




FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**OBTENÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR
DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO
EM BIORREATOR**

ROGÉRIO DA SILVA SANTOS

Lorena – SP
Maio/2005

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Biblioteca Universitária da
FAENQUIL

Santos, Rogério da Silva
A273o Obtenção de Ácido Cítrico por Fermentação Submersa a Partir
de Hidrolisado Hemicelulósico em Biorreator / Rogério da Silva
Santos.- - Lorena, 2005.
63f.: il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia
Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia.
Orientador: Arnaldo Márcio Ramalho Prata.

1. Biotecnologia 2. Biorreator 3. Ácido Cítrico : *Aspergillus
niger*. I. Prata, Arnaldo Márcio Ramalho, orientador. II. Título

CDU 574.6.0

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

**OBTENÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO
EM BIORREATOR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Banca Examinadora:

Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata (Presidente e Orientador)
Dr. Alfredo Eduardo Maiorano
Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres

Estudante:

Rogério da Silva Santos

Lorena-SP
Maio/2005

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

**OBTENÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE
HIDROLISADO HEMICELULÓSICO
EM BIORREATOR**

Este exemplar corresponde a versão
final da dissertação de mestrado
aprovado pela banca examinadora.

Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata
Orientador e Presidente da Banca examinadora

Lorena-SP
Maio/2005

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas grandes vitórias e conquistas.

A minha Família pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao grande amigo, Professor Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pela dedicação, incentivo e compreensão, pelos ensinamentos e conselhos, e pelo apoio nas horas mais difíceis, onde sempre esteve presente.

Ao professor Hélcio José Izário Filho pelas análises e sugestões.

Aos demais professores e pesquisadores do Grupo GMBIO, Inês Conceição Roberto, Silvio Silvério da Silva, Ismael Maciel de Mancilha, Maria das Graças de Almeida Felipe e João Batista de Almeida e Silva, pelos incentivos e discussões imprescindíveis.

À Rita de Cássia, Paulo Roberto e Nicamor, pela amizade e ajuda durante todo o trabalho.

A todos amigos e companheiros de laboratório, pela ajuda de sempre.

À Faculdade de Engenharia Química de Lorena, pela oportunidade de realizar este treinamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos que direta e indiretamente colaboraram pela a realização deste trabalho.

RESUMO

Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator. Rogério da Silva Santos, dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, departamento de biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata (Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL. C.P.: 116 CEP 12600-000 Lorena, SP, Brasil) Banca Examinadora: Dr. Alfredo Eduardo Maiorano e Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres.

Nos dias atuais, grande quantidade de resíduos de exploração de florestas de eucalipto são gerados pela indústria de papel e celulose, sendo que esses resíduos constituem poluentes ambientais que, através da biotecnologia, podem ser reaproveitados para a obtenção de produtos de interesse econômico-social. Este trabalho teve como principal objetivo estender o desenvolvimento do processo de produção de ácido cítrico, em sistema descontínuo, por fermentação submersa, a partir de hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto, empregando o fungo *Aspergillus niger*. O ácido cítrico é um composto empregado em larga escala na indústria alimentícia e de bebidas, também é muito utilizado na indústria de fármacos, produtos lácteos e como complexante em óleos vegetais.

Objetivando otimizar o processo de produção de ácido cítrico, foram estudadas as influências da concentração inicial de açúcares do hidrolisado hemicelulósico, o tempo de germinação dos esporos para inóculo, os metais para compor o meio de fermentação, a agitação em biorreator e a vazão de ar para a transferência de oxigênio para o meio de fermentação. Inicialmente foram determinadas as concentrações dos íons metálicos presentes na água de processo, assim como a caracterização parcial do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. Com a constatação da necessidade de tratamento ao hidrolisado hemicelulósico, verificou-se depois tratamento com óxido de cálcio e carvão ativado, uma redução de ácido acético e furfural de 97,75 % e 50 % respectivamente, já a redução dos compostos fenólicos apresentou uma redução de 84,10 %. A utilização de um evaporador de aço-inox mostrou-se não adequado para o processo de evaporação do hidrolisado devido ao aumento das concentrações de íons metálicos.

Em relação à concentração inicial dos açúcares no hidrolisado para fermentação cítrica, observou-se uma melhor produção de ácido quando utilizadas em concentrações em torno de 50 g/L e utilizando a linhagem de *Aspergillus niger* 10v10.

Com o auxílio de um planejamento fatorial 2^4 completo, foram avaliados os efeitos dos íons metálicos ferro, manganês e zinco, e também do ferrocianeto de potássio na produção cítrica. A produção mais acentuada ocorreu utilizando o nível mais baixo do metal ferro (100 ppm) e menor concentração de ferrocianeto de potássio. Através do planejamento constatou-se que não há necessidade de nenhuma adição dos metais ferro, manganês e zinco ao meio de fermentação preparado com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado. O ferrocianeto de potássio apresentou a capacidade de controlar o crescimento do fungo *A. niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado.

Em ensaios realizados em biorreator, pode-se constatar com o auxílio de um planejamento fatorial 2^3 completo, os efeitos da agitação, aeração e tempo de inóculo sobre a fermentação cítrica. Pode-se avaliar assim o efeito dessas variáveis sobre a formação de produto e obter um modelo matemático para concentração final de ácido cítrico ao nível de 95% de confiança. Maiores valores de fator de conversão ($Y_p/s = 0,384$) foram obtidos com a agitação (400 rpm) e a aeração (1,5 vvm) mais elevadas, assim como o fator de conversão de açúcares em células ($Y_p/x = 1,406$). Em relação ao tempo cultivo de inóculo para fermentação cítrica em biorreator, foi constatado que não houve variação significativa na produção, sendo que o tempo de 24 horas é o ideal para maior produtividade do processo.

ABSTRACT

Obtention of citric acid for submerged fermentation from hemicellulosic hydrolysate in bioreactor. Rogério Da Silva Santos, paper of Master's degree. Advanced Academic Program in Industrial Biotechnology, department of biotechnology of the College of Chemical Engineering of Lorena. Person who orientates: Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata (Department of Biotechnology, FAENQUIL. C.P.: 116 CEP 12600-000 Lorena, SP, Brazil)

Examiners: Dr. Alfredo Eduardo Maiorano and Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres.

In the current days, great amount of residues of exploration of forests of eucalyptus is generated by the paper industry and cellulose, being that these residues constitute ambient pollutants that, through the biotechnology, can be reused for the attainment of products of economic-social interest. This work had as main objective to extend the development of the process of citric acid production, in discontinuous system, for submerged fermentation, from hemicellulosic hydrolysate, using fungi *Aspergillus niger*. The citric acid is a substance used in large scale in the industry of foods and of drinks, also very it is used in the industry of pharmacist, milky products and as complex in vegetal oils.

With the objective to optimize the process of citric acid production, the influences of the initial concentration of sugars of the hemicellulosic hydrolysate, the time of germination of the espores for inoculum, the metals to compose the medium of fermentation, the agitation in bioreactor and the air outflow had been studied for the transference of oxygen for the medium of fermentation. Initially had been determined the concentrations of íons presents in the water of process, as well as the partial characterization of the eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. With the evidence of the necessity of treatment to the hemicellulosic hydrolysate, verified later treatment with oxide of calcium and activated coal, an reduction of acetic acid and furfural of 97,75 % and 50 % respectively, the reduction of phenolic composites presented of 84,10 %. The use of a steel-inox evaporator revealed not adequate for the process of evaporation by cause the increase of the metallic concentrations of íons in hemicellulosic hydrolysate. In relation to the initial concentration of the sugars in the hydrolysate for citric fermentation, one better production of acid was observed when used in concentrations around 50 g/L and using the strain of *Aspergillus to niger* 10v10.

With the aid of an factorial planning 2^4 , iron, manganese and zinc had been evaluated the effect of metallic íons, and also of ferrocyanide of potassium in the citric production. The more production occurred using the level lowest of the metal iron (100 ppm) and minor concentration of ferrocyanide of potassium. Through the planning, evidenced that it does not have necessity of no addition of metals iron, manganese and zinc to the medium of fermentation prepared with eucalyptus hemicellulosic hydrolysate treated. Ferrocyanide of potassium presented the capacity to control the growth of fungi *A. niger* 10v10 in eucalyptus hemicellulosic hydrolysate treated.

In assays carried through in biorreator, it can be evidenced with the aid of an factorial planning 2^3 , the effect of the agitation, aeration and time of inoculum on the citric fermentation. A mathematical model for concentration of citric acid can thus be evaluated it the effect of these variable on the product formation and be gotten to the reliable level of 95%. Bigger values of conversion factor ($Y_{p/s} = 0,384$) had been gotten with the agitation (400 rpm) and the aeration (1,5 vvm) greatest, as well as the factor of conversion of sugars in cells ($Y_{p/x} = 1,406$). In relation to the time culture of inoculum for citric fermentation in biorreator, it was evidenced that it did not have significant variation in the production, being that the time 24-hour is the ideal for bigger productivity of the process.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 O ÁCIDO CÍTRICO	3
2.2. MATÉRIAS-PRIMAS	5
2.3 MICRORGANISMOS E FUNGOS.....	9
2.4 CONDIÇÕES PARA FERMENTAÇÃO	10
2.5 BIOQUÍMICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO	14
2.6 RECUPERAÇÃO DO PRODUTO.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	16
3.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE EUCALIPTO.....	16
3.3 TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE EUCALIPTO	17
3.4. FUNGOS.....	17
3.5 PREPARO DO INÓCULO	18
3.6 PREPARO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	18
3.7 TESTE DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO	19
3.8 ESTUDO DOS METAIS.....	19
3.9 DEFINIÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO DO INÓCULO, DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO.....	20
3.10 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	22
3.11 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE EUCALIPTO.....	26
4.3 SELEÇÃO DO FUNGO	30
4.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES.....	30
4.5 EFEITO DOS METAIS E DO FERROCIANETO DE POTÁSSIO	33
4.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA AGITAÇÃO, DA AERAÇÃO E DO TEMPO DE CULTIVO DO INÓCULO	39
6.0 CONCLUSÕES	56
7. TRABALHOS FUTUROS.....	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Aplicações do ácido cítrico.....	4
Tabela 2.2	Matérias-primas usadas para fermentação do ácido cítrico.....	5
Tabela 2.3	Microrganismos capazes de produzir ácido cítrico.....	9
Tabela 3.1	Composição do meio que será empregado para o processo de fermentação, em relação aos nutrientes.....	19
Tabela 3.2	Fatores e níveis do Planejamento fatorial 2^4	20
Tabela 3.3	Matriz de planejamento experimental fatorial 2^4	21
Tabela 3.4	Fatores e níveis do Planejamento fatorial 2^3	22
Tabela 3.5	Matriz de planejamento experimental fatorial 2^3	22
Tabela 4.1	Composição parcial dos metais na água utilizada para a produção do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.....	25
Tabela 4.2	Composição parcial do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto original.....	26
Tabela 4.3	Composição parcial do hidrolisado sem concentrar (HE), concentrado antes (HE 3X) e depois do tratamento físico-químico (HE 3X Trat.).....	27
Tabela 4.4.	Produção de ácido cítrico e glicerol, crescimento e consumo de substrato por duas linhagens de <i>Aspergillus niger</i> , em meio sintético com proporções de xilose e glicose idênticas à do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.....	32
Tabela 4.5	Parâmetros da fermentação cítrica, obtidos por duas linhagens de <i>Aspergillus niger</i> , em meio sintético com proporções de xilose e glicose idênticas à do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.....	32
Tabela 4.6	Parâmetros de fermentação cítrica, obtidos por <i>Aspergillus niger</i> 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado e suplementado com diferentes metais e ferrocianeto de potássio, a 30 °C e agitação de 200 rpm em frascos.....	34

Tabela 4.7	Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2^4 completo.....	36
Tabela 4.8	Análise de variância dos efeitos para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2^4 completo.....	37
Tabela 4.9	Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2^2 completo.....	37
Tabela 4.10	Análise de variância dos efeitos para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2^2 completo.....	38
Tabela 4.11.	Parâmetros dos ensaios do planejamento para fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo, obtidos por <i>Aspergillus niger</i> 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto e suplementados com 100 ppm de ferrocianeto de potássio, a 30 °C.....	40
Tabela 4.12	Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para o parâmetro concentração final de ácido cítrico em biorreator, segundo o planejamento 2^3 completo.....	52
Tabela 4.13	Análise de variância dos efeitos para o parâmetro concentração final de ácido cítrico em biorreator, segundo o planejamento fatorial 2^3 completa.....	52
Tabela 4.14	Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “Student” e nível de significância para o modelo representativo da concentração final de ácido cítrico em biorreator, considerando agora um planejamento de 2^2 completo.....	53
Tabela 4.15	Análise de variância dos efeitos e da regressão para o modelo que representa a concentração final de ácido cítrico em biorreator descontínuo, segundo o planejamento fatorial 2^2 completo.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Modelo Molecular do ácido cítrico.....4
- Figura 2.2** Esquema generalizado do fluxo de carbono até citrato em *Aspergillus niger*. (a) via glicolítica; (b) Descarboxilação Oxidativa e Carboxilação do Piruvato; (c) Ciclo de Krebs.14
- Figura 3.1** Fermentador de bancada, MULTIGEN (Brunswink Sc. Co.).....21
- Figura 4.1** Gráfico comparativo das composições do hidrolisado concentrado depois do tratamento físico-químico; PHT= Fenóis totais; FUR=Furfural; HMF=Hidroxiacetilfurfural; ACG=Acido gálico; SYR=Siringaldeido; CUM=Cumarina; Mn=Manganês; Ca=Cálcio; Ni=Níquel; Cr=Cromo; Co=Cobalto; Fe=Ferro; Zn=Zinco; Cu=Cobre; Na=Sódio.....29
- Figura 4.2** Fermentação cítrica em “shaker” utilizando *Aspergillus niger* 10v10 e NRRL 334 em diferentes concentrações de açúcares.....31
- Figura 4.3** Superfície de resposta e curvas de nível que representa a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em fermentação submersa (em frascos) de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado.....38
- Figura 4.4** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 1).....41
- Figura 4.5** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 2).....41
- Figura 4.6** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 3).....42
- Figura 4.7** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 4).....42
- Figura 4.8** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 5).....43

- Figura 4.9** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 6).....43
- Figura 4.10** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo(ensaio7).....44
- Figura 4.11** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo(ensaio8).....44
- Figura 4.12** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio9).....45
- Figura 4.13** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 10).....45
- Figura 4.14** Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo (ensaio 11).....46
- Figura 4.15** Efeito na produção de ácido cítrico pela variação na agitação em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com aeração de 0,5 vvm. (○) 200 rpm; (■) 400 rpm.....47
- Figura 4.16** Efeito na massa-celular pela variação na agitação em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo de cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com aeração de 0,5 vvm. (○) 200 rpm; (■) 400 rpm.....48
- Figura 4.17** Efeito na massa-celular pela variação da vazão de ar em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo de cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com agitação de 200 rpm. (○) 0,5 vvm ; (■) 1,5 vvm.....50
- Figura 4.18** Efeito na produção de ácido cítrico pela variação na vazão de ar em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo de cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com agitação de 200 rpm. (○) 0,5 vvm; (■) 1,5 vvm.....51

- Figura 4.19** - Distribuição de resíduos do modelo proposto (Y) que representa a concentração de ácido cítrico final em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto por *Aspergillus niger* 10V10 em biorreator.....**54**
- Figura 4.20** Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo proposto (Y), que representa a concentração final de ácido cítrico em fermentação descontínua de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto por *Aspergillus niger* 10V10 em biorreator.....**55**

1. INTRODUÇÃO

O ácido cítrico é atualmente um dos compostos mais amplamente empregados nas indústrias farmacêuticas, de bebidas e de alimentos. Após a descoberta de seu potencial, a produção comercial tornou-se objetivo de diversas empresas, que logo desenvolveram métodos de extração e de síntese. Porém, a obtenção de ácido cítrico pelo método fermentativo mostrou-se mais viável, sendo o responsável pela produção de quase todo ácido cítrico utilizado hoje em dia no mundo. Embora apresente problemas relacionados com a interferência com metais, a fermentação cítrica por fungos é um processo amplamente empregado para a produção de ácido cítrico, sendo utilizado, sobretudo, o processo de fermentação submersa.

A Empresa Cargill do Brasil, localizada em Uberlândia, no triângulo mineiro, é a maior produtora de ácido cítrico no país. A fábrica realizou investimentos da ordem de R\$ 130 milhões e tem capacidade de processar 30 mil toneladas de ácido cítrico por ano (ADTP, 2002). O Brasil atualmente é auto-suficiente na fabricação de ácido cítrico, o qual é produzido a partir da sacarose, adquirida no próprio Estado de Minas Gerais. O mesmo é utilizado como acidulante, estimulante de aroma, antioxidante e conservante nas indústrias de alimentos, cosméticos, medicamentos e detergentes biodegradáveis. A fábrica de Uberlândia, primeira de ácido cítrico da Cargill fora dos EUA, tem a mesma tecnologia da unidade americana, com obtenção de produtos uniformes, estáveis e cristalizados, o que permite altos índices de hidratação exigidos pela indústria alimentícia. A Cargill exporta o ácido cítrico do Brasil para todos os países latino-americanos, além de países asiáticos e africanos (CARGILL, 2003).

Nos dias de hoje a comunidade científica está cada vez mais interessada nos problemas relacionados com a poluição ambiental. O desenvolvimento da indústria de papel e celulose é um fator relevante em relação a esse problema, devido a grande quantidade de resíduos gerados anualmente. Diversas pesquisas são realizadas com a finalidade de viabilizar matérias-primas alternativas, objetivando a utilização de resíduos. O uso de resíduos como matéria-prima é de grande interesse para obtenção de produtos de alto valor agregado, e ainda contribui para o abaixamento dos custos de produção. Dentre esses resíduos encontra-se as aparas de eucalipto, uma fonte inesgotável para obtenção de açúcares

fermentescíveis, principalmente a xilose, a qual pode ser empregada como substrato para obtenção biotecnológica de ácido cítrico.

Os materiais lignocelulósicos constituem um recurso renovável amplamente distribuído na natureza, e vêm sendo intensamente estudados para a obtenção de energia e bioconversão em produtos comerciais.

Com o constante desenvolvimento dos métodos de pré-tratamento e hidrólise dos materiais lignocelulósicos, é possível que se obtenham, a partir desses materiais polissacarídeos, hidrolisados com altas concentrações de açúcares fermentescíveis.

O Brasil tem hoje uma grande área plantada de eucalipto (quase 3,0 milhões de hectares), é o sétimo maior produtor mundial de celulose (cerca de 6,3 milhões de toneladas por ano) e detém o maior índice médio de produtividade (40 m³/ hectare por ano). As indústrias brasileiras do setor como um todo, que também usam o eucalipto como matéria-prima para a produção de papel, celulose e demais derivados, representam 4% do Produto Interno Bruto (PIB), 8% das exportações e geram aproximadamente um milhão de empregos diretos e indiretos.

Por ser uma árvore de crescimento rápido, com ciclos de plantação de seis e oito anos e de fácil adaptação às mais diferentes condições de clima e solo, o eucalipto passou a ser uma alternativa racional contra a devastação das florestas nativas em diversas regiões do planeta. Porém, em linhas gerais, este setor produz grande quantidade de resíduos como: casca, aparas e lixívia.

Os resíduos de madeira de eucalipto, acumulado em grandes quantidades pelas indústrias de papel e celulose, constituem uma matéria-prima com grande potencial para conversão de insumos químicos.

A hidrólise ácida da hemicelulose fornece um xarope de açúcares, principalmente de xilose, que pode ser fermentado por microrganismos e atualmente vêm sendo estudado como matéria-prima para diversos insumos químicos.

Considerando a disponibilidade da matéria-prima, a utilização de resíduos agroindustriais e a viabilidade do processo fermentativo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto como meio alternativo para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, em fermentação submersa em reator descontínuo, assim como definir condições que proporcionem rendimentos satisfatórios em ácido cítrico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O ácido cítrico

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico), de fórmula química $C_6H_8O_7$ (Figura 2.1), foi isolado e cristalizado por Sheele, pela primeira vez, em 1784, do suco de limão, sendo o principal constituinte dos frutos cítricos. Este ácido orgânico pode também ser encontrado como constituinte natural de uma variedade de frutas cítricas como: abacaxi, pêra, pêssego e laranja. A produção comercial de ácido cítrico começou na Inglaterra em 1860, utilizando sais de cálcio. Este processo tinha um rendimento muito baixo, necessitando de 30 a 40 toneladas de limões para obter uma tonelada de ácido cítrico. Três décadas depois, em 1893, o acúmulo de ácido cítrico por microrganismo foi descoberto. Wehmer, um botânico alemão, descobriu que o *Citromyces* (hoje identificado como *Penicillium sp*) possuía a capacidade de acumular este ácido durante seu cultivo (REED, 1991).

O processo submerso está atualmente difundido para a produção comercial de ácido cítrico, sendo um processo que requer menos espaço, menos trabalhoso e proporciona alta produtividade (GREWAL; KARLA, 1995). Enquanto o processo em superfície dura de 8 a 12 dias, o processo submerso dura de 5 a 10 dias (GREWAL; KARLA, 1995).

Penna (2001) cita que as vantagens do processo de fermentação submersa sobre o de superfície em termos de custos de investimento e operação, induziram pesquisadores a procurar desenvolvê-lo para a obtenção de ácido cítrico. Outra evidência da importância da produção de ácido cítrico por processo submerso é a possibilidade de se desenvolver métodos diferenciados de condução da fermentação, como é o caso do sistema de fermentação em batelada alimentada com reciclo. Este permite aumentar rendimento, reciclar meio e micélio, diminuir mão de obra e consumo de energia e ainda utilizar matéria-prima de baixo custo sem suplementação (ALI et al., 2002).

Cerca de 70% da produção é utilizada pela indústria de alimentos e bebidas; 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias (BOHDZIEWICZ; BODZEK, 1992). Na Tabela 2.1 encontram-se algumas aplicações do ácido cítrico segundo Grewal et al. (1995).

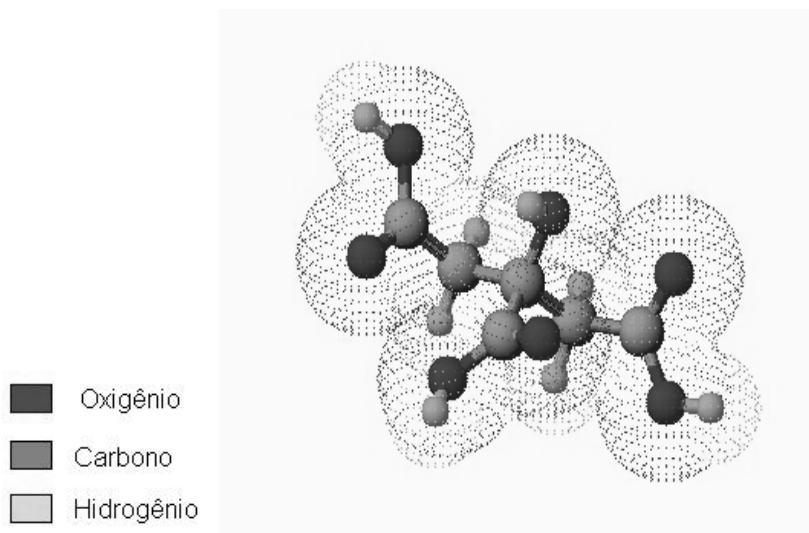


Figura 2.1 - Modelo molecular do ácido cítrico.

A produção mundial de ácido cítrico ultrapassa 800.000 t/ano, sendo os maiores produtores a Europa e os Estados Unidos. O mercado cresce cerca de 4% ao ano e seu emprego em alimentos representa 55-65% do mercado total de acidulante, contra 20-25% do ácido fosfórico e 5% do ácido málico (CARGILL, 2003).

Tabela 2.1 Aplicações do ácido cítrico

Indústria	Uso
Suco de frutas e vegetais	Atua como estabilizante em sucos preparados comercialmente e em vegetais
Vinhos e cidras	Previne a turbidez de vinhos e cidras, previne o amarelamento de vinhos brancos, ajuste de pH e inibe a oxidação.
Produtos lácteos	Como emulsificante em sorvetes e no processamento de queijos. Atua como agente acidificante em queijos e também como antioxidante
Óleos e gorduras	Capacidade de complexação com metais pesados como o ferro e o cobre, possibilitando assim sua utilização como estabilizante.
Farmacêutica	Como efervescente ao combinar-se com bicarbonatos, antioxidante nas preparações de vitaminas, anticoagulante entre outras aplicações.

A produção de ácido cítrico por *A. niger* é influenciada por diversos parâmetros e condições que governam a produção do mesmo por este fungo.

A seguir serão discutidas as seções que incluem: Matérias-primas, Microrganismos, condições de fermentação, bioquímica da fermentação e a recuperação do produto.

2.2. Matérias-primas

Antigamente o ácido cítrico era produzido por fermentação, apenas da sacarose, mas hoje em dia os substratos mais utilizados são: a sacarose, o melaço, o caldo de cana-de-açúcar, os melaços cítricos e vários outros hidrolisados (NEHAD, 2002). Uma larga variedade de outras matérias-primas pode ser utilizada para produção de ácido cítrico por fermentação (Tabela 2.2) .

Além dos substratos citados, vários trabalhos têm sido publicados demonstrando a utilização de matérias-primas alternativas. Os resíduos vegetais e as madeiras, por exemplo, vêm sendo intensamente estudados como fonte de carboidratos para processos fermentativos, pois estes materiais constituem uma fonte renovável, tanto naturalmente como através de programas de reflorestamento (MISHRA; SINGH, 1993; SHAN; LEE, 1994).

Tabela 2.2. Matérias-primas usadas para fermentação do ácido cítrico.

Matéria-prima	Tipo de fermentação	Rendimento %
Resíduo de algodão	Superfície	-
Raiz de <i>Asphodelus aestivus</i>	Superfície	-
Açúcar de beterraba	Superfície	40-60 ^a
Resíduo de cervejaria	Superfície e Submerso	78,5 ^a e 42-58 ^a
Hemicelulose da madeira	Submerso	-
Hidrolisado de bagaço de cana de açúcar	Submerso	60 ^a
Polpa de maçã	Estado sólido(SSF)	88 ^a
Polpa de uva	SSF	60 ^a
Casca de fruta de kiwi	SSF	60 ^a
Resíduo de abacaxi	SSF	50-60 ^a

a- Baseado em açúcar consumido.

Fonte: Grewal et al. (1995)

Segundo o Jornal Folha de São Paulo (2004) a produção brasileira de celulose foi estimada, no ano de 2004, em torno de 9,4 milhões de toneladas, e, em 2005, haverá um incremento dessa produção, devido à entrada em atividade da empresa Veracel, na Bahia, cuja capacidade será de 900 mil toneladas. O país já é o terceiro maior produtor mundial de celulose do mercado, ficando atrás apenas do Canadá e dos Estados Unidos.

Trazido da Austrália em meados do século XIX para a fabricação de dormentes para as linhas férreas que se instalavam no País, a árvore adaptou-se excepcionalmente bem no Brasil. Hoje o País é líder mundial em produtividade de derivados do eucalipto. Por ser uma árvore de crescimento rápido – a indústria da celulose trabalha com ciclos de plantação entre cinco e sete anos – e de fácil adaptação às mais diferentes condições de clima e solo, o eucalipto passou a ser uma alternativa racional contra a devastação das florestas nativas em diversas regiões do planeta. Hoje, temos a maior área plantada de eucaliptos do mundo, mais de três milhões de hectares.

Através da pesquisa do genoma dessa nobre árvore (Projeto *Genolyptus*) que vai aumentar ainda mais a competitividade de nossa indústria, 12 empresas do setor, junto com sete universidades e a Embrapa, estão decifrando os mecanismos capazes de levar o País a plantar eucalipto mais produtivo e ter indústrias menos poluentes (JORNAL O ESTADO DE SÃO PAULO, 2002). Além disso, obteremos eucaliptos mais resistentes a doenças, mais adaptáveis aos diferentes solos e climas do País ou mais adequados à especificidade de cada tipo de indústria.

Sendo assim, grande quantidade de resíduos é gerada e acumulada anualmente na natureza, ocasionando sérios problemas de poluição ambiental e perdas de fontes potenciais de alto valor agregado. As atividades florestais podem causar uma variedade de impactos sobre o meio ambiente. Entre elas a monocultura florestal que tem um peso considerável, visto que simplifica o ecossistema, o deixando vulnerável a doenças e principalmente a quantidade de resíduos gerados na sua manufatura (U.S ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1995).

As indústrias madeireiras, serrarias e mobiliário, produzem resíduos a partir do beneficiamento de toras. Os tipos de resíduos produzidos são casca, cavaco, costaneira, pó de serra, maravalha e aparas.

No setor de papel e celulose existem indústrias de papel e indústrias de celulose, e também indústrias integradas, ou seja, que produzem papel e celulose. Haverá nestes casos diferenças nos tipos de resíduos produzidos, porém, em linhas gerais este setor produz como resíduos: casca, cavaco e lixívia. Existem 220 companhias no Brasil com unidades industriais localizadas em 16 estados, utilizando madeira de reflorestamento, das espécies eucalipto (62%) e pinus (36%) (MCT, 2002).

Os materiais lignocelulósicos constituem um recurso renovável amplamente distribuído na natureza, e vêm sendo intensamente estudados para a obtenção de energia e conversão em produtos de interesse industrial. Com o constante desenvolvimento dos métodos de pré-tratamento e hidrólise dos materiais lignocelulósicos, é possível que se obtenham, a partir desses materiais polissacarídeos, hidrolisados com altas concentrações de açúcares fermentescíveis (MIYAFUJI et al., 2003).

De acordo com Dekker (1985) os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são: a celulose, a hemicelulose e a lignina, em proporções que variam de 40 a 50%, 15 a 30% e 10 a 30%, respectivamente. Devido à sua natureza polissacarídica, os materiais lignocelulósicos não são diretamente utilizados pela maioria dos microrganismos produtores de substâncias de interesse industrial, havendo a necessidade de se realizar a hidrólise dos seus componentes para os respectivos monômeros. Uma exceção é o fungo *Lentinus edodes*, descrito como fungo da madeira e causador da "podridão branca", que devido ao seu elevado potencial de biodegradação é capaz de decompor a madeira sem necessidade de hidrólise. Este fungo é conhecido desde a Antigüidade, na Ásia, principalmente na China e no Japão. No Brasil, o desenvolvimento desta cultura iniciou-se na década de 1980, empregando-se como substrato a madeira de *Eucalyptus* (ANGELIS et al., 1998).

Esta hidrólise dos materiais lignocelulósicos pode ser realizada por processos físicos, químicos, biológicos e combinação destes (BUCHHOLZ et al., 1981; KUMAKURA et al., 1983). Segundo Funk (1975) o processo de hidrólise ácida pode ser conduzido mediante o uso de altas concentrações de ácido mineral, à temperatura ambiente, ou pelo emprego de ácido mineral diluído em temperaturas entre 150 e 180 °C. Entretanto, para a utilização da hemicelulose, uma hidrólise na temperatura entre 100 e 160 °C é mais conveniente, pois impede a degradação da xilose, o que leva à formação de produtos que podem ser fortes inibidores do metabolismo microbiano (DOMINGUES et al., 1997).

Diferentes materiais lignocelulósicos vêm sendo utilizados para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos como bagaço de cana (SENE et al., 2000), palha de arroz (ROBERTO et al., 1995) e cavacos de eucalipto (SANTOS, et al., 2001; PARAJÓ et al., 1998). Esses hidrolisados hemicelulósicos, obtidos por hidrólise ácida, têm se mostrado de grande interesse. Almeida (1991) e Pessoa (1991)

estudaram a hidrólise da palha de arroz, e do bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente, visando obter o hidrolisado para a produção de proteína microbiana.

De acordo com Dale (1987), os custos de vários produtos resultantes de processos fermentativos dependem muito do custo da fonte de carboidratos. Segundo este, a conversão da lignocelulose oferece potencial para a obtenção de açúcares fermentescíveis de menor custo. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Shan e Lee (1994), que desenvolveram um processo de produção de acetona-butanol a partir da madeira, através do sistema de fermentação extrativa e sacarificação associadas.

Yu et al. (1984) utilizaram a fração celulósica da madeira para a produção de 2,3-butanodiol e Prata (1989) obteve ácido cítrico a partir do hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar, em fermentação submersa com *Aspergillus niger*.

A fermentação de hidrolisados obtidos de materiais lignocelulósicos pelo processo de hidrólise ácida, o qual vem sendo empregado em várias pesquisas com vistas à obtenção microbiológica de xilitol apresenta problemas diferentes àqueles encontrados na fermentação de misturas de açúcares puros. Isto porque nestes hidrolisados estão presentes, além dos açúcares, compostos tóxicos à atividade microbiana como íons metálicos oriundos da corrosão de equipamentos, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural oriundos do procedimento de hidrólise da estrutura lignocelulósica reduzidas (RODRIGUES, et al., 1999).

Em função da toxicidade dos hidrolisados, vários métodos de tratamento têm sido empregados antes de sua utilização como meio de cultura, tais como: neutralização, combinação entre resina de troca iônica e neutralização e entre carvão ativo e neutralização (DOMINGUEZ et al., 1996), combinação entre neutralização e carvão ativo (PARAJÓ et al., 1996), alteração de pH com ácidos e bases (FELIPE et al., 1997a e 1997b), bem como a combinação deste último com carvão ativo (ALVES et al., 1998).

2.3 Microrganismos e Fungos

Ao longo dos anos um grande número de microrganismos foram usados para a produção de ácido cítrico. A excreção de ácido cítrico é um fenômeno que ocorre em bactérias, leveduras e fungos. As bactérias *Arthrobacter paraffineus* e *Corynebacterium* produzem ácido cítrico em meio que contém hidrocarbonetos como fonte de carbono (GREWAL et al., 1995).

Em relação às leveduras Madox et al. (1985) apresentaram um trabalho demonstrando a capacidade da *Saccharomycopsis lipolytica* de converter os açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico da madeira em ácido cítrico. Djadjat et al. (1996) demonstraram também que a levedura *Candida guilliermondii* imobilizadas são capazes de produzir ácido cítrico utilizando glicose como meio de fermentação em reator de coluna de bolhas. Outra levedura estudada atualmente é a *Yarrowia lipolytica* que se apresenta como um potencial produtor de ácido cítrico utilizando o glicerol como substrato (PAPANIKOLAOU et al., 2002).

Atualmente, o fungo *Aspergillus niger* é o principal organismo empregado para a produção comercial. A vantagem de se utilizar este fungo são: a facilidade do controle de variáveis de processo, a habilidade de fermentar uma larga variedade de materiais de baixo custo e seus altos rendimentos (SIEBERT; SCHULZ, 1974). Uma lista de outros microrganismos capazes de produzir ácido cítrico encontra-se na Tabela 2.3 segundo Grewal et al. (1995).

Tabela 2.3. Microrganismos capazes de produzir ácido cítrico.

Fungos	Leveduras	Bactérias
<i>Aspergillus wentii</i>	<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>A. carbonarius</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Arthrobacter paraffinens</i>
<i>A. aculeatus</i>	<i>C. oleophila</i>	<i>Corynebacterium ssp</i>
<i>A. awamori</i>	<i>C. guilliermondii</i>	
	<i>C. citroformans</i>	
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Hansenula anamola</i>	

2.4 Condições para fermentação

Existem três formas de se produzir ácido cítrico por *A.niger* descritas na literatura. A fermentação cítrica pode ser conduzida pelos seguintes processos: em superfície, submerso e Koji. No primeiro caso utilizam-se bandejas, geralmente de alumínio e alta pureza, contendo uma camada de meio de fermentação de 5 a 20 cm de altura, de acordo com o volume. As bandejas são colocadas em câmaras ventiladas, onde há circulação de ar e previamente esterilizado, que fornece oxigênio para a fermentação, e ao mesmo tempo serve para retirar o calor produzido durante o processo (MILSON; MEERS, 1985). O crescimento resulta na formação de uma camada semi-submersa de micélio que garante o fornecimento de oxigênio e dos constituintes do meio para a massa celular. A fermentação se processa no período de 8 a 12 dias, de acordo com a concentração de açúcar, resultando em rendimentos de 70 a 75% sobre a quantidade de açúcar inicial. Um fator importante do processo é a retenção do produto pelo micélio, que pode chegar a 15% do total produzido (KUBICEK; ROHR, 1986).

O processo Koji, originalmente desenvolvido no Japão, consiste de uma fermentação em meio sólido, geralmente empregando-se farelo de arroz ou resíduos de frutas que, após tratamento, são inoculados com uma suspensão de esporos aspergida sobre a superfície. A fermentação se completa em cerca de 4 dias, em condições ideais (KUBICEK; ROHR, 1986).

O processo de fermentação submersa é o mais difundido para produção comercial de ácido cítrico. Requer menos espaço, possibilita o controle das variáveis durante o período inicial, garantindo o sucesso da fermentação e viabiliza altas velocidades de produção. Qualquer reator tanque pode ser usado e devido ao baixo valor de pH que desenvolve durante a fermentação e o fato de do ácido cítrico ser corrosivo, o biorreator deve ser construído de materiais resistentes à corrosão.

Uma outra consideração importante para biorreatores para produções de ácido cítrico é a provisão de um sistema de aeração que possa manter um nível de oxigênio dissolvido alto. Esse nível é monitorado durante as fermentações utilizando eletrodos (ALI et al., 2002).

A fermentação cítrica é um processo dependente do oxigênio, tanto na fase de crescimento do fungo, quanto durante o acúmulo do ácido. O oxigênio funciona

como regulador da produção, e uma interrupção de seu fornecimento faz com que a velocidade de produção seja alterada completamente, dependendo do estágio em que o processo se encontra (KUBICEK; ROHR, 1986). As velocidades máximas de produção da fermentação cítrica foram observadas em altos valores de oxigênio dissolvido (90% de saturação) em sistema descontínuo (DAWSON et al., 1988). A velocidade da turbina afeta consideravelmente a morfologia do fungo e acúmulo de ácido cítrico (SEICHERT et al., 1982; PAPAGIANNI et al., 1998). De acordo com Berovic et al. (2001) o sistema descontínuo é amplamente aplicado em biorreatores para produção cítrica. Este tipo de reator oferece algumas vantagens, como a facilidade de difusão de gás, intensidade de agitação, que podem ser variadas e a transferência de massa e calor.

O inóculo é preparado adicionando-se uma suspensão de esporos de *A. niger* ou um pré-cultivo do micélio. Para o pré-cultivo o inóculo deve estar em torno de 10% do volume do meio de fermentação.

A fermentação submersa pode ser conduzida em sistema descontínuo, contínuo e descontínuo alimentado, mas geralmente o primeiro é aplicado (PAPAGIANNI et al., 1998).

Para produzir ácido cítrico é essencial que o meio de fermentação contenha fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e níveis adequados de traços de metais e sendo influenciado pela aeração, temperatura e pH. A fermentação cítrica por *A. niger* deve ser conduzida a temperatura em torno de 30 °C. Um intervalo de 28 a 33 °C é citado por Sodeck et al. (1981), sendo que em temperaturas acima do limite máximo ocorre formação de ácido oxálico e, abaixo de 28 °C, ocorre diminuição significativa da produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI et al., 1998).

A concentração de açúcares afeta significativamente a produção de ácido cítrico por *A. niger*. A glicose e a frutose são rapidamente assimiladas pelo fungo, por serem açúcares mais simples. Em escala industrial utiliza-se a sacarose como fonte de carbono e, neste processo, o fungo atua sob condições ácidas e através da enzima invertase extracelular hidrolisa a sacarose em seus monômeros (KUBICEK; ROHR, 1986).

A. niger assimila facilmente a manose, xilose e arabinose e produz ácido cítrico a partir destes açúcares (MADDOX et al., 1985). Segundo Santos e Prata (2001), *A. niger* assimila facilmente os açúcares que estão presentes no hidrolisado de madeira.

A concentração de açúcar é crítica para a produção de ácido cítrico, sendo que a taxa de produção máxima é usualmente obtida entre 14-22% de açúcar (PAPAGIANNI et al., 1999). A faixa ótima de concentração de açúcar encontra-se entre 10-14%, de acordo com Xu et al. (1989a). Segundo os mesmos autores não há produção de ácido cítrico em concentrações de açúcares abaixo de 2,5% (PAPAGIANNI et al., 1999; XU et al., 1989b). As baixas concentrações de açúcares facilitam o acúmulo de ácido oxálico, isso mostra claramente o fato da baixa produtividade de ácido cítrico (PENNA, 2001).

O nitrogênio é necessário na produção de ácido cítrico por fungos, e geralmente sua fonte é sulfato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio, uréia, etc (HANKAR, 1974; HANG, 1977; KAHLON, 1982; LAL, 1980; MANONMANI, SREEKANTIAH, 1987). A forma e a concentração da fonte de nitrogênio afetam consideravelmente no crescimento do fungo e a síntese do ácido cítrico. Sulfato de amônio prolonga o tempo de crescimento vegetativo enquanto que nitrato de amônio proporciona um curto período de crescimento vegetativo. Nitrato de amônio, acima de 0,25%, favorece a produção de ácido oxálico (GUPTA et al., 1976). A alta concentração de nitrogênio aumenta o crescimento vegetativo e também o consumo de açúcares, com diminuição da produção de ácido cítrico (HANG et al., 1987). Estudos mostram que sulfato de amônio como fonte de nitrogênio resulta em um aumento na produção de ácido cítrico sem a formação de ácido oxálico (USMANI, 1978).

Além de carbono e nitrogênio a presença de fosfato no meio de fermentação tem um efeito considerável na fermentação cítrica. A alta concentração de fosfato promove maior crescimento e menor produção de ácido cítrico (KHAN et al., 1970). Há informações que indicam o dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4) como a melhor fonte de fosfato (KAHLON, 1982; PUROHIT, 1985). Foram estudados seus efeitos com concentrações entre 0,5 - 5,0 g/L, utilizando resíduos de cervejarias, verificando-se um pequeno efeito no crescimento do fungo e na formação do ácido cítrico (HANG et al., 1970). A fermentação cítrica por *A.niger* fica muito restrita quando está em falta o dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4) e o monohidrogênio fosfato de dipotássio (K_2HPO_4) (SINGH; MEHROTRA, 1975).

A manutenção do pH baixo é essencial para a máxima produção de ácido cítrico. O pH inicial requerido depende da fonte de carbono usada. Geralmente o pH abaixo de dois é o mais utilizado para otimização da produção. O pH baixo tem a

vantagem de prevenir uma possível contaminação e inibir a produção de ácido oxálico (KUBICEK; ROHR, 1986). Em valores de pH iguais ou superiores a 4,0 a formação de ácido oxálico é acelerada devido à alta capacidade de tamponamento do meio (USAMI; FUKUTOMI, 1977). Também pode ser encontrado pH acima de 5,4 e entre 6,0-6.5 e que estão consideradas esses valores como ótimos para fermentações com melaços (KAHLON, 1982). O emprego de valores de pH mais altos em meios à base de melaços é consequência da impossibilidade de o fungo *A. niger* germinar nesses substratos a pH baixo, o que só é possível em meios à base de sacarose e glicose (MILSON; MEERS 1985).

Os elementos-traços são componentes críticos para a fermentação cítrica. Os cátions bivalentes: zinco, cobre, manganês, ferro e magnésio têm apresentado influência na produção de ácido cítrico por *A. niger* (MUSHNIKOVA; EGLIT 1986; ROUKAS; KOTZEKIDOU, 1987). Quando esses elementos-traços limitam o crescimento, há acúmulo de ácido cítrico (CLARK et al., 1966; HORITSU, 1977; SANCHEZ-MARROQUIN, 1970).

Recentemente foram feitos estudos em que o período de incubação foi reduzido de seis para dois dias, tornando-se um processo altamente econômico. Foram adicionados aproximadamente 3 ppm de sulfato de manganês em melaço de cana-de-açúcar e o pico máximo de produção em reator de mistura alimentado ocorreram em 48 horas (SIKANDER et al., 2002)

Outro elemento importante é o cobre, cuja presença é muito importante na formação dos *pellets*, favorecendo a fisiologia celular para formação de ácido cítrico. Um estudo recente mostra que a concentração ótima para produção de ácido cítrico está em torno de 3 ppm de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). O sulfato de cobre reduz a concentração de ions Fe^{3+} formando sais complexos que se precipitam durante o curso da fermentação (HAQ et al., 2002).

Os efeitos dos íons zinco e magnésio também são importantes. O primeiro não pode estar em altas concentrações, pois favorece o crescimento celular e não o acúmulo de ácido cítrico (WOLD, SUZUKI, 1976). No caso do íon magnésio, a literatura cita a sua importância para o crescimento celular. A fonte utilizada comumente é o sulfato de magnésio e a concentração ótima varia entre 0,02-0,025% (KAPOOR et al., 1983).

2.5 Bioquímica da produção de ácido cítrico

Segundo, Stanier et al. (1976), a formação do ácido cítrico por *A. niger* é resultado de uma operação defeituosa que ocorre no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e o metabolismo é relatado em três etapas seqüenciais: (1) a quebra das hexoses em piruvato e CO₂ na via glicolítica; (2) formação de oxalacetato através do piruvato e CO₂ via “anaplerótica”: e (3) acúmulo de ácido cítrico com o ciclo de Krebs; que pode ser verificar claramente através do balanço de carbono na Figura 2.2.

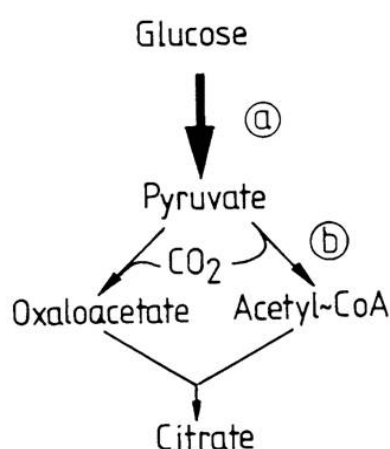


Figura 2.2 Esquema generalizado do fluxo de carbono até citrato em *Aspergillus niger*. (a) via glicolítica; (b) Descarboxilação Oxidativa e Carboxilação do Piruvato; (c) Ciclo de Krebs. (KUBICEK; ROHR,1986).

Segundo Kubicek (1986) o catabolismo das hexoses realizado pelo fungo *A.niger* é dividido em duas fases, uma pela (Ember Meyerhof Parnas) e a outra pela Pentose-Fosfato, sendo que 80% do catabolismo é realizado na fase (Ember Meyerhof Parnas).

O processo cinético de produção apresenta uma fase de crescimento rápido do fungo, e uma segunda fase em que o crescimento diminui e a produção de ácido cítrico é máxima, assim fica caracterizado um processo bifásico (PRATA, 1989). Rohr et al. (1981) e Kubicek e Rohr (1986) concluíram que a produção de ácido cítrico é realizada numa pequena proporção por células em crescimento e, na maior parte, por células em fase estacionária. Duas enzimas chaves foram estudadas em detalhe com relação à fermentação cítrica, que são a aconitase e a isocitrato

desidrogenase. A atividade dessas enzimas diminui para um nível muito baixo com o acúmulo de ácido cítrico. Rohr et al. (1981), Ramakrishanan et al. (1955) e Ramakrishanan e Martin (1955) verificam que a enzima isocitrato desidrogenase é inibida na presença de ácido cítrico e de ferrocianeto. La Neusa (1966), cita que um acréscimo de 20% na concentração de ferro dobra a atividade da aconitase e conseqüentemente diminui em 25% o acúmulo de ácido cítrico. A adição de ferrocianeto de potássio ao meio inibe a atividade da aconitase e a da enzima isocitrato desidrogenase, estimulando assim o acúmulo de ácido cítrico.

2.6 Recuperação do produto

A recuperação do ácido cítrico do meio de fermentação é feita geralmente por precipitação, na forma de sal de cálcio. O micélio é separado por filtração, e o filtrado é submetido a um tratamento com óxido de cálcio (180 a 250 g/L) a pH 7,0 e 90 °C. Em seguida adiciona-se ácido sulfúrico, que resulta na formação de gesso e na liberação do ácido para o meio. Depois de separado o gesso, a solução é tratada com carvão ativo e passada por colunas de troca iônica. Finalizando o processo, procedem-se a concentração e cristalização a vácuo. A separação dos cristais é realizada por peneiramento (KUBUCEK; ROHR, 1986).

A extração por solvente é uma possível alternativa para o método clássico. Porém, o solvente tende a extrair algumas das impurezas contidas em melados – derivados de licores. A vantagem do método de extração por solvente é evitar o uso de ácido sulfúrico e o problema pela contaminação da disposição do gesso gerado (PAZOUKI et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, na cidade de Lorena-SP.

3.1 Matéria-prima

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido a partir de aparas de eucalipto (folhas, galhos e pontas), que permanecem no campo depois da retirada da madeira para a fabricação de papel e celulose, provenientes das plantações da Cia Suzano de Papel e Celulose - São Luís do Paraitinga – SP. Essas aparas foram processadas em picador que fracionou o material até um tamanho de aproximadamente 2 cm x 2 cm x 0,5 cm.

3.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto

O hidrolisado foi obtido pelo processo de hidrólise ácida. Aparas cominuídas de eucalipto foram colocadas em um reator cilíndrico de 50 litros tipo eixo rotativo, impregnados com solução de ácido sulfúrico 0,8%, a qual foi preparada de acordo com o volume de água em relação à massa seca de aparas de eucalipto. O reator foi operado nas seguintes condições: temperatura de 160 °C; tempo de hidrólise de 20 minutos; relação água:materia-seca igual a 3:1. Foram realizadas 10 hidrólises obtendo-se cerca de 22,0 litros de hidrolisado hemicelulósico em cada batelada. Com a finalidade de remover alguns dos compostos tóxicos e aumentar em três vezes o teor inicial de açúcares, o hidrolisado foi concentrado em um evaporador de aço-inox de capacidade para 32 litros, projetado exclusivamente para o processo de concentração do hidrolisado hemicelulósico. O evaporador foi operado nas seguintes condições: temperatura de 66 ± 4 °C, sob vácuo, com volume inicial de 30 L. Após a concentração o hidrolisado foi homogeneizado e armazenado em um único recipiente para o uso em todos os experimentos.

3.3 Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto

O hidrolisado concentrado foi submetido a um tratamento físico-químico para remoção de compostos inibidores do crescimento microbiano. O tratamento baseou-se na variação de pH e na adsorção com carvão ativo (RODRIGUES et. al.,1995)

A elevação do pH até 7,0 foi realizada com óxido de cálcio PA. O hidrolisado permaneceu em repouso por 12 horas, sendo filtrado a seguir para remoção dos precipitados. O pH então foi ajustado para 5,4 com ácido sulfúrico concentrado. Após repouso de 6 horas o hidrolisado foi novamente filtrado com papel de filtro qualitativo. Em seguida foi adicionado carvão ativado (área superficial de 500 a 600 m²/g, densidade aparente de 0,25 a 0,30 g/cm³ e 30 a 35% de partículas retidas em malha 325) na proporção de 9% (p/v) sendo a mistura agitada por 1 hora, à 30 °C. Finalmente o hidrolisado foi filtrado à vácuo, em papel de filtro Klabin (qualitativo), para a remoção do carvão.

3.4. Fungos

Foram avaliadas inicialmente duas linhagens do fungo *Aspergillus niger*: NRRL 334 e 10v10, em fermentação submersa. A linhagem NRRL 334 foi escolhida inicialmente por apresentar os melhores resultados dentre outras linhagens já estudadas em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto Santos e Prata (2001). A linhagem 10v10 foi incluída para efeito comparativo junto a NRRL 334, pois a mesma ainda não havia sido estudada em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. Dentre essas duas linhagens foi escolhida a melhor para ser utilizada no prosseguimento dos trabalhos. As culturas, provenientes do Northern Regional Research Laboratory e da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", respectivamente, foram cultivadas em placas de Petri com agar nutriente (1% glicose, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de carne e 2% de ágar-ágar) à 30 °C por um período de oito dias. Em seguida as culturas foram repicadas e mantidas em ágar inclinado (0,5% de peptona, 0,3% de extrato de carne e 2% de ágar-ágar) sob refrigeração (4 °C).

3.5 Preparo do inóculo

Para ensaios de definição dos metais foi utilizada como inóculo uma suspensão de esporos não germinados, obtida de uma cultura cultivada em ágar inclinado, por um período de sete dias, a 30 °C, foi utilizada como inóculo. Foram adicionados 2,0 mL de uma solução de TWEEN 80 0,8% (v/v) ao tubo contendo a cultura esporulada e, após agitação, o conteúdo foi transferido para outro tubo esterilizado. Este procedimento foi repetido por duas vezes e a suspensão obtida foi agitada vigorosamente para a destruição de aglomerados de esporos. Após contagem de esporos na câmara de Neubauer, foi procedida a diluição da suspensão. Cada frasco de 250 mL foi inoculado com 2,0 mL desta suspensão, de modo a se obter uma concentração inicial de esporos entre 10^6 - 10^7 esporos/mL.

Para as fermentações no reator foi usado inóculo vegetativo na proporção de 10% (v/v). Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50 mL de meio sintético na mesmas proporções de açúcares do hidrolisado hemicelulósico juntamente com os nutrientes citados na Tabela 3.1. Em seguida uma suspensão de esporos contendo cerca de 10^6 – 10^7 esporos/mL, de uma cultura de *A. niger* foi transferida assepticamente para o frasco. O frasco foi incubado em incubadora de movimento circular (New Brunswick Scientific Co., modelo Innova-4000), a uma frequência de agitação de 200 min^{-1} , temperatura de 30 °C. O tempo de incubação do inóculo usado foi de 24, 48 e 72 horas.

3.6 Preparo do meio de fermentação

O meio de fermentação foi preparado suplementando-se o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com os sais descritos na Tabela 3.1. O meio foi estabelecido com 60 g/L de carboidratos iniciais, que foi obtido pela diluição do hidrolisado concentrado e tratado. A esterilização foi realizada em banho-maria fervente por 20 minutos. As fermentações foram realizadas em frascos agitados durante um período de sete dias.

Tabela 3.1 Composição do meio empregado para o processo de fermentação, em relação aos nutrientes.

Componentes	Concentração Final (g/L)
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	2,5
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,25
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,1

pH inicial = 6,0

3.7 Teste da concentração inicial de substrato

A fim de se determinar a influência da concentração inicial de substrato na fermentação cítrica com os açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, definiu-se a concentração inicial de substrato em meio sintético, com 50, 100 e 150 g/L de xilose e glicose, respeitadas as proporções em que estes açúcares se apresentam no hidrolisado em estudo. O meio foi suplementado também com os nutrientes descritos na Tabela 3.1. Em todos os experimentos realizados, a vidraria foi previamente lavada com HCl 1 M e lavada em seguida com água deionizada duas vezes a fim de se remover os metais presentes.

3.8 Estudo dos metais

Foi realizado um planejamento fatorial 2⁴ completo, com o objetivo de determinar os níveis de metais no meio de fermentação que proporcionasse uma melhor produção de ácido cítrico.

Os ensaios iniciais foram conduzidos em sistema descontínuo, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com tampão de algodão hidrofóbico, contendo 50 mL de meio de fermentação composto por hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado e com concentração inicial de 60 g/L de açúcares e suplementado com os nutrientes citados na Tabela 3.1. Os frascos foram incubados em incubadora de movimento circular (New Brunswick Scientific Co., modelo Innova-4000), a uma frequência de agitação de 200 min⁻¹, temperatura de 30 °C, por um período de 7 dias, em pH=6,0.

A Tabela 3.2 mostra os fatores e os níveis das variáveis analisadas. Os valores do nível central correspondem a valores aproximados das condições

adotadas por Sikander et al. (2002) para o íon manganês e por Haq et al. (2002) para o íon cobre. O valor adotado para o íon ferro foi estabelecido pela concentração encontrada no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, portanto o nível inferior adotado no planejamento foi o nível original desse metal no hidrolisado sem suplementação. Já os níveis do composto ferrocianeto de potássio foram estabelecidos de acordo com Prata (1989). A Tabela 3.3 apresenta a matriz de planejamento experimental de fatorial 2^4 , contendo os fatores e níveis codificados.

3.9 Definição do tempo de cultivo do inóculo, da agitação e da aeração.

Os ensaios de tempo de inóculo, agitação e aeração foram realizados em fermentador de bancada, tipo MULTIGEN (Brunswink Sc. Co.), com capacidade útil de 0,6 L, equipado com controlador de temperatura, controlador de pH, agitador e aerador, e medidor de oxigênio dissolvido (Figura 3.1).

Os experimentos foram conduzidos a 30 °C e com pH inicial de 6,0, sendo que o tempo de germinação, a velocidade da turbina e o fluxo de ar foram estudados como fatores do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 3.4). A Tabela 3.5 apresenta a matriz de planejamento experimental fatorial 2^3 , contendo os fatores e níveis codificados. A fermentação foi realizada em sistema descontínuo, utilizando um volume de 0,6 L de meio. O período de fermentação foi estabelecido em 168 horas (SIKANDER et al., 2002; HAQ et al., 2002).

Tabela 3.2 Fatores e níveis do Planejamento fatorial 2^4 .

FATORES	Concentração (ppm)		
	-1*	0*	+1*
MnSO ₄	20	40	60
FeCl ₃ .6H ₂ O	100	200	300
ZnSO ₄	6	12	18
K ₄ Fe(CN) ₆	100	200	300

* Níveis codificados: Nível Superior: +1; Nível inferior: -1; Ponto central: 0.

Tabela 3.3 Matriz de planejamento experimental fatorial 2^4 .

Ensaio	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	K ₄ Fe(CN) ₆
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

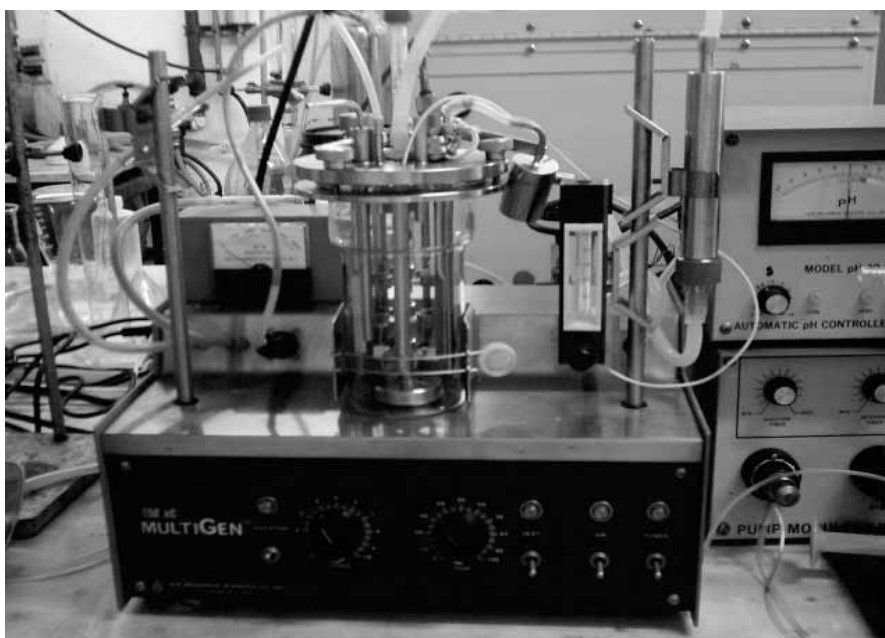


Figura 3.1 Fermentador de bancada, MULTIGEN (Brunswick Sc. Co.)

Tabela 3.4 Fatores e níveis do Planejamento fatorial 2³

FATORES	Valores		
	-1*	0*	+1*
Tempo de germinação (horas)	24	48	72
Agitação (min ⁻¹)	200	300	400
Aeração (vvm)	0,5	1,0	1,5

* Níveis codificados: Nível Superior: +1; Nível inferior: -1; Ponto central: 0.

Tabela 3.5 Matriz de planejamento experimental fatorial 2³.

Ensaio	Tempo de germinação	Agitação	Vazão de ar
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

3.10 Métodos analíticos

As concentrações de D-xilose, D-glicose, L-arabinose, ácido cítrico e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em equipamento da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), usando um detector de índice de refração, coluna Aminex HPX-87H (300x7,8mm) da marca Bio Rad (Hercules, CA) na temperatura de 45 °C. Como eluente foi usado ácido sulfúrico 0,01 N numa vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e volume da amostra de 20 µL.

As concentrações de furfural e HMF foram determinadas também por HPLC usando um detector duplo de absorvância (SPD-10Auv-vis), no comprimento de onda de 276 nm e coluna RP 18 Hewlett-Packard (200 mm), na temperatura de 25 °C, razão acetonitrila/água 1:8, ácido acético 1% (v/v) como eluente a uma vazão

de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume da amostra $20 \mu\text{L}$. Os compostos fenólicos derivados da solubilização da lignina (ácido gálico, vanilina, siringaldeído e cumarina) foram analisados por HPLC (Knauer) usando um detector UV em 280 nm de comprimento de onda, equipado com coluna Hypersil 50 DS, eluente $0,01 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ com $16,67\%$ de metanol e $2,78\%$ de propanol à uma vazão de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. Os compostos fenólicos totais foram determinados utilizando-se os reagentes de Folin e Ciateau. Foi adicionado $0,2 \text{ mL}$ de reagente Folin-Ciateau em 3 mL da amostra diluída. Após rápida agitação em vórtice e repouso de 5 minutos , adicionou-se $0,8 \text{ mL}$ de carbonato de sódio 15% . Após 30 minutos de reação na ausência de luz, o volume total foi transferido para uma cubeta de vidro de $1,0 \text{ cm}$ de percurso ótico. A absorvância da solução resultante foi lida a 760 nm em um espectrofotômetro computadorizado BECKMAN DU 640 B e comparada com uma curva de calibração, previamente preparada usando-se vanilina como padrão. O branco foi obtido substituindo apenas o volume de amostra por igual volume de água destilada, seguida da adição dos mesmos reagentes em idêntico procedimento para análise das amostras. Os metais presentes na água e no hidrolisado foram determinados por espectrometria de absorção atômica por chama, em equipamento PerkinElmer Modelo Analyst 800.

Para os experimentos de fermentação cítrica em biorreator, os açúcares (CRT) foram dosados pelo método colorimétrico de Nelson (1944) e o ácido cítrico foi dosado pelo método colorimétrico de Marier e Boulet (1958).

3.11 Metodologia de análise dos resultados

Para avaliar o processo de produção de ácido cítrico foram dosadas as concentrações de açúcares e de ácido cítrico no meio fermentado. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa Design-Expert 6.0.6 e STATISTICA/w 5.0.

Durante todos os ensaios foram retiradas amostras a fim de determinar as características morfológicas dos micélios formados e verificar sua relação com a capacidade de produção de ácido pelo fungo.

O processo fermentativo, em todos os ensaios, foi avaliado em termos de fator de conversão de substrato em produto, isto é, (g/L) de ácido cítrico formado por (g/L) de açúcar consumido e concentração final de produto no fim das 168 horas de

fermentação. A capacidade de formação de produto pela massa celular foi definida como $Y_{p/x}$, calculado pela razão entre o produto obtido (g/L) e a massa celular formada (g/L).

Para determinação do peso-seco nas fermentação em frascos, todo conteúdo do frasco foi utilizado, já nas fermentações em biorreator foram retirados 5,0 mL do meio de fermentação com pipeta graduada invertida e com ponta serrada de 20 mL. As amostras filtradas a vácuo, em papel de filtro Klabin, sendo que os papéis de filtro foram previamente secados em estufa a 80 °C por duas horas, e a seguir tarados. O Filtrado recolhido foi submetido as análises e o micélio lavado três vezes com volumes de água destilada iguais ao volume do meio, após o que procedeu-se a secagem a 80 °C, até massa constante.

O crescimento do fungo, com relação às características morfológicas do micélio, foi acompanhado por observações microscópicas, empregando-se a técnica de preparação à fresco. Utilizou-se a seguinte convenção para avaliação das características morfológicas:

**Micélio em forma de “pellets” pequenos e resistentes, com hifas curtas, bastante ramificadas e entrelaçadas (desejável);*

***Micélio em forma de “pellets” de tamanhos irregulares bastante ramificadas e entrelaçadas.*

****Micélio em forma de “pellets” de tamanhos grandes e quebrados, ocupando todo o meio de fermentação.*

#Crescimento em forma filamentosa, sem formação de micélio individualizado, ocupando todo o meio de fermentação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Metais da água de processo

A água empregada é fator fundamental a considerar. Avaliou-se a qualidade da água para fins de processo levando-se em consideração os efeitos potencialmente negativos dos metais sobre o rendimento da fermentação cítrica e também como uma forma de comparar com os metais oriundos dos equipamentos empregados. Sendo assim, a água utilizada no processo de obtenção do hidrolisado hemicelulósico foi analisada por espectrometria de absorção atômica por chama a fim de se caracterizar a mesma quanto à composição de alguns metais que influenciam na fermentação cítrica. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Composição parcial dos metais na água (rede de abastecimento) utilizada para a produção do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.

Metal	Concentração (ppm)
Manganês	0,2
Cálcio	5,2
Níquel	0,76
Cromo	nd
Cobalto	nd
Ferro	0,92
Zinco	5,32
Cobre	0,5
Sódio	nd

nd= não detectado

De acordo com os resultados apresentados, os níveis de metais na água de processo estão abaixo da faixa adequada para os metais, sódio e cálcio; 0,1-0,5 g/L. Manganês e ferro também estão também abaixo da faixa esperada de 1,0-3,0 ppm para produção de ácido cítrico em sacarose, segundo Kubicek e Rohr (1986). Segundo Hag et al. (2002), o cobre estando numa concentração de até 4,7 mg/100 g de melaço ajuda a diminuir o efeito negativo do ferro nas fermentações cítricas, sendo assim a concentração do mesmo apresenta valores inferiores ao citado.

4.2 Caracterização parcial e tratamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto

As aparas de eucalipto utilizadas para o preparo do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto apresentavam umidade em torno de 10% antes do procedimento de hidrólise. O hidrolisado foi obtido por hidrólise ácida e sua composição parcial é mostrada na Tabela 4.2.

A hidrólise ácida das aparas de eucalipto forneceu um hidrolisado composto principalmente por açúcares (74,14% de xilose, 3,73% de glicose e 4,7% de arabinose) e ácido acético (15,87%). Foram também detectados metais em níveis superiores aos presentes na água, o que pode ser decorrente do reator de hidrólise. A decomposição da xilose e da glicose durante o processo de hidrólise conduziu à formação de compostos inibidores da atividade fermentativa, como o furfural e hidroximetilfurfural (DOMINGUEZ et al., 1996). Outro potente inibidor, o ácido acético, foi produzido pela ruptura dos grupos acetil da fração hemicelulósica das aparas de eucalipto (LEE; McCASKEY, 1983).

Tabela 4.2 Composição parcial do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto original.

Composto	Concentração	Composto	Concentração
Xilose*	39,55	Manganês**	109,8
Glicose*	1,99	Cálcio**	240,2
Arabinose*	2,53	Níquel**	28,3
Ácido acético*	8,47	Cromo**	29,2
Fenóis totais**	841,2	Cobalto**	0,5
Furfural**	158,4	Ferro**	200,8
5-HMF**	61,5	Zinco**	15,4
Ácido Gálico**	34,8	Cobre**	0,3
Siringaldeido**	118,5	Sódio**	nd
Vanilina**	523,0	Potássio**	887,6
Cumarina**	3,0	Alumínio**	47,8

nd= não detectado *g.L⁻¹ **ppm **pH=0,98**

A Tabela 4.3 mostra as concentrações de açúcares fermentescíveis, assim como dos compostos inibidores do crescimento celular, presentes no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto sem concentrar, concentrado três vezes. Baixas concentrações de furfural e hidroximetilfurfural assim como ácido gálico, siringaldeido, vanilina e cumarina também podem ser encontrados no hidrolisado.

A concentração do ácido acético no hidrolisado pode variar consideravelmente em função do tipo de material lignocelulósico utilizado e das condições de hidrólise empregadas (RODRIGUES et al., 1995).

Pode-se observar que houve aumento de todas as concentrações de metais, com exceção do cálcio, quando o hidrolisado foi concentrado no evaporador de aço-inox. Na mesma tabela é também apresentada a composição do hidrolisado concentrado e que foi tratado com óxido de cálcio e carvão ativo, como descrito na metodologia. Rodrigues et. al. (1995), descreveram um tratamento para controle de metais de matérias primas impuras. O tratamento foi desenvolvido para possibilitar a fermentação de hidrolisados ácidos de madeira, e consiste da eliminação principalmente de íons ferro e cobre, por precipitação com óxido de cálcio.

Tabela 4.3 Composição parcial do hidrolisado sem concentrar (HE), concentrado antes (HE 3X) e depois do tratamento físico-químico (HE 3X Trat.).

Composto	HE	HE 3X	HE 3X Trat.
Xilose*	39,55	122,5	109,2
Glicose*	1,99	6,987	6,36
Arabinose*	2,53	4,319	2,98
Ácido acético*	8,47	1,288	0,57
Fenóis totais**	841,2	352,0	56,0
Furfural**	158,4	52,3	25,0
5-HMF**	61,5	92,0	nd
Ácido Gálico**	34,8	95,0	nd
Siringaldeido**	118,5	273,0	58,0
Vanilina**	523,0	58,0	nd
Cumarina**	3,0	Nd	nd
Manganês**	109,8	308,4	42,5
Cálcio**	240,2	199,0	430,1
Níquel**	28,3	96,4	19,3
Cromo**	29,2	173,1	52,4
Cobalto**	0,5	2,8	1,2
Ferro**	200,8	583,4	203,0
Zinco**	15,4	17,4	12,3
Cobre**	0,3	3,9	1,8
Sódio**	nd	36,6	10,2

nd= não detectado

* g/L

**ppm

Na Tabela 4.3 observa-se também uma tendência de aumento proporcional no teor dos açúcares glicose, xilose e arabinose, em relação ao fator de concentração do hidrolisado. O mesmo comportamento não foi observado para o

ácido acético, constatando-se uma diminuição em sua concentração quando o hidrolisado foi concentrado 3 vezes. A diminuição do teor de ácido acético pode ser atribuída à sua volatilização nas condições empregadas para a concentração do hidrolisado (temperatura 66 ± 4 °C e vácuo). O ponto de ebulição do ácido acético à pressão atmosférica é de 118,1 °C, sendo reduzido para 63 °C quando a pressão passa para 100 mmHg (vácuo). A temperatura de 66 °C foi determinada a fim de evitar a degradação dos açúcares durante a evaporação.

Nota-se também que existe uma relação próxima a 19/1 entre xilose e glicose nos hidrolisados original e concentrado. Segundo Pfeifer et al. (1996), a glicose presente no meio em baixas concentrações pode favorecer a velocidade de consumo de xilose tornando o hidrolisado de eucalipto um ótimo meio para produção de ácido cítrico.

A diminuição do pH do hidrolisado após a etapa de concentração pode ser atribuída ao incremento da concentração de ions H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise, conforme citado por Corrêa et al. (1995). Também pode-se observar pela Tabela 4.3 o aumento na concentração de todos os metais, com exceção ao cálcio, evidenciando a influência do evaporador, que é constituído de aço-inox. Em $pH=0,98$ o ácido acético é bastante volátil e conseqüentemente o hidrolisado hemicelulósico concentrado três vezes apresentou uma redução de 97,75% de ácido acético. As concentrações de ácido gálico, siringaldeído, vanilina e cumarina, decresceram depois do tratamento com carvão ativo, sendo que os compostos fenólicos totais apresentaram decréscimo de 84,10%, aproximadamente.

Com o tratamento, aproximadamente 50% do furfural presente no hidrolisado hemicelulósico concentrado foi removido, enquanto que o hidroximetilfurfural não foi detectado no hidrolisado concentrado e tratado, demonstrando-se que com a adição de carvão ativo sua remoção é facilitada.

A Figura 4.1 apresenta uma comparação da remoção dos compostos tóxicos e dos metais presentes no hidrolisado depois do tratamento físico-químico e com carvão ativado. Nela pode-se observar de forma mais clara a diminuição da concentração de quase todos os metais, com exceção do cálcio. O aumento do cálcio é explicado pelo fato do tratamento físico-químico utilizar óxido de cálcio para elevar o pH do hidrolisado.

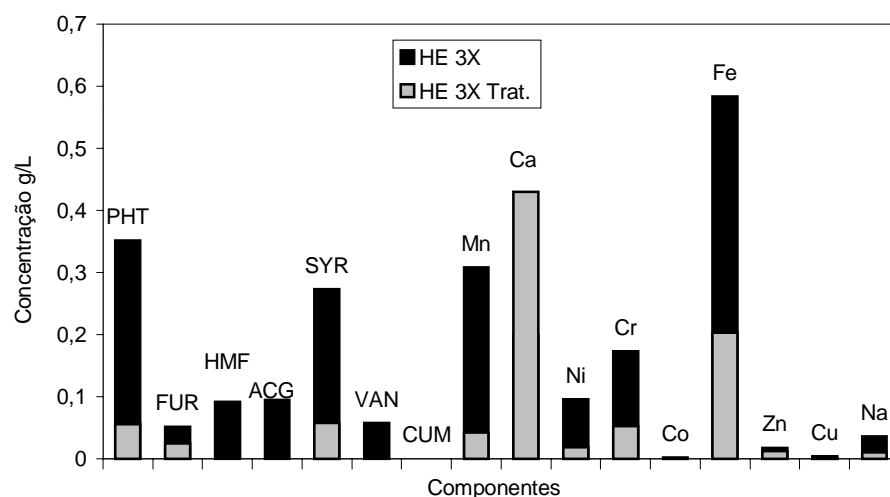


Figura 4.1 Gráfico comparativo das composições do hidrolisado concentrado depois do tratamento físico-químico; PHT= Fenóis totais; FUR=Furfural; HMF=Hidroximetilfurfural; ACG=Acido gálico; SYR=Siringaldeido; CUM=Cumarina; Mn=Manganês; Ca=Cálcio; Ni=Níquel; Cr=Cromo; Co=Cobalto; Fe=Ferro; Zn=Zinco; Cu=Cobre; Na=Sódio.

Na fermentação cítrica o controle de metais é indispensável. Em relação à água, os níveis de todos os metais determinados no hidrolisado hemicelulósico foram nitidamente superiores. Manganês, cálcio e ferro tiveram aumento em suas concentrações bem mais acentuado. “Os íons metálicos bivalentes como zinco, cobre, manganês podem apresentar influência positiva na produção de ácido cítrico por *A. niger*” (ROUKAS; KOTZEKIDOU, 1987). Quando esses elementos-traços limitam o crescimento, forma-se grande quantidade de ácido cítrico (HORITSU, 1977).

Outro elemento-traço importante é o íon cobre, cuja presença é muito importante na formação dos *pellets*, favorecendo a fisiologia celular para formação de ácido cítrico. Sulfato de cobre reduz a concentração de Fe^{3+} formando complexos que precipitam durante o curso da fermentação (HAQ et al., 2002). Os efeitos dos íons zinco e magnésio também são importantes, o íon zinco não pode estar em altas concentrações, pois o mesmo favorece o crescimento celular e não o acúmulo de ácido cítrico (WOLD; SUZUKI, 1976).

As concentrações de alguns íons metálicos encontrados no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado e depois diluído não são consideradas por Walisch et. al. (1983), como inibidores de crescimento microbiano. Entretanto, para a fermentação cítrica alguns metais, principalmente o ferro, apresentam considerável influência na produtividade e, portanto, devem ser bem avaliados. Segundo Grewal

et al. (1995), a concentração do íon Fe^{3+} acima de 0,2 ppm tem efeito negativo na produção de ácido cítrico por *A. Niger* em melaço de cana, necessitando assim adicionar sulfato de cobre ao meio para neutralização do ferro em excesso. O ferrocianeto de potássio foi empregado nas etapas posteriores ao estudo de fermentação cítrica para controlar o nível de ferro em excesso no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado. Ferrocianeto de potássio é comumente utilizado no tratamento de matérias-primas para fermentações cítricas, segundo Kubicek e Rohr (1986). Segundo esses mesmos autores sua ação se caracteriza principalmente pela complexação com os metais pesados que normalmente contaminam os substratos impuros, evitando assim a ação inibidora desses metais. Conforme também observado por Clark et al. (1966), concentrações de ferrocianeto de potássio acima de 30 ppm inibem o crescimento de *A. niger* em melaços de beterraba, afetando a capacidade de produção de ácido cítrico pelo fungo. Estes autores mostraram que a formação de complexos de ferrocianeto envolve a participação de dois ou mais cátions.

4.3 Seleção do fungo

Verificou-se em estudos anteriores que as duas linhagens de *Aspergillus niger* desenvolveram-se normalmente em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, mas sem acúmulo de ácido cítrico no meio (SANTOS; PRATA, 2001). Estudando agora a nova linhagem 10v10 foi constatada uma diferença nas quantidades de ácido cítrico produzidas pelas duas linhagens (Tabela 4.4).

Nas mesmas condições de fermentação as duas linhagens apresentaram crescimento na forma de “pellets”, sendo que o *Aspergillus niger* 10v10, em razão da maior quantidade de produto acumulado no meio, foi selecionado para estudos posteriores. Os diferentes resultados mostram a necessidade de se proceder à seleção de linhagens especiais, especialmente fungos selvagens nacionais, seleção esta que deverá ser realizada futuramente.

4.4 Efeito da concentração de açúcares

A fim de se determinar a concentração inicial de açúcares adequada para a fermentação cítrica, foram realizados ensaios com diversas concentrações de

açúcares utilizando-se duas linhagens de *Aspergillus niger*. Esses ensaios foram realizados em meio sintético respeitando-se as proporções dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto na proporção próxima a 19/1 de xilose e glicose (Figura 4.2).

Foi constatada uma considerável diferença na quantidade de ácido cítrico produzida pelas duas linhagens de *Aspergillus niger* estudadas (Tabela 4.4).

O valor de 7,55 g/L de ácido cítrico obtido com a linhagem *Aspergillus niger* 10v10 foi baixo em relação aos valores encontrados em literatura para fermentações industriais e meios sintéticos. Nesses casos, as concentrações de açúcares utilizadas foram superiores a 100 g/L. Jernejc et al. (1982) encontraram um ótimo de 140 g/L de sacarose para fermentação cítrica em meio sintético que resultou numa produção de 85 g/L de ácido cítrico. Entretanto, Maddox et al. (1985) apresentaram resultados parecidos em fermentação em meio sintético utilizando misturas binárias de açúcares (50 g/L de xilose + 50 g/L de glicose), na qual apresentou $Y_{p/s}=0,37$, sendo que o fungo utilizou 48 g de glicose e apenas 13 g de xilose, num tempo de fermentação de 14 dias.



Figura 4.2 Fermentação cítrica em “shaker” utilizando *Aspergillus niger* 10v10 e NRRL 334 em diferentes concentrações de açúcares.

Nos resultados apresentados também na Tabela 4.4 verifica-se um maior consumo de xilose devido à baixa concentração de glicose no meio de fermentação, por parte da linhagem 10v10. Outro ponto a se destacar nestes resultados é o tempo

de fermentação que durou sete dias e com consumo abaixo de 50% dos açúcares, mostrando que o tempo de fermentação poderia ter sido estendido.

Tabela 4.4. Produção de ácido cítrico e glicerol, crescimento e consumo de substrato por duas linhagens de *Aspergillus niger*, em meio sintético com proporções de xilose e glicose idênticas à do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.

Açúcares iniciais Xilose/Glicose(g/L)	Linhagem	A. cítrico (g/L)	Massa-seca (g/L)	Açúcar consumido Xilose/Glicose(g/L)	Glicerol (g/L)
(46,95/2,47)	10v10	7,55	5,44	18,6/2,47	-
	NRRL 334	4,03	3,68	16,79/2,47	-
(93,71/4,93)	10v10	3,39	7,78	37,24/4,52	0,297
	NRRL 334	4,94	7,71	48,22/4,93	0,189
(140,8/7,37)	10v10	1,35	8,73	22,11/6,29	0,232
	NRRL 334	1,32	3,84	12,84/5,26	0,328

Testes em duplicatas por um período de sete dias de fermentação.

Na Tabela 4.5 estão apresentados os fatores de conversão relativos aos ensaios para teste da influência da concentração inicial de substrato. Pode-se observar que, além da maior concentração de ácido cítrico obtida pela linhagem 10v10, com concentração de açúcares iniciais próximas a 50 g/L, o valor de Y_p/s para este caso também foi o maior. A maior capacidade de produção desta linhagem é confirmada pelo maior valor de Y_p/x .

Tabela 4.5 Parâmetros da fermentação cítrica, obtidos por duas linhagens de *Aspergillus niger*, em meio sintético com proporções de xilose e glicose idênticas à do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.

Açúcares totais iniciais (g/L)	Linhagem	Y_p/s	Y_x/s g/g	Y_p/x g/g
49,43	10v10	0,36	0,26	1,39
	NRRL 334	0,21	0,19	1,09
98,66	10v10	0,08	0,18	0,43
	NRRL 334	0,09	0,14	0,64
148,24	10v10	0,04	0,30	0,15
	NRRL 334	0,07	0,21	0,34

Apesar dos fungos apresentarem a morfologia que é considerada adequada nestes ensaios, o crescimento foi relativamente alto durante as fermentações, sugerindo a necessidade de se testar o ferrocianeto de potássio juntamente com os metais, utilizando o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.

Segundo Horitsu e Clark (1966) o ferrocianeto de potássio controla o crescimento de *Aspergillus niger* em fermentações de melaços, alterando sua capacidade de produção de ácido cítrico. Portanto, devido ao crescimento excessivo nesta etapa e objetivando determinar a melhor concentração de ferrocianeto de potássio, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 , na qual foi testado o nível de três tipos de metais e do ferrocianeto de potássio para a fermentação cítrica, utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.

4.5 Efeito dos metais e do ferrocianeto de potássio

A produção de ácido cítrico é influenciada pela presença de metais pesados, que constitui um dos aspectos mais amplamente discutidos e estudados na literatura. Na maioria dos trabalhos é citado o controle dos íons ferro, cobre, zinco e manganês e a importância de cada um para o processo. Rohr (1998), cita em seu trabalho os efeitos negativos na fermentação cítrica por *Aspergillus niger* em melaço de cana, no qual o máximo permitido seria 80 ppm de cálcio, 3,0 ppm de cobre, 100 ppm de ferro, 0,1 ppm de níquel, 5,0 ppm de zinco e 1,0 ppm de manganês.

Uma vez que os resultados obtidos com os níveis dos metais presentes no hidrolisado hemicelulósico tratado (Tabela 4.3) não foram satisfatórios, avaliou-se o efeito dos íons ferro (Fe^{3+}), manganês (Mn^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), assim como o ferrocianeto de potássio, sobre a fermentação cítrica no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado e diluído para um nível de CRT de 60 g/L. Utilizou-se os sais dos respectivos metais no meio de fermentação, de acordo com a Tabela 3.2. De acordo com Clark e Ito (1965) aproximadamente 30 - 35% do cálcio e 93-98% de cobre, ferro, manganês e zinco são precipitados no tratamento com ferrocianeto.

Na Tabela 4.6 são apresentadas as características morfológicas desenvolvidas pelo fungo *A. niger* 10v10 em frascos, assim como a massa celular e o fator de conversão durante os ensaios com os metais, ferro, manganês, zinco e com o ferrocianeto de potássio em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado.

O efeito mais marcante sobre os parâmetros avaliados foi observado quando não houve adição de metal ao meio de fermentação (ensaio 1 - Tabela 4.6), o qual correspondeu ao hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado e suplementado com os nutrientes descritos na Tabela 3.1 juntamente com

ferrocianeto de potássio na concentração de 100 ppm. Esse resultado mostra que o hidrolisado depois de tratado e diluído apresenta os íons ferro, manganês e zinco em níveis apropriados para a produção de ácido cítrico, sem a necessidade de adição dos mesmos. Já o ferrocianeto de potássio apresentou nítida influência no controle de crescimento do fungo durante seu desenvolvimento em frascos, o que foi evidenciado pela média de valores de massa seca conforme os ensaios de 1 a 8 e de 9 a 16, 9,0 g/L e 7,48 g/L, respectivamente. Também foi observado o efeito do zinco em conjunto com o ferrocianeto de potássio, que evidencia o crescimento na forma filamentosa, observado nos ensaios 13, 14 e 15. Segundo Grewal et. al. (1995), o excesso de zinco durante a fermentação cítrica por *A. niger* leva o consumo de substrato para a fase de crescimento com diminuição do acúmulo de ácido cítrico.

Tabela 4.6 Parâmetros de fermentação cítrica, obtidos por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado e suplementado com diferentes metais e ferrocianeto de potássio, a 30 °C e agitação de 200 rpm em frascos.

Ensaio	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	K ₄ Fe(CN) ₆	Ácido cítrico g/L	Massa-seca g/g	Yp/s g/g	Morfologia
1	-1	-1	-1	-1	3,33	8,33	0,29	*
2	1	-1	-1	-1	1,28	9,86	0,13	**
3	-1	1	-1	-1	2,55	7,65	0,25	*
4	1	1	-1	-1	1,12	8,67	0,19	#
5	-1	-1	1	-1	2,88	7,21	0,22	*
6	1	-1	1	-1	0,55	10,88	0,12	#
7	-1	1	1	-1	3,11	7,29	0,26	*
8	1	1	1	-1	1,13	12,11	0,17	**
9	-1	-1	-1	1	1,25	6,34	0,09	**
10	1	-1	-1	1	0,95	8,78	0,11	**
11	-1	1	-1	1	2,55	6,25	0,24	*
12	1	1	-1	1	0,44	9,76	0,12	***
13	-1	-1	1	1	2,21	8,16	0,20	#
14	1	-1	1	1	0,33	3,48	0,06	#
15	-1	1	1	1	1,05	7,21	0,12	#
16	1	1	1	1	1,51	9,86	0,15	***
17	0	0	0	0	2,47	7,56	0,16	**
18	0	0	0	0	2,01	7,89	0,13	**
19	0	0	0	0	1,96	8,15	0,15	***

As características morfológicas observadas aparentemente não foram resultantes da atuação do ferrocianeto de potássio no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, mas sim do ferro. Clark et al. (1966) observaram que o crescimento na forma filamentosa está diretamente relacionado com a presença de manganês no meio de fermentação, em níveis superiores a 2,0 ppb e que esse tipo de crescimento não é favorável para um bom rendimento em fermentações cítricas em meio sintético. Kisser et al. (1980) observaram ainda uma relação direta entre a deficiência de manganês e o crescimento de *Aspergillus niger* em forma de “pellets” com hifas curtas e ramificadas, ideais segundo o autor para produção de ácido cítrico. Assim, ao contrário do relato de Kisser et al. (1980), o crescimento em forma filamentosa não foi relacionado diretamente pela presença de manganês neste trabalho.

Os resultados obtidos com os meios 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 mostram baixos valores de conversão de substrato em produto, resultado que pode ser consequência de um possível excesso de ferro adicionado ao meio de fermentação conforme observado por Kubicek e Rohr (1986). Neste caso, tais resultados estão relacionados com o crescimento na forma filamentosa, conforme discutido anteriormente.

O efeito dos metais pesados sobre a produção de ácido cítrico, observado no presente trabalho, indica ainda que o tratamento a que foi submetido o hidrolisado foi suficiente para reduzir seus respectivos teores, a níveis tais que ao diluir o hidrolisado hemicelulósico tratado, não há necessidade de uma posterior suplementação, obtendo-se assim um balanço adequado entre os mesmos capaz de proporcionar o melhor resultado comparado com os outros ensaios em que houve suplementação. O ferrocianeto de potássio parece ser necessário, mas seu excesso não é adequado já que o mesmo parece apresentar efeito negativo sobre o crescimento do fungo e sobre o rendimento da fermentação (Tabela 4.6). Durante a análise estatística o modelo encontrado propõe utilizá-lo no seu menor nível para atingir resultados mais satisfatórios.

Com o objetivo de avaliar a influência dos metais ferro, manganês e zinco e também do ferrocianeto de potássio sobre a produção de ácido cítrico em fermentação submersa em frascos, utilizou-se um planejamento fatorial 2^4 completo com três pontos centrais. Na Tabela 4.6 está apresentada a matriz de planejamento utilizada, contendo os fatores, níveis codificados e os resultados obtidos em termos de concentração final de ácido cítrico, crescimento e fator de conversão de substrato em produtos e morfologia. Os maiores valores foram obtidos nos ensaios 1, 5 e 7.

Os resultados dos ensaios apresentados na Tabela 4.6 foram analisados estatisticamente e utilizados para estimar os efeitos principais e os efeitos de interação sobre a resposta de interesse que foi a concentração final de ácido cítrico, com 168 horas de fermentação. A estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “Student” e análise de variância para o parâmetro concentração final de ácido cítrico, segundo o planejamento fatorial 2^4 completo, estão apresentados na Tabela 4.7 e 4.8, respectivamente.

Observa-se pela tabela de estimativas dos efeitos, que íon ferro e o composto ferrocianeto de potássio foram significativos ao nível de 5% de probabilidade e que a interação entre ambos os efeitos foi significativo ao nível de 10% de probabilidade, devido ao fato dos valores de t calculados serem superiores aos valores de t tabelados.

Na Tabela 4.8 observa-se também que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 90%, indicando que o modelo ajusta-se na faixa dos dados experimentais utilizados.

Tabela 4.7 Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2^4 completo.

Efeitos	Estimativa	Erros-Padrão	t(2)
Média	1,72	$\pm 0,0645$	26,66
Fe	-1,4525	$\pm 0,1406$	-10,334*
Mn	0,085	$\pm 0,1406$	0,60
Zn	-0,0875	$\pm 0,1406$	-0,62
K4Fe(CN)6	-0,7075	$\pm 0,1406$	-5,03*
Fe x Mn	0,1875	$\pm 0,1406$	1,33
Fe x Zn	0,02	$\pm 0,1406$	0,14
Fe x K4Fe(CN)6	0,495	$\pm 0,1406$	3,52**
Mn x Zn	0,1225	$\pm 0,1406$	0,87
Mn x K4Fe(CN)6	0,1175	$\pm 0,1406$	0,83
Zn x K4Fe(CN)6	0,065	$\pm 0,1406$	0,46

* :significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($t \geq 4,303$).

** : significativo ao nível de 10% de probabilidade ($t \geq 2,9$)

Tabela 4.8– Análise de variância dos efeitos para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2^4 completo.

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
Fe**	8,439	1	8,439	106,78	0,0092
Mn	0,029	1	0,029	0,37	0,6068
Zn	0,031	1	0,031	0,39	0,5971
K4Fe(CN)6**	2,002	1	2,002	25,33	0,0373
Fe x Mn	0,141	1	0,141	1,78	0,3138
Fe x Zn	0,002	1	0,002	0,02	0,8999
Fe x K4Fe(CN)6*	0,980	1	0,980	12,40	0,0720
Mn x Zn	0,060	1	0,060	0,76	0,4754
Mn x K4Fe(CN)6	0,055	1	0,055	0,70	0,4912
Zn x K4Fe(CN)6	0,017	1	0,017	0,21	0,6892
Falta de ajuste	3,426	6	0,571	7,23	0,1265
Erro-puro	0,158	2	0,079		
Total	15,340	18			

* :significativo ao nível de 5 % de probabilidade. $R^2 = 0,766$

** : significativo ao nível de 10% de probabilidade.

Uma vez que a análise de variância indicou fatores que não tiveram influência significativa sobre o parâmetro estudado, foi realizada uma nova análise estatística, desprezando-se agora os fatores não significativos, cuja estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “Student” e análise de variância são apresentados na Tabela 4.9 e 4.10. Observa-se pela estimativa dos efeitos, que o metal ferro e o composto ferrocianeto de potássio foram significativos ao nível de 5% de probabilidade e as interações entre ambos foram significativas ao nível de 10% de probabilidade, uma vez que os valores calculados de t para estes efeitos continuaram sendo superiores aos valores de t tabelados. Também pode ser visto que a falta de ajuste não foi significativa, indicando que o modelo ajusta-se à faixa dos dados experimentais utilizados.

Tabela 4.9 - Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2^2 completo.

Efeitos	Estimativa	Erros-padrão	t(2)
Média	1,72	0,0645	26,67
Fe	-1,4525	0,1406	-10,33**
K4Fe(CN)6	-0,7075	0,1406	-5,03**
Fe x K4Fe(CN)6	0,495	0,1406	3,52*

* :significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($t \geq 4,303$).

** : significativo ao nível de 10% de probabilidade ($t \geq 2,92$).

Tabela 4.10 - Análise de variância dos efeitos para o parâmetro concentração final de ácido cítrico conduzidos em frascos, segundo o planejamento fatorial 2² completo.

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
Fe*	8,439	1	8,439	106,78	0,0092
K4Fe(CN)6*	2,002	1	2,002	25,33	0,0373
Fe x K4Fe(CN)6**	0,980	1	0,980	12,40	0,0720
Falta de ajuste	3,760	13	0,289	3,66	0,2348
Erro-puro	0,158	2	0,079		
Total	15,340	18			

* :significativo ao nível de 5 % de probabilidade. $R^2 = 0,744$

** : significativo ao nível de 10% de probabilidade.

Os resultados apresentados na análise estatística indicam que, quando na fermentação cítrica em frasco for utilizado o menor nível do metal ferro e o menor nível do composto ferrocianeto de potássio maior será a excreção de ácido cítrico pelo fungo durante o processo fermentativo, salientando que o menor nível estudado do metal ferro é o correspondente à concentração presente no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado original.

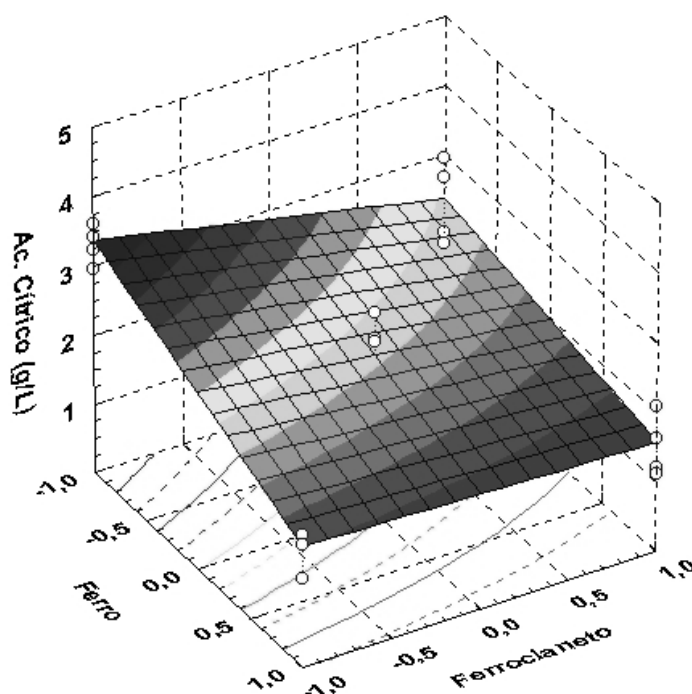


Figura 4.3 Superfície de resposta e curvas de nível que representa a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em fermentação submersa (em frascos) de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado.

Para o composto ferrocianeto de potássio foi observado que quanto mais se aproxima do nível inferior, melhor para a produção de ácido cítrico. Na figura 4.3 é possível observar o efeito do metal ferro e do composto ferrocianeto na produção de ácido cítrico pelo fungo.

Com base nos resultados obtidos na análise estatística da influência dos metais (ferro, manganês e zinco) e do ferrocianeto de potássio sobre a produção de ácido cítrico, estabeleceu-se a não suplementação do meio com ferro para fermentação em biorreator. Também foi estabelecida a adição de 100 ppm de ferrocianeto de potássio ao meio, isto é, o menor nível apresentado pelo modelo. Como se observa na análise estatística, o modelo propõe utilizar uma quantidade menor de ferrocianeto de potássio, mas vale lembrar que o mesmo parece ser fundamental para controlar o crescimento do fungo (Tabela 4.6).

4.6 Avaliação dos efeitos da agitação, da aeração e do tempo de cultivo do inóculo

Em fermentação submersa a agitação é necessária para uma boa transferência de massa e calor. Forças mecânicas resultantes da rotação das turbinas afetam consideravelmente fungos filamentosos na maioria dos casos, causando diferentes formas de crescimento e formação de produtos. Ujcová et al. (1980) estudaram o comportamento de três linhagens de *Aspergillus niger* durante a produção de ácido cítrico quando submetidas a diferentes tensões de cisalhamento e observaram que em agitações mais elevadas ocorre o rompimento dos “pellets” resultando em filamentos mais curtos e ramificados, e em relação à produtividade, a mesma é melhorada quando dentro de uma faixa de agitação elevada.

O acompanhamento da fermentação em diferentes valores de agitação e aeração e tempo de inóculo possibilitaram o estudo da cinética do processo e a influência desses fatores sobre a produção de ácido cítrico, por *Aspergillus niger* 10v10, no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, em biorreator em sistema descontínuo, conforme apresentado na Tabela 4.11 e nas Figuras 4.4 à 4.12. Na Tabela 4.11 são apresentados os parâmetros cinéticos da fermentação cítrica calculados para cada ensaio realizado.

Com relação à produção de ácido cítrico, observa-se que a produção foi favorecida com o aumento da agitação, da aeração e do tempo de cultivo do inóculo, conforme pode ser observado no ensaio 8 (Tabela 4.11) e (Figura 4.11).

Pode-se observar, pelos resultados apresentados na Tabela 4.11 que os maiores valores de fator de conversão (Y_p/s) foram obtidos com a agitação e a aeração mais elevadas assim como a capacidade de formação de produto pelas células (Y_p/x). Foi observado também que depois de 168 horas de fermentação, 40% dos açúcares, em média, não haviam sido utilizados. Maddox et al. (1985) apresentaram resultados semelhantes utilizando *Aspergillus niger* em meio sintético, com consumo de 61% de uma mistura binária de xilose e glicose em 14 dias de fermentação em frascos.

Tabela 4.11. Parâmetros dos ensaios do planejamento para fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo, obtidos por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto e suplementados com 100 ppm de ferrocianeto de potássio, a 30 °C.

Ensaio	Ac. Cítrico g/L	Peso-seco g/L	$Y_{x/s}$ g/g	$Y_{p/x}$ g/g	$Y_{p/s}$ g/g
1	5,89	10,39	0,306	0,551	0,169
2	6,88	12,65	0,351	0,527	0,185
3	7,96	11,88	0,322	0,656	0,211
4	9,55	12,87	0,348	0,742	0,258
5	11,56	10,88	0,312	1,054	0,329
6	10,81	12,34	0,336	0,871	0,293
7	13,25	9,62	0,279	1,365	0,382
8	14,28	10,31	0,272	1,406	0,384
9	12,89	9,46	0,261	1,369	0,358
10	13,85	10,05	0,266	1,393	0,371
11	12,03	9,59	0,268	1,261	0,338

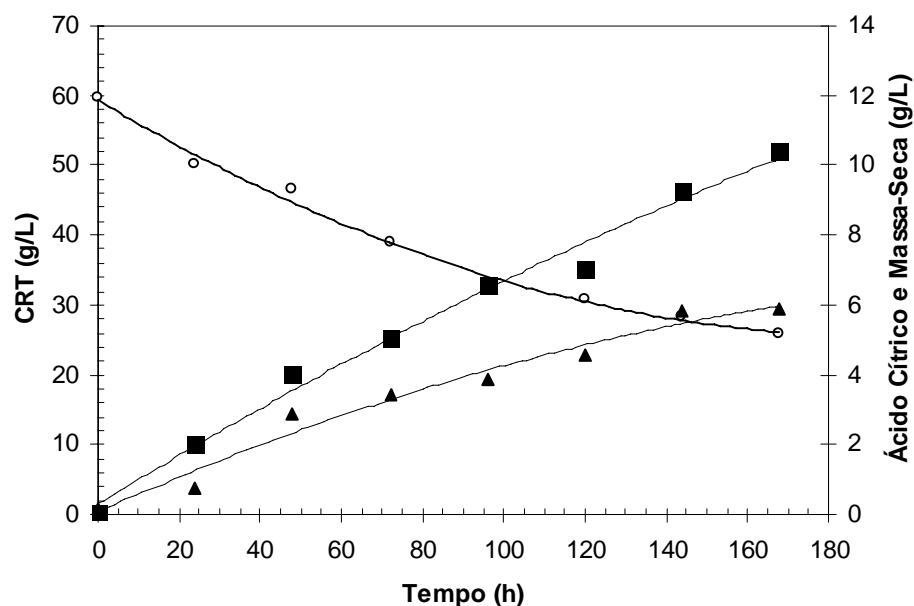


Figura 4.4 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 200 rpm, vazão de ar de 0,5 vvm e tempo de germinação de 24 horas (ensaio 1).

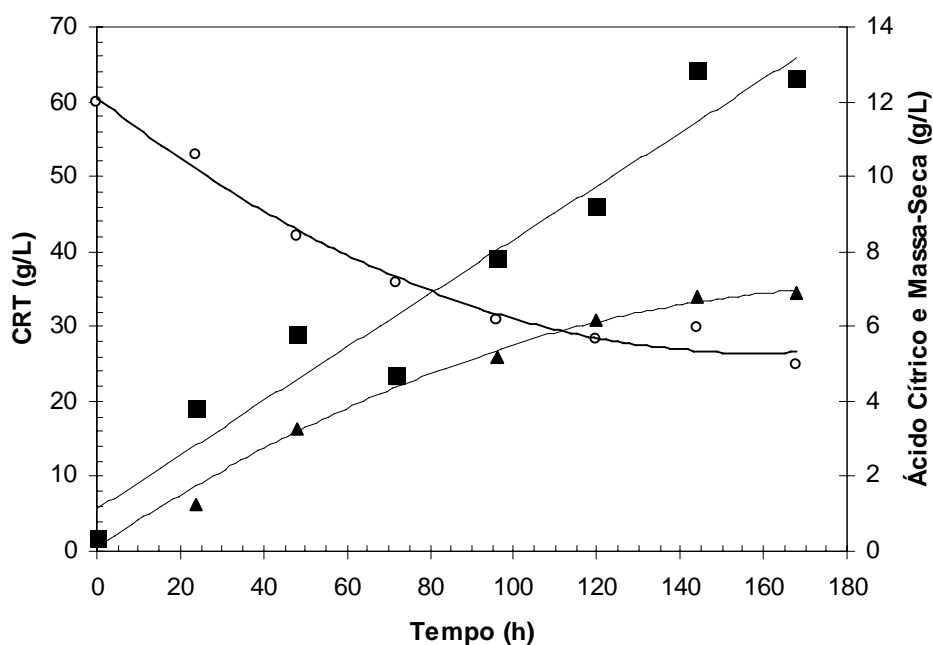


Figura 4.5 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 200 rpm, vazão de ar de 0,5 vvm e tempo de germinação de 72 horas (ensaio 2).

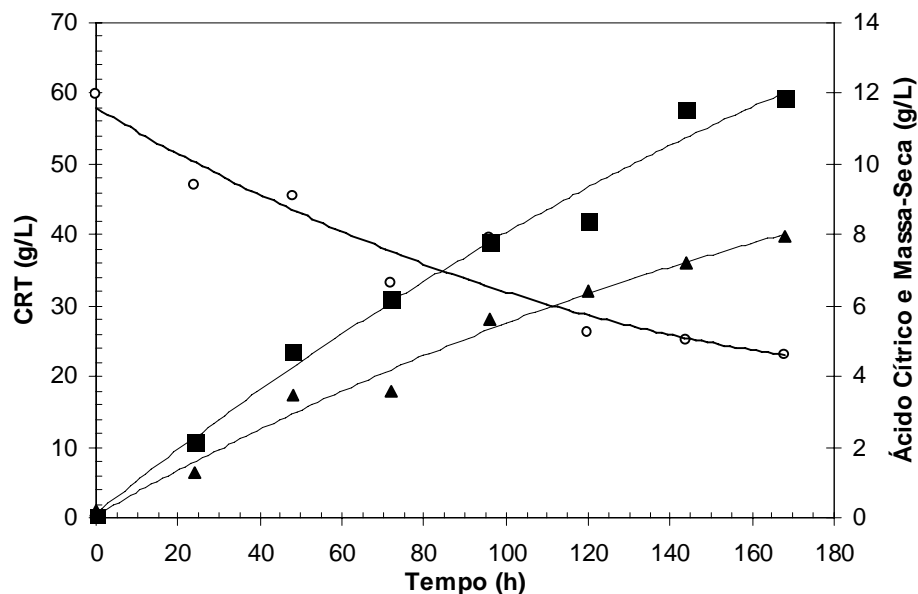


Figura 4.6 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 400 rpm, vazão de ar de 0,5 vvm e tempo de germinação de 24 horas (ensaio 3).

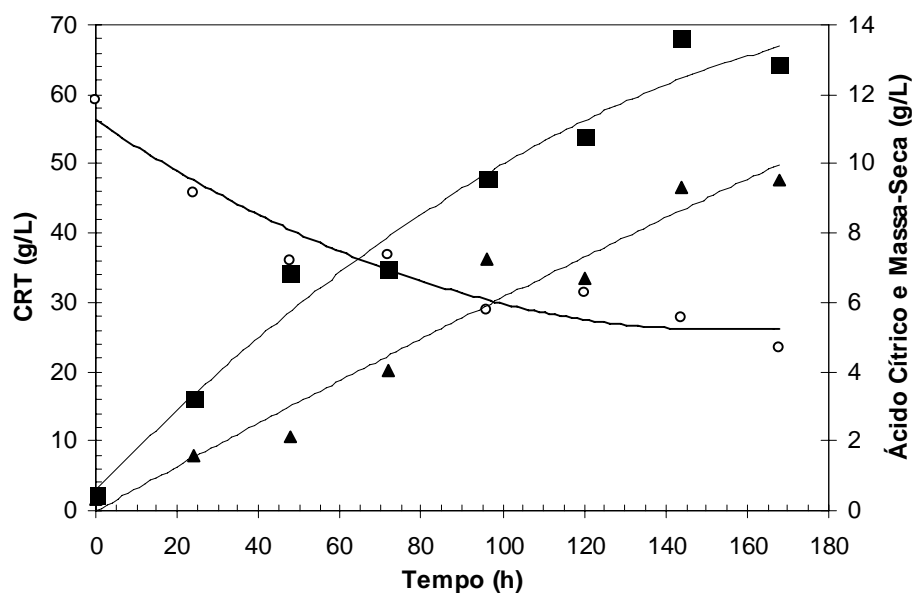


Figura 4.7 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 400 rpm, vazão de ar de 0,5 vvm e tempo de germinação de 72 horas (ensaio 4).

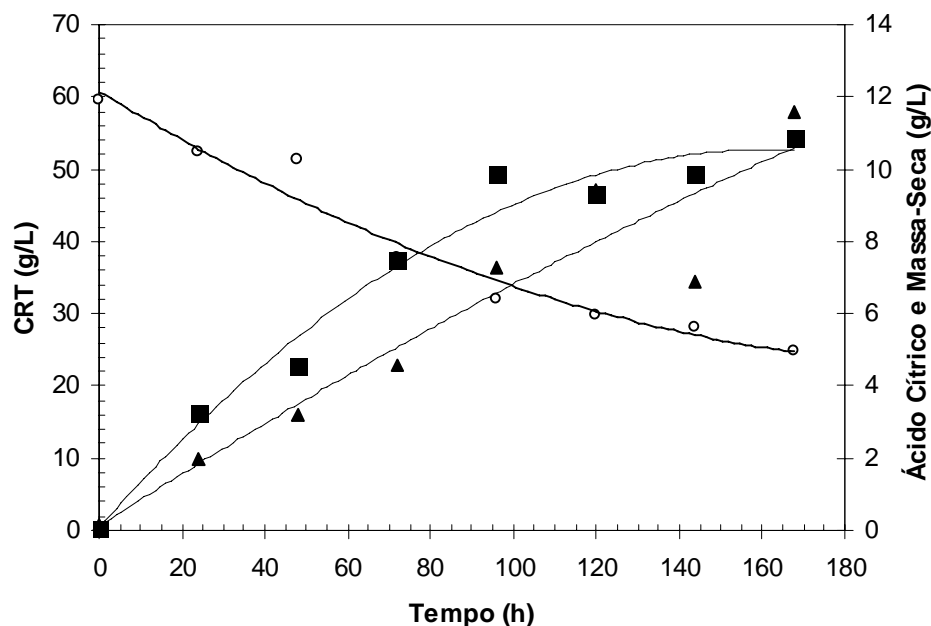


Figura 4.8 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 200 rpm, vazão de ar de 1,5 vvm e tempo de germinação de 24 horas (ensaio 5).

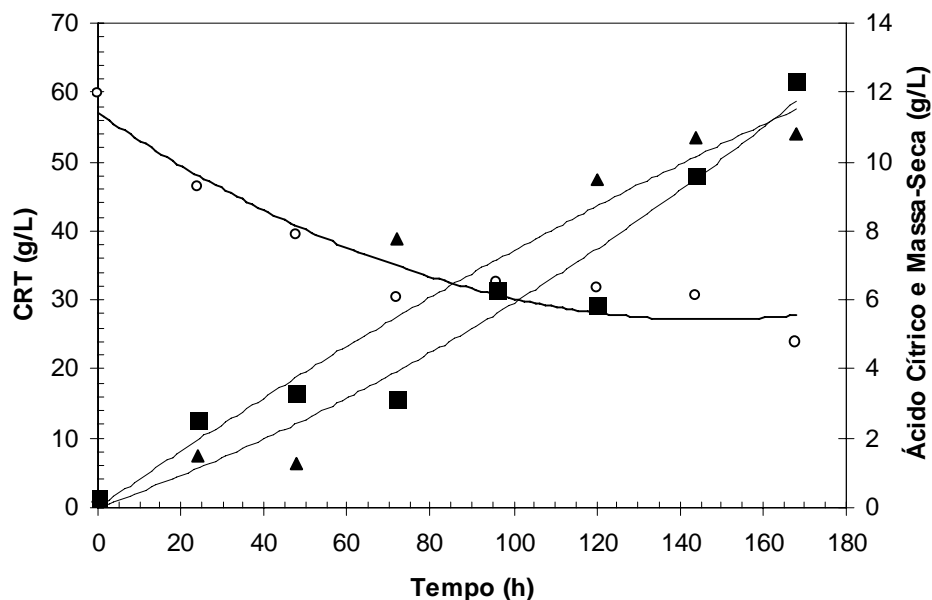


Figura 4.9 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 200 rpm, vazão de ar de 1,5 vvm e tempo de germinação de 72 horas (ensaio 6).

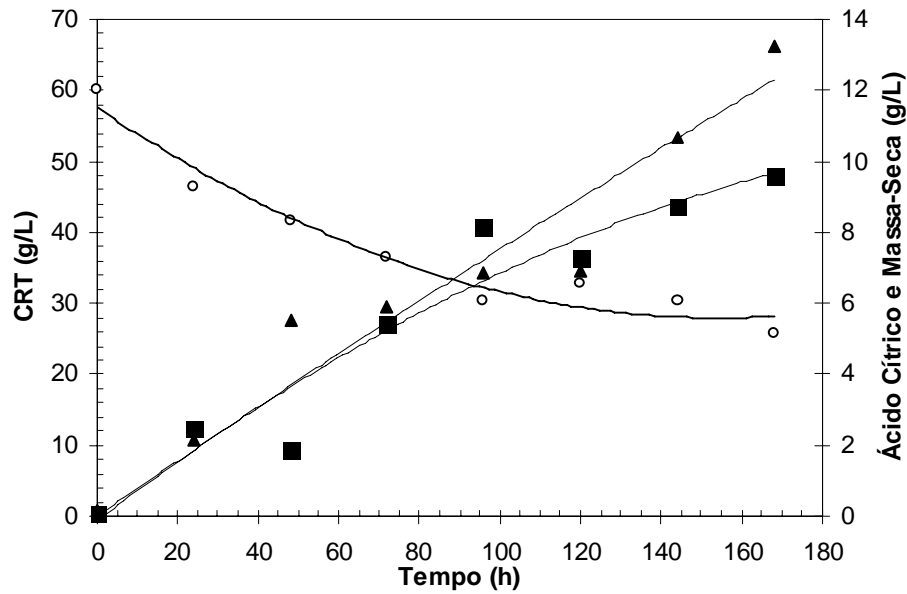


Figura 4.10 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 400 rpm, vazão de ar de 1,5 vvm e tempo de germinação de 24 horas (ensaio 7).

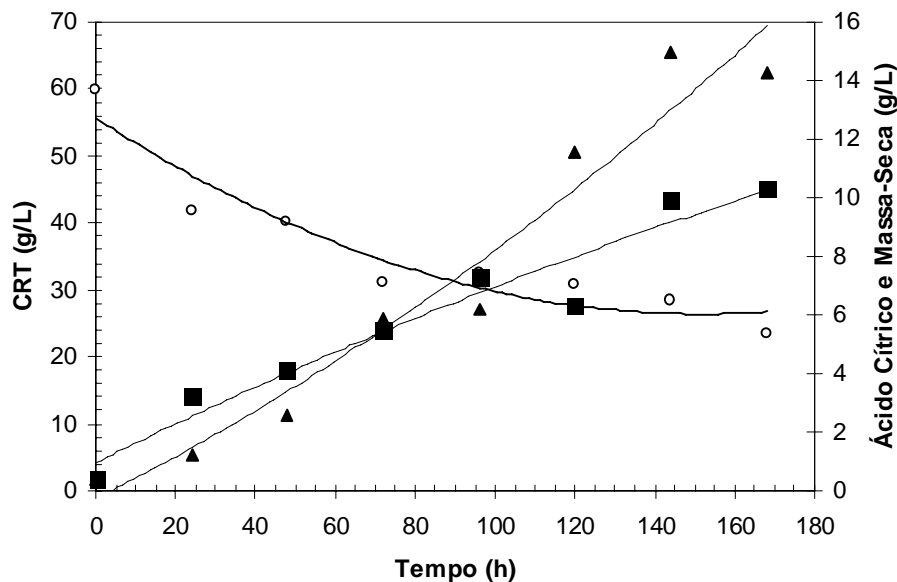


Figura 4.11 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 400 rpm, vazão de ar de 1,5 vvm e tempo de germinação de 72 horas (ensaio 8).

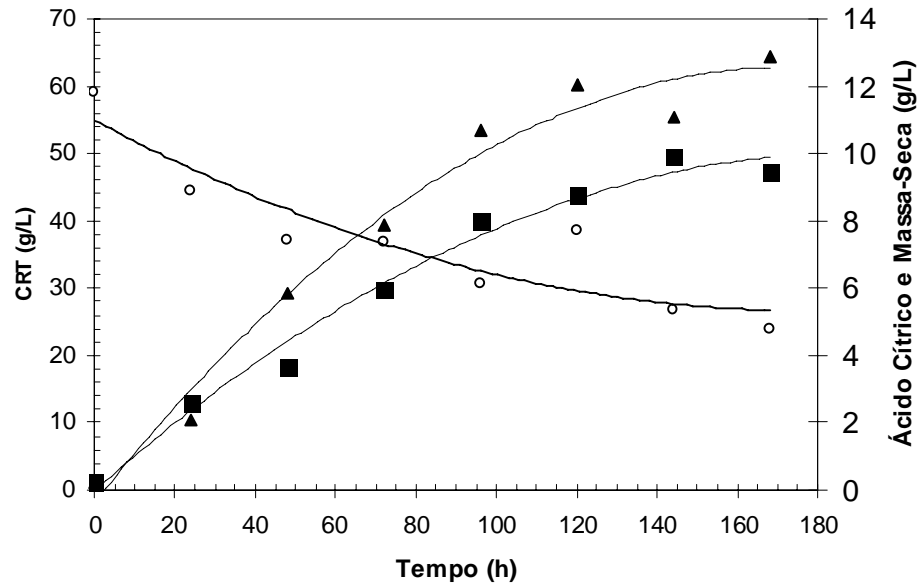


Figura 4.12 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 300 rpm, vazão de ar de 1,0 vvm e tempo de germinação de 48 horas (ensaio 9).

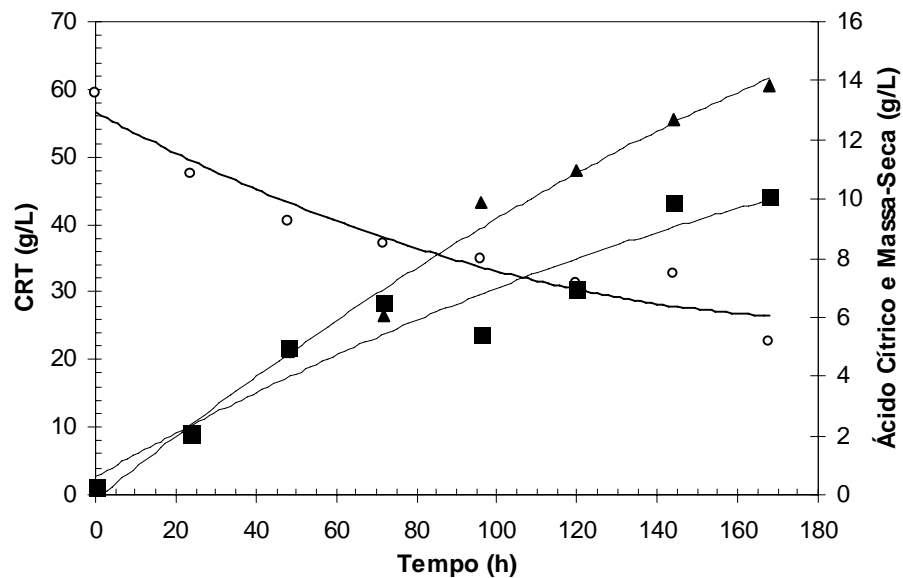


Figura 4.13 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 300 rpm, vazão de ar de 1,0 vvm e tempo de germinação de 48 horas (ensaio 10).

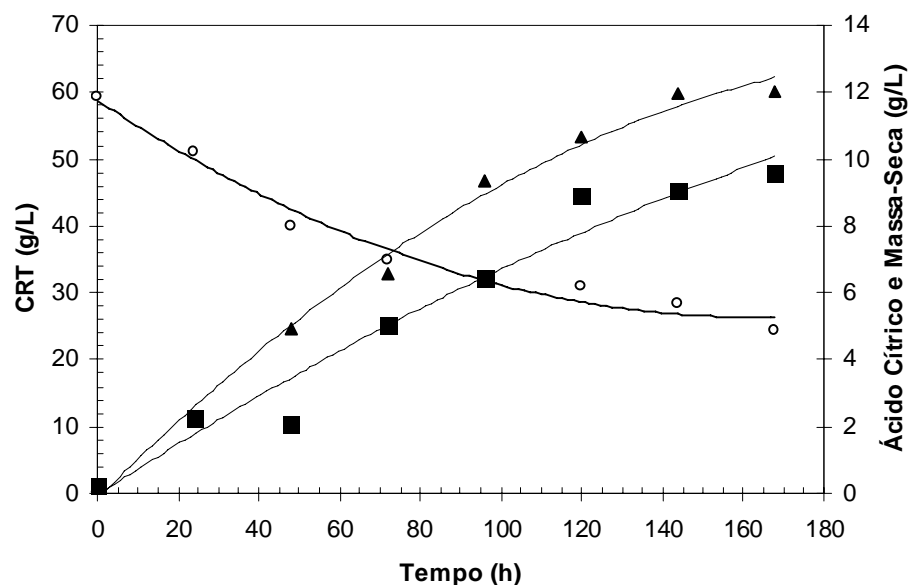


Figura 4.14 – Concentração de Células (■), de açúcares (○) e de ácido cítrico (▲) em função do tempo, durante cultivo com *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado, em sistema descontínuo nas seguintes condições: Agitação 300 rpm, vazão de ar de 1,0 vvm e tempo de germinação de 48 horas.(ensaio 11).

Nas figuras 4.15 e 4.16, apenas a agitação varia como referência para comparação; entretanto, para conseguir uma melhor análise do efeito da agitação, são apresentadas variações em diferentes tempos de cultivo de inóculo, isto é, variou-se a agitação nos ensaios com tempo de cultivo do inóculo com 24 horas e variou-se também a agitação com tempo de cultivo do inóculo de 72 horas. Observa-se que a maior velocidade do agitador (rpm) no fermentador favorece a produção do ácido cítrico (Figura 4.15). Na Figura 4.16 pode-se observar também um favorecimento do crescimento celular decorrente de uma maior agitação.

Durante as fermentações não foram observadas variações nítidas na morfologia em função das mudanças na aeração, nem no aumento de biomassa, nos ensaios onde foram utilizados o inóculo com tempo de cultivo de 24 horas, como mostrado na Figura 4.17. Gomez et al. (1988) em seu trabalho sobre produção de ácido cítrico por *A. niger* mostraram que não existe diferença na morfologia de “pellets” ou na forma de micélio filamentososo atribuída aos níveis de oxigênio dissolvido, embora a produção fosse realçada por um aumento do oxigênio dissolvido no meio de fermentação, desde que este nunca ficasse abaixo de 40% de saturação. No presente trabalho fica bem clara a afirmação citada acima e na

Figura 4.18 pode-se observar um favorecimento substancial sobre a produção de ácido cítrico devido o aumento da aeração. Para fungos filamentosos, a taxa de respiração é de grande importância, principalmente no período da fase exponencial de crescimento: uma vazão mais elevada de oxigênio é exigida a rigor para elevação na produção de ácido cítrico. Durante a fermentação, em vazões de ar mais baixas, o nível de oxigênio ficou abaixo de 10% da saturação, diminuindo a produção de ácido cítrico conforme pode ser observado nas Figuras 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7.

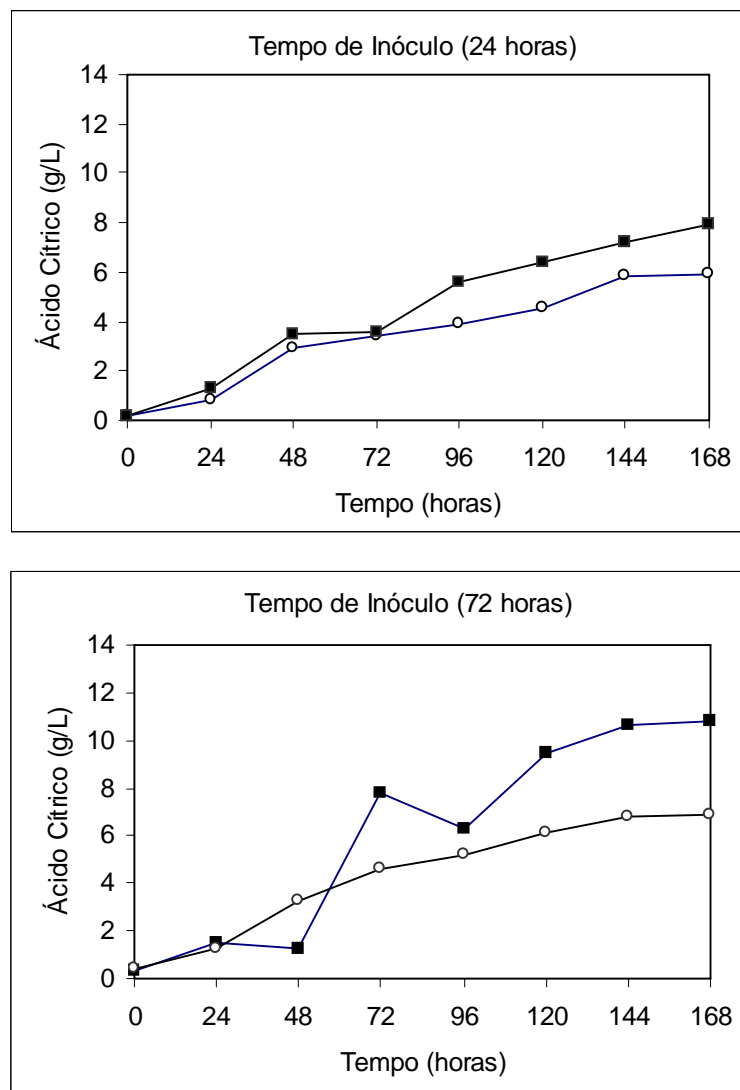


Figura 4.15 Efeito na produção de ácido cítrico pela variação na agitação em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com aeração de 0,5 vvm. (○) 200 rpm; (■) 400 rpm.

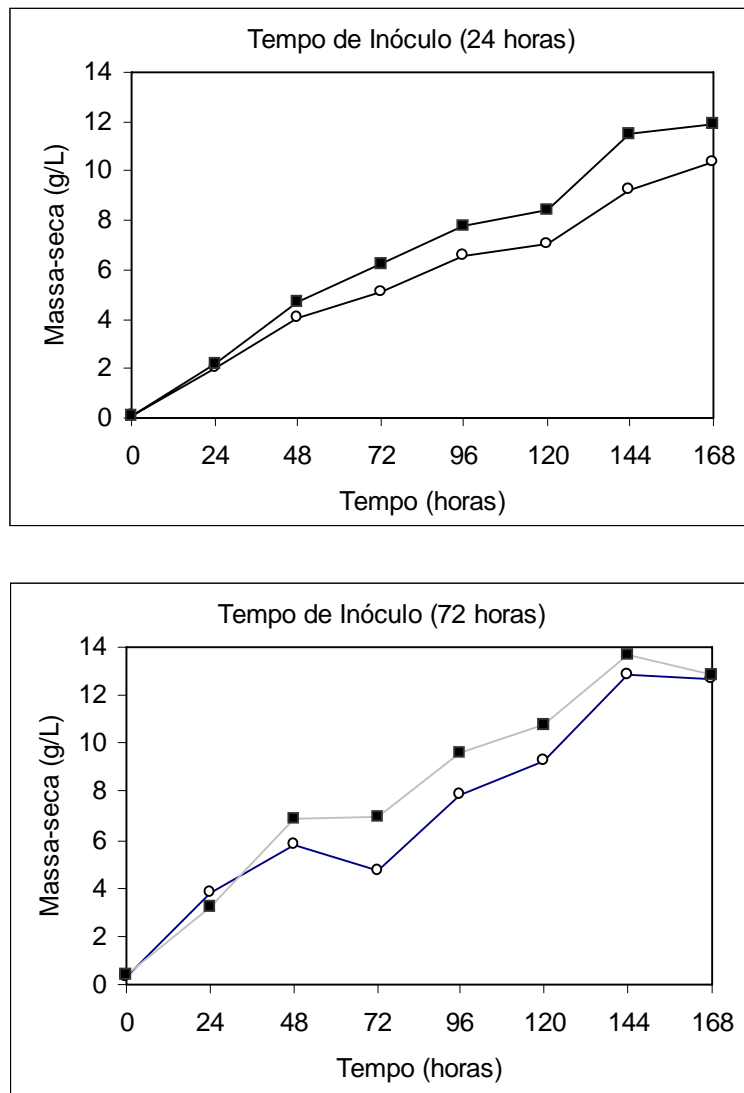


Figura 4.16 Efeito na massa-celular pela variação na agitação em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo de cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com aeração de 0,5 vvm. (○) 200 rpm; (■) 400 rpm

Os menores fatores de conversão observados nos ensaios foram obtidos em níveis inferiores de agitação e poderiam ser considerados devido ao resultado da morfologia desenvolvida sob tais circunstâncias de agitação (micélio filamentososo de hifas longas e entrelaçadas) e não como o resultado da limitação da transferência de oxigênio. Os ensaios 1 e 2 (Tabela 4.11) apresentaram níveis de oxigênio abaixo de

10% de saturação durante a fermentação. Clark et al. (1965), mostraram que o aumento da produtividade em ácido cítrico está associada com algum tipo morfologia: “pellets” pequenos, com filamentos densamente ramificados e grossos. Parece ser de opinião geral que a morfologia na forma na “pellets” é requerida para uma fermentação cítrica bem sucedida (KUBICEK; ROHR, 1989). Obviamente este não é o argumento para as agitações usadas neste estudo, pois em todos os ensaios o crescimento foi com sem formação de “pellets”, porém houve diferenças quanto ao fator de conversão e concentração final de ácido cítrico. Muitos pesquisadores discutiram efeitos da agitação na morfologia e na biossíntese.

Na literatura há casos em que a velocidade de crescimento e a produtividade nas fermentações cítricas está ligada à morfologia, como discutido por Marckl et al. (1985), enquanto em outros, nenhuma ligação foi observada, como no trabalho de Belmar e Thomas (1991). Existe outro fator importante, em que a fragmentação pode resultar no chamado “stress de tesoura” aplicado ao micélio, característica observada em velocidades elevadas de agitação, como no trabalho de Ayazi et al. (1994). Os autores mostraram que a ruptura hifal é o mecanismo dominante que determina o comprimento hifal do *Penicillium chrysogenum* sob circunstâncias de agitação intensa em biorreatores. Os danos da turbina aos micélios foram investigados também por Justen et al. (1996) e mostrou-se que a morfologia pode ser dependente da intensidade e do tipo do impulsor.

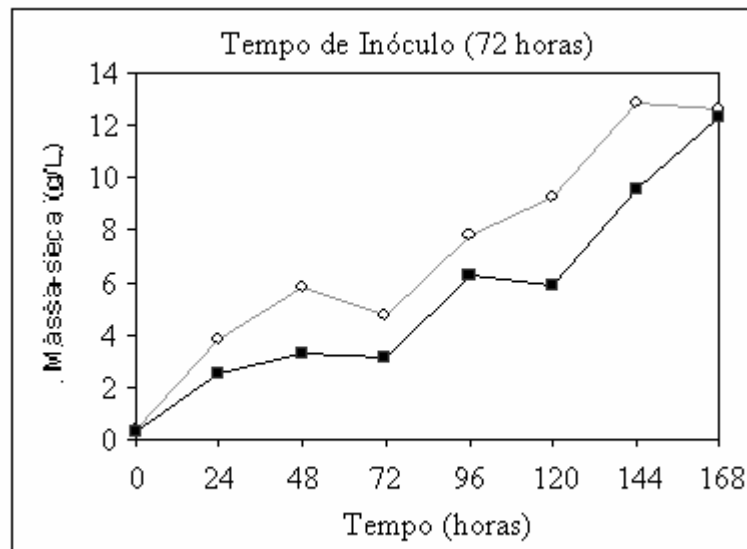
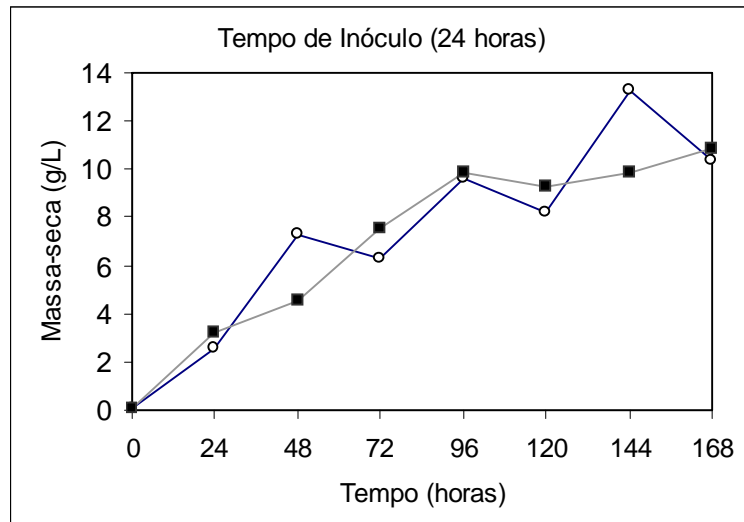


Figura 4.17 Efeito na massa-celular pela variação da vazão de ar em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo de cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com agitação de 200 rpm. (○) 0,5 vvm ; (■) 1,5 vvm

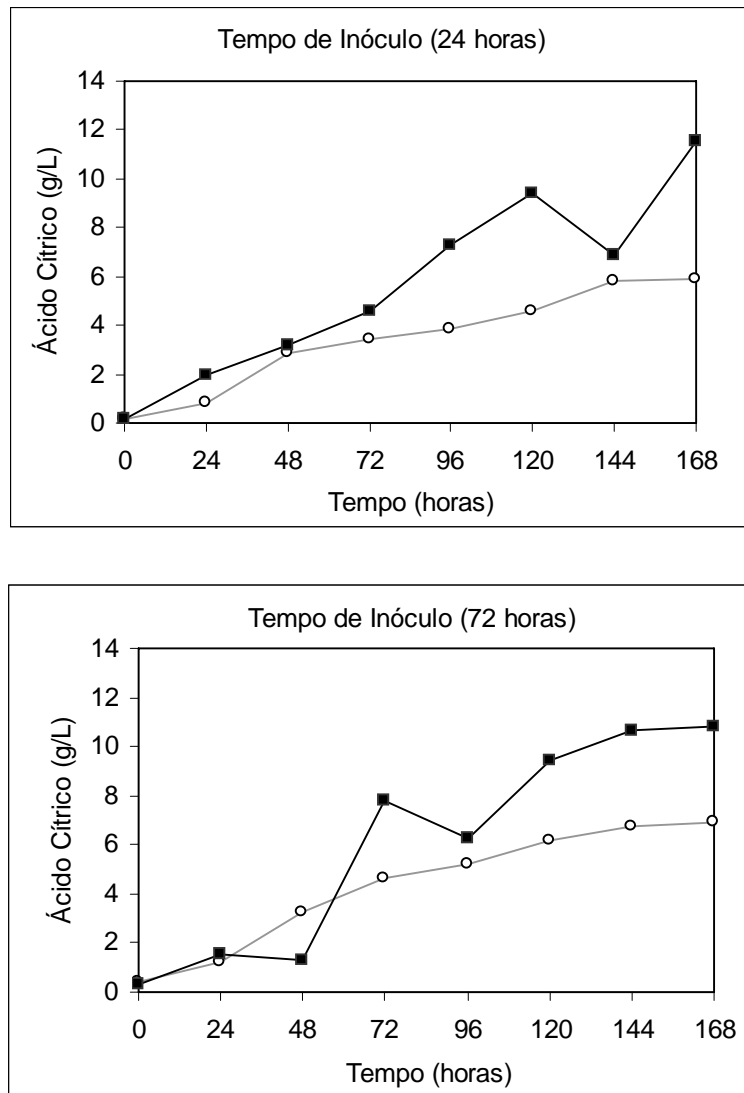


Figura 4.18 Efeito na produção de ácido cítrico pela variação na vazão de ar em fermentação submersa por *Aspergillus niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com tempo de cultivo de inóculo em 24 e 72 horas com agitação de 200 rpm. (○) 0,5 vvm; (■) 1,5 vvm

Com o objetivo final do trabalho em avaliar a influência da agitação, aeração e tempo de inóculo em fermentador em sistema descontínuo sobre a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, utilizou-se um planejamento fatorial 2^3 completo com três pontos centrais.

Na tabela 4.11 estão apresentados os resultados obtidos em termos de concentração final de ácido cítrico dos ensaios da matriz de planejamento estatístico da Tabela 3.5.

Estes resultados foram analisados estatisticamente e utilizados para estimar os efeitos principais e os efeitos de interação sobre a resposta de interesse que foi a concentração final de ácido cítrico com 168 horas de fermentação. A estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “Student” e análise de variância para o parâmetro de concentração final de ácido cítrico, segundo o planejamento fatorial 2³ completo, estão apresentados na TABELA 4.12 e 4.13 respectivamente.

Observa-se pela tabela de estimativas dos efeitos, que a agitação foi significativa ao nível de 10% de probabilidade, já a aeração apresentou um nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4.12- Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para o parâmetro concentração final de ácido cítrico em biorreator, segundo o planejamento 2³ completo.

Efeitos	Estimativa	Erro-padrão	t(2)
Média.	10,814	0,2746	39,39
t de inóculo	0,715	0,6438	1,11
Agitação	2,475	0,6438	3,84**
Aeração	4,905	0,6438	7,62*
inoc. X Agit.	0,595	0,6438	0,92
inoc. X Aera.	-0,575	0,6438	-0,89
Agit. X Aera.	0,105	0,6438	0,16

* :significativo ao nível de 5 % de probabilidade (t ≥ 4,303).

** : significativo ao nível de 10% de probabilidade (t ≥ 2,

Tabela 4.13 Análise de variância dos efeitos para o parâmetro concentração final de ácido cítrico em biorreator, segundo o planejamento fatorial 2³ completa.

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
t de inóculo	1,022	1	1,022	1,23	0,3824
Agitação	12,251*	1	12,251	14,78	0,0615
Aeração	48,118*	1	48,118	58,05	0,0168
inoc. X Agit.	0,708	1	0,708	0,85	0,4529
inoc. X Aera.	0,661	1	0,661	0,80	0,4660
Agit. X Aera.	0,022	1	0,022	0,03	0,8854
Falta de ajuste	18,534*	2	9,267	11,18	0,0821
Erro-puro	1,658	2	0,829		
Total	82,975	10			

* :significativo ao nível de 10 % de probabilidade

Como pode ser observado na Tabela 4.13 a falta de ajuste foi significativa e implica que o modelo não ajusta os dados experimentais. Nesse caso, como

apareceram muitos termos não significativos que não necessários à hierarquia, assim, redução do modelo pode apresentar um melhor resultado. Portanto, foram removidos os termos não significativos e realizada uma nova análise estatística. Os resultados desta nova análise estatística encontram-se nas Tabelas 4.14 e 4.15.

Tabela 4.14 Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “Student” e nível de significância para o modelo representativo da concentração final de ácido cítrico em biorretor, considerando agora um planejamento de 2² completo.

Efeitos	Coef. Regressão	Erro-padrão	t(2)	p
Média	10,81	0,274513343	39,39202454	0,000643819
B(agitação)*	1,24	0,321895428	3,844416204	0,061486714
C(aeração)**	2,45	0,321895428	7,618933932	0,016794326

* :significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($t \geq 4,303$).

** : significativo ao nível de 10% de probabilidade ($t \geq 2,92$).

Tabela 4.15 Análise de variância dos efeitos e da regressão para o modelo que representa a concentração final de ácido cítrico em biorreator descontínuo, segundo o planejamento fatorial 2² completo. ($R^2=0,93$)

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	Prob > F
Modelo	60,37	2	30,185	49,77	< 0.0001
B (agitação)	12,25	1	12,251	20,20	0.0028
C (aeração)	48,12	1	48,118	79,33	< 0.0001
Curvatura	18,36	1	18,359	30,27	0.0009
Resíduo	4,25	7	0,606		
Falta de ajuste	2,59	5	0,517	0,624	0.7100
Erro-puro	1,66	2	0,829		
Total	82,97	10			

O valor de F no modelo de 49,77 implica que o modelo é significativo. Existe, portanto significância para os termos de agitação e aeração, confirmando a existência de curvatura na região de estudo. Há somente a possibilidade de 0,01% do valor de F ser devido ao ruído. Valores de Prob > F menores que 0,0500 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso B e C são termos significativos do modelo proposto. Os valores mais extremos e acima 0,100 indicam que os termos do modelo não são significativos. O valor F da curvatura de 30,27 implica que a curvatura é significativa (medida da diferença entre a média dos pontos centrais e a média dos pontos fatoriais) no espaço do modelo. Há somente 0,09% de possibilidade de que essa curvatura ocorra devido ao ruído. A falta de ajuste de 0,62 indica que esta não é significativa em relação ao erro puro. Na Figura 4.19 é mostrada a distribuição dos resíduos do modelo em torno do zero, onde se observa

que essa distribuição é aleatória e que não existe tendência do modelo proposto. Sendo assim, o modelo ajusta os dados experimentais na faixa dos valores experimentais utilizados.

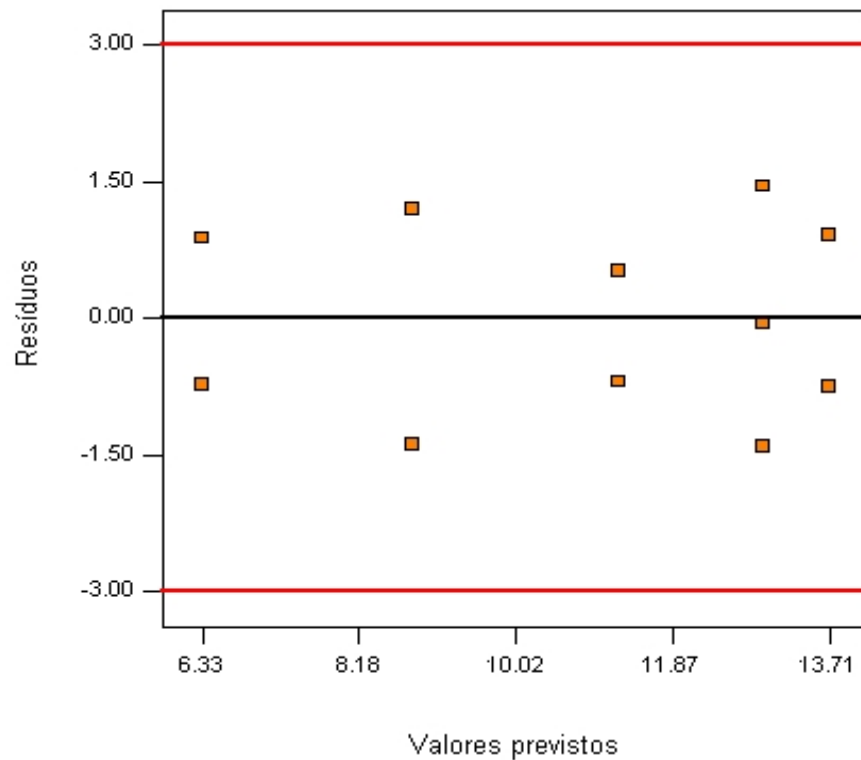


Figura 4.19 - Distribuição de resíduos do modelo proposto (Y) que representa a concentração de ácido cítrico final em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto por *Aspergillus niger* 10V10 em biorreator.

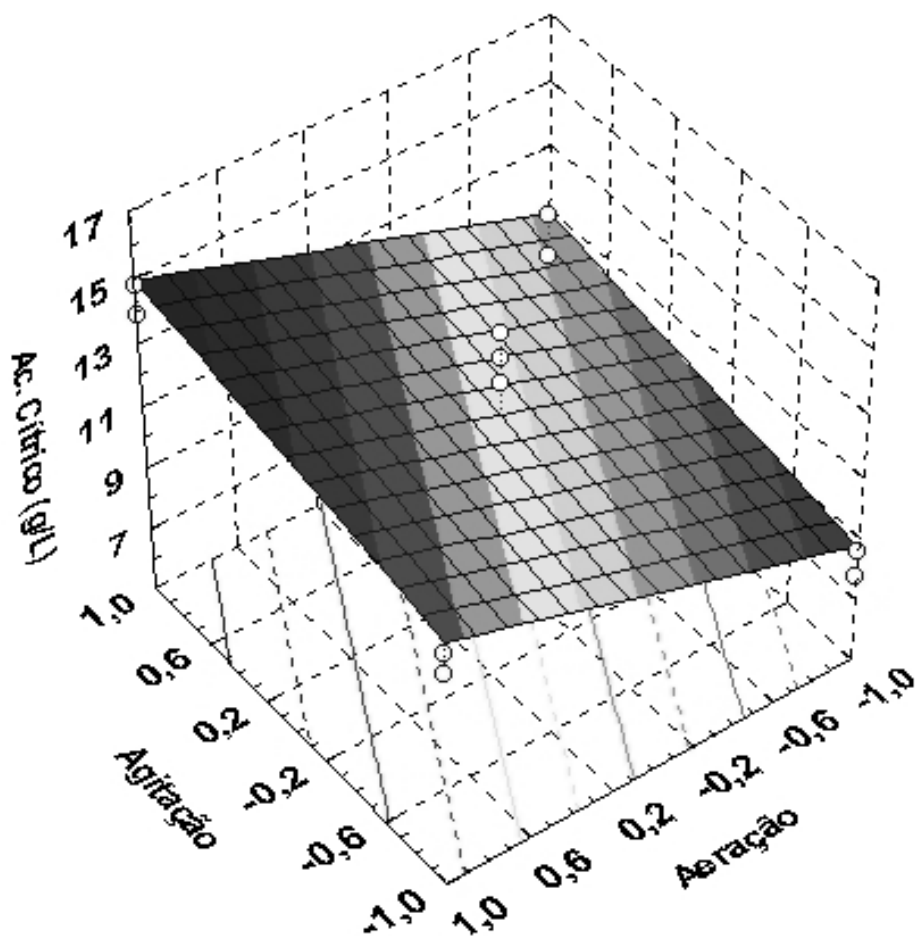


Figura 4.20 Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo proposto (Y), que representa a concentração final de ácido cítrico em fermentação descontínua de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto por *Aspergillus niger* 10V10 em biorreator.

Com base nos resultados obtidos, considerando os termos significativos, e com o auxílio da metodologia de superfície de resposta, obteve-se um modelo matemático para representar a resposta de concentração de ácido cítrico final em fermentação descontínua em biorreator, dentro da faixa estudada:

$$Y = 10,81 + 1,24 B + 2,45 C$$

Onde: Y representa o valor previsto para concentração final de ácido cítrico, B e C, os níveis codificados para agitação e aeração, respectivamente.

De acordo com o gráfico de superfície de reposta (Figura 4.20) pode-se constatar a existência de uma região de maior concentração de ácido quando se tem a maior aeração e maior agitação, dentro da faixa estudada. Quanto ao tempo de inóculo, o modelo matemático indica que o mesmo não apresentou efeito significativo dentro da faixa estudada, mas vale lembrar que para fins de processo o mesmo é fundamental. Sendo assim, o tempo de inóculo ideal que deve ser empregado para este processo deve ser de 24 horas, resultado esse bem abaixo do apresentado por PAPAGIANNI et al. (1998), que utilizou inóculo com tempo de 40 horas.

6.0 CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente trabalho, pode concluir que:

- A linhagem 10v10 apresentou uma maior quantidade de ácido cítrico acumulado no meio de fermentação.
- A concentração de açúcares iniciais (xilose + glicose) na proporção do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto próxima a 50 g/L favorece a produção de ácido cítrico pelo fungo *A. niger* 10v10.
- O tratamento físico-químico com variação de pH e adsorção com carvão ativo mostrou-se eficiente na remoção dos compostos inibidores de crescimento microbiano no hidrolisado hemicelulósico concentrado, assim como também a diminuição da concentração de quase todos os metais, com exceção do cálcio.
- Não há necessidade de nenhuma adição dos metais ferro, manganês e zinco ao meio de fermentação preparado com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado.
- O ferrocianeto de potássio é capaz de controlar o crescimento do fungo *A. niger* 10v10 em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado.

- Maiores valores de fator de conversão (Y_p/s) são obtidos com a agitação e a aeração mais elevadas assim como o fator de conversão de açúcares em células (Y_p/x).
- O melhor tempo de cultivo de inóculo para fermentação cítrica em biorreator para o presente estudo é de 24 horas.
- É possível obter ácido cítrico com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto em biorreator com o fungo *Aspergillus niger*.

7. TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudos com novas linhagens do Fungo *A. niger*, se possível linhagens selvagens nacionais.
- Estudar os parâmetros de fermentação cítrica utilizando o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto purificado com outros tipos de tratamentos.
- Realizar estudos mais específicos para tipos de agitadores e fermentadores em sistemas descontínuos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADTP, Agência de Desenvolvimento Tiete Paraná. Catalogado em registro eletrônico. Disponível em: <<http://www.adtp.org.br/artigo.php?idartigo=60>> . Acesso em: 12 de Novembro de 2004

ANGELIS, D.F, ANGELIS, C., GOES, A.C.L., & FONTANETTI, S. **Fundamentos de tecnologia da produção de shiitake**, 1998, p.24.

ALMEIDA, A. **Produção de Proteína Microbiana a Partir de hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz**. Viçosa: UFV, 1991. 90p. (Dissertação de Mestrado).

BEROVIC, M; POPOVIC, M. Characterisation of gas mixed bioreactors in submerged citric acid fermentation. **Chem. Biochem. Eng.Q.** p.65-69, 2001

BOHDZIEWICZ, S.; BODZEK, M. **Ultrafiltration preparation of liquid pectinolytic enzyme solution from citric acid fermentation broth**. Recents Prog. Genie. Procedes 6 (1992) (22, Membr. Prep.: Fouling emerging process), p.449-454.

BUCHHOLZ, K.; PULS, J.; GODELMANN, B.; DIETRICH, H. H. Hidrolisys of cellulosic wastes. **Process Biochemistry**, p. 37-43, dec-jan, 1980/1981.

CARGILL, Catálogo em registro eletrônico.

Disponível em: <<http://www.cargill.com.br/asp/system/empty.asp?P=509&VID=default&SID=866351526525475&S=3&A=closeall&C=23369>>. Acessado em 13 de Novembro de 2003

CLARK, D.S; ITO, K; HORITUS, H. Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. **Biotechnol Bioeng.**, vol.8, 465-471 (1966).

CLARK, D.S; ITO, K, **Biotechnol Bioeng.** Vol.7 p.269, 1965.

CORRÊA, P. E. D., RAMOS, R. M. SILVA, S. S., MANCILHA, I. M., Avaliação do fator de Concentração do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de cana de açúcar no Crescimento e consumo de açúcares por *Candida guilliermondii*. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Iniciação Científica**, 1, São Carlos, 8-10 ago.1995 São Carlos, CNPQ/FAPESP/ABEQ/UFSCar, p.26-29,1995.

DALE, B.E. Lignocellulose Conversion and the future of fermentation. **Biotechnology Tibtech**, v.5, p.287-291, 1987.

DAWSON, M.W; MADDIX, L.S; BOANG, I.F; BROOKS, J.D. Application of fed batch culture to citric acid production by *Aspergillus niger*, The effect of dilution rate and dissolved oxygen tension, **Biorechnol. Bioeng**, v.32 p. 220-226, 1988.

DEKKER, R.F.H. The enzymatic hidrolisys of biomass. In: **Seminário de hidrólise enzimática de biomassa**, 2, Maringá, 1985. Maringá, universidade Estadual de Maringá,. p. 11-13, 1985

DHANKAR, H.S; ETHIRAJ, S; VYAS,S.R. Effects of methanol on citric acid production from sugar cane molasses by *A. niger*. **Ind J. Technol**, v.12, p.316-317 (1974).

DOMINGUEZ, J.M., GONG, C.S., TSAO, G.T. Pretreatment of Sugar Cane Bagasse Hemiceliulose Hydrotysate for Xylitol Production by Yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton,v.57/58, p.49-56, 1996.

FOLHA, Jornal Folha de São Paulo. Caderno Painei S.A. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro/fi1310200401.htm>> acessado em 23 de outubro de 2004

FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., MANCILHA, 1. M., SILVA, S. S., Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.251-254, 1997a.

FELIPE, M.G. A., VITOLO, M., MANCILHA, 1. M. AND SILVA, S. S., Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH . **Biomass and Bioenergy**, v.13, p.11-14,1997b.

FHC lança estudo da genética do eucalipto com verba federal. Jornal O estado de São Paulo, São Paulo, Caderno Geral, 21/02/2002.

FUNK, H. F., Recovery of Pentoses and Hexoses from Wood and Others Material Containing Hemicellulose and Further Processing of C₅ and C₆ Components. **Applied Polymer Symposium**, vol.28, p.145-152, 1975

GREWAL, H.S; KALRA, K.L. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, Vol. 13, No 2. pp.212, 1995.

GUPTA, J.K; HEDING, L.G; JARGENSEN, O.B. Effect of sugars, pH and ammonium nitrate on formation of citric acid by *Aspergillus niger*, **Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.**, 23, 63-67 (1976).

HANG, Y. D; LUH, B.S; WOODAMS, E.E. Microbial production on citric acid by solid state fermentation of kiwi fruit peel, **J. Food. Sci.**, v.52, p.226-227, 1987.

HANG, Y.D; SPLITTSTOESSER, D.F; WOODAMS, E.E; SHERMAN, R.M. Citric acid fermentation of brewery waste, **J. Food Sci.** 42, p.383-384, 1977.

HANG, Y.D; WOODAMS, E.E. Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production. **J Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.2, p.283-287, 1986.

HAQ, I.U; ALI, S; QADEER, M.S; IQBAL., J. Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *A. niger* using molasses based media. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1085-1090, 2002.

HORITSU, H. Citric acid fermentation of *A. niger* with tower fermenter, II, Effect of manganese on growth, respiration and citric acid production of *A.niger*, *Hakko Kyokaishi*. V.29, p.460-464, 1977.

KAHLON, S.S. Production of citric acid by *Aspergillus* sp. isolated from different sources, **J. Res. Punjab Agric. Univ.**, v.19, p.44-50, 1982.

KAPOOR, K.K; CHAUDHARY, K; TAURO, P. Citric acid. In: **Presscott and Dunn's Industrial Microbiology**, 4ed, G. Reed (ed.) AVI Publishing Co., Westport, CT, 1983.

KHAN, M.A.A; HOSSAIN, M; KBALIQUE, M.A ;RAHMAN, M.A. Methods of citric acid production from molasses by *A. niger*. Pak. **J. Sci. Ind. Res.**, v.13, p.439-444, 1970.

KRISTIANSEN, B; SINCLAIR, C.G. Production of citric acid in continuous culture, **Biotechnol Bioeng.**, v.21, p.297-315, 1979.

KUBICEK, C.P. & ROHR, M. Citric acid fermentation. CRC Critical reviews in **Biotechnology**, v.3 (4): p. 331-373, 1986.

KUMAKURA, M. & KAETSU,I. Effects of radiation pretreatment of bagasse on enzymatic and acid hydrolysis. *Biomass*, v. 3, p.199-208, 1983.

LA NAUZE, J.M. Aconitase and isocitrate dehydrogenase of *Aspergillus niger* in relation to citric acid production, **J. Gen. Microbiol**, v.44, p.73-81, 1966.

LAL, D.N. The influence of some ammonium compounds on the production of citric acid by *A. niger* AL 29, Ind. 1. **Agri.. Chem.**, v.13, p.153-157, 1980.

LEE, Y. Y., McCASKEY, T. A., Hemicellulose hydrolysis and fermentation of resulting pentoses to ethanol. **Tappi Jornal**, v.66, No.5, p.1002-7, 1983.

LEWIS, K.F; WEINHOUSE, S. Studies on the mechanism of citric acid production in *A. niger*, **J.Am. Chem. Soc.**, v.73, p.2500-2503, 1951.

MARIER, J. R; BOULET, M. Direct Determination of Citric Acid in Milk With an Improved Pyridine – Acetic Anhydride Method. Division of Applied Biology National Research Council, Ottawa, Canada. **Journal of Dairy Science**, n.41, p.1683,1958.

MADDOX, I.S; SPENCER, K; GREENWOOD, J.M; DAWSON, M.W; BROOKS, J.D. Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces lipolytica*, **Biotechnol. Lett**, v.7, p. 815-818, 1985.

MANONMANI, H.K; SREEKANTIAH, K.R. Studies on the conversion of cellulose hydrolysate into citric acid by *A. niger*, **Process. Biochem.**, v22, p.92-94, 1987.

MIYAFUGI, H. et al. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal of increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and microbial technology**, p.396-400, 2003

MCT- Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil. Genolyptus consolida liderança do setor. Endereço eletrônico : <http://www.mct.gov.br>. 20/02/2002.

MILSON, P.E. & MEERS, J.L. Citric acid. In: MOOYUNG, M.Ed. **Comprehensive Biotechnology**. London. Pergamon Press, p. 665-680, 1985

- MISHRA, P.; SINGH, A. Microbial pentose utilization. **Advances in Applied Microbiology**, v.15, p.91-149, 1993.
- MUSHNIKOVA, L.N; EGLIT, I.T. Trace and major element requirements in culture of acid producing fungi, Khelbopok. **Konditer. Promst**, v.3, p.34-36, 1984.
- NEHAD, Z.A. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beet-molasses medium. **Bioresource technology**, p. 97-100, 2002.
- PENNA, T. C. V. Produção de ácidos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Eds. **Biociencia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, cap. 2, p. 45-59, 2001
- PAPANIKOLAOU, S., MUNIGLIA, L., CHEVALOT, I., AGGELIS, G. e MARC, I. *Yarrowia Lipolytica* as A Potential producer of citric Acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, p. 737-744, 2002.
- PAPAGIANNI, M.;MATTEY, M.;KRISTIANSEN, B. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, p.197-205, 1998.
- PAPAGIANNI, M.;MATTEY, M.;KRISTIANSEN, B. The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and culture. **Enzyme and microbial technology**, p.710-717, 1999.
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M. Biotchnological Production of Xylitol. Part 3:Operation in Culture Media made from Lignoceilulose Hydrolysate. **Bioresource Technology**, London, v.66, p.25-40, 1998.
- PARAJÓ, J. C., DOMINGUES, H., DOMINGUES, 1. M. Production of Xylitol from Concentrated Wood Hidrolysate by *Degayromyces hansenii*: Effect of the Initial Celi Concentration. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 5., p. 593-598, 1996.
- PAZOUKI, M.; PANDA, T. Recovery of citric acid – a review. **Bioprocess Engineering**, p. 435-439, 1998.
- PESSOA JUNIOR, A. Produção de Biomassa Microbiana a Partir de Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de Cana-de-açúcar. São Paulo: EPUSP, 1991. 187p. (Dissertação de Mestrado).
- PFEIFER, M. J., SILVA, S.S., FELIPE, M. G. A., ROBERTO, I. C. MANCILHA, I. M., Effect of culture Conditions on Xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.57/58, p.423-1996
- PRATA, A.M.R. Avaliação do Hidrolisado Celulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar para Obtenção de Ácido Cítrico. Viçosa: UFV, 1989. 72p.(Tese de Mestrado).
- PUROHIT, H.S; DAGINAWAL, H.E. Isolation of microorganisms for citric acid production from tamarind seed powder. **J. Soc. Pure Appl. Nat. Sci.** v.1, p.10-15, 1985.

RAMAKRISHNAN, C.V; MARTIN, SM. Isocitrate dehydrogenase in *Aspergillus niger*, **Arch. Biochem. Biophys.** v.55, p.403-407, 1955.

RAMAKRISHNAN, C.V; STEEL, R; LENTZ, C.P. Mechanism of citric acid formation and accumulation in *Aspergillus niger*, **Arch. Biochem. Biophys**, v.55, p.270-273, 1955.

REED, G. Prescott and Dunn's Industrial Microbiology, 4ed., p. 709-749, 1991.

ROBERTO, I.C., SATO, S., MANCILHA, I.M., TAQUEDA, M.E.S. Influence of media Composition on Xylitol Fermentation by *Candida guilliermondii* Using Response Surface Methodology. **Biotechnology Letters**, v.17, n.11, p.1223-1228, 1995.

RODRIGUES, R.C.L.B. Avaliação das Condições de Concentração a Vácuo do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana para a Produção do Xilitol. Lorena: Faenquil/Departamento de Biotecnologia e Química, p.109, 1999 (Tese de Mestrado).

RODRIGUES, R.C.L.B., PRATA, A. M.R, RAMOS, R.M. Influência do pH e do uso de carvão ativo na redução do teor de impurezas do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Iniciação científica**, 1. Anais. p.11-14, 1995.

ROHR M. A century of citric acid fermentation and research. **Food Technol Biotechnol**, v.36, p.163-171, 1998

ROHR, M.;KUBICEK, C.P. Regulatory aspects of citric acid fermentation by *A. niger*. **Process Biotechnology**. p.34-37, Jun-Jul, 1981.

ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery waste by *A. niger*. **Enz. Microbial. Technol.**, v.9, p.391-394, 1987.

ROUKAS, T; HARVEY, R. The effect of pH on production of citric and gluconic acid from beet and cane molasses using continuous culture. **Biotech. Lett.**, v.10, p.289-294, 1988.

SANCHEZ-MARROQUIN, A, R. CARRENO and M. LEDCZMA. Effect of trace elements on citric acid fermentation by *A. niger*. **Appl. Microbiol** . v.20, p.888-892, 1970.

SANTOS, R.S; PRATA, A.M.R. Growth of *Aspergillus niger* in eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for citric acid. In:**10th European Congress on Biotechnology. Biotechnological challenges in the new millennium** - July 8 -11, Madrid, Spain, 2001

SEICHERT, S; UJCOVA, E; MUSILKOVA, M; FENCI, Z. Effect of aeration and agitation on the biosynthetic activity of diffusely growing *A. niger*. **Folia Microbiol**, v.27, p.333-334, 1982.

SENE, L., VITTOLO, V., FELIPE, M.G.A., SILVA, S. Effect of Environmental Conditions on Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Production in *Candida guilliermondii*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.371-380, 2000.

SHAN, M.M; LEE, Y.Y. Process Improvement in acetone-butanol production from hardwood by simultaneous saccharification e extractive fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.45/46, p. 585-597, 1994

SIEBERT, D. & SCHULZ, G. Citric acid production by fermentation. In: **INTERNATIONAL MICROBIOLOGICAL FOOD INDUSTRY CONGRESS**, v.2, Paris, p.55-71, 1979

SJOLANDER, N. O., LANGLYKKE, A. F., PETERSON, W. H. Butyl alcohol Fermentation of wood sugar. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.30, p.1251-1255, 1938.

SIKANDER, A; IKRAM, H.U; JAVEL, I. The role of Mn⁺⁺ ions for high and consistent yield of citric acid in recycling fed-batch bioreactor system and is novelty on kinetic basis. **EJB Eletronic Jornal of Biotechnology** ISSN: 0717-3458 v.5. No.2 Issue of August , 2002

SINGH, J; MEHROTRA, B.S. Mycological production of citric acid in India. IV, Role of sulphur and phosphorous compounds, **Sydowia Ann. Myco/**. V.26, p.235-242, 1975.

SODECK, G.; MODL, J.; KOMINEK, J.; SALZBRUNN, W. Production of citric acid according to the submerged fermentation process. **Process Biochemistry** : p.9-11, oct-nov, 1981.

STANIER, Y. R.; ADELBERG, A.E.; INGRAHAM, L. J. **Microbial World**. 4ed., p.162-171, 1976

USAMI, S; FUKUTOMI, N. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse and concentrated liquor of pineapple waste, **Hakk kogaku**, v.55, p.44-50, 1977.

UJCOVA, E., FENCL, Z., MUSILCOVA, M., SEICHERT, L. **Biotechnol. Bioeng.** v.22 p.237-241,1980.

USMANI, S. Production of citric acid by submerged culture, Memoir of the School of Science and Engineering, **Waseda Univ. Tokyo**, v.42, p18-26, 1978.

WOLD, W.S.M; SUZUKI, I. The citric acid fermentation by *Aspergillus niger*, **Can. J. Microbiol.**, v.22, p.1083-1092, 1976.

XU, D.B; KUBICEK, C.P; ROHR, M. Comparison of factors influencing citric acid production by *A. niger* grown in submerged culture and on filter paper, **Appl Microbiol. Biotechnol**, v.30, p.444-449, 1989a.

XU, D.B; MADRID, C.P; ROHR, M; KUBICEK, CP. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *A. niger*, **Appl Microbial Biotechnol**, v.30, p.553-558, 1989b.

YU, E.K.C; DESCHATELETS, L. SADDLER, J.N. Combined enzymatic hydrolysis and fermentation approach to butanediol production from cellulose and hemicellulose carbohydrates of wood and agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 14, p. 341-352, 1984a.

APÊNDICE

Apêndice 1A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 01).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,56	0,05	0,183
24	50,23	2,03	0,781
48	46,57	4,01	2,892
72	38,89	5,09	3,42
96	32,55	6,57	3,85
120	30,86	7,02	4,56
144	28,46	9,24	5,84
168	25,81	10,39	5,89

Apêndice 2A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 02).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,89	0,35	0,391
24	52,94	3,84	1,26
48	41,99	5,79	3,27
72	35,67	4,73	4,64
96	30,98	7,84	5,21
120	28,22	9,25	6,16
144	29,9	11,48	6,77
168	24,86	12,65	6,88

Apêndice 3A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 03).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,75	0,06	0,2
24	47,01	2,15	1,28
48	45,32	4,68	3,48
72	33,22	6,22	3,57
96	39,41	7,78	5,6
120	26,29	8,41	6,42
144	25,06	11,53	7,23
168	23,11	11,88	7,96

Apêndice 4A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 04).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,21	0,45	0,33
24	45,64	3,23	1,563
48	35,98	6,85	2,133
72	36,79	6,96	4,05
96	28,83	9,58	7,26
120	31,41	10,8	6,68
144	27,9	13,64	9,31
168	23,54	12,87	9,55

Apêndice 5A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 05).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,48	0,06	0,15
24	52,26	3,26	1,98
48	51,25	4,59	3,21
72	37,77	7,51	4,59
96	31,98	9,84	7,29
120	29,88	9,29	9,41
144	28,09	9,89	6,89
168	24,86	10,88	11,56

Apêndice 6A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 06).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,77	0,3	0,32
24	46,21	2,54	1,51
48	39,46	3,29	1,28
72	30,4	3,12	7,79
96	32,55	6,31	6,28
120	31,65	5,87	9,48
144	30,51	9,59	10,68
168	23,98	12,34	10,81

Apêndice 7A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 07).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,96	0,05	0,18
24	46,31	2,45	2,16
48	41,55	1,87	5,55
72	36,47	5,42	5,89
96	30,27	8,16	6,87
120	32,59	7,29	6,9
144	30,19	8,77	10,65
168	25,76	9,62	13,25

Apêndice 8A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 08).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,82	0,41	0,36
24	41,88	3,21	1,23
48	40,06	4,16	2,59
72	31,09	5,47	5,85
96	32,55	7,26	6,21
120	30,86	6,32	11,56
144	28,46	9,93	14,98
168	23,55	10,31	14,28

Apêndice 9A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 09).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,12	0,21	0,22
24	44,44	2,57	2,1
48	37,23	3,64	5,84
72	36,95	5,97	7,87
96	30,51	7,96	10,69
120	38,58	8,79	12,05
144	26,76	9,88	11,06
168	23,78	9,46	12,89

Apêndice 10A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 10).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,34	0,25	0,19
24	47,46	2,12	2,01
48	40,34	4,97	4,87
72	37,17	6,51	6,06
96	34,9	5,43	9,91
120	31,12	6,97	10,98
144	32,68	9,87	12,68
168	22,52	10,05	13,85

Apêndice 11A- Variação na concentração de ácido cítrico, Carboidratos redutores totais (CRT) e massa-seca (X) durante fermentação cítrica em biorreator em sistema descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado (ensaio 11).

Tempo (h)	CRT (g/L)	X (g/L)	Ac. Cítrico (g/L)
0	59,31	0,22	0,21
24	51,06	2,26	2,27
48	40,09	2,11	4,94
72	34,97	5,02	6,6
96	31,97	6,44	9,38
120	30,86	8,89	10,65
144	28,46	9,06	11,98
168	24,4	9,59	12,03