MANIPUEIRA COMO MEIO DE CULTIVO E FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Aspergillus niger*

MAGALI LEONEL

Bióloga

Orientadora: Marney Pascoli Cereda

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura «Luiz de Queiroz», da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de Concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

- Leonel, Magali
L583m Manipueira como meio de cultivo e fermentação na
produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.
Piracicaba, 1993.
55p.
- Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia
1. Acido cítrico - Produção 2. Aspergilo 3. Mani-
pueira como meio de cultivo I. Escola Superior de
Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba

CDD ` 589.24

**MANIPUEIRA COMO MEIO DE CULTIVO E FERMENTAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Aspergillus niger***

MAGALI LEONEL

Aprovada em: 22.02.1994

Comissão Julgadora:

Profa.Dra. Marney Pascoli Cereda

FCA/UNESP

Profa.Dra. Marília Detterer

ESALQ/USP

Dr. Gerard Chuzel

CIRAD/UNESP

PROFa.DRa. MARNEY PASCOLI CEREDA
Orientadora

A Deus

OFEREÇO

Aos meus pais Vera e Francisco,
pela confiança e amor que a mim
dedicam.

As minhas irmãs Sarita e Flávia,
pelos momentos de amizade, com-
preensão e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho, e, em especial:

- a **Profa.Dra. Marney Pascoli Cereda**, pela orientação recebida e, antes de tudo, pela sua amizade, atenção e estímulo;
- a **Profa.Dra. Marília Oetterer**, pela co-orientação, amizade e incentivo tão oportunos;
- ao **Departamento de Tecnologia dos Produtos Agropecuários**, da **Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu**, por haver cedido suas instalações para a execução deste trabalho;
- ao **Conselho de Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, ESALQ - USP - Piracicaba**, pela oportunidade que me deram de realizar o curso de mestrado nesta Instituição;
- a **Secretária Regina Lúcia de M. Lourenço** do **Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, ESALQ - USP - Piracicaba**, pelo seu auxílio, carinho e atenção;
- aos técnicos de laboratório **Sr. Benedito Heliodoro** do **Departamento de Solos** e o **Sr. Francisco Rossi** do **Departamento de Tecnologia dos Produtos Agropecuários, FCA-UNESP-Botucatu**, pelas análises físico-químicas do substrato;

- a Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas-SF, pela concessão da linhagem de *Aspergillus niger*;
- à colega Elizabeth Orika Ono por sua amizade e pela execução dos serviços de computação;
- aos colegas de Mestrado, pelo auxílio e pelos momentos de amizade, vivenciados durante o curso;
- a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido, o qual permitiu a realização do Curso de Mestrado.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. O agente <i>Aspergillus niger</i>	04
2.2. A biossíntese do ácido cítrico	05
2.3. O substrato manipueira	10
3. MATERIAL E METODOS	17
3.1. Linhagem utilizada	17
3.2. Planejamento da pesquisa	18
3.3. Caracterização físico-química dos meios de manipueira	19
3.4. Experimento I	19
3.5. Experimento II	23
3.6. Meios de cultura e soluções usadas ...	24
3.7. Dosagem de cianeto na presença de glicose	27

3.8. Avaliação do crescimento da linhagem CCT0917 de <i>Aspergillus niger</i> em meio de cultivo com adição de cianeto	27
3.9. Análise estatística	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. Adaptação do microorganismo a manipueira	29
4.2. O substrato manipueira	30
4.3. Produção de conídios	39
4.4. Produção de ácido cítrico	42
5. CONCLUSÕES	48
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Fórmula estrutural da linamarina	12
2. Via geral de biossíntese de cianoglicosídeos	13
3. Variação do pH e acidez da manipueira com o tempo de armazenamento	32
4. Variação nos teores de cianeto total na manipueira e no meio de manipueira	36
5. Variação nos teores de cianeto livre na manipueira e no meio de manipueira	37
6. Variação nos teores de cianeto livre e total no meio de manipueira	38
7. Produção de conídios pela linhagem CCT 0917 de <i>A. niger</i> nos três meios de cultura	41
8. Produção de ácido cítrico pela linhagem CCT 0917 de <i>A. niger</i> nos dois meios de fermentação com pH 2,0 (Experimento I)	44
9. Produção de ácido cítrico pela linhagem CCT 0917 de <i>A. niger</i> nos três meios de fermentação (Experimento II)	46

LISTA DE TABELAS**Página**

1. Características físico-químicas da manipueira	15
2. Características físico-químicas da matéria-prima manipueira coletada na indústria e armazenada a temperatura ambiente por 0, 24, 48 e 72 horas	31
3. Características físico-químicas do meio de manipueira nos quatro tempos de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente (Experimento I)	33
4. Características físico-químicas do meio de manipueira nos três tempos de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente (Experimento II)	34
5. Características físico-químicas do ágar manipueira nos três tempos de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente	35
6. Valor médio da produção de conídios por mililitro e respectivos níveis de significância da linhagem CCT 0917 de <i>A. niger</i> nos três meios de cultura	40

7. Valor médio da produção de ácido
cítrico (g/l) e respectivos níveis de
significância da linhagem CCT 0917 de
A. niger nos dois meios de fermentação 43
8. Valor médio da produção de ácido
cítrico (g/l) e respectivos níveis de
significância da linhagem CCT 0917 de
A. niger nos três meios de fermentação 45

**MANIPUEIRA COMO MEIO DE CULTIVO E FERMENTAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO POR *Aspergillus niger***

Autora: MAGALI LEONEL

Orientadora: PROFa.DRa. HARNEY PASCOLI CEREDA

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar o uso da manipueira, resíduo líquido resultante da prensagem da massa ralada de mandioca, como meio de cultivo e fermentação na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. A manipueira é um resíduo que apesar de tóxico, apresenta em sua composição nutrientes necessários ao desenvolvimento do fungo. Os meios de manipueira foram comparados nas mesmas condições, a meios sintéticos, utilizados tradicionalmente.

Em se tratando de proposta de um novo substrato, foi estudado o armazenamento do resíduo a temperatura ambiente por 72 h, e realizada a caracterização físico-química dos meios de manipueira em todos os ensaios.

O trabalho foi dividido em dois experimentos. No experimento I realizou-se a adaptação do agente ao subs-

trato manipueira e avaliou-se a produção de ácido cítrico nos meios sintéticos e de manipueira com ajuste de pH. No experimento II, foi analisada a produção de conídios e de ácido cítrico nos meios sintético e de manipueira sem o ajuste de pH. Realizou-se também ensaio de dosagem de cianeto em presença de glicose e avaliação do crescimento do fungo em meio sintético com adição de cianeto.

Verificou-se que a produção de conídios foi superior no ágar manipueira. No experimento I a produção de ácido cítrico não diferiu, quanto ao meio, e no Experimento II foi 38,4% inferior no meio de manipueira com 24 h de armazenamento do resíduo, quando comparado ao meio sintético.

Não foi observado crescimento do fungo nos meios de manipueira com concentrações acima de 70 mg/l de cianeto. Observou-se também que a glicose adicionada à manipueira na elaboração dos meios não interferiu na dosagem de cianeto, pelo método utilizado.

Os resultados obtidos mostraram a necessidade de maiores estudos para viabilizar o uso da manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico.

**CITRIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus niger*
FROM "MANIPUEIRA", A MANIOC LIQUID RESIDUE**

Author: MAGALI LEONEL

Adiviser: PROFa.DRa. MARNEY PASCOLI CEREDA

SUMMARY

This research was made to evaluate the manipueira as culture medium and fermentation on citric acid biosynthesis by *Aspergillus niger*. The substrate manipueira is the water from pressed manioc, a residue which, in spite of the presence toxic substances, in its composition, has nutrients to fungus growing. The manipueira medium was compared in the same conditions, to the synthetical medium, traditionally used in citric acid fermentation process.

The residue was kepted at environment temperature during 72 h, and the physical-chemical characterization was made all of experiments.

This research was splited in two experiments. In the experiment I it were studied the adaptation of the agent for manipueira substratum and citric acid production

on synthetic medium and manipueira medium on with pH adjust. In the experiment II, it was analized the conidium production and the citric acid production at synthetic medium and manipueira medium. Also, it was observed the cyanide dosage in glucose presence and the fungus growing in synthetical medium with cyanide addition.

It was observed the highest conidium production in agar manipueira. In the experiment I the citric acid production did not change in the different medium and in the experiment II the citric acid production from manipueira medium was 38,4% lower than synthetic medium.

The fungus did not grown in the manipueira medium with concentrations about 70 mg/l of cyanide. Also, it was observed that glucose added to manipueira did not change the cyanide dosage.

The results showed the necessity of more researches to viability the manipueira utilization as susbtratum to the citric acid biosynthesis.

1. INTRODUÇÃO

A produção de ácido cítrico por fermentação é conhecida desde 1893, quando Wehmer relatou sua ocorrência em fungos atualmente classificados como pertencentes ao gênero *Penicillium*. Após este trabalho pioneiro outros fungos foram relatados como acumuladores deste importante metabólito (BONATELLI Jr., 1977).

Atualmente o ácido cítrico é quase que exclusivamente obtido através de processos de biossíntese utilizando como agente biológico o fungo imperfeito *Aspergillus niger*. Dois processos são utilizados na biossíntese deste ácido: a fermentação de superfície e a submersa, que se diferenciam essencialmente pelo modo de crescimento do microorganismo.

O ácido cítrico é utilizado em grande escala pelas indústrias de alimentos, refrigerantes, produtos

farmacêuticos, além de outras em que o íon citrato propicia a formação de uma variedade de moléculas complexas que possuem a capacidade de sequestrar e inativar íons metálicos. Devido a isto, controlam efeitos indesejáveis numa reação, que poderiam ocasionar alterações de cor, aparência, estabilidade, etc, prejudicando o produto final (CABELLO, 1991).

As inovações nos processos de produção de ácido cítrico são de difícil acesso. Geralmente as condições de cultura não são de domínio público, sendo protegidas por patentes, na maioria das vezes, pouco detalhadas.

O Brasil possui em funcionamento a FERMENTA S.A. uma fábrica no Estado de São Paulo que supre grande parte da demanda, abastecendo o mercado interno, principalmente a indústria alimentícia. Por outro lado, é importador de ácido cítrico com maior grau de pureza, cuja produção é tida como inviável economicamente devido ao consumo ainda restrito (DWYER, 1984).

Um dos problemas enfrentados na produção de ácido cítrico por fungos é o custo do processo, onde o meio de cultivo e de fermentação representam um alto percentual. Numa tentativa de barateamento do processo, tem-se utilizado resíduos industriais como meio de cultivo para microorganismos.

A escolha de um resíduo como substrato permite diminuir o custo do processo e ao mesmo tempo que se apresenta como alternativa, para redução da poluição ambiental.

Estuda-se o uso da manipueira, resíduo líquido resultante do processo de fabricação da farinha de mandioca ou da extração da fécula, como substrato para biossíntese do ácido cítrico pelo fato de se tratar de um resíduo rico em carboidratos, o que resulta em alta carga poluente quando descartada no meio ambiente. Esta poluição é causada tanto pela elevada carga orgânica como pelo cianeto, liberado através da hidrólise de glicosídeos cianogênicos presentes na manipueira.

Para viabilizar a manipueira como substrato viável para a biossíntese de ácido cítrico, propõe-se como hipótese que a indústria situe-se próxima à região processadora de raízes de mandioca. Supondo uma distância máxima de 100 Km, imagina-se que o substrato permanecerá sem esterilização por um período máximo de 72 horas, incluindo o transporte e a espera pelo processamento.

Neste raciocínio, o presente trabalho, foi conduzido com o objetivo de utilizar a manipueira estocada como meio de cultivo e fermentação para produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

São abordados três tópicos: o agente *Aspergillus niger*, a biossíntese do ácido cítrico e o substrato manipueira.

2.1. O agente *Aspergillus niger*

PONTECORVO (1952) usando a técnica descrita por ROPER (1952), constatou ocorrência do ciclo parassexual nesta espécie, após o isolamento de diplóides heterozigotos e da segregação não ao acaso das marcas genéticas utilizadas.

A espécie é descrita por RAPER & FENNELL (1965) como organismo tipo, de um grupo bastante heterogêneo e que inclui os fungos saprofíticos mais comuns. Citam como

suas características em meio de Czapek sólido: 1) esterigmas em duas séries, 2) colônias (conídios) de coloração negro carvão a olho nú e 3) conídios globosos com aspecto rugoso, sem equinolações verdadeiras e com menos de 5 micrômetros de diâmetro na maturidade. Citam também, que não foi descrito ciclo sexual, sendo o *A. niger* portanto, um fungo imperfeito.

KALYANI et alii (1969) após observarem a reversão de deficiências nutricionais com o tratamento de conídios com DNA extraído da linhagem paternal prototrófica, sugerem a existência de fenômeno semelhante à transformação bacteriana nesta espécie.

Com relação à ocorrência de conídios binucleados, BARACHO et alii (1975), estudaram diversas linhagens de *A. niger* e constataram que a porcentagem de binucleados varia entre as diferentes linhagens.

AZEVEDO & BONATELLI Jr. (1983), observaram maior frequência de recombinação mitótica do que a obtida por Lhoas em 1961. A este fenômeno, caracterizado por um estado diplóide seguido da formação de grande número de recombinantes, deu-se o nome de paramiose.

2.2. A biossíntese do ácido cítrico

Tem-se encontrado muitas aplicações específicas para o ácido cítrico e, este apresenta grande potencia-

lidade para novas utilizações, devido principalmente ao fato de não ser tóxico pelos critérios adotados pela "Food and Drug Administration" - USA, e portanto de utilização praticamente irrestrita.

Em 1893 o ácido cítrico foi identificado como produto do metabolismo de microorganismos, mais especificamente de fungos do gênero *Penicillium*. Em 1917 foi observado que o fungo filamentoso *Aspergillus niger* produzia ácido cítrico. Foi também neste mesmo ano, desenvolvido um meio de cultura que possibilitava a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (WARWAR, 1990).

Quanto ao processo de biossíntese, a acumulação de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger* é fortemente influenciada pela composição de nutrientes do meio de cultura, e este efeito é mais pronunciado em cultivos por via submersa conforme estudos sistemáticos relatados por SHU & JOHNSON (1948a) que propuseram esse processo de produção. Até então conhecia-se apenas a via de cultivo em superfície.

SHU & JOHNSON (1948b) observaram que a presença de manganês no meio de esporulação em concentrações de 9,3 mg/l retarda a produção de ácido cítrico em fermentação submersa, e a presença de manganês e extrato de malte no meio de esporulação reduzem a produção de ácido na fermentação submersa, porém não na fermentação em superfície.

O efeito dos lipídeos na produção de ácido cítrico por mutantes de *A. niger* foi estudado por MILLIS et alii (1963), os quais observaram que ácidos graxos com menos

de 15 átomos de carbono inibiam o crescimento e não ocorria produção de ácido cítrico. Os óleos naturais com alto conteúdo de ácidos graxos insaturados quando adicionados até 2% (v/v) em meio de fermentação adequado, aumentavam a produção de ácido cítrico em aproximadamente 20%.

SANCHES-MARROQUIN et alii (1970), relataram o efeito que os íons Fe^{++} , Zn^{++} e Cu^{++} causam na produção de ácido cítrico. O trabalho demonstrou ser possível a obtenção de mutantes que continuassem produzindo ácido cítrico mesmo na presença de concentrações elevadas destes íons.

LOCKWOOD (1975) em revisão sobre produção de ácido cítrico por *A. niger*, discutindo os relatos na literatura sobre as influências de fatores do ambiente na produção do metabólito salientou: a) a necessidade de eliminação, na maior intensidade possível, dos metais presentes em concentrações elevadas e b) o cuidado em se evitar a elevação do pH inicial para 3,5 durante a fermentação, pois há o favorecimento do acúmulo de outros ácidos, como o oxálico e o glucônico.

O desempenho de uma linhagem de *A. niger* isolada de vinhoto de cana-de-açúcar na fermentação cítrica foi avaliado por FRANÇA et alii (1984), os quais observaram que a neutralização parcial do ácido cítrico, durante o processo, determinou aumento de produção, e o uso de sulfato de alumínio ou ferrocianeto de potássio, no preparo do meio de fermentação, levou à diminuição do rendimento.

Dentre os fatores que afetam a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, os mais importantes são: acumulação de ácido cítrico, taxa de crescimento, sensibilidade aos metais, resposta ao pH ácido, morfologia celular, capacidade em crescer na presença de fontes de carbono alternativas e susceptibilidade a contaminantes (BIGELIS, 1985).

Como fonte de carboidratos geralmente são utilizados somente açúcares, tais como glicose, frutose, sacarose, pois propiciam um melhor rendimento na produção de ácido cítrico. Em muitos casos a sacarose tem sido preferida por apresentar baixo preço e grande pureza. Como o fungo produz a enzima invertase, que extracelularmente hidrolisa a sacarose rapidamente devido a condições ácidas do meio de cultura, não há necessidade de hidrólise prévia do substrato (HOSSAIN et alii, 1984).

Segundo DAWSON & MADDOX (1989), em experimentos realizados em fermentação com concentrações limitadas de fosfato, a produção de ácido cítrico foi inversamente relacionada ao excesso de nitrogênio no meio.

A influência qualitativa e quantitativa de diferentes fontes de carbono para a produção de ácido cítrico foi explorada por XU et alii (1989). Os resultados mostraram que a alta concentração da fonte de carbono está envolvida na indução de alterações para a acumulação de ácido cítrico.

O requerimento nutricional para biossíntese do ácido cítrico por fungo *Aspergillus niger* pode ser resumido nos seguintes tópicos principais:

- alta concentração de açúcar: 140 a 240 g/l
- sais de amônia (sulfato ou nitrato): 2 a 2,5 g/l
- pH: abaixo de 2,0 durante fase ativa de produção do ácido.
- alta tensão de oxigênio no meio: 140 mbar
- ausência em metais interferentes (especialmente Mn^{+2})
- balanço adequado entre fosfatos e os íons Mn^{+2} , Fe^{+2} e Zn^{+2}

Foram obtidos bons resultados utilizando meio de biossíntese com a seguinte concentração de metais: Zn^{+2} - 500 ppb, Fe^{+3} - 110 ppb, Cu^{+2} - 40 ppb, Mn^{+2} - 3ppb. Para outros elementos é usual a utilização do meio básico segundo PRESCOTT & DUNN (1959), que tem a seguinte composição: sacarose - 140 g/l; $NH_4(NO_3)$ - 2,5 g/l; $MgSO_4$ - 0,23 g/l; K_2PO_4 - 1,0 g/l e água deionizada até completar 1 litro. Nesta formulação as quantidades dos sais de amônio e fosfatos propiciam a melhor relação entre o crescimento da biomassa e a conversão ao metabólito desejado.

O barateamento da produção de ácido cítrico por *A. niger* envolve a busca de novas fontes de carboidratos para o substrato da biossíntese e também a busca de novos meios de cultivos. Vários estudos vêm sendo realizados usando outras fontes de carboidratos como: melão de frutas cí-

tricas (GADEN et alii, 1977), águas de lavagem de algodão (KIEL et alii, 1981), polpa de maçã (HANG & WOODAMS, 1989), água residual de extração de proteína vegetal (CHANDA et alii, 1990), melaço de beterraba (ROWKAS & ALICHANIDS, 1991), e manipueira (CABELLO, 1991; LEONEL, 1991).

2.3. O substrato manipueira

Em geral os resíduos agroindustriais são potencialmente interessantes como substrato para processos de biossíntese, por estarem disponíveis a baixo custo.

O processamento das raízes de mandioca, com a finalidade de produzir farinha ou fécula, dá origem a resíduos, dentre os quais a água vegetal ou manipueira.

As raízes de mandioca são classificadas em mandioca mansa ou doce, denominada também popularmente de aipim ou macaxeira, constituída das variedades comestíveis e a mandioca brava ou amarga, que engloba as variedades com mais de 100 ppm de cianeto (CN^-). Alguns autores discutem, todavia, este tipo de classificação, considerando que o teor de cianeto parece estar relacionado a diversos fatores tais como a idade da planta, continuidade de cultivo, altitude, clima e teor de nitrogênio no solo, na região de cultivo, não sendo, portanto, o atributo mais adequado para a caracterização de espécies ou variedades.

A toxicidade decorre da presença, em todas as partes da planta, mas sobretudo nas folhas e na entre-casca, de um beta-D-glucosídeo cianogênico denominado faseololunatosídeo ou linamarina que, por hidrólise, dá origem a glucose, acetona e ácido cianídrico, em quantidades equimoleculares (Figura 1). Este glucosídeo é solúvel e facilmente decomposto por ação enzimática da linamarase endógena, especialmente quando as raízes são arrancadas e fragmentadas. O ácido cianídrico, liberado é um dos biocidas mais potentes conhecidos, atua como inibidor da cadeia respiratória, sendo nocivo a todas as formas de vida aeróbica. Por outro lado, devido à ligação beta glicosídica ser muito forte, o cianeto pode permanecer fixado, mesmo quando submetido a agentes físicos enérgicos.

A linamarase tem pH ótimo entre 5,5 e 6,0 sendo fortemente inibida pela 1,5 gluconoladona. A glicose também pode atuar como antidoto, com a justificativa de que inverteria o sentido da reação, favorecendo a síntese do glucosídeo (OKE, 1968).

Segundo CARVALHO & CARVALHO (1979), parece existir uma estreita relação entre aminoácidos e certos glucosídeos cianogênicos, advindo a possibilidade de que os possíveis precursores destas substâncias sejam os aminoácidos. Através de pesquisas foi demonstrado ser alfa-valina e alfa-isoleucina os possíveis precursores da linamarina e lotaustralina, respectivamente (Figura 2).

As indústrias de farinha de mandioca e as fe-
cularias liberam durante o processo de produção, um efluente
altamente tóxico conhecido como manipueira. Esta água resi-
dual contém matéria orgânica biodegradável que, ao ser lan-
çada em um curso de água, entra em decomposição através da

Figura 1. Fórmula estrutural da linamarina.

Fonte: COOKE (1979).

Figura 2. Via geral de biossíntese de cianoglicosídeos.

Fonte: GOODWIN & MERCER (1983).

ação microbiana, aumentando a demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Nas fábricas de farinha de mandioca, a massa ralada prensada produz cerca de 300 litros de líquido residual por tonelada de raiz e nas fecularias este valor aumenta para 600 litros, embora o efluente seja mais diluído (CEREDA, 1990).

Além da carga poluidora, a manipueira apresenta em média 130 ppm de cianeto, quando originária de uma fecularia e 280 ppm quando originária de uma fábrica de farinha. Esta toxicidade é atenuada com tratamento em lagoas de decantação (CABELLO, 1991).

A manipueira apresenta em média, 91,7% de umidade, pH 5,1, 167 ppm de cianeto total e DQO 48.500 mg/l (FIORETTO, 1987; FERNANDES, 1989 e CABELLO, 1991) (Tabela 1).

CEREDA & FIORETTO (1983) estudaram a fermentação natural de manipueira originária de indústria de processamento de mandioca e constataram que apesar do conteúdo de cianeto, esta apresentava número elevado de microorganismos aeróbios mesófilos o que a tornava passível de utilização como meio de cultivo para fermentação. Esta microflora abundante, permitiu a obtenção de microorganismos adaptados ao meio e resistentes ao cianeto, entre os quais os autores citam o fungo *Aspergillus niger*.

Segundo CEREDA et alii (1981) os microorganismos podem-se desenvolver em substratos contendo cianeto caso possuam metabolismo anaeróbio ou alternativo à cadeia

respiratória, ou serem capazes de detoxicar o cianeto pela cisão do radical em carbono e nitrogênio.

Tabela 1. Características físico-químicas da manipueira.

Variáveis	Autor		
	FIORETTO (1984)	FERNANDES Jr., (1989)	CABELLO (1991)
umidade (%)	92,90	—	90,60
pH	3,90	—	6,40
CN ⁻ total ppm	203,94	—	130,00
fósforo ppm	180,00	300,00	401,00
potássio ppm	1260,00	2052,00	4200,00
cálcio ppm	240,00	230,00	385,00
nitrogênio ppm	—	681,00	2646,00
magnésio ppm	432,00	444,00	640,00
enxofre ppm	210,00	195,00	151,00
ferro ppm	—	8,70	7,80
zinco ppm	—	4,20	4,20
cobre ppm	—	1,30	1,50
manganês ppm	—	5,90	3,90
DBO*	51000,00	—	46000,00

* Demanda Química de Oxigênio

Vários estudos estão sendo realizados, objetivando utilizar resíduos de mandioca na produção de enzimas, lipídeos e ácidos. SICHIERI et alii (1986), utilizaram manipueira para a produção de biomassa por *Trichiosporon* sp.

FIORETTO (1987), utilizou manipueira como meio de cultivo para *Trichosporon cutaneum* na produção de lipídeos, e CABELLO (1991), usou manipueira como substrato na produção de ácido cítrico por *A. niger*.

A análise das características físico-químicas da manipueira (CABELLO & CEREDA, 1989), mostrou que, com exceção do teor de manganês, a concentração dos elementos apresentaram uma proporcionalidade bastante próxima da citada na literatura como adequada para o crescimento do fungo *Aspergillus niger* (KUBICEK & ROHR, 1986) com alto potencial de rendimento na conversão.

CABELLO (1991), analisou o processo de produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em manipueira e concluiu que o substrato poderá ser adequado para este tipo de fermentação.

LEONEL et alii (1991), compararam a esporulação de linhagens de *Aspergillus niger*, cultivadas em meio sintético utilizado para esta finalidade, e cultivadas em ágar-manipueira, constatando uma maior produção de esporos em comparação ao meio sintético.

O custo do tratamento das águas residuárias é elevado, sendo pouco viável para indústrias de médio e grande porte e totalmente inviável para as pequenas fecularias e "casas de farinha", sendo de máxima importância buscar para este líquido uma aplicação que o torne rentável ao industrial, à semelhança do que já ocorre com a água de maceração do milho e a vinhaça.

3. MATERIAL E METODOS

O presente trabalho, foi conduzido no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Tecnologia dos Produtos Agropecuários, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Campus de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

3.1. Linhagem utilizada

A linhagem de *Aspergillus niger* do presente trabalho, foi obtida na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas - SP, sob a sigla CCT 0917.

3.2. Planejamento da pesquisa

O trabalho foi dividido em dois experimentos: Experimento I e II. A manipueira utilizada no trabalho foi obtida na Fábrica de farinha de mandioca da Fazenda Experimental Lageado (FCA - UNESP - Botucatu) e estocada à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), durante 0, 24, 48 e 72 horas no experimento I e 0, 24 e 48 horas no experimento II.

Experimento I: realizou-se a reativação das células liofilizadas (item 3.4.1.), adaptação do microorganismo a manipueira (item 3.4.2.), a produção de ácido cítrico pela linhagem de *A. niger* em meio de manipueira 0, 24, 48 e 72 h, com o pH ajustado para 2,0 e no meio de fermentação sintético com pH 2,0 (item 3.4.3.).

Experimento II: Foi feita a comparação da produção de conídios nos meios: Ágar - manipueira (0, 24 e 48 h) e Ágar Czapek (item 3.5.1.), e também a produção de ácido cítrico pela linhagem de *Aspergillus niger*, sem ajuste de pH, no meio de manipueira (0, 24 e 48 h) e no meio de fermentação de PRESCOTT & DUNN (1959), para fins de comparação (item 3.4.3.).

Os meios de manipueira utilizados no trabalho foram caracterizados quanto a composição físico-química, para os tempos de armazenamento, nos dois experimentos. Foi feito também a caracterização da manipueira matéria-prima utilizada no preparo dos meios, para fins de comparação.

3.3. Caracterização físico-química dos meios de manipueira

Durante a realização da pesquisa, utilizou-se diferentes partidas de manipueira, extraídas do mesmo cultivar (Branca de Santa Catarina), para compor os meios de cultivo.

As análises feitas para a caracterização físico-química dos meios de manipueira foram: umidade, pH, acidez normal, CN^- livre, CN^- total, carboidratos totais, açúcar redutor e total, nitrogeno, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, zinco, cobre, manganês, carbono e amido (MALAVOLTA et alii, 1989).

A determinação dos teores de cianeto foi realizada por método enzimático (COOKE, 1979).

3.4. Experimento I

3.4.1. Reativação das células liofilizadas

A ampola de vidro contendo as células liofilizadas da linhagem CCT 0917 de *A. niger* foi desinfetada com álcool. Após isto, esterilizou-se uma lima e fez-se um corte no ponto médio da ampola. Retirou-se o tampão de algodão e com uma pipeta estéril, adicionou-se uma pequena quantidade de Malte Extrato Agar (MEA). Feita esta suspensão de célu-

las, esta foi transferida para tubos de ensaio contendo MEA. Os tubos foram incubados a 30°C por 7 dias.

3.4.2. Adaptação do microorganismo à manipueira

A mudança nos meios de cultura e de biossíntese do recomendado pela literatura para os meios a base de manipueira, exigiu que o fungo passasse por um processo de adaptação. A partir do tubo de cultura (MEA) contendo o microorganismo esporulado, e por meio de uma alça de platina foram semeados esporos em erlenmeyer contendo manipueira diluída com água nas concentrações: 5, 10, 20 e 30% de manipueira. As diluições preparadas foram esterilizadas e enriquecidas com 10% em peso de sacarose. Após 14 dias de incubação em estufa bacteriológica a 30°C, os micélios crescidos na superfície das soluções apresentavam-se densamente esporulados. Após essa adaptação e com auxílio de uma alça de platina, foram semeadas placas de Petri contendo ágar-manipueira e incubadas em estufa bacteriológica a 30°C.

3.4.3. Avaliação da produção de ácido cítrico pela linhagem CCT 0917 de *A. niger* nos meios sintéticos e nos meios de manipueira

3.4.3.1. Fermentação nos meios de manipueira (0, 24, 48 h e 72 h) e no meio de fermentação sintético (PRESCOTT & DUNN, 1959)

Para a determinação da produção de ácido cítrico pela linhagem de *A. niger* ensaiada, foram preparadas suspensões de conídios em Tween 80, a partir de colônias incubadas em ágar Czapek e ágar manipueira (0, 24, 48 e 72 h) por 7 dias a 30°C. O número de conídios destas suspensões foi ajustado por diluição em solução de Tween 80 esterilizada, a cerca de 1×10^7 conídios/ml. De cada suspensão foi retirado 1 ml que foi adicionado a erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml dos meios de fermentação. O período de fermentação foi de 7 dias a 30°C.

3.4.3.2. Determinação da produção de ácido cítrico pelo método de SAFFRAN & DENSTEDT (1948)

Amostras de 4 ml dos meios de fermentação filtrados em papel de filtro quantitativo, foram desprotei-

nizadas por 0,2 ml de ácido tricloroacético a 5%, em tubos de ensaio. Após agitação enérgica foram centrifugadas por 10 minutos em 3.000 rpm. Do sobrenadante retirou-se uma alíquota de 1 ml e foi efetuada uma diluição (1/10) de modo a adequar à leitura na curva padrão. Uma alíquota de 0,5 ml da amostra diluída foi colocada em tubos de ensaio com rosca contendo 4,0 ml de anidrido acético, agitados, tampados e colocados em banho maria a 60°C por 40 minutos. Os tubos foram então colocados em banho de gelo por 5 minutos, e deixados a temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, em 420 nm, sendo o zero ajustado através de um controle branco, constituído de todos os reagentes, exceto a amostra.

Os valores de absorção lidos foram convertidos em concentração a partir de uma Curva Padrão, estabelecida pela equação I:

$$Y = -0,12645 + 0,109642.X$$

onde:

Y = valor da leitura expressa em absorbância

X = valor em ácido cítrico expresso em mg/ml

com $r^2 = 0,9974$ e $r = 0,9987$

3.5. Experimento II

Este experimento teve por objetivo avaliar a produção de ácido cítrico pela linhagem CCT 0917 de *A. niger* em meio de fermentação de PRESCOTT & DUNN (1959), e nos meios de manipueira (0, 24 e 48) sem ajuste de pH.

A avaliação da produção de ácido cítrico pela linhagem ensaiada, nestes meios foi realizada conforme descrito no item 3.4.3.

3.5.1. Produção de conídios em ágar manipueira e ágar Czapek

Este ensaio visou determinar a influência do ágar manipueira nos tempos 0, 24 e 48 h de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente, na produção de conídios da linhagem CCT 0917 de *A. niger*.

Foram utilizadas placas de Petri com 20 ml dos meios, ágar Czapek e ágar manipueira. Foram feitas 5 repetições para cada meio e a linhagem foi inoculada através de picada central nas placas. Estas foram incubadas a 30°C por 7 dias. Após este período, uma amostra circular de 1 cm de diâmetro, foi retirada de cada placa e colocada em tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina. Após agitação vigorosa, foi realizada a contagem de conídios em câmara de Newbauer, expressa em número total de conídios/ml.

3.6. Meios de cultura e soluções usadas

3.6.1. Solução salina

Cloreto de sódio 8,5 g

Água destilada 1,0 l

Foram preparados frascos com 9 ml desta solução e autoclavados.

3.6.2. Solução de Tween

Foi adicionado tween 80 à água destilada numa concentração de 0,1% (v/v). Foram colocados 2,5 ml em tubos de ensaio, autoclavados e conservados em refrigerador.

3.6.3. Solução estoque de ácido cítrico

Utilizada na confecção de curva padrão nos experimentos de determinação da quantidade de ácido cítrico nos meios de fermentação.

Foram pesadas 2 g de ácido cítrico e colocada em 100 ml de água destilada. A solução resultante foi agitada rigorosamente, e conservada em refrigerador a 4°C.

3.6.4. Malte extrato ágar (MEA)

Extrato de malte	20,0 g
Glicose	20,0 g
Peptona	1,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	1,0 l

3.6.5. Ágar Czapek

Sacarose	30,0 g
NaNO_3	3,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,01 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1,0 l

Ferver até dissolver em um pouco de água destilada e completar o volume a 1.000 ml. Esterilizar em autoclave a 1 atm por 15 minutos.

3.6.6. Ágar manipueira

Sacarose	50,0 g
Ágar	20,0 g

Dissolver em 200 ml de água, ferver e completar o volume a 1.000 ml com manipueira, armazenada por 0, 24 e 48 h.

3.6.7. Meio de fermentação (PRESCOTT & DUNN, 1959)

Sacarose	140,0 g
Nitrato de amônio	2,23 g
Fosfato monohidrogenado	
de potássio	1,00 g
Sulfato de magnésio.7H ₂ O	0,23 g
Água deionizada, suficiente para completar volume para 1 litro.	

Foram distribuídos 50 ml do meio em erlenmeyer de 125 ml. O meio foi esterilizado a 1 atmosfera por 15 minutos. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1 N no experimento I.

3.6.8. Meio de manipueira

Sacarose	100,0 g
Manipueira	1000,0 ml

Foram distribuídos 50 ml do meio em erlenmeyer de 125 ml. O meio foi esterilizado a 1 atmosfera por 15 minutos. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1 N no experimento I.

3.7. Dosagem de cianeto na presença de glicose

Foi realizado um ensaio com o objetivo de verificar a influência da glicose adicionada à manipueira no preparo dos meios sobre a determinação de cianeto livre e total.

Foram analisadas duas amostras de manipueira, uma sem adição de glicose e outra com a adição de 10% de glicose, quanto ao teor de cianeto livre e total.

3.8. Avaliação do crescimento da linhagem CCT 0917 de *Aspergillus niger* em meio de cultivo com adição de cianeto

Este ensaio foi realizado com o objetivo de se analisar o crescimento da linhagem em meio de cultivo sintético com adição de cianeto de potássio, nas concentrações de cianeto em que não foi observado o crescimento do fungo nos meios de manipueira.

Foram preparadas placas com ágar Czapek adicionado de 70, 80 e 90 mg/l de cianeto e sem a adição de cianeto. Adicionou-se 0,1 ml de uma suspensão de conídios (10^7 conídios/ml) e as placas foram incubadas a 30°C por 7 dias.

3.9. Análise estatística

A avaliação da produção de conídios e de ácido cítrico foram analisados por comparação segundo meio de cultivo e fermentação, através da análise de variância para experimentos inteiramente casualizados, complementados com o teste de comparações múltiplas de Tukey (OSTLE, 1973).

Foi feita a análise estatística apenas para os tratamentos onde se observou o crescimento da linhagem ensaiada.

Todos os resultados estatísticos foram concluídos ao nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão, os resultados estão apresentados em quatro itens: adaptação do microorganismo à manipueira, o substrato manipueira, produção de conídios e produção de ácido cítrico.

4.1. Adaptação do microorganismo à manipueira

Os resultados obtidos mostraram o crescimento da linhagem de *A. niger* nas concentrações de 5, 10, 20 e 30% de manipueira recém coletada na fábrica.

Foi selecionado o micélio esporulado que cresceu em solução com 30% de manipueira, por admitir-se que se encontrava em maior concentração do meio ao qual se desejava adaptar o fungo.

4.2. O substrato manipueira

Os resultados obtidos na caracterização físico-química dos meios de manipueira e da manipueira da indústria, nos tempos de armazenamento, são apresentados nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Os dados obtidos mostraram que os meios compostos por manipueira apresentaram um teor de nitrogênio e fósforo superior ao citado por KUBICEK & ROHR (1986) como ideal para a biossíntese de ácido cítrico por *A. niger*. O teor de manganês variou na faixa de 3,5 ppm valor este também superior ao citado na literatura, que segundo CLARK et alii (1986), deve ser de 1 ppm no meio de fermentação.

A manipueira apresentou uma fermentação natural, com aumento da acidez. O pH inicial foi de aproximadamente 6,0 e com o armazenamento chegou ao redor de 4,0. Esta fermentação foi observada por LEONEL et alii (1991) e CABELLO (1991). (Figura 3).

Foi observado nas caracterizações dos meios de manipueira, uma variação crescente nos teores de cianeto livre e total (Figuras 4, 5 e 6), variação esta oposta a observada na análise da manipueira matéria-prima para elaboração dos meios, e da relatada por LEONEL (1991) em manipueira armazenada a 6°C por 30 dias. Uma hipótese levantada foi a existência de algum mecanismo interferindo na hidrólise da linamarina. Aparentemente é difícil supor síntese de linamarina no resíduo, o que justificaria o aumento de cianeto to-

tal. Segundo OKE (1968) a linamarase tem pH ótimo 5,5 a 6,0 sendo fortemente inibida pela 1,5 gluconoladona. A glicose também pode atuar invertendo o sentido da reação, favorecendo a síntese do glicosídeo.

Tabela 2. Características físico-químicas da matéria-prima manipueira coletada na indústria e armazenada a temperatura ambiente por 0, 24, 48 e 72 horas.

Variáveis	Tempo de armazenamento (h)			
	0	24	48	72
Umidade %	90,00	89,94	91,80	92,55
pH	6,27	4,00	3,67	3,63
Acidez normal %	0,83	9,67	16,09	16,68
HCN livre ppm	52,20	41,18	29,10	25,34
HCN total ppm	459,86	351,13	287,88	253,33
Amido %	5,71	5,40	4,43	3,42
Carboidratos				
totais %	6,35	6,00	4,92	3,81
Aç.red. total %	2,93	0,45	0,21	0,37
Nitrogênio ppm	1421,00	1414,00	1344,00	1386,00
Fósforo ppm	293,00	297,00	283,00	283,00
Cálcio ppm	220,00	220,00	210,00	210,00
Magnésio ppm	340,00	330,00	350,00	340,00
Enxofre ppm	74,00	78,00	74,00	70,00
Ferro ppm	7,60	7,90	5,50	6,00
Zinco ppm	3,20	3,30	2,80	2,90
Cobre ppm	0,90	0,90	0,90	0,90
Manganês ppm	3,90	3,80	3,50	3,60
Potássio ppm	2650,00	2570,00	2590,00	2600,00

Figura 3 – Variação do pH e acidez da manipueira com o tempo de armazenamento

Tabela 3. Características físico-químicas do meio de manipueira nos quatro tempos de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente (Experimento I).

Variáveis	Tempo de armazenamento (h)			
	0	24	48	72
Umidade %	85,10	82,20	87,39	86,88
pH	2,63	2,48	1,93	2,33
Acidez normal %	8,84	15,55	19,10	16,28
HCN livre ppm	0,00	0,00	3,45	4,50
HCN total ppm	28,87	74,91	91,05	80,73
Carboidratos				
totais %	8,92	15,77	9,40	10,54
Aç.red. total %	6,07	6,75	6,20	6,19
Nitrogênio ppm	1176,00	1134,00	1099,00	1120,00
Fósforo ppm	245,00	245,00	227,00	241,00
Potássio ppm	2120,00	2080,00	2190,00	2190,00
Cálcio ppm	190,00	170,00	180,00	180,00
Magnésio ppm	270,00	280,00	290,00	290,00
Enxofre ppm	59,00	62,00	59,00	62,00
Ferro ppm	6,60	6,50	4,70	5,00
Zinco ppm	2,70	2,60	14,60	2,30
Cobre ppm	0,70	0,70	0,70	0,70
Manganês ppm	3,10	3,10	3,00	3,00

Tabela 4. Características físico-químicas do meio de manipueira nos três tempos de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente (Experimento II).

Variáveis	Tempo de armazenamento (h)		
	0	24	48
Umidade %	80,84	81,00	83,21
pH	6,90	6,20	4,80
Acidez normal %	0,80	2,00	12,00
HCN livre ppm	2,52	3,70	40,28
HCN total ppm	10,21	28,55	93,90
Ag.red. total %	12,20	11,94	12,34
Nitrogênio ppm	1449,00	1414,00	1330,00
Fósforo ppm	231,00	227,00	219,00
Potássio ppm	2520,00	2530,00	2620,00
Cálcio ppm	220,00	220,00	220,00
Magnésio ppm	380,00	370,00	390,00
Enxofre ppm	74,00	69,00	69,00
Ferro ppm	4,20	3,90	4,50
Zinco ppm	3,00	2,90	3,20
Cobre ppm	1,10	1,10	1,10
Manganês ppm	3,50	3,40	3,40
Carbono %	15,70	15,20	13,80

Tabela 5. Características físico-químicas do ágar manipueira nos três tempos de armazenamento da manipueira a temperatura ambiente.

Variáveis	Tempo de armazenamento (h)		
	0	24	48
Umidade %	87,19	86,01	90,00
pH	6,50	5,90	4,50
Acidez normal %	0,65	1,20	5,80
HCN livre ppm	7,16	4,62	10,45
HCN total ppm	56,40	32,41	96,94
Carboidratos			
totais %	10,34	10,82	9,10
Aç. red. total %	10,00	10,16	8,43
Nitrogênio ppm	1288,00	1302,00	1260,00
Fósforo ppm	235,00	227,00	219,00
Potássio ppm	2530,00	2490,00	2430,00
Cálcio ppm	210,00	220,00	200,00
Magnésio ppm	360,00	350,00	340,00
Enxofre ppm	69,00	67,00	61,00
Ferro ppm	4,60	5,40	3,80
Zinco ppm	3,00	3,00	3,40
Cobre ppm	1,00	1,00	0,90
Manganês ppm	3,20	3,30	3,20
Carbono %	9,70	11,70	9,20

Figura 4 – Variação nos teores de cianeto total na manipueira e no meio de manipueira.

Figura 5 – Variação nos teores de cianeto livre na manipueira e no meio de manipueira.

Figura 6 – Variação nos teores de cianeto livre e total no meio manipulada.

Como o que diferencia a matéria-prima manipueira dos meios de manipueira é a adição de glicose e o tratamento térmico, sendo que este só poderia acarretar diminuição nos teores de cianeto, acreditou-se que uma possível explicação para o aumento no teor de cianeto seria a interferência da glicose na hidrólise da linamarina, baseando-se na afirmação de OKE (1968).

Para a constatação desta hipótese, foi realizado o ensaio em que se dosou cianeto em amostras de manipueira sem e com adição de 10% de glicose, concentração esta utilizada no preparo dos meios, observou-se os mesmos teores de cianeto livre e total nas duas amostras, resultado que demonstra que a variação nos teores de cianeto, não é devida a interferência da glicose adicionada ao meio, na hidrólise do glicosídeo. Este resultado, confirma os dados obtidos por YEOM (1988) e contraria a observação de OKE (1968).

Os valores de cianeto livre e total obtidos nas caracterizações dos meios de manipueira sem armazenemento (0 h), são semelhantes aos obtidos por CABELLO (1991).

4.3. Produção de conídios

Os resultados obtidos para a produção de conídios pela linhagem CCT 0917 de *A. niger*, encontram-se na Tabela 6 e Figura 7.

Os dados obtidos mostraram que houve o crescimento do fungo no ágar manipueira apenas nos tempos 0 e 24 h, e indicaram que o ágar manipueira diferiu significativamente ao nível de 5% de significância do ágar Czapek quanto a produção de conídios por mililitro. Não houve diferença significativa entre o ágar manipueira 0 e 24 h de armazenamento do resíduo a temperatura ambiente. A melhor produção de conídios por mililitro, pela linhagem foi obtida no ágar manipueira.

A maior produção de conídios em meios de cultura contendo manipueira, foi também verificada por FASCON et alii (1990), que observaram a produção de conídios de linhagens de *A. niger* e *A. oryzae*, e por LEONEL et alii (1991) que compararam a produção de linhagens de *A. niger* isoladas de resíduos de mandioca e linhagem industrial.

Tabela 6. Valor médio da produção de conídios por mililitro e respectivos níveis de significância da linhagem CCT 0917 de *A. niger* nos três meios de cultura.

Meios	Médias (conídios/ml)
Agar Czapek	307,0 a
Agar manipueira 0 h	1313,0 b
Agar manipueira 24 h	1135,0 b

Médias com mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Figura 7. Produção de conídios pela linhagem CCT0917 de *A. niger* nos três meios de cultura.

4.4. Produção de ácido cítrico

Os resultados obtidos para a produção de ácido cítrico em gramas por litro pela linhagem CCT 0917 de *A. niger*, nos diferentes substratos estão sumariados na Tabela 7 e Figura 8 (Experimento I) e na Tabela 8 e Figura 9 (Experimento II).

No experimento I, não foi observado o crescimento do fungo nos tempos 24, 48 e 72 h de armazenamento da manipueira. A produção de ácido cítrico no meio de manipueira 0 h não diferiu significativamente ao nível de 5% do meio de fermentação sintético.

Observou-se uma baixa produção de ácido cítrico nos dois meios de fermentação (sintético e meio de manipueira 0 h), com o pH ajustado para 2,0 com HCl 1N, mesmo sendo este valor o indicado na literatura, como o que se obtém maiores produções na biossíntese de ácido cítrico utilizando como agente o fungo *Aspergillus niger* (ROUKAS & HARVEY, 1988).

A baixa produção de ácido cítrico pela linhagem CCT 0917 em pH 2,0, pode ser devido ao mecanismo de acumulação do metabólito pelo agente. ROUKAS & ALICHANIDIS (1991), observaram uma melhor produtividade em cepas de *A. niger*, utilizando melão de beterraba, em pH 3,0, e BEGUM et alii (1990), obtiveram melhores resultados utilizando o meio

de PRESCOTT & DUNN (1959) com pH 4,0. O valor 2,0 de pH não é pois um valor de aceitação unânime.

Diante desses resultados, realizou-se o experimento II, em que o pH dos meios não foi ajustado e também o tempo de armazenamento do residuo foi diminuído para 48 h.

No experimento II, não foi observado o crescimento do fungo no tempo 48 h de armazenamento da manipueira. A produção de ácido cítrico diferiu significativamente ao nível de 5% de significância nos três meios de fermentação, sendo a melhor produção observada no meio sintético de PRESCOTT & DUNN (1959).

Tabela 7. Valor médio da produção de ácido cítrico (g/l) e respectivos níveis de significância da linhagem CCT 0917 de *A. niger* nos dois meios de fermentação.

Meios	Médias (g/l)
PRESCOTT & DUNN (1959) (sintético)	2,560 a
Meio de manipueira 0 h	2,862 a

Médias com mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

meios de fermentação
Figura 8. Produção de ácido cítrico pela linhagem CCT0917 de *A. niger* nos dois meios de fermentação com pH 2,0 (Exp. I).

A maior produção de ácido cítrico no meio sintético, está em acordo com os resultados obtidos por CABELLO (1991), que obteve uma produção de 16,1 g/l no meio de PRESCOTT & DUNN (1959) e 10,5 g/l em meio de manipueira recém coletada na indústria, utilizando como agente a linhagem industrial 10V10 de *A. niger*.

A maior concentração de fosfatos no meio de manipueira, poderia ser um dos fatores da menor produção de ácido cítrico, pois segundo KUBICEK & ROHR (1986), a acumulação de ácido cítrico por *A. niger* é estimulada pela limitação de fosfatos no meio de fermentação.

Tabela 8. Valor médio da produção de ácido cítrico (g/l) e respectivos níveis de significância da linhagem CCT 0917 de *A. niger* nos três meios de fermentação.

Meios	Médias (g/l)
PRESCOTT & DUNN (1959) (sintético)	8,948 a
Meio de manipueira 0 h	3,762 c
Meio de manipueira 24 h	5,514 b

Médias com mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A concentração de ácido cítrico obtida nos experimentos pode ser considerada pequena se comparada aos valores obtidos em experimentos de laboratório em que se ob-

Figura 9. Produção de ácido cítrico pela linhagem CCT0917 de *A. niger* nos três meios de fermentação (Experimento II).

teve 60 a 80 gramas de ácido cítrico por litro de meio de fermentação (KUBICEK & ROHR, 1986), e a obtida em experimentos utilizando outros resíduos industriais. HANG et alii (1987), obtiveram uma produção de 100 g de ácido cítrico/Kg de casca de kiwi fermentada na presença de 2% de metanol. Já HANG & WOODAMS (1989), obtiveram uma produção de 250 g de ácido cítrico/Kg de polpa de maçã fermentada. Não se dispõe de dados de indústria para fins de comparação, mas acredita-se que os valores sejam superiores a 100 g/l. Provavelmente a baixa produção de ácido cítrico se deva à pequena capacidade de produção da linhagem, uma vez que esta foi baixa em todos os meios.

O não crescimento da linhagem nos meios de manipueira com teores de cianeto superiores a 70 mg/l, levou a hipótese de que a causa do não crescimento seria as altas doses de cianeto, fator de maior variação, visto que os teores de cianeto total nos meios, aumentaram com o armazenamento. Esta hipótese foi testada no ensaio em que se observou o crescimento do fungo nos meios com e sem adição de cianeto, verificou-se que a linhagem cresceu apenas no ágar Czapek sem adição de cianeto, confirmando a hipótese de que o cianeto em concentração acima de 70 mg/l inibiu o crescimento do fungo.

Resta explicar o aumento nos teores de cianeto total com o armazenamento, o que deve ser objeto de novos estudos sobre a hidrólise da linamarina e a fermentação natural do resíduo.

5. CONCLUSOES

Considerando ser o objetivo do trabalho, utilizar a manipueira como meio de cultivo na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, foi possível concluir:

- a manipueira apresenta-se viável como matéria-prima na elaboração de meios de cultivo, desde que recém-colhida na indústria (sem armazenamento);

- durante o armazenamento a temperatura ambiente, ocorrem alterações da manipueira, sendo as principais a redução de pH e aumento do teor de cianeto livre e total;

- não foi observado crescimento da linhagem ensaiada, nos meios de manipueira com valores de cianeto a partir de 70 ppm;

- o não crescimento do microorganismo no meio de manipueira foi, possivelmente, devido ao cianeto presente no meio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AZEVEDO, J.L. & BONATELLI Jr., R. Genetics of the over-production of organic acids. In: KRUMPHANZL, V., SIKYTA, B., VANEK, Z., ed. **Over production of microbial products.** London, Academic Press Inc., 1983. cap. 35, p.439-450.
- BARACHO, I.R.; COELHO, W.R.; KIMURA, M. Variações no número de conídios de *Aspergillus* do grupo *niger*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 27:227, 1975.
- BEGUN, A.A.; CHOUDHURY, N.; ISLAM, M.S. Prescott salt requirements in cane molasses medium for citric acid production by gamma ray induced mutants of *Aspergillus niger*. **Bangladesh Journal of Microbiology**, Bangladesh, 7(2):123-127, 1990.

- BIGELIS, R. Primary metabolism and industrial fermentation. In: SIKYTA, B. & VANEK, Z. ed. **Gene manipulation on fungi**. London, Academic Press Inc., 1985.
- BONATELLI Jr., R. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1977. 126p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CABELLO, C. & CEREDA, M.P. Produção de ácido cítrico por fermentação fúngica a partir de resíduos de mandioca: avaliando potencialidades. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 8, Araraquara, 1989. Anais. Araraquara, 1989. p.08.
- CABELLO, C. Avaliação do substrato manipueira na biossíntese de ácido cítrico monitorada por computador. Botucatu, 1991. 88p. (Mestrado - Faculdade de Ciências Agrônomicas/UNESP).
- CARVALHO, V.D. & CARVALHO, J.G. Princípios tóxicos da mandioca. **Inf. Agropec.**, Belo Horizonte, 5(59/60):82-88, 1979.
- CEREDA, M.P.; BRASIL, O.G.; FIORETTO, A.M.C. Microorganismos resistentes ao cianeto isolados em líquido residual de fecularia. **Phyton**, Buenos Aires, 41:197-201, 1981.
- CEREDA, M.P. & FIORETTO, M.C. Produção de biomassa de *Trichosporon* sp em líquido residual de fecularias. São Paulo, FIPEC, Banco do Brasil, 1983. 212p.
- CEREDA, M.P. Resíduos da industrialização da mandioca. Botucatu, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, 1990. 42p.

- CHANDA, S.; CHAKRABART, S.; NATAI, S. Citric production in liquid waste from a leaf-protein production plant: effects of sugar and potassium ferrocyanide. **Biological-Wastes**, India, 34(1):77-81, 1990.
- CLARK, D.S.; ITO, K.; HORITSU, H. Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, 8:465-468, 1986.
- COOKE, R.D. Enzymatic assay for determining the cyanide content of cassava and cassava products. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1979. 14p.
- DAWSON, M.W. & MADDOX, I.S. Evidence for nitrogen catabolite repression during citric acid production by *Aspergillus niger* under phosphate-limited growth conditions. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, 33:1500-1504, 1989.
- DWYER, Y.L. Scaling up bio-product separation with high performance liquid chromatography. **Biotechnology Lett.**, Letchwortherts, 2:957-964, 1984.
- FERNANDES Jr., A. Ocorrência de instabilidade e seu controle em digestão anaeróbica de manipueira, em reator de banca de mistura completa. Botucatu, 1989. 118p. (Mestrado - Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP).
- FIORETTO, A.M.C. Viabilidade de cultivo de *Trichosporon* sp em manipueira. Botucatu, 1987. 96p. (Mestrado - Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP).

- FRANÇA, F.P.; CASTRO, A.C.D.; LEITE, S.E.F. Desempenho de *Aspergillus niger* A₁ na fermentação cítrica. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 15(2):89-93, 1984.
- GADEN, E.L.; PETSIAS, P.N.; WINOKER, Y. Citric acid production by citric fruit molasses. *J. Agric. Food Chem.*, New York, 2:632-635, 1977.
- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to plant biochemistry**. 2.ed. Oxford, Pergamon Press, 1983. 677p.
- HANG, Y.D.; LUH, B.S.; WOODAMS, E.E. Microbial production of citric acid by solid state fermentation of kiwifruit peel. *J. Food Science*, Champaign, 52:226-227, 1987.
- HANG, Y.D. & WOODAMS, E.E. Apple pomace: a potential substrate for citric acid production by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, Letchworth, 6:763-764, 1989.
- HOSSAIN, M.; BROOKS, J.D.; MADDOX, I.S. The effect of the sugar source on citric production by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, 12:383-397, 1984.
- KALYANI, S.; NANDI, P.; MISHRA, A.K. Transformation of nutritionally deficient mutants of *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, 55:195-200, 1969.
- KIEL, H.; GUURIN, R.; HENIS, Y. Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* on low sugar concentrations and cotton waste. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 42:1-4, 1981.
- KUBICEK, C.P. & ROHR, M. Citric acid fermentation. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, Boca Raton, 3:331-373, 1986.

- LEONEL, M.; HAMADA, C.; CEREDA, M.P. Cultivo de *Aspergillus niger* em ágar residual de processamento de mandioca (manipueira). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16, Santos, 1991. Anais. Santos, 1991. p.215.
- LOCKWOOD, L.R. Organic acid production. In: SMITH, J.E. & BERRY, D.R. **The filamentous fungi**. London, Edward Arnold Ltd., 1975. vol.I, p.140-157.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, C.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do Estado nutricional das plantas**. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.
- MILLIS, N.F.; TRUMPY, H.B.; PALMER, B.M. The effect of lipids on citric acid production by an *Aspergillus niger* mutant. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, 30:365-379, 1963.
- OKE, O.L. Cassava as food in Nigeria. **Wld. Rev. Nutr.**, Londres, 2:227-250, 1968.
- OSTLE, B. Estatística aplicada. México, Editorial Limusa-Wiley S.A., 1973. 662p.
- PASCON, C.R.; HAMADA, C.; LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; COSTA, C. Utilização da manipueira como meio de cultivo para *Aspergillus* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 6, Londrina, 1990. Anais. Londrina, 1990. p.90
- PONTECORVO, G. Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. **Nature**, London, 170:204-205, 1952.
- PRESCOTT, S.C. & DUNN, C.G. **Industrial microbiology**. 3.ed. New York, McGraw-Hill Book, 1959. 368p.

- RAPER, K.B. & FENNEL, D.I. The genus *Aspergillus*.
Baltimore, Williams e Wilkins Co., 1965. 686p.
- ROUKAS, T. & HARVEY, L. The effect of pH on production of
citric and gluconic acid from beet molasses using
continous culture. **Biotechnology Letters**,
Letchwortherts, 10(4):289-294, 1988.
- ROUKAS, T. & ALICHANIDIS, E. Citric acid production from
beet molasses by cell recycle of *Aspergillus niger*. **J.**
Ind. Microbiol., Amsterdam, 2(1):71-74, 1991.
- SAFFRAN, M. & DENSTEDT, O.F. A rapid method for
determination of citric acid. **J. Bid. Chem.**, New York,
175:849-855, 1948.
- SANCHES-MARROQUIN, A.; CARRENO, R.; LEDEZMA, M. Effect of
trace elements on citric acid fermentation by *Aspergillus*
niger. **Applied Microbiology**, New York, 20:888-892, 1970.
- SICHERI, V.L.F.S.; WOSIACKI, G.; SILVA, R.S.F.S.; CEREDA,
M.P. Produção de biomassa de *Trichosporon* sp isolado do
liquido residual de fecularias. V - Determinação da
influência do binômio tempo x concentração de nitrogênio.
In: SIMPOSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 7, Londrina, 1986.
Anais. Londrina, 1986. p.24.
- SHU, P. & JOHNSON, M.J. The interdependence of medium
constituents in citric acid production by submerged
fermentation. **J. Bacteriol.**, Washington, 56:577-585,
1948a.

- SHU, P. & JOHNSON, M.J. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.*, Washington, 40:1202-1208, 1948b.
- XU, D.-B.; KUBICEK, C.F.; ROHR, M. A comparison of factors influencing citric acid production by *Aspergillus niger* grown in submerged culture and on filter paper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Heidelberg, 30:444-449, 1989.
- WARMAR, W. Parassexualidade e eletrofusão em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1990. 131p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- YEOH, H.H. Variation in kinetic properties of cassava leaf beta-glucosidases. *Biochem. Sytem Ecology*, Oxford, 16(6):525-528, 1988.