



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020026250-5 A2



(22) Data do Depósito: 21/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 28/06/2022

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE DESCARTES DA INDÚSTRIA DE BEBIDAS AÇUCARADAS

(51) Int. Cl.: C12P 7/48.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) Inventor(es): SABRINA MORES; LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE; CARLOS RICARDO SOCCOL; SUSAN GRACE KARP; CRISTINE RODRIGUES.

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE DESCARTES DA INDÚSTRIA DE BEBIDAS AÇUCARADAS. A presente invenção refere-se a um processo de produção de ácido cítrico por fermentação submersa com fungos filamentosos utilizando descartes de bebidas açucaradas como substrato. O processo estabelecido pela presente invenção explora a composição rica em carboidratos e com baixas concentrações de micronutrientes dos descartes da indústria de bebidas açucaradas para utilização como substrato em fermentação para produção de ácido cítrico. A composição dessas bebidas permite seu uso como substrato em fermentação por fungos filamentosos para produção de ácido cítrico sem a necessidade de pré-tratamento. A invenção oferece uma alternativa economicamente e ambientalmente interessante para a indústria de bebidas açucaradas pela valorização dos produtos descartados, uma vez que além de reduzir a alta carga orgânica dos mesmos, há a produção de ácido cítrico, um produto de interesse comercial para as próprias indústrias de bebidas, indústrias de alimentos, farmacêutica e outras.

**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE DESCARTES DA
INDÚSTRIA DE BEBIDAS AÇUCARADAS**

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção refere-se a um processo de produção de ácido cítrico por fermentação submersa por fungos filamentosos utilizando descartes provenientes da indústria de bebidas açucaradas.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. Ácido cítrico é um dos ácidos orgânicos mais utilizados industrialmente, especialmente na indústria de alimentos e farmacêutica em função do seu status de GRAS (geralmente reconhecido como seguro). O ácido cítrico é utilizado como conservante para minimização da deterioração oxidativa da cor e sabor de alimentos e bebidas, podendo também ser utilizado como agente emulsificante e aromatizante ácido. Geleias, sucos, refrigerantes, sobremesas, vinhos, produtos enlatados e em conserva são alguns exemplos de alimentos que podem ser adicionados de ácido cítrico em sua formulação como conservante e acidificante. Na indústria farmacêutica ácido cítrico é empregado para melhoramento da palatabilidade, mascarar sabores indesejáveis, como componente de sistemas efervescentes e como agente anticoagulante. Na indústria química, o ácido cítrico é utilizado em cosméticos, embalagens, produtos de limpeza, tintas, dentre outros (CIRIMINNA, R. et al. Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017.; DHILLON, G. S. et al. Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 505–529, 2011; SOCCOL, C. R. et al. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44,

n. 2, p. 141–149, 2006; VANDENBERGHE, L. P. S. et al. Production and Application of Citric Acid. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2016. p. 557–575).

[003]. A produção comercial de ácido cítrico teve início por volta de 1826 com a extração a partir de frutas cítricas. Os primeiros processos comerciais, implantados na Inglaterra e Itália, envolviam a extração de ácido cítrico de suco de limão ou lima (GB423668A, GB136979A). Novos processos foram comercialmente implantados a partir da descoberta da capacidade de alguns microrganismos em produzir ácido cítrico em condições específicas. A produção biológica de ácido cítrico, especialmente empregando cepas do fungo filamentoso *Aspergillus niger*, se mostrou uma alternativa mais viável (US1066358A). Inicialmente, a produção biológica empregou o método de fermentação líquida em superfície. Atualmente, a maior parte do ácido cítrico é produzida por fermentação submersa pelo fungo *Aspergillus niger*. A produção de ácido cítrico via fermentação submersa permite a utilização de matérias primas amplamente disponíveis e de baixo custo, tais como melaço de cana e beterraba, xaropes, hidrolisados de amido e outros (IKRAM-UL, H. et al. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 2, p. 125–130, 1 jun. 2004; SHOW, P. L. et al. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2015; WANG, B. et al. High-efficient production of citric acid by *Aspergillus niger* from high concentration of substrate based on the staged-addition glucoamylase strategy. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 6, p. 891–899, 7 abr. 2017). Os documentos supracitados reportam diversos fatores que influenciam a produção de ácido cítrico por fungos como *A. niger* em diferentes substratos e

matérias-primas. Porém, a composição complexa dos descartes da indústria de bebidas açucaradas diferencia esses substratos dos demais reportados na literatura. Relação carbono/nitrogênio/fosfato, balanço de íons, presença de reguladores de acidez, corantes, edulcorantes, antioxidantes, mistura de carboidratos, maltodextrina, cafeína, taurina, glucoronolactona, aromatizantes naturais e artificiais, vitaminas, conservadores, dióxido de carbono são fatores presentes nos descartes que afetam a produção de ácido cítrico. Tais compostos podem ter efeitos inibidores no crescimento de *A. niger* ou promover desvios na rota metabólica do fungo. Desse modo, é necessário desenvolvimento tecnológico específico para esse tipo de substrato.

[004]. A maioria das matérias primas atualmente empregadas necessitam de pré-tratamento. No caso do melaço de cana e beterraba, há necessidade de diversos tratamentos para remoção de íons metálicos e outros inibidores que prejudicam o desempenho do processo fermentativo. Matérias-primas constituídas de açúcares complexos necessitam de pré-tratamento para disponibilização de açúcares simples capazes de serem fermentados pelos microrganismos (ZHOU, P. P.; MENG, J.; BAO, J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 563–572, 1 jan. 2017; RIVAS, B. et al. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2380–2387, 9 abr. 2008).

[005]. O documento CN104805136A descreve um método para a produção de ácido cítrico por fungo filamentoso utilizando como substrato material lignocelulósico. Mais especificamente, o documento se refere a um processo que envolve o cultivo de *Aspergillus niger* em hidrolisado enzimático de matéria prima celulósica ou por meio de

sacarificação enzimática do substrato simultaneamente à fermentação. O processo de obtenção do hidrolisado enzimático envolve as etapas de pré-tratamento com ácido sob pressão e desintoxicação.

[006]. CN101636500A descreve um método para produção de ácido cítrico a partir de glicerol. O processo descreve a utilização de glicerol em combinação com uma ou mais fontes de carbono, tais como melaço, glicose, frutose, sacarose ou amido hidrolisado por *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico pelo método de fermentação em superfície.

[007]. A patente GB799752A descreve a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* utilizando fontes impuras de carboidratos pelo método de fermentação submersa. Mais especificamente, o documento descreve a utilização de solução aquosa de melaço invertido, hidrolisado de amido de milho ou melaço de beterraba após tratamento para remoção de impurezas, principalmente íons metálicos. O pré-tratamento consiste na adição de cal ou hidróxidos insolúveis à solução aquosa rica em carboidratos (10 – 15% (m/v), seguido pelo tratamento com resinas de troca aniônica e/ou catiônica.

[008]. Na indústria de bebidas, uma considerável quantidade de bebidas é descartada ao longo da cadeia produtiva e comercial. Produtos são rejeitados durante o processamento por problemas relacionados ao padrão de qualidade, além disso, há uma parcela de produtos que retornam do mercado à indústria por problemas como perda de CO₂ ou por ter expirado o prazo de validade (COMELLI, R. N. et al. Treatment of High-Strength Wastewater from the Sugar-Sweetened Beverage Industry by an Alcoholic Fermentation Process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 31, p. 7687–7693, 2015; ISLA, M. A.; COMELLI, R. N.; SELUY, L. G. Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 136, p.

140–147, 2013).

[009]. No caso da indústria de bebidas açucaradas, os efluentes são ricos em carboidratos, o que requer tratamentos para diminuição da carga orgânica antes do descarte no meio ambiente. As bebidas descartadas durante o processamento ou após expirar o prazo de validade podem atingir até 135000 mg O₂/L em níveis de demanda química de oxigênio (DQO). As bebidas açucaradas apresentam elevado teor de carboidratos (6 a 18% m/v), principalmente açúcares facilmente fermentáveis, tais como glicose, frutose, sacarose e maltose. Além disso, proteínas, cálcio, potássio, sódio, magnésio, zinco e vitaminas, dentre outros compostos, podem estar presentes. As bebidas açucaradas geralmente apresentam pH ácido variando de 2,5 a 5,0. Essa faixa é favorável à produção de ácido cítrico (COMELLI, R. N. et al. Treatment of High-Strength Wastewater from the Sugar-Sweetened Beverage Industry by an Alcoholic Fermentation Process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 31, p. 7687–7693, 2015; ISLA, M. A.; COMELLI, R. N.; SELUY, L. G. Wastewater from the soft drinks industry as a source for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 140–147, 2013; MAX, B. et al. Biotechnological production of citric acid. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 862–875, 2010).

[010]. US9677036B1 descreve uma unidade de produção de etanol que utiliza como substrato diversas matérias-primas fermentáveis à base de açúcar e amido. Dentre as diversas matérias-primas, os autores reivindicam a utilização de refrigerantes, bebidas energéticas e sucos de frutas no processo. A obtenção de etanol para utilização como combustível para veículos envolve as etapas de fermentação e destilação.

[011]. A pesquisa em diversos bancos de patentes não apresentou informações referentes à utilização de descartes da indústria de bebidas açucaradas para a produção de ácido cítrico.

Descrição da abordagem do problema técnico

[012]. A presente invenção tem como objetivo a produção de ácido cítrico a partir da fermentação submersa de descartes da indústria de bebidas açucaradas por fungos filamentosos. Além de contemplar o aproveitamento de descartes da indústria de bebidas, a presente invenção não requer etapas de pré-tratamento do substrato.

[013]. Conforme evidenciado no estado da técnica, a maioria dos substratos utilizados para a produção biológica de ácido cítrico necessitam de pré-tratamento para remoção de componentes inibidores e/ou transformação dos açúcares complexos em açúcares fermentáveis. Dentre os principais componentes que, em excesso, podem prejudicar o acúmulo de ácido cítrico, destacam-se os íons metálicos ferro, manganês, cálcio, magnésio e zinco.

[014]. A presente invenção se diferencia de outros processos por utilizar substratos com baixas concentrações de íons metálicos e alto teor de açúcares fermentáveis, não havendo necessidade de pré-tratamento para uso como substrato em fermentações para produção de ácido cítrico. Além disso, a invenção oferece uma alternativa economicamente e ambientalmente interessante para valorização de descartes da indústria de bebidas açucaradas, uma vez que, além de reduzir a alta carga orgânica dos mesmos, há geração de um produto de interesse comercial.

Descrição detalhada da Invenção

[015]. A presente invenção apresenta um PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE DESCARTES DA INDÚSTRIA DE BEBIDAS AÇUCARADAS compreendendo as seguintes etapas:

- (a) Preparo do meio de cultivo
- (b) Suplementação
- (c) Inoculação
- (d) Fermentação

[016]. A cepa utilizada no processo é cultivada e armazenada em tubos inclinados contendo meio ágar-batata-dextrose. A incubação se dá em um período de 4 a 9 dias em estufa na faixa de temperatura de 26 a 32 °C. Após o completo desenvolvimento dos esporos, os tubos são mantidos sob refrigeração. O preparo do inóculo para utilização na fermentação se dá pelo cultivo dos microrganismos em frascos Erlenmeyer contendo meio ágar-batata-dextrose, inoculados pela técnica de profundidade e incubados a 26 – 32 °C por um período de 4 a 9 dias. Em seguida, os esporos são extraídos com uma solução de Tween 80 com concentração entre 0,01 e 0,1% (m/v) sob agitação magnética por 5 a 15 minutos. A suspensão de esporos obtida é submetida à contagem em câmara de Neubauer, para a determinação do volume de inóculo a ser adicionado aos cultivos.

[017]. Na etapa (a) o meio de cultivo líquido é composto essencialmente por carboidratos e sais. A fonte de carboidratos é constituída basicamente por um ou mais descartes da indústria de bebidas açucaradas. O descarte da indústria de bebidas açucaradas compreende uma bebida açucarada descartada durante o processamento ou cuja validade expirou e cujo teor de açúcar seja superior a 6% (m/v).

[018]. Na etapa (a) o descarte da indústria de bebidas açucaradas compreende uma bebida açucarada composta

majoritariamente por açúcares facilmente fermentáveis, tais como glicose, frutose, sacarose e maltose, cujo teor de açúcar seja superior a 6% (m/v), com baixas concentrações de íons metálicos e pH na faixa de 2,5 a 5,0, tais como refrigerantes, sucos de frutas, néctar de frutas, energéticos e bebidas esportivas isotônicas.

[019]. Na etapa (a) o meio de cultivo deve ser preparado de modo a apresentar concentração de açúcares totais na faixa de 6% a 18% (m/v), mais preferencialmente na faixa de 8% a 16% (m/v).

[020]. Na etapa (b), a cada 100 g de açúcares totais, o meio deve ser suplementado com, em porcentagem mássica, 0,04 a 0,5 de nitrogênio, 0,05 a 3 de fosfato, 0,1 a 1 de magnésio, 0,0005 a 0,001 de ferro, 0,001 a 0,005 de zinco. Etanol ou metanol podem ser adicionados como indutores numa faixa de 1 a 5% (v/v). O pH do meio deve ser ajustado, se necessário, com NaOH ou KOH para atingir o intervalo de 3 a 8.

[021]. Na etapa (c) o meio de cultivo deve ser inoculado em proporção variando de 4 a 20% (v/v), de modo que a concentração inicial no meio de cultivo esteja na faixa de 10^4 a 10^9 esporos/mL, preferencialmente 10^6 esporos/mL. O inóculo pode consistir em uma solução de esporos conforme descrito, uma solução de células recuperadas ao final da fermentação ou em uma solução líquida de células previamente cultivadas. Fungos filamentosos já relatados como produtores de ácido cítrico pela literatura podem ser utilizados no processo descrito pela presente invenção tais como *Aspergillus awamori*, *Aspergillus luchuensi*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus welwitschiae*, *Penicillium janthinelum* e, preferencialmente, *Aspergillus niger*, especialmente a cepa NRRL 599 que se encontra depositada no banco de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, e está catalogada na Coleção de

Culturas Tropical da Fundação André Tosello e também no ARS (NRRL) Culture Collection do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

[022]. Na etapa (d) a fermentação se dá na modalidade submersa, em condições aeróbicas, sob agitação, nas condições ótimas de crescimento do *A. niger* (temperatura entre 25 e 37 °C, preferencialmente 30°C, e pH entre 2,0 e 5,0, preferencialmente 3,0) e por tempo de 96 a 216 h. A fermentação submersa do meio de cultivo pode ser realizada em biorreatores, preferencialmente, do tipo tanque agitado. As condições de cultivo podem ser temperatura entre 25 e 37°C, aeração na faixa de 0,5 - 2,5 vvm, taxa de oxigenação entre 20 e 70% e tempo de cultivo de 96 a 216 h.

[023]. Na etapa (d) o pH do meio pode opcionalmente ser controlado pela adição de solução de NaOH ou KOH, de modo a manter o pH na faixa de 2,0 a 5,0, preferencialmente em 3,0.

[024]. Os exemplos a seguir ilustram os parâmetros de processo, a composição do meio de cultivo e os resultados de acordo com a matéria divulgada na presente invenção. Estes exemplos não pretendem incluir todos os aspectos da matéria, mas ilustrar parâmetros, composições e resultados representativos. Estes exemplos não se destinam a excluir equivalentes e variações da presente invenção e, portanto, não devem ser interpretados para limitar o escopo da invenção.

Exemplos: Produção de ácido cítrico utilizando diferentes bebidas açucaradas

[025]. O meio de cultivo foi preparado com a adição de 93% (v/v) de uma bebida açucarada (refrigerante, néctar de fruta, bebida esportiva isotônica, suco de fruta ou energético) e suplementado com

0,2 - 1,0 g/L de ureia, 0,5 - 3,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,10 - 0,40 g/L de MgSO_4 , 0,0001 - 0,001 g/L de FeSO_4 , 0,002 - 0,005 g/L de ZnSO_4 e 1 - 3% (v/v) de etanol. O meio foi inoculado com 2 mL de uma suspensão de esporos de *Aspergillus niger* resultando numa concentração inicial de 10^6 esporos/mL. A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com um volume inicial de 50 mL, incubados a 30°C, com agitação de 150 rpm durante 216 horas. O mesmo procedimento foi realizado utilizando dextrose comercial (100 g/L de açúcares totais) para fins comparativos (controle). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela a seguir.

Bebida açucarada utilizada no meio de cultivo	Concentração total de açúcares (g/L)	Produção de ácido cítrico (g/L)	Produtividade (g/L.h)
Bebida esportiva isotônica de laranja/ Bebida energética/ Suco de uva	60 - 110	15 - 22	0,07 – 0,10
Néctar de laranja/ Refrigerante de guaraná	100 - 160	50 - 65	0,23 – 0,30
Controle	100	47,08	0,22

REIVINDICAÇÕES

1. **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE DESCARTES DA INDÚSTRIA DE BEBIDAS AÇUCARADAS** caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:
 - (a) Preparo do meio de cultivo utilizando como a fonte principal de carboidratos descartes da indústria de bebidas açucaradas que compreendem bebidas descartadas durante o processamento ou cuja validade expirou e cujo teor de açúcares totais é superior a 6% (m/v), podendo ser escolhidos entre refrigerantes, sucos de frutas, néctar de frutas, bebidas esportivas isotônicas e energéticos ou a combinação desses, de modo que a concentração inicial de açúcares seja de 6 a 18% (m/v);
 - (b) Suplementação do meio de cultivo com 0,04 a 0,5% de nitrogênio, 0,05 a 3% de fosfato, 0,1 a 1% de magnésio, 0,0005 a 0,001% de ferro, 0,001 a 0,005% de zinco (porcentagens mássicas) a cada 100 g de açúcares totais, podendo também ser adicionados etanol ou metanol numa faixa de 1 a 5% (v/v);
 - (c) Inoculação com *Aspergillus* sp;
 - (d) Fermentação submersa.
2. **PROCESSO** de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o pH do meio de cultivo deve ser ajustado, se necessário, com NaOH ou KOH para atingir o intervalo de 3 a 8.
3. **PROCESSO** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) o inóculo é composto por linhagem de *Aspergillus* sp. e adicionado ao meio de cultivo em proporção variando entre 4 e 20% (v/v), de modo a obter uma concentração

no início da fermentação entre 10^4 e 10^9 esporos/mL, preferencialmente 10^6 esporos/mL.

4. PROCESSO de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de ser utilizada preferencialmente a espécie *Aspergillus niger*, e mais preferencialmente a cepa NRRL 599.
5. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a etapa (d) ser realizada em condições aeróbicas, sob agitação, nas condições ótimas de crescimento do *A. niger* (temperatura entre 25 e 37 °C, preferencialmente 30°C, e pH entre 2,0 e 5,0, preferencialmente 3,0 e por tempo de 96 a 216 h.

RESUMO**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE DESCARTES DA
INDÚSTRIA DE BEBIDAS AÇUCARADAS**

A presente invenção refere-se a um processo de produção de ácido cítrico por fermentação submersa com fungos filamentosos utilizando descartes de bebidas açucaradas como substrato. O processo estabelecido pela presente invenção explora a composição rica em carboidratos e com baixas concentrações de micronutrientes dos descartes da indústria de bebidas açucaradas para utilização como substrato em fermentação para produção de ácido cítrico. A composição dessas bebidas permite seu uso como substrato em fermentação por fungos filamentosos para produção de ácido cítrico sem a necessidade de pré-tratamento. A invenção oferece uma alternativa economicamente e ambientalmente interessante para a indústria de bebidas açucaradas pela valorização dos produtos descartados, uma vez que além de reduzir a alta carga orgânica dos mesmos, há a produção de ácido cítrico, um produto de interesse comercial para as próprias indústrias de bebidas, indústrias de alimentos, farmacêutica e outras.