

# ADITIVOS ALIMENTARES PRODUZIDOS POR VIA FERMENTATIVA

## PARTE I: ÁCIDOS ORGÂNICOS

### Resumo

Diversos ácidos orgânicos podem ser obtidos por fermentação: acético, butírico, cítrico, fumárico, glicônico, itacônico, kójico, láctico, málico, propiônico, succínico e tartárico, entre outros. Alguns deles são atualmente produzidos em escala industrial por via fermentativa, como é o caso dos ácidos cítrico, acético, láctico, glicônico e itacônico (em ordem decrescente de volume de produção industrial). Destes, o ácido itacônico é utilizado principalmente para a síntese de polímeros e copolímeros, enquanto os demais são amplamente empregados como aditivos alimentares. Considerando a produção industrial por via fermentativa e o uso como aditivo alimentar, os ácidos cítrico, acético, láctico e glicônico foram selecionados para uma análise detalhada.

**Palavras-chave:** ácidos orgânicos, produção industrial, fermentação

### Summary

Several organic acids can be obtained by fermentation: acetic, butyric, citric, fumaric, gluconic, itaconic, kojic, lactic, malic, propionic, succinic and tartaric, among others. Nowadays, some of them are produced in industrial scale by fermentative processes, as is the case for citric, acetic, lactic, gluconic and itaconic acids (in decreasing order of production volume). Among these, itaconic acid is used mainly to synthesize polymers and copolymers, while the others are widely used as food additives. Considering the industrial production by fermentative way and the use as food additive, citric, acetic, lactic and gluconic acids were selected for a detailed analysis.

**Keywords:** organic acids, industrial production, fermentation

### Introdução

Apesar do ser humano se beneficiar da ação de microrganismos desde os tempos antigos, principalmente na produção de alimentos e bebidas, foi somente por volta de 1857 que Louis Pasteur demonstrou o papel destes seres microscópicos nos chamados processos fermentativos.

Até meados da década de 1940, ao fim da II Guerra Mundial, acreditava-se que os processos industriais de fermentação não eram muito promissores, pois os produtos que até então podiam ser obtidos por estes processos já eram produzidos em escala industrial por processos químicos convencionais, muito mais atraentes do ponto de vista econômico. Devido às necessidades impostas pela II Guerra Mundial (infecções bacterianas determinando a morte de muitos mutilados e feridos), foi neste instante que os conhecimentos da área de engenharia de processos, oriundos dos processos químicos tradicionais, entraram em cena para dar subsídios à produção em larga escala de um produto biotecnológico, obtido exclusivamente por via fermentativa: a penicilina, antibiótico produzido pelo fungo *Penicillium chrysogenum*.

Desde então, importantes desenvolvimentos nas áreas de engenharia, bioquímica e microbiologia (transferência de oxigênio, ampliação de escala e elaboração de meios de cultura, entre outros) têm permitido a implementação de processos fermentativos em escala industrial para a produção de vários produtos de interesse comercial (enzimas, antibióticos, solventes orgânicos, vitaminas e aminoácidos, entre outros). Ao longo destes anos, os rendimentos e produtividades dos processos têm sido continuamente melhorados, não somente em função do uso de novas configurações de biorreatores, de meios de cultura mais adequados e da seleção de células mais produtivas, mas também devido aos desenvolvimentos nas áreas de informática e biologia molecular, que transformaram definitivamente o cenário da engenharia bioquímica. Além disso, os desenvolvimentos na área de downstream processing têm contribuído para que a produção biotecnológica de insumos com elevado valor agregado (hormônios e vacinas, entre outros) se torne economicamente interessante. Hoje em dia, diversos processos fermentativos são operados em escala industrial, com alta eficiência

Walter Carvalho\*,  
Débora D. V. Silva,  
Larissa Canilha e  
Ismael M. Mancilha

Faculdade de Engenharia  
Química de Lorena,  
Departamento de  
Biotecnologia

\* Autor para correspondência:  
Faculdade de Engenharia  
Química de Lorena,  
Departamento de  
Biotecnologia  
Rod. Itajubá-Lorena Km 74,5  
Caixa Postal 116  
CEP 12600-970. Lorena. SP  
Fone: (12) 3159-5027  
Fax: (12) 3153-3133  
E-mail:  
carvalho@debiq.fauenquil.br

e baixo custo, para a geração de diversos produtos biotecnológicos de interesse comercial.

Face ao exposto, o presente trabalho analisa aspectos relacionados à obtenção de alguns ácidos orgânicos, utilizados como aditivos alimentares, atualmente produzidos em escala industrial por via fermentativa. Pretende-se, com este trabalho, iniciar uma série de revisões dedicadas à análise de aspectos relacionados à obtenção de aditivos alimentares por via fermentativa. Temas de revisões futuras compreenderão a produção de enzimas, poliálcoois, aminoácidos e vitaminas, entre outros.

## Ácido cítrico

O ácido cítrico é um ácido orgânico de sabor agradável, facilmente assimilável pelo organismo humano e de pequena toxicidade. Devido a estas características, é amplamente utilizado na indústria alimentícia como acidulante, agente para intensificar o sabor, antioxidante para inibir o ranço em óleos e gorduras, como agente tamponante em geléias e gelatinas, e como estabilizante (Demain, 2000a).

De acordo com Graham e Lund (1986), o efeito antibacteriano do ácido cítrico está associado não somente à sua ação acidulante, mas também à sua atividade quelante de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , conforme demonstrado em estudos com a bactéria proteolítica *Clostridium botulinum*.

Com uma produção anual em torno de 400 mil toneladas e um valor de mercado estimado em 1,4 bilhões de dólares (Demain, 2000b), o ácido cítrico é o segundo maior produto biotecnológico em termos de volume de produção, perdendo apenas para o etanol (Wilke, 1999). Embora o ácido cítrico seja utilizado também na fabricação de detergentes, medicamentos e cosméticos, os setores de alimentos e bebidas são os responsáveis pela utilização da maior parte do ácido cítrico produzido (Roehr *et al.*, 1996a).

O ácido cítrico foi inicialmente produzido em escala comercial na Itália e Sicília por meio de extração e purificação a partir de frutas cítricas. Por muitos anos, a Itália manteve o monopólio da produção de ácido cítrico, praticando preços elevados. Este monopólio foi quebrado quando o processo microbiológico utilizando o fungo *Aspergillus niger* foi desenvolvido, resultando em queda acentuada nos preços. Hoje em dia, virtualmente todo o ácido cítrico disponibilizado no mercado é produzido por fermentação (Brock *et al.*, 1994; Roehr *et al.*, 1996a).

Existem dois tipos de processos empregados para a produção de ácido cítrico por via fermentativa: submerso e em superfície. Os processos de fermentação em superfície podem ser ainda subdivididos, de acordo com o estado físico do meio de cultura utilizado, em: sólido e líquido.

As fermentações conduzidas na superfície de meios líquidos representam o método original e mais antigo empregado na produção de ácido cítrico. Apesar do desenvolvimento de métodos mais sofisticados, esta técnica ainda é empregada para a produção de ácido cítrico devido à simplicidade de instalação e operação, e aos baixos custos energéticos (Grewal e Kalra, 1995). Estima-se que

cerca de 20 % da produção mundial de ácido cítrico seja obtida através de fermentações conduzidas na superfície de meios líquidos (Brock *et al.*, 1994; Roehr *et al.*, 1996a).

Com relação ao uso de meios sólidos para fermentações em superfície, Grewal e Kalra (1995) descrevem o processo Koji como uma das técnicas mais simples para a obtenção de ácido cítrico. Neste processo, resíduos de materiais amiláceos são umedecidos, esterilizados e dispostos em bandejas que, depois de serem inoculadas com conídios de *Aspergillus niger*, são cultivadas em câmaras com temperatura e umidade controladas. Apesar deste método não ser empregado em escala industrial (Grewal e Kalra, 1995), muita atenção tem sido dada ao uso de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de ácido cítrico através de fermentações em estado sólido conduzidas em escala laboratorial (Pandey *et al.*, 2000).

Cerca de 80% da produção mundial de ácido cítrico é obtida empregando-se processos de fermentação submersa (Brock *et al.*, 1994; Roehr *et al.*, 1996a). Estes processos requerem menos espaço, menor mão de obra e proporcionam maiores taxas de produção (Grewal e Kalra, 1995). A fermentação é conduzida em fermentadores aerados do tipo torre ou STR, feitos de aço inoxidável para impedir a lixiviação de metais pesados que interferem na produção de ácido cítrico (Brock *et al.*, 1994; Grewal e Kalra, 1995).

Embora vários microorganismos (fungos, leveduras e bactérias) possam ser utilizados para a obtenção de ácido cítrico, o fungo *Aspergillus niger* é o catalisador de excelência devido à facilidade de manuseio, habilidade para utilizar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e altos rendimentos (Grewal e Kalra, 1995).

Embora várias matérias-primas possam ser utilizadas como fontes de carboidratos para a elaboração do meio de fermentação, elevadas concentrações (120 – 250g/l) de açúcares facilmente metabolizáveis pelo fungo, como glicose e sacarose, favorecem a obtenção de melhores rendimentos e taxas de produção (Roehr *et al.*, 1996a). Além disso, a composição do meio de cultivo em termos de elementos-traço é um dos principais fatores que afetam a produção de ácido cítrico. Em particular, as concentrações de manganês, ferro, cobre e zinco devem ser controladas rigidamente. Tanto o excesso quanto a ausência destes elementos no meio de fermentação afetam fortemente o rendimento da fermentação (Yigitoglu, 1992; Demain, 2000b).

Com relação à suplementação do meio de cultivo, a utilização de sais de amônio (sulfato, nitrato, etc.) é preferida devido ao seu consumo provocar queda no pH do meio, um pré-requisito adicional para a obtenção de bons rendimentos e taxas de produção (Yigitoglu, 1992). De acordo com Grewal e Kalra (1995), a suplementação do meio de cultivo com pequenas quantidades (1-3%) de álcoois (metanol, etanol) e lipídeos (óleos vegetais, ácidos graxos) também proporciona melhora na produção.

Com relação à condução da fermentação, dois parâmetros de cultivo merecem atenção especial: pH e aeração.

Com relação ao pH, a manutenção de baixos valores (1,7 – 2,0) é requerida para a máxima produção de ácido cítrico. Além de favorecer o crescimento de possíveis contaminantes, elevados

valores de pH ( $\text{pH} > 2,0$ ) favorecem a produção dos ácidos oxálico e glicônico em detrimento da produção de ácido cítrico (Grewal e Kalra, 1995; Demain, 2000b).

Com relação à aeração, a produção de ácido cítrico é um processo aeróbio e, de acordo com Grewal e Kalra (1995), os valores críticos de tensão de oxigênio dissolvido no meio de fermentação situam-se em torno de 9–10% e de 12–13% da saturação com ar para as fases de crescimento e produção, respectivamente.

Embora o ácido cítrico seja um produto do metabolismo primário, formado no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, a fermentação ocorre em duas fases distintas: Na primeira fase, trofofase, uma parte do açúcar presente no meio de fermentação é utilizada para a produção de biomassa e a outra parte é convertida em  $\text{CO}_2$  através de respiração. Na segunda parte, idiofase, o restante do açúcar presente no meio é convertido em ácidos orgânicos com perda mínima através de respiração (Brock et al., 1994).

## Ácido acético

Embora o ácido acético seja produzido em grandes quantidades através de processos petroquímicos e utilizado para diversas aplicações (Huang et al., 2002), a presente discussão trata da produção de vinagre através da fermentação oxidativa de etanol também obtido por fermentação. Estima-se que cerca de 1,9 milhões de litros de vinagre contendo cerca de 10 % de ácido acético (aproximadamente 190.000 toneladas de ácido acético) sejam produzidas anualmente através de processos fermentativos (Ebner et al., 1996). O vinagre assim obtido é utilizado principalmente como condimento de cozinha ou para a fabricação de molhos, ketchup e maionese (Ory et al., 2002).

A produção de vinagre a partir de soluções hidroalcoólicas é conhecida há pelo menos 10 mil anos, quando romanos e gregos o obtinham por fermentação espontânea do vinho deixado em contato com o ar (Crueger e Crueger, 1989). Há cerca de 200 anos, teve início o aprimoramento tecnológico da produção de vinagre com o advento do processo francês. Através deste processo, o vinagre era lentamente obtido através do cultivo de bactérias acéticas na superfície de vinho contido em barris, os quais eram mantidos em posição horizontal e apresentavam aberturas laterais para facilitar a passagem de ar (Crueger e Crueger, 1989; Zancanaro Jr., 2001). No século 19, a fermentação em superfície foi aprimorada, resultando no processo alemão, introduzido em 1832. Utilizando um reator de escoamento conhecido como vinagreira, a mistura vinho/vinagre era passada continuamente através de um leito contendo bactérias acéticas imobilizadas em material com elevada área superficial, encontrando ar atmosférico em contracorrente (Ebner et al., 1996; Zancanaro Jr., 2001). Na década de 50, o desenvolvimento e a implementação do processo de fermentação submersa ocasionaram uma revolução na produção de vinagre em escala industrial (Crueger e Crueger, 1989; Ebner et al., 1996; Zancanaro Jr., 2001). Neste contexto, a fábrica Heinrich Frings-Bonn, localizada na Alemanha, desenvolveu um papel fundamental para o aprimoramento deste processo com o

desenvolvimento de um acetificador altamente eficiente, chamado Acetator Frings. Este acetificador é utilizado em mais de 50 países (Ebner et al., 1996; Zancanaro Jr., 2001).

Hoje em dia, virtualmente todo o vinagre produzido em escala industrial é obtido através de cultivos submersos. O modo empregado para a condução da fermentação é o semicontínuo. Ao se completar a acetificação, com uma concentração residual de etanol em torno de 0,2%, descarrega-se cerca de 1/3 do volume do meio fermentado, que segue para processamento final. O acetificador é novamente carregado com meio não fermentado até o seu volume de trabalho, reiniciando-se o ciclo (Zancanaro Jr., 2001).

A oxidação de etanol em ácido acético é processada por uma cultura mista de bactérias acéticas. Preferivelmente, emprega-se uma microflora mista de *Acetobacter*, contendo diferentes espécies e/ou cepas da mesma espécie (Zancanaro Jr., 2001). Entretanto, diferentes cepas de *Gluconobacter* e *Frateria* são normalmente encontradas como constituintes das microfloras utilizadas em plantas industriais de produção de vinagre (Ebner et al., 1996). Embora a classificação de bactérias acéticas seja bastante problemática (Ebner et al., 1996), estima-se que cerca de 20 cepas das espécies *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. acidophilum*, *A. polyoxogenes*, *A. hansenii* e *A. liquefaciens* sejam as principais responsáveis pelas acetificações submersas industriais (Zancanaro Jr., 2001).

Os vinagres são classificados de acordo com a matéria-prima utilizada para o seu preparo. Por exemplo: O vinagre de álcool é obtido a partir da acetificação de álcool destilado e diluído. O vinagre de vinho é obtido a partir da acetificação de vinho de uvas, etc. (Ebner et al., 1996).

Como regra geral, soluções hidroalcoólicas não destiladas (vinhos de frutas, vinhos de cereais, etc) não requerem a adição de nutrientes para a elaboração da calda antes da acetificação. Estas soluções já contêm os nutrientes requeridos pelas bactérias acéticas e a fermentação alcoólica prévia também contribui para o enriquecimento da calda. Por outro lado, soluções hidroalcoólicas preparadas com álcool destilado (etanol, cachaça, etc.) requerem a adição de diversos nutrientes (glicose, minerais, fosfato de amônio, elementos-traço) para a elaboração da calda previamente à acetificação (Ebner et al., 1996; Zancanaro Jr., 2001). Além disso, se for necessário adicionar água para o preparo da calda, esta deve ser potável, de baixa dureza, livre de sedimentos e isenta de cloro (Zancanaro Jr., 2001).

As bactérias acéticas são aeróbias estritas e a interrupção da aeração durante qualquer fase da fermentação submersa pode provocar sérios danos na produção de vinagre, dependendo da concentração total (etanol + ácido acético) e do tempo de interrupção da aeração. Quanto maior a interrupção da fermentação e quanto maior a concentração total, maior o efeito prejudicial. Por exemplo, em uma concentração total de 5%, uma perda de viabilidade celular de 34% ocorre após a interrupção da aeração por dois minutos, enquanto o mesmo percentual de queda na viabilidade celular é observado após a interrupção da aeração por 10–20 segundos em uma concentração total de 12% (Crueger e Crueger, 1989; Ebner et al., 1996).

Perdas na viabilidade celular também são observadas se a fermentação é conduzida até a exaustão completa de etanol, e se ocorrerem atrasos na adição de calda recém-preparada ao acetificador. De maneira semelhante ao efeito determinado pela interrupção da aeração, o efeito da exaustão de etanol também depende da concentração total e do tempo (Ebner *et al.*, 1996). Além disso, a exaustão de etanol pode determinar a oxidação indesejável do ácido acético formado em  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ , dependendo dos microorganismos presentes na microflora mista (Ebner *et al.*, 1996). A concentração crítica de etanol que determina o momento de corte no processo semicontínuo situa-se em torno de 0,2% (Crueger e Crueger, 1989).

## Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico não volátil, sem odor e de sabor suave. Este ácido está presente em muitos alimentos, seja naturalmente ou como produto de fermentação *in situ*, e é um dos principais intermediários do metabolismo em diversos organismos (Datta *et al.*, 1995). Podendo ser obtido por fermentação ou síntese química, o ácido láctico tem uma história antiga de uso como acidulante e flavorizante na produção de diversos alimentos (Chotani *et al.*, 2000), e como intermediário na síntese de derivados empregados pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (Liu, 2003). Mais recentemente, este ácido passou a ser utilizado também para a polimerização em ácido polilático, um polímero biodegradável (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000).

Devido à sua estrutura química, o ácido láctico ocorre em duas formas isoméricas: ácido L (+) láctico e ácido D (-) láctico. Ambas as formas isoméricas podem ser utilizadas para a síntese de polímeros com diferentes propriedades (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000). Por outro lado, sob o ponto de vista nutricional, o uso ou a formação (por fermentação) de ácido D (-) láctico em alimentos e bebidas é indesejável uma vez que esta forma isomérica não é facilmente metabolizada por mamíferos, incluindo humanos (Liu, 2003). Além disso, o consumo excessivo de ácido D (-) láctico pode levar a distúrbios médicos (Liu, 2003) e não é recomendado na alimentação de bebês e crianças (WHO, 1974).

Até pouco tempo atrás (início da década de 90), a produção de ácido láctico em escala comercial era considerada uma tecnologia madura, com uma produção global média em torno de 40 mil toneladas por ano (Datta *et al.*, 1995). Até então, tanto a fermentação quanto a síntese química eram igualmente utilizadas em escala industrial (Datta *et al.*, 1995). De acordo com Wilke (1995), o ácido L (+) láctico obtido por fermentação era destinado principalmente para o uso como acidulante em alimentos processados. Por outro lado, o ácido láctico obtido por síntese química era utilizado principalmente para a produção de derivados devido à maior pureza química, apesar de sua natureza racêmica.

O emprego de síntese química para a produção de ácido láctico em escala industrial foi largamente substituído pelo processo fermentativo, baseado no cultivo anaeróbio de *Lactobacillus*

(Demain, 2000b). Cerca de 90% da produção mundial é obtida por fermentação, enquanto o restante é obtido sinteticamente através da hidrólise de lactonitrila (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000). Rendimentos, concentrações e produtividades da ordem de 95%, 100g/l e 2g/lh, respectivamente, são obtidos em escala industrial (Demain, 2000b). A produção global nos dias atuais é estimada como sendo em torno de 100 mil toneladas por ano, com um valor de mercado da ordem de 150 milhões de dólares (Demain, 2000b).

As bactérias lácticas são os catalisadores preferidos para a produção de ácido láctico (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal). Atualmente, estas bactérias são compostas pelos seguintes gêneros de bactérias gram-positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Liu, 2003).

Em geral, as bactérias lácticas são anaeróbias facultativas. Devido à tolerância ao oxigênio, a exclusão completa deste elemento durante as fermentações não é um requisito absoluto (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000). A temperatura ótima de crescimento varia entre 20 e 45°C, dependendo do microorganismo considerado (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000). Estas bactérias exibem baixa atividade proteolítica e lipolítica, e apresentam capacidade limitada de biosíntese, requerendo a adição de aminoácidos e vitaminas do complexo B ao meio de cultivo para crescimento (Caplice e Fitzgerald, 1999).

Incapazes de sintetizar ATP por meio de respiração, as bactérias lácticas obtêm energia através de fosforilação ao nível de substrato (Caplice e Fitzgerald, 1999). Dependendo das vias metabólicas utilizadas durante o metabolismo de açúcares, a fermentação pode ser homolática (ácido láctico obtido como único produto do metabolismo), heterolática ( $\text{CO}_2$ , etanol e/ou acetato obtidos como subprodutos do metabolismo, ao lado de ácido láctico) ou de ácidos mistos ( $\text{CO}_2$ , etanol e/ou acetato, e formato obtidos como subprodutos do metabolismo, ao lado de ácido láctico). Além disso, dependendo das condições prevalentes durante o cultivo, o metabolismo de açúcares pelas bactérias lácticas pode ser alterado, resultando em subprodutos adicionais (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000). Em teoria, bactérias homofermentativas como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e alguns *Lactobacillus* produzem 2 moles de lactato e 2 moles de ATP por mol de glicose consumida (Chotani *et al.*, 2000).

A proporção entre os isômeros, L (+) e D (-), obtidos durante a fermentação varia com o gênero e, dentro de um mesmo gênero, com a espécie do microorganismo. Ácido L (+) láctico é produzido por *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, e *Vagococcus*. Ácido D (-) láctico é produzido por *Leuconostoc* e *Oenococcus*. Microorganismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Weissella* produzem ambas as formas isoméricas, isolada ou conjuntamente, dependendo da espécie considerada e das condições de cultivo (Liu, 2003).

Por outro lado, o pH do meio de fermentação também pode afetar o padrão de fermentação exibido pelas bactérias lácticas, dependendo da espécie considerada. Por exemplo: *Lactobacillus*

*bulgaricus* é homofermentativo em pH ácido, porém se torna heterofermentativo em pH alcalino. Além disso, as bactérias lácticas podem desviar o fluxo do metabolismo de açúcares em direção à formação de exopolissacarídeos como resposta a variações no pH do meio (Liu, 2003).

A escolha do microorganismo a ser utilizado para a produção de ácido láctico depende grandemente do substrato utilizado para o preparo do meio de fermentação. Por exemplo: *Lactobacillus delbrueckii* é o catalisador preferido quando glicose ou sacarose são utilizadas como substrato. Por outro lado, *Lactobacillus bulgaricus* é o catalisador preferido quando lactose é utilizada como substrato. Enquanto o primeiro não é capaz de utilizar lactose como fonte de carbono e energia, o segundo não consegue assimilar sacarose (Kascak *et al.*, 1996). Vários substratos têm sido utilizados para a obtenção de ácido láctico em escala laboratorial. Um produto com maior grau de pureza é obtido quando se utiliza um açúcar puro para se preparar o meio de fermentação, o que resulta em menores custos de purificação. Entretanto, o uso de resíduos agroindustriais (soro de queijo, melaços, amido e materiais lignocelulósicos) para o preparo do meio de fermentação é preferido para aplicações em escala industrial devido ao baixo valor de mercado do ácido láctico (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000).

Com relação à fermentação, o parâmetro mais importante para o cultivo de bactérias lácticas é o pH do meio de fermentação. Para a ótima produção de ácido láctico, o pH deve ser mantido entre 5,5 e 6,0 (Kascak *et al.*, 1996). O controle do pH pela adição de álcalis (carbonato de cálcio, hidróxido de amônio) ao meio é tradicionalmente empregado. Por outro lado, a remoção simultânea do ácido à medida que é produzido, por meio de técnicas de extração, adsorção ou eletrodialise, também vem sendo estudada (Hofvendahl e Hahn-Hägerdal, 2000).

## Ácido glicônico

O ácido glicônico é um ácido orgânico que apresenta pequenas toxicidade e ação cáustica, sendo capaz de formar complexos solúveis com íons metálicos divalentes e trivalentes em soluções aquosas. Devido a estas características, é amplamente utilizado na indústria de laticínios e na fabricação de bebidas, para prevenir a formação de precipitados indesejáveis, e na produção de diversos alimentos, para realçar o sabor e complexar traços de metais pesados (Roehr *et al.*, 1996b). A  $\alpha$ -gliconolactona, intermediário formado durante a oxidação de glicose em ácido glicônico, também pode ser utilizada em substituição a este ácido, sendo preferida quando uma ação acidulante lenta é desejada (aditivos para panificação, produção de embutidos, coagulação de proteína de soja para produção de tofu, etc.) (Roehr *et al.*, 1996b). O principal produto comercializado, entretanto, é o sal sódico de ácido glicônico, que pode formar complexos com íons metálicos em soluções alcalinas. Este sal é utilizado para remover óxidos de metais pesados formados em superfícies metálicas, para remover tintas e vernizes de vários objetos, em soluções alcalinas próprias para lavagem de vasilhames, e como aditivo

na produção de concreto. Cerca de 80% da produção mundial é comercializada como gliconato de sódio (Roehr *et al.*, 1996b).

Existem diferentes processos químicos para a obtenção de ácido glicônico, compreendendo a oxidação de glicose por meios químicos, eletroquímicos ou catalíticos. A principal desvantagem destes processos refere-se aos baixos rendimentos, ocasionados pela formação inevitável de subprodutos indesejáveis. Devido a isto, a especificidade da reação bioquímica proporcionada pelo uso de biocatalisadores faz da fermentação a via de excelência para a produção de ácido glicônico em escala industrial (Roehr *et al.*, 1996b; Bao *et al.*, 2001). A produção global nos dias atuais é estimada como sendo em torno de 40.000 toneladas por ano, com um valor de mercado da ordem de 93 milhões de dólares (Demain, 2000b).

Apesar de vários microorganismos (especialmente fungos filamentosos e bactérias oxidativas) serem capazes de oxidar glicose em ácido glicônico, o fungo *Aspergillus niger* é o catalisador utilizado na maior parte dos processos operados em escala industrial (Roehr *et al.*, 1996b).

A conversão de glicose em ácido glicônico por *Aspergillus niger* é bastante direta. O passo inicial consiste na oxidação de glicose em  $\alpha$ -gliconolactona, catalisada pela flavoproteína glicose oxidase com redução simultânea de  $O_2$  em  $H_2O_2$ . A  $\alpha$ -gliconolactona formada é posteriormente hidrolisada, pela ação da enzima lactonase ou espontaneamente, em ácido glicônico. O  $H_2O_2$  formado é re-convertido em  $O_2$  pela ação de catalases (Roehr *et al.*, 1996b). Estudos realizados por Witteveen *et al.* (1992) demonstraram que tanto a glicose oxidase quanto diferentes catalases são enzimas constitutivas presentes na parede celular do fungo *Aspergillus niger*.

O controle do pH durante a produção de ácido glicônico é muito importante, sendo feito pela adição de álcalis ao meio durante a fermentação. Dependendo da base adicionada para o controle do pH durante a fermentação, pode-se obter gliconato de cálcio (adição de carbonato de cálcio para controle do pH) ou gliconato de sódio (adição de hidróxido de sódio para controle do pH). Devido à maior demanda, a produção de gliconato de sódio é a mais utilizada (Roehr *et al.*, 1996b).

Excetuando-se a base utilizada para o controle de pH, os processos de produção de gliconato de cálcio e de gliconato de sódio são bastante semelhantes. Em ambos os casos, fermentadores convencionais de mistura ou tipo torre são utilizados para a produção através de cultivo submerso (Roehr *et al.*, 1996b). Devido ao elevado valor de  $K_m$  da enzima com relação ao oxigênio e à glicose, tanto a tensão de oxigênio dissolvido quanto a concentração de glicose são parâmetros-chave na cinética de formação de gliconato (Reuss *et al.*, 1986). Desta forma, elevadas concentrações de glicose (130 – 150g/l na produção de gliconato de cálcio, e 240 – 380g/l na produção de gliconato de sódio) e aeração vigorosa (1 – 1,5vvm) do meio de fermentação devem ser empregadas (Crueger e Crueger, 1989; Roehr *et al.*, 1996b). O pH do meio de fermentação deve ser mantido em um valor superior a 3,5 (5,5 na produção de gliconato de cálcio, e 6,5 na produção de gliconato de sódio), para evitar a inativação da glicose oxidase (Roehr *et al.*, 1996b). Além disso,

o meio de fermentação deve ser limitante em termos de nitrogênio e fósforo, além de apresentar concentrações suficientes de elementos-traço (Roehr *et al.*, 1996b). Em ambos os processos, rendimentos em torno de 90 – 95% são obtidos em escala industrial (Crueger e Crueger, 1989).

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da FAPESP, da CAPES e do CNPq para o desenvolvimento de projetos de pesquisa.

## Referências

- Bao J, Furumoto K, Fukunaga K, Nakao K. *A kinetic study on air oxidation of glucose catalyzed by immobilized glucose oxidase for production of calcium gluconate*. **Biochemical Engineering Journal**. 8, 91-102, 2001.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. **Biology of Microorganisms**. Prentice-Hall International, New Jersey, 7<sup>th</sup> ed., 385-386, 1994.
- Caplice E, Fitzgerald GF. *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation*. **International Journal of Food Microbiology**. 50, 131-149, 1999.
- Chotani G, Dodge T, Hsu A, Kumar M, LaDuca R, Trimbur D, Weyler W, Sanford K. *The commercial production of chemicals using pathway engineering*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1543, 434-455, 2000.
- Crueger W, Crueger A. **Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology**. Science Tech Publishers, Madison, 2<sup>nd</sup> ed., 134-149, 1989.
- Datta R, Tsai SP, Bonsignore P, Moon SH, Frank JR. *Technologic and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives*. **FEMS Microbiology Reviews**. 16, 221-231, 1995.
- Demain AL. *Microbial technology*. **Trends in Biotechnology**. 18, 26-31, 2000a.
- Demain AL. *Small bugs, big business: the economic power of the microbe*. **Biotechnology Advances**. 18, 499-514, 2000b.
- Ebner H, Sellmer S, Follmann H. Acetic Acid. In: Rehm H.J., Reed G. **Biotechnology**. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2<sup>nd</sup> ed., 381-401, 1996.
- Graham AF, Lund BM. *The effect of citric acid on growth of proteolytic strains of Clostridium botulinum*. **Journal of Applied Bacteriology**. 61, 39-49, 1986.
- Grewal HS, Kalra KL. *Fungal production of citric acid*. **Biotechnology Advances**. 13, 209-234, 1995.
- Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. *Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources*. **Enzyme and Microbial Technology**. 26, 87-107, 2000.
- Huang YL, Wu Z, Zhang L, Cheung CM, Yang ST. *Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor*. **Bioresource Technology**. 82, 51-59, 2002.
- Kascak JS, Kominek J, Roehr M. Lactic acid. In: Rehm HJ, Reed G. **Biotechnology**. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2<sup>nd</sup> ed., 293-306, 1996.
- Liu SQ. *Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations*. **International Journal of Food Microbiology**. 83, 115-131, 2003.
- Ory I, Romero LE, Cantero D. Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. **Journal of Food Engineering**. 52, 31-37.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT, Vandenberghe LPS, Mohan R. *Biotechnological potential of agro-industrial residues: cassava bagasse*. **Bioresource Technology**. 74, 81-87.
- Reuss M, Frohlich S, Kramer B, Messerschmidt K, Pommerening G. *Coupling of microbial kinetics and oxygen transfer for analysis and optimization of gluconic acid production by Aspergillus niger*. **Bioprocess Engineering**. 1, 79-91, 1986.
- Roehr M. *Products of primary metabolism*. In: Rehm HJ, Reed G. **Biotechnology**. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2<sup>nd</sup> ed., vol. 6, 294-401, 1996.
- Roehr M, Kubicek C.P., Kominek J.. Citric acid. In: Rehm H.J., Reed G. **Biotechnology**. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2<sup>nd</sup> ed., 308-345, 1996a.
- Roehr M, Kubicek CP, Kominek J. *Gluconic acid*. In: Rehm HJ, Reed G. **Biotechnology**. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2<sup>nd</sup> ed., 308-345, 1996b.
- Yigitoglu M. *Production of citric acid by fungi*. **Journal of Islamic Academy of Sciences**. 5, 100-106, 1992.
- WHO. *Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, and thickening agents*. **WHO Food Additives series**, 5, 461-465, 1994.
- Wilke D. *What should and what can biotechnology contribute to chemical bulk production?* **FEMS Microbiology Reviews**. 16, 89-100, 1995.
- Wilke D. *Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 52, 135-145, 1999.
- Witteveen CFB, Veenhuis M, Visser J. *Location of glucose oxidase and catalase activities in Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**. 58, 1190-1194, 1992.
- Zancanaro Jr O. Vinagres. In: Aquarone E., Borzani W., Schmidell W., Lima U.A. **Biotecnologia Industrial**. Editora Edgard Blücher Ltda. 1<sup>st</sup> ed., vol. 4, 183-208, 2001.