

# PRODUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO FERMENTADOR INSTRUMENTADO

R. L. SERRA<sup>1</sup>, G. da S. FAHEINA Jr.<sup>2</sup>, G. A. S. PINTO<sup>3</sup> e A. C. FREITAS<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

<sup>3</sup> Embrapa Agroindústria Tropical

<sup>4</sup> Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: [raellson@hotmail.com](mailto:raellson@hotmail.com)

**RESUMO** – O ácido gálico tem aplicações nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. É produzido convencionalmente por hidrólise ácida do ácido tânico, porém apresenta baixo rendimento e baixa pureza. Uma alternativa é produzi-lo pela hidrólise microbiana do ácido tânico por tanase, uma enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ácido gálico utilizando o fungo *Aspergillus niger* CCBP 002 por fermentação submersa. Os ensaios foram conduzidos em biorreator instrumentado de 5 litros. A produção de ácido gálico foi analisada de acordo com o tempo de fermentação, sendo retirada amostra a cada 24 h até 96 horas, onde avaliou-se a influência do controle do pH e o fluxo de ar durante o processo fermentativo. As melhores condições de fermentação para produção do ácido foram realizadas sem o controle de pH e em meio ácido.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido gálico é um ácido orgânico, também conhecido como 3,4,5 triidroxibenzóico, e apresenta diversas aplicações nas indústrias farmacêuticas como a produção de trimetopima e na indústria química, sendo utilizado na revelação de fotografias e impressão a tinta. Este ácido ainda pode ser empregado no setor de alimentos como substância antioxidante e verificador de estabilidade de corantes naturais. Uma forma de obtenção do ácido é através da enzima tanase que hidrolisa ésteres e ligações laterais (CHÁVES-GONZÁLES et al. 2012). Esta enzima é extracelular e produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras (MACEDO et al. 2005).

A enzima tanase catalisa a hidrólise das ligações éster e depsídicas em taninos hidrolizáveis, liberando glicose e ácido gálico. A tanase é produzida na presença de indutor como o ácido tânico ou outras fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas, como sulfatos de amônio, nitrato de sódio e peptona, têm sido utilizados para a produção de tanase (PINTO, 2003). Para Battestin (2007), mesmo na presença de outras fontes de carbono, a concentração de ácido tânico constituiu o fator predominante na produção de tanase através do processo de fermentação.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi produzir ácido gálico por fermentação submersa utilizando um biorreator instrumentado, tendo como fonte de carbono o ácido tânico.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

*Aspergillus niger* CCBP 002 proveniente da coleção de cultura do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza – Ceará, Brasil.

### **2.2. Preparo do inóculo**

Foi preparada uma solução contendo o esporo do *A. niger* em 50 mL de Tween 80 a 0,3% e a contagem de esporos foi feita em câmara de Neubauer, sendo necessário diluir a  $10^{-1}$ .

### **2.3. Preparo do meio**

O meio para fermentação continha (em g/L): ácido tânico: 54,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,0; KCL: 0,5;  $\text{MgSO}_4$ : 0,5,  $\text{FeCl}_3$ : 0,0242 e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 0,88,. Estas concentrações foram avaliadas em frascos Erlenmeyers durante processos fermentativos realizados (dados não publicados).

### **2.4. Fermentação e parâmetros experimentais**

Os experimentos foram realizados utilizando biorreator New Brunswick modelo BioFlo®/Cellingen® 115 com volume operacional de 3,5 litros de meio autoclavado a 121°C por 15 minutos, inoculados com  $1 \times 10^5$  esporos/mL e incubados na temperatura de 25°C por 96 horas. A cada 24 horas amostras foram retiradas para determinação de ácido tânico residual, biomassa e ácido gálico produzido. Os biorreatores possuíam sistema de monitoramento automático de pH, agitação, temperatura, aeração e ação antiespumante.

Os parâmetros avaliados foram:

- Na primeira etapa do estudo acompanhou-se o pH da fermentação e variou-se o fluxo de ar (1 e 2 volume de ar por volume de meio, por minuto - vvm);
- Na segunda etapa o pH do meio fermentativo foi ajustado em  $4,0 \pm 0,2$  e controlado com adição de NaOH 1,0 M ao longo do processo fermentativo;
- Na terceira etapa avaliou-se a alimentação do meio de cultura durante o processo fermentativo. Nesta condição foi necessário reduzir o volume operacional para 3 L e utilizou-se 400 mL do meio de cultura preparado nas mesmas condições para a alimentação durante a fermentação. A taxa de operação da bomba foi de 3,3% e 1,5%, sendo um volume de alimentação de aproximadamente 0,1383 mL/segundo e 0,1483 mL/segundo respectivamente, com intervalo de 60 segundos entre cada alimentação. Os testes ocorrem em regime de batelada simples e batelada alimentada. No reator onde a taxa de alimentação era de 3,3% a fermentação permaneceu as primeiras 24 horas em regime de batelada simples e a partir das 24 h

em batelada alimentada. Já quando a taxa de alimentação foi de 1,5% a fermentação permaneceu as primeiras 48 horas em regime de batelada simples e a partir deste período em batelada alimentada.

## 2.5. Determinações analíticas

2.5.1 Biomassa: Uma alíquota amostral de 20 mL foi filtrada com papel de filtro Melitta® previamente tarado. Após sucessivas lavagens, o conjunto papel mais biomassa foram colocados em estufa a 90 °C /24 h. A diferença de massa representa a biomassa seca quantificada. Os sobrenadantes foram armazenados a - 18 °C para as demais análises.

2.5.2 Ácido gálico: Foi determinado por método espectrofotométrico através da formação de complexo com rodanina em meio alcalino, conforme Pinto (2003).

2.5.3 Determinação de ácido tânico: Determinado segundo Lowry (1947). Este método se baseia na utilização do ácido tânico como padrão numa faixa de diluição de 10 – 100 mg.L<sup>-1</sup>.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A variação do fluxo de ar com 1 e 2 vvm no reator foi avaliada durante a fermentação. Nesta etapa o pH do meio foi acompanhado ao longo do processo fermentativo, conforme a Figura 1. Para condição em que o fluxo de ar foi de 1 vvm, o pH inicial foi de 3,9 reduzindo para 3,3 em 48 h de fermentação, chegando 1,99 no último tempo avaliado (96 h). Já para ao fluxo de 2 vvm, o pH inicial de 2,88, e diminuindo para 1,24 em 96 h de fermentação. A redução do pH ao longo do processo fermentativo relaciona-se ao acúmulo de ácido gálico no meio.

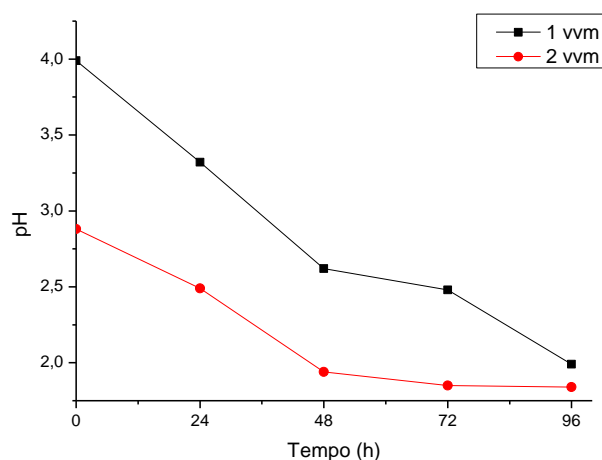


Figura 1 - pH durante processo fermentativo nas condições em que houve variação do fluxo de ar entre 1,0 e 2,0.

O valor da massa celular durante a fermentação foi quantificado nos experimentos aerados com 1 e 2 vvm, conforme a Figura 2. A concentração da biomassa celular apresentou valor crescente nos tempos fermentativos avaliados nos experimentos realizados. Porém, houve uma maior concentração na massa celular no experimento com aeração de 1 vvm. Com máxima concentração de biomassa em 72 horas (17,6 mg/mL). Muller et al. (2007) obtiveram valores superiores de massa celular quando utilizaram 1,5 vvm em reator Air-lift quando comparado com estudos realizados em *shaker*.

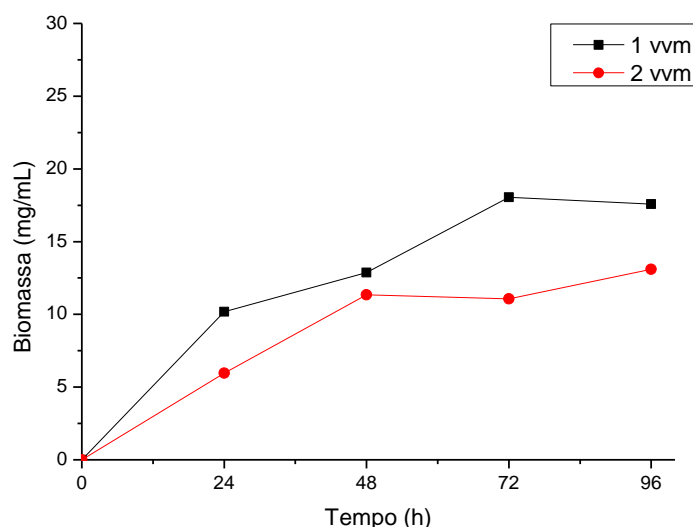


Figura 2 – Biomassa seca do fungo (mg/L) por tempo (h) de fermentação nas condições em que houve variação do fluxo de ar entre 1,0 e 2,0.

A Figura 3 apresenta o consumo de ácido tânico e produção de ácido gálico (mg/L) por tempo (h) de fermentação durante as condições em que houve variação na aeração entre 1,0 e 2,0. O consumo de ácido tânico apresentou valores próximos em ambos os experimentos. Os dados mostram que a variação do fluxo de ar, entre 1 e 2 vvm, resultou em uma concentração de ácido gálico de 21,69 mg/L e 23,86 mg/L, respectivamente. No início da fermentação os valores eram de 6,70 mg/L para o fluxo de 1 vvm e 7,09 mg/L para o fluxo de 2 vvm. E nas primeiras 24 horas de fermentação apresentava 18,41 mg/L de ácido gálico para o fluxo de ar de 2 vvm, enquanto em 1 vvm o valor é de 8,35 mg/L.

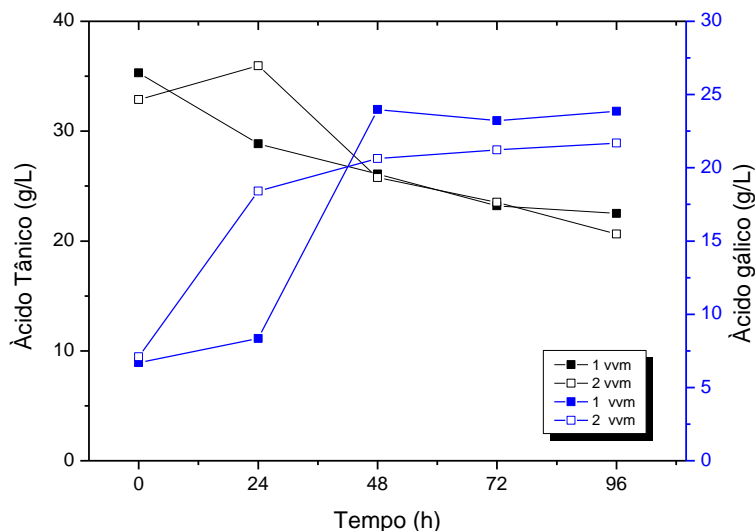


Figura 3 – Consumo de ácido tânico e produção de ácido gálico (mg/L) por tempo (h) de fermentação durante as condições em que houve variação do fluxo de ar entre 1,0 e 2,0.

Os resultados indicaram que o fluxo de ar de 2 vvm é a melhor aeração para o crescimento fungo *A. niger* e para a produção de ácido gálico. Nesta etapa, os experimentos foram realizados com fluxo do ar fixa em 2 vvm e avaliou-se a o controle do pH durante a fermentação (ajuste do pH em 4,0 usando NaOH 1 M e sem ajuste do pH do meio de fermentação. Observa-se que na condição não controlada o pH atingiu um valor inferior a 2,0.

A Figura 4 apresenta os resultados da produção de ácido gálico e o consumo de ácido tânico. A produção de ácido gálico em 96 horas de fermentação foi de 24 g/L para ambos os experimentos. O que demonstra que o ajuste do pH em 4,0 não influenciou em maiores conversões de ácido gálico.

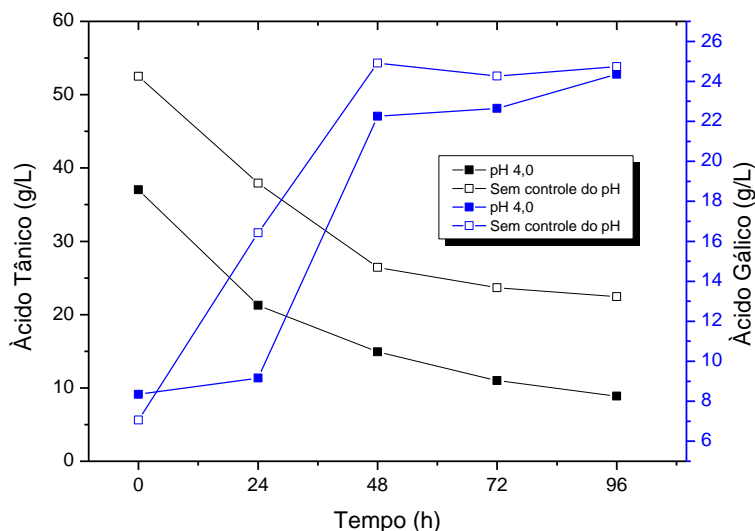


Figura 4 – Produção de ácido gálico e consumo de ácido tânico (g/L) por tempo (h) de fermentação durante as condições com e sem controle de pH.

Na etapa seguinte os experimentos foram conduzidos sem controle de pH e fluxo de ar fixado em 2,0 vvm, e conduzidos em batelada alimentada com 1,5 e 3,0% de meio.

Determinou-se o pH dos meios fermentativos nos sistemas batelada alimentada com de 1,5 e 3,0% e observou-se no início do processo fermentativo baixos valores no pH, próximo de 3,0. Com decréscimo no decorrer da fermentação nos sistemas de alimentação avaliados, chegando ao pH 1,9 em 96 horas de fermentação.

A Figura 5 apresenta os resultados da produção de ácido gálico e consumo de ácido tânico durante o processo fermentativo. A alimentação de 3,3% apresentou uma maior conversão do substrato em produto, produzindo 52,03 g/L de ácido gálico, quando comparada a alimentação de 1,5%, com produção de 41,50 g/L. A concentração de ácido tânico inicial foi de 50 g/L, sendo consumido ao longo do processo fermentativo. Apresentando concentração no último tempo amostral em torno de 5 g/L nos diferentes sistemas estudados.

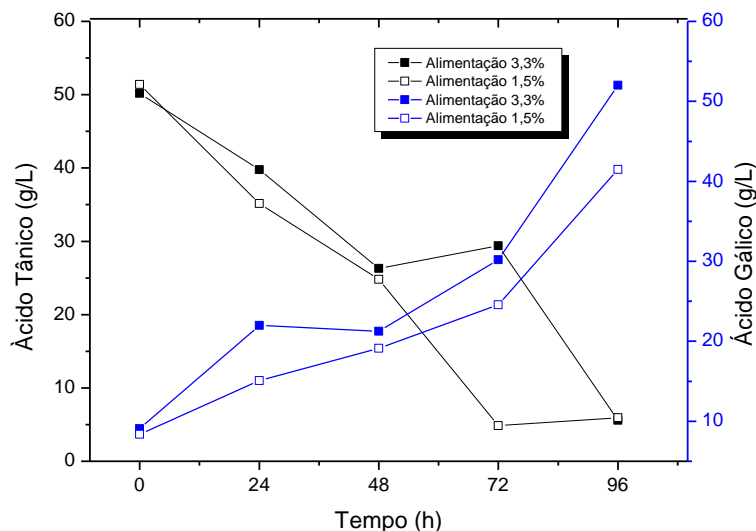


Figura 5 – Produção de ácido gálico e consumo de ácido tânico (g/L) durante o processo fermentativo com alimentação de 3,3 e 1,5% do substrato, sem ajuste de pH e fluxo de ar de 2 vvm

Estudos conduzidos por Bajpai et al. (2008), mostraram que adicionar ácido tânico em diversas fases da fermentação melhora a produção de ácido gálico. Segundo os autores, a adição do substrato em sistema de batelada simples apresenta efeito negativo na atividade do fungo e na conversão do produto. Ainda segundo os autores o fungo pode sofrer intoxicação quando aplicado dose única do ácido tânico assim como também mostra Ganga et al. (1977).

## 4. CONCLUSÕES

Foi possível produzir ácido gálico, sendo as condições testadas satisfatórias para produção de ácido gálico. Os experimentos conduzidos sem ajuste de pH, aeração de 2 vvm e em sistema de batelada alimentada operando a 3,3% apresentaram valores superiores de conversão do substrato em produto.

## 5. REFERÊNCIAS

- BAJPAI, B.; PATIL, S. A new approach to microbial production of gallic acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39. p. 708-711. 2008.
- BATTESTIN, V. Produção, purificação, caracterização e aplicação da tanase de *Paecilomyces variotii* Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas –SP, 2007.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ M. L.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J.; PRADO-BARRAGÁN, L.; RODRÍGUEZ, R.; AGUILERA-CARBO, A.; RODRÍGUEZ, L.; AGUILAR, C. Microbial and enzymatic hydrolysis of tannic acid: influence of substrate chemical quality. Chemical Papers v. 66. p. 171-177. 2012.

GANGA, P.S.; NANDY, S.C.; SANTAPPA, M. Effect of environmental factors on the production of fungal tannase: Part I. Leather Sci.v. 24. p. 327-427. 1977.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 170, 23, p. 265-270, 1947.

MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 4, p. 833-838, 2005.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 27, n. 4, p. 688-693, 2007.

PINTO, G. A. S. Produção de Tanase por *Aspergillus niger*. Tese (Doutorado)-UFRJ, Rio de Janeiro. 213f. 2003.