

Produção de ácido cítrico por fungos filamentosos a partir de glicerina bruta, coproduto do biodiesel

Brenda Rabello de Camargo (Embrapa Agroenergia, brendarc@gmail.com), Samira Costa Braga (Universidade de Brasília, Embrapa Agroenergia, samiracostabraga@hotmail.com), Thályta Fraga Pacheco (Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br), Thaís Demarchi Mendes (Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br), Thaís Fabiana Chan Salum (Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br), Sílvia Belém Gonçalves (Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br), Mônica Caraméz Triches Damaso (Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br)

Palavras Chave: *Ácido cítrico, fungos filamentosos, biorrefinaria do glicerol*

1 - Introdução

O ácido cítrico (2-hidróxi-propano-1,2,3-ácido tricarbóxico) é um composto que pode ser utilizado em aplicações biotecnológicas, como na indústria alimentícia, devido ao seu sabor (Angumeenal e Venkappayya, 2013). Além disso, os sais derivados desse ácido são usados como conservadores de alimentos, devido a sua atividade quelante e à capacidade de tamponamento. Tais características são utilizadas nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e de produtos de limpeza (Show et al., 2015).

Em 2015, a produção mundial de ácido cítrico foi maior que um milhão de toneladas (com custo médio de US\$ 0,60/ kg), e estudos mostram uma análise de progressão com aumento linear até o ano de 2020 (Hu et al., 2019). Para obtenção desse composto por via microbiana, diversas fontes de carbono podem ser utilizadas como substrato, como hemicelulose, xilana, melão de cana ou beterraba, glicerol, e óleos variados (de soja, milho, coco ou palma) (Hu et al., 2019). Dessa forma, resíduos gerados em cadeias agroindustriais podem ser utilizados como substrato para a produção do ácido.

A indústria do biodiesel produz como coproduto uma grande quantidade de glicerol bruto (glicerina), na proporção 10:1, do produto em relação ao coproduto. O glicerol tem sido avaliado como matéria prima para obtenção de uma gama de compostos químicos, tais como: dióis, polióis e ácidos orgânicos (Almeida et al., 2012). Nesse contexto, o foco desse trabalho foi a produção de ácido cítrico a partir de glicerinas brutas de soja (industrial) e de dendê, utilizando linhagens de fungos filamentosos.

2 - Material e Métodos

Fungos filamentosos codificados nesse trabalho como FFA, FFB, FFC e FFD, preservados na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias, da Embrapa Agroenergia, foram utilizados para produção de ácido cítrico. Como fonte de carbono, foram utilizadas duas glicerinas (glicerol bruto), uma de origem industrial, coproduto da produção de biodiesel de óleo de soja, gentilmente cedida pela usina ADM, Rondonópolis/(MT), e outra obtida em laboratório a partir da produção de biodiesel de óleo de dendê. Os teores de glicerol nas glicerinas são de 81% e 52%, respectivamente. Não foi detectada a presença de metanol nas glicerinas. Para o preparo dos meios de cultivo, a quantidade de glicerina adicionada foi padronizada por concentração de glicerol.

Primeiramente, a produção de ácido cítrico foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio, sendo avaliadas as duas glicerinas brutas

(industrial de soja e de dendê) e dois meios de cultivo com diferentes composições minerais e concentrações de glicerina bruta. As composições dos meios foram as seguintes: Meio A, em g.L⁻¹: glicerol (60); extrato de levedura (1,1); KH₂PO₄ (1,0); MgSO₄ (0,5); NH₄SO₄ (0,5), Meio B, em g.L⁻¹: glicerol (30,0); NaNO₃ (3,0); K₂HPO₄ (1,0); MgSO₄ (0,5); FeSO₄ (0,01). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,4, e posteriormente, o meio foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Os frascos foram inoculados com 2 discos de 7 mm de diâmetro dos fungos crescidos em meio BDA por 7 dias. Os cultivos foram realizados em triplicata, sob agitação de 120 rpm, a 30 °C. Após 10 dias, os sobrenadantes dos cultivos foram coletados e as amostras analisadas em relação à produção de ácido cítrico secretado pelos fungos (extracelular) e consumo de glicerol.

Depois da avaliação dos resultados dos primeiros cultivos, um segundo experimento foi realizado utilizando a linhagem FFB. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio sendo uma triplicata com glicerina industrial de soja e a outra com glicerina de dendê, ambas com concentração inicial de glicerol de 60 g.L⁻¹. As composições dos meios foram: Meio A (como descrito anteriormente) e meio C: igual ao meio A acrescido de ZnSO₄ (1 mg.L⁻¹), CuSO₄ (1 mg.L⁻¹), MnSO₄ (1 mg.L⁻¹). O valor de pH inicial dos meios e a esterilização foram como descrito acima. Os frascos foram inoculados com 250 µL de uma suspensão de esporos (10⁷ esporos.mL⁻¹ de meio de cultivo) da linhagem crescida por 7 dias, em placas contendo meio BDA. Os cultivos foram realizados sob agitação a 120 rpm, 30 °C. Após 5, 10 e 15 dias, os sobrenadantes dos cultivos foram coletados e as amostras analisadas quanto à produção de ácido cítrico extracelular e consumo de glicerol.

As quantificações de ácido cítrico e glicerol foram realizadas por Cromatografia Líquida de alta performance utilizando o equipamento “HPLC Infinity 1260” (Agilent Technologies), acoplado ao detector de índice de refração (RID), em coluna Aminex HPX-87H (BioRad). Como fase móvel, uma solução de ácido sulfúrico 5 mmol/L foi usada, com fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura da coluna foi ajustada para 45 °C e usado modo de injeção automático. As quantificações de glicerol e ácido cítrico presentes nas amostras foram realizadas tendo como base curva padrão dos compostos em grau HPLC.

3 - Resultados e Discussão

Na Figura 1 estão apresentados os resultados de produção de ácido cítrico utilizando-se as 4 linhagens avaliadas no trabalho. As linhagens FFA e FFB produziram os maiores teores de ácido cítrico. O melhor meio de

produção foi o Meio A, utilizando tanto a glicerina proveniente de dendê, como a industrial de soja. Os teores de ácido obtidos por FFB foram 17,5 g.L⁻¹ e 7,5 g.L⁻¹ utilizando glicerina de dendê e industrial, respectivamente. Para FFA a maior produção (3,0 g.L⁻¹) foi obtida com a glicerina industrial. As linhagens FFC e FFD obtiveram valores inferiores a 1 g.L⁻¹ de ácido cítrico.

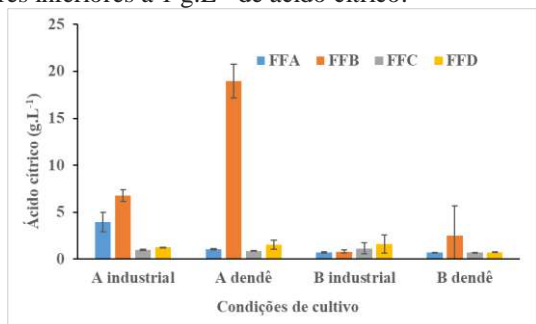


Figura 1. Produção de ácido cítrico (g.L⁻¹) a partir de glicerina industrial e de dendê utilizando 4 linhagens de fungos filamentosos. Concentração inicial de substrato: A= 60 g.L⁻¹; B=30 g.L⁻¹.

Como o cultivo da linhagem FFB no meio A resultou em maiores teores de ácido cítrico, essa condição foi utilizada em novo experimento, mantendo-se a concentração de glicerina em 60 g.L⁻¹ (Meio A), e adicionando-se elementos traço ao meio A, resultndo no Meio C, para avaliação do perfil cinético de produção do ácido pela linhagem FFB (Figura 2).

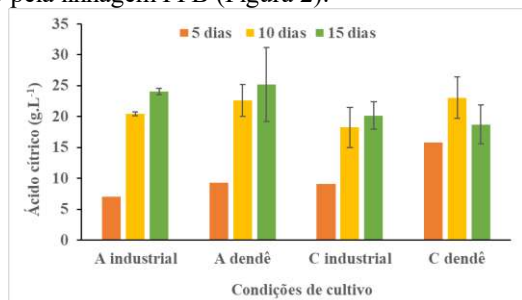


Figura 2. Perfil cinético de produção de ácido cítrico pela linhagem FFB em diferentes condições de cultivo utilizando glicerina industrial de soja e glicerina de dendê. Concentração inicial de substrato: A= 60 g.L⁻¹; C=30 g.L⁻¹.

Na avaliação cinética, quando compara-se a produção após 10 e 15 dias de cultivo para todos as condições avaliadas, pôde-se concluir que não houve diferença estatística ($p < 0,05$), e que a produtividade (g de ácido cítrico/Litro.dia) em 10 dias é maior que em 15 dias. No entanto, para a maioria dos casos, em 10 dias de cultivo foi observada uma produção cerca de 3 vezes maior que o observado em 5 dias (Figura 2). Esse é o caso por exemplo do resultado obtido em meio A utilizando glicerina industrial, com uma produção de 20 g.L⁻¹ de ácido cítrico após 10 dias de cultivo, e apenas cerca de 7 g.L⁻¹, após 5 dias. Nessa mesma condição com 10 dias de cultivo, houve um consumo de 40 g de glicerina, de 60g inicialmente disponibilizada, resultando em um rendimento mássico de 0,50 g de ácido cítrico/g de glicerol.

Em 2016, pesquisadores mostraram uma produção de 27 g.L⁻¹ de ácido cítrico a partir de milho, resultado comparável ao do presente trabalho, chegando a 132 g.L⁻¹ após processo otimizado (Wang et al., 2016). Outros

trabalhos mostram produções de ácido utilizando açúcares como glicose e hidrolisado de batata doce, a partir de altas concentrações de substrato, como 135 g.L⁻¹ (Betiku e Adesina, 2013). Dessa forma, uma futura otimização do processo descrito no presente trabalho utilizando glicerinas, poderá aumentar os níveis de ácido cítrico obtidos.

A comparação dos resultados de obtenção de ácido cítrico a partir da glicerina industrial, produzida principalmente a partir de soja, e da glicerina de dendê, revelou que há produção do ácido independente da origem da glicerina. O mesmo resultado poderia talvez ser extrapolado para outras glicerinas de outras fontes, podendo indicar que o tipo de óleo que origina a glicerina não afetaria a produção do ácido. Isso indica um potencial de aplicação já que, atualmente, propõe-se uma diversificação de biomassas oleoginosas para produção de biodiesel. Além disso, o uso de glicerina proveniente de dendê como fonte de carbono, relatado pela primeira vez para produção de ácido cítrico, abre oportunidades para utilização desse coproduto para a obtenção tanto de ácido cítrico, como para outros bioprodutos.

4 – Conclusões

A avaliação de fungos filamentosos, previamente isolados e preservados na Coleção de Microrganismos da Embrapa Agroenergia, revelou duas cepas, FFA e FFB, como promissoras para a produção de ácido cítrico a partir de glicerina proveniente da produção de biodiesel de óleo de soja e de óleo de dendê. Além disso, ambas glicerinas possibilitaram a produção de ácido cítrico pela linhagem FFB, principalmente no meio A.

5 – Agradecimentos

Embrapa, CNPq, Capes e Finep

6 - Bibliografia

- ALMEIDA, J. R.; FÁVARO, L. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel Biorefinery: Opportunities and Challenges for Microbial Production of Fuels and Chemicals from Glycerol Waste. *Biotechnology for Biofuels* **2012**, 5, 1-16.
- ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An Overview of Citric Acid Production. *LWT - Food Science and Technology* **2012**, 50, 367-370.
- BETIKU, E.; ADESINA, O. A. Statistical Approach to the Optimization of Citric Acid Production Using Filamentous Fungus *Aspergillus Niger* Grown on Sweet Potato Starch Hydrolyzate. *Biomass and Bioenergy* **2013**, 55, 350-354.
- HU, W.; LI, E. J.; YANG, H. Q. Current Strategies and Future Prospects for Enhancing Microbial Production of Citric Acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, 103, 201-219.
- SHOW, P. L.; OLADELE, K. O.; SIEW, Q. Y.; ZAKRY, F. A. A.; LAN, J. C. W.; LING, T. C. Overview of Citric Acid Production from *Aspergillus Niger*. *Frontiers in Life Science*, **2015**, 8, 271-283.
- WANG, B.; CHEN, J.; LI, H.; SUN, F.; LI, Y. Pellet-Dispersion Strategy to Simplify the Seed Cultivation of *Aspergillus Niger* and Optimize Citric Acid Production. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2017**, 40, 45-53.