

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE  
*Aspergillus niger* LB-02-SF OBTIDAS EM PROCESSO SUBMERSO

**CAROLINE REGINATTO**

CAXIAS DO SUL, 2016.

**CAROLINE REGINATTO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE  
*Aspergillus niger* LB-02-SF OBTIDAS EM PROCESSO SUBMERSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Eloane Malvessi

**Co-orientador:** Prof. Dr. Mauricio Moura da  
Silveira

Caxias do Sul, 2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

R335p Reginatto, Caroline, 1988-  
Produção e caracterização parcial de pectinases de *Aspergillus niger*  
LB-02-SF obtidas em processo submerso / Caroline Reginatto. – 2016.  
78 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi ; Coorientador: Prof. Dr.  
Mauricio Moura da Silveira.

1. Enzimas. 2. Pectinases. 3. *Aspergillus niger*. 4. Suco de frutas –  
Indústria. I. Título.

CDU 2. ed.: 577.15

Índice para o catálogo sistemático:

1. Enzimas	577.15
2. Pectinases	577.152.34
3. <i>Aspergillus niger</i>	582.282.123.4
4. Suco de frutas – Indústria	663.813

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

# CAROLINE REGINATTO

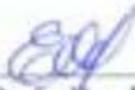
## PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PECTINASES DE *Aspergillus niger* LB-02-SF OBTIDAS EM PROCESSO SUBMERSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Eloane Malvessi

Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18 DE DEZEMBRO DE 2015.



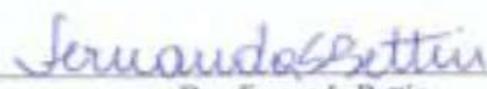
Orientador: Profa. Dra. Eloane Malvessi



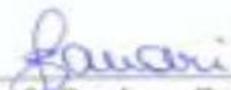
Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira



Profa. Dra. Eunice Valduga



Dra. Fernanda Bettin



Profa. Dra. Ivana Greice Sandri

*À minha filha Maria Luiza,  
minha inspiração, minha vida, meu amor.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me apoiaram na realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade de Caxias do Sul e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

Aos professores da banca de acompanhamento, Dr. Aldo José Pinheiro Dillon e Dra. Fernanda Bettin pela disponibilidade em colaborar na elaboração deste trabalho. Bem como aos membros da banca de avaliação, Dra. Eunice Valduga e Dra. Ivana Greice Sandri.

Agradeço à Profa. Dra. Eloane Malvessi pela orientação e paciência, por ter entendido as minhas limitações e meus medos e por ter me ajudado a superá-los. Ao Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira por todos os ensinamentos e pela oportunidade de realizar iniciação científica e o mestrado.

Aos colegas que fizeram e fazem parte da equipe do laboratório de bioprocessos, principalmente a Aline Pozza, Caroline Hartmann, Caroline Rossi, Diógenes Lunardi Garin, Paloma Forest e Viviane Girardi, agradeço pelas conversas, pelas risadas e pela amizade.

À Sabrina Carra, que além de técnica do laboratório, é uma grande amiga, por toda ajuda e disponibilidade. À minha amiga Fernanda Bettin, agradeço por todas as conversas e conselhos. À Lenara Meneghel, pela amizade e orientação, por me incentivar e servir de exemplo desde o começo da minha caminhada no laboratório.

Aos bolsistas de iniciação científica que participaram deste trabalho, Guilherme Pelenz Reis, Fernanda Noronha, Franciele Oliveira, Marina Ferrari, Marielem Santos e Betina Miglioranza.

À minha família, meu Pai Wilmar Ignacio Reginatto, minha mãe Rosa Maria Reginatto e meu irmão Fabio Reginatto, pelo apoio incondicional, por acreditarem na minha capacidade e por cuidar da minha filha sempre que não pude ser uma mãe muito presente. Agradeço a minha filha Maria Luiza Reginatto Serafin por alegrar os meus dias e por entender a minha ausência para cuidar dos *Aspergillus*. Agradeço a Deus por ter essas pessoas especiais ao meu lado.

## ÍNDICE

<b>LISTA DA FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>II</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>IV</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Enzimas em processos industriais</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Pectinases e substâncias pécticas</b> .....	<b>3</b>
2.2.1 Classificação das pectinases .....	4
2.2.2 pH e temperatura de ação catalítica de pectinases .....	5
2.2.3 Aplicações das pectinases .....	7
<b>2.3 Microrganismos produtores de pectinases</b> .....	<b>8</b>
<b>2.4 Processos de obtenção de pectinases microbianas</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5 Produção de pectinases em cultivo submerso</b> .....	<b>10</b>
2.5.1 Fatores que influenciam a produção de pectinases em cultivo submerso .....	11
<b>2.5.1.1 Inóculo</b> .....	11
<b>2.5.1.2 Meio de cultivo</b> .....	12
<b>2.5.1.3 Temperatura</b> .....	14
<b>2.5.1.4 Suprimento de oxigênio</b> .....	15
<b>2.5.1.5 pH</b> .....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Microrganismo</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Meios de cultivo</b> .....	<b>18</b>
3.2.1 Meio de conservação .....	18
3.2.2 Meio para cultivos submersos.....	18
3.2.3 Meio para cultivos em estado sólido.....	19
<b>3.3 Condições de cultivo</b> .....	<b>19</b>
3.3.1 Preparo de inóculo de esporos ou inóculo vegetativo .....	19
3.3.2 Ensaio em frascos sob agitação .....	20
3.3.3 Cultivos submersos em biorreator de bancada.....	20
3.3.4 Cultivo em estado sólido.....	21
<b>3.3.4.1 Extração de enzimas</b> .....	22
<b>3.4 Clarificação de suco de fruta</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5 Experimentos realizados</b> .....	<b>23</b>
3.5.1 Avaliação dos perfis cinéticos .....	23
3.5.2 Definição do meio para o cultivo submerso.....	23
3.5.3 Adição de indutor de pectinases em diferentes tempos de cultivo .....	24
3.5.4 Avaliação de inóculo vegetativo .....	24
3.5.5 Avaliação do pH sobre o crescimento fúngico e a produção de pectinases .....	25
3.5.6 Atividade enzimática em função do pH e da temperatura de reação .....	25
3.5.7 Estabilidade dos extratos enzimáticos brutos frente ao pH e à temperatura .....	25
3.5.8 Uso de extratos enzimáticos no tratamento de suco de maçã .....	26
<b>3.6 Métodos analíticos</b> .....	<b>26</b>
3.6.1 Coleta e tratamento de amostras .....	26
3.6.2 Concentração celular.....	26
3.6.3 Açúcares redutores totais (ART) .....	27
3.6.4 Atividade de pectinases totais .....	28

3.6.5 Determinação da clarificação, redução da turbidez e da viscosidade de suco de maçã .....	30
<b>3.7 Parâmetros de avaliação do processo .....</b>	<b>31</b>
3.7.1 Fator de produção específica .....	31
3.7.2 Fatores de conversão.....	31
3.7.3 Produtividade volumétrica.....	32
3.7.4 Velocidade específica de crescimento celular.....	32
<b>3.8 Análises estatísticas .....</b>	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Características gerais do processo de obtenção de pectinases por <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em cultivo submerso.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Definição da composição do meio de cultivo .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Avaliação do tempo de adição do indutor enzimático ao cultivo .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Utilização de inóculo vegetativo no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Efeito do pH sobre o cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF.....</b>	<b>49</b>
4.5.1 pH inicial em cultivos em frascos sob agitação .....	52
4.5.2 Estratégias de controle do pH em cultivos em biorreator .....	54
<b>4.6 Caracterização dos extratos enzimáticos produzidos quanto à temperatura e ao pH .....</b>	<b>59</b>
4.6.1 Influência do pH e da temperatura de reação sobre a atividade de pectinases.....	60
4.6.2 Avaliação da estabilidade térmica das pectinases produzidas .....	61
4.6.3 Avaliação da estabilidade das pectinases produzidas em processo submerso em relação ao pH .....	63
<b>4.7 Uso dos extratos enzimáticos produzidos em processo submerso e em estado sólido no tratamento de suco de maçã .....</b>	<b>64</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 1 – DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE CRESCIMENTO DE INÓCULO VEGETATIVO.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 2 – RELAÇÃO ENTRE A DEMANDA DE OXIGÊNIO PELO CULTIVO (OUR) E A CONCENTRAÇÃO CELULAR .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura da parede celular vegetal .....	4
<b>Figura 2</b> - Modo de ação de enzimas pectinolíticas.....	5
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática de um biorreator de agitação mecânica .....	10
<b>Figura 4</b> – Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em frascos sob agitação em agitador recíproco construído na UCS.....	20
<b>Figura 5</b> - Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de bancada.....	21
<b>Figura 6</b> – Cultivo <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em estado sólido. ....	22
<b>Figura 7</b> – Variação das concentrações de biomassa, de açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT) e do pH em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em frascos sob agitação utilizando o meio M. ....	33
<b>Figura 8</b> – Variação das concentrações de biomassa, de açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT) e do pH em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada.....	35
<b>Figura 9</b> – Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada .....	36
<b>Figura 10</b> – Variação das concentrações de biomassa e açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT) e do pH em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada com diferentes concentrações de glicose.....	39
<b>Figura 11</b> – Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada, utilizando o meio A, isento de glicose .....	40
<b>Figura 12</b> – Variação das concentrações de biomassa, de açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT) e do pH em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada com diferentes tempos de adição de pectina .....	43
<b>Figura 13</b> – Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada com adição de pectina em diferentes tempos.....	44
<b>Figura 14</b> – Variação da concentração de biomassa, de açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT) e do pH em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada com diferentes formas de inoculação .....	47
<b>Figura 15</b> – Variação das concentrações de biomassa, de açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT) e do pH em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada, com diferentes condições de controle de pH. ....	50
<b>Figura 16</b> – Variação das concentrações de biomassa, de açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT) e do pH em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em frascos sob agitação, com diferentes valores de pH inicial .....	52
<b>Figura 17</b> - Variação das concentrações de biomassa, da atividade de pectinases totais (PT) e das concentrações de açúcares redutores totais (ART) em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada, com diferentes condições de pH.....	55
<b>Figura 18</b> – Variação das concentrações de biomassa e de açúcares redutores totais (ART), da atividade de pectinases totais (PT), do pH e da concentração de oxigênio dissolvido em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF, em biorreator de bancada no ensaio N5.....	57
<b>Figura 19</b> – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de pectinases produzidas por <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF .....	60
<b>Figura 20</b> – Efeito da temperatura e do tempo de incubação sobre as pectinases totais presentes nos extratos enzimáticos produzidos por <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF.....	62
<b>Figura 21</b> - Atividade relativa de pectinases no extrato bruto exposto a diferentes valores de pH em função do tempo .....	64

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Composição do meio utilizado em cultivo submerso. ....	18
<b>Tabela 2</b> - Composição do meio utilizado em cultivo em estado sólido.....	19
<b>Tabela 3</b> – Composição dos meios testados em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> em frascos sob agitação. ...	24
<b>Tabela 4</b> - Resultados gerais do cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em frascos sob agitação e em biorreator de bancada. ....	37
<b>Tabela 5</b> - Resultados gerais dos cultivos de <i>Aspergillus niger</i> conduzidos em frascos sob agitação para avaliação das concentrações de glicose, sulfato de amônio e extrato de farelo de trigo no meio.....	38
<b>Tabela 6</b> - Resultados gerais do cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de bancada em meio com diferentes concentrações de glicose .....	41
<b>Tabela 7</b> - Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus niger</i> em biorreator de bancada com diferentes tempos de adição do indutor enzimático. ....	45
<b>Tabela 8</b> - Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em biorreator de bancada com diferentes proporções de inóculo vegetativo. ....	48
<b>Tabela 9</b> - Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em frascos sob agitação com diferentes valores de pH inicial.....	54
<b>Tabela 10</b> - Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus niger</i> em biorreator de bancada em ensaios com diferentes condições de pH.....	59
<b>Tabela 11</b> - Efeito do tratamento enzimático no aumento da clarificação, na redução da turbidez e da viscosidade de suco de maçã. ....	65

## RESUMO

A produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF foi estudada, em processo submerso, com o objetivo de avaliar condições de processo de obtenção, caracterizar e utilizar as enzimas produzidas. As condições de processo estudadas foram a composição do meio de cultivo, a adição de pectina (indutor enzimático) ao meio após a fase de intenso crescimento celular, a utilização de inóculo vegetativo e estratégias de controle do pH. Adicionalmente, o extrato enzimático bruto foi caracterizado quanto à temperatura e ao pH de reação e utilizado no tratamento de suco de maçã Gala. Com o meio de cultivo formulado, que não contém glicose na composição, foi verificada a redução do crescimento celular, sem afetar a produção de pectinases e facilitando o controle dos parâmetros de processo. A adição de pectina quando o pH atingiu o valor de 2,7 (22 horas) não influenciou o crescimento fúngico, sendo que a concentração celular máxima (11,0 g/L) e o tempo em que ela ocorreu (48 horas) foram semelhantes aos observados na condição controle, com pectina presente no meio desde o início do processo (11,5 g/L em 41 horas). Nesta condição de adição de indutor enzimático, a produção de pectinases foi favorecida, sendo atingida atividade máxima de 14 U/mL, cerca de 40% superior à da condição controle, no mesmo tempo de cultivo (135 horas). A utilização de inóculo vegetativo levou à redução da fase de adaptação do microrganismo ao meio. Concentrações de 5 e 10% (v/v) favoreceram o crescimento celular; no entanto, foram verificadas atividades enzimáticas máximas de 5,5 e 3,8 U/mL, inferiores à obtida com a inoculação por esporos (6,4 U/mL). Além disso, não foi observada redução dos tempos em que os picos de atividade enzimática ocorreram. No cultivo com a queda natural do pH inicial de 4,0 para o mínimo atingido (pH 2,5) e posterior controle neste valor, foi obtida atividade enzimática máxima de 7,5 U/mL, superior às atingidas no cultivo com controle de pH em mínimo de 2,7 e no cultivo com pH não controlado, de 6,4 e 3,5 U/mL, respectivamente. Nos cultivos em frascos sob agitação, valores iniciais de pH de 2,0, 3,0 e 4,0 foram os que proporcionaram a obtenção de maiores valores de fator de produção específica ( $Y_{p/x}$ ). Em cultivos em biorreator com o pH controlado nestes valores durante todo o processo, verificou-se que o crescimento celular foi favorecido em pH 3,0, com a concentração máxima de biomassa (10,2 g/L) sendo atingida cerca de 90 horas antes do pico observado no cultivo com pH 2,0 constante (7,7 g/L). Por outro lado, a produção de pectinases foi favorecida em pH 2,0, com pico de atividade enzimática de 9,5 U/mL, superior aos determinados com pH constante de 3,0 e 4,0, de 4,7 e 2,0 U/mL, respectivamente. A estratégia de condução do cultivo que possibilitou a obtenção da maior atividade enzimática, de 13,2 U/mL, foi em pH inicial de 3,0 e mantido até que fosse atingido no meio a concentração de oxigênio dissolvido de 30%, sendo então reduzido para 2,0 pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nesta condição, o crescimento celular não foi afetado, resultando em maior fator de produção específica (1,26 U/mg). A ação das enzimas pectinolíticas produzidas em cultivo líquido foi favorecida em pH 4,0 e em temperatura de 50°C. A estabilidade das enzimas formadas é favorecida em pH 3,0, sendo observada a manutenção de 90% da atividade inicial após 120 horas de exposição. Com a exposição do extrato enzimático às temperaturas de 30, 40 e 50°C, 100% da atividade enzimática inicial foram preservados por até 180 minutos. Na avaliação da ação do extrato enzimático no tratamento de suco de maçã, os resultados foram estatisticamente semelhantes aos observados após o uso de preparação pectinolítica comercial. Após o tratamento enzimático, foi determinado aumento de clarificação de 79%, com a redução da turbidez e da viscosidade em 98 e 10%, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as condições avaliadas para o processo submerso influenciam efetivamente na produção de pectinases e que estas enzimas têm potencial para serem utilizadas em formulações para a clarificação de sucos de frutas.

## ABSTRACT

The production of pectinases by *Aspergillus niger* LB-02-SF was carried out in submerged process, aiming to evaluate process conditions and to characterize and utilize the produced enzymes. The process conditions evaluated were medium composition, addition of pectin (enzymatic inducer) to the medium after the phase of intense cellular growth, use of vegetative inoculum and strategies to pH control. Additionally, the crude enzyme extract was characterized with respect to temperature and pH of reaction and used in Gala apple juice treatment. By using the cultivation medium formulated, which does not contain glucose, it was verified the decrease of the cellular growth without affecting the pectinase production and facilitating the control of the process parameters. The addition of pectin when the pH reached the value of 2.7 (22 hours) did not influence the fungal growth, noticing that the maximum cellular concentration (11.0 g/L) and the time that it occurred (48 hours) were similar to the ones obtained at the control condition, which had pectin in the medium since the beginning of the process (11.5 g/L at 41 hours). In this condition of enzyme inducer addition, the pectinase production was favored, reaching a maximum activity of 14 U/mL, ca. of 40% superior to that of control condition, at the same cultivation time (135 hours). The use of vegetative inoculum led to a decrease in the adaptation phase of the microorganism to the medium. Concentrations of 5 and 10% (v/v) enhanced the cellular growth; however, maximum enzyme activities of 5.5 and 3.8 U/mL were attained, which are lower than that obtained with spore inoculation (6.4 U/mL). In addition, it was not observed a reduction of the times in which the enzyme activity peaks occurred. In the cultivation with natural decrease of the initial pH 4.0 to the minimum reached (pH 2.5) and further control in this value, it was obtained maximum enzyme activity of 7.5 U/mL, which is higher than the ones obtained in the cultivation with pH controlled at minimum of 2.7 and in the cultivation with no pH control, of 6.4 and 3.5 U/mL, respectively. In shaken flasks cultivations, initial pH values of 2.0, 3.0, and 4.0 resulted in highest values for the specific production factor ( $Y_{P/X}$ ). In bioreactor cultivations with the pH controlled at these values along the process, it was verified that the cellular growth was favored at pH 3.0, with the maximum biomass concentration (10.2 g/L) attained about 90 hours before the peak observed in the run at constant pH 2.0 (7.7 g/L). On the other hand, pectinase production was favored in pH 2.0, with enzyme activity peak of 9.5 U/mL, which is higher than the ones obtained with constant pH of 3.0 and 4.0, of 4.7 and 2.0 U/mL, respectively. The strategy of cultivation conduction that enabled the highest enzyme activity of 13.2 U/mL was the use of initial pH 3.0, its control until the dissolved oxygen concentration in the medium reached 30%, and then decreasing to 2.0 by adding H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In this condition, the cellular growth was not affected, resulting in high specific production factor (1.26 U/mg). The action of pectinolytic enzymes obtained in liquid cultivation was favored at pH 4.0 and temperature of 50°C. The stability of formed enzymes is favored at pH 3.0, being observed the maintenance of about 90% of the initial activity after 120 min of incubation. At 30, 40 and 50°C, after 180 minutes of exposure, 100% of the initial enzyme activity were maintained. The enzyme extracts obtained were used in enzymatic treatment of Gala apple juice and they had comparable effects to those observed after using commercial pectinolytic preparation. After the enzymatic treatment, it was identified 79% of apple juice clarification, with 98 and 10% of turbidity and viscosity reduction, respectively. The results obtained in this work show that the conditions assessed for submerged process effectively influence pectinase production and that these enzymes have potential to be used in formulations for fruit juices clarification.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em processos industriais consiste em uma alternativa viável para a substituição de catalisadores químicos, além possibilitar o desenvolvimento de processos de menor impacto ambiental. Diversos estudos têm sido realizados no sentido de aplicar estes biocatalisadores em diferentes setores industriais, incluindo as áreas de alimentos, nutrição animal, cosméticos e medicamentos.

O mercado global de enzimas tem se mostrado em expansão, movimentando em torno de US\$ 4,8 bilhões em 2013 e com projeção de ultrapassar 5,0 bilhões até 2018 (Dewan, 2014). Dentre as enzimas produzidas comercialmente, destacam-se as enzimas pectinolíticas, ou pectinases, que atuam degradando as substâncias pécicas presentes na parede celular dos vegetais. Essas enzimas correspondem a aproximadamente 25% das enzimas utilizadas na indústria de alimentos, onde sua principal aplicação é no processamento de frutas (Li *et al.*, 2012).

Para a produção de pectinases, leveduras, bactérias e fungos filamentosos são utilizados, destacando-se os fungos do gênero *Aspergillus*. A produção microbiana é realizada em cultivo em estado sólido (CES) ou em cultivo submerso (CSm). De acordo com a literatura especializada, os processos em CES podem ser operados em menores volumes, apresentam menores riscos de contaminação e problemas de inibição por substrato e produto. Apesar disso, a presença de água livre, característica de CSm, garante maior homogeneidade ao meio e, desse modo, facilita o controle de parâmetros de processo como o pH, a temperatura e o suprimento de oxigênio.

O crescimento fúngico e a produção de pectinases são fortemente influenciados pela composição do meio de cultivo. A utilização de pectina cítrica tem a função de induzir a formação de pectinases; porém, essa substância promove o aumento da viscosidade do meio, prejudicando as condições de mistura e processos de transferência de calor e de massa. A forma de inoculação também pode influenciar o processo, principalmente em relação ao tempo de cultivo, podendo levar à redução do período de adaptação microbiana, minimizando o gasto energético do processo.

As condições de pH exercem grande efeito sobre o metabolismo fúngico, influenciando o crescimento celular e, principalmente, a produção e a estabilidade das enzimas formadas. O estudo das condições de ação catalítica, como pH e temperatura, torna-se muito importante, levando-se em consideração a aplicação industrial destas enzimas, pois as características do complexo enzimático podem variar de acordo com o microrganismo ou sua forma de produção.

A produção de pectinases fúngicas vem sendo estudada há mais de uma década no Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul (LBio). Dentro desta linha de pesquisa são abordados, entre outros aspectos, a identificação de novas linhagens produtoras de

enzimas pectinolíticas e a avaliação das condições operacionais do processo fermentativo. O fungo filamentoso *Aspergillus niger* LB-02-SF, isolado por Sandri *et al.* (2013) e pertencente à coleção de culturas do LBio, foi estudado em CES, sendo que as enzimas produzidas por esse microrganismo apresentaram características comparáveis às enzimas comerciais na clarificação de sucos de diferentes frutas.

Tendo em vista a demanda comercial e a aplicabilidade de pectinases, as condições de cultivo de *A. niger* LB-02-SF foram direcionadas ao processo submerso, envolvendo estudos de definição do meio, indução, efeitos do pH e da forma de inoculação, entre outros aspectos que devem ser considerados visando à adequação do processo proposto à produção e também à aplicação destas enzimas.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral estudar a produção de pectinases em cultivo submerso, considerando o efeito das condições do processo na obtenção, caracterização parcial e utilização das enzimas produzidas por *A. niger* LB-02-SF.

Para que o objetivo geral fosse alcançado, foram desenvolvidas atividades que focalizaram os objetivos específicos listados a seguir:

- formular um meio cultivo limitante ao crescimento celular e adequado à produção de pectinases;
- verificar a influência do tempo de adição do indutor ao cultivo, de modo a melhorar a transferência de oxigênio para o meio líquido;
- avaliar o efeito da utilização de inóculo vegetativo buscando o aumento da produtividade enzimática;
- estudar a influência do pH sobre o crescimento celular e a produção de pectinases;
- caracterizar o extrato enzimático obtido em cultivo submerso frente ao pH e à temperatura da reação;
- avaliar a estabilidade do extrato enzimático bruto em diferentes condições de pH e temperatura;
- avaliar a utilização do extrato pectinolítico produzido no tratamento de suco de maçã.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Enzimas em processos industriais

Enzimas são moléculas proteicas que atuam como catalisadores em reações bioquímicas, trazendo grande contribuição para a indústria. As enzimas são aplicadas em diversos segmentos industriais, incluindo a área de alimentos, nutrição animal, cosméticos, medicamentos e como ferramenta em pesquisa e desenvolvimento de novos processos ou produtos já existentes. Cerca de 4000 enzimas são conhecidas, sendo que aproximadamente 200 usadas comercialmente são de origem microbiana (Li *et al.*, 2012).

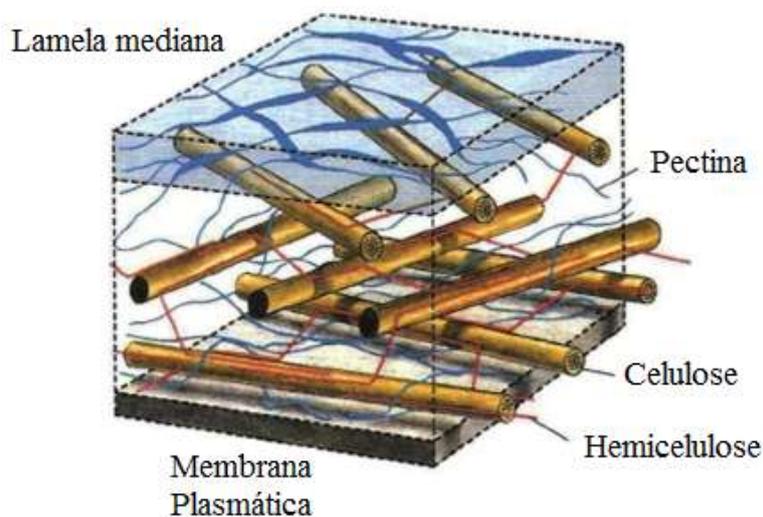
Entre os organismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico e industrial destacam-se as bactérias, leveduras e os fungos filamentosos. Em geral, estes microrganismos secretam grande quantidade e variedade de enzimas em curto tempo de cultivo, com facilidade de crescimento em uma ampla gama de substratos, inclusive em resíduos industriais (Bon *et al.*, 2008; Anbu *et al.*, 2013).

A utilização de biocatalisadores em processos industriais tem se revelado muito promissora devido a algumas características, como maior especificidade na reação, pureza do produto, condições amenas de reação (Bon *et al.*, 2008).

Globalmente, o mercado de enzimas tem mostrado um incremento gradual, que alcançou US\$ 4,5 bilhões em 2012 e, aproximadamente, US\$ 4,8 bilhões em 2013, com destaque para a indústria de alimentos. Até 2018, o aumento médio esperado é de 8% (Dewan, 2014). Entre as enzimas produzidas, 75% correspondem a hidrolases e, dentre estas, as pectinases, especificamente, se consolidam cada vez mais como uma das enzimas mais relevantes industrialmente (Prakash *et al.*, 2013). As pectinases são enzimas utilizadas principalmente para o segmento de alimentos e bebidas, sendo que o mercado de pectinases responde por um quarto da produção total de enzimas alimentares no mundo (Tari *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

### 2.2 Pectinases e substâncias pécticas

Enzimas pectinolíticas, também chamadas de pectinases, correspondem a um grupo de enzimas que promove a desconstrução dos polissacarídeos que formam as substâncias pécticas (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005). O termo substâncias pécticas se refere a um grupo formado por polissacarídeos heterogêneos, carregados negativamente, ácidos e de alta massa molecular que estão presentes na parede celular de vegetais (Jayani *et al.*, 2005; Uenojo & Pastore, 2007). As substâncias pécticas correspondem de 0,5 a 4,0% da massa fresca de frutos e são os principais constituintes da lamela média celular, como representado na Figura 1, onde se apresentam sob a forma de pectato de cálcio e magnésio (Jayani *et al.*, 2005).



**Figura 1** - Estrutura da parede celular vegetal (Raven *et al.*, 2007).

Na literatura, substâncias pécnicas são descritas apresentando como constituintes básicos resíduos de ácido galacturônico ligados entre si por ligações  $\alpha$ -1,4 (Jayani *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2013). Essas macromoléculas são compostas por duas estruturas principais, as ramnagalacturonanas, formadas por resíduos de ácido galacturônico interligados por moléculas de ramnose, e as homogalacturonanas, como a pectina e o ácido péctico, formadas por moléculas de ácido galacturônico (Da Silva *et al.*, 1997). A pectina é solúvel em água, com baixa solubilidade em solventes orgânicos, sendo diferenciada de ácidos pécticos pela presença de mais de 75% de seus grupos carboxila esterificados por grupos metoxila (Whitaker, 1984; Kashyap *et al.*, 2001). Quando mais de 50% de seus grupos carboxila apresentam-se esterificados por grupos metoxila, são consideradas de alto grau de metoxilação e apresentam alto poder geleificante, sendo utilizadas na indústria de alimentos para a produção de geleias (Aspinall, 1970).

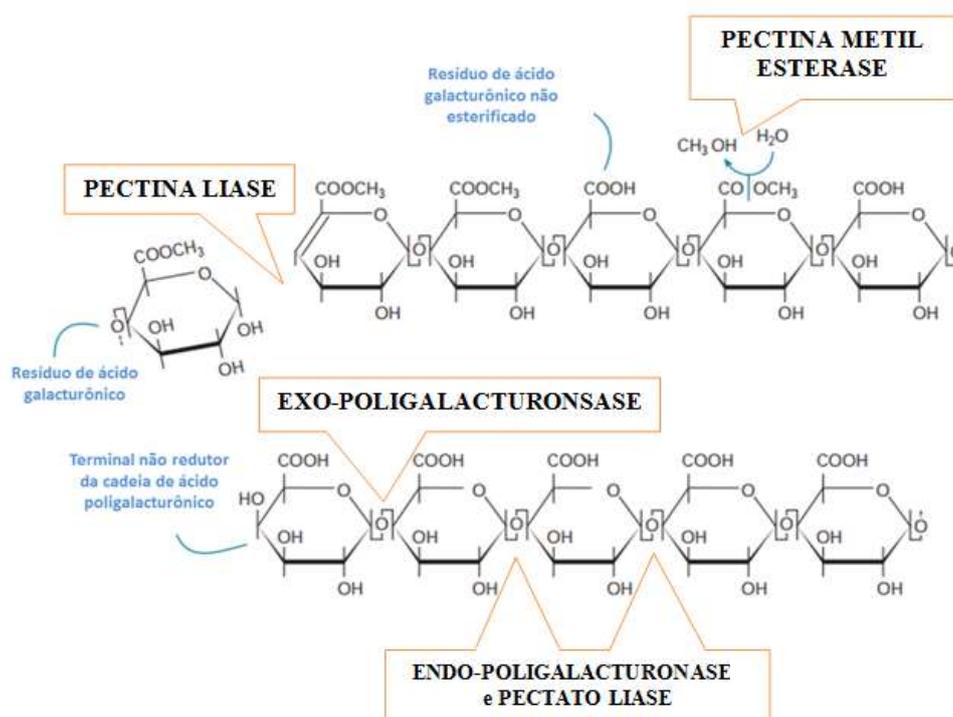
### 2.2.1 Classificação das pectinases

Devido à estrutura complexa e heterogênea da pectina, é necessário que várias enzimas estejam envolvidas na sua degradação (Martínez-Trujillo *et al.*, 2009). De acordo com a sua forma de ação sobre as macromoléculas pécticas, as enzimas pécticas podem ser classificadas em desmetoxilantes, que agem promovendo a remoção dos resíduos metoxila, desesterificando a pectina e o ácido péctico, e em despolimerizantes, que atuam catalisando a quebra das ligações  $\alpha$ -1,4 da cadeia principal (Pilnik & Rombouts, 1981; Kashyap *et al.*, 2001).

A pectina metilesterase é classificada como uma enzima desmetoxilante, pois catalisa a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, produzindo ácido péctico e metanol (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005).

De acordo com Kashyap *et al.* (2001), as pectinases despolimerizantes podem ser classificadas em hidrolases e liases. Entre as hidrolases, destacam-se as poligalacturonases, que são as principais enzimas com função de hidrólise e que atuam nas ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de resíduos não metoxilados de ácido galacturônico. As endo-poligalacturonases hidrolisam aleatoriamente as ligações  $\alpha$ -1,4 entre unidades de ácido poligalacturônico e as exo-poligalacturonases hidrolisam as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico, a partir da extremidade não redutora (Jayani *et al.*, 2005).

As liases atuam por transeliminção, sendo que as endo-pectatoliasas rompem as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido pectico, as exo-pectatoliasas rompem, a partir de terminais não redutores, ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido galacturônico e as endo-pectinaliasas rompem as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido galacturônico (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005). O modo de ação de algumas enzimas que compõem o complexo pectinolítico está apresentado na Figura 2.



**Figura 2** - Modo de ação de enzimas pectinolíticas (NCBE, 2000).

### 2.2.2 pH e temperatura de ação catalítica de pectinases

A atividade catalítica de uma enzima está relacionada, principalmente, com fatores como o pH e a temperatura de reação (Cabral *et al.*, 2003). As pectinases comerciais e que são mais utilizadas no processamento de frutas e vegetais são, geralmente, derivadas de fungos do gênero *Aspergillus*, podendo ser compostas pela mistura de poligalacturonase, pectina liase e pectinesterase (Lang & Dörnenburg, 2000).

Jayani *et al.* (2005) citam como ideal para a ação de poligalacturonases a faixa de pH de 3,5-5,5 e temperaturas entre 30 a 50°C. Na literatura, são relatadas condições diferentes de pH e de temperatura para a ação de enzimas pectinolíticas, visto que, através do conhecimento destas condições, é possível aumentar a eficiência do tratamento enzimático, o que pode ser economicamente vantajoso. Alguns destes apontamentos estão relacionados no Quadro 1.

**Quadro 1** – Condições de temperatura e pH relatados para a ação de diferentes pectinases comerciais e experimentais.

<b>Enzima/ microrganismo</b>	<b>Processo de obtenção</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Referência</b>
Rapidase C80 e Pectinase CCM	-	50	4,0	Ortega <i>et al.</i> (2004)
Pectinex 3XL	-	50	4,7	Ortega <i>et al.</i> (2004)
Pectinex 100 L Plus e Panzym Clears	-	45	4,0	Gonzalez & Rosso (2011)
Pectinex Clear e Pectinex Be Color	-	40	-	Sandri <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CES	60	4-5	Phutela <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Csm	50-60	4,0-5,0	Sandri <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	CES	50-60	4,0-5,0	Poletto (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Csm	37	5,5	Gomes <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Csm	50	4,0	Rossi <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus giganteus</i>	Csm	55	5,5-6,5	Pedrolli <i>et al.</i> (2008)

CES - cultivo em estado sólido; Csm - cultivo submerso.

De acordo com o processo industrial em que serão empregadas, é necessário que a atividade enzimática se mantenha por um determinado período de tempo, sob as condições de pH e de temperatura do processo (Iyer & Ananthanarayan, 2008). Neste contexto, torna-se importante a avaliação do extrato enzimático produzido em relação à estabilidade térmica e ao pH. Essa caracterização está presente em um grande número de trabalhos que estudam a produção de pectinases por diferentes microrganismos e em diferentes tipos de processo (Gomes *et al.*, 2007).

Quanto à estabilidade frente às diferentes condições de pH, Gummadi *et al.* (2007) relataram que poligalacturonases fúngicas geralmente são estáveis na faixa de pH de 3,0 a 5,0. Souza *et al.* (2010) constataram a maior estabilidade de pectinases produzidas por *A. niger* em cultivo sólido, na faixa de pH entre 3,5 e 5,5. O extrato enzimático obtido em processo submerso de *A. niger* foi avaliado por Mohsen *et al.* (2009), através da exposição à faixa de pH

de 3,0 a 8,0, sendo que, nas condições avaliadas, maior preservação da atividade enzimática foi atingida em valores de pH de 3,0 a 6,0.

Mohsen *et al.* (2009) também avaliaram a estabilidade do extrato pectinolítico obtido em de cultivo de *A. niger* frente à temperatura. Os autores relataram maior estabilidade a 30°C, com queda acentuada da atividade enzimática em temperaturas mais altas. O mesmo comportamento foi observado por Semenova *et al.* (2003), avaliando poligalacturonases produzidas por uma espécie mutante de *Aspergillus japonicus*, em que foi observada maior estabilidade em temperatura de 30°C. Sandri (2010) relatou que as enzimas produzidas por *Aspergillus fumigatus* em meio submerso apresentaram maior estabilidade térmica durante a exposição do extrato enzimático em temperaturas de 20 a 40°C. A mesma faixa foi relatada por Rossi *et al.* (2015), avaliando a termoestabilidade de extrato enzimático bruto obtido em cultivo submerso de *A. oryzae*. De acordo com Pedrolli *et al.* (2008), em temperatura de 55°C, após 50 minutos de incubação de poligalacturonases produzidas por *A. giganteus* em cultivo submerso, cerca de 80% da atividade pectinolítica foi preservada. Entretanto, com o aumento da temperatura para 65°C, foi observada inativação das enzimas em apenas 10 minutos de incubação.

Sandri (2010) analisou a termoestabilidade do extrato enzimático bruto produzido por *A. niger* LB-02-SF em cultivo sólido. Nas temperaturas de 20, 30 e 40°C, foi observada a maior estabilidade do extrato enzimático. Poletto *et al.* (2015) avaliou a estabilidade do extrato enzimático pectinolítico concentrado também produzido em meio sólido pelo mesmo microrganismo. Durante a exposição a 30 e 40°C, foi relatada a manutenção da atividade por até 180 minutos de incubação. A 50°C, após 60 minutos, foi preservada cerca de 60% da atividade inicial. O autor destaca que, nas mesmas condições de temperatura, este valor foi superior ao obtido nos testes com as enzimas comerciais Pectinex Ultra SP-L e Novozym 33095, quando, após 60 minutos de exposição, foi observada a manutenção de 36 e 51% da atividade inicial, respectivamente.

No processamento de frutas, onde várias etapas são realizadas em temperaturas elevadas (60 a 90°C) para a hidrólise enzimática, torna-se necessário o resfriamento do material, devido à baixa estabilidade das preparações comerciais em temperaturas elevadas. Nessa situação, a utilização de enzimas termoestáveis diminuiria o tempo e o custo do processo (Gomes *et al.*, 2007). Na literatura, a maioria das pectinases termoestáveis é produzida por bactérias. Martins *et al.* (2002) destacaram a poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus*, com atividade ótima a 70°C e estabilidade a 60°C por 2 horas.

### **2.2.3 Aplicações das pectinases**

As pectinases microbianas podem ser utilizadas em uma variedade de processos industriais (Jayani *et al.*, 2005). Os primeiros registros de sua utilização comercial são da década de 1930 e referem-se à preparação de sucos de frutas e vinhos. Porém, a partir de 1960,

avanços em estudos sobre a natureza dos tecidos vegetais proporcionaram o aumento da eficiência destas enzimas nas aplicações industriais (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005).

A principal aplicação de enzimas pectinolíticas é na indústria de alimentos, sendo extensivamente usadas na produção de sucos de frutas e vinhos (Busto *et al.*, 2006; Uenojo & Pastore, 2007). A presença de substâncias pécticas no suco promove aumento da viscosidade, dificultando os processos de filtração e concentração (Alkorta *et al.*, 1998). As pectinases podem ser usadas na etapa de maceração da fruta, durante a prensagem da polpa, promovendo maior rendimento de extração do suco. Também são aplicadas na etapa de clarificação, onde atuam hidrolisando os resíduos de pectina provenientes da maceração da fruta, diminuindo a viscosidade e a turbidez do suco (Grassin & Fauquemberg, 1996; Lea, 1998).

A utilização destas enzimas também é relacionada a outros setores industriais, como a indústria têxtil, onde são utilizadas juntamente com amilases e celulasas. Pectinases e xilanases são utilizadas na degomagem de fibras naturais, substituindo o tratamento químico. São relatadas, também, a utilização de pectinases na indústria de papel; na fermentação de chá; em processos de cura de café, cacau e tabaco; no tratamento de águas de lavagem; na preparação de alimentação animal e na extração de óleos cítricos (Kashyap *et al.*, 2001; Sharma & Satyanarayana, 2006).

### **2.3 Microrganismos produtores de pectinases**

Diversos microrganismos apresentam a capacidade de sintetizar enzimas pectinolíticas, como bactérias, fungos e leveduras. Estes microrganismos são selecionados a partir de fontes como resíduos agrícolas e vegetais deteriorados (Kashyap *et al.*, 2001).

A maioria das preparações comerciais destas enzimas é obtida de fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus*. A produção de pectinases por estes fungos é vantajosa, pois cerca de 90% das enzimas produzidas são secretadas no meio de cultivo, facilitando a recuperação e a purificação das mesmas (Uenojo & Pastore, 2007). Outro fator que aumenta a empregabilidade de enzimas produzidas por fungos em nível industrial é a faixa de pH em que atuam, entre 3,0 e 6,0, compatível com a utilizada em alguns processos da indústria de alimentos, principalmente no caso de sucos de frutas (Ueda *et al.*, 1982).

O fungo filamentoso *A. niger* é o mais utilizado para a produção industrial de pectinases. Possui a classificação *generally recognized as safe* (GRAS) da *Food and Drugs Administration* (FDA), órgão do governo dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos e medicamentos. Este fungo também é listado na Resolução RDC 53/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que relaciona os microrganismos que podem ser utilizados na indústria de alimentos para a produção de pectinases (Brasil, 2014).

## 2.4 Processos de obtenção de pectinases microbianas

A produção de enzimas microbianas, entre elas, as pectinases, pode ser conduzida em duas formas de processo, distintas entre si pela quantidade de água presente no meio de cultivo. O cultivo em estado sólido (CES) é caracterizado pela ausência de água livre, porém com teor de umidade na faixa de 15 a 80%. Neste processo, o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem sobre um substrato sólido, geralmente produtos agrícolas ou resíduos de indústrias agrícolas e florestais (Cannel & Moo-Young, 1980; Solis-Pereira *et al.*, 1996).

Outra forma de produção de metabólitos microbianos é em processo submerso ou cultivo líquido (CSm), caracterizado pela presença de água livre, onde a massa de células fica em suspensão no meio (Solis-Pereira *et al.*, 1996).

As diferentes características de cada tipo de processo estão destacadas na literatura (Cannel & Moo-Young, 1980; Lonsane *et al.*, 1991; Hölker & Lenz, 2005; Prabhakar *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2006) e listadas a seguir:

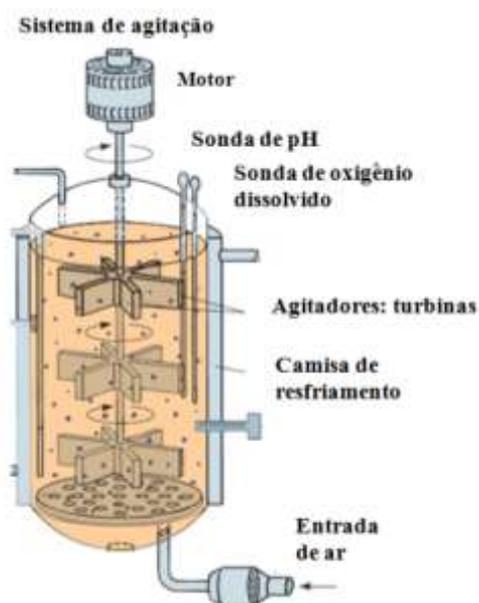
- CES apresenta menor risco de contaminação devido à baixa atividade de água;
- problemas de inibição por substrato e produto são menos comuns em cultivos em estado sólido;
- CES operam com menores volumes, pela ausência de água livre;
- em CSm, as hifas se mantêm hidratadas, pois se encontram submersas no meio de cultivo líquido;
- podem ser formados gradientes de temperatura, pH e umidade ao longo do processo em CES. Este fato não é observado em CSm, onde a maior homogeneidade do sistema permite o controle e o monitoramento de parâmetros como pH, temperatura e suprimento de oxigênio;
- o conhecimento da engenharia do processo e dos mecanismos regulatórios de produção de pectinases em CSm é muito maior do que em CES;
- a dificuldade de remoção de calor resultante do metabolismo microbiano em CES é uma das principais limitações quando se considera o aumento de escala.

A comparação entre os processos de produção de pectinases, com o mesmo microrganismo, vem sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores, sendo observado que o tipo de processo utilizado pode afetar a produção de pectinases (Solis-Pereira *et al.*, 1993; Minjares-Carranco *et al.*, 1997; Díaz-Godínez *et al.*, 2001; Patil & Dayanand, 2006; Kumar *et al.*, 2011). Esse comportamento pode ser explicado pelas diferentes condições de mistura e difusão de nutrientes inerentes a cada tipo de processo (Solis-Pereira *et al.*, 1993; Minjares-Carranco *et al.*, 1997). Apesar de alguns desses trabalhos indicarem maior produção em CES, é difícil a comparação dos resultados obtidos nas duas formas de cultivo, pois a atividade enzimática resultante de CES é dependente das condições de extração das enzimas.

As características de cada processo podem influenciar fenômenos reguladores, tais como indução ou repressão catabólica, relacionados com a síntese de pectinases. Como foi observado por Solis-Pereira *et al.* (1993), que ao avaliarem a produção de pectinases por *A. niger* em CSm e CES, observaram o efeito negativo da adição de glicose e sacarose sobre a produção de pectinases em CSm, sugerindo que possa ter ocorrido repressão da produção das enzimas pela presença dos açúcares. Por outro lado, a adição de glicose e sacarose em CES proporcionou a obtenção de aumento no título de pectinases. Díaz-Godínez *et al.* (2001), em estudo de produção de exo-poligalacturonases por *A. niger* em ambos os processos, também relataram repressão catabólica ao utilizar sacarose como fonte de carbono em CSm, o que não foi observado em CES.

### 2.5 Produção de pectinases em cultivo submerso

A forma mais comum para a condução de um cultivo submerso de produção de pectinases é em regime descontínuo. A maioria dos biorreatores utilizados é de agitação mecânica ou *stirred tank reactor* (STR) (Figura 3).



**Figura 3** - Representação esquemática de um biorreator de agitação mecânica (Disponível (online): <http://www.ifsc.usp.br/~ilanacamargo/FFI0740/aula5.pdf>).

Os biorreatores de agitação mecânica consistem em tanques cilíndricos com um agitador mecânico no eixo central, provido de impelidores distribuídos ao longo do mesmo. Estes biorreatores, em geral, equipados por chicanas, cujo objetivo é evitar a formação de vórtice, proporcionando uma mistura mais eficiente. São caracterizados pela alta flexibilidade de utilização e por promover uma eficaz homogeneização dos nutrientes, possibilitando transferência de calor e de massa eficientes, que garantem a manutenção da temperatura e o

suprimento de oxigênio (Schmidell *et al.*, 2001). Por outro lado, o cisalhamento causado pela utilização de elevadas frequências de agitadores pode provocar ruptura das células microbianas, principalmente em se tratando de cultivos de fungos filamentosos (Chisti & Jauregui-Haza, 2002).

### **2.5.1 Fatores que influenciam a produção de pectinases em cultivo submerso**

A produção de pectinases em processo submerso é dependente de vários fatores, como a forma de inoculação e a composição do meio de cultivo, assim como de parâmetros operacionais, destacando-se o pH, a temperatura e o suprimento de oxigênio.

#### **2.5.1.1 Inóculo**

As etapas prévias ao cultivo, no caso da produção de enzimas, incluem o preparo do meio, a esterilização dos equipamentos e o preparo do inóculo. Este último tem efeito direto sobre o tempo de processo (Lima *et al.*, 2001). Em experimentos de bancada utilizando alguns fungos, como os do gênero *Aspergillus*, a inoculação pode ser realizada com uma suspensão de esporos ou a partir da cultura pré-crescida, denominado inóculo vegetativo (Papagianni & Moo-Young, 2002).

Ali *et al.* (2003) testaram o efeito de diferentes proporções (0,5-3,5%) de inóculo vegetativo de *A. niger* sobre o crescimento celular e a produção de ácido cítrico. Foi demonstrado que com a inoculação do meio com 1% (m/v) da biomassa previamente cultivada, foi obtida a maior concentração de produto. Os autores relacionaram os resultados inferiores de formação de produto atingidos com a utilização das proporções de inóculo mais altas com a provável limitação de nutrientes no meio de cultivo, decorrente do elevado crescimento celular.

Reginatto *et al.* (2014) avaliaram a utilização de inóculo vegetativo em comparação ao inóculo de esporos de *A. fumigatus* para a produção de pectinases em cultivo submerso. Com o emprego de inóculo vegetativo, independente da proporção (5 ou 10% v/v), foram obtidas maiores atividades enzimáticas em relação à utilização de suspensão de esporos e maior produtividade, em função da redução de 45 horas para a obtenção do pico de atividade de pectinases.

O tipo de inóculo também foi objeto de estudo de Meneghel *et al.* (2015), que avaliaram a produção de pectinases em cultivo submerso de *A. oryzae*. Com a utilização de inóculo vegetativo, os autores relataram a diminuição da fase de adaptação do microrganismo ao meio e um aumento da atividade enzimática em comparação ao emprego de inóculo de esporos. Também, foi observada a redução do tempo de obtenção do pico de atividade máxima quando se utilizaram como inóculo proporções de 5 e 10% (v/v) da cultura pré-crescida.

Papagianni & Moo-Young (2002) verificaram que, ao utilizar-se inóculo vegetativo de *A. niger*, foi atingido maior título de biomassa e de atividade de glicoamilases. No entanto, a

velocidade específica de crescimento e a produção de proteases extracelulares foram inferiores quando comparadas às atingidas em cultivos inoculados com esporos. Os autores atribuíram esse comportamento à morfologia do microrganismo, pois, com a utilização de inóculo vegetativo, o crescimento teria se dado, preferencialmente, em forma de *pellets*, e esta característica provavelmente desfavoreceu a produção e excreção de proteases no meio.

A utilização de inóculo vegetativo, devido à diminuição do tempo de cultivo que é relatada na literatura, pode ser uma alternativa em se tratando de produção industrial de pectinases, visto que esta redução é economicamente vantajosa (Reginatto *et al.*, 2014; Meneghel *et al.*, 2015).

### **2.5.1.2 Meio de cultivo**

A composição do meio de cultivo é um fator que está diretamente ligado à síntese de enzimas pectinolíticas, pois, em função dos componentes e da concentração utilizada, podem ser favorecidos os fenômenos de indução ou de inibição da formação dessas enzimas. De forma geral, meios de cultivo para a produção de pectinases fúngicas são compostos por fontes de carbono, como glicose e lactose, fontes de nitrogênio e indutores, como pectina ou resíduos agroindustriais que contenham alto teor de pectina (Teixeira *et al.*, 2000; Martínez-Trujillo *et al.* 2009).

Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar o tipo e a concentração da fonte de carbono no meio de cultivo. Solis-Pereira *et al.* (1993) estudaram a utilização de glicose, sacarose e ácido galacturônico, juntamente com pectina, para a produção de pectinases por *A. niger* em CES e CSm. A adição das três fontes de carbono proporcionou um aumento da atividade enzimática em cultivo sólido. Por outro lado, ao utilizar glicose e sacarose em CSm, foram atingidas maiores concentrações celulares, porém, com a diminuição da produção de pectinases. Os autores sugerem que a presença destes açúcares possa ter causado a repressão da produção das enzimas em CSm.

Teixeira *et al.* (2000) avaliaram a relação entre diferentes fontes de carbono, como sacarose, pectina, glicose e glicerol, e a produção de pectinases por *A. japonicus* em cultivo submerso. Os autores relataram que a produção destas enzimas está diretamente ligada ao tipo e à concentração da fonte de carbono e, ao utilizar altas concentrações de pectina, glicose ou sacarose, foi evidenciado um efeito repressor sobre a produção das enzimas avaliadas. Neste trabalho, o melhor resultado de atividade de endo-poligalacturonases foi observado ao utilizara combinação de glicerol e pectina em baixas concentrações (0,2% m/v) e, para exo-poligalacturonases, a utilização de glicose e pectina (0,5% m/v).

Diferentes concentrações de glicose no meio foram avaliadas em cultivo submerso de *A. oryzae* por Fontana & Silveira (2012). Foi verificado o aumento do crescimento celular proporcionalmente ao aumento da concentração de glicose empregada. A produção de

poligalacturonases foi favorecida com o emprego de 10 g/L de glicose, em cultivos sem controle de pH, e 30 g/L de glicose quando o pH foi controlado em mínimo de 2,7. Os autores sugeriram que, sem o controle de pH, são atingidos valores de pH em torno de 2,0, que não favoreceram a produção das enzimas.

No cultivo submerso de *A. fumigatus* para a produção de pectinases, Sandri (2010) observou que a adição de glicose (5 a 20 g/L) ao meio de produção inibiu a síntese de pectinases. Nesse trabalho, foi também avaliada a produção dessas enzimas em cultivos em estado sólido de *A. niger* LB-02-SF em diferentes concentrações de glicose (0 a 20 g/L), sendo verificada a maior atividade enzimática na ausência de glicose no meio de cultivo.

Fawole & Odufa (2003), estudando a produção de pectinases por *A. niger* em cultivo submerso, testaram glicose (0 a 2,0 g/L), ácido galacturônico (0,8 g/L) e pectina (0,8 g/L) como fontes de carbono e verificaram inibição da produção de pectinases quando utilizaram altas concentrações de glicose (1,0 a 2,0 g/L), porém, sem influência sobre o crescimento celular. Neste estudo, também foi avaliado o efeito de várias fontes de nitrogênio sobre o crescimento celular e a produção de pectinases, destacando-se a utilização de sulfato de amônio e nitrato de amônio como as melhores fontes de nitrogênio, dentre as avaliadas. Solis-Pereira *et al.* (1993), utilizando *A. niger* em cultivos em estado sólido e submerso, destacaram o uso de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Galiotou-Panayotou *et al.* (1997) relataram a forte influência da variação da fonte de nitrogênio sobre a produção de pectinases. Neste trabalho, no qual foi estudada a produção de pectinases por um fungo do gênero *Aspergillus*, os autores observaram que maiores atividades enzimáticas foram atingidas com a utilização de sais de amônio em comparação à utilização de nitrato.

A adição de pectina ao meio de cultivo está relacionada com o fenômeno de indução à formação de enzimas, favorecendo a sua excreção e, além disso, pode ser utilizada como fonte de carbono (Rombouts & Pilnik, 1980; Maldonado & Strasser de Saad, 1998). Em geral, os meios utilizados para a produção de pectinases contêm pectina na sua composição, mas, devido ao seu alto custo, são estudadas formas de substituir esse composto por resíduos agroindustriais (Martínez-Trujillo, 2009).

Teixeira *et al.* (2000) utilizaram pectina como única fonte de carbono, em cultivo submerso de *A. japonicus*, obtendo atividades enzimáticas comparáveis com as condições em que utilizaram glicose ou sacarose. Maldonado & Strasser de Saad (1998) também obtiveram maiores atividades enzimáticas ao utilizar pectina como única fonte de carbono e verificaram, com a adição de glicose, redução da produção de pectinases e aumento da concentração celular. Baracat *et al.* (1991), com a utilização de diferentes fontes de carbono para a produção de poligalacturonases por *A. fumigatus*, verificaram que maiores atividades enzimáticas foram atingidas em cultivos com o uso de polpa de laranja em comparação com a utilização de pectina cítrica.

Meneghel *et al.* (2014), em cultivo submerso de *A. oryzae*, buscando a diminuição da viscosidade causada pela presença de pectina no meio, definiram como melhor condição a adição da pectina 24 horas após a inoculação. Com isso, os mecanismos de transferência de calor e de massa durante o período de intenso crescimento celular foram facilitados, possibilitando o controle e o monitoramento dos parâmetros operacionais.

Malvessi & Silveira (2004) relataram a utilização de um meio de cultivo baseado em farelo de trigo e na presença de pectina, como agente indutor, para produção de poligalacturonases de *A. oryzae*, em cultivo submerso. Segundo os autores, a produção foi favorecida nos meios com a utilização de farelo de trigo. Estudos anteriores também indicaram que a utilização de farelo de trigo na formulação do meio de cultivo, em processos submersos, favorece a produção de poligalacturonases (Maiorano, 1990; Kapritchkoff, 1996).

Fontana *et al.* (2009) propuseram a substituição de farelo de trigo integral por uma solução extraída desta matéria-prima em cultivos de *A. oryzae* para a produção de pectinases, desenvolvendo, assim, um meio de cultivo na ausência de sólidos em suspensão, o que também facilitou, de acordo com os autores, a avaliação cinética do processo. Nestas condições, os resultados obtidos em termos de atividade de pectinases foram comparáveis aos atingidos com o emprego do farelo de trigo integral. O meio desenvolvido neste trabalho, isento de sólidos em suspensão, serviu como base para os meios definidos por Sandri (2010), em cultivo submerso de *A. fumigatus*, e por Meneghel *et al.* (2014), em cultivo submerso de *A. oryzae*.

### **2.5.1.3 Temperatura**

A temperatura em que é conduzido o processo exerce influência direta sobre a produção de pectinases fúngicas. Em geral, a temperatura empregada nos cultivos submersos para a produção de enzimas pectinolíticas varia de 20 a 30°C.

Galiotou-Panayotou *et al.* (1997), em cultivos de uma espécie do gênero *Aspergillus* em meio submerso, observaram maior atividade de pectinases utilizando a temperatura de 25°C. Levin & Forchiassin (1998) relataram a obtenção de maior atividade pectinolítica, produzida por *Trametes trogii* em processo submerso, em temperaturas entre 23 e 28°C.

Fawole & Odunfa (2003), em cultivo submerso de *A. niger*, avaliaram uma faixa de temperatura entre 20 e 45°C, observando aumento da atividade enzimática com o aumento da temperatura até 40°C, onde foram obtidos os melhores resultados. Lenartovicz *et al.* (2003) avaliaram o efeito da temperatura sobre o crescimento de *A. fumigatus* em meio submerso e destacaram a melhor condição para o crescimento celular a 30°C, com queda na formação de biomassa em temperaturas superiores a 42°C.

#### 2.5.1.4 Suprimento de oxigênio

Em grande parte dos processos biotecnológicos de interesse industrial, como na obtenção de antibióticos, enzimas, vitaminas, entre outros produtos, são empregados microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos. Em processos conduzidos em aerobiose, os microrganismos necessitam de uma quantidade não limitante de oxigênio dissolvido no meio, pois este é utilizado para a respiração microbiana; sendo assim, influencia o crescimento celular e é fundamental para a produção de metabólitos (Schmidell *et al.*, 2001; Najafpour, 2007; Bastos, 2010).

Uma vez que a solubilidade de oxigênio em água é baixa, maior é a dificuldade em termos de transferência de oxigênio para as células. Quando se considera o meio de cultivo, o qual contém quantidades de nutrientes de fácil dissolução, o suprimento de oxigênio é ainda mais dificultado. O aumento da viscosidade do meio também influencia negativamente a dissolução de oxigênio (Schmidell *et al.*, 2001).

Lai *et al.* (2005) estudaram o controle da concentração de oxigênio dissolvido no meio em valores constantes durante o cultivo de *Aspergillus terreus* para a produção do metabólito secundário lovastatina. Os autores apresentaram como a melhor condição, o controle da concentração de oxigênio dissolvido em 20% de saturação, onde foram obtidos maiores valores de lovastatina e de consumo de açúcares, porém, desfavorável ao crescimento celular.

Meneghel *et al.* (2014) relataram que maior concentração celular de *A. oryzae* foi atingida quando a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em mínimo de 30% da saturação durante todo o cultivo em meio líquido. Os autores afirmam que, nestas condições, o fornecimento de oxigênio ilimitado à população microbiana foi favorável à produção de pectinases. Nesse trabalho, o controle da concentração de oxigênio dissolvido no meio só foi possível com a adição do indutor enzimático, pectina cítrica, em torno de 24 horas de processo, após a fase de intenso crescimento celular.

#### 2.5.1.5 pH

A produção de pectinases por fungos do gênero *Aspergillus* apresenta relação direta com o pH do cultivo e também com a evolução deste parâmetro durante o processo fermentativo, como relatado por Fontana & Silveira (2012) em estudos de cultivos de *A. oryzae*. Em geral, é observada uma queda do pH durante a fase de intenso crescimento microbiano e, após esta etapa, há incremento nos valores de pH (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1997; Malvessi & Silveira, 2004; Martínez-Trujillo *et al.*, 2009; Sandri, 2010; Fontana & Silveira, 2012; Meneghel *et al.*, 2014). A acidificação do meio pode estar ligada à formação de ácidos orgânicos provenientes do metabolismo celular e também pode ser explicada pela liberação de dióxido de carbono formado durante o metabolismo de carboidratos, que ao reagir com a água, forma ácido carbônico (Moore-Landecker, 1996). Segundo Sternberg & Dorval (1979), a queda do pH pode estar

relacionada à liberação do íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) proveniente da fonte de nitrogênio utilizada. Quando o nitrogênio deste íon é consumido pelo microrganismo, compostos iônicos são liberados no meio, podendo formar ácidos ao reagirem com a água. Os autores sugerem, ainda, que o aumento do pH após a fase de intenso crescimento celular pode estar associado à liberação da amônia previamente consumida, por lise celular.

A fim de entender melhor este comportamento, Meneghel (2013) realizou a comparação de duas fontes de nitrogênio em cultivo de *A. oryzae*. Com a utilização de sulfato de amônio, foi verificada a queda característica do pH nas primeiras horas de cultivo. Já com a utilização de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ), o pH manteve-se constante nas primeiras horas e observou-se aumento até 24 horas de ensaio. Segundo o autor, esse perfil pode ser explicado pela liberação de íons potássio ( $\text{K}^+$ ), em consequência do consumo de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) pela população microbiana. A presença de  $\text{K}^+$  no meio de cultivo pode neutralizar a formação dos ácidos produzidos no metabolismo celular, evitando a queda do pH que é observada com outras fontes de nitrogênio.

A variação de pH durante o processo pode influenciar a estabilidade e a manutenção da atividade das enzimas formadas. Ueda *et al.* (1982) avaliaram a influência do pH na produção e na composição do complexo pectinolítico sintetizado por *A. oryzae*, observando que a composição do complexo pectinolítico foi alterada de acordo com o pH do cultivo. Os autores também sugeriram o efeito das condições de pH do processo sobre a estabilidade dessas enzimas. Em condições onde a estabilidade enzimática é negativamente influenciada por condições de cultivo, como o pH, pode ocorrer uma modificação da estrutura conformacional da enzima, impossibilitando sua ação na degradação do substrato, fenômeno conhecido como desnaturação enzimática (Fágáin, 1995).

Fawole & Odunfa (2003) e Patil & Dayanand (2006), avaliando processo submerso de *A. niger*, relataram que a produção destas enzimas é favorecida em faixas ácidas, em torno de pH 5,0. Martínez-Trujillo *et al.* (2009) avaliaram a influência do pH sobre a produção de pectinases por *Aspergillus flavipes*, em processo submerso, onde foram testados valores iniciais de pH de 3,5, 4,2 e 5,0, sem controle deste parâmetro durante o processo, verificando maiores atividades enzimáticas com pH inicial de 3,5.

Bueno *et al.* (2005), em estudo de produção de enzimas pectinolíticas em processo submerso por fungos do gênero *Aspergillus* isolados de solo, sugerem pH inicial de 2,5 como favorável à produção de pectinaesterase; porém, na condição de pH inicial 4,5, foi demonstrada a maior atividade de poligalacturonases. Pedrolli *et al.* (2008) avaliaram a faixa de pH de 3,0 a 10,0 para a produção de pectinases por *A. giganteus* em meio submerso. Os melhores resultados foram obtidos em condições ácidas de pH, com maior atividade enzimática observada no cultivo de pH inicial de 3,5.

A melhor condição de pH para a produção de pectinases por *A. fumigatus*, no trabalho desenvolvido por Sandri (2010), foi com valor inicial de 4,0, sem controle de valor mínimo, que chegou próximo a 2,5, e com valor máximo controlado em 3,5.

Malvessi & Silveira (2004), ao avaliar o cultivo submerso de *A. oryzae*, verificaram que, em pH 4,0, o crescimento celular foi favorecido, porém, a síntese de pectinases foi aumentada quando em valores em torno de pH 3,0. Em cultivos sem o controle desse parâmetro, foi verificado o aumento do pH para níveis próximos à neutralidade, com conseqüente decréscimo de atividade enzimática. Buscando aumentar a produção de enzimas, os autores realizaram ensaios com pH 3,0 constante e com pH 4,0 inicial e controlado em 2,7 após decrescer naturalmente até este valor. Nestas condições, as atividades de pectinases não mostraram a tendência de queda observada nos cultivos sem o controle de pH em valor mínimo. Utilizando o mesmo microrganismo, Fontana & Silveira (2012) verificaram que, quando o pH do cultivo foi controlado em valor mínimo de 2,7, houve aumento na produção de enzimas e, abaixo deste valor, o metabolismo microbiano e a produção das enzimas foram afetados de forma negativa, sugerindo que a produção destas enzimas é dependente do pH do processo.

O mesmo comportamento foi descrito por Meneghel *et al.* (2014), que relataram o pH 4,0 como o mais adequado ao crescimento de *A. oryzae*, porém a produção de pectinases foi favorecida em valores de pH mais ácidos. Neste trabalho, os melhores resultados de atividade enzimática foram alcançados na condição de pH inicial de 4,0, controlado neste valor até 24 horas de cultivo, com posterior redução para 2,7 pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e com controle neste valor até o final do processo.

De acordo com os relatos analisados, foi observada a influência da composição do meio de cultivo, da forma de inoculação e dos parâmetros de processo sobre a produção de pectinases por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Além disso, é fundamental a avaliação das condições de ação catalítica tendo em vista a aplicação dessas enzimas em processos industriais. Em particular para *A. niger* LB-02-SF, o estudo das condições de produção em CSM e a caracterização das enzimas tornam-se importantes, uma vez que a produção de pectinases por esse microrganismo foi anteriormente estudada em CES.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Aspergillus niger* LB-02-SF, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul e depositada no banco de culturas da Fiocruz (INCQS 40371). Esta linhagem foi isolada e estudada no trabalho desenvolvido por Sandri (2010) e, posteriormente, também avaliada por Poletto (2015) para a produção de pectinases em cultivo sólido. Em função das características do complexo enzimático pectinolítico, identificadas em cultivo sólido, no presente trabalho esta linhagem foi avaliada em cultivo submerso. O microrganismo também foi cultivado em estado sólido para a obtenção de extrato pectinolítico que foi utilizado na etapa de caracterização enzimática.

A cultura foi mantida em meio sólido glicerinado, a 4°C.

#### 3.2 Meios de cultivo

##### 3.2.1 Meio de conservação

Para a conservação e propagação do microrganismo foi utilizado o meio de cultura descrito por Maiorano (1982), com a seguinte formulação, em g/L: glicerina, 25; glicose, 25; extrato de levedura, 5; ágar-ágar, 20.

##### 3.2.2 Meio para cultivos submersos

O meio de cultivo utilizado como base nos ensaios para a definição de meio no presente trabalho foi denominado meio M e é apresentado na Tabela 1. Esta composição foi descrita por Meneghel *et al.* (2014) para a produção de pectinases por *A. oryzae* em cultivo submerso. Para a preparação do inóculo vegetativo foi utilizado o meio M, porém sem adição de pectina.

**Tabela 1** - Composição do meio utilizado em cultivo submerso.

Componente	Concentração
Pectina cítrica <sup>1</sup> (g/L)	20,0
Farelo de trigo <sup>2</sup> (em extrato aquoso) <sup>3</sup> (mL/L)	500
Extrato de levedura (g/L)	0,05
Glicose (g/L)	5,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	5,0
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	2,5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	6,3x10 <sup>-4</sup>
ZnSO <sub>4</sub> (g/L)	6,2x10 <sup>-4</sup>
MnSO <sub>4</sub> (g/L)	1,0x10 <sup>-5</sup>

Fonte: Meneghel *et al.* (2014).

Notas: <sup>1</sup>GENU® Pectin tipo USP-B, CPKelco (São Paulo); <sup>2</sup>Vicato Alimentos (Sananduva, RS); <sup>3</sup>O farelo de trigo foi substituído por seu extrato aquoso para obter-se um meio de cultivo isento de sólidos em suspensão. Para obtenção do extrato, a massa de 40 g de farelo de trigo foi suspensa em 500 mL de água destilada e autoclavada a 1atm por 15 minutos. Após resfriamento, a mistura foi filtrada e o extrato utilizado na preparação do meio.

### 3.2.3 Meio para cultivos em estado sólido

O meio de cultivo utilizado para os experimentos em estado sólido, descrito por Fontana *et al.* (2005), é apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição do meio utilizado em cultivo em estado sólido.

Componente	Concentração (g)
Pectina cítrica <sup>1</sup>	6,0
Farelo de trigo <sup>2</sup>	36,6
Glicose	10,0
Solução salina	30,5

Fonte: Fontana *et al.* (2005).

Notas: <sup>1</sup>GENU® Pectin tipo USP-B, CPKelco (São Paulo); <sup>2</sup>Vicato Alimentos (Sananduva, RS)

A solução salina utilizada tinha a seguinte composição, em g/L: 5,0 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 de MgSO<sub>4</sub>; 2,5 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6,3x10<sup>-4</sup> de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 6,2x10<sup>-4</sup> de ZnSO<sub>4</sub>; 1,0x10<sup>-5</sup> de MnSO<sub>4</sub>.

A este meio, foi adicionada água destilada, juntamente com um volume de suspensão de esporos, para ajuste da massa de cada frasco e correção da umidade para cerca de 60% (m/v) (Fontana *et al.*, 2005).

## 3.3 Condições de cultivo

Os cultivos submersos de *A. niger* foram conduzidos em frascos sob agitação e em biorreator de bancada e o cultivo em estado sólido foi realizado sob condições estáticas, em frascos Becher. As condições experimentais utilizadas nos cultivos são apresentadas na sequência.

### 3.3.1 Preparo de inóculo de esporos ou inóculo vegetativo

O inóculo obtido a partir de suspensão de esporos foi preparado da mesma forma para todos os cultivos. Em câmara de fluxo laminar, foi adicionada água destilada à placa com a cultura de *A. niger*. A mesma foi raspada para liberação dos esporos, formando uma suspensão cuja concentração foi definida por contagem em câmara de Neubauer. A inoculação para os cultivos submersos foi feita com 10<sup>8</sup> esporos por litro de meio.

Para os cultivos em estado sólido foi utilizada uma concentração de 10<sup>7</sup> esporos/100g de meio sólido.

O inóculo vegetativo foi utilizado somente para os cultivos submersos.

O tempo de crescimento do inóculo vegetativo foi definido com base no valor da máxima velocidade de crescimento celular ( $\mu_{X,max}$ ) obtida em cultivo de *A. niger* em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio definido neste trabalho (isento de pectina), em agitador de bancada (Certomat U, B. Braun Biotech, Sartorius), a 300 rpm e 28°C (Reginatto *et al.*,

2014). Este cultivo foi realizado para determinar o tempo necessário para que a população de *A. niger* atingisse a fase exponencial de crescimento. O valor da máxima velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{X,max}$ ),  $0,39\text{ h}^{-1}$ , foi alcançado em 13 horas de ensaio, quando o pH atingiu o valor de 3,2 (Anexo 1). O pH foi utilizado como parâmetro para a definição do tempo de crescimento necessário para a inoculação dos cultivos em biorreator.

### 3.3.2 Ensaio em frascos sob agitação

Os ensaios em frascos sob agitação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com gargalo alongado, contendo 100 mL de meio, cobertos com gaze e algodão hidrófobo. O ajuste do pH do meio nos ensaios em frascos sob agitação foi realizado pela adição de NaOH 2,5 mol/L ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol/L e, posteriormente, foram autoclavados por 20 minutos.

Estes cultivos foram realizados em duplicata, em agitador recíproco construído na UCS (Figura 4), a 180 rpm e 28°C, por 120 horas (Meneghel *et al.*, 2014). Nos intervalos definidos de amostragens, frascos inteiros eram removidos.



**Figura 4** – Cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em frascos sob agitação em agitador recíproco construído na UCS.

### 3.3.3 Cultivos submersos em biorreator de bancada

Os ensaios foram conduzidos em biorreator de bancada (BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick/EUA) apresentado na Figura 5, com uma cuba de vidro com volume máximo de 7,5 L, sendo utilizado neste trabalho volume operacional de 4 L. A cuba do reator tem diâmetro interno de 185 mm, sendo a agitação proporcionada por três turbinas do tipo Rushton, com 60 mm de diâmetro, com seis lâminas planas, separadas a uma distância de 30 mm. A dispersão do ar é feita a partir de um anel perfurado instalado na extremidade inferior do eixo central do agitador. O reator contém um conjunto com quatro chicanas equidistantes, com 20 mm de largura cada uma.

O sistema de amostragem consistia de um tubo de aço inoxidável, cuja extremidade situava-se próximo ao fundo da cuba, conectada a uma mangueira de silicone que, após a passagem por uma bomba peristáltica, retornava ao reator. O mesmo sistema, com reversão no sentido da bomba peristáltica, foi usado para realizar a inoculação.



**Figura 5** - Cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de bancada (BioFlo/CelliGen 115, New Brunswick/EUA).

A unidade de controle do equipamento permite a determinação e manutenção de parâmetros básicos de processo, como o pH, a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido.

O eletrodo de pH foi calibrado com soluções tampão com valores de pH de 4,0 e 7,0, e o controle deste parâmetro foi feito automaticamente com a adição de NaOH (2,5 mol/L) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 mol/L). A temperatura dos cultivos foi mantida em 28°C através da circulação da água da camisa da cuba do reator, proporcionada por uma bomba acoplada ao fermentador. As concentrações de oxigênio dissolvido foram obtidas na forma de percentagem da saturação do meio com oxigênio, com o auxílio de uma sonda polarográfica conectada ao reator e calibrada antes da inoculação. O percentual de oxigênio dissolvido foi mantido automaticamente em mínimo de 30% de saturação através de variações da vazão de entrada de ar (0,5 a 5 L/minuto) e/ou da frequência dos agitadores (300 e 750 rpm).

O biorreator é controlado por um *software* (Biocommand), que possibilita o armazenamento de dados durante o cultivo, como de pH, de oxigênio dissolvido, de temperatura e de fluxo de ar.

Os valores de frações molares de oxigênio e de dióxido de carbono no fluxo gasoso à saída do biorreator foram registrados através de um analisador de gases EX-2000 (New Brunswick/EUA) acoplado ao equipamento.

### **3.3.4 Cultivo em estado sólido**

O cultivo em estado sólido (Figura 6) foi conduzido em frascos Becher de 800 mL, contendo 100 g de meio sólido. Os meios foram esterilizados a 1 atm por 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos de *A. niger*. A homogeneização do meio de cultivo, após a inoculação, foi realizada por revolvimento manual do leito em recipiente aberto no interior da

câmara de fluxo laminar esterilizada. Os frascos foram cobertos com uma manta de gaze e algodão hidrófobo esterilizados, sendo mantidos em estufa (DeLeo, Brasil), a 30°C, em atmosfera saturada em umidade, por 96 horas (Fontana *et al.*, 2005).



**Figura 6** – Cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em estado sólido.

#### **3.3.4.1 Extração de enzimas**

A extração das enzimas do meio sólido foi realizada de acordo com as condições definidas por Poletto *et al.* (2015). Água acidificada com HCl 2 mol/L até pH 4 foi utilizada como solvente. A razão sólido-líquido de 1:10 foi utilizada na extração, realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL submetidos à agitação recíproca de 200 rpm em agitador de bancada (Certomat U/H, Sartorius, Alemanha), em temperatura ambiente (~20°C), por 15 minutos. Após este período, as suspensões obtidas foram centrifugadas em centrífuga (Sigma modelo 4-15, Alemanha) a 5836 g por 10 minutos. O extrato bruto extraído foi mantido a 4°C para as posteriores análises.

#### **3.4 Clarificação de suco de fruta**

Os extratos brutos obtidos em cultivo em meio líquido e em estado sólido foram testados na clarificação de suco de maçã Gala (*Malus domestica*) em comparação com a enzima comercial Pectinex Ultra SP-L (Novozymes Latin America Ltda). As frutas foram adquiridas no mercado local e higienizadas com água. O suco foi obtido com auxílio de um processador de alimentos (Mondial) e não foi adicionada água na preparação. As amostras de suco de maçã foram acondicionadas em tubos e para cada 6,0 mL de suco foi adicionado 1 mL dos extratos enzimáticos, sendo a dosagem utilizada de 1 unidade de pectinases totais por mL de suco. A diluição dos extratos foi realizada para padronizar a atividade enzimática em todas as condições.

O tempo de incubação dos devidos tratamentos enzimáticos foi de 60 minutos, a 50°C. Após o período de tratamento, as amostras foram resfriadas em banho de gelo para interromper a reação enzimática e centrifugadas para as posteriores análises.

### **3.5 Experimentos realizados**

#### **3.5.1 Avaliação dos perfis cinéticos**

A cepa de *A. niger* utilizada neste trabalho foi anteriormente cultivada em meio sólido para a produção de pectinases (Sandri *et al.*, 2013; Poletto, 2015). Como, no presente trabalho, o estudo da produção de pectinases por esse fungo foi realizado em cultivo submerso, optou-se por descrever inicialmente um cultivo conduzido em frascos sob agitação e outro em biorreator de bancada.

O ensaio em frascos sob agitação foi conduzido por 120 horas e a amostragem realizada em intervalos de 24 horas. Neste cultivo foram utilizadas as condições definidas por Meneghel *et al.* (2014) para cultivos líquidos de *A. oryzae*, como pH inicial de 4,0 e o meio de cultivo, denominado neste trabalho como meio M.

O ensaio em biorreator foi conduzido por 135 horas e com a utilização do meio M. O pH inicial do meio foi ajustado para 4,0, com queda natural até atingir o valor de 2,7 e controlado neste valor até o final do processo. Esta condição de pH foi utilizada com base nos trabalhos desenvolvidos com *A. oryzae*, em cultivo submerso, por Malvessi & Silveira (2004), Fontana & Silveira (2012) e Meneghel *et al.* (2014). A concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em mínimo de 30% de saturação durante o processo, de acordo com as condições definidas por Meneghel *et al.* (2014).

#### **3.5.2 Definição do meio para o cultivo submerso**

A avaliação da composição do meio de cultivo foi realizada preliminarmente em ensaios em frascos sob agitação. A partir do meio base, definido por Meneghel *et al.* (2014), foram testadas diferentes concentrações de glicose, sulfato de amônio e farelo de trigo, mantendo-se as proporções dos demais componentes do meio e condições de processo. Estes testes foram realizados com o intuito de definir um meio de cultivo que fosse limitante ao crescimento celular, porém, favorável à produção de pectinases. Em relação ao meio base (meio M), foram avaliadas concentrações inferiores de sulfato de amônio e de farelo de trigo. Para a glicose, foram testadas concentração inferior e uma superior em relação à utilizada no meio base, buscando avaliar uma faixa maior deste componente, tendo em vista a influência que pode exercer em fenômenos de indução ou repressão catabólica (Fontana *et al.*, 2005; Sandri, 2010; Fontana & Silveira, 2012). As diferentes composições de meio avaliadas em frascos sob agitação são apresentadas na Tabela 3.

Na sequência, o meio de cultivo que levou à obtenção do maior valor de fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ), nos cultivos em frascos sob agitação, foi avaliado em biorreator de bancada em comparação com o meio M, por um período de 135 horas. O meio de cultivo definido foi, então, utilizado nos cultivos realizados no decorrer do trabalho.

**Tabela 3** – Composição dos meios testados em cultivos de *Aspergillus niger* em frascos sob agitação.

Meio	Glicose (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)	Extrato aquoso de farelo de trigo <sup>1</sup> (mL/L)
M	5,0	5,0	500
A	0,0	5,0	500
B	10,0	5,0	500
C	5,0	1,0	500
D	5,0	3,0	500
E	5,0	5,0	0
F	5,0	5,0	250

Notas: <sup>1</sup> O farelo de trigo foi substituído por seu extrato aquoso para obter-se um meio de cultivo isento de sólidos em suspensão. Para obtenção do extrato aquoso, a massa de 40 g de farelo de trigo foi suspensa em 500 mL de água destilada e autoclavada a 1 atm por 15 minutos. Após resfriamento, a mistura foi filtrada e o extrato utilizado na preparação do meio.

### 3.5.3 Adição de indutor de pectinases em diferentes tempos de cultivo

Além da adição de pectina cítrica ao meio de cultivo no início do processo (condição controle), foi avaliado o efeito da adição do indutor após a fase de intenso crescimento celular, uma vez que a pectina presente no meio leva ao aumento aparente da viscosidade, influenciando o controle dos parâmetros de processo e a transferência de massa (Malvessi & Silveira, 2004; Fontana *et al.*, 2009; Meneghel *et al.*, 2014). Uma vez definido o meio de cultivo entre as condições avaliadas, apresentadas na Tabela 3, foram conduzidos cultivos em biorreator por 135 horas, sendo testadas duas condições diferentes de adição de pectina, ambas na mesma concentração (20 g/L):

- ensaio P1: adição de pectina quando foi atingida a concentração residual média de 2 g/L de açúcares redutores totais;
- ensaio P2: adição de pectina quando o pH chegou ao valor mínimo de 2,7.

### 3.5.4 Avaliação de inóculo vegetativo

A partir desta etapa de experimentos, passou a ser utilizado um novo lote de pectina cítrica e, então, o ensaio controle foi repetido para comparação com as demais condições.

A utilização de inóculo vegetativo foi testada em duas proporções em relação ao volume total de cultivo:

- ensaio V5: utilização de 5% (v/v) de inóculo em relação ao volume total de meio;
- ensaio V10: utilização de 10% (v/v) de inóculo em relação ao volume total de meio.

O tempo de crescimento do inóculo vegetativo foi definido com base no valor da máxima atividade específica de crescimento celular ( $\mu_{X,max}$ ) obtida em ensaio em frascos sob agitação e os dados referentes a esse cultivo estão mostrados no Anexo 1. Os cultivos em biorreator foram conduzidos por 140 horas.

### **3.5.5 Avaliação do pH sobre o crescimento fúngico e a produção de pectinases**

Os ensaios para a avaliação do pH foram realizados utilizando o meio definido neste trabalho, contendo pectina desde o início e inoculado com suspensão de esporos. Buscando avaliar o valor mínimo de pH atingido no cultivo, foram conduzidos dois ensaios em biorreator, ambos com pH inicial de 4,0 e com diferentes estratégias de controle de pH durante o processo, que foram comparados com a condição controle. Os ensaios estão listados a seguir:

- ensaio controle: pH inicial 4,0 e controlado em 2,7, após atingir naturalmente este valor;
- ensaio N0: pH inicial 4,0 e livre durante o cultivo;
- ensaio N1: pH inicial 4,0, com queda livre até o valor mínimo atingido e controlado neste valor até o final do processo.

A avaliação de diferentes condições de pH inicial do meio foi realizada em frascos sob agitação, a 300 rpm, 28°C, por 120 horas. Foram avaliados os valores de pH inicial de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0.

Em função dos resultados obtidos nos cultivos em frascos sob agitação, foi realizada outra etapa de ensaios em biorreator de bancada, por aproximadamente 190 horas, listados a seguir:

- ensaio N2: pH constante em 2,0;
- ensaio N3: pH constante em 3,0;
- ensaio N4: pH constante em 4,0;
- ensaio N5: pH inicial 3,0 e com queda para 2,0 com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mol/L quando a concentração de oxigênio dissolvido atingiu 30% da saturação.

### **3.5.6 Atividade enzimática em função do pH e da temperatura de reação**

A atividade de pectinases totais dos extratos brutos obtidos em cultivo submerso (ensaio N5) e em estado sólido (descrito no item 3.3.4), foi avaliada em valores de pH de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0, diluídos em solução tampão McIlvaine – fosfato dissódico/ácido cítrico (Assumpção & Morita, 1968), sendo mantidas as demais condições de análise de atividade enzimática, conforme descrito no item 3.6.4.

Para determinar-se a temperatura ótima de reação, os extratos enzimáticos brutos foram mantidos em temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, mantendo-se as condições padrões de análise.

### **3.5.7 Estabilidade dos extratos enzimáticos brutos frente ao pH e à temperatura**

O extrato enzimático bruto produzido no cultivo N5 foi exposto a diferentes condições de pH (2,0 a 8,0) por um período de 120 horas, sendo a atividade enzimática foi avaliada em intervalos de 24 horas. Para a realização deste teste, o extrato pectinolítico foi diluído em solução tampão McIlvaine – fosfato dissódico/ácido cítrico (Assumpção & Morita, 1968),

sendo mantidas as demais condições de análise de atividade enzimática, conforme descrito no item 3.6.4.

Os extratos enzimáticos brutos produzidos em cultivo submerso (ensaio Controle e N5) e em estado sólido foram avaliados quanto à estabilidade frente às diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60°C) e tempos de incubação (30, 60, 90, 150 e 180 minutos). Após o término do período de exposição em cada condição proposta, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e, na sequência, realizada a avaliação da atividade de pectinases totais conforme metodologia descrita no item 3.6.4.

### **3.5.8 Uso de extratos enzimáticos no tratamento de suco de maçã**

Os extratos brutos obtidos no ensaio N5, no cultivo em estado sólido e, ainda, a preparação enzimática comercial Pectinex Ultra SP-L (Novozymes Latin America Ltda.), foram comparados em testes de clarificação de suco natural de maçã Gala (*Malus domestica*), em duplicata. Após o período de tratamento, as amostras foram analisadas quanto à clarificação, redução de turbidez e de viscosidade.

## **3.6 Métodos analíticos**

### **3.6.1 Coleta e tratamento de amostras**

As amostras coletadas durante os ensaios foram divididas em duas alíquotas. Uma parte foi utilizada para a determinação da concentração celular e a segunda parte da amostra foi centrifugada a 10.000 rpm em centrífuga para tubos Eppendorf (Sigma, modelo 1-13, Alemanha), equipada com rotor de 9 cm de diâmetro, por 10 minutos. O sobrenadante foi armazenado a 4°C para determinação da atividade enzimática e para a quantificação de açúcares redutores.

### **3.6.2 Concentração celular**

A determinação da concentração celular foi determinada de duas formas: diretamente, por gravimetria, ou indiretamente, a partir de parâmetros respiratórios.

Para a determinação gravimétrica, um volume conhecido de amostra foi submetido à filtração a vácuo em papel filtro, previamente seco em estufa a 80°C por 20 minutos. Durante o procedimento, as amostras passaram por uma etapa de lavagem com água destilada para a remoção de componentes do meio que poderiam estar aderidos à biomassa fúngica. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 80°C, por 24 horas. Após resfriamento em desumidificador, a massa de células secas foi estimada por pesagem, descontando-se a massa inicial do filtro seco. A concentração celular foi expressa como biomassa fúngica em grama (g) de massa de células secas por litro (L) de meio, determinada pela divisão da massa de células secas pelo volume da amostra.

O acompanhamento do crescimento celular por gravimetria nas primeiras horas de cultivo pode apresentar erros em função da alta viscosidade do meio em relação à baixa concentração celular. Deste modo, no início dos ensaios em biorreator, a biomassa foi determinada a partir dos dados da demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR, *oxygen uptake rate*). Para determinar a relação entre concentração de biomassa e OUR, foi conduzido um ensaio em biorreator de bancada, utilizando o meio M, porém isento de pectina e de extrato de farelo de trigo (Anexo 2).

A OUR foi quantificada pelo método do balanço gasoso, conforme descrito por Wang (1979), a partir dos valores de fração molar de CO<sub>2</sub> resultantes do cultivo (Equação 1).

$$\text{OUR} = \frac{Q_{\text{N}_2}}{V} \cdot \left( \frac{Y_{\text{O}_2\text{e}}}{1 - Y_{\text{O}_2\text{e}}} - \frac{Y_{\text{O}_2\text{s}}}{1 - Y_{\text{O}_2\text{s}} - Y_{\text{CO}_2\text{s}}} \right) \quad (1)$$

Onde, OUR é a demanda de oxigênio no cultivo (mmol/L/h), Q<sub>N<sub>2</sub></sub> é a vazão molar de nitrogênio na entrada do biorreator (mmol/h), V é o volume de meio (L), Y<sub>O<sub>2</sub>e</sub> é a fração molar de oxigênio na entrada do fermentador (0,209), Y<sub>O<sub>2</sub>s</sub> é a fração molar de oxigênio na saída do fermentador e Y<sub>CO<sub>2</sub>s</sub> é a fração molar de dióxido de carbono na saída do fermentador.

O valor de Q<sub>N<sub>2</sub></sub> foi calculado pelo produto da vazão molar de ar na entrada do sistema (Q<sub>Ar</sub>) pela fração molar média de nitrogênio no ar (0,791). Q<sub>Ar</sub>, por sua vez, foi determinado pela Equação 2.

$$Q_{\text{Ar}} = \frac{Q_v \cdot P \cdot 1000}{R \cdot T} \quad (2)$$

Onde, Q<sub>Ar</sub> é a vazão molar de ar na entrada do biorreator (mmol/h), Q<sub>v</sub> é a vazão volumétrica de ar na entrada do biorreator (L/h), P é a pressão total no biorreator (atm), R é a constante dos gases (0,082 atm.L/(mol.K)) e T é a temperatura da fase gasosa (K).

Os valores de OUR e de concentração celular em cada tempo foram relacionados para a obtenção de uma equação que permitisse a determinação da biomassa a partir do valor de CO<sub>2</sub> medido no cultivo (Anexo 2). Essa aproximação só é válida nas primeiras horas de processo, onde o fluxo de ar no reator ainda é baixo em consequência da menor demanda de oxigênio pela população microbiana. O aumento do fluxo de ar poderia dificultar a interpretação da leitura das frações molares dos gases detectadas no analisador, uma vez que pode ocorrer arraste do gás de entrada, diminuindo a concentração de CO<sub>2</sub> medida.

### 3.6.3 Açúcares redutores totais (ART)

A concentração de açúcares redutores totais (ART) foi determinada conforme método de hidrólise ácida, descrito por Bitmann (1974) e adaptado para amostras isentas de sólidos em

suspensão (Meneghel, 2013). As amostras foram diluídas em água destilada e 1 mL desta amostra diluída foi adicionado a um tubo de ensaio juntamente com 1 mL de ácido clorídrico 2,0 mol/L. Um branco foi preparado substituindo-se a amostra por água destilada. As preparações foram submetidas a um banho a 100°C por 10 minutos e resfriadas em banho de gelo. Em seguida, para cada tubo de reação, foi adicionado 2,5 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L para correção do pH e 0,5 mL de água destilada para a equalização do volume.

A partir das amostras hidrolisadas, a quantificação de ART foi feita pelo método do ácido 3,5-di-nitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). Em tubo de ensaio foram adicionados 0,25 mL de amostra hidrolisada a 0,75 mL de solução DNS. Um branco foi preparado substituindo-se o volume de amostra por água destilada. Os tubos foram colocados em um banho a 100°C por 5 minutos, em seguida, resfriados em banho de gelo. Posteriormente, 4 mL de água destilada foram adicionados em cada tubo de reação.

A absorvância das preparações foi medida em espectrofotômetro (modelo T80+, PG Instruments, EUA), a 545 nm. As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose entre 100 e 1000 mg/L, submetidas ao mesmo procedimento.

Os resultados foram expressos em grama de glicose por litro de meio de cultivo, levando-se em conta os volumes iniciais de amostra e a diluição empregada.

#### **3.6.4 Atividade de pectinases totais**

A atividade de pectinases foi avaliada pelo método descrito por Maiorano (1990) e modificado por Malvessi (2000). Este método é baseado na medida da redução da viscosidade de uma solução padrão de pectina 0,63% (m/v) submetida à ação de enzimas pectinolíticas que rompem as ligações glicosídicas internas da cadeia de ácido poligalacturônico.

Em trabalhos anteriores (Malvessi & Silveira, 2004; Fontana *et al.*, 2009), este método foi relacionado à quantificação da atividade de endo-PG, considerando-se o papel predominante desta enzima na redução da viscosidade da solução de pectina. Entretanto, tendo em vista que a hidrólise do polissacarídeo depende da ação do conjunto de enzimas do complexo pectinolítico, os resultados da análise, neste trabalho, são referidos como pectinases totais.

A solução padrão de pectina foi preparada pela dissolução de 0,63 g de pectina em 100 mL de solução tampão acetato - ácido acético 0,05 mol/L pH 4,0 e mantida sob agitação por cerca de 12 horas.

O tampão foi preparado a partir de três soluções:

<u>Solução A:</u>	ácido acético (P.A.)	3,0 g
	água destilada	100 mL
<u>Solução B:</u>	acetato de sódio (3H <sub>2</sub> O)	6,83 g

	água destilada	100 mL
<u>Solução C:</u>	benzoato de sódio	10 g
	água destilada	100 mL

Foram misturados, então, 73,6 mL da solução A com 26,4 mL da solução B e 2,5 mL da solução C, completando-se o volume para 1000 mL com água destilada.

A técnica analítica inicia com a adição de 3,2 mL de extrato enzimático diluído a um tubo de ensaio que é submetido a um banho termostático na temperatura de 30°C. Após ambientação das amostras, foram adicionados 14,8 mL da solução de pectina 0,63% (m/v). Esta mistura foi mantida em banho, a 30°C, por 30 minutos. Decorrido este tempo, a viscosidade da mistura foi determinada em viscosímetro (modelo LDV-II+, Brookfield, EUA) a 60 rpm. Para cada amostra, foi preparado um branco da reação, com solução enzimática diluída inativada em banho a 100°C por 30 minutos, submetida ao mesmo procedimento das amostras.

Com os valores de viscosidade das preparações contendo a amostra ativa e a inativada, foi calculado o percentual de redução de viscosidade (A) pela relação apresentada na equação (3).

$$A (\%) = \frac{\text{visc. amostra inativada} - \text{visc. amostra}}{\text{visc. amostra inativada}} \times 100 \quad (3)$$

O percentual de redução de viscosidade foi relacionado com a atividade de pectinases, utilizando-se curva padrão construída a partir de uma série de diluições (entre 1:1 e 1:500) do extrato enzimático do final do cultivo. Estas amostras diluídas eram analisadas quanto à redução de viscosidade e, com os valores obtidos, eram construídas curvas relacionando a redução de viscosidade (A) com o logaritmo decimal do inverso das diluições, representando uma proporção da concentração de enzimas. Uma unidade (U) de pectinase foi definida como a quantidade de enzima (abscissa) que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas. Os demais valores de número de unidades de pectinases foram calculados proporcionalmente e uma nova curva, então, foi construída, relacionando a redução de viscosidade com o logaritmo decimal do número de unidades de pectinases. A partir do ajuste linear desta curva, foram obtidos os coeficientes utilizados para o cálculo das atividades enzimáticas, de acordo com a Equação 4.

$$PT = 10^{\frac{A-a}{b}} \cdot \frac{\text{dil}}{V} \quad (4)$$

Onde, PT é atividade enzimática de pectinases (U/mL), A é a redução de viscosidade (%), a é o coeficiente linear da curva de calibração, b é o coeficiente angular da curva de calibração, dil é a diluição da preparação enzimática e v é o volume de preparação enzimática utilizado na análise (mL).

A determinação de atividade relativa na etapa de caracterização dos extratos enzimáticos foi calculada a partir da Equação 5.

$$\text{Atividade relativa (\%)} = \frac{PT_{\text{inicial}} - PT_{\text{tempo}}}{PT_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (5)$$

Onde,  $PT_{\text{inicial}}$  é a atividade de pectinases antes da exposição às condições de pH e temperatura avaliadas e  $PT_{\text{tempo}}$  é a atividade de pectinases no tempo de exposição avaliado.

### 3.6.5 Determinação da clarificação, redução da turbidez e da viscosidade de suco de maçã

A clarificação de suco de maçã Gala foi determinada por intensidade de cor, medida em espectrofotômetro, seguindo a metodologia proposta por Ranganna (1977) e adaptada por Sandri (2010). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (modelo T80+, PG Instruments Ltda., EUA), nos comprimentos de onda de 440 e 520 nm contra água. O comprimento de onda de 440 nm corresponde à cor amarela decorrente de oxidação de polifenóis; a medida em 520 nm refere-se à cor vermelha, resultante da presença de antocianinos da fruta (Tanner & Brunner, 1985).

O suco tratado com os extratos brutos foi comparado com o suco tratado com a enzima comercial Pectinex Ultra SP-L quanto ao aumento da clarificação, redução da turbidez e da viscosidade.

A intensidade de cor (IC) do suco foi expressa como a soma das absorbâncias a 440 nm e 520 nm (Equação 6).

$$IC = Abs_{440} + Abs_{520} \quad (6)$$

A clarificação, expressa em percentual de clarificação, foi determinada em função da intensidade de cor do suco controle e do suco tratado (Equação 7):

$$\text{Clarificação (\%)} = \frac{IC_{\text{suco controle}} - IC_{\text{suco tratado}}}{IC_{\text{suco controle}}} \times 100 \quad (7)$$

A turbidez dos sucos foi determinada em turbidímetro (Digimed Modelo Dm TU), em temperatura ambiente, com a utilização de 12 mL de suco tratado. A redução da turbidez foi calculada a partir da Equação 8.

$$\text{Redução da turbidez (\%)} = \frac{Turb_{\text{suco cont}} - Turb_{\text{suco tratado}}}{Turb_{\text{suco cont}}} \times 100 \quad (8)$$

A viscosidade dos sucos de frutas foi medida em viscosímetro (Brookfield modelo LDV-II+), com a utilização de 18 mL de amostra, a 60 rpm e 30°C. A redução da viscosidade, calculada em termos de percentual de redução, foi obtida em função da medida de viscosidade do suco controle e do suco tratado, conforme a Equação 9.

$$\text{Redução da viscosidade(\%)} = \frac{\text{Visc}_{\text{suco cont}} - \text{Visc}_{\text{suco tratado}}}{\text{Visc}_{\text{suco cont}}} \times 100 \quad (9)$$

### 3.7 Parâmetros de avaliação do processo

#### 3.7.1 Fator de produção específica

O fator de produção específica relaciona a máxima atividade enzimática com a máxima concentração celular no processo e foi calculado de acordo com a Equação 10.

$$Y_{P/X} = \frac{P_{\max}}{X_{\max}} \quad (10)$$

Onde,  $Y_{P/X}$  é o fator de produção específica (U/mg),  $P_{\max}$  é a máxima atividade enzimática obtida no processo (U/mL) e  $X_{\max}$  é a máxima concentração celular obtida no processo (g/L).

#### 3.7.2 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato em produto, calculado pela Equação 11, relaciona a máxima produção de pectinases com o consumo de substrato até o momento em que esta ocorreu.

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\max} - P_0}{S_0 - S_{P,\max}} \quad (11)$$

Onde,  $Y_{P/S}$  é o fator de conversão de substrato em enzimas (U/mg),  $P_{\max}$  é a máxima atividade enzimática obtida no processo (U/mL),  $P_0$  é a atividade enzimática inicial (U/mL),  $S_0$  é a concentração inicial de substrato (g/L) e  $S_{P,\max}$  é a concentração de substrato no instante em que ocorreu  $P_{\max}$  (g/L).

O fator de conversão de substrato em células (Equação 12) relaciona a máxima concentração celular com o consumo de substrato.

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\max} - X_0}{S_0 - S_{X,\max}} \quad (12)$$

Onde,  $Y_{X/S}$  é o fator de conversão de substrato em células (g/g),  $X_{\max}$  é a máxima concentração celular obtida no cultivo,  $X_{\max}$  é a concentração celular inicial,  $S_0$  é a concentração inicial de substrato (g/L) e  $S_{X,\max}$  é a concentração de substrato no instante em que ocorreu  $X_{\max}$  (g/L).

### 3.7.3 Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica representa a concentração de produto formado por tempo de processo e foi calculada pela Equação 13.

$$p_v = \frac{P_{\max}}{t} \quad (13)$$

Onde,  $p_v$  é a produtividade volumétrica (U/mL/h),  $P_{\max}$  é a atividade enzimática máxima no processo (U/mL) e  $t_{P,\max}$  é o tempo de processo em que ocorreu  $P_{\max}$  (h).

### 3.7.4 Velocidade específica de crescimento celular

A máxima velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_{X,\max}$ ) foi estimada a partir do coeficiente angular da reta resultante do ajuste linear dos pontos experimentais, em representação semilogarítmica da concentração celular com o tempo de cultivo, durante a fase exponencial de crescimento. Nesta fase, a velocidade específica do crescimento é constante e máxima (Hiss, 2001).

## 3.8 Análises estatísticas

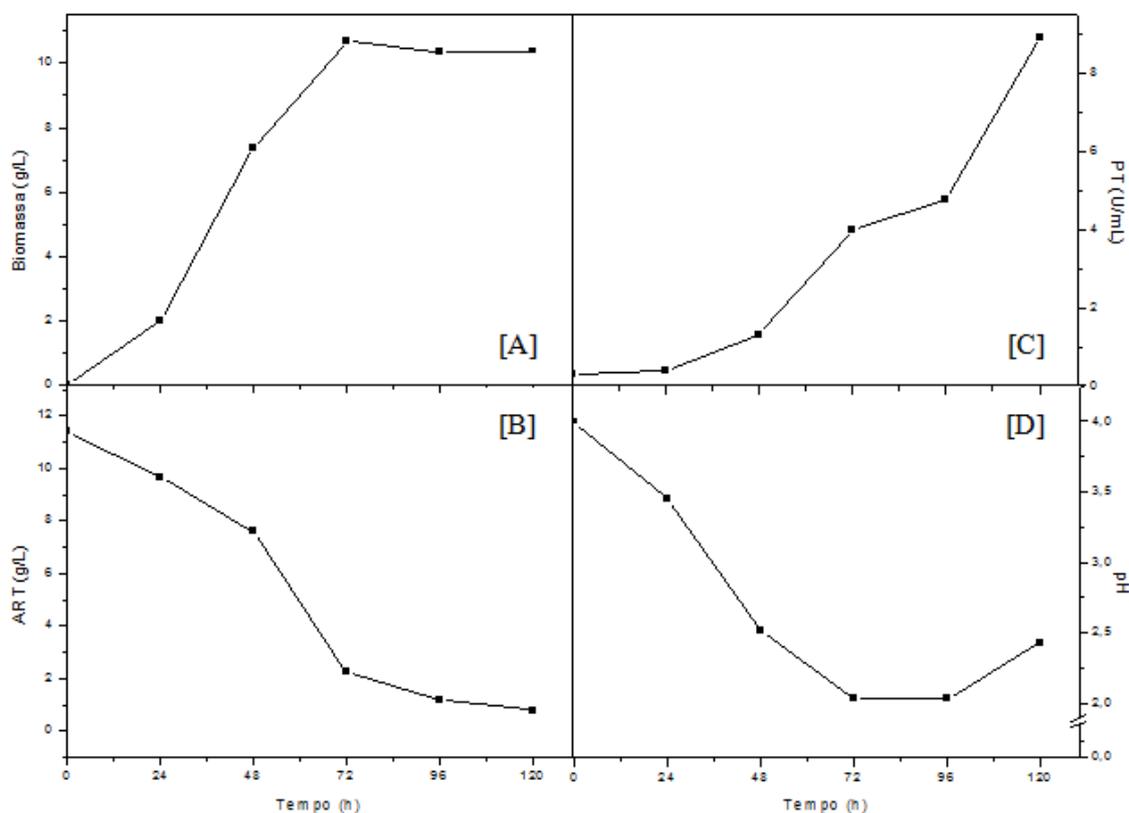
Neste trabalho, os testes estatísticos foram realizados por análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% ( $p < 0,05$ ), com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.0 para Windows, San Diego, Califórnia, EUA.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados e discutidos neste capítulo, iniciando-se pela apresentação de cultivos de *A. niger* LB-02-SF em processo submerso para o conhecimento das características cinéticas do processo em frascos sob agitação e em biorreator. Na sequência, são apresentados e discutidos os resultados da avaliação dos diferentes aspectos de processo, relacionados aos objetivos propostos, como a definição do meio de cultivo, a avaliação do tempo de adição do indutor, a utilização de inóculo vegetativo e a avaliação das condições de pH do cultivo. Também serão mostrados e discutidos os resultados da caracterização dos extratos enzimáticos brutos produzidos e a sua utilização na clarificação de suco de maçã.

##### 4.1 Características gerais do processo de obtenção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em cultivo submerso

A avaliação dos perfis cinéticos de cultivos em meio líquido de *A. niger* LB-02-SF foi realizada a partir de dois ensaios, um conduzido em frascos sob agitação e outro em biorreator. Em relação ao cultivo em frascos sob agitação, os perfis de concentração celular, pH, consumo de substrato e atividade enzimática estão mostrados na Figura 7.



**Figura 7** – Variação das concentrações de biomassa [A], de açúcares redutores totais (ART) [B], da atividade de pectinases totais (PT) [C] e do pH [D] em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em frascos sob agitação utilizando o meio M.

Em ensaios em frascos sob agitação, a amostragem foi realizada em intervalos de 24 horas. Pode-se observar que a concentração celular aumenta nas primeiras 48 horas de cultivo, sendo que, em 72 horas, já atingiu o valor máximo em torno de 10 g/L, mantendo-se nesse patamar até o final do cultivo. A concentração de substrato apresenta uma redução gradual até 72 horas de cultivo, quando chegou a valor próximo de 2,0 g/L, restando cerca de 1,0 g/L ao final do cultivo. Foi observado um perfil decrescente do pH para 2,0, até 72 horas de cultivo, seguido de aumento, entre 96 e 120 horas, para cerca de 2,5.

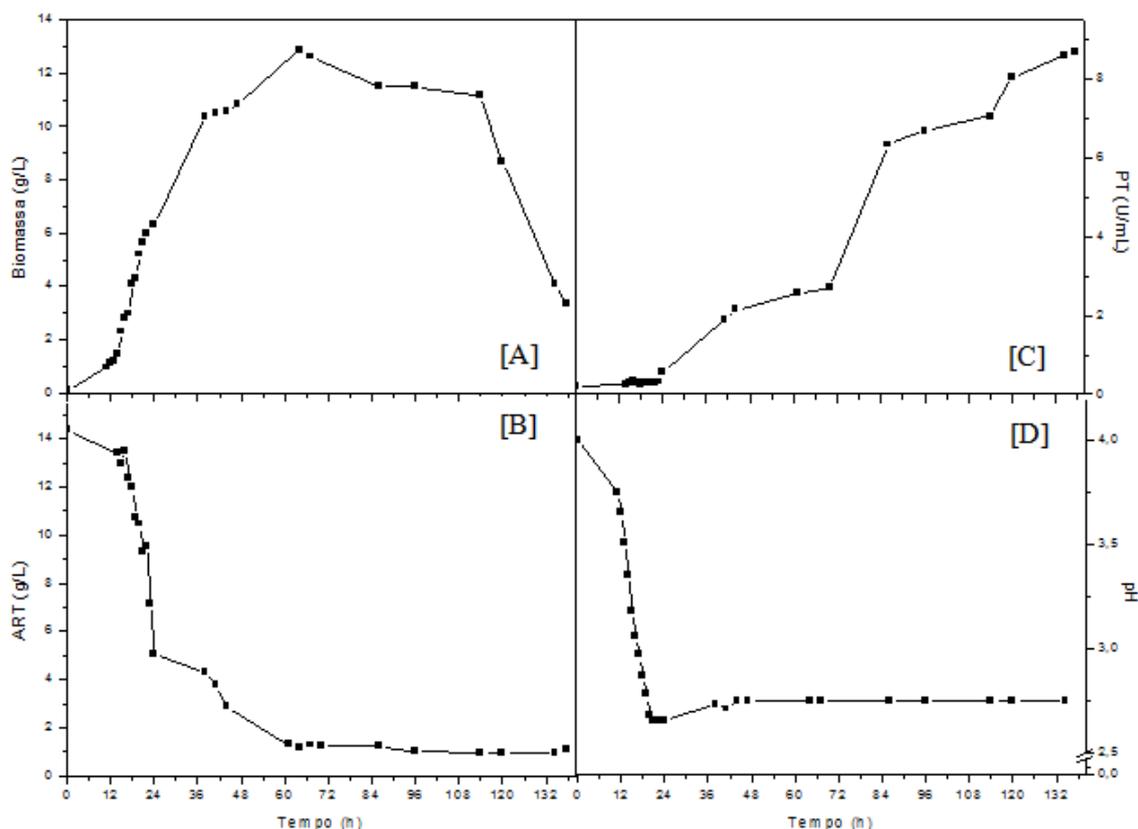
O perfil de queda do pH, relacionado à fase de intenso crescimento celular, foi descrito por diversos autores que avaliaram a produção de pectinases por fungos do gênero *Aspergillus* (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1997; Malvessi & Silveira, 2004; Martínez-Trujillo *et al.* 2009; Sandri, 2010; Fontana & Silveira, 2012; Meneghel, 2014). Como discutido no item Revisão Bibliográfica, esse comportamento pode estar ligado a diversos fatores, como à formação de ácidos orgânicos provenientes do metabolismo celular, à formação de ácido carbônico proveniente do metabolismo de carboidratos ou, ainda, resultante da liberação do íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) dependendo da fonte de nitrogênio utilizada (Sternberg & Dorval, 1979; Moore-Landecker, 1996). Malvessi & Silveira (2004), em cultivos submersos de *A. oryzae*, afirmaram que esta queda no pH é essencial para a excreção de pectinases, o que também foi relatado por Fontana & Silveira (2012) e Meneghel *et al.* (2014). Os mesmos autores também descrevem aumento do pH no final do processo, podendo estar relacionado à fase estacionária de crescimento celular (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1997).

Aumento da atividade enzimática foi verificado a partir de 48 horas de cultivo, momento em que o pH alcançou valores próximos a 2,5. Este incremento foi observado até o final do cultivo (120 horas), quando foi atingido o valor de 8,9 U/mL.

Em ensaios em frascos sob agitação, as condições de mistura são desfavorecidas e o controle de parâmetros de processo é limitado. Dessa forma, a avaliação dos perfis cinéticos pode ser prejudicada devido aos problemas de amostragem, que podem ser causados pela heterogeneidade entre os frascos e, também, pelo grande intervalo de tempo entre uma amostra e outra, geralmente limitado pelas condições operacionais disponíveis. Buscando um melhor entendimento sobre o cultivo de *A. niger* LB-02-SF em meio submerso, foi realizado ensaio em biorreator de bancada, onde é possível monitorar os parâmetros operacionais com maior facilidade e/ou precisão. Os perfis cinéticos deste cultivo estão mostrados na Figura 8.

Quanto ao perfil de concentração celular, é verificado aumento a partir de 12 horas de cultivo, porém, não foi possível mensurar a concentração celular por gravimetria nas primeiras horas de cultivo e determinar o tempo exato de fase *lag*. Alguns componentes do meio, principalmente extrato de farelo de trigo e pectina, podem interferir na medição, já que a concentração celular é muito baixa em comparação à quantidade destes compostos. A partir de 12 horas de cultivo, foi observado o aumento da biomassa até cerca de 65 horas, atingindo o seu

valor máximo, de aproximadamente 13 g/L. Um perfil de queda da concentração celular foi verificado a partir de 115 horas, até o final do processo.



**Figura 8** – Variação das concentrações de biomassa [A], de açúcares redutores totais (ART) [B], da atividade de pectinases totais (PT) [C] e do pH [D] em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada.

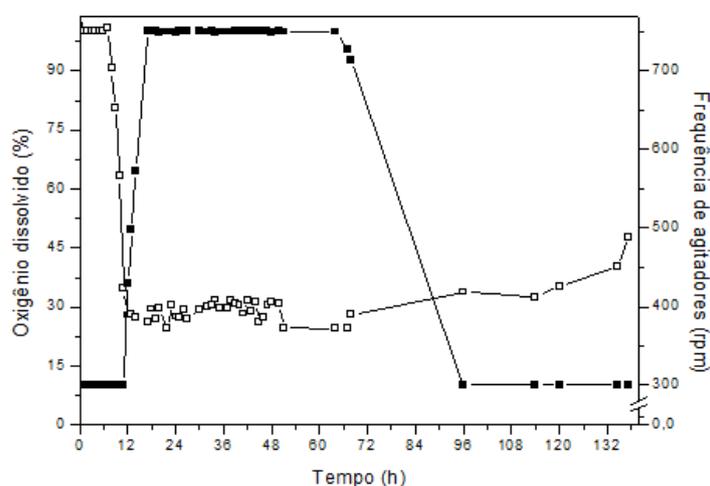
Foi observado decréscimo das concentrações de açúcares redutores totais (ART) até 24 horas de ensaio, acompanhando o acelerado crescimento celular. Por volta de 60 horas, a concentração de ART chegou ao valor de 1,0 g/L, que se manteve até o final do cultivo.

O pH do meio foi ajustado para 4,0 no início do cultivo e foi observada intensa queda nas primeiras horas de ensaio, até atingir o valor de 2,7 em, aproximadamente, 20 horas. Em torno de 40 horas, quando o pH já estava sendo controlado em mínimo de 2,7, foi observado o início da produção de pectinases, com valor de atividade enzimática de aproximadamente 2,0 U/mL. A partir desse ponto, o perfil de atividade enzimática é crescente e é atingido o valor máximo (8,6 U/mL) em 135 horas, ao final do processo. Os valores de atividade enzimática continuam aumentando após 115 horas de cultivo, quando foi evidenciado o início da queda da concentração celular. Este comportamento pode estar associado à existência de enzimas pectinolíticas intracelulares, conforme descrito na literatura (Stack *et al.*, 1980; Kawano *et al.*,

1999). Possivelmente, o incremento na atividade enzimática pode ter sido causado pela liberação destas enzimas no meio, após a ruptura das células.

Os perfis de concentração celular e atividade de pectinases determinados ao longo do tempo, em ambos os cultivos, indicam que, de acordo com a classificação de Gaden (1959), o crescimento celular e a produção enzimática são semi-associados. Nesse tipo de processo, a formação de produto se dá durante o crescimento celular e, também, na fase estacionária. Pode-se observar o aumento da biomassa por até 65 horas de cultivo e o início da produção de pectinases foi verificado a partir de 40 horas. Mesmo com a queda das concentrações celulares a partir de 65 horas de ensaio, os valores de atividade enzimática continuaram aumentando até o final do processo. Fontana & Silveira (2012) e Meneghel *et al.* (2014), em cultivos de *A. oryzae* para a produção de pectinases, relataram que os perfis de crescimento celular e de produção não são associados. Por outro lado, Sandri (2010), utilizando *A. niger* LB-02-SF em cultivos em estado sólido, afirmou que os perfis de formação de pectinases e de crescimento celular são associados. Fontana (2004) também descreveu este comportamento para os cultivos de outra cepa de *A. niger* em estado sólido.

Os perfis de variação na concentração de oxigênio dissolvido e na frequência de agitadores estão mostrados na Figura 9.



**Figura 9** – Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada. (□) concentração de oxigênio dissolvido; (■) frequência de agitadores.

Não foi observada a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido até 8 horas de processo, indicando o reduzido metabolismo fúngico, característico da fase de adaptação do microrganismo às condições do cultivo (fase *lag*). A partir deste momento, verificou-se queda acentuada da concentração de oxigênio dissolvido até 30% da saturação, sendo controlada neste valor pelo aumento automático da frequência de agitadores e do fluxo de ar. Para que a concentração de oxigênio dissolvido pudesse ser mantida em mínimo de 30% da saturação, foi

necessário manter-se a frequência de agitadores no máximo permitido pelo equipamento (750 rpm) por, aproximadamente, 60 horas, a partir de 18 horas de cultivo.

Salienta-se que a manutenção da concentração de oxigênio acima do percentual crítico para a população microbiana nem sempre é de fácil controle, pois, muitas vezes, a elevada viscosidade do caldo pode levar à incrustação de meio na base do eletrodo, situação inerente ao sistema. Mesmo com o aumento da frequência de agitadores e do fluxo de aeração, a resposta em termos de percentual de oxigênio dissolvido é, eventualmente, governada pela impossibilidade de medição correta.

Na Tabela 4, estão apresentados, de forma comparativa, os resultados obtidos nos cultivos em frascos sob agitação e em biorreator de bancada. A máxima concentração celular atingida em biorreator foi superior, provavelmente devido à maior facilidade em termos de transferência de oxigênio ao meio líquido. A atividade de pectinases, por sua vez, foi semelhante em ambas as condições.

**Tabela 4** - Resultados gerais dos cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em frascos sob agitação e em biorreator de bancada.

	<b>Frascos sob agitação</b>	<b>Biorreator de bancada</b>
$X_{\max}$ (g/L)	10,7	12,8
$t_{X,\max}$ (h)	72	64
$P_{\max}$ (U/mL)	8,9	8,6
$t_{P,\max}$ (h)	120	135
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,83	0,67

$X_{\max}$  – máxima concentração de biomassa;  $t_{X,\max}$  – tempo em que ocorreu  $X_{\max}$ ;  $P_{\max}$  – máxima atividade de pectinases;  $t_{P,\max}$  – tempo em que ocorreu  $P_{\max}$ ;  $Y_{P/X}$  – fator de produção específica.

#### 4.2 Definição da composição do meio de cultivo

A formulação do meio de cultivo foi realizada com o objetivo de encontrar uma condição que fosse limitante ao crescimento celular, para facilitar a transferência de oxigênio à população microbiana e, também, que favorecesse a produção de pectinases. Para tanto, o principal parâmetro de avaliação foi o valor de fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ), que relaciona os valores máximos de concentração celular e de atividade de pectinases totais.

Os ensaios preliminares foram conduzidos em frascos sob agitação, por 120 horas, e a composição dos meios testados foi mostrada na Tabela 3, do item 3.5.2. Os resultados obtidos nestes ensaios estão compilados na Tabela 5.

Ao avaliar o efeito de diferentes concentrações de glicose no meio de cultivo, pode-se observar a grande influência que esta fonte de carbono exerce sobre o crescimento celular, o perfil de pH e a produção de pectinases. No meio A, sem adição de glicose, foi atingida máxima concentração celular de 9,7 g/L, inferior à biomassa obtida com a utilização dos meios M

(10,7 g/L) e B (13,5 g/L). Entretanto, a produção de pectinases totais foi superior com a utilização do meio A, obtendo-se o maior valor de  $Y_{P/X}$  entre as condições testadas, de 0,989 U/mg.

**Tabela 5** - Resultados gerais dos cultivos de *Aspergillus niger* conduzidos em frascos sob agitação para avaliação das concentrações de glicose, sulfato de amônio e extrato de farelo de trigo no meio.

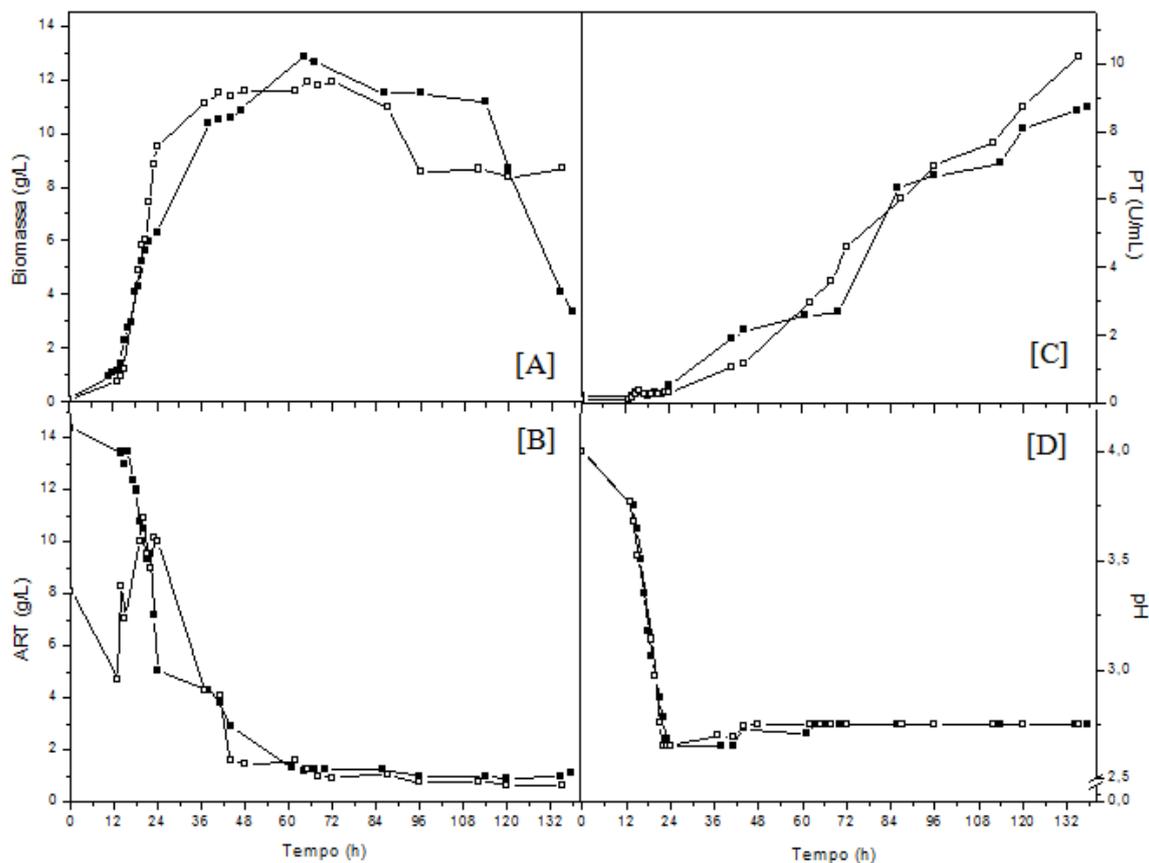
Meio	$X_{max}$ (g/L)	$P_{max}$ (U/mL)	$Y_{P/X}$ (U/mg)	$S_0$ (g/L)	$S_{final}$ (g/L)	$pH_{min}$	$pH_{final}$
<b>M</b>	10,7	8,9	0,83	11,4	1,0	2,04	2,43
<b>A</b>	9,7	9,6	0,99	6,0	0,5	2,20	2,60
<b>B</b>	13,5	9,3	0,69	20,7	1,0	1,60	1,60
<b>C</b>	9,5	3,1	0,33	11,5	2,8	1,85	2,00
<b>D</b>	10,4	7,0	0,67	11,5	0,5	1,93	2,55
<b>E</b>	8,9	3,7	0,41	9,5	0,9	1,97	3,43
<b>F</b>	10,7	5,9	0,55	10,5	0,8	1,98	3,13

$X_{max}$  – máxima concentração de biomassa;  $P_{max}$  – máxima atividade de pectinases;  $Y_{P/X}$  – fator de produção específica;  $S_0$  – ART no tempo inicial de cultivo;  $S_{final}$  – ART no tempo final de cultivo;  $pH_{min}$  – pH mínimo atingido no cultivo;  $pH_{final}$  – pH ao final do cultivo. **M** – 5 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo; **A** – 0 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo; **B** – 10 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo; **C** – 5 g/L de glicose, 1 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo; **D** – 5 g/L de glicose, 3 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo; **E** – 5 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 0 mL/L de extrato de farelo de trigo; **F** – 5 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 250 mL/L de extrato de farelo de trigo.

Em 120 horas de ensaio, concentrações de açúcares residuais próximas a 1 g/L foram determinadas nos cultivos com os meios M, A e B. Os valores de pH mínimo atingido no cultivo foram menores em função do aumento da concentração de glicose no meio. Com a utilização dos meios A e M, foi observado aumento dos valores de pH após 96 horas, porém, esse comportamento não foi verificado no ensaio com o meio B, com pH em torno de 1,6 até o final do processo. Esse comportamento foi relatado por Fontana & Silveira (2012), em cultivos de *A. oryzae* sem controle de pH, que destacaram queda do pH para valores mais baixos com o aumento da concentração inicial de glicose do meio e, quando em concentrações superiores a 10 g/L o aumento característico do pH no final do cultivo não foi observado.

Com a utilização de menores concentrações de sulfato de amônio (1,0 e 3,0 g/L) e de farelo de trigo (0 e 20 g/L) em relação ao meio M, as concentrações celulares obtidas foram semelhantes; porém, observou-se efeito negativo sobre a produção de pectinases, resultando em menores valores de  $Y_{P/X}$ . Dessa forma, optou-se por manter as concentrações destes componentes como previamente definidas no meio M e, então, realizar apenas a avaliação do efeito da concentração de glicose nos cultivos em biorreator de bancada. Devido ao grande crescimento celular e, conseqüentemente, ao menor valor de  $Y_{P/X}$ , obtido com o meio B, optou-

se por testar em biorreator apenas o meio A, sem a adição de glicose, em comparação ao meio M. Os cultivos foram conduzidos em biorreator, cujos perfis cinéticos são mostrados na Figura 10.



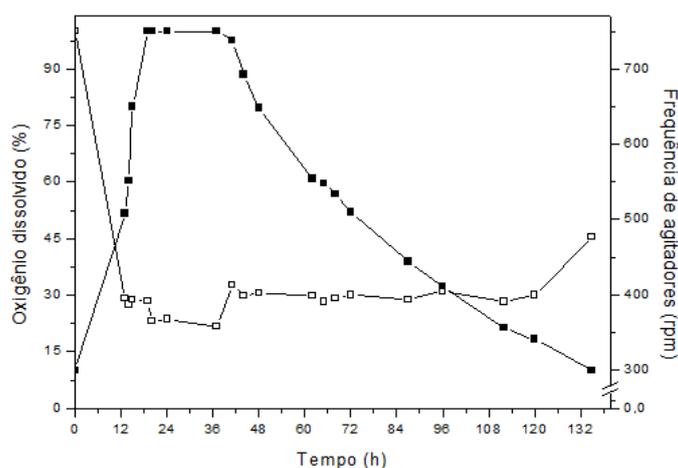
**Figura 10** – Variação das concentrações de biomassa [A], de açúcares redutores totais (ART) [B], da atividade de pectinases totais (PT) [C] e do pH [D] em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada com diferentes concentrações de glicose. (■) meio M - 5 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo; (□) meio A - 0 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo.

Os perfis de biomassa foram semelhantes no início dos cultivos. Com a utilização do meio A, a máxima concentração celular foi medida em torno de 40 horas e se manteve nesse patamar até 96 horas, quando foi verificada queda para 8,0 g/L, sem alteração até o final do processo. Ao contrário, no cultivo conduzido com o meio M, o pico de biomassa foi atingido em torno de 70 horas e foi observada queda acentuada após 96 horas. O cultivo conduzido com meio A, por não conter glicose, apresentou concentração inicial de ART inferior (8,1 g/L), porém, em torno de 20 horas de processo, foi observado aumento para valor próximo a 11 g/L. Este comportamento pode ser resultado da hidrólise de carboidratos complexos do meio, presentes no extrato de farelo de trigo. Entre 50 e 60 horas de processo, a concentração de ART chegou a cerca de 1,0 g/L nas duas condições, mantendo-se nesse valor até o final dos cultivos.

A tendência característica de queda do pH foi verificada no início dos dois cultivos, até atingir 2,7, em cerca de 20 horas, e controlado neste valor até o final dos processos. Foram

observados perfis de atividade enzimática semelhantes, com aumento até 135 horas de processo, sendo que a utilização do meio A proporcionou atividade enzimática superior (10,2 U/mL).

A Figura 11 mostra os perfis de concentração de oxigênio dissolvido e de frequência de agitadores empregadas no cultivo com o meio A. Em 12 horas de cultivo, a concentração de oxigênio dissolvido já estava sendo controlada em mínimo de 30% de saturação pelo aumento da frequência de agitadores. Entre 18 e 36 horas, foi necessário manter o sistema operando em valor máximo (750 rpm), aproximadamente 40 horas a menos do necessário para manter essa condição no cultivo em que utilizou-se o meio M (Figura 9). Apesar da elevada viscosidade do meio ter levado, muitas vezes, à interrupção da medida de oxigênio dissolvido, como já discutido anteriormente, pode-se afirmar que a utilização do meio A favoreceu a mistura e a transferência de oxigênio para o cultivo.



**Figura 11** – Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada, utilizando o meio A, isento de glicose. (□) concentração de oxigênio dissolvido; (■) frequência de agitadores.

Os resultados gerais obtidos nestes dois ensaios estão apresentados, de forma comparativa, na Tabela 6.

No cultivo com o meio M, foi verificada a maior concentração celular (12,8 g/L), pela presença de glicose nessa condição. Utilizando o meio A, o pico de biomassa (11,5 g/L) ocorreu em menor tempo de cultivo (41 horas) e foi obtida a maior atividade enzimática, 10,2 U/mL, resultando em um fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ) superior. Como a concentração de substrato inicial foi mais baixa pela ausência de glicose, os fatores de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) e em produto ( $Y_{P/S}$ ) também foram superiores. A produtividade volumétrica ( $p_V$ ) obtida no cultivo com meio A foi mais alta, pois, apesar do pico de atividade enzimática ter ocorrido no mesmo tempo de cultivo, o seu valor foi superior. Essa condição de produção apresentaria menores custos ao considerar a aplicação industrial desse processo, devido a não

utilização de glicose e ao menor gasto de energia para manter as frequências de agitadores em valores mais elevados.

**Tabela 6** - Resultados gerais dos cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de bancada em meio com diferentes concentrações de glicose

	Meio M	Meio A
$S_0$ (g/L)	14,4	8,1
$X_{max}$ (g/L)	12,8	11,5
$t_{X,max}$ (h)	64	41
$S_{cons, Xmax}$ (g/L)	13,2	4,0
$P_{max}$ (U/mL)	8,6	10,2
$t_{P,max}$ (h)	135	135
$S_{cons, Pmax}$ (g/L)	13,5	7,5
$S_{cons}$ (g/L)	13,5	7,5
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,67	0,88
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,97	2,87
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,64	1,36
$p_V$ (U/mL/h)	0,064	0,075

$S_0$  – concentração de ART inicial;  $X_{max}$  – máxima concentração de biomassa;  $t_{X,max}$  – tempo em que ocorreu  $X_{max}$ ;  $S_{cons, Xmax}$  – consumo de ART até  $X_{max}$ ;  $P_{max}$  – máxima atividade de pectinases;  $t_{P,max}$  – tempo em que ocorreu  $P_{max}$ ;  $Y_{P/X}$  – fator de produção específica;  $S_{cons, Pmax}$  – consumo de ART até  $P_{max}$ ;  $S_{cons}$  – consumo total de ART;  $Y_{X/S}$  – fator de conversão de substrato em células;  $Y_{P/S}$  – fator de conversão de substrato em pectinases;  $p_V$  – produtividade volumétrica; **Meio M** – 5 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo; **Meio A** – 0 g/L de glicose, 5 g/L de sulfato de amônio e 500 mL/L de extrato de farelo de trigo.

A avaliação dos perfis cinéticos e dos parâmetros calculados para ambos os meios permitiu verificar que a condução do processo com a utilização do meio A, isento de glicose, revela-se a melhor alternativa para a produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em meio submerso, em função do maior valor de  $Y_{P/X}$  e de melhores condições de transferência de oxigênio à população microbiana. Sandri (2010), em cultivo em estado sólido desta mesma cepa, relatou que a utilização de meio isento de glicose favoreceu a produção de pectinases. Solis-Pereira *et al.* (1993) avaliaram a produção de pectinases por *A. niger* em CES e CSm, também verificando o efeito negativo da adição de glicose e de sacarose sobre a produção de pectinases em CSm, o que não foi observado em CES.

Os experimentos que serão apresentados na sequência deste trabalho foram conduzidos com a utilização do meio A, sendo que o cultivo apresentado neste item passou a ser denominado de cultivo controle e utilizado para a comparação com as demais condições testadas.

### 4.3 Avaliação do tempo de adição do indutor enzimático ao cultivo

A pectina atua como indutor da formação de pectinases, por isso, sua presença no meio de produção é essencial (Rombouts & Pilnik, 1980). Porém, o aumento da concentração de pectina utilizada é proporcional ao aumento da viscosidade do meio, o que pode prejudicar as condições de mistura e a transferência de oxigênio (Meneghel, 2013). Na tentativa de minimizar os efeitos causados pela elevada viscosidade no início no cultivo, quando o microrganismo encontra-se na fase exponencial de crescimento, foi avaliada a possibilidade de adição de pectina em dois diferentes tempos de processo, sempre após o período de intenso crescimento celular.

Inicialmente, no cultivo P1, foi realizado o acompanhamento da concentração de ART nas horas iniciais de cultivo e a pectina foi adicionada no momento em que valores próximos a 2,0 g/L foram atingidos. Este valor de ART foi escolhido por indicar um elevado consumo de açúcares, supondo que o microrganismo ainda não estivesse em condições de limitação de substrato. A concentração de ART chegou a 1,7 g/L em 18 horas após o início do cultivo P1 e, então, foi realizada a adição de 20 g/L de pectina cítrica.

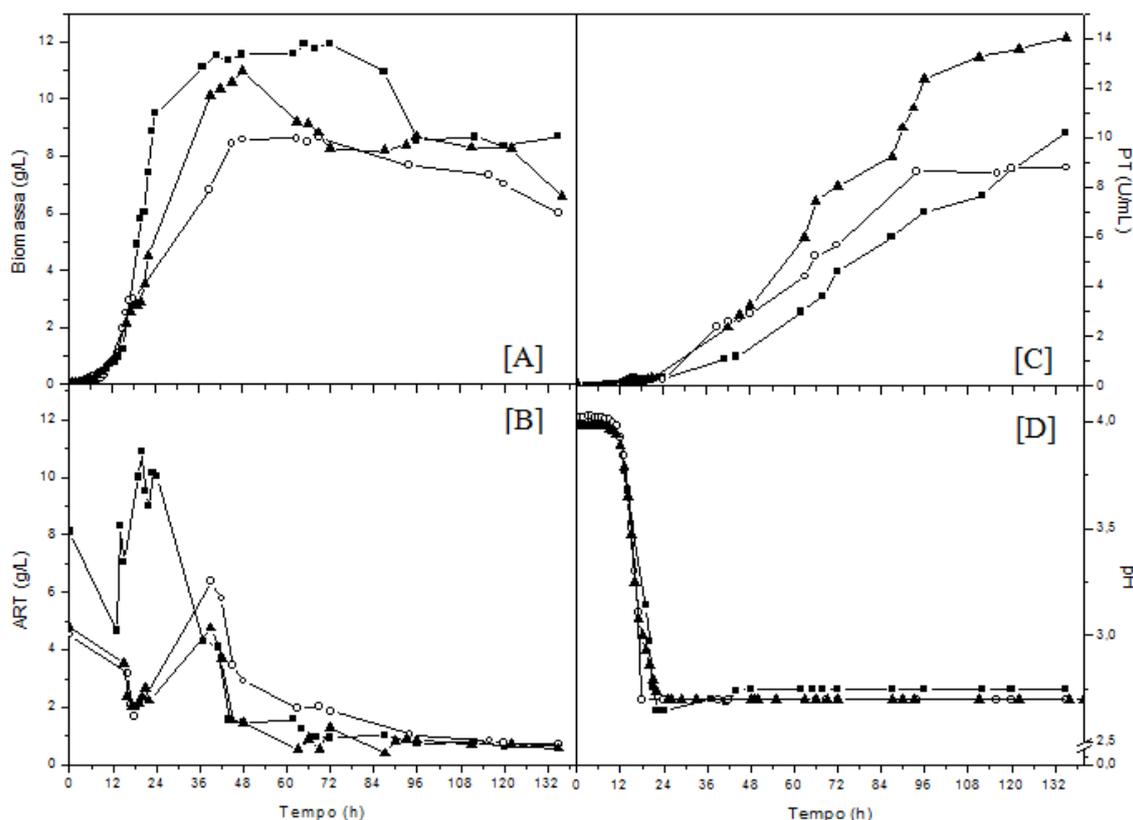
No cultivo P2, a adição de pectina baseou-se nos valores de pH e a pectina foi adicionada quando o pH atingiu o valor mínimo de 2,7, em 22 horas de processo.

Os perfis cinéticos destes cultivos em comparação ao ensaio controle, todos conduzidos em biorreator de bancada, são mostrados na Figura 12.

Os perfis de concentração de ART foram semelhantes nos cultivos P1 e P2, sendo verificado um elevado aumento na concentração de substrato em torno de 40 horas de processo. Comportamento diferente foi observado na condição controle, com pico de ART em aproximadamente 20 horas de cultivo. Nos ensaios P2 e controle, concentrações residuais de ART, abaixo de 1,0 g/L, foram determinadas a partir de 72 horas. Já em P1, a concentração de substrato mínima só foi atingida em torno de 96 horas.

Em P1 e P2, foram observados perfis de concentração celular semelhantes ao controle, antes de adição do indutor. Isso pode indicar que a diminuição da viscosidade do meio no início do cultivo, devido à ausência de pectina, não influenciou o crescimento celular nas primeiras horas de processo. As máximas concentrações celulares, inferiores à verificada no cultivo controle, foram obtidas em torno de 48 horas nos cultivos P1 e P2, de 8,5 e 11 g/L, respectivamente, diferentemente dos resultados obtidos por Meneghel *et al.* (2014), em cultivo submerso de *A. oryzae*, que destacaram o favorecimento do crescimento celular com a adição de pectina em 24 horas de processo.

No cultivo P1, após atingido o pico, foi verificada queda das concentrações de biomassa para 6,0 g/L, mantendo-se nesse patamar até o final do processo. Em P2, também foi observado este comportamento, com concentração celular em torno de 8,0 g/L entre 72 horas e o final do ensaio. Em comparação à condição controle, o crescimento celular foi desfavorecido com a adição posterior de pectina, principalmente no cultivo P1.



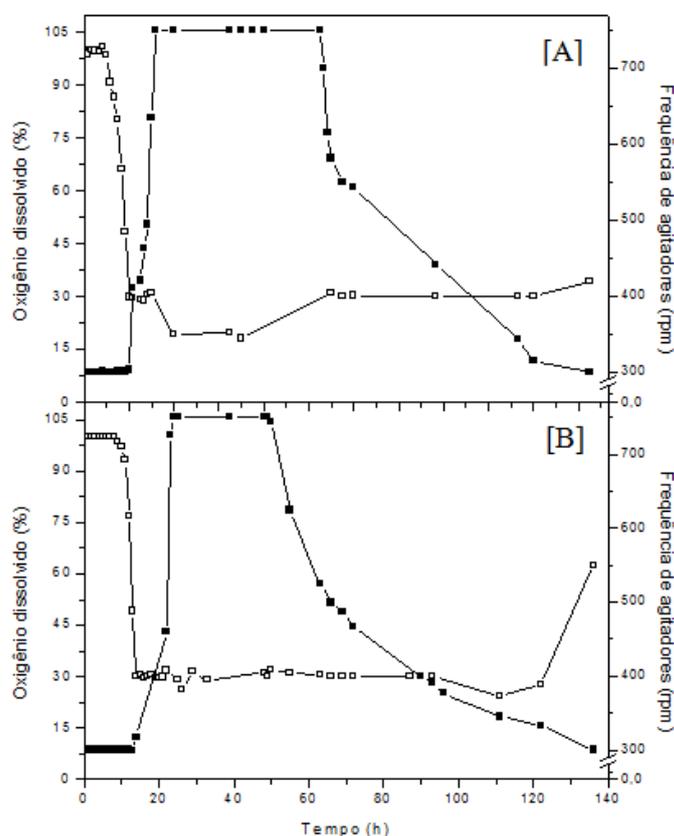
**Figura 12** – Variação das concentrações de biomassa [A], de açúcares redutores totais (ART) [B], da atividade de pectinases totais (PT) [C] e do pH [D] em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada com diferentes tempos de adição de pectina. (■) Controle – adição de pectina no tempo zero; (○) P1 - adição de pectina quando a concentração de ART foi inferior a 2,0 g/L (18 horas); (▲) P2 - adição de pectina quando o pH chegou a 2,7 (22 horas).

Variação dos valores de pH foi observada a partir de, aproximadamente, 10 horas nos três cultivos avaliados. O pH 2,7 foi atingido em 22 horas nos cultivos controle e em P2, indicando, como já comentado, que não foram observadas diferenças nas condições de crescimento celular antes da adição de pectina. Este comportamento não foi observado por Meneghel *et al.* (2014) que, em cultivo de com adição tardia do indutor, o pH mínimo de 2,7 foi atingido em torno de 18 horas, já no ensaio com pectina no tempo zero, este valor de pH foi atingido em mais de 24 horas de processo, indicando que o crescimento celular ocorreu de forma mais rápida na ausência de pectina.

Em P1, no momento da adição do indutor (18 horas), o pH foi reduzido de 3,1 para 2,7 com a adição de ácido, uma vez que após a adição de pectina, as condições de mistura ficam prejudicadas, dificultando o controle desse parâmetro (Figura 12).

Nos cultivos P1 e P2, os valores de atividade enzimática foram superiores em comparação ao cultivo controle por até 96 horas de processo, onde foi atingida a máxima atividade enzimática em P1, de 8,6 U/mL, mantendo-se nesse valor até o final do ensaio. A partir deste tempo, foi observado aumento gradual da atividade enzimática em P2, chegando ao valor máximo de 14,0 U/mL em 135 horas, superior ao obtido no cultivo controle (10,2 U/mL)

no mesmo tempo de processo. Na Figura 13 são apresentados os perfis de concentração de oxigênio dissolvido e frequência de agitadores nos cultivos P1 e P2.



**Figura 13** – Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada com adição de pectina em diferentes tempos. [A] P1 – adição de pectina quando a concentração de ART foi inferior a 2,0 g/L (18 horas); [B] P2 – adição de pectina quando o pH atingiu 2,7 (22 horas). (□) concentração de oxigênio dissolvido; (■) frequência de agitadores.

Em P1 e P2, variação da concentração de oxigênio dissolvido foi observada a partir de 8 horas de processo, atingindo 30% da saturação em torno de 15 horas. Porém, apenas em P1, não foi possível o controle neste valor durante todo o cultivo. Mesmo com a frequência dos agitadores sendo mantida em valor máximo por um período de 45 horas, foram observados valores inferiores a 30% a partir de 24 horas de ensaio, momento em que foi verificado aumento acentuado das concentrações celulares. A dificuldade de fornecimento de oxigênio pode ter limitado o crescimento celular em P1, o que foi observado a partir 45 horas de processo.

Ao contrário do que foi observado nas condições de adição de indutor avaliadas neste trabalho, no estudo de Meneghel *et al.* (2014) com *A. oryzae*, a diminuição da viscosidade devido à ausência de pectina favoreceu o controle dos parâmetros operacionais, promovendo melhores condições de mistura e transferência de oxigênio, sendo possível utilizar frequência dos agitadores inferiores às utilizadas no processo com pectina desde o início. Operar o sistema

com menores frequências de agitadores seria uma das principais vantagens de utilizar essa condição de adição de indutor em processos industriais, pois reduziria os custos de operação do processo e, principalmente, o consumo energético, visto que poderiam ser utilizadas condições de agitação mais brandas.

Os resultados gerais obtidos nos cultivos P1 e P2 estão mostrados na Tabela 7. Em P1, a máxima concentração celular foi inferior às obtidas no ensaio controle e em P2, mas os picos ocorreram em tempos próximos nos três cultivos. A estratégia de adição de pectina utilizada levou à redução dos valores concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo em P1, prejudicando as condições de mistura, de transferência de massa para o meio de cultivo e desfavorecendo o crescimento celular. Em P1, a máxima atividade enzimática (8,6 U/mL) foi inferior à verificada no cultivo controle (10,2 U/mL), porém, o pico foi observado anteriormente, cerca de 40 horas antes que nos outros dois cultivos.

Possivelmente, as condições menos favoráveis de mistura, observadas pela maior dificuldade de controle da concentração de oxigênio dissolvido, podem ter afetado o crescimento celular, o que também foi desfavorável à produção de pectinases.

**Tabela 7** - Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* em biorreator de bancada com diferentes tempos de adição do indutor enzimático.

	<b>Controle</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>
<b>S<sub>0</sub> (g/L)</b>	8,1	4,5	4,8
<b>X<sub>max</sub> (g/L)</b>	11,5	8,5	11,0
<b>t<sub>X,max</sub> (h)</b>	41	45	48
<b>S<sub>cons, Xmax</sub>(g/L)</b>	4,0	1,0	3,4
<b>P<sub>max</sub> (U/mL)</b>	10,2	8,6	14,0
<b>t<sub>P,max</sub> (h)</b>	135	94	135
<b>S<sub>cons, Pmax</sub>(g/L)</b>	7,5	3,5	4,2
<b>S<sub>cons</sub>(g/L)</b>	7,5	3,8	4,2
<b>Y<sub>P/X</sub> (U/mg)</b>	0,88	1,01	1,27
<b>Y<sub>X/S</sub> (g/g)</b>	2,87	8,50	3,23
<b>Y<sub>P/S</sub> (U/mg)</b>	1,36	2,46	3,34
<b>p<sub>V</sub> (U/mL/h)</b>	0,075	0,091	0,103

X<sub>max</sub> – máxima concentração de biomassa; t<sub>X,max</sub> – tempo em que ocorreu X<sub>max</sub>; S<sub>cons,Xmax</sub> – consumo de ART até X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – máxima atividade de pectinases; t<sub>P,max</sub> – tempo em que ocorreu P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – fator de produção específica; S<sub>cons,Pmax</sub> – consumo de ART até P<sub>max</sub>; S<sub>cons</sub> – consumo total de ART; Y<sub>X/S</sub> – fator de conversão de substrato em células; Y<sub>P/S</sub> – fator de conversão de substrato em pectinases; p<sub>V</sub> – produtividade volumétrica; **Controle** – adição de pectina no tempo zero; **P1** – adição de pectina quando a concentração de ART foi inferior a 2,0 g/L (18 horas); **P2** – adição de pectina quando o pH atingiu 2,7 (22 horas).

Em P2, apesar da obtenção de crescimento celular semelhante aos da condição controle, a produção de pectinases foi favorecida com a adição do indutor baseada na queda do pH, em 22

horas de cultivo. Meneghel *et al.* (2014), em estudo sobre a indução de pectinases em cultivos de *A. oryzae*, sugerem que a escassez de nutrientes no momento em que o indutor foi adicionado poderia explicar o efeito positivo sobre a produção de pectinases, já que, nesta condição de limitação, o microrganismo poderia ser induzido a produzir enzimas para a hidrólise da pectina em espécies redutoras, que poderiam, posteriormente, ser consumidas pela população.

O maior valor de fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ) foi determinado para o cultivo P2, devido à alta atividade enzimática obtida nessa condição. No cultivo P1, por apresentar menor crescimento celular, o valor de  $Y_{P/X}$  foi superior ao do ensaio controle. Da mesma forma, foram obtidos maiores valores de produtividade volumétrica ( $p_v$ ) nos ensaios com adição de pectina em diferentes tempos.

Para o cálculo dos fatores de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) e em produto ( $Y_{P/S}$ ) foram consideradas as concentrações de substrato iniciais de cada condição. Como já comentado, foram observadas concentrações de ART inferiores no início dos cultivos P1 e P2 e, com isso, os valores dos fatores de conversão foram superiores ao controle.

Avaliando as estratégias de adição do indutor, a obtenção de maior atividade enzimática em P2 também pode ter sido causada pelas melhores condições de crescimento celular, verificadas pelo maior pico de biomassa atingido. Já em P1, o tempo de 18 horas parece não ter sido adequado para a adição da pectina, pois pôde ser observada a limitação do crescimento celular e da produção de pectinases, provavelmente, devido às condições menos favoráveis de mistura.

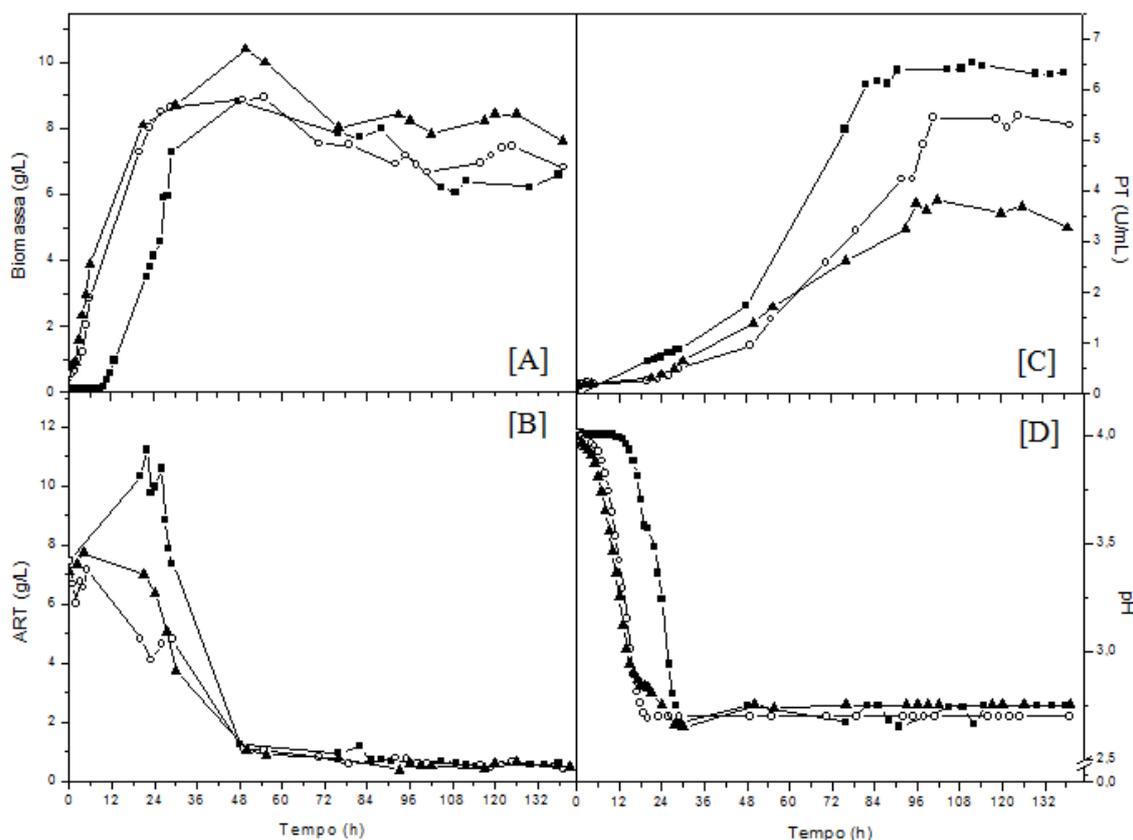
#### **4.4 Utilização de inóculo vegetativo no cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF**

Em cultivos submersos de fungos filamentosos, geralmente, a inoculação é realizada a partir de uma suspensão de esporos, porém, a utilização de inóculo vegetativo pode diminuir o tempo de adaptação do microrganismo às condições de cultivo, diminuindo o tempo total de processo e aumentando, portanto, a produtividade (Ali *et al.*, 2003; Meneghel *et al.*, 2015).

A pectina utilizada nestes cultivos e nos ensaios apresentados a seguir pertencia a um lote diferente da utilizada nos ensaios descritos até o item 4.3. A pectina pode apresentar propriedades diferentes a cada lote, já que é produzida a partir materiais naturais, como frutas, podendo influenciar em alguns aspectos do processo, como a viscosidade do meio. Em vista disso, foi realizada a repetição do ensaio controle, para comparação com os resultados obtidos após a troca do lote de pectina.

A utilização de inóculo vegetativo foi testada em proporção de 5 e 10% do volume de meio, nos cultivos V5 e V10, respectivamente. O inóculo foi preparado em frascos sob agitação e adicionado ao biorreator quando atingido o pH de 3,2, após, aproximadamente, 13 horas de crescimento.

Na Figura 14 são apresentados os perfis de concentrações de biomassa, de concentrações de ART, de atividade de pectinases e de pH relacionados aos cultivos controle, V5 e V10, conduzidos em biorreator, por 140 horas.



**Figura 14** – Variação da concentração de biomassa [A], de açúcares redutores totais (ART) [B], da atividade de pectinases totais (PT) [C] e do pH [D] em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada com diferentes formas de inoculação. (■) Controle – inóculo de esporos; (○) V5 – inóculo vegetativo 5% (v/v); (▲) V10 – inóculo vegetativo 10% (v/v).

Nos ensaios com a utilização de inóculo vegetativo, independentemente da proporção, foi verificado aumento da concentração celular a partir da primeira hora de cultivo, observado pela produção de  $\text{CO}_2$ , indicando, ainda, a redução considerável da fase *lag*. A queda do pH também confirma o início da atividade microbiana a partir da primeira hora de processo. No cultivo controle, o início da produção de  $\text{CO}_2$  e a queda do pH foram verificados em torno de dez horas de ensaio. Nos cultivos controle e V5, foram atingidas concentrações celulares máximas semelhantes, cerca de 9,0 g/L, mas em V5, o pico foi observado com 20 horas de antecipação. O crescimento celular foi favorecido com a utilização de 10% (v/v) de inóculo vegetativo, apresentando o pico de 10,4 g/L em 48 horas. Reginatto *et al.* (2014), em cultivos de *A. fumigatus* em frascos sob agitação, e Meneghel *et al.* (2015), ao avaliar a produção de

pectinases por *A. oryzae* em biorreator, também verificaram a diminuição do tempo de fase *lag* e também crescimento celular superior com a utilização de inóculo vegetativo.

Um aumento da concentração de ART foi verificado em torno de 20 horas no ensaio controle. Em V5 e V10, os picos, apesar de menos proeminentes, foram observados em torno de seis horas de processo. Ao final de todos os cultivos, foi determinada concentração de substrato inferior a 1,0 g/L.

A produção de pectinases não foi favorecida nos ensaios V5 e V10 e os picos de atividade enzimática ocorreram algumas horas depois em comparação com o cultivo controle. Segundo Ali *et al.* (2003), que estudaram cultivos em meio submerso de *A. niger*, a utilização de proporções de inóculo vegetativo superiores a 1% (v/v), não foi favorável à produção de ácido cítrico. Os autores sugerem que o elevado crescimento celular, devido às concentrações de inóculo mais altas, podem causar limitação de nutrientes, prejudicando a produção do metabólito em questão.

Diferentemente do observado no presente trabalho, nos cultivos de *A. fumigatus* relatados por Reginatto *et al.* (2014), e de *A. oryzae*, descritos por Meneghel *et al.* (2015), a produção de pectinases foi favorecida e o tempo em que ocorreram os picos foi inferior com a inoculação a partir da cultura pré-crescida, aumentando a produtividade do processo.

Os resultados gerais destes cultivos estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus niger* em biorreator de bancada com diferentes proporções de inóculo vegetativo.

	<b>Controle</b>	<b>V5</b>	<b>V10</b>
<b>S<sub>0</sub> (g/L)</b>	7,5	7,4	7,1
<b>X<sub>max</sub> (g/L)</b>	8,8	8,6	10,4
<b>t<sub>X,max</sub> (h)</b>	48	29	50
<b>S<sub>cons, Xmax</sub>(g/L)</b>	6,2	2,6	6,1
<b>P<sub>max</sub> (U/mL)</b>	6,4	5,5	3,8
<b>t<sub>P,max</sub> (h)</b>	91	101	96
<b>S<sub>cons, Pmax</sub>(g/L)</b>	6,9	6,9	6,1
<b>S<sub>cons</sub>(g/L)</b>	6,9	7,0	6,6
<b>Y<sub>P/X</sub> (U/mg)</b>	0,73	0,64	0,37
<b>Y<sub>X/S</sub> (g/g)</b>	1,42	3,23	1,64
<b>Y<sub>P/S</sub> (U/mg)</b>	0,93	0,80	0,62
<b>p<sub>V</sub> (U/mL/h)</b>	0,07	0,05	0,04

X<sub>max</sub> – máxima concentração de biomassa; t<sub>X,max</sub> – tempo em que ocorreu X<sub>max</sub>; S<sub>cons, Xmax</sub> – consumo de ART até X<sub>max</sub>; P<sub>max</sub> – máxima atividade de pectinases; t<sub>P,max</sub> – tempo em que ocorreu P<sub>max</sub>; Y<sub>P/X</sub> – fator de produção específica; S<sub>cons, Pmax</sub> – consumo de ART até P<sub>max</sub>; S<sub>cons</sub> – consumo total de ART; Y<sub>X/S</sub> – fator de conversão de substrato em células; Y<sub>P/S</sub> – fator de conversão de substrato em pectinases; p<sub>V</sub> – produtividade volumétrica; **Controle** – inóculo de esporos; **V5** – inóculo vegetativo 5% (v/v); **V10** – inóculo vegetativo 10% (v/v).

A atividade enzimática obtida no ensaio controle foi superior à verificada nos cultivos com inóculo vegetativo. A concentração celular máxima foi semelhante à observada em V5 e inferior à obtida em V10, por isso, o fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ) foi superior com a utilização de inóculo de esporos. Os valores dos fatores de conversão de substrato em células foram superiores nos cultivos com inóculo vegetativo, especialmente em V5, entretanto, comportamento contrário foi observado para os fatores de conversão de substrato em produto. Isso também pode indicar que, na possível condição de limitação de substrato, o crescimento celular foi favorecido em detrimento da produção de pectinases. Como já comentado, os valores de atividade enzimática obtidos em V5 e V10 foram inferiores e observados em tempo superior ao cultivo controle, com isso, a produtividade volumétrica ( $p_v$ ) também foi inferior.

A utilização de inóculo vegetativo em cultivos de *A. niger* LB-02-SF em cultivo submerso favoreceu a formação de biomassa, mas não foi favorável à produção de pectinases. Além disso, ao contrário de relatos na literatura, a utilização de inóculo vegetativo não levou à redução do tempo de obtenção do pico de atividade enzimática, diminuindo a produtividade do processo. Possivelmente, o microrganismo possa ter sofrido limitação de nutrientes, em função do elevado crescimento celular nas primeiras horas de processo, proporcionado pela utilização de altas concentrações de inóculo.

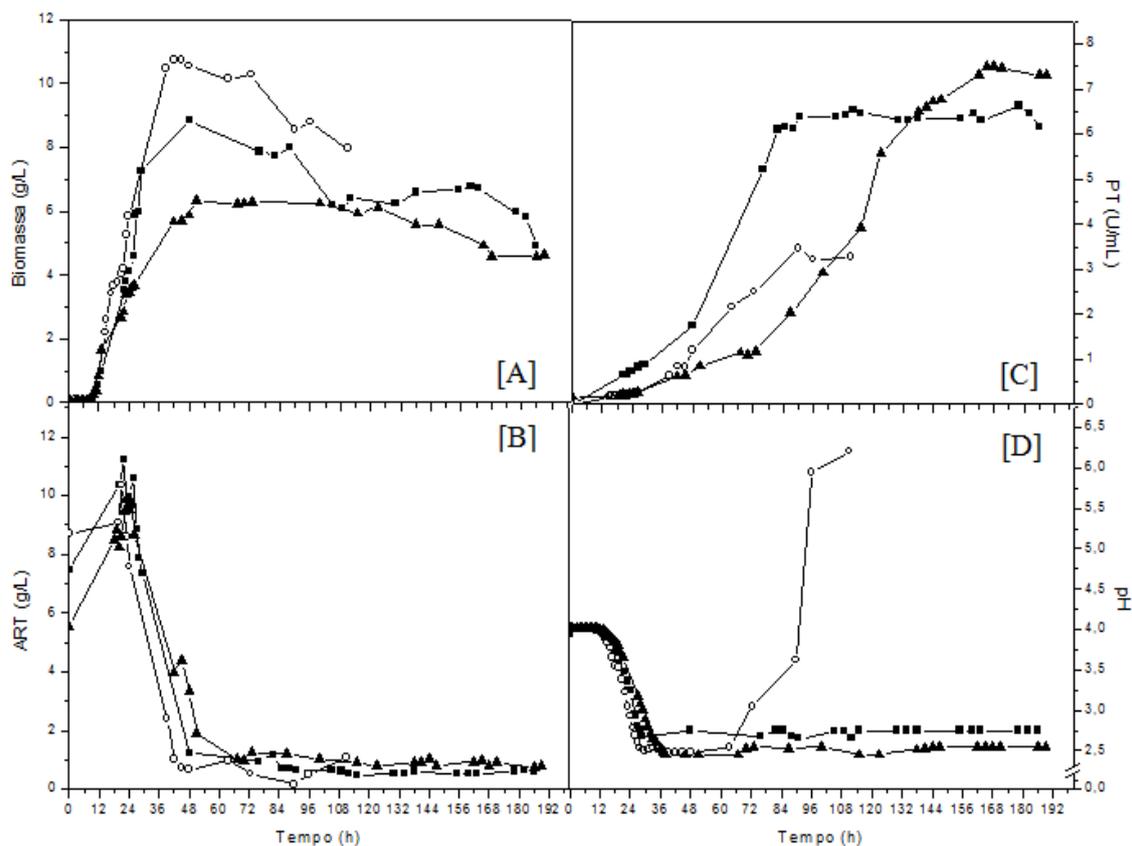
#### **4.5 Efeito do pH sobre o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF**

A avaliação do efeito do pH no crescimento microbiano e na produção de pectinases foi dividida em três etapas: i) inicialmente avaliou-se o valor de pH mínimo atingido nos cultivos em biorreator em comparação com a condição de pH inicial de 4,0, com queda livre até 2,7 e controlado neste valor até o final do cultivo (ensaio controle); ii) avaliação dos valores de pH inicial em frascos sob agitação; iii) ensaios em biorreator foram conduzidos empregando diferentes estratégias de controle do pH durante o cultivo. Todos os cultivos foram realizados com a utilização do meio A, na presença de pectina desde o tempo inicial de processo e com inoculação a partir de suspensão de esporos.

A avaliação das condições de pH em cultivos de fungos do gênero *Aspergillus* revela-se muito importante, em função da influência que exercem sobre o desenvolvimento microbiano, a produção de pectinases e, também, sobre a composição do complexo enzimático formado (Ueda *et al.*, 1982; Malvessi & Silveira, 2004). A condição de pH utilizada nesta etapa foi baseada em estudos de produção de pectinases em meio líquido por *A. oryzae*. No caso, o pH 4,0 favoreceu o crescimento celular e foi observado que a queda do pH para valores inferiores a 3,0 é necessária para que haja produção de pectinases (Malvessi & Silveira, 2004; Fontana & Silveira, 2012; Meneghel *et al.*, 2014).

Para a avaliação dos efeitos do pH sobre o cultivo de *A. niger*, optou-se por realizar, primeiramente, o estudo das condições de pH mínimo atingido no cultivo, partindo-se da

condição controle. Inicialmente, foi conduzido um cultivo sem promover o controle deste parâmetro, denominado cultivo N0. Como relatado na literatura, em geral, é observado o aumento do pH para valores próximos à neutralidade após o período de intenso crescimento celular, o que pode afetar negativamente a estabilidade de pectinases (Ueda *et al.*, 1982). Neste sentido, foi conduzido um cultivo com pH inicial de 4,0 e com o controle de pH no valor mínimo atingido até o final do processo (Ensaio N1). Os perfis cinéticos dos ensaios N0 e N1, de forma comparativa à condição controle, são mostrados na Figura 15.



**Figura 15** – Variação das concentrações de biomassa [A], de açúcares redutores totais (ART) [B], da atividade de pectinases totais (PT) [C] e do pH [D] em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada, com diferentes condições de controle de pH. (■) Controle – pH inicial de 4,0 e controlado em 2,7 após atingir naturalmente este valor; (□) N0 – pH inicial de 4,0 e sem controle; (▲) N1 – pH inicial de 4,0 e controlado no valor mínimo atingido após chegar naturalmente a este valor.

O crescimento celular foi favorecido no cultivo N0, atingindo a máxima concentração celular de 10,8 g/L, em 42 horas. Após o pico, foi observada queda gradual até 8,0 g/L no final do processo. Em N1, a concentração celular foi inferior às obtidas nos cultivos controle e N0, mantendo-se em torno 6,0 g/L de 51 a 140 horas, quando foi observado perfil de queda até o valor final de 4,6 g/L. Apesar de as condições dos ensaios terem sido iguais até o início do controle do pH em 2,5, as concentrações celulares observadas em N1 foram inferiores em comparação às verificadas em N0. Estas diferenças em termos de desenvolvimento microbiano

podem ter sido causadas pela forma de preparação do inóculo, que é obtido a partir da contagem do número de esporos, porém, sem a análise da viabilidade das células, podendo apresentar efeitos diferentes sobre o crescimento celular. Possivelmente, por este motivo, em N1 foi observada a diminuição das concentrações de ART de forma menos intensa por até 72 horas. Os perfis de concentração de ART foram semelhantes nas três condições, apresentando aumento súbito em torno de 24 horas seguido de intensa queda, com concentração de substrato residual inferior a 1,0 g/L.

No ensaio controle, o pH atingiu 2,7 em 29 horas e foi controlado neste valor até o final do processo. A queda do pH foi mais acentuada em N0, atingindo o valor de 2,5 em 28 horas, enquanto em N1 esse valor foi alcançado somente em 36 horas. Em N0, após atingir o mínimo de 2,5, o pH manteve-se neste valor até 64 horas, quando foi observado o início do perfil de aumento, atingindo 6,3 no final do cultivo. Segundo Ueda *et al.* (1982), valores de pH próximos à neutralidade não favorecem a estabilidade de pectinases, podendo causar a perda de atividade e a desnaturação dessas enzimas. Por isso, o cultivo foi encerrado ao atingir valores próximos a 6,0, em tempo inferior aos ensaios controle e N1.

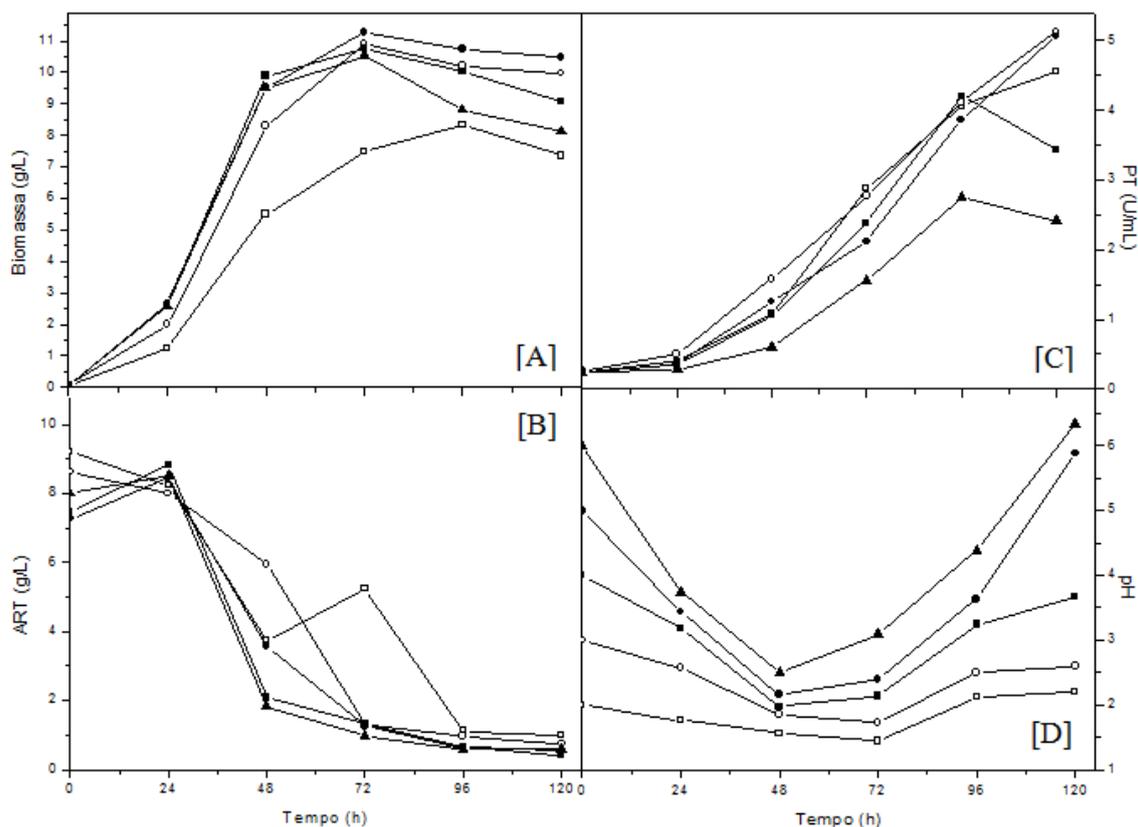
Os valores de atividade enzimática obtidos nos cultivos N0 e N1 foram semelhantes nas primeiras 48 horas de processo e apresentaram valores inferiores aos verificados no ensaio controle. A partir deste momento, foi observado o aumento mais acentuado da atividade enzimática em N0, chegando ao valor máximo (3,5 U/mL) em 90 horas de processo, quando o valor de pH era de 3,6. Com o aumento do valor de pH para 5,9, em 96 horas, foi observado que, após ligeira queda, a manutenção da atividade até 111 horas. Em N1, foi observado aumento da atividade de pectinases de 48 a 165 horas, atingindo o pico de 7,5 U/mL, também mantida até o final do processo. O valor de atividade enzimática neste cultivo foi superior ao obtido no ensaio controle, porém, em período cerca de 70 horas posterior.

A análise comparativa destes ensaios revela o forte efeito que variações do pH do meio têm sobre o crescimento celular e a produção de pectinases. No cultivo com pH livre, o crescimento celular foi favorecido, mas a atividade de pectinases foi inferior, devido ao aumento do pH para valores próximos a 6,0, já que, de acordo com relatos da literatura, valores de pH próximos à neutralidade não são favoráveis à produção dessas enzimas (Malvessi & Silveira, 2004). Quando o controle de pH foi realizado em um valor mínimo, no ensaio N1, por exemplo, essa queda não foi observada e foi atingido maior título de pectinases. Segundo relatos da literatura, valores de pH de 3,0 a 6,0 são mais favoráveis à estabilidade do complexo pectinolítico (Mohsen *et al.*, 2009).

Com o intuito de avaliar a estabilidade das pectinases produzidas por *A. niger* LB-02-SF, neste trabalho, o extrato enzimático foi exposto a diferentes valores de pH, por um período de 120 horas e na temperatura de cultivo, de 30°C. Salienta-se que os resultados dessa avaliação estão apresentados no item 4.6.3, relativo à caracterização das enzimas.

#### 4.5.1 pH inicial em cultivos em frascos sob agitação

Considerando-se as diferenças encontradas na avaliação das condições de pH mínimo entre os cultivos de *A. niger* apresentados neste trabalho e os relatados na literatura para *A. oryzae*, verificou-se a necessidade de ampliar os estudos acerca das estratégias de controle de pH ao longo do processo. Preliminarmente, diferentes valores de pH inicial do meio de cultivo foram avaliados em ensaios em frascos sob agitação, por 120 horas, variando de 2,0 a 6,0. Os perfis cinéticos obtidos nestes cultivos estão mostrados na Figura 16.



**Figura 16** – Variação das concentrações de biomassa [A], de açúcares redutores totais (ART) [B], da atividade de pectinases totais (PT) [C] e do pH [D] em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em frascos sob agitação, com diferentes valores de pH inicial. (□) 2,0; (○) 3,0; (●) 4,0; (■) 5,0; (▲) 6,0.

O crescimento celular ocorreu de forma mais lenta no cultivo com pH 2,0, chegando ao pico de concentração de biomassa (8,3 g/L) em 96 horas de processo. Conforme Ueda *et al.* (1982), valores muito baixos de pH podem provocar a desaceleração do metabolismo celular. Os perfis de concentração celular obtidos nos cultivos com pH inicial de 3,0 a 6,0 foram semelhantes nas primeiras 72 horas de processo, atingindo 10,5 g/L, em média. A partir deste momento, foi observada queda mais acentuada da biomassa nos cultivos com pH inicial 5,0 e 6,0. Este comportamento está de acordo com relatos da literatura, onde é listada uma ampla faixa de pH para o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* (Moore-Landecker, 1996). Esta informação também é corroborada por Bueno *et al.* (2005), que identificaram o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* na faixa de pH entre 2,5 e 6,5.

Com relação à concentração de ART, comportamento decrescente foi observado até 72 horas de ensaio nos cultivos com pH inicial de 3,0 a 6,0, porém, em pH 3,0, esta queda foi menos acentuada. Quando foi utilizado o pH inicial 2,0, observou-se aumento da concentração de substrato entre 48 e 72 horas. Em todas as condições, a concentração residual de açúcares foi inferior a 1,0 g/L.

Valores de atividade enzimática inferiores foram observados no cultivo com pH inicial de 6,0, quando comparado às demais condições. Foi observado incremento na atividade de pectinases até 120 horas nos ensaios com pH inicial de 2,0, 3,0 e 4,0, com a obtenção de valores entre 4,5 e 5,0 U/mL. Já nos cultivos com pH inicial de 5,0 e 6,0, a partir dos valores máximos atingidos em 96 horas, de 4,2 e 2,7 U/mL, respectivamente, foi observada diminuição da atividade enzimática até 120 horas.

De forma geral, a variação de pH foi semelhante em todas as condições, apresentando a queda característica nas primeiras 48 horas e aumento no final dos cultivos, chegando a valores próximos aos valores de pH inicial. Nos ensaios com pH inicial 4,0, 5,0 e 6,0, o valor de pH mínimo foi atingido em 48 horas de ensaio, enquanto com o pH 2,0 e 3,0 ocorreu em 72 horas. A queda da atividade enzimática a partir de 96 horas nos cultivos com pH inicial 5,0 e 6,0 pode estar relacionada ao aumento do pH para valores próximos a 6,0, no mesmo período de processo.

Os resultados gerais obtidos nos cultivos conduzidos sob diferentes condições de pH inicial estão mostrados na Tabela 9.

Com a utilização do pH inicial 2,0, os valores de pH verificados ao longo do cultivo foram inferiores aos observados nas outras condições, com pH mínimo de 1,4 em 72 horas, o que pode ter sido desfavorável ao crescimento celular, sendo atingida, nesta condição, menor concentração de biomassa em comparação aos outros ensaios. Em função disso, o maior fator de produção específica ( $Y_{P/X}$ ) foi obtido com a utilização de pH inicial 2,0, ainda que a atividade enzimática, neste caso, tenha sido inferior aos ensaios com pH inicial 3,0 e 4,0.

O efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de pectinases foi avaliado por vários pesquisadores que, assim como nos resultados obtidos neste trabalho, relatam os melhores resultados de atividade enzimática quando empregados valores de pH inicial na faixa ácida. Meneghel *et al.* (2014) citam valores de pH de 3,0 a 5,0 como mais adequados para a produção de pectinases por *A. oryzae*. Para Martínez-Trujillo *et al.* (2009), em cultivo submerso de *A. flavipes*, o pH inicial de 3,5 foi o que proporcionou a obtenção de maiores títulos de pectinases, mesmo apresentando valores inferiores de crescimento celular. O valor de pH inicial de 3,5 também foi relatado por Pedrolli (2008) como o mais adequado para a produção de pectinases por *A. giganteus* em cultivo submerso. Em estudo com fungos do gênero *Aspergillus* isolados de solo, Bueno *et al.* (2005) sugeriram que o emprego de pH inicial 2,5 favorece a

produção de pectina esterase e, com pH inicial 4,5, foi obtida a maior atividade de poligalacturonases.

**Tabela 9** - Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* em frascos sob agitação com diferentes valores de pH inicial.

	pH inicial do cultivo				
	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
$S_0$ (g/L)	9,2	8,6	7,3	7,5	8,0
$X_{max}$ (g/L)	8,3	10,9	11,3	10,7	10,5
$t_{X,max}$ (h)	96	72	72	72	72
$S_{cons, Xmax}$ (g/L)	8,1	7,3	6,0	6,2	7,0
$P_{max}$ (U/mL)	4,6	5,1	5,0	4,2	2,8
$t_{P,max}$ (h)	120	120	120	96	96
$S_{cons, Pmax}$ (g/L)	8,2	7,9	6,8	6,8	7,4
$S_{cons}$ (g/L)	8,2	7,9	6,8	7,1	7,4
$pH_{min}$	1,4	1,7	1,9	2,1	2,5
$t_{pH,min}$	72	72	48	48	18
$pH_{final}$	2,2	2,6	3,7	5,9	6,3
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,55	0,47	0,44	0,39	0,27

$S_0$  – concentração de ART inicial;  $X_{max}$  – máxima concentração de biomassa;  $t_{X,max}$  – tempo em que ocorreu  $X_{max}$ ;  $S_{cons, Xmax}$  – consumo de ART até  $X_{max}$ ;  $P_{max}$  – máxima atividade de pectinases;  $t_{P,max}$  – tempo em que ocorreu  $P_{max}$ ;  $S_{cons, Pmax}$  – consumo de ART até  $P_{max}$ ;  $S_{cons}$  – consumo total de ART;  $pH_{min}$  – valor mínimo de pH;  $t_{pH,min}$  – tempo em que ocorreu  $pH_{min}$ ;  $pH_{final}$  – pH final;  $Y_{P/X}$  – fator de produção específica.

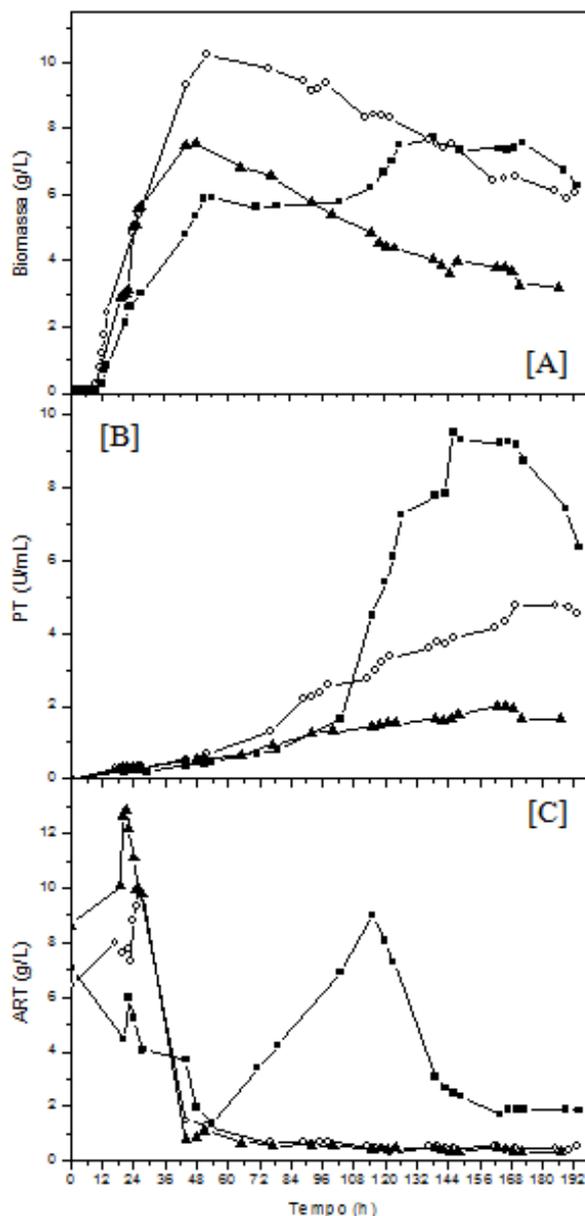
#### 4.5.2 Estratégias de controle do pH em cultivos em biorreator

Para compreender melhor o efeito causado pelas diferentes condições de pH sobre o crescimento e a produção de pectinases de forma isolada, foram realizados ensaios em biorreator mantendo-se o pH constante durante todo processo. A partir dos melhores resultados obtidos nos cultivos em frascos sob agitação, foram avaliados os valores de pH 2,0, 3,0 e 4,0, denominados ensaios N2, N3 e N4, respectivamente. Os perfis cinéticos obtidos nestes cultivos estão mostrados na Figura 17.

Variações em termos de concentração celular foram verificadas a partir de 10 horas nos cultivos N2, N3 e N4. Em N3, o crescimento celular foi favorecido, atingindo a máxima concentração de biomassa, cerca de 10 g/L, em 48 horas, valor superior ao obtido nas outras duas condições. Em N4, o pico de concentração celular foi de 7,5 g/L, também em 48 horas. Nos cultivos N3 e N4, foi observada a diminuição gradual da biomassa até o final do processo.

Em N2, o perfil de aumento da concentração de biomassa foi menos acentuado que os observados nas outras condições, chegando em 6,0 g/L em 48 horas, mantendo-se neste patamar até 96 horas. Na sequência, foi observado um novo aumento da biomassa, com máxima

concentração celular de 8,0 g/L, mantida de 120 a 180 horas. Nestas condições, o valor de pH 2,0 pode ter sido muito baixo para o crescimento celular, desacelerando o metabolismo fúngico, principalmente nas primeiras horas de cultivo.



**Figura 17** - Variação das concentrações de biomassa [A], da atividade de pectinases totais (PT) [B] e das concentrações de açúcares redutores totais (ART) [C] cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada, com diferentes condições de pH. (■) N2 – pH 2,0 constante; (○) N3 – pH 3,0 constante; (▲) N4 – pH 4,0 constante.

Nos cultivos N3 e N4, foi verificado o aumento das concentrações de ART em torno de 24 horas de processo, porém foi mais pronunciado em N4. Após o pico, foi observada a redução acentuada dos valores de concentração de substrato, coincidindo com a fase exponencial de crescimento, com a determinação de concentração inferior a 1,0 g/L em 48 horas. Em N2, também em torno de 24 horas, foi observado um pico, porém inferior aos encontrados nas outras

condições. Neste cultivo, após a queda até 48 horas, aumento gradual das concentrações de substrato foi observado até 114 horas, seguido de redução até 150 horas. Ao final do processo, foi observada concentração de substrato residual superior em comparação com N3 e N4, de cerca de 2,0 g/L.

Nos cultivos realizados com diferentes condições de pH controlado em valor constante, a utilização de pH 3,0 foi a mais favorável ao crescimento celular, diferentemente do que foi relatado por Malvessi & Silveira (2004) e Meneghel *et al.* (2014) em cultivos submersos de *A. oryzae*, que indicaram pH 4,0 como o mais indicado ao crescimento celular. Os autores verificaram que valores de pH inferiores a 3,0 causam efeito negativo sobre o metabolismo celular, reduzindo a velocidade de crescimento, como também foi observado neste trabalho, uma vez que o crescimento celular não foi favorecido em pH 2,0 constante.

O aumento da concentração de açúcares observado em N2 pode estar relacionado ao início da produção de pectinases, em torno de 100 horas de processo. O incremento da atividade enzimática ocorreu de forma acelerada, atingindo valor máximo de 9,5 U/mL em 146 horas. Com a presença de pectinases no meio de cultivo, pode ter ocorrido hidrólise da pectina a substâncias redutoras metabolizáveis pelo microrganismo, resultando no aumento das concentrações celulares.

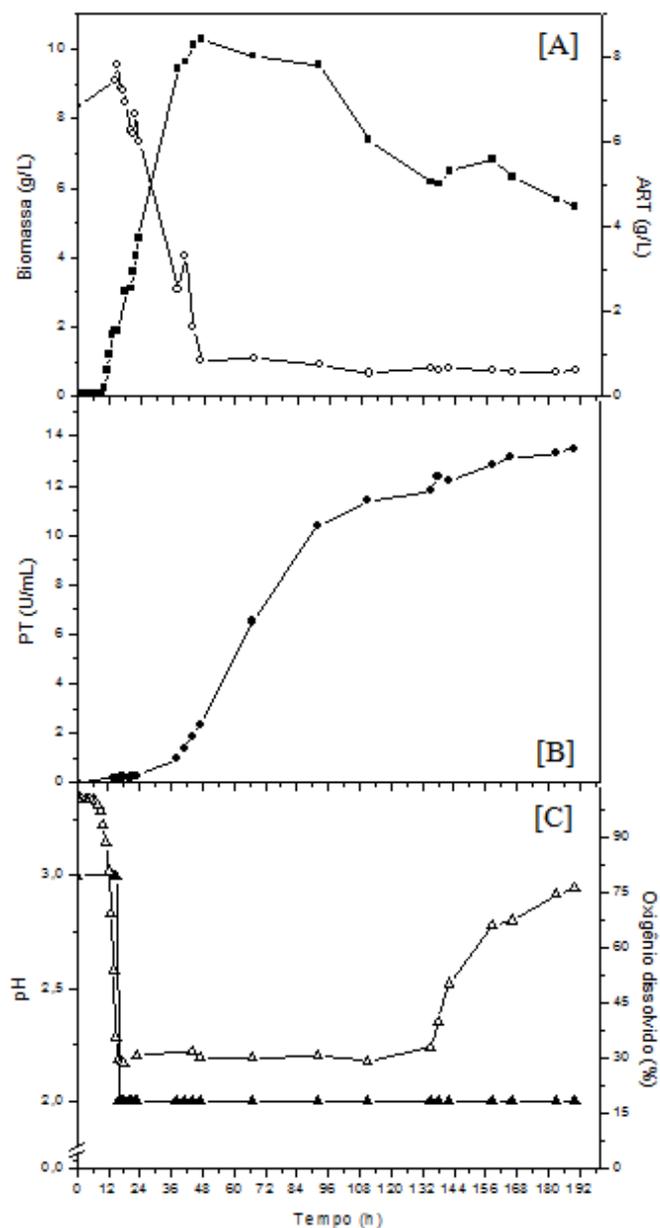
Em N3, apesar de ter sido observado um aumento acentuado da atividade enzimática até 96 horas, o valor máximo atingido (4,7 U/mL) foi inferior ao obtido em N2. A produção de pectinases não foi favorecida no cultivo N4, com a obtenção de valores inferiores a 2,0 U/mL ao final do processo.

A estratégia de utilizar duas condições de pH durante o cultivo, uma adequada ao crescimento e outra a produção de pectinases, proporcionou a obtenção de resultados positivos de acordo com os relatos de Malvessi & Silveira (2004), Fontana & Silveira (2012) e Meneghel *et al.* (2014), em cultivos de *A. oryzae*, e de Sandri (2010), com *A. fumigatus*, todos conduzidos em processo submerso. Ainda, no estudo de Meneghel *et al.* (2014), com a redução forçada do pH de crescimento (4,0) para o pH de produção enzimática (2,7) após a fase de intenso crescimento celular (24 horas), foram obtidos os maiores títulos de pectinases.

A partir dessa estratégia, foi conduzido um cultivo, denominado N5, dividido em dois momentos. O pH inicial foi definido em 3,0, por ter sido a condição que favoreceu o crescimento celular, como discutido anteriormente. Após isso, foi realizada a redução do pH para 2,0 pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e controlado até o final do processo neste valor. A redução do pH para um valor que não é favorável ao metabolismo fúngico poderia causar a limitação ou a desaceleração do crescimento e, com isso, facilitar as condições de mistura e de transferência de massa. Nesse contexto, a escolha do momento de redução do pH baseou-se na queda dos valores de concentração de oxigênio dissolvido, que, por sua vez, está relacionada ao aumento da

concentração de biomassa, e foi realizada assim que atingido 30% da saturação, em 16 horas de processo.

Os perfis cinéticos obtidos no cultivo N5 estão mostrados na Figura 18.



**Figura 18** – Variação das concentrações de biomassa e de açúcares redutores totais (ART) [A], da atividade de pectinases totais (PT) [B], do pH e da concentração de oxigênio dissolvido [C] em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF, em biorreator de bancada no ensaio N5. (■) biomassa; (○) ART; (●) PT; (▲) pH; (Δ) oxigênio dissolvido.

Foi observado o aumento gradual da biomassa, com pico de 10,2 g/L atingido em 47 horas. Comportamento semelhante foi verificado em cultivo conduzido em pH 3,0 constante (N3), o que indica, nestas condições, que a redução do pH para 2,0, em 16 horas, não afetou o perfil de crescimento celular. A partir de 92 horas, foi observado um perfil de queda das

concentrações celulares, chegando a 5,5 g/L no final do processo. Na condição avaliada no trabalho de Meneghel *et al.* (2014), foi relatada queda das concentrações celulares de *A. oryzae* no momento da redução do pH, porém, segundo os autores, o microrganismo se adaptou à nova condição e continuou crescendo.

Foi verificado um comportamento de consumo de açúcares relacionado com o perfil das concentrações celulares durante o cultivo, sendo observado aumento das concentrações de ART em 15 horas de processo, seguido de queda acentuada até 47 horas, quando foi quantificado cerca de 1,0 g/L.

Aumento da atividade enzimática foi observado a partir de 36 horas, sendo mais acelerado até 92 horas e, a partir deste momento, o incremento das atividades enzimáticas ocorreu de forma mais lenta. Este comportamento coincidiu com a diminuição da concentração celular e pode estar relacionado à liberação de pectinases intracelulares, como discutido anteriormente. O pico de atividade enzimática (13,2 U/mL) foi observado em 166 horas, mantendo-se até o final do processo.

A estratégia de pH utilizada em N5 foi a que mais favoreceu a produção de pectinases, dentre as condições avaliadas neste trabalho. Esse resultado pode estar relacionado às melhores condições de mistura e de fornecimento de oxigênio proporcionadas pela redução forçada do pH, uma vez que, para manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30% da saturação, o período em que o equipamento operou em máxima capacidade de agitação em N5 (22 horas) foi inferior aos verificados nos cultivos controle (26 horas) e N3 (32 horas).

Na Tabela 10, estão mostrados, de forma comparativa, os resultados obtidos nos cultivos realizados em biorreator, com as diferentes condições de pH avaliadas neste trabalho.

Entre as condições avaliadas, a maior concentração celular foi obtida no cultivo N0, que teve seu início em pH de 4,0 e sem controle deste parâmetro no decorrer do processo. No ensaio N1, em que foram utilizadas as mesmas condições iniciais, porém foi realizado o controle no mínimo valor atingido, foi obtida a menor concentração de biomassa dentre todos os processos.

O controle em pH 3,0 foi o mais favorável ao crescimento celular, sendo obtido título máximo de biomassa semelhante ao atingido em N0. Já a produção de pectinases foi favorecida em valores de pH inferiores a 3,0. Em N1, com o pH controlado em mínimo de 2,5, foi obtido 7,5 U/mL, enquanto em N2, com o pH controlado em 2,0 durante todo processo, o pico de atividade foi de 9,5 U/mL.

A condição que proporcionou a obtenção de maior título de pectinases foi a utilizada no cultivo N5, a partir da redução forçada do pH de 3,0 para 2,0 (Tabela 10).

**Tabela 10** - Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* em biorreator de bancada em ensaios com diferentes condições de pH.

	Controle	N0	N1	N2	N3	N4	N5
$S_0$ (g/L)	7,5	8,7	5,5	7,0	6,4	8,6	6,8
$X_{max}$ (g/L)	9,1	10,7	6,3	7,7	10,2	7,5	10,2
$t_{X,max}$ (h)	48	42	51	139	52	48	47
$S_{cons, Xmax}$ (g/L)	6,2	7,7	3,6	4,0	5,1	7,7	5,9
$P_{max}$ (U/mL)	6,4	3,5	7,5	9,5	4,7	1,98	13,2
$t_{P,max}$ (h)	91	90	165	146	170	163	166
$S_{cons, Pmax}$ (g/L)	6,9	8,5	4,6	4,5	5,9	8,1	6,2
$S_{cons}$ (g/L)	6,9	8,5	4,7	5,1	6,0	8,3	6,2
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,70	0,33	1,19	1,23	0,46	0,26	1,29
$Y_{X/S}$ (g/g)	1,47	1,39	1,75	1,92	2,0	0,97	1,73
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,93	0,41	1,63	2,11	0,79	0,24	2,13
$p_v$ (U/mL/h)	0,07	0,038	0,045	0,065	0,027	0,012	0,080

$S_0$  – concentração de ART inicial;  $X_{max}$  – máxima concentração de biomassa;  $t_{X,max}$  – tempo em que ocorreu  $X_{max}$ ;  $S_{cons, Xmax}$  – consumo de ART até  $X_{max}$ ;  $P_{max}$  – máxima atividade de pectinases;  $t_{P,max}$  – tempo em que ocorreu  $P_{max}$ ;  $Y_{P/X}$  – fator de produção específica;  $S_{cons, Pmax}$  – consumo de ART até  $P_{max}$ ;  $S_{cons}$  – consumo total de ART;  $Y_{X/S}$  – fator de conversão de substrato em células;  $Y_{P/S}$  – fator de conversão de substrato em pectinases;  $p_v$  – produtividade volumétrica; **Controle** – pH inicial 4,0 e controlado em 2,7 após atingir naturalmente este valor; **N0** – pH inicial 4,0 e não controlado durante o cultivo; **N1** – pH inicial 4,0 e controlado em 2,5 após atingir naturalmente este valor; **N2** – pH constante em 2,0; **N3** – pH constante em 3,0; **N4** – pH constante em 4,0; **N5** – pH inicial 3,0 e reduzido para 2,0 quando a concentração de oxigênio dissolvido atingiu o valor de 30% da saturação.

Os valores de fator de produção específica foram superiores em N2 e N5 devido às maiores atividades enzimáticas observadas nestas condições. A produtividade volumétrica observada em N5 foi a única superior à verificada no cultivo controle. Apesar de o pico de atividade de pectinases ter ocorrido mais de 60 horas depois em N5, o valor obtido foi aproximadamente o dobro do obtido no ensaio controle. O maior fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi obtido em N3, devido à maior concentração celular observada neste cultivo, seguido de N2 que, apesar de não ter favorecido o crescimento celular como em N3, apresentou perfil de concentração de ART diferente do observado nas outras condições avaliadas, com menor consumo de substrato até o momento do pico. Maiores fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) também foram observados nos cultivos N2 e N5.

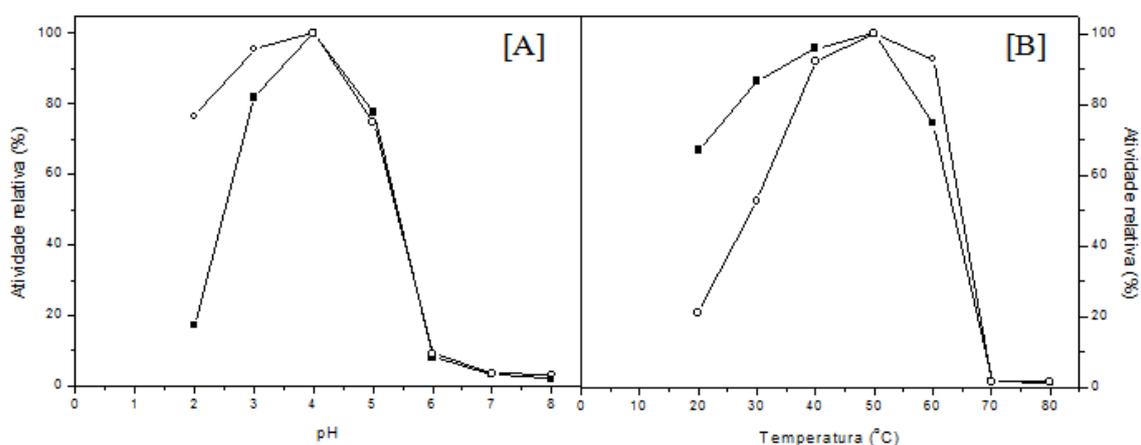
#### 4.6 Caracterização dos extratos enzimáticos produzidos quanto à temperatura e ao pH

Os extratos pectinolíticos brutos produzidos por *A. niger* LB-02-SF em cultivo em meio submerso e em estado sólido foram avaliados quanto às características de ação do complexo enzimático formado frente ao pH e a temperatura de reação. Como a cinética de cultivos deste microrganismo em estado sólido já foi descrita em trabalhos anteriores do grupo (Sandri, 2010; Poletto, 2015), não foi realizada esta avaliação no presente trabalho, apenas utilizou-se o extrato enzimático para a comparação com o produzido em meio líquido. Esse estudo revela-se

importante, visto que as condições de pH e de temperatura afetam tanto a velocidade das reações enzimáticas como a estabilidade das enzimas, podendo aumentar a eficiência catalítica da enzima na sua utilização em processos industriais (Cabral *et al.*, 2003).

#### 4.6.1 Influência do pH e da temperatura de reação sobre a atividade de pectinases

Para esta avaliação, foram utilizados os extratos brutos produzidos no cultivo N5 e no cultivo em CES. Estes extratos foram submetidos a diferentes valores de pH e temperatura, buscando definir os valores ótimos para a ação do complexo enzimático. A avaliação de pH foi realizada na temperatura de 30°C e o pH utilizado para verificar a influência das diferentes temperaturas foi 4,0 (item 3.6.4). Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 19.



**Figura 19** – Efeito do pH [A] e da temperatura [B] sobre a atividade de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* LB-02-SF. (■) pectinases produzidas em cultivo submerso; (○) pectinases produzidas em cultivo em estado sólido.

Os extratos enzimáticos obtidos em cultivo submerso e em estado sólido apresentaram comportamentos diferentes nas faixas de pH e temperatura avaliadas. Quanto ao pH, o extrato obtido em CES apresentou atividades relativas superiores em pH 2,0 e 3,0, porém, em ambos, foi observado pH 4,0 como a melhor condição para a ação das pectinases. A partir do pH 5,0, o mesmo comportamento de diminuição do percentual de atividade enzimática foi observado para ambos os extratos, sendo os valores de pH de 6,0, 7,0 e 8,0 desfavoráveis à ação do complexo pectinolítico.

Como observado com relação ao pH, a atividade enzimática dos extratos produzidos em CSm e CES também foi afetada de forma diferente nas temperaturas testadas. Com o extrato pectinolítico produzido em cultivo submerso, foram observadas maiores atividades relativas nas temperaturas de 20, 30 e 40°C. Para esse extrato, os melhores resultados foram obtidos em 40 e 50°C, sendo que, em 60°C, foi observada redução de 20% da atividade máxima. Quanto ao extrato enzimático produzido em meio sólido, as melhores temperaturas para a ação das enzimas

foram de 40 a 60 °C. Nas temperaturas de 70 e 80°C, para ambos os extratos, foi verificada a total inativação das enzimas.

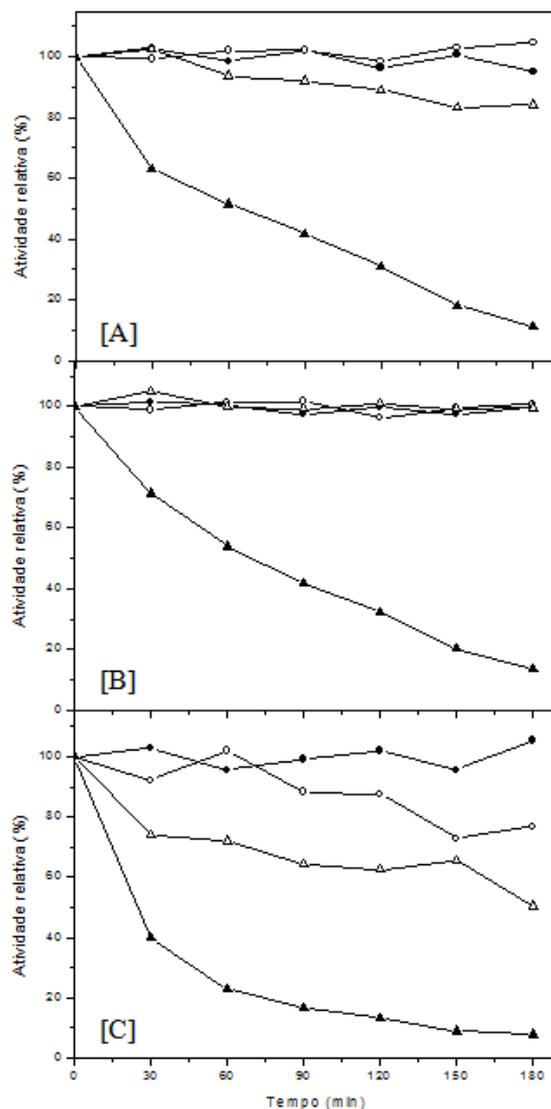
As faixas de pH de 4,0 e 5,0 e de temperatura de 40 a 60°C são relatadas como as mais favoráveis à ação de algumas pectinases comerciais e, também, de extratos pectinolíticos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* (Ortega *et al.*, 2004; Pedrolli *et al.*, 2008; Mohsen *et al.*, 2009; Gonzalez & Rosso, 2011; Rossi *et al.*, 2015). Sandri *et al.* (2013) e Poletto (2015), ao avaliarem as melhores condições de reação do extrato pectinolítico produzido pela mesma cepa de *A. niger* utilizada neste trabalho, porém em cultivos em estado sólido, também observaram melhores resultados nas faixas de pH e de temperatura citadas. Os resultados obtidos apontam a possível utilização das pectinases produzidas por *A. niger* LB-02-SF no processamento de sucos, uma vez que os valores ótimos para a reação dessas enzimas é compatível com as condições de pH natural dos sucos e as etapas onde seriam empregadas, a maceração e a clarificação, são realizadas em temperaturas entre 30 e 60°C (Ueda *et al.*, 1982; Bon *et al.*, 2008).

#### **4.6.2 Avaliação da estabilidade térmica das pectinases produzidas**

O estudo de estabilidade das enzimas produzidas frente à temperatura é necessário, pois a perda de atividade pode diminuir a eficiência do tratamento enzimático, dependendo do tempo de exposição. Foram avaliados dois extratos enzimáticos produzidos em CSm, um obtido do cultivo controle e outro do ensaio N5, buscando verificar se as condições de pH utilizadas na produção afetariam a termoestabilidade das enzimas formadas. Também, foi utilizado um extrato pectinolítico produzido em CES. O pH utilizado para incubação foi 4,0 e o tempo de exposição foi de 180 minutos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 20.

Os extratos provenientes de cultivos líquidos apresentaram comportamentos semelhantes, porém, com o complexo enzimático produzido no cultivo controle foi verificada redução gradual das atividades enzimáticas a partir de 60 minutos de exposição a 50°C, perdendo cerca de 15% da atividade inicial (Figura 20A). Com o extrato enzimático produzido no cultivo N5 foram atingidos os melhores resultados frente às temperaturas de 30 a 50°C, mantendo aproximadamente 100% da atividade enzimática após 180 minutos de incubação (Figura 20B).

O extrato obtido de CES, em comparação aos extratos de cultivos líquidos, mostrou menor estabilidade nas condições de temperatura avaliadas, sendo que, apenas na temperatura de 30°C foi observada a preservação de 100% de atividade após 180 minutos. Em 40°C, foi observada diminuição da atividade enzimática a partir de 120 minutos, com perda cerca de 20% da atividade inicial após 180 minutos de teste. Na temperatura de 50°C, foi verificado que apenas 75% da atividade foi mantida nos primeiros 30 minutos, seguido de decréscimo gradual até 180 minutos, quando foi observada redução de 50% da atividade inicial (Figura 20C).



**Figura 20** – Efeito da temperatura e do tempo de incubação sobre as pectinases totais presentes nos extratos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* LB-02-SF. [A] processo submerso (controle); [B] processo submerso (N5); [C] processo em estado sólido. (●) 30°C; (○) 40°C; (△) 50°C; (▲) 60°C.

A exposição à temperatura de 60°C não foi favorável à estabilidade de nenhum dos extratos de *A. niger* LB-02-SF avaliados, porém foi verificada perda de atividade mais rápida no extrato produzido em CES. Foram observadas atividades relativas de 63, 70 e 40% após 30 minutos para os extratos produzidos no cultivo controle, N5 e em CES, respectivamente. Após 180 minutos, foi observada a preservação de somente cerca de 10% da atividade inicial nas três condições avaliadas.

Os resultados obtidos neste teste para o extrato enzimático produzido em meio sólido, estão de acordo com os relatados por Sandri (2010) e Poletto *et al.* (2015) que avaliaram a termoestabilidade de pectinases obtidas por *A. niger* LB-02-SF, também em CES.

Na temperatura de 50°C, os extratos pectinolíticos produzidos em meio líquido, principalmente o proveniente do cultivo N5, mostraram maior estabilidade durante os 180

minutos de incubação. Ortega *et al.* (2004) e Poletto *et al.* (2015) avaliaram a estabilidade das preparações comerciais Pectinase CCM, Rapidase C80, Pectinex 3XL, Pectinex Ultra SP-L e Novozym 33095 frente à temperatura de 50°C, por 60 minutos, e verificaram a manutenção de apenas 57, 5, 10, 36 e 51% da atividade inicial, respectivamente. Destaca-se que, no presente trabalho, os extratos dos cultivos controle e N5 ainda apresentavam 90 e 100% de atividade relativa após o mesmo tempo de incubação a 50°C.

Os resultados obtidos indicam que a forma de produção, em cultivo sólido ou processo submerso, pode afetar a estabilidade do complexo pectinolítico frente à temperatura. Esse comportamento também foi observado por Acuña-Argüelles *et al.* (1995), que compararam a estabilidade de pectinases produzidas por *A. niger* em CES e CSm e, contrariando o que foi observado neste estudo, verificaram que o complexo enzimático produzido em meio sólido apresentou maior estabilidade na faixa de temperatura de 50 a 60°C. A termoestabilidade das pectinases formadas também pode ser afetada pelas condições de pH utilizadas na produção em meio líquido. No cultivo N5, além de ter sido obtida maior atividade de pectinases em relação à condição controle, o extrato produzido nesta condição de pH mostrou-se mais estável à temperatura, principalmente quando exposto a 50°C.

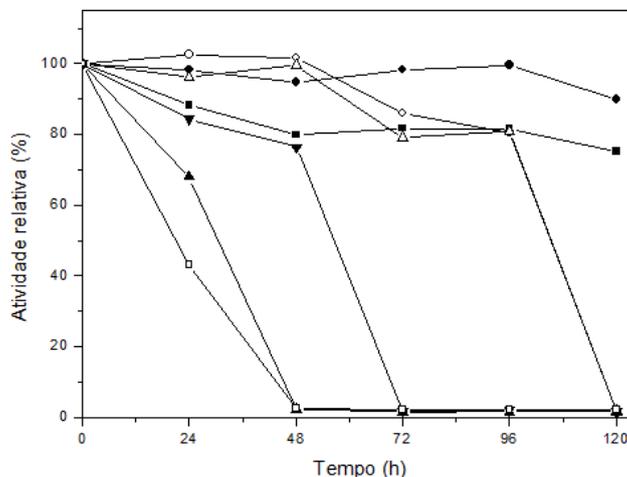
Esses resultados são relevantes, visto que os relatos da literatura indicam a faixa entre 50 e 60°C como a mais adequada para a ação dessas enzimas e, visando a sua aplicação em processos industriais, a preservação da atividade por um período de tempo maior aumentaria a eficiência do tratamento enzimático.

#### **4.6.3 Avaliação da estabilidade das pectinases produzidas em processo submerso em relação ao pH**

Para a avaliação da estabilidade frente ao pH das pectinases produzidas neste trabalho, em particular do extrato enzimático bruto obtido ao final do cultivo N5, este foi exposto a diferentes valores de pH (2,0 a 8,0), incubado a 30°C, por 120 horas e a atividade pectinolítica foi determinada em intervalos de 24 horas. A temperatura e tempo de exposição foram definidos como forma de avaliar o efeito do pH na formação das enzimas durante um cultivo de *A. niger*. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 21.

A incubação do extrato enzimático em pH 2,0 levou à perda de 20% da atividade enzimática nas primeiras 48 horas, porém com a manutenção neste patamar até 120 horas. Entre os valores de pH avaliados, pH 3,0 foi a condição que mais favoreceu a estabilidade das pectinases produzidas no cultivo N5, com a preservação de, em média, 95% da atividade inicial após 120 horas de exposição. Para Mohsen *et al.* (2009) e Meneghel *et al.* (2014), avaliando extratos pectinolíticos obtidos em cultivos líquidos de *A. niger* e *A. oryzae*, respectivamente, este valor de pH também foi o que proporcionou os melhores resultados em termos de

estabilidade enzimática. Nos extratos submetidos a valores de pH 4,0 e 5,0, cerca de 80% da atividade enzimática foi mantida por até 96 horas, porém em 120 horas, atividades residuais foram estimadas.



**Figura 21** - Atividade relativa de pectinases no extrato bruto exposto a diferentes valores de pH em função do tempo. (■) 2,0; (●) 3,0; (○) 4,0; (△) 5,0; (▼) 6,0; (▲) 7,0; (□) 8,0.

A estabilidade das pectinases produzidas neste trabalho não foi favorecida em valores de pH ainda superiores. Em pH 6,0, foi verificada a preservação de cerca 80% do valor inicial até 48 horas, com perda total da atividade em 72 horas. Quando submetidas à incubação em pH 7,0 e 8,0, foi verificada a redução de atividade nas primeiras 24 horas, com total inativação após 48 horas de exposição a 30°C.

Os resultados obtidos com relação à estabilidade das enzimas indicam que valores de pH próximos à neutralidade são desfavoráveis à manutenção da atividade, tanto durante o cultivo fúngico quanto nos testes realizados com o extrato bruto. Os dados sugerem que durante o processo de obtenção de enzimas, o controle do pH em valores mais ácidos, além de favorecer a produção de pectinases, também possibilita a preservação da atividade, assim como foi observado no cultivo N1 (Figura 15). Resultados semelhantes também foram observados por Meneghel *et al.* (2014), para pectinases de *A. oryzae*.

#### **4.7 Uso dos extratos enzimáticos produzidos em processo submerso e em estado sólido no tratamento de suco de maçã**

As pectinases são extensivamente utilizadas no processamento de frutas, principalmente na produção de sucos e vinhos. São utilizadas na etapa de clarificação desses processos, promovendo a hidrólise das moléculas de pectina, diminuindo a viscosidade e a turbidez do suco (Alkorta *et al.*, 1998; Busto *et al.*, 2006; Uenojo & Pastore, 2007). Em função destas aplicações comerciais, a ação das enzimas pectinolíticas foi avaliada no tratamento de suco de fruta.

O suco natural de maçã Gala foi utilizado para a avaliação dos extratos enzimáticos de *A. niger* LB-02-SF, produzidos em cultivos líquidos (ensaio N5) e em estado sólido. A temperatura definida para os testes foi 50°C, por ter proporcionado a obtenção de maiores atividades nos extratos de *A. niger*, como mostrado anteriormente. O pH do suco *in natura*, medido em torno de 4,0, também se constitui em uma condição favorável para a ação do complexo pectinolítico. Como controle, foi utilizada a preparação comercial Pectinex Ultra SP-L (Novozymes Latin America Ltda). As atividades enzimáticas dos extratos enzimáticos produzidos e da preparação comercial foram padronizadas para o mesmo valor, de 6 U/mL.

Os resultados obtidos após 60 minutos de tratamento enzimático estão mostrados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Efeito do tratamento enzimático no aumento da clarificação, na redução da turbidez e da viscosidade de suco de maçã.

	<b>Aumento da clarificação (%)</b>	<b>Redução da turbidez (%)</b>	<b>Redução da viscosidade (%)</b>
<b>CSm<sup>1</sup></b>	79,3 <sup>a</sup>	97,9 <sup>a</sup>	9,8 <sup>a</sup>
<b>CES<sup>2</sup></b>	77,1 <sup>a</sup>	96,9 <sup>a</sup>	11,5 <sup>a</sup>
<b>PectinexUltra SP-L<sup>3</sup></b>	81,7 <sup>a</sup>	98,5 <sup>a</sup>	13,2 <sup>a</sup>

Os tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup>extrato pectinolítico produzido por *Aspergillus niger* LB-02-SF em processo submerso; <sup>2</sup>extrato pectinolítico produzido por *A. niger* LB-02-SF em cultivo sólido; <sup>3</sup>preparação comercial Pectinex Ultra SP-L.

Dados da amostra controle: intensidade de cor (2,57); viscosidade (1,48 cp); turbidez (83,2 NTU)

O tratamento enzimático com os extratos produzidos experimentalmente proporcionou, nas condições testadas, resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos com a preparação pectinolítica comercial, após análise de variância e pós-teste de Tukey em nível de probabilidade inferior a 5%. Sandri *et al.* (2013) e Poletto *et al.* (2015), utilizando extrato enzimático produzido por *A. niger* LB-02-SF em cultivo sólido, também relataram resultados comparáveis às preparações comerciais de pectinases no tratamento de suco de maçã. Para fins de tratamento de suco de maçã, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o tipo de cultivo para a produção das enzimas não afetou a ação do complexo pectinolítico, abrindo perspectivas da utilização de *A. niger* LB-02-SF para a produção de pectinases de aplicação comercial, tanto em processo em estado sólido quanto submerso.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em cultivo submerso se constitui em um processo promissor, complementando os estudos anteriores do grupo conduzidos com esta mesma linhagem em cultivo em estado sólido (Sandri *et al.*, 2011; Poletto *et al.*, 2015). Em relação ao processo submerso de obtenção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF foram observados comportamentos diferentes em relação

às condições definidas também com o mesmo propósito, porém com *A. oryzae* IPT-301, por Meneghel *et al.* (2014). Neste trabalho, o meio de cultivo definido - isento de glicose - e o uso de inóculo vegetativo não favoreceram a produção de pectinases. Por outro lado, a adição de pectina após a fase de intenso crescimento celular e o controle de pH baseado em valores que favoreceram inicialmente o crescimento celular e posteriormente a produção de enzimas, foram estratégias que proporcionaram o incremento na formação de enzimas. Quanto à caracterização parcial dos extratos produzidos em CSm e CES, o extrato proveniente de cultivo líquido demonstrou maior estabilidade térmica em relação ao produzido em estado sólido. No tratamento de suco de maçã, resultados estatisticamente semelhantes aos observados com utilização de preparação pectinolítica comercial foram obtidos com o extrato produzido em meio submerso, sugerindo o potencial uso destas enzimas em formulações para a clarificação de sucos de frutas.

## 5. CONCLUSÕES

O processo de obtenção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF foi avaliado em cultivo submerso, identificando-se a influência que a composição do meio, a adição posterior do indutor enzimático, a utilização de inóculo vegetativo e as condições de pH exercem sobre o crescimento celular e a produção dessas enzimas, assim como a comparação de extratos pectinolíticos produzidos em CES e CSm quanto às condições de ação das enzimas e a aplicação no tratamento de suco de maçã.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as conclusões apresentadas a seguir.

- Ao utilizar-se o meio de cultivo definido - isento de glicose - é observada a redução do crescimento celular, sem influenciar negativamente a produção das enzimas. Com isso, o controle da concentração de oxigênio dissolvido em 30% da saturação é favorecido, o que leva a menor necessidade de manutenção do equipamento operando em sua capacidade de agitação máxima.

- A adição do indutor enzimático (pectina cítrica) ao meio de cultivo quando atingido o valor de pH de 2,7, em 22 horas de processo, proporciona a obtenção de atividade de pectinases aproximadamente 40% superior em comparação ao cultivo com pectina adicionada inicialmente no meio. Entretanto, em comparação à condição controle, nenhuma das estratégias de adição avaliadas possibilita a melhora das condições de mistura e de transferência de oxigênio para a população microbiana.

- A utilização de inóculo vegetativo, independentemente da proporção utilizada, possibilita a redução do tempo de fase *lag* e resulta na obtenção de maiores concentrações de biomassa, porém, não é favorável à produção de pectinases. Além disso, ao realizar-se a inoculação a partir da cultura pré-crescida, são obtidos menores valores de produtividade volumétrica, já que o tempo em que as máximas atividades de pectinases são atingidas é superior ao verificado com a utilização de inóculo de esporos.

- Em biorreator, a queda natural do pH do valor inicial 4,0 para o mínimo de 2,5 e posterior manutenção neste valor favorece a produção de pectinases em relação ao valor mínimo de pH de 2,7 utilizado como controle. Na avaliação de pH inicial em frascos sob agitação, os valores 2,0, 3,0 e 4,0 proporcionam a obtenção dos melhores resultados em termos de fator de produção específica. Em cultivos em biorreator com pH constante, o pH 3,0 é o mais favorável ao crescimento celular e o pH 2,0 é o que proporciona a obtenção de maior atividade enzimática.

- Entre as estratégias de controle de pH avaliadas, a maior atividade de pectinases é obtida quando o pH do cultivo é mantido constante em 3,0 até que a concentração de 30% de oxigênio dissolvido seja atingida e, então, reduzido para pH 2,0 e mantido neste valor até o final

do processo.

- A estabilidade das pectinases formadas é favorecida em pH 3,0, sendo observada a manutenção de mais de 90% da atividade inicial após 120 horas de incubação a este valor de pH.

- Os extratos enzimáticos brutos produzidos por *A. niger* LB-02-SF em CES e CSm apresentam maior atividade em pH 4,0 e a 50°C.

- Maior estabilidade térmica é observada nos extratos produzidos em CSm em comparação ao obtido em CES, principalmente na temperatura de 50°C;

- No tratamento enzimático de suco de maçã com os extratos produzidos em CSm e CES, são obtidos resultados estatisticamente semelhantes aos alcançados com preparação comercial de alta qualidade, sugerindo a possibilidade de utilização de *A. niger* LB-02-SF para a produção de pectinases com aplicação industrial.

Como perspectivas para a continuação dos estudos de produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em processo submerso, sugere-se:

- avaliar outros parâmetros operacionais que não foram contemplados neste trabalho, como, por exemplo, a temperatura e o suprimento de oxigênio;

- estudar a combinação das melhores estratégias de controle de pH com a adição do indutor em outros tempos de processo;

- estabelecer a melhor condição de utilização do inóculo vegetativo;

- quantificar outras enzimas do complexo pectinolítico presentes no extrato enzimático;

- verificar a possibilidade de utilização do extrato pectinolítico produzido na maceração de frutas e na extração e tratamento de sucos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-Argüelles, M. E.; Gutiérrez-Rojas, M.; Viniestra-González, G.; Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid–state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 808-814.
- Ali, S.; Rehman, A.; Ehsa, A.; Haq, I.; Iqbal, J. (2003). Effect of vegetative inoculums on submerged citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. **Pakistan J. Biol. Sci.** 6: 334-335.
- Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M.J.; Serra, J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochem.** 33: 21-28.
- Anbu, P.; Gopinath, S.C.B.; Cihan, A.C.; Chaulagain, B.P. (2013). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. **BioMed Res. Int.** 2013, ID: 204014.
- Aspinall, G.O. (1970). Pectins, plants gums, and other plant polysaccharides. In: **The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**. Vol. 2. New York: Academic Press. 515p.
- Assumpção, R.M.; Morita, T. (1968). **Manual de soluções**. São Paulo: Edgard Blucher, 627p.
- Baracat, M.C.; Vanetti, M.C.D.; Araujo, E.F.; Silva, D.O. (1991). Growth conditions of a pectinolytic *Aspergillus fumigatus* for degumming of natural fibres. **Biotechnol. Lett.** 13: 693-696.
- Bastos, R.G. (2010). **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos – Editora Universitária.
- Bitmann, R. (1974). Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods. **J. Chem. Education.** 51: 49.
- Bon, E.P.S.; Costa, R.B.; Silva, M.V.A.; Ferreira-Leitão, V.S.; Freitas, S.P.; Ferrara, M.A. (2008). **Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil**. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Ed.) **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, pp. 463-488.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 53 de 07 de outubro de 2014. Dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. **Disponível (online)** [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e156580045c8232da081e2d10ee53f37/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n.+53\\_2014\\_Lista+de+enzimas.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e156580045c8232da081e2d10ee53f37/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n.+53_2014_Lista+de+enzimas.pdf?MOD=AJPERES) (15 de novembro de 2015).
- Bueno, M.C.; Perez, M.F.S.; Gattás, E.A.L. (2005). Production of polygalacturonase by three soil *Aspergillus* strains. **Alim. Nutr.** 16: 253-257.
- Busto, M.D.; García-Tramontín, K.E.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. (2006). Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresour. Technol.** 97: 1477-1483.

- Cabral, J.M.S.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M. (2003). **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas Ltda. 250p.
- Cannel, E. & Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. **Process Biochem.** 15: 2-7.
- Chisti, Y; Jauregui-Haza, U.J. (2002). Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochem. Eng. J.** 10(2): 143-153.
- Da Silva, R.; Franco, C.M.L.; Gomes, E. (1997). Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim SBCTA.** 3: 249-260.
- Dewan, S.S. (2014). Enzymes in the fruit juice industry. In: **Global markets for enzymes in industrial application – BIO030H.** BBC Research. **Disponível (online):** <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>. (15 de outubro de 2015).
- Diaz-Godínez, G.; Soriano-Santos, J.; Augur, C.; Viniegra-Gonzalez, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 26(5): 271-275.
- Fágáin, C.O. (1995). Understanding and increasing protein stability. **Biochem. Biophys. Acta (BBA) - Protein Struct. Mol. Enzymol.** 1252(1): 1-14.
- Fawole, O.B.; Odunfa, S.A. (2003). Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biodeter. Biodegr.** 52: 223-227.
- FDA, Food and Drug Administration. (2002). GRAS Notices. **Disponível (online)** [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=89&sort=GRN\\_No&order=DESC &startrow=1&type=basic&search=pectinase](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=89&sort=GRN_No&order=DESC &startrow=1&type=basic&search=pectinase). (15 de janeiro de 2015).
- Fontana, R.C. (2004). Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de Caxias do Sul.
- Fontana, R.C.; Salvador, S.; Silveira, M.M. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32: 371-377.
- Fontana, R.C.; Polidoro, T.A.; Silveira, M.M. (2009). Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresour. Technol.** 100: 4493-4498.
- Fontana, R.C.; Silveira, M.M. (2012). Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. **Braz. J. Chem. Eng.** 29: 683-690.
- Gaden, E.L. (1959). Fermentation process kinetics. **J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.** 1: 413-419.

- Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M.; Kalantzi, O. (1997). Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 425-429.
- Gomes, J.; Zeni J.; Cence, K.; Toniazzo, G.; Treichel, H.; Valduga E. (2011). Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC9642. **Food Bioprod. Process.** 89: 281-287.
- Gomes, E.; Guez, M.A.U.; Martin, N.; Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quím. Nova.** 30: 136-145.
- Gonzalez, S.L.; Rosso, N.D. (2011). Determination of pectin methylesterase activity in commercial pectinases and study of the inactivation kinetics through two potentiometric procedures. **Ciênc. Tecnol. Alim.** 31: 412-417.
- Grassin, C.; Fauquembergue, P. (1996). Application of pectinases in beverages. **Biotechnol. Progress.** 14: 453-462.
- Gummadi, S.N.; Manoj, N.; Kumar, D.S. (2007). Structural and biochemical properties of pectinases. **Ind. Enzym.** 7: 99-115
- Hiss, H. (2001). **Cinética de processos fermentativos.** In: Schmidell, W.; Lima, U. E.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica.** Vol. 2. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. pp. 93-122.
- Hölker, U.; Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Curr. Opin. Microbiol.** 8: 301-306.  
<http://www.ifsc.usp.br/~ilanacamargo/FFI0740/aula5.pdf>. **Disponível (online).** (27 de outubro de 2015).
- Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization - aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem.** 43: 1019-1032.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochem.** 40: 2931-2944.
- Kapritchkoff, F.M. (1996). Estudo comparativo dos processos de produção de pectinase por fermentação semi-sólida e fermentação submersa. **Dissertação de mestrado.** Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo.
- Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.** 77: 215-227.
- Kawano, C.Y.; Chellegatti, M.A.; Said, S.; Fonseca, M.J. (1999). Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 2: 133-140.
- Kumar, S.; Sharma, H.K.; Sarkar, B.C. (2011). Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF). **Food Sci. Biotechnol.** 20: 1289-1298.

- Lai, L.T.; Tsai, T.H.; Wang, T.C.; Cheng, T.Y. (2005). The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 737-748.
- Lang, C; Dörnenburg, H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 366-375.
- Lea, A.G.H. (1998). Enzymes in production of beverages and fruit juices. In: **Enzymes in Food Processing**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1998. pp. 223-249.
- Lenartovicz, V.; Souza, C.G.M.; Moreira, F.G.; Peralta, R.M. (2003). Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable  $\beta$ -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.** 38: 1775-1780.
- Levin, L. & Forchiassin, F. (1998). Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes by the white-rot fungus *Trametes trogii* on a laboratory scale. **Acta Biotechnol.** 18: 157-166.
- Li, C.; Adamcik, J.; Mezzenga, R. (2012). Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. **Nat. Nanotechnol.** 7(7): 421-427.
- Lima, U.E.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (2001). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. 593p.
- Lonsane, B.K.; Saucedo-Castañeda, G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra-Gonzales, G.; Ghildyal, N.P.; Ramakrishna, M.; Krishnaiah, M.M. (1991). Scale-up strategies for solid state fermentation systems: a review. **Process Biochem.** 26: 1-15.
- Maiorano, A.E. (1982). Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. **Dissertação de mestrado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.
- Maiorano, A.E. (1990). Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. **Tese de doutorado**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- Maldonado, M.C.; Strasser de Saad, A.M. (1998). Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20: 34-38.
- Malvessi, E. (2000). Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Braz. Arch. Biol Technol.** 47: 693-702.

- Martínez-Trujillo, A.; Aranda, J.S.; Gómez-Sánchez, C.; Aguilar, B.T.; Aguilar-Osorio, G. (2009). Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. **Braz. J. Microbiol.** 40: 40-47.
- Martins, E. S.; Silva, D.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2002). Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochem.** 37(9): 949-954.
- Meneghel, L. (2013). Avaliação da produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 em processo submerso. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Meneghel, L.; Negri, F.; Pozza, A.; Rossi, C.; Reginatto, C.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2015). Estudo do inóculo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 para a produção de pectinases em processo submerso. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais**. Fortaleza, 2015.
- Meneghel, L.; Reis, G.P.; Reginatto, C.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2014). Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochem.** 49 (11): 1800-1807.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Minjares-Carranco, A.; Trejo-Aguilar; B.A.; Aguilar, G.; Viniegra-González, G. (1997). Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enzyme Microb. Technol.** 21: 25-31.
- Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. (2006). **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 447p.
- Mohsen, S.M.; Bazaraa, W.A.; Doukani, K. (2009). Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. In: 4<sup>o</sup> Conference on Recent Technologies in Agriculture. **Anais**. Egito, 2009.
- Moore-Landecker, E. (1996). **Fundamentals of Fungi**. New Jersey: Prentice Hall. 574p.
- Najafpour, G.D. (2007). **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1ed. Netherlands: Elsevier. 421p.
- NCBE, National Center of Biotechnology Education. (2000). Enzymes in fruit juice production. **Disponível (online)** <http://www.ncbe.reading.ac.uk/ncbe/protocols/inajam/pdf/jam01.pdf> (07 de outubro de 2015).
- Ortega, N.; Diego, S.; Perez-Mateos, M; Busto, M.D. (2004). Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chem.** 88: 209-217.
- Papagianni, M.; Moo-Young, M. (2002). Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculums effects. **Process Biochem.** 37: 1271-1278.

- Patil, S.R.; Dayanand, A. (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresour. Technol.** 97: 2054-2058.
- Pedrolli, D.B. (2008). Caracterização físico-química de pectinases extracelulares purificadas de *Aspergillus giganteus*. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- Pedrolli, D.B.; Gomes, E.; Monti, R.; Carmona, E. C. (2008). Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **App. Biochem. Biotechnol.** 144(2): 191-200.
- Pilnik, W.; Rombouts, F.M. (1981). **Pectic enzymes**. In: Birch, G. G.; Blakebrough, N.; Parker, K.J. **Enzymes and Food Processing**. London: Applied Science Publishers. 296p.
- Poletto, P. (2015). Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Poletto, P.; Borsói, C.; Zeni, M.; Silveira, M.M. (2015). Downstream processing of pectinase produced by *Aspergillus niger* in solid state cultivation and its application to fruit juices clarification. **Food Sci. Technol.** 35 (2): 391-397.
- Phutela, U.; Dhuna, V.; Sandhu, S.; Chadha, B.S. (2005). Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Braz. J. Microbiol.** 36: 63-69.
- Prabhakar, A.; Krishnaiah, K.; Janaun, J.; Bono, A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. **Malaysian J. Microbiol.** 12: 10-16.
- Prakash, D.; Nawani, N.; Prakash, M.; Bodas, M.; Mandal, A.; Khetmalas, M.; Kapadnis, B. (2013). Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **BioMed Res. Int.** <http://dx.doi.org/10.1155/2013/264020>.
- Ranganna, S. (1977). **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New Delhi: McGraw-Hill, 634p.
- Reginatto, C.; Noronha, F.P.; Rossi, C.; Carra, S.; Meneghel, L.; Silveira, M.M.; Malvessi, E. (2014). Efeito do inóculo na obtenção de pectinases por *Aspergillus fumigatus*. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais**. Florianópolis, 2014.
- Rombouts, E.M.; Pilnik, W. (1980). **Pectic enzymes**. In: Rose, A. (Ed). **Economic Microbiology**. Vol. 5. London: Academic Press. pp. 228-282.
- Rossi, C.; Pozza, A., Negri, F., Reginatto, C.; Meneghel, L.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2015). Caracterização de extrato pectinolítico produzido por *Aspergillus oryzae*. In: XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. **Anais**. Campinas, 2015.

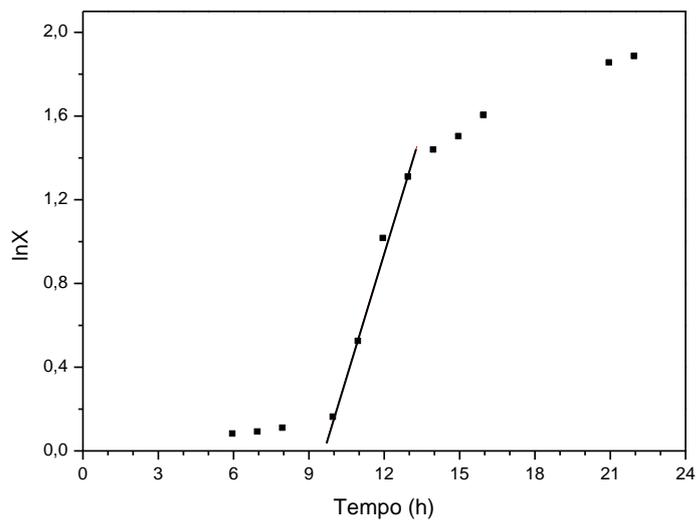
- Sandri, I.G. (2010). Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Sandri, I.G.; Fontana, R.C.; Barfknecht, D.M.; Silveira, M.M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT – Food Sci. Technol.** 44: 2217-2222.
- Sandri, I.G.; Lorenzoni, C.M.T.; Fontana, R.C.; Silveira, M.M. (2013). Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT - Food Sci. Technol.** 51: 469-475.
- Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol 2. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. 541p.
- Semenova, M.V.; Grishutin, S.G.; Gusakov, A.V.; Okunev, O.N.; Sinitsyn, A.P. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochem.** 68(5): 559-569.
- Sharma, D.C.; Satyanarayana T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresour. Technol.** 97(5): 727-733.
- Sharma, N.; Rathore, M.; Sharma, M. (2013). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Rev. Environm. Sci. Biotechnol.** 12: 45-60.
- Solis-Pereira, S.; Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G.; Gutiérrez-Rojas, M.; Roussos, S.; Saucedo-Castañeda, G.; Gunasekaran, P. (1993). Production of pectinase by *Aspergillus niger* in solid state fermentations at high initial glucose concentrations. **J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 257-260.
- Souza, R.L.A.; Oliveira, L.S.C.; Silva, F.L.H.; Amorim, B.C. (2010). Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.** 14: 9-12.
- Stak, J.P.; Mount, M.S.; Berman, P.M.; Hubbard, J.P. (1980). Pectic enzyme from *Erwinia carotovora*: a mode for degradation and assimilation of host pectic fractions. **Physiol. Biochem.** 70: 267-272.
- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Tanner, H.; Brunner, H. R. (1985). Getränke analytik – untersuchungsmethode für die Labor- und Betriebspraxis. Wädenswill: Verlag Helles. In: Nogueira, A. (2006). Physical chemical and technological evaluation of the juice of seven apple tree cultivars. **Ciências Agrárias**, 27(1): 89-98.
- Tari, C.; Göğüs, N.; Tokatli, F. (2007). Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. **Enzyme Microb. Technol.** 40(5): 1108-1116.

- Teixeira, M.F.S.; Lima-Filho, J.L.; Durán, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicas* 586. **Braz. J. Microbiol.** 31: 286-290.
- Ueda, S.; Fujio, Y.; Lim, J.Y. (1982). Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. **J. Appl. Biochem.** 4: 524-532.
- Uenojo, M.; Pastore, G.M. (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quím. Nova.** 30: 388-394.
- Wang, D.I.C.; Cooney, C.L.; Demain, A.L.; Dunnill, P.; Humphrey, A.E.; Lilly, M.D. (1979). **Fermentation and Enzyme Technology**. New York: Wiley-Interscience. 182p.
- Whitaker, J.R. (1984). Review: pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 341-349.

## ANEXO 1 – Determinação do tempo de crescimento de inóculo vegetativo

**Tabela 1** – Resultados de cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em frascos sob agitação para a determinação do tempo de crescimento do inóculo vegetativo.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b>ln (biomassa)</b>
<b>0</b>	0	--
<b>6</b>	1,08	0,07696
<b>7</b>	1,09	0,08618
<b>8</b>	1,11	0,10436
<b>10</b>	1,17	0,157
<b>11</b>	1,68	0,51879
<b>12</b>	2,75	1,0116
<b>13</b>	3,685	1,30427
<b>14</b>	4,195	1,43389
<b>15</b>	4,469	1,49728
<b>16</b>	4,95	1,59939
<b>21</b>	6,36	1,85003
<b>22</b>	6,56	1,88099

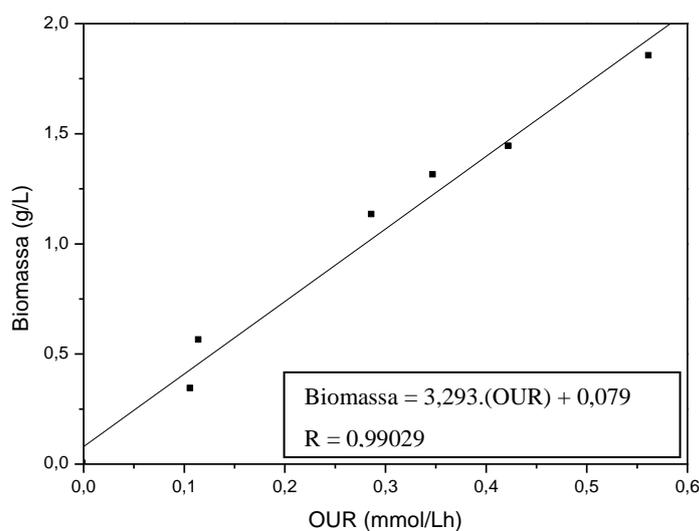


**Figura 2** – Representação semilogarítmica das concentrações de biomassa de cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em frasco sob agitação. (—) ajuste linear dos pontos experimentais.

## ANEXO 2 – Relação entre a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) e a concentração celular

**Tabela 1** – Resultados obtidos em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em meio M, isento de pectina e de extrato de farelo de trigo.

Tempo (h)	Biomassa (g/L)	CO <sub>2</sub> (%)	OUR (mmol/Lh)
0	0	0	0
14,5	0,34	0,0383	0,10707
15,5	0,56	0,0412	0,11518
18	1,13	0,1027	0,2871
19	1,31	0,1245	0,34805
21	1,44	0,1514	0,42325
23	1,85	0,2012	0,56247



**Figura 1** – Relação entre biomassa e OUR de cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de bancada, com meio M isento de pectina e extrato de farelo de trigo.