) é um ácido orgânico fraco utilizado principalmente pelas indústrias de alimentos e bebidas. Segundo relatao de alguns

autores os maiores problemas enfrentados na produção deste ácido são os custo do processo, onde o substrato representa um alto percentual, por isso na tentativa de diminuir esse custo, tem se procurado alternativas, como por exemplo a utilização de resíduos industriais, como componente do meio de cultivo em fermentações realizadas por micro-organismos [2].

Atualmente, o ácido cítrico é quase que exclusivamente obtido através de processos biossintéticos utilizando como agente biológico o fungo anamorfo *Aspergillus niger*. Dois processos são utilizados na biossíntese deste ácido, o de superfície (fermentação em estado sólido) e submersa, que se diferenciam essencialmente pelo modo de crescimento do microrganismo. O ácido cítrico é utilizado em grande escala pelas indústrias de alimentos, refrigerantes, produtos farmacêuticos, além de outras em que o íon citrato propicia a formação de uma variedade de moléculas complexas que possuem a capacidade de sequestrar e inativar íons metabólicos [2].

O ácido cítrico é um produto com uma demanda mundial crescente, devido a suas aplicações na indústria de alimentos (bebidas, embutidos), farmacêutica, cosmética, plásticos e detergentes por este motivo se tem estudado sua produção a partir de diferentes sustratos [3].

Portanto, diante do exposto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade na utilização dos resíduos agroindústrias, processados, na produção de ácido cítrico por fermentação microbiana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste trabalho foi utilizada a levedura *Kluveromyces marxianus* URM 4404 adquirida na Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Como substrato do meio de produção foram utilizados os resíduos agroindustriais do processamento de acerola, mangaba e graviola fornecidos por uma indústria de polpa do estado de Sergipe. Para serem utilizados como substrato no meio reacional os resíduos foram processados e transformados em farinha, para isto os mesmo foram secos em secador de bandeja com circulação de ar por 24 horas à temperatura de 40°C, em seguida foram moídos em liquidificador industrial, peneirado, esterilizado por 15 minutos a 121°C e 1atm. Posteriormente foram armazenados em recipientes ermeticamente fechados. Todos os resíduos foram submetidos a análises físico-químicas para determinação de acidez, pH, brix°, umidade, lipídios, proteínas, cinzas, fibras e açúcares redutores segundo a metodologia descrita por [4]. As análises foram realizadas em triplicatas.

A produção de ácido cítrico iniciou com a obtenção de um pré-inóculo onde três alçadas da levedura *K. marxianus* URM 4404 foram inoculadas em meio Sabouraud líquido e incubada sob agitação de 150rpm a 30°C por 48 horas. Após este período foi padronizado um inóculo de 10⁸cel/mL e adicionado a frascos Erlenmeyer de 250mL de volume contendo 50mL de meio de produção compostos de 1% de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 5% de resíduo, pH 5 e incubados em shaker rotatório a 28°C por a 150 rpm por um períodos de 96 horas. A fim de se quantificar a produção de ácido cítrico durante a fermentação dos resíduos agroindustriais por *K. Marxianus* URM 4404, foram retiradas alíquotas de 2 ml do fermentado a cada 24 horas durante quatro dias para análise da biomassa e produção de ácido cítrico. A biomassa foi analisada por contagem direta de células em câmara de Neubauer. O teor de ácido cítrico ao longo da fermentação foi analisado de forma isocrática em um sistema cromatográfico composto por cromatógrafo líquido da marca Shimadzu Modelo LC 20AT contendo sistema de bombas quartenárias, com detector de arranjo diodo (DAD). A coluna utilizada foi C₁₈ em fase reversa com 250mmX46mm e λ partícula 5micro. A amostra foi analisada no comprimento de onda de 214nm e a fase móvel composta de uma solução de KH₂PO₄ a 5mM e vazão de 0,9mL/min, com volume de injeção de 20µL. Os cromatogramas foram analisados no software LC Solution. A título de confirmação o tempo de retenção do ácido cítrico presente na amostra foi comparado com o do padrão de ácido cítrico marca Sigma Aldrich. O percentual de ácido cítrico foi calculado em relação a sua área de pico, admitindo-se a maior área como 100%.

Foi realizada uma curva de crescimento a fim de calcular o tempo de geração e a taxa máxima de crescimento. Ao longo do processo também foram calculados o fator de rendimento e o quociente de produção. Com o objetivo de verificar se havia diferença estatística significativa entre a produção utilizando os diferentes resíduos foi realizado uma análise de variância utilizando o Software Statistica 6.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se a produção de ácido cítrico pela levedura *Kluveromyces marxianus* URM 4404 utilizando resíduos de processamento de polpa para obtenção de sucos, como substrato no meio reacional. Na tabela 1 pode-se observar as características físico-químicas dos resíduos utilizados no trabalho.

Tabela 1: Caracterização físico-química dos resíduos utilizados como substrato para a produção de ácido cítrico pela levedura *K. marxianus* URM 4404.

Resíduo	Umidade	Cinza	PH	Acidez	Brix	Acidez/Brix	Lipídios	Fibras	Açúcares redutores	Proteína
Mangaba	6,03±0,17	0,98±0,02	4,03± 0,01	11,05±1,23	1,08±0,14	0,10	8,1±0,30	31,73±1,06	4,81±0,02	9,95±0,02
Acerola	8,97±0,37	0,97±0,00	3,23±0,01	35,00±0,06	2,17±0,14	0,06	1,26±0,20	26,4±0,02	16,13±0,36	6,86±0,10
Graviola	6,67±0,19	0,98±0,00	4,43±0,02	8,9±1,23	1,25±0,00	0,05	5,35±0,32	31,37±1,35	7,03±0,13	10,78±1,09

Em relação ao resíduo de acerola, os valores encontrados para umidade, cinzas e proteína foram de 8,97%; 0,97% e 6,68%, respectivamente. Outros autores já descreveram a caracterização do bagaço seco de acerola. [5] verificaram a composição físico-química do bagaço seco de acerola e encontraram valores de 7,02% para umidade semelhante ao encontrado neste trabalho. Valores bastante diferentes foram encontrados referente à caracterização de cinzas (2,13%) e proteína bruta (0,52%). Para mangaba, foram encontrados valores de 6,03%; 0,98%; 81,81%; 9,95% e 11,5% para umidade, cinzas, lipídios, proteína e acidez, respectivamente. Araújo *et al.*, [6] estudando as características físico químicas da farinha obtida do processamento da semente da mangaba foram encontrados valores de umidade 4,30%, cinzas 2,13%, lipídeos 23,50%, proteínas 15,0% e acidez total de 28,40%. Essas diferenças se devem ao modo de processamento para a obtenção dos resíduos, além de que deve ser considerado as diferenças entre variedades, clima, entre outros possíveis fatores. Em relação à graviola apesar de possuir alto potencial para a exploração econômica, existem ainda poucos estudos relatados na literatura com essa fruta. Foi acompanhada a produção de ácido cítrico pela levedura *Kluveromyces marxianus* URM 4404 utilizando os três resíduos agroindustriais como substrato separadamente. Dentre os três resíduos testados, o que demonstrou ter sido melhor utilizado pela levedura na fermentação submersa foi o de acerola, com uma produção de 4,1g/L de ácido cítrico, seguido pelo de graviola com 2,13g/L e finalmente o de mangaba com 0,8g/L de ácido cítrico (Figura 1).

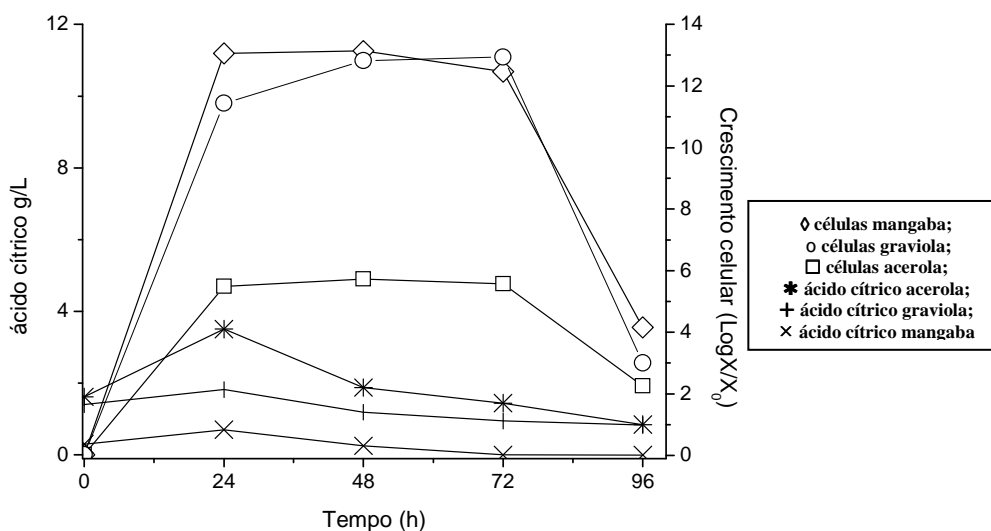


Figure 1: Produção de ácido cítrico e crescimento celular durante a fermentação de três resíduos agroindustriais utilizados como substrato na fermentação por *K. marxianus* URM 4404.

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por [7], que utilizando resíduo da produção de maçã como substrato em fermentação submersa pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* NRRL 2001 e APS 1 obtiveram uma concentração de 4,5g/L e 6,5g/L de ácido cítrico. Devido ao baixo teor nutricional dos resíduos foi necessário o acréscimo de glicose e extrato de levedura como fontes adicionais de carbono e nitrogênio. Muitos autores tem reportado a importância de um meio nutricionalmente rico para a obtenção de ácido cítrico. [8], produzindo ácido cítrico em meio de cultura composto de minerais e acrescido de glicose e extrato de levedura obteve 0,8g/L em fermentação submersa por *Yarrowia lipolytica*. Possivelmente a produção significativa de ácido cítrico utilizando o resíduo de acerola como substrato se deve a adição de glicose e extrato de levedura como fontes nutricionais adicionais. Outro importante parâmetro estudado pelos autores são as condições do processo. O inóculo inicial e o pH são fatores importantes nos processos biotecnológicos. Resultados similares foram obtidos por [9] produzindo ácido cítrico por *Aspergillus niger* MTCC 282 em fermentação submersa usando casca de banana como substrato onde foi observado um crescimento ótimo a 28°C e inóculo inicial de 3×10^8 UFC/mL. Esses mesmos autores obtiveram valores de produção de ácido cítrico em pH ácido (2-3), enquanto que neste trabalho obteve-se a melhor produção de ácido cítrico pela levedura *K. marxianus* URM 4404 em pH 5. A utilização de resíduos agroindustriais tem sido estudado por vários autores com o objetivo de baratear os custos do processo. [10] estudaram a produção de ácido cítrico pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* CETC2090 por fermentação submersa utilizando casca de laranja como substrato, obtiveram 4,8g/L, resultados muito semelhantes aos que obteve-se neste trabalho. Muitos autores tem observado que a produção de ácido cítrico está relacionada ao crescimento microbiano independente do substrato utilizado (meio sintético ou resíduo). [11] associaram o crescimento microbiano com a produção de ácido cítrico e Nicotinamida Adenina de Nucleotídeo (NAD⁺) mediada pela enzima iso-cítrico desidrogenase. Corroborando com este trabalho, os autores relataram a produção de ácido cítrico associado ao crescimento microbiano, isto pode ser explicado por ser o ácido cítrico o primeiro produto anabólico do ciclo de *Krebs*. Outro fator importante que deve ser considerado neste trabalho é a utilização de fungos leveduriformes ao invés de fungos filamentosos. As leveduras apresentam uma vantagem em relação aos fungos filamentosos, pois são menos patogênicas e contaminadas do ambiente, além de ser mais fácil sua manipulação. Vários autores tem estudado a utilização de outros microrganismos para a produção de ácido cítrico ao invés de fungos filamentosos. [12] testou a levedura *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 como produtora de ácido cítrico utilizando glicerol como fonte de carbono, obtendo 0,7g/L, valores abaixo dos obtidos neste trabalho. [13]

estudando a produção simultânea de ácido cítrico e da enzima invertase em meio sintético contendo glicose como fonte de carbono pela levedura *Yarrowia lipolytica* obteve 4.5g / L de ácido cítrico em fermentação submersa. [14] desenvolveu biosensores para monitorar a produção de ácido cítrico pela levedura *Yarrowia lipolytica* H222 em fermentadores de leito fixo. Os autores reportaram que após 533 horas de fermentação, obtiveram 2,4g/L de ácido cítrico. Vale salientar que os valores obtidos por esses autores foi mais baixo que os obtidos no presente trabalho.

A partir da curva de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* foram calculados os valores da taxa máxima de crescimento e o tempo de geração. A taxa máxima de crescimento da levedura foi de 2.3026h^{-1} enquanto que o tempo de geração foi de 18min. Esses dois parâmetros foram calculados apenas durante a fase *log* do crescimento microbiano. Além desses parâmetros também foram calculados o quociente de produção e o fator de rendimento de ácido cítrico ao final da produção utilizando os três resíduos como substrato (Tabela 2).

Tabela 2 : Coeficiente de produção e fator de rendimento obtidos da produção de ácido cítrico nos três resíduos agroindustriais testados como substrato na fermentação pela *K. marxianus* URM 4404.

Resíduo	Coeficiente de Produção	Fator de Rendimento
acerola	91.08gLh^{-1}	6.80cel/gL/h^{-1}
graviola	44.64gLh^{-1}	9.30cel/gL/h^{-1}
mangaba	19.41gLh^{-1}	$21.50\text{cel/gL/h}^{-1}$

Após a análise observou-se que a produção de ácido cítrico pela levedura *K. marxianus* URM 4404 foi estatisticamente diferente para todos os resíduos testados com $p < 0,05$, demonstrando assim que a produção utilizando o resíduo de acerola é realmente a maior.

4. CONCLUSÃO

Este estudo sugere que a levedura *Kluyveromyces marxianus* URM 4404 apresenta potencial na produção de ácido cítrico utilizando resíduo agroindustrial da acerola como substrato acrescido de glicose e extrato de levedura.

1. SOCCOL, C. R.; PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A. General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 652-664 (2003).
2. LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. *Scientia agrícola* 299 (1995).
3. AIACHE, M.; CHANET, L.; BEYSSAC, E.; HAIGER, M.J. *In vitro* permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. *International Journal of Pharmaceutical* 170:151-156 (1998).
4. Instituto Adolfo Lutz (2008).
5. ABUD, A. K. S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 12, p. 257-265, 2009.
6. ARAÚJO, K. B.; SANTOS, R. C. A.; SOUZA, F. M.; AQUINO, L. C. L. Potencial do Fungo *Rhizopus stolonife* para o Enriquecimento protéico da Farinha de Sementes de Mangaba. In: II SIMPOSIO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E I CONGRESSO DO INSTITUTO NACIONAL DE FRUTAS TROPICIAS. Aracaju, SE. *Anais...* Aracaju: UFS, 2010
7. DHILON, G. S.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 54, p. 83-92, 2011.
8. MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; ENTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrais wastewater. *New Biotechnology*, v. 27, n. 4. P. 337-340, 2010

9. KATTHIKEYAN, A.; SIVAKUMAR, N. Citric acid production by koji fermentation using banana peel as a novel substrate. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5552-5556, 2010.
10. TORRADO, A. N.; CÓTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Citric acid production from orange peel wastes by solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 394-409, 2011.
11. MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G.; Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 2351-2358, 2010.
12. IMANDI, S. B.; BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; GARAPATI, H. R.; Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 1367-1372, 2007.
13. LAZAR, Z.; WALCZAK, E.; ROBAK, M. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC⁺ transformants. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 13, p. 6982-6989, 2011.
14. MOELLER, L.; GRUNBERG, M.; ZEHNSDORF, A.; AURICH, A.; BLEY, T.; STREHLITZ, B. Repeated fed-batch fermentation using biosensor online control for citric acid production by *Yarrowia lipolytica*, v. 153, p. 133-137, 2011.