

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO POR VIA MICROBIANA

J. C. CRUZ¹, J. P. FARIAS¹, A. M. CASTRO² e E. F. C. SÉRVULO¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

²PETROBRAS, CENPES

E-mail para contato: julianacruz@ufrj.br

RESUMO – O ácido itacônico, listado como um dos 12 mais promissores produtos químicos obteníveis de biomassa, pode ser produzido por fermentação de açúcares por fungo filamentoso *Aspergillus terreus*. O ácido orgânico, de aplicação nas áreas de polímero, agricultura, farmacêutica e medicina, atrai interesses de desenvolvimento de processos fermentativos com alta produtividade. Para tal, a identificação de um microrganismo com capacidade significativa de produção permite, *à posteriori*, um estudo dos componentes do meio que aumente da produtividade, atentando para a o fator aeração, essencial na produção de ácido itacônico. O presente trabalho inicialmente selecionou uma entre duas linhagens de *Aspergillus terreus* (DSMZ 826 e DSMZ 5770) que produzisse ácido itacônico em maior concentração em meio com glicose como fonte de carbono. A linhagem selecionada foi utilizada para testes de volume de meio reacional, diretamente relacionado à aeração da fermentação em escala de bancada. Por fim, testou-se uma segunda fonte de carbono: a sacarose. Os resultados indicaram que *A. terreus* DSMZ 5770 produz ácido itacônico em maiores concentrações (31g/L) em comparação com a linhagem DSMZ 826 (1g/L) em meio de glicose. A obtenção de ácido itacônico por *A. terreus* DSMZ 5770 em volume de 100 mL apresentou melhor condição para produção (22g/L) comparado com 150 mL (14 g/L). Por fim, não houve diferença significativa entre os valores de ácido itacônico produzido em sacarose (26g/L) e glicose (28 g/L).

1. INTRODUÇÃO

O interesse comercial do ácido itacônico é evidente, já que o resultado da polimerização do diácido como homopolímero ou copolímero é um produto biodegradável (Hughes e Swift, 1992) potencialmente aplicável em áreas como química de polímeros (resinas, poliésteres plásticos, vidro artificial), nos setores de agricultura, farmácia e medicina (preparação de compostos bioativos) (Pfeifer, 1952; Okabe, 2009; Kuenz, 2012). Tais características torna o ácido itacônico um potencial protagonista de otimização de processo de produção. A rota química de obtenção produção do ácido pode ser realizada pela desidratação ou pirólise de ácido cítrico, por descarboxilação de ácido aconítico, ou partir da fermentação de açúcares (Pfeifer, 1952), sendo a última utilizada industrialmente e atende à necessidade de processos por fontes renováveis.

Apesar do reconhecimento do ácido itacônico como um potencial bloco de construção para obtenção de produtos bio-derivados (DOE, 2004), ainda não foi atingido o potencial de produção,

estando incluído ainda num mercado de nicho em muitas economias (Itaconic Acid - Global Strategic Business Report, 2011). Tal fato é evidenciado por ainda ser produzido industrialmente em poucos países (Tabela 1), o que resulta em uma produção bem abaixo da demanda mundial (Itaconic Acid - Global Strategic Business Report, 2011).

Tabela 1 - Produtores de ácido itacônico no mundo (Okabe *et al.*, 2009).

Empresa	Localização	Início da produção	Capacidade (ton/ano)
Pfizer Food Science	New York, USA; Sandwick, UK	1945-1995	5.000-7.000 ^a
Iwata Chemicals	Kyogyo, Japan	1970	10.000
Tianli Biological Fermentation Factor	Yunnan, China	1988	2.000
Gansu Feipeng Biochemical Co. Ltd.	Gansu, China	1989	1.000
Chengdu Lake Biology Engineering Industry	Sichuan, China	1993	4.000
Nanjing Huajin Biologicals Co. Ltd.	Nanjing, China	1994	1.000
Jiangsu Binhai Sanai Biological Co. Ltd.	Jiangsu, China	1994	1.200
Rhodia	Melle, France	1995	1.000
Zhejiang Guoguang Biochemical Co. Ltd.	Zhejiang, China	1995	1.000
Cargill/Cultor Food Science	Eddyville, USA	1996	30.000
Shandong Zibo Zhongshun	Shandong, China	1999	1.200
Science & Technology Co. Ltd. Diversified Co. of Zibo Mineral Bureau	Zibo, China	1999	3.000
Guangdong Leizhou Yueli IA Co. Ltd.	Guangdong, China	1999	1.500
Qingdao Langyatai Group	Qingdao, China	2000	4.500

^aEncerrou a produção de ácido itacônico em 1996

O custo de produção do ácido itacônico por rota biotecnológica depende de custos com a matéria prima, fermentação e separação. Apesar dos custos de fermentação e purificação serem as maiores barreiras do processo, é esperado um rápido desenvolvimento tecnológico que possa contornar as limitações do processo. Reconhecidamente, inovação, competitividade de custos e expansão global são os principais determinantes do sucesso no mercado de produtos químicos renováveis (Global Strategic Business Report, 2011). Neste âmbito, a produção de biomoléculas a partir de matéria prima mais barata vem atraindo pesquisas para obtenção diversos produtos. Como exemplos, podem ser citados alguns trabalhos dedicados a tornar possível a utilização de madeira hidrolisada e milho como matéria prima de baixo custo para fermentação por fungo filamentosos (ITACONIX, 2009; Klement *et al.*, 2012).

Observa-se que estudos ainda são necessários para que a produção de ácido itacônico seja superior e mais rentável. De acordo com o estudo do Departamento de Energia dos Estados Unidos, é necessária a redução do custo de produção do ácido itacônico para, pelo menos, US\$ 0,5/kg para que esse seja competitivo com a atual cadeia de produtos da indústria química – o valor de venda atual varia de US\$ 1,5–2,5, custando em torno de US\$ 1,2 quando comprado em toneladas (Klement e Büchs, 2013). Para tal resultado, o rendimento de produto por substrato consumido se torna um importante parâmetro para a redução de custos. No caso do uso de matéria prima de baixo custo, mesmo que seja mantido o valor do rendimento, o baixo custo do substrato resultaria em maior rentabilidade do produto. Sendo assim, fazer uso de fontes de substrato mais baratas é uma das estratégias de redução do custo da produção, devendo esta ser consideradas em pesquisas para tornar o produto mais atraente economicamente.

Este trabalho realizou testes comparativos de obtenção de ácido itacônico por *Aspergillus terreus* DSMZ 826 e 5770, além de realizar testes de produção em diferentes condições de agitação (por conseguinte, aeração) e em presença de glicose e sacarose como fontes de carbono, considerando que a sacarose poderá ser substituída por melaço, matéria prima de baixo valor comparado com glicose e sacarose, de acordo com análises posteriores.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Composição do meio e condições de cultivo

Os meios de cultivo foram preparados com glicose para o teste cinético e de volume, e com glicose e sacarose para o teste da fonte de carbono. A composição do meio teve como referência o trabalho de Kuenz *et al* (2012). O cultivo foi realizado em frascos cônicos de 500 mL de capacidade. O meio de produção continha, por litro, 120 g de glicose ou 114 g de sacarose, 0,1 de fosfato de potássio monobásico, 3 g de nitrato de amônio, 1 g de sulfato de magnésio hepta hidratado, 5 g de cloreto de cálcio dihidratado, 1,67 ppm de cloreto de ferro hexahidratado, 0,008 g de sulfato de zinco heptahidratado, e 0,015 g de sulfato de cobre heptahidratado. O ajuste do pH foi feito com ácido sulfúrico até pH 3. O meio foi esterilizado em atmosfera úmida por 20 minutos a 111°C, exceto a solução de cloreto de ferro, a qual foi esterilizada separadamente por filtração com membrana de poro de 0,2 µm. A fermentação foi conduzida em agitação constante (150 rpm, com deslocamento da câmara agitadora de 60 mm) a 33°C.

2.2. Quantificação de substrato, ácido itacônico e concentração celular

A determinação da concentração de açúcares e ácido itacônico foi realizada utilizando HPLC Bio-Rad equipado com coluna HPX-87H, H_2SO_4 a 5 mM como fase móvel, numa vazão de 0,7 mL/min, e detecção por índice de refração a 35°C. A concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de contagem espelhada e a massa celular foi determinada em balança de umidade com secagem por infravermelho a 105°C até massa constante.

2.3. Produção de ácido itacônico: teste de cinética, aeração e fonte de carbono

Para que fosse obtido um perfil cinético do cultivo, realizou-se a fermentação em múltiplos frascos agitados, todos com a mesma concentração de componentes e com glicose como fonte de carbono, variando apenas a cepa de micro-organismo inoculado. O perfil cinético foi determinado a cada 48 horas, durante 240 horas, em duplicata.

Os experimentos de cinética permitiram a seleção do micro-organismo *Aspergillus terreus* DSM 5770 como um potencial produtor de ácido itacônico. Diferentes volumes de cultivo representam diferentes taxas de transferência de oxigênio para o meio. O teste do efeito da produção ácido itacônico e a aeração do cultivo, representado pelo uso de 100 ou 150 mL de meio de produção, foi realizado com os mesmos componentes e concentrações do meio de cultivo utilizado para a avaliação cinética. Os resultados de concentração de glicose, massa seca de células e ácido itacônico foram obtidos em 192 e 240 horas, em triplicata.

Por fim, foi avaliada a produção de ácido itacônico em diferentes fontes de carbono.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise cinética

A determinação do perfil cinético é importante para conhecer em qual etapa de cultivo o ácido itacônico é produzido, se existe uma extensa fase lag de crescimento, assim como conhecer se a produção do ácido acompanha ou não o crescimento do micro-organismo. A Figura 1 apresenta o perfil cinético de crescimento e de produção por *Aspergillus terreus* DSM 826 (a) e DSM 5770 (b), assim como o consumo de substrato. A comparação da produção pelas diferentes linhagens é claramente diferenciada. Observa-se na Figura 1 (a) que a linhagem *A. terreus* DSM 826 pouco produziu ácido itacônico ao longo de 10 dias de fermentação. O tempo total do experimento não foi suficiente para esgotar a glicose adicionada, utilizada preferencialmente para o crescimento celular que para a produção do ácido de interesse. Em contrapartida, o perfil de produção ilustrado na Figura 1 (b) caracteriza a linhagem DSM 5770 como potencial produtora de ácido itacônico, atingindo o valor de 31,5 g/L. O perfil cinético obtido, então, permite analisar que a produção do ácido se inicia quando a concentração celular apresenta valores em torno de 15g/L, sendo que este valor não passou de 20 g/L durante todo o tempo do processo. Isto identifica a produção como não associada ao crescimento. Com este resultado, foi selecionada a linhagem *A. terreus* DSM 5770 para as avaliações seguintes de produção de ácido itacônico.

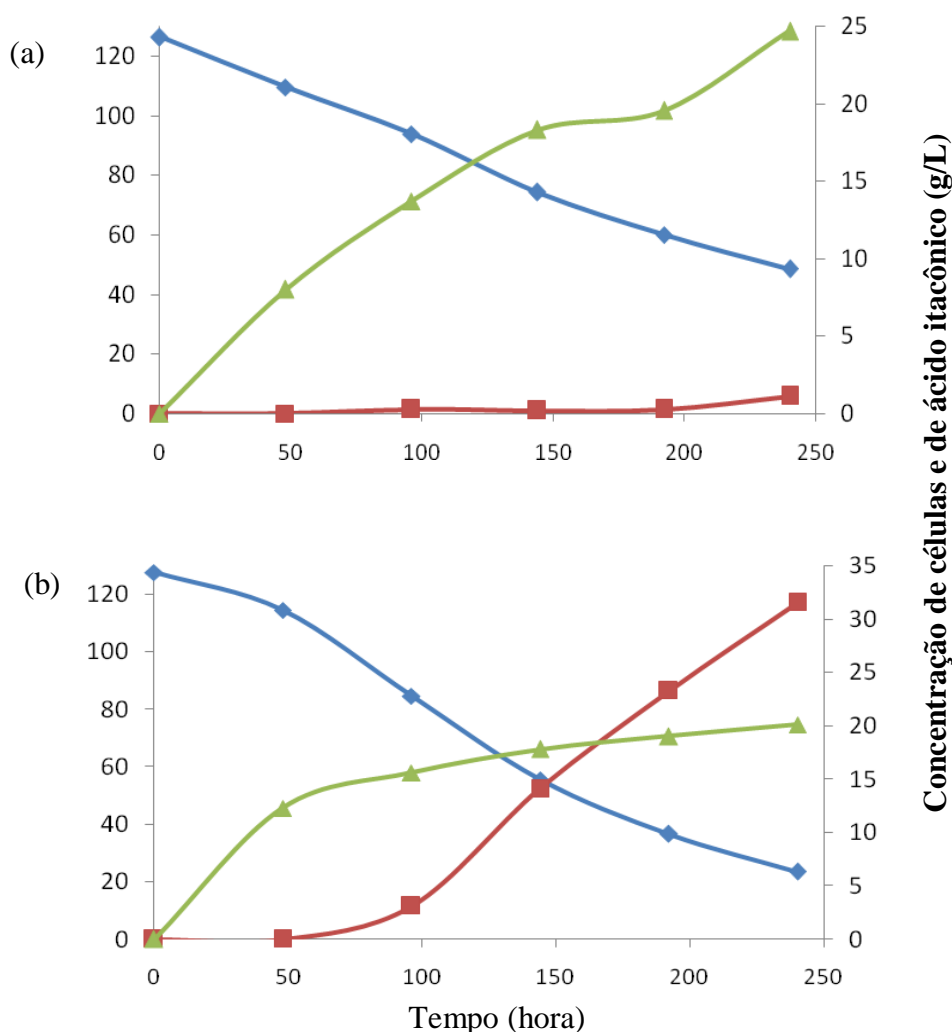


Figura 1 - Perfil cinético de produção de células e ácido itacônico por *Aspergillus terreus* DSM 826 (a) e DSM 5770 (b), em meio de cultivo contendo glicose como substrato. Concentração de células (g/L) (\blacktriangle); concentração de glicose (g/L) (\blacklozenge); concentração de ácido itacônico (g/L) (\blacksquare).

3.2. Análise de agitação/aeração

A análise de aeração em frascos agitados pode ser feita pela constatação da produção em alturas de líquido diferentes. Os resultados apresentados na Tabela 2 confirmam de forma clara que a produção de ácido itacônico é influenciada com a aeração do meio de produção. A análise da Tabela 2 permite avaliar que, para um frasco cônico com o mesmo volume e formato, o uso de volume maior, de 150 mL, resultou em menos produção de ácido itacônico comparado com o uso de 100 mL. Mesmo sendo pouca a diferença das alturas do líquido, a produção em 150 mL de meio foi cerca de 60% daquela de 100 mL.

Tabela 2 - Produção de ácido itacônico em cultivo em frasco agitado de 500 mL contendo 100 mL e 150 mL. Resultados de concentração celular, de glicose e de ácido itacônico nos tempos 0, 192 e 240 horas. Erro experimental menor que 10%.

	Volume reacional: 100 (mL)			Volume reacional: 150 (mL)		
Tempo (h)	Massa celular (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido itacônico (g/L)	Massa celular (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido itacônico (g/L)
0	0	120,0	0	0	120	0
192	21,7	48,4	20,5	19,76	58,6	10,1
240	25,6	38,0	22,6	34,1	53,3	14,0

O maior volume diminui o espaço vazio do frasco, disponibilizando menor aeração. Além disso, o maior volume diminui a taxa de transferência dos gases para o microrganismo sintetizador. Estudos de Kuenz *et al* (2012) e Gyamerah (1995) dentre outros mostram que pequenas paradas na agitação/aeração são suficientes para que a produção de ácido itacônico caia drasticamente. O resultado apresentado nesse trabalho sugere que a menor disponibilidade de oxigênio proporciona maior crescimento celular em detrimento da produção de ácido, o que não é interessante. Com essa conclusão, os experimentos seguintes foram realizados utilizando volume reacional de 100 mL.

3.3. Análise de fermentação com glicose ou sacarose como fonte de carbono

O uso de fonte de carbono de menor custo é uma das possíveis alternativas para a produção viável economicamente. A análise do perfil de produção de ácido itacônico por *A. terreus* DSM 5770 por sacarose busca a possibilidade de análises de outra matéria prima que contém sacarose, como o melaço. A comparação da produção por diferentes fonte de carbono, sendo elas glicose e sacarose, é apresentada na Tabela 3. A diferença de concentração inicial de substrato é justificada pela equivalência em número de carbonos entre uma concentração e outra. Ao final de 10 dias de fermentação foram produzidos 26 g/L de ácido por glicose e 28,6 g/L de ácido por sacarose, resultando em um rendimento de $Y_{P/S}$ de 0,34 g de ácido itacônico/g de glicose e 0,25 g de ácido itacônico/g de sacarose respectivamente. O valor de rendimento é maior quando utilizada a sacarose. Entretanto, a produtividade obtida não é significativamente diferente ($0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a produção com glicose e $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a produção com sacarose). No que tange o consumo de substrato observa-se que a sacarose é possivelmente mais rapidamente consumida pelo microrganismo avaliado.

Tabela 3 - Produção de ácido itacônico com glicose e sacarose. Resultados de concentração celular, de glicose e de ácido itacônico nos tempos 0, 192 e 240 horas. Erro experimental menor que 10%.

Tempo (h)	Substrato: glicose		Substrato: sacarose	
	Glicose (g/L)	Ácido itacônico (g/L)	Sacarose (g/L)	Ácido itacônico (g/L)
0	120,0	0	114,0	0
192	60,4	15,8	11,0	19,4
240	44,2	26,0	2,9	28,6

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados identificam o micro-organismo *Aspergillus terreus* DSM 5770 como potencial produtor de ácido itacônico a partir de glicose comparado com a produção por *Aspergillus terreus* DSM 826. Além disso, foi confirmada a importância da aeração do processo por testes de diferentes volumes reacionais para frasco de mesmo volume total. Em processos realizados em escala de bancada é importante que o volume reacional não seja prejudicial à produção, já que a aeração é obtida pela agitação e problemas de transferência de massa podem ser mais evidentes.

Constatou-se que a produção por *Aspergillus terreus* DSM 5770 tendo como substrato a resulta em produção de ácido itacônico comparável àquela realizada com glicose. Isso possibilita avaliações posteriores para busca de outras matérias primas mais baratas que contenham também sacarose, como o melão.

Visto que o ácido itacônico é um produto comercialmente interessante, a otimização da produção se torna cada vez mais válido. O uso de materiais de fontes de baixo valor aumenta a perspectiva de produção a baixo custo. O estudo da fermentação a partir de glicose e sacarose abre horizontes para a utilização de matérias primas de pouco valor agregado que, ao ser disponibilizado o açúcar fermentescível, o cultivo por *Aspergillus terreus* DSM 5770 em meio otimizado, pode ser um método bastante promissor para a obtenção de ácido itacônico em altas concentrações.

5. REFERÊNCIAS

DOE, Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I – Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. 76 p. 2004.

GYAMERAH, M. H. Oxygen requirement and energy relations of itaconic acid fermentation by *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 44, p. 20-26, 1995.

HUGHES, K. A.; SWIFT, G. Rohm and Haas Company. Preparation of itaconic acid polymers. EP 0506246 A1, 9 mar. 1992, 30 set. 1992. Disponível em www.google.pt/patents/EP0506246A1?cl=en.

Acesso em: 21 abr. 2014.

Itaconic Acid - Global Strategic Business Report. 136p. 2011.

ITACONIX, 2009. Development of integrated production of polyitaconic acid from northeast hardwood biomass, Project Sponsored by NIFA, 2009–2012.

KLEMENT, T.; BÜCHS J. Itaconic acid – A biotechnological process in change. *Bioresource Technology*, vol. 135, p. 422–431, 2013.

KLEMENT, T.; MILKER, S.; JÄGER, G.; GRANDE, P.; DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P.; BÜCHS, J. Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microbial Cell Factories*, v. 11, p. 1-13, 2012.

KUENZ, A.; GALLENMÜLLER, Y.; WILLKE, T.; VORLOP, K. Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 96, p. 1209–1216, 2012.

OKABE, M; LIES, D; KANAMASA, S; PARK, E. Y. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 84, p. 597–606, 2009.

PFEIFER, V. F.; VOJNOVICH, C.; HEGER, E. N. Itaconic acid by fermentation with *Aspergillus terreus*. *Industrial and Engineering Chemistry*, v. 44, p. 2975-2980, 1952.