

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES POR *Aspergillus niger* EM
PROCESSO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR COM DUPLA
SUPERFÍCIE**

Diogo Henrique Hendges

CAXIAS DO SUL, 2006.

DIOGO HENRIQUE HENDGES

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES POR *Aspergillus niger* EM
PROCESSO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR COM DUPLA
SUPERFÍCIE**

**“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia.”**

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Caxias do Sul, 2006.

*Aos meus pais Moacir e Valeda e ao meu
irmão Williann, dedico com carinho.*

DIOGO HENRIQUE HENDGES

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES POR *Aspergillus niger* EM PROCESSO
EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR COM DUPLA SUPERFÍCIE**

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

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15 DE DEZEMBRO DE 2006.

Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dilon

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Prof. Dra. Telma Elita Bertolin

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela saúde e pela fé que me sustenta na caminhada rumo aos meus objetivos.

Aos meus pais Moacir Antônio Hendges e Veleda Elma Hendges, e ao meu irmão Williann, pelo suporte sólido que é a minha família.

Ao Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira, pelo exemplo de profissionalismo, orientação e ajuda em todos os momentos deste trabalho, e pela paciência frente às minhas limitações.

À CAPES pelo apoio financeiro e à Universidade de Caxias do Sul pelo suporte.

À minha namorada Lucimara, pela amizade, companheirismo, dedicação e espera.

Aos Professores Jorge Alberto Vieira Costa e Telma Elita Bertolin, pela avaliação desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, em especial à Mestre Eloane Malvessi e às Acadêmicas Renata Verônica Onzi (Biologia) e Queli Montanari (Farmácia), pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Óleos Essenciais pelo livre acesso ao viscosímetro.

Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassa, em especial Patrícia Bonfanti, Luciana Brancher e Fernanda Confortin, pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia com os quais tive a oportunidade de compartilhar conhecimentos.

Ao Professor e amigo Dr. Aldo José Pinheiro Dillon.

Ao Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray pela revisão desta dissertação.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, em especial Patrícia Bonfanti, Fernanda Confortin e Adriana de Carli.

À funcionária Roseli, atendente da biblioteca setorial do bloco 57 da Universidade de Caxias do Sul.

A todas as outras pessoas que fizeram parte de minha vida até o fim nesta jornada.

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | V |
| LISTA DE TABELAS..... | VIII |
| NOMENCLATURA..... | IX |
| RESUMO..... | XI |
| ABSTRACT..... | XIII |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 Substâncias Pécicas e Enzimas Pectinolíticas..... | 3 |
| 2.2 Microrganismos Produtores de Pectinases..... | 5 |
| 2.3 Processo Fermentativo em Estado Sólido | 6 |
| 2.4 Biorreatores para Fermentação em Estado Sólido | 7 |
| 2.5 Meios de Cultivo e Condições Operacionais para a Produção de Pectinases..... | 12 |
| 2.6 Recuperação de Poligalacturonases Produzidas em Estado Sólido | 16 |
| 2.7 Influência da Temperatura e do pH sobre a Atividade de Poligalacturonases | 16 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Microrganismo Produtor de Pectinases..... | 18 |
| 3.2 Meios de Cultivo | 18 |
| 3.3 Condições Experimentais dos Cultivos..... | 19 |
| 3.4 Obtenção do Extrato Aquoso para Análise de Compostos Solúveis..... | 23 |
| 3.5 Avaliação do Efeito da Temperatura sobre a Atividade Enzimática | 23 |
| 3.6 Métodos Analíticos | 23 |
| 3.6.1 Determinação de açúcares redutores totais (ART)..... | 23 |
| 3.6.2 Determinação de atividade de exo-poligalacturonase | 24 |
| 3.6.3 Determinação da atividade de endo-poligalacturonase..... | 25 |

| | |
|---|----|
| 3.6.4 Determinação da umidade de meios de cultivo | 27 |
| 3.6.5 Determinação do pH..... | 27 |
| 3.7 Determinação da Demanda de Oxigênio pelo Cultivo (OUR) | 27 |
| 3.8 Estimativa Indireta da Concentração Celular | 29 |
| 3.9 Cálculo da Máxima Velocidade Específica de Crescimento, dos Fatores de Conversão e da Produtividade do Processo..... | 30 |
| 3.10 Análise Estatística de Resultados..... | 31 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 4.1 Avaliação de Parâmetros de Recuperação de Enzimas Produzidas em Processo em Estado Sólido | 32 |
| 4.2 Descrição de um Cultivo Padrão de <i>Aspergillus niger</i> em Meio Sólido | 35 |
| 4.3 Avaliação da Espessura de Meio Sólido em Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> | 39 |
| 4.3.1 Análise detalhada do leito do meio de cultivo..... | 44 |
| 4.4 Influência da Aeração Superficial sobre o Cultivo Sólido de <i>Aspergillus niger</i> | 48 |
| 4.5 Influência da Aplicação de Pulsos de Pressão sobre o Cultivo Sólido de <i>Aspergillus niger</i> | 55 |
| 4.6 Influência do Uso de um Duto Central no Biorreator sobre o Cultivo Sólido de <i>Aspergillus niger</i> | 57 |
| 4.7 Influência da Temperatura sobre a Atividade e a Estabilidade de Endo e Exo-PG Produzidas por <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido..... | 61 |
| 5 CONCLUSÕES | 65 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 67 |

Lista de Figuras

| Figuras | Legendas | Página |
|------------------|---|--------|
| Figura 1 | Modo de ação das pectinases. (a) Hidrólise de ligações (PMG e PG), (b) desmetoxilação (PE) e (c) quebra por transeliminção (PL e PGL). | 4 |
| Figura 2 | Esquema do reator de nível industrial de 70m ³ . (A) Diagrama esquemático do reator: 1 – porta, 2 – bandejas, 3 – tanque de fermentação, 4 – sistema de ventilação. (B) Fotografia do reator para processo sólido. (C) Esquema de circulação interna de ar (Hongzhang et al. 2002). | 10 |
| Figura 3 | Esquema do reator experimental Segundo Fujian et al., (2002). 1 – motor, 2 – ventilação, 3 – chicana, 4 – tanque de fermentação, 5 – bandejas (contendo sondas de temperatura), 6 – medidor de pressão, 7 – válvulas elétricas, 8 – cabo, 9 – termômetro, 10 – porta de observação (omitida). | 11 |
| Figura 4 | Fenômenos de transferência de massa e calor em biorreatores de bandeja. Figura adaptada de Mitchell <i>et al.</i> (2000). | 15 |
| Figura 5 | Esquema básico dos reatores utilizados em todos os ensaios, para produção de enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> . 1 - tubo em PVC, 2 - perfuração para tomada de temperatura, 3 - oliva utilizada para aeração superficial forçada e 4 - tela em náilon para suporte do meio. | 20 |
| Figura 6 | Esquema da variação do biorreator utilizado no experimento em que foi empregado o sistema de aeração superficial forçada. 1 - entrada de ar; 2 - mangueira de circulação do fluxo; 3 - saída de ar e 4 - leito de meio de cultivo. | 21 |
| Figura 7 | Esquema do sistema adaptado para o experimento em que foi utilizado o pulso de pressão, acoplado à aeração, com fluxo de 1,4 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ .mu. 1 - entrada de ar, 2 - mangueira circulação do fluxo, 3 - obstrução do fluxo, 4 - fluxo através do leito e 5 - saída de ar do reator. | 21 |
| Figura 8 | Esquema do sistema de duto central, empregado no experimento com espessura de 17 cm, na tentativa de remoção de calor e melhor transferência de massa. | 22 |
| Figura 9 | Sistema utilizado para a determinação da variação de pressão parcial de oxigênio em cultivos sólidos de <i>Aspergillus niger</i> . 1 - bomba peristáltica; 2 - oxímetro; 3 - eletrodo para a medida de oxigênio; 4 - amostra. | 28 |
| Figura 10 | Atividade de exo-PG produzida por <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido determinada após extração com diferentes razões entre solvente (água pH 4)/massa seca de meio, a 30°C, por 30 minutos. Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais ao nível de 5% de confiança, segundo o teste de Tukey. | 33 |
| Figura 11 | Atividade de exo-PG produzida por <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido determinada após extração por 15, 30 e 45 minutos, a 30°C, com razão entre solvente (água pH 4)/massa seca de meio de 7,5. Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais ao nível de 5% de confiança, segundo o teste de Tukey. | 34 |
| Figura 12 | Variação da concentração de biomassa de <i>Aspergillus niger</i> e do ART com o tempo, em cultivo em meio sólido com espessura de meio de 17 cm. (■) Biomassa, (◆) ART. | 35 |
| Figura 13 | Variação do pH e da temperatura do meio sólido, com o tempo, em cultivo de | 36 |

| | | |
|------------------|--|-----------|
| | <i>Aspergillus niger</i> na condição padrão de 17 cm de espessura. (○) pH; (◇) temperatura. | |
| Figura 14 | Variação da atividade de endo e exo-PG e da concentração de biomassa fúngica com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido, na condição padrão 17 cm de espessura. (▲) Endo-PG; (●) exo-PG; (■) concentração celular. | 37 |
| Figura 15 | Variação da umidade do meio com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido, na condição padrão de 17cm de espessura. | 38 |
| Figura 16 | Aspecto do meio de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , em 96 horas de processo. (A) 2 cm e 5 cm; (B) 8 cm; (C) 11 cm. | 40 |
| Figura 17 | Variação da concentração de biomassa fúngica com o tempo em cultivos sólidos de <i>Aspergillus niger</i> com diferentes espessuras de leito de meio. A) (■) 2 cm; (○) 5 cm; (▲) 8 cm; B) (▽) 11 cm; (◆) 14 cm; (*) 17 cm. | 40 |
| Figura 18 | Variação da umidade com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> com diferentes espessuras de leito. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm. | 41 |
| Figura 19 | Variação da concentração de ART com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em diferentes espessuras de leito de meio de cultivo. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm. | 42 |
| Figura 20 | Variação do pH do meio sólido com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , com diferentes espessuras de meio. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm. | 43 |
| Figura 21 | Variação da temperatura do meio sólido, com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , com diferentes espessuras de meio. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm. | 43 |
| Figura 22 | Corte longitudinal do meio sólido, após 96 h de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> . As letras indicam cada região submetida separadamente às análises padrão. (G) Geral (mistura da parte central (Meio), com a parte exterior (Externo)), (M) Meio e (E) Externo. | 45 |
| Figura 23 | Variação da atividade de endo-PG (A) e exo-PG (B) com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , avaliando-se diferentes regiões do leito de meio ((G) Geral, (M) Meio e (E) Externo) com 17cm de espessura. | 46 |
| Figura 24 | Variação da umidade em diferentes regiões do meio sólido com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , na condição padrão de 17 cm de espessura. (■) Geral, (○) Meio e (▲) Externo. | 47 |
| Figura 25 | Variação do pH em diferentes regiões do meio sólido com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , para condição padrão de espessura 17 cm. (■) Geral, (○) Meio e (▲) Externo. | 48 |
| Figura 26 | Corte longitudinal do meio sólido, após 96 h de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , sob diferentes condições de aeração. | 49 |
| Figura 27 | Variação da concentração de biomassa com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> sob diferentes condições de aeração avaliadas. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu. | 49 |
| Figura 28 | Variação da umidade do meio sólido com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus</i> | 51 |

| | | |
|------------------|--|-----------|
| | <i>niger</i> , sob diferentes condições de aeração de (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu. | |
| Figura 29 | Varição da atividade de endo-PG com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido, sob diferentes condições de fluxos de aeração de (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu. | 51 |
| Figura 30 | Varição do consumo de substrato com o tempo por <i>Aspergillus niger</i> em cultivo em estado sólido, sob as diferentes condições de aeração avaliadas. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu. | 53 |
| Figura 31 | Varição pH do meio sólido com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , sob as diferentes condições de aeração avaliadas. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu. | 53 |
| Figura 32 | Varição da temperatura do meio sólido com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , sob diferentes condições de aeração. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu. | 54 |
| Figura 33 | Varição da concentração de biomassa de <i>Aspergillus niger</i> com o tempo, em cultivo em meio sólido conduzido com sistema de pulso de pressão acoplado à aeração superficial com fluxo de 1,4 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu. | 55 |
| Figura 34 | Varição da concentração da biomassa de <i>Aspergillus niger</i> com o tempo, em cultivo em meio sólido em biorreator com duto central, em maio com 17 cm de espessura. | 57 |
| Figura 35 | Corte longitudinal do meio de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , com 17 cm de espessura, em biorreator com duto central. | 58 |
| Figura 36 | Varição da concentração de biomassa e atividade de endo e exo-PG de <i>Aspergillus niger</i> com o tempo em meio sólido, em reator com duto central. (■) Biomassa; (○) endo; (▲) exo-PG. | 59 |
| Figura 37 | Varição da umidade e do pH com o tempo, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido, em biorreator com duto central. (■) umidade e (○) pH. | 60 |
| Figura 38 | Varição da concentração de ART com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , em biorreator com duto central. | 60 |
| Figura 39 | Varição da atividade de endo e exo-PG produzida por <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido em função da temperatura. O valor de 100% corresponde à condição padrão de reação para cada enzima. (■) exo-PG e (○) endo-PG. | 61 |
| Figura 40 | Avaliação da termoestabilidade de exo-PG de <i>Aspergillus niger</i> , em função do tempo de exposição do caldo enzimático bruto a diferentes temperaturas. (■) 25°C, (○) 30°C; (▲) 40°C; (◇) 50°C; (+) 60°C; (*) 70°C. | 62 |
| Figura 41 | Avaliação da termoestabilidade de endo-PG de <i>A. niger</i> , em função do tempo de exposição do caldo enzimático bruto a diferentes temperaturas. (■) 25°C; (○) 30°C; (▲) 40°C; (◇) 50°C; (+) 60°C; (*) 70°C. | 63 |

Lista de Tabelas

| Tabela | Legendas | Página |
|-----------------|--|---------------|
| Tabela 1 | Resultados gerais obtidos em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em estado sólido, com espessura de leito de meio de 17 cm (condição padrão). | 38 |
| Tabela 2 | Máxima da concentração de biomassa de <i>Aspergillus niger</i> e fatores de conversão de substrato em células, para as diferentes condições de espessura avaliadas. | 41 |
| Tabela 3 | Concentrações máximas de biomassa em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> com diferentes espessuras de meio sólido. | 44 |
| Tabela 4 | Atividades enzimáticas máximas de endo e exo-PG em diferentes regiões de meio, em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , na condição padrão de 17 cm de espessura. | 47 |
| Tabela 5 | Concentrações máximas de biomassa em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> com diferentes fluxos de aeração superficial, comparadas à condição padrão. | 50 |
| Tabela 6 | Atividades enzimáticas máximas de endo-PG em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> com diferentes fluxos de aeração superficial e na condição padrão. | 52 |
| Tabela 7 | Resultados gerais obtidos em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em estado sólido em 96 h, sob condição de pulso de pressão acoplado à aeração superficial com fluxo de 1,4 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ .mu. | 56 |
| Tabela 8 | Concentrações máximas de biomassa em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> sob diferentes condições avaliadas neste trabalho. | 57 |
| Tabela 9 | Atividades enzimáticas máximas de endo e exo-PG com o tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido, em diferentes condições avaliadas neste trabalho. | 59 |

NOMENCLATURA

A - redução da viscosidade;

ART - açúcares redutores totais;

C_{AG} - concentração de ácido D-galacturônico determinada pela curva padrão;

dil - diluição;

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico;

dO₂/dt - velocidade de consumo de O₂;

dX/dt - velocidade instantânea de crescimento;

Endo-PG - endo-poligalacturonase;

Exo-PG - exo-poligalacturonase;

fc - fator de correção;

M - massa de meio seco;

m_O - coeficiente de manutenção celular para o oxigênio;

OUR - demanda de oxigênio pelo cultivo;

OUR_n - demanda de oxigênio ao final do intervalo de tempo considerado;

OUR_{n-1} - demanda de oxigênio ao início do intervalo de tempo considerado;

P₀ - atividade enzimática no tempo inicial de processo;

p_E - produtividade em enzimas;

P_{endo} - atividade enzimática de endo-poligalacturonase;

P_{exo} - atividade enzimática de exo-poligalacturonase;

P_f - máxima atividade enzimática alcançada;

PM - massa molar;

pO_{2,i} - pressão parcial de O₂ inicial;

$pO_{2,t}$ - pressão parcial de O_2 no tempo t ;

R - constante dos gases;

S_0 - concentração inicial de açúcares redutores totais;

S_f - concentração final de açúcares redutores totais;

T - temperatura absoluta;

t - tempo;

v - volume da preparação enzimática utilizada na análise;

V_e - volume de preparação enzimática diluída;

V_g - volume da fase gasosa do reator;

V_t - volume total na reação;

X - concentração celular;

X_0 - concentração celular inicial;

X_f - máxima concentração celular alcançada;

X_n - concentração celular ao final do intervalo de tempo considerado;

X_{n-1} - concentração celular ao início do intervalo de tempo considerado;

$Y_{enzima/S}$ - fator de conversão de substrato em produto;

Y_{GO} - fator real de conversão de oxigênio em células;

$Y_{X/S}$ - fator de conversão de substrato em células;

μ_a - viscosidade da amostra;

$\mu_{a,i}$ - viscosidade da amostra inativada;

$\mu_{X,máx}$ - máxima velocidade específica de crescimento.

RESUMO

Neste trabalho, estudou-se a produção das enzimas endo e exo-poligalacturonases (endo e exo-PG) pela linhagem t0005/007-2 de *Aspergillus niger* em meio sólido, em um biorreator de bandeja de dupla superfície, analisando-se as seguintes condições de operação: variação da espessura do meio sólido, uso de aeração superficial do meio, aplicação de pulsos de pressão e alteração da configuração do biorreator incluindo um duto central. Adicionalmente, foram avaliados parâmetros de recuperação das enzimas produzidas, como razão entre solvente e massa de meio e tempo de extração, sendo também analisada a influência da temperatura sobre a atividade e a estabilidade de endo e exo-PG.

Inicialmente, foram avaliadas diferentes razões solvente/massa na recuperação de exo-PG, verificando-se que com menor volume de solvente utilizado (razão solvente/massa de 7,5:1), foi possível recuperar a mesma atividade enzimática obtida nas demais condições. Com um tempo de extração de 15 min foi alcançado o mesmo nível de recuperação de enzima que em tempos maiores.

Com relação à espessura do meio sólido, maiores concentrações de biomassa (100 a 120 mg de massa celular por g de meio sólido seco; mg/gms) foram obtidas com espessuras entre 5 e 14 cm. Quando a espessura de meio foi aumentada para 17 cm, a biomassa decresceu (92 mg/gms), sugerindo-se que a transferência de massa até as regiões mais profundas do leito foi dificultada. Maiores atividades de exo-PG (80 a 115 U/gms) foram alcançadas com espessuras de leito entre 5 e 17 cm. Elevados gradientes de temperatura foram observados em todos os ensaios, com pico de temperatura de 50°C.

Quando aeração superficial forçada foi aplicada sobre o cultivo, no intuito de melhorar a transferência de calor e massa, observou-se que o crescimento microbiano foi afetado

negativamente com fluxo de aeração de $8,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\mu$ (litros de ar/kg de meio úmido/minuto), observando-se biomassa de 75 mg/gms. Maior crescimento microbiano foi observado nas condições 1,4 e $2,8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\mu$, com biomassa de 103 mg/gms. A maior produção de endo-PG se deu na condição de $1,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\mu$ em 96 h (63 U/gms). Gradientes de temperatura semelhantes aos obtidos nas condições de diferentes espessuras de leite (50°C), foram observados neste experimento.

No processo em que foi utilizado sistema de pulso de pressão, acoplado à aeração superficial, verificou-se que a produção das enzimas endo e exo-PG foi negativamente afetada. Maior atividade de endo-PG foi observada em 72 h (24 U/gms), ao passo que para exo-PG maior título enzimático foi obtido em 96 h (55 U/gms). O crescimento microbiano também foi prejudicado, verificando-se que a máxima concentração celular foi de 73 mg/gms. Constatou-se, também, que o sistema utilizado não foi eficiente na remoção de calor do leite de meio de cultivo.

No ensaio em que foi adaptado um duto central no biorreator, verificou-se maior colonização nas regiões mais profundas do leite. A concentração fúngica máxima foi de aproximadamente 100 mg/gms e maior produção de endo e exo-PG foi observada em 78 e 140 U/gms, respectivamente, embora o sistema não tenha se mostrado eficiente no que diz respeito à remoção de calor.

Com relação à atividade das enzimas endo e exo-PG frente à temperatura, verificou-se valores máximos a 50 e 60°C , respectivamente. Para endo-PG, constatou-se que, sob a condição de temperatura ótima, a atividade dobrou em comparação a condição padrão, enquanto que para exo-PG o incremento foi de 75%. Quanto à termoestabilidade das enzimas, verificou-se que exo-PG é estável a 60 e 70°C , temperaturas nas quais se observou completa inativação de endo-PG após 15 min.

ABSTRACT

In this work, the production of enzymes endo and exo-polygalacturonase (endo and exo-PG) by the strain *Aspergillus niger* t0005/007-2, in solid medium in a double-surface bioreactor, was studied. The following operational conditions were analyzed: variation of solid medium thickness, use of medium surface aeration, application of pulse of pressure to the medium, and alteration of bioreactor design by introducing a central shaft. Furthermore, enzyme-recovery parameters, such as the solvent/mass of medium rate and the extraction time, and the influence of temperature on both the activity and the stability of endo and exo-PG were evaluated.

Initially, different solvent/mass of medium rates for pectinase recovery were evaluated. With the smallest volume of solvent used (rate of 7.5/1), the same enzyme activity was recovered in comparison to the further conditions with higher rates. With a time of extraction of 15 min, the same enzyme recovery achieved in tests with longer periods was achieved.

With respect to the thickness of solid medium, higher biomass concentrations (100 to 120 mg of cell biomass/g of dry medium; mg/gdm) were obtained with layers of 5 to 14 cm. When the thickness was increased to 17 cm, biomass concentration decreased and the difficulty to transfer oxygen to the deeper regions of the medium was augmented. Maximum exo-PG activities (between 80 and 115 U/gdm) were achieved with medium layers from 5 to 17 cm. In all experiments, high temperature gradients were observed with peak temperatures around 50°C.

When medium surfaces were aerated, as an attempt to increase heat and mass transfer, microbial growth was hindered at an air flux of 8.5 L.min⁻¹.kg⁻¹mm (air liter/min/kg mm) and a biomass concentration of 75 mg/gdm was reached. Best cell growth was achieved at 1.4 and 2.8 L.min⁻¹.kg⁻¹mm with a biomass concentration of 103 mg/gdm. The highest endo-PG

activity occurred at an air flux of $1.4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{mm}$ in 96 h (63 U/gdm). In this experiment, temperature gradients similar to those observed in previous non-aerated tests were measured.

In the process in which pulse of pressure was applied to the medium, a negative effect on both endo and exo-PG was noticed. The highest endo-PG activity was measured after 72 h of process (24 U/gdm), whereas for exo-PG the best titer was attained in 96 h (55 U/gdm). Cell growth was also hindered with a maximum cell concentration of only 73 mg/gdm. The system was not efficient for heat removal from the medium.

In the experiment with the central shaft placed in the medium, the colonization of the deeper regions of the medium was favored, although the system was not efficient with respect to heat transfer. A maximum fungal concentration of 100 mg/gdm and endo and exo-PG titers of 78 and 140 U/gdm, respectively, were achieved.

With respect to the influence of temperature on the activity of endo and exo-PG, maximum titers were measured at 50 e 60°C, respectively. For endo-PG, under the optimal temperature, it was noticed that the activity was twice that measured under the standard condition (30°C), whereas for exo-PG activity was increased in 75%. Exo-PG showed thermal stability at 60 and 70°C. At the same temperatures, endo-PG was completely inactivated after 15 minutes.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas são amplamente aplicadas na indústria, principalmente de alimentos, destacando-se o processamento de frutas e vegetais, a clarificação de vinhos e sucos de frutas, cura de tabaco e café, além de aplicações nas indústrias do papel e têxtil. Embora disponíveis comercialmente, as pectinases têm um custo elevado por serem, na sua maioria, importadas.

As enzimas pectinolíticas são produzidas por muitos microrganismos, destacando-se o fungo filamentosso *Aspergillus niger*. Elas podem ser obtidas tanto em processos submersos, ou fermentação submersa (FSm), quanto em processos em estado sólido, também conhecidos como fermentação em estado sólido (FES), com o termo "fermentação" aplicado em seu contexto mais amplo.

As FES são tidas como as mais antigas “fermentações” utilizadas pelo Homem e, por aproveitarem substratos disponíveis e de baixo custo, vêm sendo empregadas na obtenção de produtos de importância comercial. Os substratos usados em FES são, geralmente, materiais provenientes da agroindústria. Além disso, como principal vantagem sobre a fermentação submersa (FSm), os processos em estado sólido são mais simples, facilitando a recuperação do produto final. Por outro lado, as FES têm como desvantagem a dificuldade em controlar ou mesmo medir variáveis fundamentais de processo como a temperatura, o pH e a umidade, além da concentração de biomassa.

Em laboratório, os biorreatores para FES mais estudados são os de tipo bandeja, coluna e tambor rotativo, sendo que em escala industrial o primeiro é o mais utilizado. Cada tipo de biorreator apresenta vantagens e desvantagens, mas, para qualquer dos casos, constata-se a necessidade de que sejam resolvidas as sérias limitações relativas, especialmente, às

transferências de massa e de calor. Para isso, é necessário desenvolverem-se desenhos de reatores eficientes com respeito a esses parâmetros.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral contribuir com o conhecimento sobre a influência de alguns parâmetros de processo, como transferências de calor e de massa sobre a produção de endo e exo-poligalacturonases de *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido em biorreator com dupla superfície.

Os objetivos específicos são relacionados a seguir.

- Estudar a influência da espessura de meio sólido sobre a produção de endo e exo-poligalacturonases.
- Avaliar o comportamento do processo quanto ao crescimento e a formação de enzimas em biorreator com aeração superficial, com pulsos de pressão e equipado com duto central, buscando melhorar a transferência de calor e massa.
- Analisar a influência da temperatura sobre a atividade e a estabilidade das enzimas endo e exo-poligalacturonases.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Substâncias Pécnicas e Enzimas Pectinolíticas

As substâncias pécnicas são polissacarídeos presentes na lamela média e parede primária de plantas superiores que contribuem com a estrutura e firmeza dos tecidos, tendo como unidades básicas resíduos de ácido galacturônico, que podem estar esterificados com metanol, em uma porcentagem que varia entre 60 e 90%. Além de ácido galacturônico, as substâncias pécnicas podem possuir resíduos de ramnose inseridos na cadeia principal e arabinanas e galactanas nas cadeias laterais ligadas à ramnose. Essas substâncias pécnicas são amplamente distribuídas em frutas e vegetais (10 a 30% em casca de laranja, limão, tomate, etc.) (Gummadi & Panda, 2003).

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, foram umas das primeiras enzimas a serem utilizadas industrialmente, sendo descrita sua aplicação inicialmente em 1930. Entretanto, apenas na década de 1960 a natureza química de tecidos de plantas tornou-se evidente, de modo a permitir grande expansão no mercado de enzimas (Kashyap *et al.* 2001).

As enzimas pectinolíticas são classificadas, segundo o seu modo de ação, em (Kashyap *et al.*, 2001; Bélafi-Bakó *et al.* 2007):

- desmetoxilante - que catalisa a hidrólise dos grupos metoxila ligados aos grupos carboxílicos da cadeia de pectina, formando o ácido pécnico, que contém quantidades desprezíveis de grupos metoxila (pectinesterase (PE): E.C.3.1.1.11);
- despolimerizantes - que catalisam reações de hidrólise (polimetilgalacturonases (PMG), poligalacturonases (PG): endo-PG (E.C.3.2.1.15) e exo-PG 1 e 2 (E.C.3.2.1.67, E.C.3.2.1.82)) e quebra por trans-eliminação (poligalacturonato liase (PGL): endo-PGL (E.C.4.2.2.2) e exo-PGL (E.C.4.2.2.9) e pectina liase (PL) (4.2.2.10)).

O modo de ação das pectinases é ilustrado na Figura 1 (Gummadi & Panda, 2003).

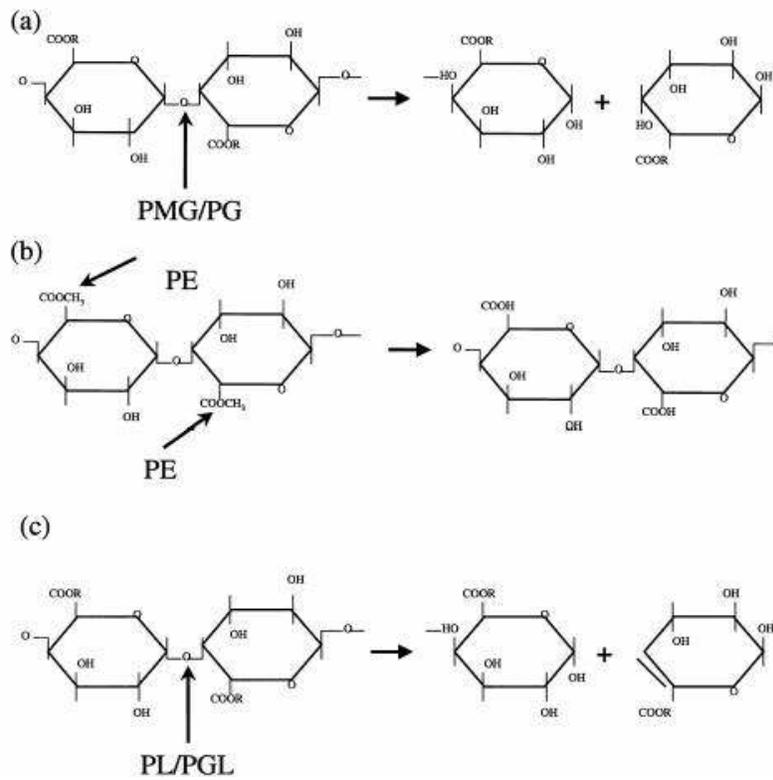


Figura 1. Modo de ação das pectinases. (a) Hidrólise de ligações (PMG e PG), (b) desmetoxilação (PE) e (c) quebra por transeliminção (PL e PGL).

O grupo das enzimas pectinolíticas tem muitas aplicações industriais, especialmente na área de alimentos, em operações como extração, clarificação e remoção de pectina de sucos de frutas e vinhos, maceração de vegetais e frutas e extração de óleos vegetais (Kashyap *et al.* 2001; Kaur *et al.* 2004). Podem ser encontradas, ainda, aplicações na indústria de papel e têxtil, bem como na produção de produtos unicelulares, que têm o intuito de preservar a integridade de células de plantas, por hidrólise seletiva de polissacarídeos presentes na lamela média (Kashyap *et al.* 2001).

As poligalacturonases (endo e exo-PG) agem sobre a cadeia de ácido poligalacturônico, liberando monômeros ou dímeros de ácido galacturônico (exo-PG) e também aleatoriamente, reduzindo a viscosidade de uma solução do ácido poligalacturônico.

As pectinases, juntamente com outras enzimas hidrolíticas, como as celulases e as xilanases, vêm sendo estudadas visando a sua aplicação na extração de diferentes óleos vegetais. O uso de pectinases, juntamente com celulases, na extração de óleos essenciais de *Citrus latifolia* (limão Taiti), foi estudado por Pedruzzi *et al.* (2001), com bons resultados. Segundo Kashyap *et al.* (2001), as enzimas pectinolíticas diminuem o tempo de processo de extração de óleos aumentando o rendimento bem como a qualidade final do produto.

2.2 Microrganismos Produtores de Pectinases

Enzimas pectinolíticas são naturalmente produzidas por bactérias e fungos filamentosos e unicelulares. Em um trabalho de seleção de microrganismos produtores de pectinases em FES, utilizando resíduos agroindustriais, Martin *et al.* (2004) selecionaram 16 linhagens, obtendo ótimos resultados com *Moniliella* sp SB9, indicando ainda a produção de enzimas pectinolíticas por linhagens de *Penicillium* sp EGC5, *Thermoascus* sp 179.5, *Phanerochaetes* sp 291, entre outros.

Na produção em larga escala, entretanto, utiliza-se o fungo filamentoso *A. niger*, visto que esta espécie recebe a classificação GRAS (*generally recognized as safe*) do FDA (*Food and Drugs Administration*), órgão responsável pelo controle de alimentos e medicamentos nos EUA (Schuster *et al.* 2002). Neste caso, é importante lembrar que as principais aplicações das pectinases se dão na indústria de alimentos. Além de *A. niger*, outros fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae* (Malvessi, 2000), *Penicillium frequentans* (Chellegatti *et al.*, 2002), *Penicillium viridicatum* RFC3 (Silva *et al.*, 2005), também são referidos na literatura especializada como bons produtores de pectinases.

2.3 Processo Fermentativo em Estado Sólido

O processo em estado sólido, também conhecido como fermentação em estado sólido (FES), caracteriza-se pelo cultivo de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida úmida (Pandey, 2003), que simulam as condições ambientais sob as quais os microrganismos se desenvolvem na natureza (Pandey, 2003; Hölker & Lenz, 2005).

Considerando as características dos processos em estado sólido, Mitchell *et al.* (1992) listaram algumas de suas vantagens e desvantagens em comparação aos processos submersos:

- em FES o meio é normalmente mais simples, podendo ser formado por resíduos da agroindústria;
- a baixa quantidade de água disponível no meio sólido desfavorece o crescimento de contaminantes como bactérias e leveduras;
- nos processos submersos, grandes reatores são utilizados, ao passo que em FES, reatores de menor capacidade podem ser utilizados para processar a mesma quantidade de substrato;
- a aeração forçada é facilitada nos processos em estado sólido devido ao espaço entre partículas;
- a remoção do calor gerado pelo metabolismo do microrganismos, em FES, é problemática, especialmente em grandes escalas;
- parâmetros como pH, concentração de substrato e temperatura são mais facilmente controlados em processos submersos;
- o tempo de cultivo em FES é maior do que em processo submerso, pois a transferência de massa no primeiro caso é feita por simples difusão, ao passo que no segundo sistema, em reator agitado, é feita por convecção.

A relação apresentada acima é uma generalização. Na verdade, cada processo específico tem de ser avaliado independentemente de forma a permitir uma escolha correta da forma de condução.

A produção de outras enzimas em FES, com linhagens do gênero *Aspergillus*, foi estudada, entre outros autores, por Viniegra-González *et al.* (2003). Segundo estes autores, o sistema em estado sólido apresenta produtividades mais altas que o submerso em função de uma menor sensibilidade à repressão catabólica e também devido à maior interface sólido-gás que permite a difusão de altos níveis de oxigênio.

2.4 Biorreatores para Fermentação em Estado Sólido

Denominam-se biorreatores, reatores bioquímicos ou ainda reatores biológicos, os reatores nos quais ocorre uma série de reações mediadas por biocatalisadores. Esses biocatalisadores podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais) (Schmidell & Faccioli, 2001).

Os biorreatores mais amplamente utilizados em fermentação submersa (FSm) são os reatores agitados mecanicamente STR (*stirred tank reactor*), ao passo que os mais utilizados em FES são os reatores de bandejas (*stationary trays*) (Schmidell & Faccioli, 2001; Mitchell *et al.*, 2000; Durand, 2003).

Segundo Mitchell *et al.* (1992), assim como nas culturas em processos submersos, há a necessidade de que sejam desenvolvidos reatores mais eficientes para as FES. Aspectos como desenho, tipos e escalonamento de reatores são extremamente importantes. Os autores listaram alguns critérios no momento de escolher-se o reator adequado para FES:

- avaliação da adequação de diferentes tipos de reatores para o processo específico;
- investigações em laboratório para determinar a compatibilidade entre o reator e o fungo utilizado;

- avaliação dos custos de operação;
- avaliação dos tipos de reatores em respeito à medição de dados de controle do processo.

Algumas considerações devem ser observadas ao final do desenho do reator:

- forma de mistura (se necessária);
- grau de aeração necessário;
- remoção do calor;
- modo de operação do processo;
- custos de operação.

Existem diferentes tipos de biorreatores para operação em estado sólido, sendo os mais comumente utilizados, de acordo com Mitchell *et al.* (1992), apresentados a seguir.

- **Reatores de bandeja**

São os mais simples reatores. Suas principais características são as seguintes:

- camada relativamente fina de substrato espalhado em uma grande área;
- não há aeração forçada através do leito de meio de cultivo, embora o fundo da bandeja possa ser perfurado, facilitando a difusão de ar;
- a temperatura pode variar dependendo do ambiente em que a bandeja é disposta, podendo ser colocada em ambientes com temperatura controlada;
- como desvantagem, apresenta a necessidade de uma grande planta de operação, não sendo de fácil automação.

- **Reatores de leito empacotado**

Esses reatores são caracterizados por terem um substrato estático, tendo como suporte uma base perfurada por onde a aeração é aplicada. Principais características:

- a umidade do meio é mantida por entrada de ar umidificado;
- melhor controle de processo do que em reatores de bandeja;
- desvantagens como dificuldade de extração do produto final, crescimento não uniforme do microrganismo, dificuldade na remoção do calor e escalonamento, são características dos reatores com meio empacotado.

- **Reatores de tambor rotativo**

As características básicas dos reatores de tambor rotativo são:

- a aeração, se suprida, é feita com baixa pressão e o ar fica no espaço entre a parte superior e o meio de cultivo;
- rotação do cilindro é feita em torno de um eixo central, com o substrato sendo movimentado por meio de chicanas;
- a rotação pode causar aglomeração e também danos ao microrganismo, devido à rotação do tambor.

- **Reatores agitados**

Tem como características gerais:

- a agitação do meio é feita por pás presas a um eixo central;
- podem ser verticais ou horizontais;
- a agitação pode ser contínua ou intermitente;
- a agitação pode causar danos ao microrganismos.

Os biorreatores de bandeja, apesar de serem os mais utilizados em escala industrial (Mitchell *et al.*, 2000; Durand, 2003), são bastante limitados no que se refere à transferência de oxigênio (Schmidell & Faccioli, 2001).

Mais recentemente, desenhos de novos reatores têm sido propostos principalmente para os processos em estado sólido. Todavia, características da FES, como difusão de calor, transferência de massa, entre outras, são documentadas como problemáticas para estes fermentadores (Schmidell & Facciotti, 2001). Analisando tais características na tentativa de desenhar um reator de bandeja para processos em estado sólido, Hongzhang *et al.* (2002) desenvolveram uma configuração (Figura 2) que, por meio de circulação interna de ar, visou acelerar a extração do calor e a transferência de massa no meio, bem como minimizar os efeitos dos gradientes de temperatura, no cultivo de *Bacillus thuringiensis* CM-1, em meio sólido. Foi observado que o pico de temperatura chegou a 32°C, partindo-se de início de processo com 30°C, sendo ainda observada uma variação de apenas 0,5°C, indicando que tal desenho é eficiente para controle de temperatura.

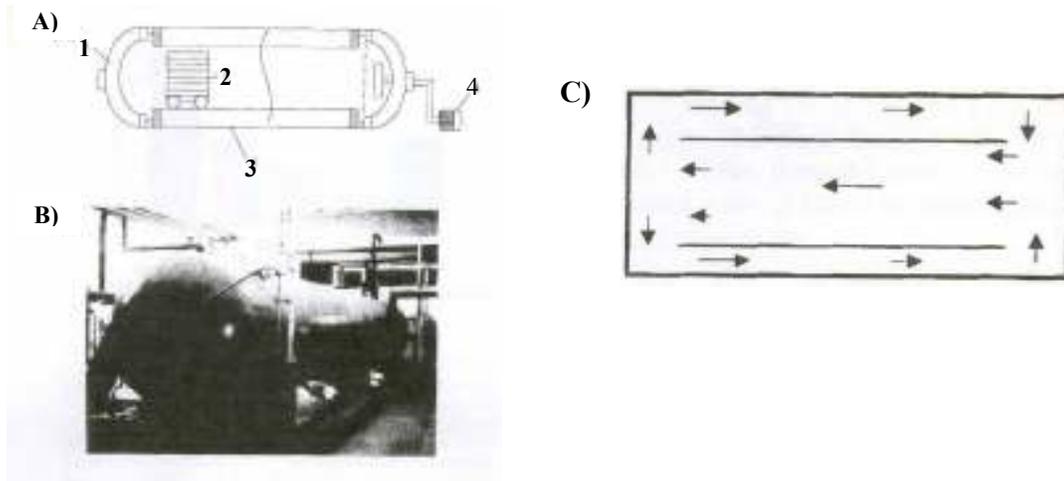


Figura 2. Esquema do reator de nível industrial de 70m³. (A) Diagrama esquemático do reator: 1 – porta, 2 – bandejas, 3 – tanque de fermentação, 4 – sistema de ventilação. (B) Fotografia do reator para processo sólido. (C) Esquema de circulação interna de ar (Hongzhang *et al.* 2002).

Em um desenho semelhante (Figura 3), Fujian *et al.* (2002) estudaram o efeito de injeção de ar e manutenção da pressão interna do reator, para processos em estado sólido, no cultivo de *Penicillium decumbens* JUA10. Os autores verificaram que a pressão interna

adequada para tal processo era de 0,20 MPa, concluindo que medidas acima desta influenciaram negativamente a atividade enzimática, além de romper o micélio. Quanto à circulação interna de ar, a taxa de circulação adequada foi de 4 m/s, garantindo dessa maneira o suprimento de oxigênio e transferência de calor excessivo para fora do meio.

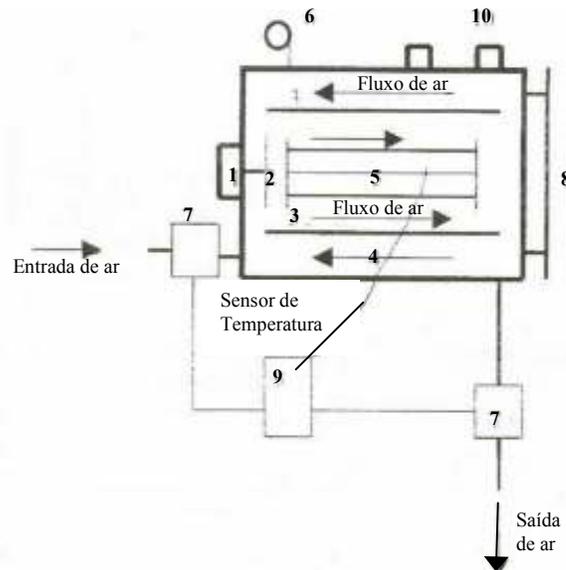


Figura 3. Esquema do reator experimental, segundo Fujian *et al.*, (2002). 1 – motor, 2 – ventilação, 3 - chicana, 4 – tanque de fermentação, 5 – bandejas (contendo sondas de temperatura), 6 – medidor de pressão, 7 – válvulas elétricas, 8 – cabo, 9 – termômetro, 10 – porta de observação (omitida).

Tao *et al.* (1999) avaliaram a amplitude da pressão sobre a produção de celulasas por *Trichoderma viride* SL-1, em FES, em reator de bandeja, verificando uma influencia positiva sobre a produção dessas enzimas. Observaram, ainda, que gradientes de temperaturas menores foram observados com amplitudes de pressão, maiores. Também foi avaliada a espessura de meio, depois de otimizada a variação da pressão, observando-se que para espessuras de meio acima de 6 cm, a atividade de celulasas foi constante.

Em um trabalho semelhante, que avaliou a produção de protease de *Bacillus pumilus* 1.1625, em FES com reator de bandeja, com sistema de pulso (aumento da pressão e descarga instantânea), e analisando a espessura de leito de meio de cultivo, Aijun *et al.*

(2005) concluíram que a remoção do calor gerado e do gás carbônico formado durante o processo foi facilitada pela descarga de ar (pulso). Com relação à espessura de leito, quando avaliado sob variação da pressão, a produtividade enzimática não variou, ao passo que, sem aplicação do sistema de pulso, a atividade de protease caiu de 410 U/mL para 260 U/mL.

Outros fatores, como a composição gasosa no processo, afetam o crescimento microbiano e a formação de produto (Villegas *et al.*, 1993). Em um trabalho que objetivou a verificação da influência da composição da fase gasosa sobre o crescimento microbiano, Villegas *et al.* (1993) observaram que teores de gás carbônico da ordem de 4% e de oxigênio de 21% favoreceram a produção de protease ácida e o crescimento de *A. niger* ANH-15 em FES. Dados semelhantes haviam sido anteriormente observados por Desgrand & Durand (1990), que verificaram que a pressão parcial de CO₂ afeta a produção de pectinases por *A. niger* S5.

O estudo da influência de aeração sobre a produção de celulases de *Penicillium decumbens*, em FES, mostrou que o sistema de aeração favoreceu a produção da enzima. Entretanto, quando elevados fluxos foram avaliados, a atividade de celulase decresceu, provavelmente devido ao ressecamento do meio (Mo *et al.*, 2004).

2.5 Meios de Cultivo e Condições Operacionais para a Produção de Pectinases

Em FES, para produção de pectinases, há a necessidade de ter-se um meio de cultivo com balanceamento adequado de nutrientes (Rombouts & Pilnik 1980), bem como é necessário medir-se e, se possível, controlar parâmetros como temperatura, umidade, pH, entre outros (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

- **Matérias primas e nutrientes em cultivos sólidos**

Para o caso específico de FES, os suportes consistem, basicamente, de polímeros

orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. Os resíduos agrícolas e agroindustriais são muito utilizados neste tipo de processo, incluindo-se neste caso materiais como farelo de trigo, casca de arroz, palha e sabugo de milho, cascas e sementes de frutas, efluentes de fábricas de papel, bagaço de laranja e de cana-de-açúcar, entre outros (Garzón & Hours, 1993; Phutela *et al.*, 2005; Vandenberghe *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2005; Attyia & Ashour, 2002).

Em um estudo comparativo entre FES e o processo submerso para produção de pectinases por *A. niger* utilizando espuma de poliuretano como suporte para o fungo, Díaz-Godínez *et al.* (2001) verificaram maior produção de biomassa em processo sólido, levando a um acréscimo na produção de exo-pectinase, quando da adição de sacarose como fonte de carbono.

Panarotto *et al.* (2003) estudaram a influência de cascas de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *A. niger* em FES e verificaram que altos títulos enzimáticos de endo e exo-PG foram obtidos em 72 h e 48 h, respectivamente, utilizando 80% de cascas secas e moídas de limão Taiti (p/p) no meio de cultivo. Este estudo evidenciou a aplicabilidade desse tipo de indutor na produção de enzimas pectinolíticas, sendo comparado a indutores industrializados.

A utilização de casca de laranja, limão, bergamota e lima como indutores da síntese de enzimas pectinolíticas foi estudada por Dartora *et al.* (2002) em FES, no cultivo de *A. niger*, e comparada com fontes industrializadas. Os indutores industrializados mostraram-se mais adequados para a produção dessas enzimas.

- **Umidade do meio sólido**

Castilho *et al.* (2000) estudaram a influência da umidade na produção de enzimas pectinolíticas em FES, verificando que altos títulos enzimáticos foram obtidos com a

umidade variando entre 40% e 55%, enquanto níveis da ordem de 70% em cultivo de *A. niger*, diminuíram a formação de pectinases. Silva *et al.* (2002), por sua vez, utilizaram 67% de umidade em cultivo de *P. viridicatum* RFC3, em FES.

Em um trabalho desenvolvido por Couri *et al.* (2000), maiores atividades de exopoligalacturonase foram obtidas com 60% de umidade no cultivo de *A. niger* 3T5B8 em FES.

- **Temperatura de incubação do cultivo**

Na avaliação da temperatura de incubação no processo de produção de poligalacturonase e pectina liase, Silva *et al.* (2002) não observaram variação significativa na síntese de PG quando a temperatura de 30°C foi utilizada, em comparação à temperatura de 28°C, ao passo que a produção de pectina liase foi diminuída a 30°C.

Souza *et al.* (2003) obtiveram maiores produtividades de endo-poligalacturonase em FES, no cultivo de *Peacilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. a 30°C.

- **pH do meio de cultivo**

Silva *et al.* (2002) estudaram o efeito do pH na produção de poligalacturonase e pectina liase, verificando que máximas atividades de PG e PL não foram significativamente influenciadas no cultivo de *P. viridicatum* RFC3 em FES.

Avaliando a influência do pH sobre a produção de pectinases, em processo submerso, por *A. oryzae*, Malvessi & Silveira (2004) observaram que maiores atividades de endo-PG foram alcançadas com processo iniciado em pH 4, sendo controlado posteriormente quando naturalmente decresceu para valores próximos a 3.

De Gregório *et al.* (2002) utilizaram pH próximo a 3,7 para produção de poligalacturonase em cultivos de *A. niger* e *T. viride* em processo utilizando polpa de limão na forma de lodo.

- **Transferência de oxigênio e de calor**

A transferência de oxigênio em processos fermentativos que envolvam microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos é muito importante para que o processo seja eficiente e favoreça o rápido consumo do substrato. Essa transferência pode ser feita de várias maneiras, como mistura, no caso de reatores agitados, e aeração superficial, no caso de FES (Schmidell, 2001). No que diz respeito à transferência de calor, sistemas de oscilação de pressão podem ser utilizados (Mo *et al.*, 2004) além de melhorar a transferência de oxigênio (Zhang *et al.*, 2003).

Na Figura 4, pode ser observado um modelo de como ocorre a transferência de massa e calor em biorreatores de bandeja (Mitchell *et al.*, 2000).

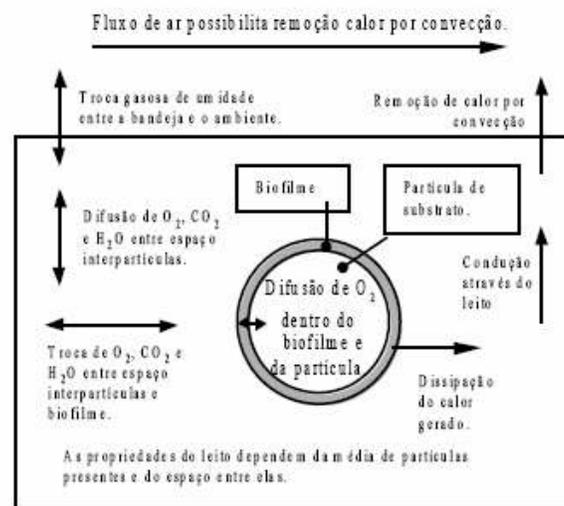


Figura 4. Fenômenos de transferência de massa e calor em biorreatores de bandeja. Figura adaptada de Mitchell *et al.*(2000).

Estudando a influência da aeração sobre a produção de xilanase por *Trichoderma longibrachiatum* em FES, Ridder *et al.* (1999) observaram que um fluxo de aeração de 2,9 L.min⁻¹.kg⁻¹ de farelo de trigo favoreceu a produção da enzima, em comparação com ensaios não aerados e com maior fluxo de ar. Na produção de celulase por *P. decumbens*

JUA 10, Zhang *et al.* (2003) verificaram que sistemas de aeração e oscilação de pressão, acoplados, favoreceram a produção da enzima. Mo *et al.* (2004) estudaram a influência da aeração forçada, amplitude de pressão e oscilação de pressão acoplada à aeração forçada, comparadas à condição estática, sobre a produção de celulase de *P. decumbens* n°1, concluindo que a produção da enzima foi favorecida quando o sistema de oscilação de pressão acoplado à aeração forçada foi utilizado.

2.6 Recuperação de Poligalacturonases Produzidas em Estado Sólido

Em processos biotecnológicos, os passos de recuperação, concentração e purificação do produto são extremamente importantes (Castilho, 1997). Castilho *et al.* (1999) avaliaram a recuperação de poligalacturonase produzida por *A. niger* em FES, utilizando diferentes sistemas (leito fixo, sistema agitado, múltiplos estágios), e concluíram que sob agitação a recuperação foi favorecida quando comparada ao sistema de leito fixo. Além disso, os mesmos autores verificaram que aplicando sistema de múltiplos estágios foi possível recuperar cerca de 84% da atividade de poligalacturonase já no primeiro estágio e praticamente 100% da atividade após cinco estágios.

Trabalho semelhante foi realizado por Singh *et al.* (1999), no qual foram otimizados os seguintes parâmetros: tempo de extração (15 min), razão massa fermentada/solvente (1:10) e temperatura de extração (28-30°C) para recuperação de pectinase produzida por *A. carbonarius* em meio sólido.

2.7 Influência da Temperatura e do pH sobre a Atividade de Poligalacturonases

Na avaliação de poligalacturonase produzida em cultivo de *Sporotrichum thermophile* APINIS, Kaur *et al.* (2004) verificaram que a enzima é completamente ativa em uma larga faixa de pH (3,0 a 9,0) e temperatura (30 a 80°C), com valores ótimos de 7,0 e 55°C,

respectivamente, exibindo um tempo de meia-vida de 4 h a 65°C. Os autores determinaram ainda valores de k_m de 0,416 mg.mL⁻¹ e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,520 $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ de proteína.min⁻¹.

Na avaliação da influência do pH e da temperatura sobre a ação de endo e exo-PG produzida por *A. oryzae* em processo submerso, Malvessi & Silveira (2004) verificaram que maiores atividades de endo-PG foram obtidas em pH em torno de 4,7 e temperatura entre 35 e 40°C, ao passo que para exo-PG a temperatura ótima de atividade variou numa faixa entre 55 e 60°C e pH 4,5.

Outro ponto importante é a possível desnaturação térmica durante a produção das enzimas em FES. Segundo Santos *et al.* (2004), durante o processo de produção de protease por *Penicillium fellutanum*, em reator de leito fixo, com fluxos de aeração de 5, 15 e 25 L.min⁻¹, temperaturas da ordem de 52, 45 e 36°C foram obtidos, respectivamente, sendo observada desnaturação térmica de 2 a 3 vezes quando fluxo de aeração de 15 L.min⁻¹ foi utilizado, em comparação à condição de aeração 25 L.min⁻¹, constatando-se ainda cerca de 85% de desnaturação para fluxo de aeração de 5 L.min⁻¹.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo Produtor de Pectinases

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* t0005/007-2 foi utilizado em todos os ensaios. Esta linhagem isolada do solo na região de Salta, Argentina, foi cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, tendo sido anteriormente utilizada por Linde (2000), no estudo da produção de pectinases em fermentação em estado sólido em biorreator de coluna, e por Dartora *et al.* (2002) e Fontana *et al.* (2005) no estudo de produção de pectinases em reator de bandeja. A cultura foi mantida a 4°C em meio glicerinado (Maiorano, 1982).

3.2 Meios de Cultivo

Para conservação e propagação do microrganismo, foi utilizado o meio de cultura descrito por Maiorano (1982), com a seguinte composição em g.L⁻¹: glicose, 25,0; glicerina, 25,0; extrato de levedura, 5,0; agar-agar, 20,0. Após a dissolução dos componentes, o pH do meio foi corrigido para 6,5, sendo então autoclavado a 1 atm por 20 min e distribuído em placas de Petri previamente esterilizadas em estufa a 170°C por 3 h.

Para produção das enzimas, farelo de trigo foi utilizado como suporte e fonte de carbono e nutrientes do meio sólido empregado em todos os ensaios fermentativos. A formulação do meio de cultivo para produção de poligalacturonases foi a seguinte, em % (m/m): farelo de trigo, 35,6; pectina cítrica (Farmaquímica), 3,0; glicose, 9,4; solução de sais nutrientes, 29,6. Essa solução de sais nutriente teve a seguinte composição, em g.L⁻¹: (NH₄)₂SO₄, 4,0; KH₂PO₄, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 0,5; FeSO₄.7H₂O, 6,3.10⁻⁵; MnSO₄, 1,0.10⁻⁶; ZnSO₄, 6,2.10⁻⁵. O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 min. Posteriormente à esterilização, água e suspensão de esporos foram adicionadas para completar uma massa de

100g. Após o preparo, o teor inicial de umidade do meio de cultivo foi de aproximadamente 60%. O pH do meio de cultivo não foi corrigido, sendo que os valores iniciavam no cultivo variavam entre 4,8 e 5,2.

3.3 Condições Experimentais dos Cultivos

No preparo do inóculo dos diferentes ensaios, a propagação da cultura foi feita em placas de Petri contendo meio glicerinado, à temperatura de 30°C (Maiorano, 1982). A concentração de esporos para inóculo dos ensaios foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Linde, 2000), sendo adicionado ao reator um volume de inóculo correspondente a 1×10^7 esporos por grama de meio úmido.

Todos os experimentos foram realizados em reator de dupla superfície (RDS) construído pela equipe do Laboratório de Bioprocessos do IB/UCS. Esta configuração foi desenhada com o intuito de representar uma amostra dos reatores de bandeja empregados industrialmente em fermentações em estado sólido.

O reator consiste de um tubo de PVC com diâmetro de 100 mm e 300 mm de altura, com perfurações laterais para tomada de temperatura do meio de cultivo durante o processo e ainda, olivas adaptadas nas extremidades para permitir a realização de aeração superficial forçada. Dentro do reator, uma tela em *nylon* servia como suporte para o meio de cultivo permitindo contato com o meio externo também pela base. As extremidades do sistema foram cobertas com mantas de gaze e algodão hidrófobo de modo a impedir a entrada de microrganismos contaminantes, mas permitir a troca gasosa – Reator de Dupla Superfície (RDS). Em ensaios sob aeração superficial ou pulso pressão, as extremidades do reator foram seladas com tampas de PVC. Alternativamente, foram realizados testes em que um cilindro de tela de aço inoxidável (duto central), com 10 mm de diâmetro e 170

mm de altura, foi adaptado no centro do meio, como forma de propiciar melhor transferência de massa e calor.

Todos os ensaios foram conduzidos em estufa saturada em umidade, à temperatura inicial de 30°C, por até 96 h. Um esquema básico do reator é apresentado na Figura 5.

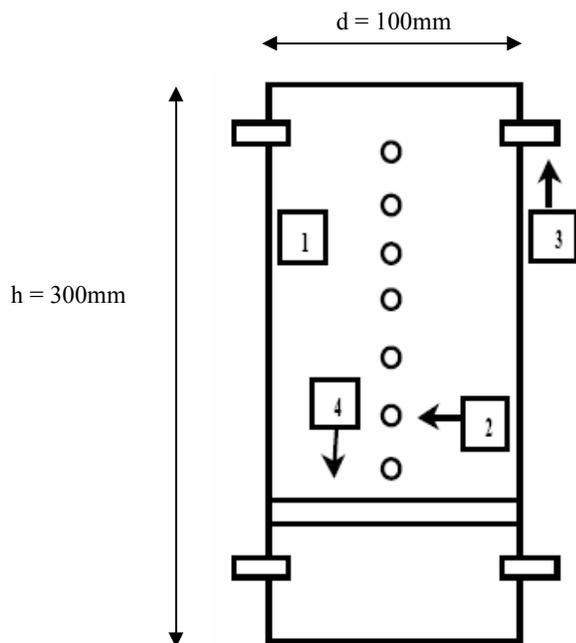


Figura 5. Esquema básico dos reatores utilizados em todos os ensaios, para produção de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger*. 1 - tubo em PVC, 2 - perfuração para tomada de temperatura, 3 - oliva utilizada para aeração superficial forçada e 4 - tela em náilon para suporte do meio.

Com esta configuração foram realizados ensaios que avaliaram a influência da espessura de leito sobre a produção de poligalacturonases.

Com o objetivo de melhorar a transferência de massa e calor, variações do biorreator de dupla superfície (RDS) foram avaliadas, incluindo: sistema de aeração superficial forçada, sistema de pulso de pressão acoplado à aeração e sistema de duto central adaptado ao leito de meio de cultivo.

Quando o sistema de aeração superficial forçada foi utilizado, este foi alimentado por uma rede de ar comprimido, sendo conectado a um manômetro para controle da pressão. O

ar foi direcionado através de um aquecedor, para colunas de umidificação recheadas com anéis plásticos, sendo, então, introduzido no reator, pré aquecido e saturado em umidade.

A configuração do biorreator utilizado neste grupo de ensaios é representada a seguir e as setas indicam o sentido do fluxo de ar (Figura 6).

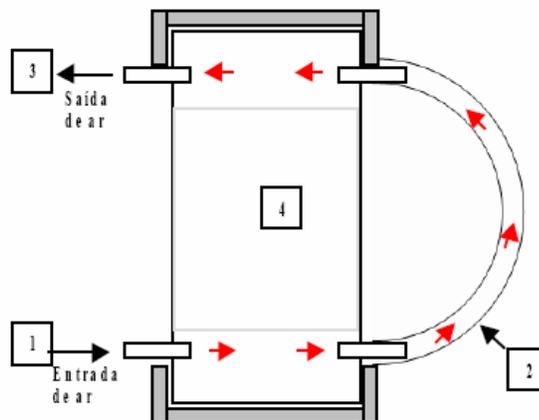


Figura 6. Esquema da variação do biorreator utilizado no experimento em que foi empregado o sistema de aeração superficial forçada. 1 - entrada de ar; 2 - mangueira de circulação do fluxo; 3 - saída de ar e 4 - leito de meio de cultivo.

Outra alternativa de biorreator de bandeja de dupla superfície, visando melhorar a transferência de massa e calor, foi o sistema de pulso de pressão acoplado à aeração apresentado na Figura 7.

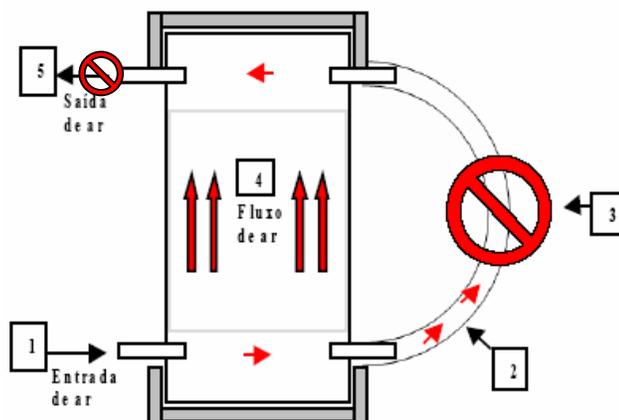


Figura 7. Esquema do sistema adaptado para o experimento em que foi utilizado o pulso de pressão, acoplado à aeração, com fluxo de $1,4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{mu}$. 1 - entrada de ar, 2 - mangueira circulação do fluxo, 3 - obstrução do fluxo, 4 - fluxo através do leito e 5 - saída de ar do reator.

Primeiramente foi aplicado o sistema de aeração descrito no item 4.5 e, após cada ponto de leitura de respiração microbiana, foi obstruído o tubo de circulação de ar, que conduzia o ar que entrava no reator, da parte inferior à parte superior, o que, por alguns instantes, direcionava o fluxo de ar através do leito de meio.

A partir desse instante, foi obstruída a saída de ar do reator de modo que a pressão total interna aumentasse até um limite de 0,5 atm, controlada por um manômetro de mercúrio. Quando a pressão desejada era atingida, a saída de ar do reator foi aberta, ocorrendo a descompressão instantânea do sistema, possibilitando que o leito sofresse uma expansão (pulso), permitindo dessa forma que o ar atravessasse o reator favorecesse a transferência de oxigênio e de calor gerado pelo metabolismo microbiano. Após cada ponto de leitura de pO_2 , para determinação da demanda de oxigênio pelo fungo (item 3.7), era aplicado o pulso de pressão no sistema. Sistemas semelhantes ao utilizado neste trabalho já foram anteriormente descritos na literatura (Tao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001; Hongzhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2004; Aijun *et al.*, 2005).

A Figura 8 ilustra o esquema do biorreator de bandeja de dupla superfície com duto central. O sistema consistiu de um duto feito com tela de aço inoxidável que permitia a passagem de ar do ambiente para as regiões próximas à tela.

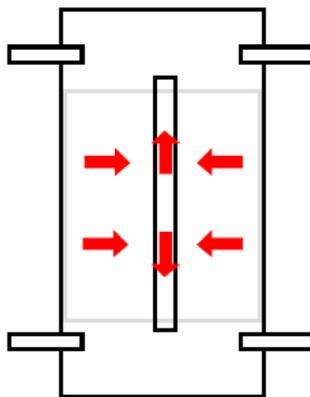


Figura 8. Esquema do sistema de duto central, empregado no experimento com espessura de 17 cm, na tentativa de remoção de calor e melhor transferência de massa.

3.4 Obtenção do Extrato Aquoso para Análise de Compostos Solúveis

Inicialmente, foram pesados 2,7 g de amostra, sendo adicionados 15 mL de água pH 4,0 em frascos Erlenmeyer de 125 mL, e submetidos à agitação recíproca de 200 rpm, por 30 min, a 30°C, em agitador de bancada Certomat[®]U (B. Braun Biotech, RFA), para que enzimas e carboidratos solúveis fossem extraídos. Em seguida, o extrato foi centrifugado a temperatura ambiente próxima a 0°C, a 6000 rpm, por 20 min (Centrífuga Sigma modelo 4K15, RFA).

Neste trabalho, a recuperação de exo-poligalacturonase obtida em cultivo sólido foi avaliada com diferentes volumes de solvente (água pH 4,0) e tempo de extração. Detalhes destes testes são mostrados no Capítulo 4 deste trabalho.

3.5 Avaliação do Efeito da Temperatura sobre a Atividade Enzimática

As atividades de endo e exo-PG foram avaliadas em temperaturas de reação entre 20 e 70°C. A estabilidade das enzimas frente à temperatura, com variação entre 25 a 70°C, por até 2 h, foi também estudada.

3.6 Métodos Analíticos

Todas as análises foram realizadas em duplicata para todos os parâmetros avaliados de acordo com os métodos descritos a seguir. Amostras foram coletadas a cada 24 horas e então, eram homogeneizadas para posterior tratamento.

3.6.1 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

Para determinação de açúcares redutores totais (ART), o método descrito por Malvessi (2000) e adaptado por Fontana (2004) foi utilizado:

- a 1 g de massa úmida foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico 1,5 M;
- a amostra foi colocada em banho em ebulição por 30 min, seguido de banho de gelo;
- a preparação foi neutralizada com hidróxido de sódio 4 N, tratada com agentes desproteinizantes (sulfato de cobre, 300 g/L e ferrocianeto de potássio, 150 g/L) e filtrada;
- o sobrenadante foi diluído, levando-se em consideração o tempo de processo, e analisado pelo método do ácido 2,3-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), com as leituras de absorvância feitas em espectrofotômetro Aurora UV 210 (EUA), a 545 nm;
- as concentrações de ART foram calculadas utilizando-se uma curva padrão com concentrações de glicose entre 0,2 e 2,0 g/L.

3.6.2 Determinação de atividade de exo-poligalacturonase

A atividade de exo-poligalacturonase (exo-PG) foi medida de acordo com Couri *et al.* (2000), em que substâncias redutoras liberadas pela ação enzimática são quantificadas pelo método de Somogy (1952). O procedimento foi o seguinte:

- a 0,8 mL de solução de ácido poligalacturônico (Sigma) 0,25% (m/v), em tampão acetato 0,1 M, pH 4,0, foram adicionados 20 µL do extrato aquoso;
- a mistura de reação foi incubada em banho a 35°C por 30 minutos;
- desta mistura, foi coletado 0,3 mL e misturado com 0,7 mL de água destilada, sendo posteriormente adicionado 1 mL da mistura 4:1 das soluções A e B de Somogy, respectivamente;
- a amostra foi submetida a banho em ebulição por 20 min, seguido de banho de gelo;
- foram adicionados 2 mL da solução C de Somogy, e a mistura foi agitada até completo despreendimento de gases, sendo completado até o volume de 25 mL com água destilada;

- as amostras tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de substâncias redutoras foi estimada a partir de curva de calibração construída com ácido D-galacturônico (Sigma) em concentrações entre 50 a 400 mg/L.

Uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que gera 1 μmol de ácido D-galacturônico por minuto nas condições de análise, sendo a atividade de exo-PG calculada pela seguinte equação:

$$P_{\text{Exo}} = \frac{C_{\text{AG}} \cdot V_t \cdot \text{dil}}{\text{PM} \cdot V_e \cdot t} \cdot \text{fc} \quad (1)$$

onde:

P_{exo} – atividade enzimática de exo-PG (U/gms);

C_{AG} – concentração de ácido D-galacturônico determinada pela curva padrão (mg/L);

V_t – volume total na reação enzimática (0,82 mL);

PM – massa molecular do ácido D-galacturônico (194 mg/mmol);

V_e – volume de preparação enzimática diluída, utilizado (0,020 mL);

t – tempo de reação (30 min);

dil – diluição aplicada à preparação enzimática;

fc – fator de correção na extração (mL/gms).

3.6.3 Determinação da atividade de endo-poligalacturonase

Para a determinação da atividade de endo-poligalacturonase, foi adotado o seguinte procedimento (Maiorano, 1990):

- do extrato aquoso convenientemente diluído, foram retirados 3,2 mL sendo a estes adicionados 14,8 mL de solução de pectina (Farmaquímica) 0,63% (m/v) em tampão acetato 0,05 M, pH 4,0, a 30°C;
- a mistura de reação foi colocada em banho a 30°C por 30 min;

- posteriormente, foi realizada a medida da viscosidade, a 60 rpm, em viscosímetro Brokfield modelo DV-II⁺ (EUA);
- para cada amostra, foi feito um controle contendo extrato enzimático inativado em banho em ebulição por 30 min, sendo este submetido ao mesmo tratamento;
- uma curva padrão foi construída avaliando-se diluições do extrato entre 2 e 100 vezes.

Com os valores da viscosidade das amostras, foi efetuado então o cálculo da redução de viscosidade conforme a equação a seguir:

$$A = \frac{\mu_{a,i} - \mu_a}{\mu_{a,i}} \cdot 100 \quad (2)$$

onde:

A – redução da viscosidade (%);

$\mu_{a,i}$ – viscosidade da amostra inativada (cp);

μ_a – viscosidade da amostra (cp).

Em seguida, foi construída uma curva correlacionando os valores de A com o logaritmo decimal do inverso das diferentes diluições. Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que reduz em 50% a viscosidade da solução de pectina, nas condições de análise, sendo o número de unidades enzimáticas presentes em cada diluição calculadas de forma proporcional.

Com estes dados, foi feita uma nova curva, correlacionando valores de A com o logaritmo decimal do número de unidades presentes em 3,2 mL de extrato aquoso com diferentes diluições. Para o trecho linear desta curva, foram calculados os coeficientes angular e linear da equação da reta e as atividades de endo-PG em amostras diluídas foram determinadas pela expressão:

$$P_{\text{endo}} = \frac{10^{(A-a/b)} \cdot \text{dil}}{v} \cdot \text{fd} \quad (3)$$

onde:

P_{endo} – atividade enzimática de endo-PG (U/gms);

A – redução de viscosidade (%);

a e b – coeficientes da curva de calibração;

v – volume da preparação enzimática utilizada na análise (3,2 mL);

fc – fator de correção na extração (mL/gms);

dil – diluição da preparação enzimática após a extração.

3.6.4 Determinação da umidade de meios de cultivo

Para este procedimento, 1 g de amostra de meio homogeneizado e macerado em gral foi submetido à secagem em estufa a 105°C até atingir peso constante, sendo então calculada a porcentagem de umidade presente na amostra (AOAC, 1998).

3.6.5 Determinação do pH

Foram adicionados 10 mL de água deionizada à amostra seca, obtida conforme descrito no item anterior (3.6.4), e, após 10 min sob agitação magnética, foi realizada a medida do pH.

3.7 Determinação da Demanda de Oxigênio pelo Cultivo (OUR)

A medida da demanda de oxigênio pelo cultivo (*oxygen uptake rate*, OUR) foi feita em um sistema fechado, ilustrado na Figura 9, em que, com um eletrodo polarográfico acoplado a um oxímetro Digimed modelo DM4 (Brasil), foi possível determinar-se a variação com o tempo da pressão parcial de O₂ na fase gasosa dos reatores.

Com dados obtidos para as pressões parciais, foi calculada então a velocidade de consumo de oxigênio pelo fungo, por meio da seguinte equação:

$$\frac{dO_{2c}}{dt} = \frac{(p_{O_2, i} - p_{O_2, t}) \cdot V_g}{R \cdot T \cdot t} \cdot 1000 \quad (4)$$

onde:

dO_{2c}/dt – velocidade de consumo de O_2 (mmol/h);

$p_{O_2, i}$ – pressão parcial de O_2 inicial (atm);

$p_{O_2, t}$ – pressão parcial de O_2 no tempo t (atm);

V_g – volume da fase gasosa do sistema (L);

R – constante dos gases (0,082 atm.L/mol.K);

T – temperatura absoluta (K);

t – tempo da medida (h).

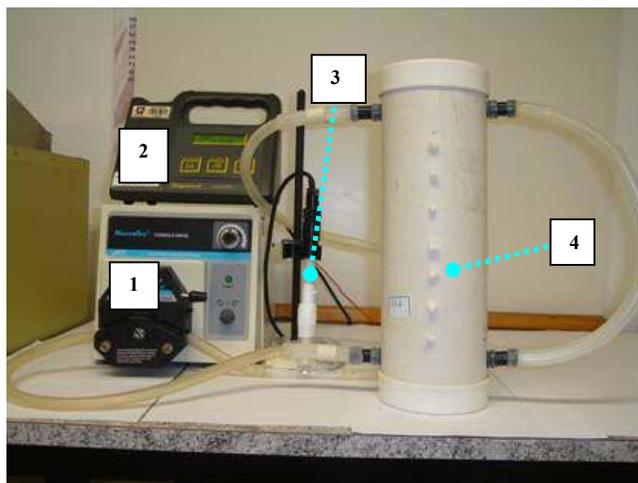


Figura 9. Sistema utilizado para a determinação da variação de pressão parcial de oxigênio em cultivos sólidos de *Aspergillus niger*. 1 - bomba peristáltica; 2 - oxímetro; 3 - eletrodo para a medida de oxigênio; 4 - amostra.

Em seguida, calculou-se a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR) por meio da equação:

$$OUR = \frac{dO_{2c}/dt}{M} \quad (5)$$

onde:

OUR – demanda de O_2 pelo cultivo (mmol O_2 /gms.h);

dO_{2c}/dt – velocidade de consumo de O_2 (mmol/h);

M – massa de meio seco no reator (gms).

3.8 Estimativa Indireta da Concentração Celular

A estimativa das concentrações celulares foi feita indiretamente a partir de dados obtidos por balanço de oxigênio, de acordo com o método proposto originalmente por Zabriskie & Humprey (1978) e adaptado para cultivos sólidos por Maiorano (1990). Esse método se baseia na correlação da concentração fúngica no meio sólido com a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR).

Conforme Nagai (1979), OUR se relaciona com a velocidade instantânea de crescimento através da seguinte equação:

$$\text{OUR} = \frac{1}{Y_{GO}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_o \cdot X \quad (6)$$

onde:

Y_{GO} – Fator de conversão de oxigênio em células (mmol/g);

m_o – coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (mmol/g.h);

dX/dt – velocidade instantânea de crescimento (g/gms.h).

A integração da Equação 6 pelo método dos trapézios resulta em:

$$X_n = \frac{Y_{GO} \cdot (\Delta t/2) \cdot (\text{OUR}_n + \text{OUR}_{n-1}) + (1 - m_o \cdot Y_{X/O} \cdot \Delta t/2) \cdot X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{GO} \cdot \Delta t/2} \quad (7)$$

onde:

X_n – concentração celular ao final do intervalo de tempo considerado (g/gms);

X_{n-1} – concentração celular ao início do intervalo de tempo considerado (g/gms);

Δt – intervalo de tempo entre duas determinações (h);

OUR_n – demanda de O_2 ao final do intervalo de tempo considerado (mmol/gms.h);

OUR_{n-1} – demanda de O_2 ao início do intervalo de tempo considerado (mmol/gms.h).

Para que a estimativa da concentração celular fosse feita, cada ponto de análise foi utilizado, sendo que para o primeiro valor da concentração celular foi considerada a

concentração da própria suspensão de esporos usada como inóculo. Na realização dos cálculos, foram utilizados os valores das constantes Y_{GO} (0,0142 g biomassa/mmol O_2) e m_O (2,75 mmol O_2 /g biomassa.h) determinados por Fontana (2004) para a mesma linhagem fúngica utilizada no presente trabalho.

3.9 Cálculo da Máxima Velocidade Específica de Crescimento, dos Fatores de Conversão e da Produtividade do Processo

As máximas velocidades específica de crescimento ($\mu_{X,max}$) foram calculadas graficamente a partir de curvas correlacionando o logaritmo natural da concentração celular (X) com o tempo (t), em que o trecho linear de máxima inclinação corresponde à fase exponencial de crescimento e o coeficiente angular desta reta ao próprio valor de $\mu_{X,max}$.

Os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e em produto ($Y_{enzima/S}$) foram calculados levando-se em consideração os valores iniciais e finais de células e produto sobre o valor de substrato consumido, como mostram as fórmulas a seguir.

- **Fator de conversão de substrato em células**

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (8)$$

onde:

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato consumido em células (mg/g);

X_f – máxima concentração celular alcançada (mg/gms);

X_0 – concentração celular inicial (suspensão de esporos) (mg/gms);

S_0 – concentração de açúcares redutores totais, inicial (g/gms);

S_f – concentração de açúcares redutores totais no tempo de máxima concentração celular alcançada.

- **Fator de conversão de substrato em atividade enzimática de poligalacturonases (endo e exo-PG)**

$$Y_{\text{Enzima/S}} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (9)$$

onde:

$Y_{\text{enzima/S}}$ – fator de conversão de substrato consumido em atividade enzimática de poligalacturonases (endo e exo-PG) (U/g);

P_f – máxima atividade enzimática alcançada (U/gms);

P_0 – atividade enzimática no tempo 0 (zero) do processo (U/gms);

S_0 – concentração de açúcares redutores totais, inicial (g/gms)

S_f – concentração de açúcares redutores totais no tempo de máxima atividade enzimática alcançada.

A produtividade do processo foi calculada com as máximas atividades enzimáticas alcançadas sobre o tempo de processo, no qual as máximas atividades foram obtidas, representadas na equação a seguir.

$$p_E = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (10)$$

onde:

p_E – produtividade em enzimas (endo e exo-PG) (U/gms.h);

P_f – máxima atividade enzimática alcançada (U/gms);

P_0 – atividade enzimática no tempo 0 do processo (U/gms);

t – tempo em que a máxima atividade enzimática foi alcançada (h).

3.10 Análise Estatística de Resultados

Os ensaios mostrados neste trabalho foram realizados em duplicata. Todos os gráficos foram construídos utilizando-se o programa PRISM GRAPH Versão 3.0 para Windows. Com o mesmo programa, foram realizadas análises estatísticas dos resultados pela análise da variância das médias (*one-way* ANOVA) e pelo teste de Tukey no nível de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os principais resultados obtidos neste trabalho. Primeiramente, é mostrada uma avaliação das condições básicas de recuperação de exopoligalacturonase produzida em estado sólido. Em seguida, é feita uma descrição de um cultivo padrão de *Aspergillus niger* em meio sólido. Posteriormente são discutidos os experimentos em que foram avaliados alguns parâmetros fundamentais que influenciam os processos em estado sólido, como espessura de leito, sistemas de aeração e variações de sistemas de aeração visando à melhoria da transferência de massa e condução de calor. Finalmente, é apresentada uma análise da influência da temperatura sobre a atividade e a estabilidade das enzimas produzidas.

4.1 Avaliação de Parâmetros de Recuperação de Enzimas Produzidas em Processo em Estado Sólido

Foram realizados ensaios nos quais avaliaram-se parâmetros como a razão solvente/massa de meio sólido e tempo, na extração de exopoligalacturonase (exo-PG) produzida por *A. niger* à temperatura de 30°C. Nestes ensaios, exo-PG é usada como parâmetro de avaliação, admitindo-se que as melhores condições encontradas também seriam adequadas para endo-PG.

As condições básicas de extração foram descritas no Capítulo 3. No caso dos experimentos descritos neste item, ao final de cada extração, todos os caldos foram diluídos ao mesmo volume final (100 mL) uma vez que se observou em testes preliminares (dados não apresentados) que a atividade de exo-PG não é proporcional à sua concentração.

A Figura 10 apresenta a atividade de exo-PG em função da razão solvente/massa de meio sólido seco.

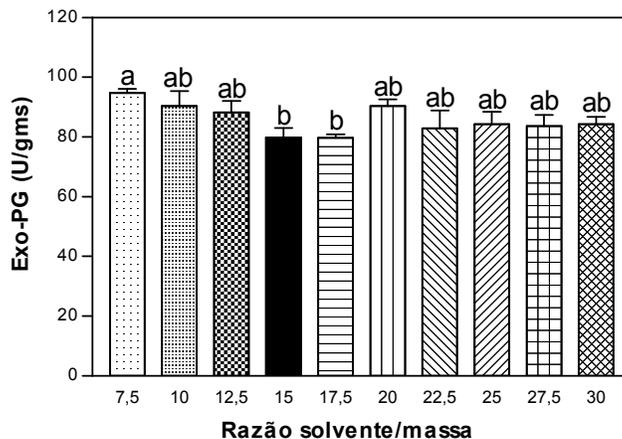


Figura 10. Atividade de exo-PG produzida por *Aspergillus niger* em meio sólido determinada após extração com diferentes razões entre solvente (água pH 4)/massa seca de meio, a 30°C, por 30 minutos. Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais ao nível de 5% de confiança, segundo o teste de Tukey.

Observa-se na Figura 10 que a razão solvente/massa de meio, no intervalo testado, não influenciou a extração de exo-PG, exceto para as condições de razão 15 e 17,5, possibilitando então que menor quantidade de solvente fosse utilizada. Deste modo, na seqüência deste trabalho, foi utilizada a menor razão solvente/massa, pois essa condição é estatisticamente igual às demais condições avaliadas. Singh *et al.* (1999) avaliaram a influência da razão solvente/massa na recuperação de pectinase de *A. carbonarius*, variando essa razão entre 5 e 15, concluindo que a melhor condição de extração foi a razão 10.

Outro parâmetro importante na extração de enzimas é o tempo de contato entre massa e solvente. Foram avaliadas tempos de extração variando entre 15 e 45 min, a 30°C. A Figura 11 ilustra a influência do tempo na extração de exo-PG com razão solvente/massa de sólido de 15.

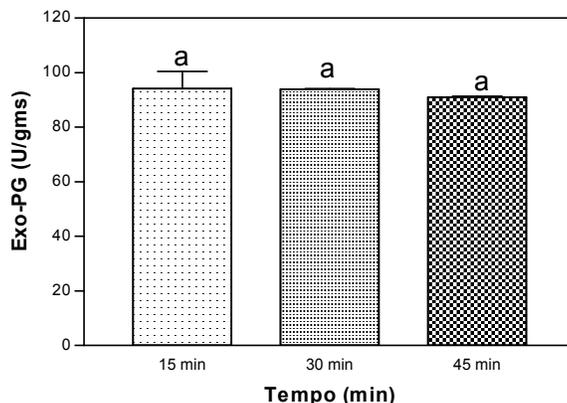


Figura 11. Atividade de exo-PG produzida por *Aspergillus niger* em meio sólido determinada após extração por 15, 30 e 45 minutos, a 30°C, com razão entre solvente (água pH 4)/massa seca de meio de 7,5. Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais ao nível de 5% de confiança, segundo o teste de Tukey.

Conforme apresentado na Figura 11, o tempo de contato massa/solvente, no intervalo testado, para extração de exo-PG produzida por *A. niger*, é estatisticamente igual para as diferentes condições avaliadas, indicando que 15 min são suficientes para recuperação da atividade enzimática. Esses resultados são mais interessantes que os obtidos por Castilho *et al.* (1999) que verificaram que 30 min de tempo de contato entre massa e solvente, a 25°C, foi a melhor condição para extração de poligalacturonase produzida por *A. niger* em meio sólido. Segundo Singh *et al.* (1999), após 15 min de contato entre massa e solvente, sob temperatura de 30°C, para recuperação de pectinase produzida por *A. carbonarius*, a atividade enzimática recuperada permaneceu constante.

Para Castilho *et al.* (2000), que avaliaram três condições de tempo de contato massa/solvente, 10, 30 e 50 min, a 35°C, para recuperação de pectinases produzidas por *A. niger*, a melhor condição foi 30 min, sendo sugerido que 10 min não foram suficientes para recuperação das enzimas e que com maior tempo de contato (50 min) pode ter havido inativado das enzimas.

4.2 Descrição de um Cultivo Padrão de *Aspergillus niger* em Meio Sólido

Neste item são descritos os resultados e as características gerais de um cultivo padrão de *A. niger* em fermentação em estado sólido (FES). Este experimento foi realizado em reator de dupla superfície (RDS) com espessura de leito de meio de cultivo igual a 17 cm.

Em FES, vários fatores afetam os resultados do processo em reatores de bandeja. Dentre estes fatores, um dos mais importantes é a espessura de leito. Fontana (2004) avaliou espessuras de leito de meio de cultivo, em ensaios realizados em frascos Becher de 800 mL, que possibilitavam apenas aeração superficial superior do meio de cultivo, obtendo melhores resultados com espessura de leito de 4 cm, para produção de endo e exo-PG por *A. niger*. Neste trabalho, o reator construído era aberto nas duas extremidades (reator de dupla superfície), permitindo aeração superficial inferior e superior, possibilitando então, a utilização de maior espessura de leito. Na Figura 12 são apresentadas as variações de crescimento celular e consumo açúcares redutores totais (ART) de substrato pelo fungo, em meio de cultivo com 17 cm de espessura de leito.

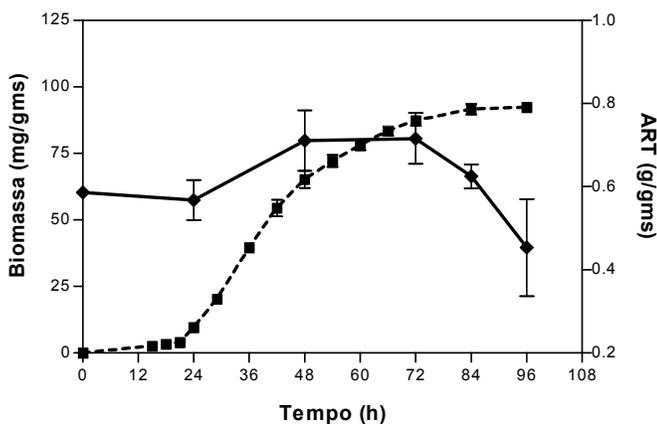


Figura 12. Variação da concentração de biomassa de *Aspergillus niger* e do ART com o tempo, em cultivo em meio sólido com espessura de meio de 17 cm. (■) Biomassa, (◆) ART.

Como mostra a Figura 12, após uma fase *lag* entre 18 e 20 h, o crescimento celular assumiu um perfil exponencial até cerca de 36 h, momento em que a máxima temperatura

do processo foi constatada (50°C em 36 h; Figura 13), sendo então constatada uma redução da velocidade de crescimento, fortemente pronunciada após 48 h de processo. Em torno de 84 h, o crescimento atingiu a fase estacionária, com concentração celular entre 90 e 95 miligramas de biomassa por grama de meio seco (mg/gms). Fontana (2004), avaliou a influência da espessura de leito sobre o cultivo de *A. niger*, observando valores de concentrações de biomassa próximos a 115 mg/gms, em cultivo em frascos de Becher, com 8 cm de espessura de meio.

Na Figura 12 o consumo de substrato pelo fungo é apresentado, podendo ser observado, ao final do processo, valor residual de aproximadamente 0,4-0,45 g/gms, que pode estar relacionado à carência de algum nutriente essencial ou à presença de substâncias redutoras não metabolizáveis pelo fungo.

Neste ensaio, os valores de fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e da máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{X,max}$) foram de 0,661 g/g e 0,40 h⁻¹, respectivamente.

Na Figura 13 os perfis do pH e da temperatura do meio (no centro do leito) de cultivo ao longo do processo são apresentados.

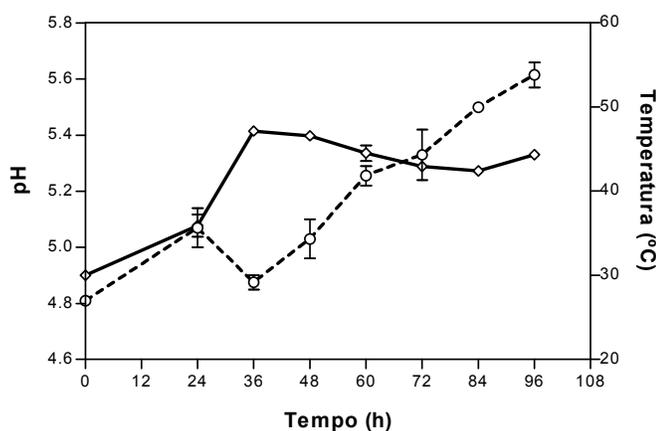


Figura 13. Variação do pH e da temperatura do meio sólido, com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger* na condição padrão de 17 cm de espessura. (○) pH; (◇) temperatura.

Após aumentar nas primeiras 24 h de cultivo, o pH teve seu valor mínimo em 36 h, devido à intensa atividade metabólica microbiana neste momento do processo, coincidindo com o pico de temperatura do meio de cultivo ($\cong 50^{\circ}\text{C}$), sendo posteriormente observado aumento até cerca de 5,6 ao final do cultivo.

Na Figura 14, são mostrados os perfis de produção de endo e exo-PG e o crescimento celular, durante o processo.

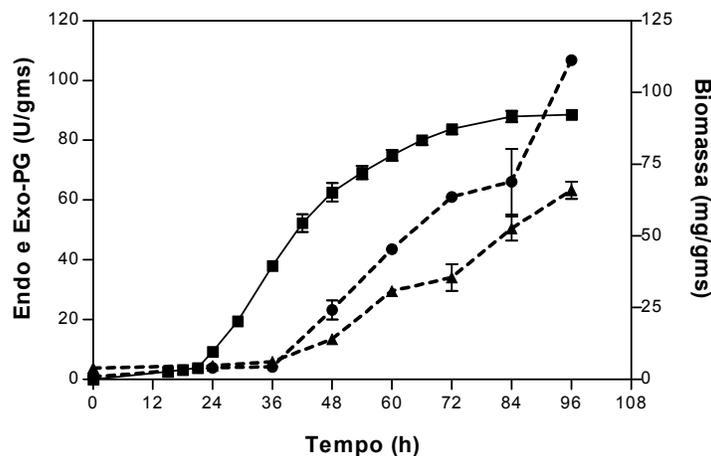


Figura 14. Variação da atividade de endo e exo-PG e da concentração de biomassa fúngica com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido, na condição padrão 17 cm de espessura. (▲) Endo-PG; (●) exo-PG; (■) concentração celular.

Pode-se verificar na Figura 14 que a produção das enzimas endo e exo-PG se dá de forma parcialmente associada ao crescimento microbiano, com aumento na produção após 36 h de processo. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Fontana (2004) que verificou que a produção de endo e exo-PG é predominantemente associada ao crescimento celular em cultivo de *A. niger* em meio sólido.

As máximas atividades de endo e exo-PG alcançadas foram de 63 e 107 unidades por grama de meio seco (U/gms), respectivamente. Os fatores de rendimento em enzimas (Y_{endo} e $e_{\text{exo-PG/S}}$) foram calculadas em 450 e 764 unidades por grama de substrato consumido (U/g) para endo e exo-PG, respectivamente, e as produtividades (P_{endo} e $e_{\text{exo-PG}}$) do processo

foram de aproximadamente $0,66 \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para endo-PG, e $1,11 \text{ U.gms}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para exo-PG.

Na Figura 15, é apresentado o perfil da umidade do meio de cultivo durante o processo, em que se pode verificar que este parâmetro, durante todo o cultivo, permaneceu em torno de 60%, nível considerado como adequado para fungos (Castilho *et al.*, 2000; Couri *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002).

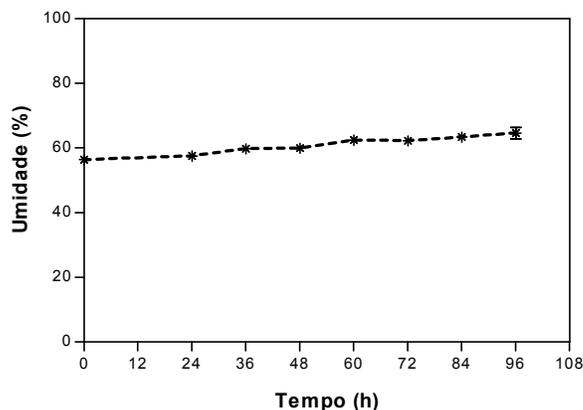


Figura 15. Variação da umidade do meio com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido, na condição padrão de 17 cm de espessura.

Na Tabela 1 são resumidos os resultados encontrados neste ensaio padrão.

Tabela 1. Resultados gerais obtidos em cultivo de *Aspergillus niger* em estado sólido, com espessura de leito de meio de 17 cm (condição padrão).

| | |
|--|-------|
| $X_{\text{máx}}$ (mg/gms) | 95,0 |
| $Y_{X/S}$ (g/g) | 0,661 |
| $\mu_{X,\text{máx}}$ (h^{-1}) | 0,4 |
| $\text{ART}_{\text{cons.}}$ (g/gms) | 0,14 |
| endo-PG (U/gms) | 63 |
| $Y_{\text{endo-PG/S}}$ (U/g) | 450 |
| $P_{\text{endo-PG}}$ (U/gms.h) | 0,66 |
| $\text{pH}_{\text{endo-PG máx}}$ | 5,6 |
| exo-PG (U/gms) | 107 |
| $Y_{\text{exo-PG/S}}$ (U/g) | 764 |
| $P_{\text{exo-PG}}$ (U/gms.h) | 1,11 |
| $\text{pH}_{\text{exo-PG,máx}}$ | 5,6 |
| $T_{\text{máx}}$ ($^{\circ}\text{C}$) | 49 |

- $X_{\text{máx}}$ - concentração celular máxima

- $Y_{X/S}$ - fator de conversão de substrato em células
- $\mu_{X,máx}$ - máxima velocidade específica de crescimento
- ART_{cons} - açúcares redutores totais consumidos até o tempo de máximas atividades enzimáticas
- endo-PG - máxima atividade de endo-PG
- $Y_{endo-PG/S}$ - fator de conversão de substrato em atividade enzimática de endo-PG
- $P_{endo-PG}$ - produtividade em endo-PG
- $pH_{endo-PG,máx}$ - pH no tempo de máxima atividade enzimática de endo-PG
- exo-PG - máxima atividade de exo-PG
- $Y_{exo-PG/S}$ - fator de conversão de substrato em atividade enzimática de exo-PG
- P_{exo-PG} - produtividade em exo-PG
- $pH_{exo-PG,máx}$ - pH no tempo de máxima atividade enzimática de exo-PG
- $T_{máx}$ - pico de temperatura durante o processo

4.3 Avaliação da Espessura de Meio Sólido em Cultivo de *Aspergillus niger*

Neste grupo de ensaios, foi avaliada a influência da espessura do meio sólido, entre 2 e 17 cm, sobre o cultivo de *A. niger*. O estudo foi feito sem levar em consideração a atividade de endo-PG, em razão de o equipamento utilizado para esta determinação (viscosímetro Brookfield DV II+) encontrar-se sem condições de uso na ocasião destes experimentos. Entretanto, como demonstrado na discussão do item anterior, as duas poligalacturonases apresentam comportamento cinético semelhante e, assim, é justificado esperar-se que os efeitos de espessuras avaliados para exo-PG seriam também válidos para endo-PG.

Para espessuras de leito de meio de 2 e 5 cm (Figura 16A), verificou-se total colonização e esporulação, em 96 h, por serem camadas de meio de cultivo pouco espessas em que as limitações difusionais são menores. Já nos cultivos com espessuras de 8 cm (Figura 16B) e 11 cm (Figura 16C) e superiores, verificou-se a existência de uma área no centro do meio na qual a colonização foi menor provavelmente devido à maior dificuldade no suprimento de oxigênio para o fungo nesta região.

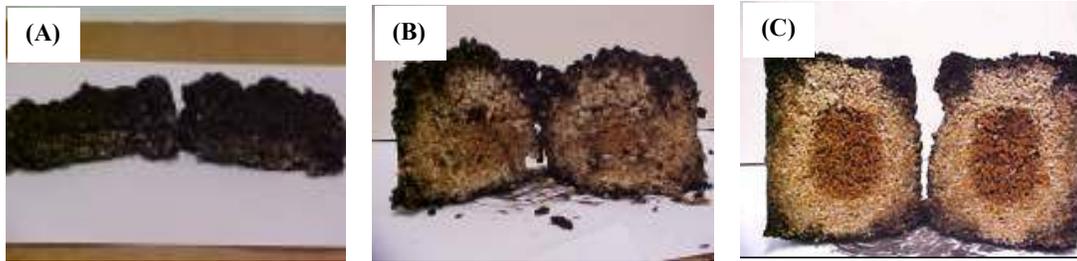


Figura 16. Aspecto do meio de cultivo de *Aspergillus niger*, em 96 horas de processo. (A) 2 cm; (B) 8 cm; (C) 11 cm.

A Figura 17 e apresenta as curvas de crescimento de *A. niger* nas diferentes espessuras de leito de meio de cultivo.

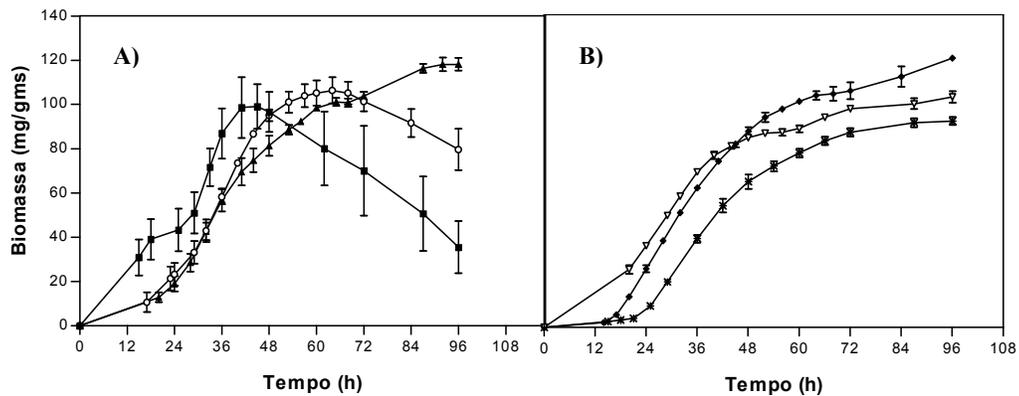


Figura 17. Variação da concentração de biomassa fúngica com o tempo em cultivos sólidos de *Aspergillus niger* com diferentes espessuras de leito de meio. A) (■) 2 cm; (○) 5 cm; (▲) 8 cm; B) (▽) 11 cm; (◆) 14 cm; (*) 17 cm.

Observa-se na Figura 17 que, para as condições de 2 e 5 cm, houve decréscimo na concentração celular estimada, após serem atingidos os picos de crescimento, provavelmente devido ao esgotamento de algum nutriente essencial, que possa ter levado o fungo a realizar lise celular.

A Tabela 2 apresenta um resumo dos resultados concentração de biomassa e formação de enzima, bem como seus respectivos fatores de conversão de substrato em células e exo-PG

Tabela 2. Máxima da concentração de biomassa de *Aspergillus niger* e fatores de conversão de substrato em células, para as diferentes condições de espessura avaliadas.

| Condição | Biomassa (mg/gms) | $Y_{X/S}$ (g/g) | exo-PG (U/gms) | $Y_{\text{exo-PG}}$ (U/g) |
|----------|-------------------|-----------------|----------------|---------------------------|
| 2 cm | 98 | 0,316 | 46 | 155 |
| 5 cm | 106 | 0,265 | 97 | 246 |
| 8 cm | 118 | 0,421 | 115 | 411 |
| 11 cm | 102 | 0,242 | 83 | 213 |
| 14 cm | 120 | 0,315 | 80 | 210 |
| 17 cm | 92 | 0,661 | 106 | 763 |

Observa-se na Tabela 2 que a máxima produção de exo-PG se deu na condição de 8 cm de espessura. Fontana (2004) avaliou a influência de diferentes espessuras de leito de meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonases de *A. niger*, em frascos de Becher, verificando que a melhor condição foi de 4 cm de espessura, com produção de 360 U.gms^{-1} de exo-PG em 48 h.

Conforme é mostrado na Figura 18, a umidade do meio de cultivo permaneceu constante para espessuras acima de 2 cm, indicando que esse parâmetro não influenciou os resultados obtidos. Para a condição 2 cm, um decréscimo no teor de umidade do meio de cultivo foi constatado após 36 h, provavelmente devido à completa colonização ou a uma possível evaporação da água presente no meio de cultivo.

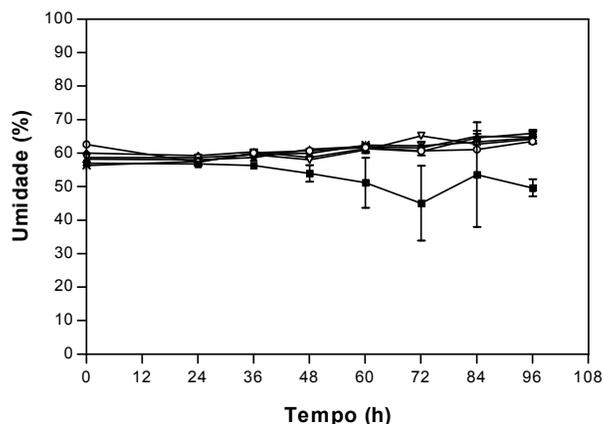


Figura 18. Variação da umidade com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger* com diferentes espessuras de leito. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm.

O consumo de substrato pelo microrganismo, para as condições de 2, 5, 8, 11, 14 e 17 cm, é apresentado na Figura 19.

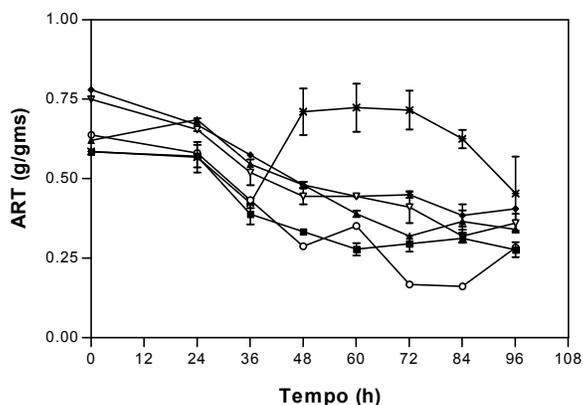


Figura 19. Variação da concentração de ART com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger* em diferentes espessuras de leito de meio de cultivo. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm.

Como pode ser observado, o consumo de substrato foi incompleto em todas as condições descritas. Valores residuais de cerca de 0,3 a 0,4 g/gms foram observados em todos os experimentos, provavelmente devido à existência de substâncias redutoras que não são metabolizadas pelo microrganismo ou à limitação de algum outro nutriente essencial, conforme já comentado neste trabalho.

A variação do pH nas diferentes condições apresentou perfis semelhantes, observando-se valores mais baixos em torno de 36 h de processo (Figura 20), coincidindo com os picos de temperatura do leito do meio de cultivo (Figura 21).

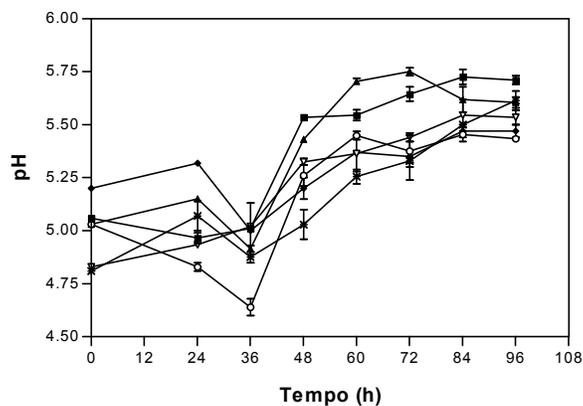


Figura 20. Variação do pH do meio sólido com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger*, com diferentes espessuras de meio. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm.

Em FES, uma das principais desvantagens é a elevada diferença de temperatura gerada pelo metabolismo microbiano durante o processo, condição intensificada pela baixa condutividade térmica do meio de cultivo (Pandey, 2003; Hölker & Lenz, 2005; Raghavaro *et al.*, 2003). A Figura 21 mostra as variações de temperatura durante o processo, para as diferentes espessuras de leito.

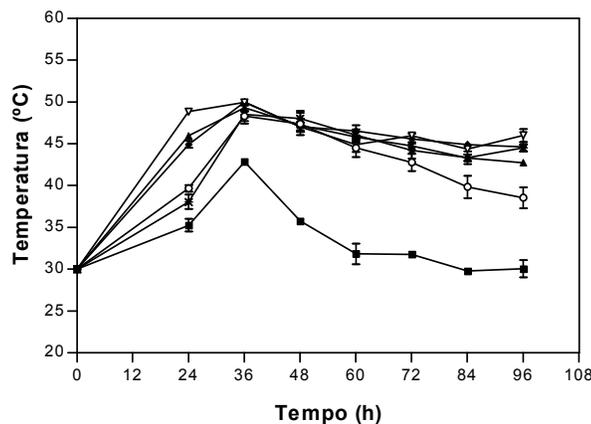


Figura 21. Variação da temperatura do meio sólido, com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger*, com diferentes espessuras de meio. (■) 2 cm, (○) 5 cm, (▲) 8 cm, (▽) 11 cm, (◆) 14 cm e (*) 17 cm.

Nos cultivos realizados, aumentos de temperatura, superiores a 16°C, em relação à temperatura de incubação, foram observados em 36 h de processo, exceto para espessura

de 2 cm, na qual observou-se variação de 13°C. Esta situação é comum em cultivos em meios sólidos, conforme relatado por Hongzhang *et al.* (2005) que observaram gradiente de temperatura de 25°C em um cultivo de *P. decumbens* em biorreator de bandeja com 9 cm de espessura de leito. No presente trabalho, observaram-se gradientes de temperatura de até 4°C entre diferentes regiões do meio para espessuras acima de 8 cm, durante o processo.

Na Tabela 3 pode ser observado que a espessura de leito de 17 cm apresentou diferença estatística significativa com respeito ao crescimento microbiano, quando comparada às espessuras de 8 e 14 cm.

Tabela 3. Concentrações máximas de biomassa em cultivos de *Aspergillus niger* com diferentes espessuras de meio sólido.

| Espessura de leito | Biomassa (mg/gms) |
|---------------------------|--------------------------|
| 2 cm | 98,6 ^{ab} ±19,4 |
| 5 cm | 106 ^{ab} ±8,30 |
| 8 cm | 118 ^a ±4,06 |
| 11 cm | 103 ^{ab} ±3,66 |
| 14 cm | 120 ^a ±1,82 |
| 17 cm | 92,3 ^b ±2,54 |

Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais, ao nível de 5% de confiança, segundo teste de Tukey.

Na seqüência do trabalho, previa-se a realização de experimentos em que a operação do biorreator fosse modificada a fim de facilitar as transferências de calor e massa. Assim, a partir dos resultados obtidos nos ensaios discutidos neste item, a espessura de leito de meio de 17 cm foi escolhida para prosseguimento do trabalho, uma vez que para essa condição o crescimento microbiano foi afetado significativamente, segundo a análise estatística.

4.3.1 Análise detalhada do leito do meio de cultivo

A Figura 22 mostra o aspecto geral do meio de cultivo do com 17 cm de espessura de leito, em 96 h de processo. Observa-se que o crescimento microbiano foi mais favorecido

nas extremidades e nas laterais do meio de cultivo, ao contrário da região mais central do leito, na qual, claramente, há uma área menos colonizada, provavelmente devido à deficiência na difusão de oxigênio. Com relação à temperatura, verificou-se pequena variação entre os valores encontrados no centro do leito (49°C) e as extremidades (47,6°C, na parte superior, e 48,3°C, na parte inferior), mostrando que o calor gerado pela intensa atividade metabólica afetou o processo de forma semelhante em todas as porções do meio. Os dados sugerem a dissipação do calor gerado nas extremidades para a parte central do leito, devido ao gradiente de temperatura obtido, ocorrendo então um equilíbrio entre as regiões, impedindo assim, o transporte de calor para o ambiente externo.

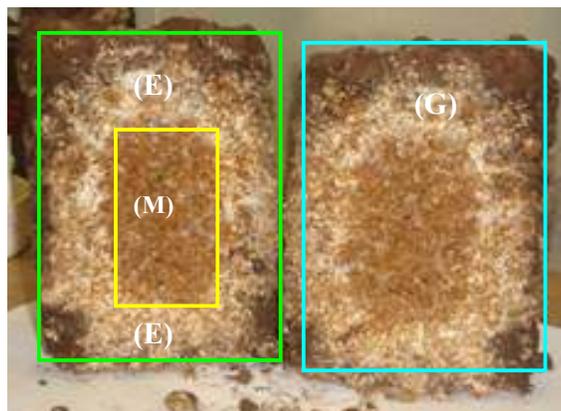


Figura 22. Corte longitudinal do meio sólido, após 96 h de cultivo de *Aspergillus niger*. As letras indicam cada região submetida separadamente às análises padrão. (G) Geral (mistura da parte central (Meio), com a parte exterior (Externo)), (M) Meio e (E) Externo.

A partir do aspecto do meio, conforme a Figura 22, seria previsível que a menor colonização na área central do leito afetasse os resultados do processo, visto que as análises foram feitas no meio homogeneizado e esta porção menos colonizada poderia estar influenciando as determinações. Partindo dessa hipótese, foram realizadas análises de endo e exo-PG, ART, umidade e pH de diferentes partes do meio, como mostra a Figura 22, para meio de cultivo com espessura de leito de 17 cm, haja vista que esta foi a condição padrão.

Para 17 cm de espessura de meio, verificou-se que, em comparação com as demais espessuras, o crescimento microbiano foi negativamente afetado, possivelmente pela existência de uma área menos colonizada na região central do leito. Foi realizada, para estimativa de crescimento microbiano nesta região, uma análise que correspondia apenas à parte central do leito (M - Meio). Apesar de visualmente ter sido constatada alguma colonização, observou-se que a respiração microbiana foi desprezível, indicando que não havia, de fato, quantidade significativa de massa fúngica nesta região.

Com respeito à produção de enzimas, endo e exo-PG (Figuras 23A e B), verificou-se que a atividade enzimática na parte central do leito foi menor que a da parte mais externa, mas, ainda assim, mais alta que a que seria previsível, possivelmente em razão da menor concentração celular na região central do meio.

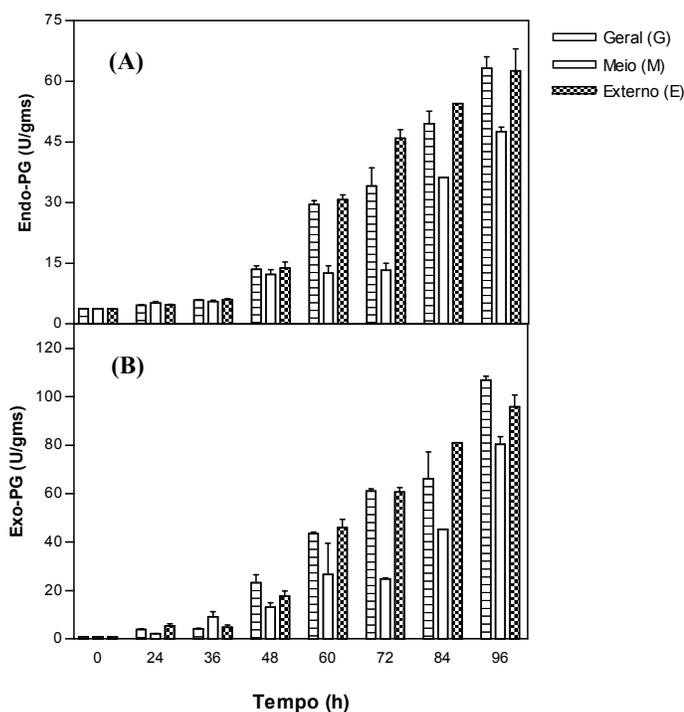


Figura 23. Variação da atividade de endo-PG (A) e exo-PG (B) com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger*, avaliando-se diferentes regiões do leito de meio ((G) Geral, (M) Meio e (E) Externo) com 17 cm de espessura.

Na Tabela 4, pode-se observar que houve diferença significativa na produção de enzimas em diferentes regiões do meio, sugerindo que a dificuldade na transferência de massa e calor pode ter afetado o processo. Segundo Ghildyal *et al.* (1993), gradientes gasosos de O₂ e CO₂ podem influenciar a produção destas enzimas.

Tabela 4. Atividades enzimáticas máximas de endo e exo-PG em diferentes regiões de meio, em cultivo de *Aspergillus niger*, na condição padrão de 17 cm de espessura.

| Região | Endo-PG (U/gms) | Exo-PG (U/gms) |
|---------|-------------------------|--------------------------|
| Geral | 63,3 ^a ±4,03 | 107 ^a ±2,33 |
| Meio | 47,6 ^b ±1,46 | 80,3 ^b ±4,39 |
| Externo | 62,7 ^a ±7,63 | 95,8 ^{ab} ±6,94 |

Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais, ao nível de 5% de confiança, segundo teste de Tukey.

Na Figura 24, observa-se que o teor de umidade do leito permaneceu em torno de 60%, tanto para a camada externa (E - Externo), quanto para a camada central (M - Meio), sugerindo que este parâmetro não influenciou os resultados obtidos.

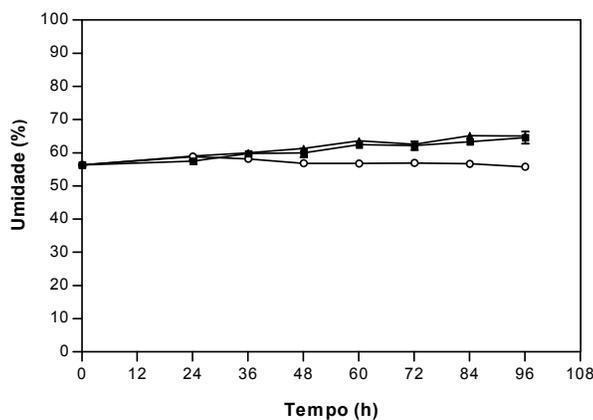


Figura 24. Variação da umidade em diferentes regiões do meio sólido com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger*, na condição padrão de 17 cm de espessura. (■) Geral, (○) Meio e (▲) Externo.

Na Figura 25, como esperado, o pH do meio de cultivo em geral, diminui ao longo do processo, assim como na parte externa, entre 36 e 48 h, devido à intensa atividade metabólica, seguido de aumento na seqüência do processo. Por outro lado, verifica-se o estabelecimento de um patamar no pH na parte central do leito de meio de cultivo, em torno de 5,1, de 24 h até cerca de 72 h, quando o valor subiu para cerca de 5,4, evidenciando a baixa atividade microbiana nesta região do meio.

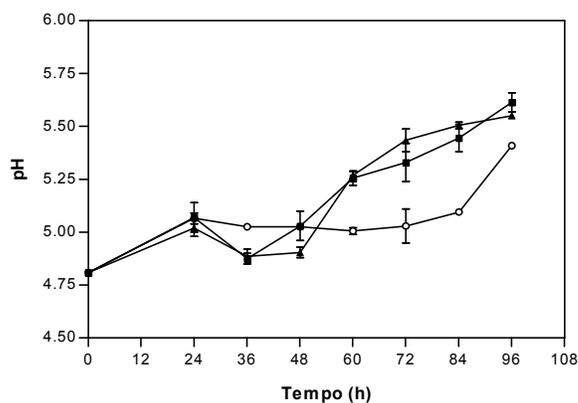


Figura 25. Variação do pH em diferentes regiões do meio sólido com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger*, para condição padrão de espessura 17 cm. (■) Geral, (○) Meio e (▲) Externo.

4.4 Influência da Aeração Superficial sobre o Cultivo Sólido de *Aspergillus niger*

Neste item são discutidos os resultados obtidos nos experimentos nos quais foram aplicados diferentes fluxos de aeração superficial forçada sobre o cultivo de *A. niger*. Esta discussão é feita apenas em função da atividade de endo-PG em razão de algumas dificuldades operacionais encontradas.

O sistema de aeração superficial forçada, empregado neste grupo de experimentos teve por objetivo arrastar o CO₂ produzido pelo metabolismo microbiano para fora do reator aumentando-se a pressão parcial de O₂ sobre as superfícies, facilitando assim a difusão de

CO₂ existente no centro do leito para o ambiente externo, pelo maior gradiente gerado, e, concomitantemente, a difusão de O₂ para o centro do leito.

Na Figura 26, verifica-se que ocorreu uma maior colonização da porção central dos meios sob aeração, em comparação com a condição sem aeração forçada descrita no item 4.3.1.



Figura 26. Corte longitudinal do meio sólido, após 96 h de cultivo de *Aspergillus niger*, sob diferentes condições de aeração.

Na Figura 27, pode ser visto a curva do crescimento microbiano nas diferentes condições avaliadas: fluxos de ar de 1,4, 2,8 e 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu (volume de ar/minuto/kg de meio úmido).

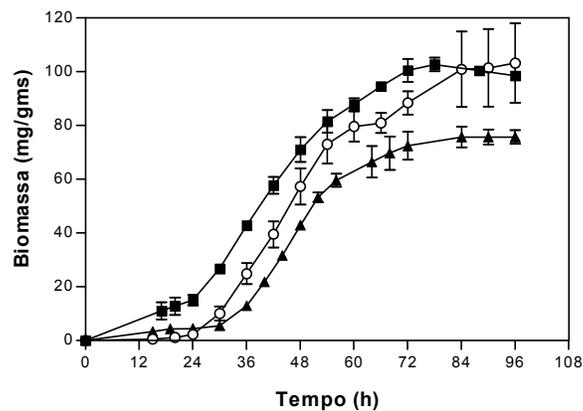


Figura 27. Variação da concentração de biomassa com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger* sob diferentes condições de aeração avaliadas. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu.

Verificou-se que o crescimento microbiano foi menor quando fluxo de ar de $8,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$ foi utilizado, sendo obtida concentração celular aproximada de 75 mg/gms em 96h, ao passo que com fluxos de $1,4, 2,8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$, o crescimento microbiano chegou a cerca de 103 mg/gms , em 78 e 96 h, respectivamente, sendo superiores à condição padrão (95 mg/gms). Os fatores de rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$) foram de 0,206, 0,515 e 0,268 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para $1,4, 2,8$ e $8,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$.

A Tabela 5 apresenta a análise estatística das médias do crescimento microbiano sob diferentes condições de aeração, comparadas à condição 17 cm sem aeração (condição padrão, item 4.2), sendo observado que o crescimento microbiano foi significativamente afetado sob condição de aeração $8,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$.

Tabela 5. Concentrações máximas de biomassa em cultivos de *Aspergillus niger* com diferentes fluxos de aeração superficial, comparadas à condição padrão.

| Condição | Biomassa (mg/gms) |
|---|---------------------------|
| $1,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$ | $103^{\text{a}}\pm 2,54$ |
| $2,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$ | $103^{\text{a}}\pm 20,9$ |
| $8,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$ | $75,8^{\text{c}}\pm 3,57$ |
| Condição padrão | $92,3^{\text{b}}\pm 2,54$ |

Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais, ao nível de 5% de confiança, segundo teste de Tukey.

Na condição de aeração com fluxo de $8,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$, o crescimento microbiano pode ter sido afetado negativamente em razão de certo grau de ressecamento das extremidades do meio, em comparação com as demais condições de aeração e com a condição padrão, que prejudicaria a difusão de gases no sistema, apesar da presença de umidificadores, que tinham por objetivo saturar em umidade o ar que entrava nos reatores. Ressalte-se que a umidade geral dos meios, exceção feita ao ensaio com $8,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{mu}$, não foi afetada pela aeração, como é mostrado na Figura 28.

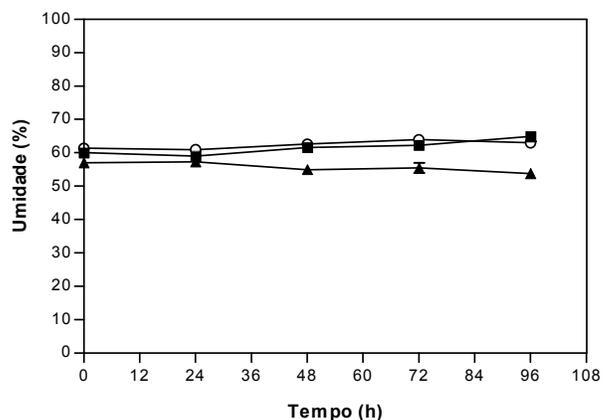


Figura 28. Variação da umidade do meio sólido com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger*, sob diferentes condições de aeração de (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu.

Na Figura 29 observa-se a produção máxima de endo-PG por *A. niger* foi para a condição 1,4 L.min⁻¹.kg⁻¹mu (63 U/gms), valor próximo obtido no cultivo em condição padrão (sem aeração forçada). Para a condição de fluxo de aeração 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu, menor atividade de endo-PG foi observada (45 U/gms), possivelmente devido ao decréscimo no teor de umidade, observado para essa condição (Figura 28).

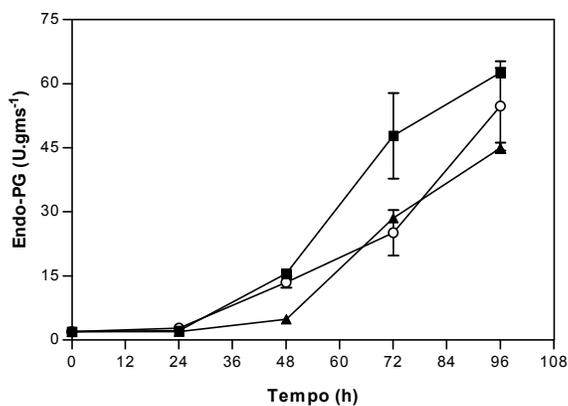


Figura 29. Variação da atividade de endo-PG com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido, sob diferentes condições de fluxos de aeração de (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu.

Mo *et al.* (2004) avaliaram diferentes fluxos de aeração, 5,0, 7,0 e 10,0 L.min⁻¹, verificando um acréscimo da produção de celulase por *P. decumbens* n^o1 em cultivo em estado sólido com aeração de 7 L.min⁻¹, ao passo que, para fluxo de 10 L.min⁻¹, foi observada perda de umidade no meio de cultivo, afetando dessa maneira o crescimento microbiano. Ridder *et al.* (1999) avaliaram a influência da aeração sobre a produção de xilanase por *Trichoderma longibrachiatum*, em meio baseado em farelo de trigo, observando também que a atividade enzimática obtida foi menor quando fluxos de aeração superiores a 2,9 L.min⁻¹.kg⁻¹ foram aplicados sobre o cultivo.

A Tabela 6 apresenta as médias de atividade máxima de endo-PG, produzida por *A. niger* em meio sólido, sob diferentes condições de aeração.

Tabela 6. Atividades enzimáticas máximas de endo-PG em cultivos de *Aspergillus niger* com diferentes fluxos de aeração superficial e na condição padrão.

| Condição | Endo-PG (U/gms) |
|--|-------------------------|
| 1,4 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu | 62,6 ^a ±1,58 |
| 2,8 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu | 54,8 ^b ±14,8 |
| 8,5 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu | 44,9 ^c ±1,70 |
| Condição padrão | 63,3 ^a ±4,03 |

Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais, ao nível de 5% de confiança, segundo teste de Tukey.

O consumo de substrato pelo fungo em cultivos sob diferentes condições de aeração é apresentado na Figura 30.

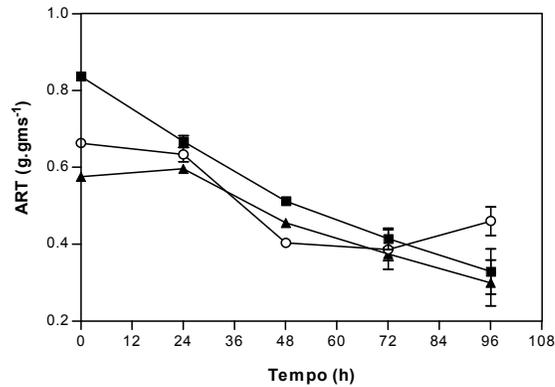


Figura 30. Variação do consumo de substrato com o tempo por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido, sob as diferentes condições de aeração avaliadas. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu.

Observa-se na Figura 30 que o consumo de substrato por *A. niger*, nas diferentes condições avaliadas foi semelhante. Os fatores de rendimento de substrato em produto ($Y_{\text{endo-PG}}$) foram de 126, 275 e 161 U.g⁻¹ e as produtividades de 0,66, 0,57 e 0,47 U.gms⁻¹.h⁻¹, para 1,4, 2,8 e 8,5 L.kg⁻¹mu.min⁻¹, respectivamente.

Na Figura 31, que apresenta o perfil do pH do meio de cultivo durante o processo, pode ser observado o esperado decréscimo entre 24 e 48 h de processo, para todas as condições, devido ao intenso metabolismo microbiano.

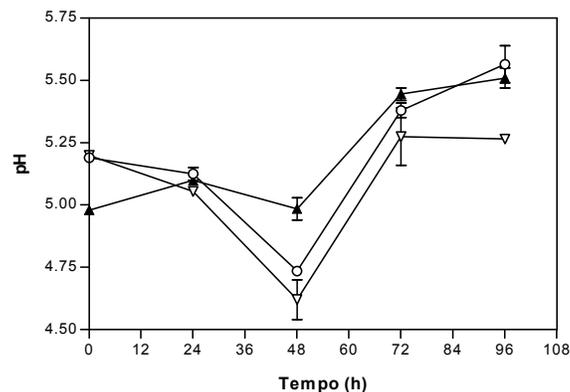


Figura 31. Variação pH do meio sólido com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger*, sob as diferentes condições de aeração avaliadas. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu.

Nota-se claramente na Figura 29 o rápido incremento na produção de endo-PG após o decréscimo do pH, em torno de 48 h (Figura 31), momento a partir do qual também se observa uma tendência de redução da velocidade de crescimento microbiano (Figura 27) para ambas as condições avaliadas, e também se observa o pico de temperatura no leito do meio de cultivo (Figura 32). Villegas *et al.* (1993), que avaliaram a influência da composição gasosa sobre a produção de protease ácida por *A. niger*, observaram variação do pH do meio semelhante aos dados observados neste trabalho.

A temperatura do leito de meio de cultivo também evidencia a intensa atividade metabólica. A Figura 32 apresenta a variação da temperatura no leito do meio de cultivo.

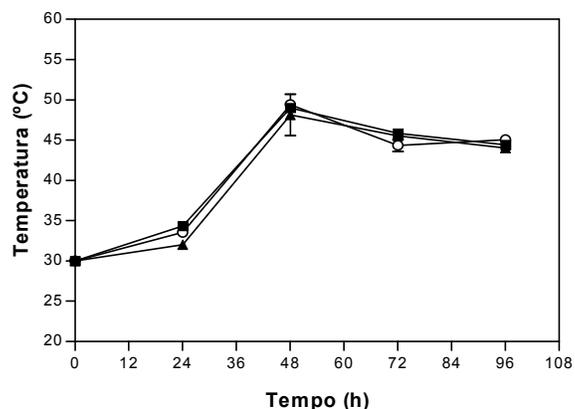


Figura 32. Variação da temperatura do meio sólido com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger*, sob diferentes condições de aeração. (■) 1,4; (○) 2,8; (▲) 8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹mu.

A variação da temperatura do leito de meio de cultivo foi semelhante para todas as condições avaliadas, indicando que a aplicação de aeração sobre o cultivo não favoreceu a remoção de calor do leito, possivelmente em razão da baixa condutividade térmica do meio conforme sugerido por outros autores (Raghavarao *et al.*, 2003; Hölker & Lenz, 2005).

4.5 Influência da Aplicação de Pulsos de Pressão sobre o Cultivo Sólido de *Aspergillus niger*

Os experimentos descritos neste item constituem mais uma tentativa de melhorar-se a transferência de calor e massa nos biorreatores.

Como mostra a Figura 33, o crescimento microbiano foi influenciado negativamente pelo sistema de pulso de pressão (73 mg/gms), quando comparado à condição de aeração de 1,4 L.min⁻¹.kg⁻¹mu (103 mg/gms).

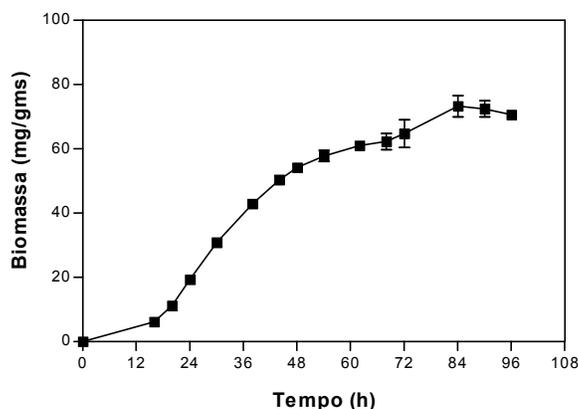


Figura 33. Variação da concentração de biomassa de *Aspergillus niger* com o tempo, em cultivo em meio sólido conduzido com sistema de pulso de pressão acoplado à aeração superficial com fluxo de 1,4 L.min⁻¹.kg⁻¹mu.

Neste experimento, temperaturas da ordem de 50°C também foram observadas, assim como na condição de aeração superficial de 1,4 L.min⁻¹.kg⁻¹mu (49°C). De fato, não foram observadas variações significativas de temperatura após a aplicação dos pulsos de pressão sobre o meio, evidenciando que o sistema utilizado não foi eficiente na remoção de calor. É possível que o procedimento experimental adotado nesta pesquisa não tenha sido o ideal, já que diversos trabalhos relatam que sistemas de oscilação de pressão melhoram a transferência de massa e calor em cultivos fúngicos ou bacterianos em estado sólido (Tao *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2004; Aijun *et al.*, 2005).

Na Tabela 7 estão resumidos os principais resultados deste experimento.

Tabela 7. Resultados gerais obtidos em cultivo de *Aspergillus niger* em estado sólido em 96 h, sob condição de pulso de pressão acoplado à aeração superficial com fluxo de $1,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\mu$.

| | |
|-------------------------------------|-------|
| $X_{\text{máx}}$ (mg/gms) | 73,0 |
| $Y_{X/S}$ (g/g) | 0,348 |
| $\text{ART}_{\text{cons.}}$ (g/gms) | 0,21 |
| Umidade (%) | 66 |
| pH | 5,25 |
| Endo-PG (U/gms)(72h) | 24,0 |
| $Y_{\text{endo-PG/S}}$ (U/g) | 114,0 |
| $P_{\text{endo-PG}}$ (U/gms.h) | 0,26 |
| Exo-PG (U/gms) | 55,0 |
| $Y_{\text{exo-PG/S}}$ (U/g) | 262,0 |
| $P_{\text{exo-PG}}$ (U/gms.h) | 0,573 |
| $T_{\text{máx}}$ (°C) | 50°C |

- $X_{\text{máx}}$ - concentração celular máxima
- $Y_{X/S}$ - fator de conversão de substrato em células
- $\text{ART}_{\text{cons.}}$ - açúcares redutores totais consumidos até o tempo de máximas atividades enzimáticas (96h)
- $\text{pH}_{\text{enzimas}}$ - pH no tempo de máximas atividades enzimáticas de endo e exo-PG foram alcançadas (96h)
- endo-PG - máxima atividade de endo-PG
- $Y_{\text{endo-PG/S}}$ - fator de conversão de substrato em atividade enzimática de endo-PG
- $P_{\text{endo-PG}}$ - produtividade em endo-PG
- exo-PG - máxima atividade de exo-PG
- $Y_{\text{exo-PG/S}}$ - fator de conversão de substrato em atividade enzimática de exo-PG
- $P_{\text{exo-PG}}$ - produtividade em exo-PG
- $T_{\text{máx}}$ - pico de temperatura durante o processo

O consumo de substrato pelo fungo durante o cultivo, foi semelhante à condição de aeração $1,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\mu$, observando-se valor residual de aproximadamente $0,4 \text{ g}\cdot\text{gms}^{-1}$. Os fatores de conversão de substrato em produtos (endo e exo-PG) foram $114 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ para endo-PG e $262 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ para exo-PG, e as produtividades do processo foram calculadas como sendo $0,26$ e $0,573 \text{ U}\cdot\text{gms}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, para endo e exo-PG, respectivamente, e o fator de conversão de substrato em células foi calculado como sendo $0,348 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Observou-se que parâmetros como umidade e pH foram semelhantes àqueles obtidos nas condições sob diferentes fluxos de aeração, descritas no item 4.4, sugerindo que esses parâmetros, não influenciaram o processo.

4.6 Influência do Uso de um Duto Central no Biorreator sobre o Cultivo Sólido de *Aspergillus niger*

Neste experimento foi avaliada a cinética do processo sob a condição da presença de um duto central no biorreator, com meio de cultivo com espessura de 17 cm, no intuito de obter maior remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano e melhor transferência de massa.

Na Figura 34 pode ser observado crescimento microbiano em meio sólido em biorreator com duto central.

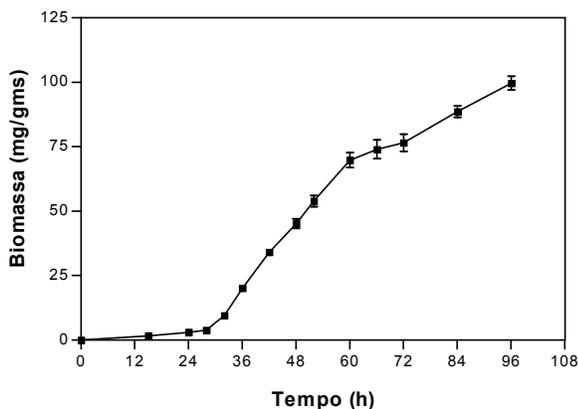


Figura 34. Variação da concentração da biomassa de *Aspergillus niger* com o tempo, em cultivo em meio sólido em biorreator com duto central, em meio com 17 cm de espessura.

Constatou-se que, apesar de o crescimento microbiano não ter sido significativamente afetado pela existência do duto central (Figura 34 e Tabela 8), uma melhor colonização no centro do leito foi observada, como mostra a Figura 35, quando comparada àquela

verificada na condição de 17 cm de espessura de leito (condição padrão), descrita no item 4.2.



Figura 35. Corte longitudinal do meio de cultivo de *Aspergillus niger*, com 17cm de espessura, em biorreator com duto central.

A Tabela 8 apresenta uma comparação entre os valores médios máximos de concentração de biomassa fúngica determinados nas diferentes condições avaliadas neste trabalho.

Tabela 8. Concentrações máximas de biomassa em cultivos de *Aspergillus niger* sob diferentes condições avaliadas neste trabalho.

| Condição | Biomassa (mg/gms) |
|---|--------------------------|
| Condição padrão | 92,3 ^b ±2,54 |
| Aeração de 1,4 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu | 103 ^a ±2,54 |
| Pulso de pressão | 73,3 ^c ±4,74 |
| Reator com duto central | 99,7 ^a ±3,74 |

Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais, ao nível de 5% de confiança, segundo teste de Tukey.

Também pode ser observado nesse experimento que a temperatura do leito de meio foi semelhante àquelas medidas em outras condições, cerca de 50°C. Apesar disso, atividades enzimáticas superiores foram alcançadas com esta configuração de biorreator, conforme é

discutido a seguir, sugerindo que a produção de enzimas tenha maior dependência da transferência de oxigênio que da dissipação de calor do meio de cultivo.

Como mostrado na Figura 36, nesta condição de operação, ocorreu um significativo ganho de atividade enzimática, tanto de endo quanto de exo-PG, em comparação com as demais condições avaliadas neste trabalho (padrão, aeração forçada e pulso de pressão).

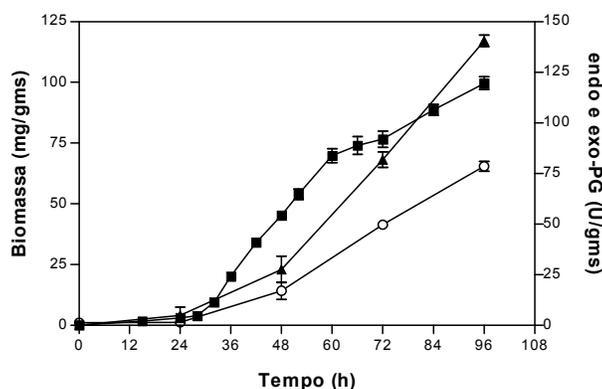


Figura 36. Variação da concentração de biomassa e atividade de endo e exo-PG de *Aspergillus niger* com o tempo em meio sólido, em reator com duto central. (■) Biomassa; (○) endo; (▲) exo-PG.

A Tabela 9 apresenta uma comparação entre as máximas de atividades de endo e exo-PG, nas diferentes condições avaliadas neste trabalho.

Tabela 9. Atividades enzimáticas máximas de endo e exo-PG com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido, em diferentes condições avaliadas neste trabalho.

| Condição | Endo-PG (U/gms) | Exo-PG (U/gms) |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Condição padrão | nd | 107 ^b ±2,33 |
| Aeração 1,4 L.min ⁻¹ .kg ⁻¹ mu | 62,6 ^b ±1,58 | nd |
| Pulso de pressão | 28,0 ^c ±6,78 | 54,8 ^c ±9,74 |
| Reator com duto central | 78,5 ^a ±3,39 | 140 ^a ±4,03 |

Letras iguais correspondem a médias estatisticamente iguais, ao nível de 5% de confiança, segundo teste de Tukey. nd - não determinado

Conforme apresentado na Figura 37, as variações da umidade e do pH sob a condição avaliada foram similares às das condições padrão e de aeração, indicando que esses parâmetros não influenciaram o crescimento microbiano, bem como a formação de enzimas. Entretanto, nota-se claramente que maior incremento na produção das enzimas se deu após o decréscimo do pH, momento no qual também se observa uma tendência na redução de velocidade do crescimento microbiano (Figura 34), assim como foi observado nos experimentos sob diferentes condições de aeração.

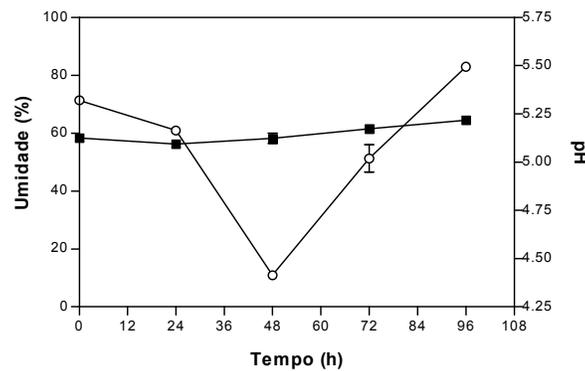


Figura 37. Variação da umidade e do pH com o tempo, em cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido, em biorreator com duto central. (■) umidade e (○) pH.

O consumo de substrato (Figura 38) também foi semelhante àquele observado sob diferentes condições de aeração, inclusive a concentração residual de ART entre 0,3 e 0,4 g.gms⁻¹.

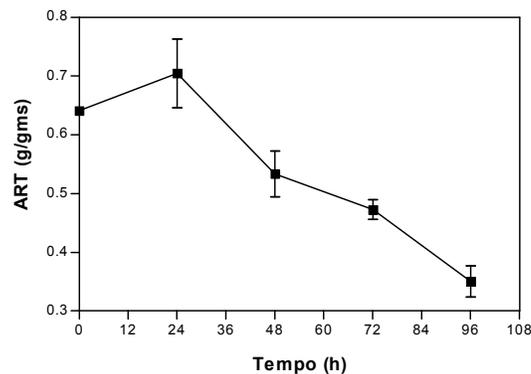


Figura 38. Variação da concentração de ART com o tempo em cultivo de *Aspergillus niger*, em biorreator com duto central.

4.7 Influência da Temperatura sobre a Atividade e a Estabilidade de Endo e Exo-PG Produzidas por *Aspergillus niger* em meio sólido

Embora já tenha sido utilizada em vários trabalhos, a linhagem t0005/007-2 de *A. niger* não teve suas poligalacturonases avaliadas com respeito à temperatura. Deste modo, a atividade e a estabilidade de endo e exo-PG foram avaliadas frente à temperatura, que variou entre 20 e 70°C, com intervalos de 5°C, para atividade enzimática, ao passo que para estabilidade foram avaliadas temperaturas de 25°C e de 30 a 70°C, com variação de 10°C, com exposição do caldo enzimático bruto por até 120 min.

Na Figura 39, são apresentados os resultados obtidos com ensaios que objetivaram avaliar a influência da temperatura sobre a atividade de endo e exo-PG produzidas por *A. niger*.

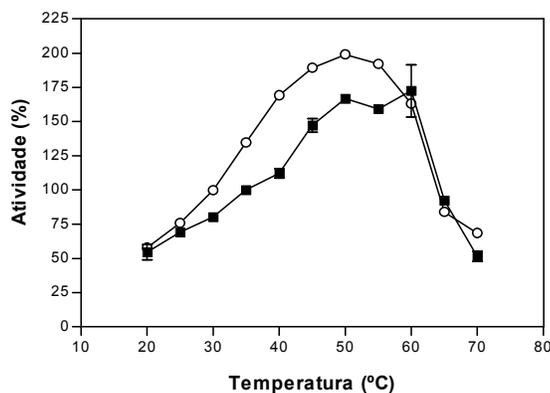


Figura 39. Variação da atividade de endo e exo-PG produzida por *Aspergillus niger* em meio sólido em função da temperatura. O valor de 100% corresponde à condição padrão de reação para cada enzima. (■) exo-PG e (○) endo-PG.

Como pode ser observado na Figura 39, houve um acréscimo acentuado nas atividades de endo e exo-PG, com o aumento da temperatura. Para endo-PG, máxima atividade foi obtida com temperatura de 50°C, sendo o dobro daquela obtida sob a condição padrão de ensaio (30°C). Maior atividade de exo-PG foi obtida a 60°C, sendo cerca de 75% superior à

condição padrão (35°C). Malvessi & Silveira (2004) avaliaram a influência da temperatura sobre a atividade das enzimas endo e exo-PG produzidas por *A. oryzae* em processo submerso e verificaram que a temperatura ótima para atividade de endo-PG variou entre 35 e 40°C, ao passo que para exo-PG a temperatura ótima de atividade foi entre 55 e 60°C.

A Figura 39 mostra ainda o rápido decréscimo na atividade das enzimas em temperaturas superiores a 50°C e 60°C, para endo e exo-PG, respectivamente, devido, possivelmente, à sua inativação. Segundo Daniel (1996), não é de se esperar que uma enzima seja estável em temperaturas muito acima daquelas correspondentes ao crescimento microbiano, como é o caso de linhagens do gênero *Aspergillus* que crescem a uma temperatura em torno de 30°C. Entretanto observa-se na Figura 40, que a enzima exo-PG apresentou elevada termoestabilidade.

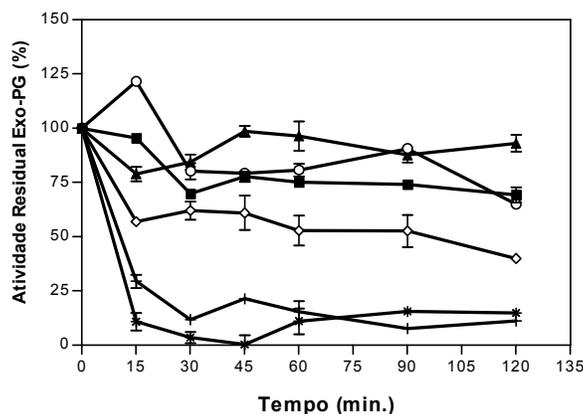


Figura 40. Avaliação da termoestabilidade de exo-PG de *Aspergillus niger*, em função do tempo de exposição do caldo enzimático bruto a diferentes temperaturas. (■) 25°C, (○) 30°C; (▲) 40°C; (◇) 50°C; (+) 60°C; (*) 70°C.

Como é mostrado na Figura 40, com aproximadamente 15 min de exposição do caldo enzimático bruto a diferentes temperaturas, a atividade enzimática foi reduzida aos níveis mínimos para cada condição, permanecendo praticamente constante até o final dos ensaios. Naidu & Panda (2003) avaliaram termoestabilidade de poligalacturonase produzida por *A.*

niger em processo submerso, concluindo que a inativação térmica acontece lentamente, diferentemente do que foi observado neste trabalho.

A análise de termoestabilidade de endo-PG, apresentada a seguir, se baseia nos dados ilustrados na Figura 41.

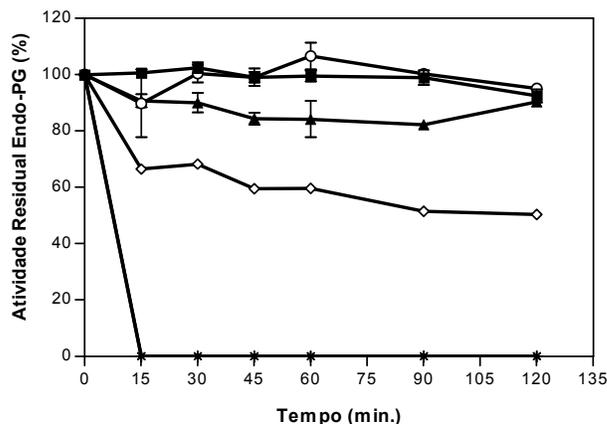


Figura 41. Avaliação da termoestabilidade de endo-PG de *A. niger*, em função do tempo de exposição do caldo enzimático bruto a diferentes temperaturas. (■) 25°C; (○) 30°C; (▲) 40°C; (◇) 50°C; (+) 60°C; (*) 70°C.

Como pode ser visto na Figura 41, após exposição do extrato enzimático, por 120 min, a temperaturas de até 40°C, atividades semelhantes foram determinadas. Entretanto quando temperaturas de 60 e 70°C foram utilizadas para verificar a influência deste parâmetro sobre a estabilidade de endo-PG, verificou-se total perda de sua atividade já na primeira amostra tomada com 15 min de exposição da preparação.

A observação dos perfis de termoestabilidade para as duas poligalacturonases sugere que a ação de endo-PG teria influência sobre a estimativa da atividade de exo-PG em temperaturas mais baixas. No caso, como endo-PG age sobre o mesmo substrato, mas de forma aleatória, como apresentado na Figura 1, haveria um aumento exponencial do número de extremidades passíveis de serem atacadas pela exo-PG. Com isso, à medida que a temperatura foi aumentada nos testes com exo-PG, maior foi a inativação de endo-PG,

justificando os patamares em níveis decrescentes constatados na Figura 40. Uma outra hipótese para explicar os perfis observados na Figura 40 seria a de que alguma outra enzima termossensível do complexo pectinolítico estivesse proporcionando um mais fácil acesso de exo-PG ao substrato, sob baixas temperaturas, com efeito inverso a temperaturas mais elevadas. A partir desses resultados, pode ser sugerido que a estimativa de exo-PG, conforme descrita amplamente na literatura, não é real, uma vez que desconsidera o efeito conjunto de endo-PG ou de outras enzimas do complexo pectinolítico.

Analisando-se os dados obtidos nestes ensaios, nos quais evidencia-se a co-participação de endo-PG ou de outras enzimas na ação de exo-PG, novos ensaios estão sendo realizados com o intuito de elucidar o real mecanismo de ação de cada enzima do complexo pectinolítico neste processo.

Os resultados deste grupo de ensaios tornam ainda mais clara a necessidade de desenvolverem-se sistemas mais eficientes de controle da temperatura, pois, tendo em vista os níveis de calor gerado no processo fermentativo em estado sólido, uma parte significativa das atividades enzimáticas é perdida durante a própria produção.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem formular as conclusões listadas a seguir:

- as condições de recuperação da exo-poligalacturonase produzida pela linhagem t0005/007-2 de *Aspergillus niger* em meio sólido foram melhoradas de modo que a extração pode ser feita utilizando-se menor razão solvente (água pH 4)/massa seca de meio sólido (7,5:1) e em menor tempo de contato (15 min);
- espessuras de leito de meio de cultivo sólido entre 8 e 17 cm, utilizado em reator com dupla superfície, resultaram em produção de títulos semelhantes em exo-poligalacturonase; espessuras menores influenciaram negativamente a produção de exo-PG, provavelmente devido ao ressecamento do meio, observado até o final do cultivo;
- gradientes de temperatura da ordem de 16°C, para espessuras de meio igual ou superiores a 5 cm, foram observados;
- em meios sólidos com maior espessura, observou-se a existência de regiões internas com pequena colonização pelo fungo provavelmente em razão da limitação na difusão de oxigênio;
- quando aeração superficial foi aplicada sobre o cultivo de *A. niger*, verificou-se que o crescimento microbiano não foi favorecido, sendo também observado que para elevados fluxos de aeração (8,5 L.min⁻¹.kg⁻¹.mu), a produção de endo-PG foi reduzida;
- em sistema de pulso de pressão, tanto o crescimento microbiano quanto a produção de endo e exo-PG foram afetados negativamente;
- com a adaptação de um duto central no biorreator, com o fim de melhorar a transferência de massa e de calor, verificou-se melhor colonização nas regiões mais

profundas do meio e a maior produção de endo e exo-PG entre todas as condições testadas neste trabalho;

- as atividades de endo e exo-PG de *Aspergillus niger* t0005/007-2 foram favorecidas a temperaturas de 50 e 60°C, respectivamente;
- a atividade de exo-PG, após exposição do caldo enzimático bruto a temperaturas entre 30 e 70°C, é rapidamente reduzida, permanecendo, em seguida, com valores residuais praticamente constantes;
- endo-PG foi completamente inativada quando exposta a temperaturas de 60 e 70°C;
- os dados da avaliação da influência da temperatura sobre a atividade e estabilidade de endo e exo-PG sugerem que o método utilizado para a determinação de atividade de exo-PG, a 35°C, sofre a interferência de outras enzimas mais termossensíveis do complexo pectinolítico, como a enzima endo-poligalacturonase.

Como sugestão para a continuidade desse trabalho, propõe-se:

- o estudo de novas variações do reator de dupla superfície (RDS) utilizado neste trabalho, visando melhores condições de transferência de calor e massa;
- uma avaliação mais detalhada da influência do duto central adaptado ao leito de meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonases;
- a verificação da influência de outras enzimas do complexo pectinolítico sobre a atividade de exo-poligalacturonase.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aijun, Z. Hongzhang, C.,; Zuohu, L. (2005) Air pressure pulsation solid state production of alkaline protease by *Bacillus pumilus* 1.1625. **Proc. Biochem.**, 40: 1547-1551.
- A.O.A.C. (1998) Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International. 16th ed. Gaithersburg, Maryland.
- Attyia, S. H. & Ashour, S. M. (2002) Biodegradation of agro-industrial orange waste under solid state fermentation and natural environmental conditions. **Egyp. J. Biol.**, 4: 23-30.
- Bellon-Maurel, V.; Orliac, O.; Christen, P. (2003) Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Proc. Biochem.**, 38: 881-896.
- Bélafi-Bakó, K.; Ezsterle, M.; Kiss, K.; Nemestóthy, N.; Gubicza, L. (2007) Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering* 78 (2007)438-442.
- Castilho, L. R. (1997) Recuperação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em cultura em estado sólido. Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil .
- Castilho, L. R.; Alves, T. L. M.; Medronho, R. A. (1999) Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Proc. Biochem.**, 34: 181-186.
- Castilho, L. R.; Medronho, R. A.; Alves, T. L. M. (2000) Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.**, 71: 45-50.
- Chellegatti, M. A. S. C.; Fonseca, M. J. V.; Said, S. (2002) Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. **Microbiol. Res.**, 157: 19-24.

- Couri, S.; Terzi, S. C.; Pinto, G. A. S.; Freitas, S. P.; Costa, A. C. A. (2000) Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Proc. Biochem.**, 36: 255-261.
- Daniel, R. M. (1996) The upper limits of enzyme thermal stability. **Enz. Microb. Technol.**, 19: 74-79.
- Dartora, A.B.; Bertolin, T. E.; Bilibio, D.; Silveira, M. M. Costa, J. A. V. (2002). Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endopolygalacturonase by solid state fermentation. **Z. Naturforsch.**, 57: 666-670.
- De Gregório, A.; Mandalari, G.; Arena, N.; Nucita, F.; Tripodo, M. M.; Lo Curto, R. B. (2002) SPC and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresour. Technol.**, 83: 89-94.
- Desgranges, C. & Durand, A. (1990) Effect of pCO₂ on growth, conidiation, and enzyme production in solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. **Enz. Microb. Technol.**, 12: 546-551.
- Díaz-Godínez, G.; Soriano-Santos, J.; Augur, C.; Viniegra-González, G. (2001) Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, 26: 267-271.
- Durand, A. (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, 13: 113-125.
- Fontana, R.C. (2004) Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS.
- 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.

- Fujian, X.; Hongzhang, C.; Zuohu, L. (2002) Effect of periodically dynamic changes of air on cellulose production in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Tech.**, 30: 45-48.
- Garzón, C.G.; Hours, R.A. (1993) Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresour. Technol.**, 39: 93-95.
- Ghildyal, N. P.; Ramakrishna, M.; Lonsane, B. K.; Karanth, N. G.; Krishnaiah, M. M. (1993) Temperature variations and amyloglucosidase levels at different bed depths in a solid state fermentation system. **Chem. Eng. J.**, 53: 817-823.
- Gummadi, S. N.; Panda, T. (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinase – a review. **Proc. Biochem.**, 38: 987-996.
- Hölker, U. & Lenz, J. (2005) Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Curr. Opin. Microbiol.**, 8: 301-306.
- Hongzhang, C.; Fujian, X.; Zhonghou, T.; Zuohu, L. (2002) A novel industrial-level reactor with two dynamic changes of air for solid-state fermentation. **J. Biosc. Bioeng.**, v.93, 2: 211-214.
- Hongzhang, C.; Jian, X. Zuohu, L. (2005) Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. **Biochem. Eng. J.**, 23: 117-122.
- 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.
- Kaur, G.; Kumar, S.; Satyanarayana, T. (2004) Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Aipinis. **Bioresour. Technol.**, 94: 239-243.
- Linde, G. A. (2000). Produção de pectinase por fermentação semi-sólida biorreator de coluna. **Dissertação de mestrado**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande.

- Maiorano, A. E. (1982) Influência da concentração de inoculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus niger* 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.
- Malvessi, E. (2000) Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS.
- Malvessi, E. & Silveira, M. M. (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, 47, 5: 693-702.
- Martin, N.; de Souza, S. R.; da Silva, R.; Gomes, E. (2004) Pectinases production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, 47, 5: 813-819.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31: 426.
- Mitchell, D. A. & Losane, B. K. (1992) Definition, characterization and potential. In: Doelle, H. W.; Mitchell, D. A.; Rolz, C. E. **Solid substrate cultivation**. Elsevier Science Publishers LTD.
- Mitchell, D. A.; Krieger, N.; Stuart, D. M.; Pandey, A. (2000) New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Proc. Biochem.**, 35: 1211-1225.
- Mo, H.; Zhang, X. Li, Z. (2004) Control of gas phase for enhanced cellulose production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Proc. Biochem.**, 39: 1293-1297.

- Nagai, S. (1979) Mass and energy balances for microbial growth kinetics. **Adv. Biochem. Eng.**, 11: 49-83.
- Naidu, G. S. & Panda, T. (2003) Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochem. Eng. J.**, 16: 57-67.
- Panarotto, C., Malvessi, E., Silveira, M. M. Avaliação de cascas de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Sinaferm, agosto de 2003.
- Pandey, A. (2003) Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, 13: 81-84.
- Pedruzzi, I.; Agostini, F.; Dillon, A.J.P. & Silveira, M.M. (2001) Extração de óleo essencial de limão Taiti (*Citrus latifolia*) com pectinases e celulases. In: VII Seminar on Enzymatic Hydrolysis of Biomass (VII SHEB), CD-ROM. **Anais**. Maringá, PR, 2001.
- Phutela, U.; Dhuna, V.; Sandhu, S.; Chadha, B. S. (2005) Pectinase and polygalacturonasee production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposition orange peels. **Braz. J. Microbiol.**, 36: 63-69.
- Prado, F. C.; Vanderberghe, S. L. P.; Soccol, C. R. (2005) Relation between citric acid production by solid-state fermentation from cassava bagasse and respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in semi-pilot scale. **Braz. J. Biol. Technol.**, 48: 29-36.
- Raghavarao, K. S. M. S.; Ranganathan, T. V.; Karanth, N. G. (2003) Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, 13: 127-135.
- Ridder, E. R.; Nokes, S. E.; Knutson, B. L. (1999) Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. **Trans. ASAE**, v.42, 6: 1785-1790
- Rombouts, E. M. & Pilnik, W. (1980) Pectic Enzymes. In: Rose, A . Ed. Economic Microb. London: Academic Press, 5: 227-282.

- Santos, M. M.; Rosa, A. S.; Dal'Boit, S.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. (2004) Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresour. Technol.**, 93: 261-268.
- Schmidell, W. (2001) In: Schmidell, W.; Lima, V.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotechnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. Vol. 2. pp 277-331.
- Schmidell, W. & Facciotti, M. C. R. (2001) In: Schmidell, W.; Lima, V.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotechnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. Vol. 2. pp 179-184.
- Shuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J. C.; Dijck, P. W. M. (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 59: 426-435.
- Silva, D.; Martins, E. S.; Silva, R.; Gomes, E. (2002) Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Braz. J. Microbiol.**, 33: 318-324.
- Silva, D.; Tokuioshi, K.; Martins, E. S.; Silva, R.; Gomes, E. (2005) Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Proc. Biochem.**, 40: 2885-2889.
- Singh, S. A.; Ramakrishna, M.; Appu Rao, A. G. (1999) Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented brans of *Aspergillus carbonarius*. **Proc. Biochem.**, 35: 411-417.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 95: 267-272
- Souza, J. V. B.; Silva, E. S.; Maia, M. L. S.; Teixeira, M. F. S. (2003) Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2A. UMIDA.1. **Proc. Biochem.**, 39: 455-458.
- Tao, S.; Beihui, L.; Zuohu, L.; Deming, L. (1999) Effects of air pressure amplitude on cellulase productivity by *Trichoderma viride* SL-1 in periodic pressure solid state fermenter. **Proc. Biochem.**, 34: 25-29.

- Vanderberghe, L. P. S.; Soccol, C. R.; Pandey, A. (2000) Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.**, 74: 175-178.
- Villegas, E.; Aubague, S.; Alcântara, L.; Auria, R.; Revah, S. (1993) Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. **Biotech. Adv.**, 11: 387-397.
- Viniegra-González, G.; Favela-Torre, E. Aguilar, C. N.; Romero-Gomez, S. J.; Díaz-Godínez, D.; Augur, C. (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochem. Eng. J.**, 13: 157-167.
- Zabriskie, D.; Humphrey, A. E. (1978) Real time estimation of aerobic and haze formation in fruit juices. **AIHE J.**, 24: 138-146.
- Zhang, X.; Mo, H.; Zhang, J.; Li, Z. (2003) A solid-state bioreactor coupled with forced aeration and pressure oscillation. **Biotechnol. Lett.**, 25: 417-420.
- Zhao, H.; Zhang, X.; Zhou, X.; Li, Z. (2001) Effects of air pressure oscillation amplitude on oxygen transfer rate and biomass productivity in a solid-state fermenter. **Biotechnol. Lett.**, 23: 1197-1200.