

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES EM PROCESSO
SUBMERSO EM BIORREATORES DE AGITAÇÃO MECÂNICA E *AIRLIFT***

ROSELEI CLAUDETE FONTANA

Caxias do Sul, 2009

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

F679e Fontana, Roselei Claudete

Estudo da produção de poligalacturonases em processo submerso em biorreatores de agitação mecânica e *airlift* / Roselei Claudete Fontana. - 2009.

vi, 155 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.

Apresenta bibliografia.

Orientação: Prof. Dr. Mauricio M. Da Silveira

1. Enzimas. 2. Pectinase. I. Título.

CDU: 577.15

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|--------------|-------------------|
| 1. Enzimas | 577.15 |
| 2. Pectinase | 577.15:547.458.88 |

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Carvalho Rodrigues – CRB 10/1411

ROSELEI CLAUDETE FONTANA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES EM PROCESSO
SUBMERSO EM BIORREATORES DE AGITAÇÃO MECÂNICA E *AIRLIFT***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, Visando a Obtenção de Grau de Doutor em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira

Caxias do Sul, 2009

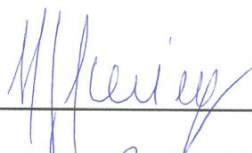
ROSELEI CLAUDETE FONTANA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES EM PROCESSO SUBMERSO
EM BIORREATORES DE AGITAÇÃO MECÂNICA E *AIRLIFT***

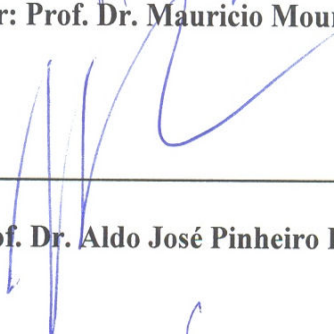
Tese Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, Visando a Obtenção de Grau de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira

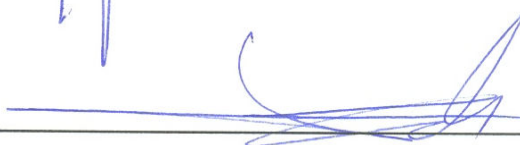
TESE APROVADA EM 20 DE JULHO DE 2009



Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira



Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa



Profa. Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro

AGRADECIMENTOS

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada, há os que deixam muito, mas há os que não deixam nada. A maior responsabilidade de nossa vida é a certeza de que as pessoas não se encontram por acaso"

Antoine de Saint-Exupéry

Por esta razão, quero expressar o meu sincero agradecimento:

À Deus por me conduzir em meus caminhos, orientar em minhas decisões e estar sempre presente iluminando minha vida.

Aos meus pais, Jamil e Josefa Fontana, pela longa espera e compreensão durante todos estes anos de ausência.

Ao Charles Mauro Canci, pelo carinho, pelo companheirismo e pelo amor incondicional, pois sei que você é uma das pessoas que quero levar pra sempre comigo, no meu coração.

Ao professor Mauricio Moura da Silveira, pela orientação, pelos seus ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

À minha amiga Sabrina Carra pela mão amiga, pela cumplicidade e pela sua amizade tão sincera. Descobri que quem tem um amigo fiel, tem um tesouro e eu reconheço que a sua amizade é um presente e isso nunca vai mudar.

À minha amiga Ivana Greice Sandri, pela atenção, carinho e amizade. Você é uma daquelas pessoas especiais com o objetivo valioso de proporcionar alegria às pessoas que lhe cercam.

À bolsista Débora M. Barfknecht pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho experimental e, em especial pela amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade de Caxias do Sul (UCS) pelo suporte financeiro a esse trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Bioprocessos, Laboratório de Enzimas e Biomassa e Laboratório de Óleos Essenciais, pela disponibilização dos equipamentos.

Aos professores Aldo José Pinheiro Dillon e Rute Terezinha da Silva Ribeiro, pela disponibilidade em colaborar na elaboração deste trabalho.

Enfim, a todos que torceram pela concretização deste sonho!

ÍNDICE

NOMENCLATURA.....	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Substâncias pécticas e enzimas pectinolíticas	3
2.2 Aplicações das pectinases e microrganismos produtores	7
2.3 Processos submerso e em estado sólido	9
2.4 Principais fatores que influenciam na produção de pectinases em cultivo submerso	11
2.4.1 Meio de cultivo	11
2.4.2 Temperatura e pH	15
2.5 Biorreatores e regimes de operação utilizados em processos submersos	17
2.5.1 Biorreatores com agitação mecânica	20
2.5.2 Biorreator <i>airlift</i>	22
2.5.3 Aplicações do biorreator <i>airlift</i> de circulação interna e externa	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Microrganismo	27
3.2 Meios de cultivo	27
3.3 Condições experimentais	29
3.4 Métodos analíticos	31
3.4.1 Amostragem e determinação do pH	31
3.4.2 Determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)	31
3.4.3 Atividade de exo-poligalacturonase (Exo-PG)	32
3.4.4 Atividade de endo-poligalacturonase (Endo-PG)	34
3.4.5 Concentração celular	36
3.4.6 Coeficiente volumétrico da transferência de oxigênio (k_La) em meio isento de células	36
3.4.7 Planejamento experimental	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Caracterização de um cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de agitação mecânica (STR)	42
4.2 Construção de biorreator <i>airlift</i> de circulação interna e externa em escala de bancada	45

4.2.1 Influência do desenho do aerador sobre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em biorreator <i>airlift</i> de circulação interna	46
4.2.2 Influência da geometria do <i>riser</i> sobre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em biorreator <i>airlift</i> de circulação interna	47
4.3 Artigo 1: Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by <i>Aspergillus oryzae</i>	49
4.4 Artigo 2: Influence of pectin, glucose, and pH on the production of polygalacturonases by <i>Aspergillus oryzae</i> in liquid medium.....	71
4.5 Artigo 3: Produção de poligalacturonases por <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreatores de agitação mecânica e <i>airlift</i> de circulação interna e externa	87
4.6 Artigo 4: Avaliação de diferentes concentrações de sais no meio de produção de poligalacturonases por <i>Aspergillus oryzae</i>	109
4.7 Discussão geral	125
5. CONCLUSÕES.....	128
6. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	130

NOMENCLATURA

a e b – coeficientes da curva de calibração na análise de endo-poligalacturonase

A – redução percentual de viscosidade de solução de pectina

AR – açúcares redutores

ART – açúcares redutores totais

C – concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio

C^* – concentração de oxigênio dissolvido num dado instante

C_{AG} - concentração de ácido galacturônico (mg/L)

dC/dt – variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo (mmol/L/h)

dil. – diluição em análises enzimáticas

DNS – ácido 3,5 dinitrosalicílico

Endo-PG – endo-poligalacturonase (U/mL)

$\text{Endo-PG}_{\max}$ – máxima atividade de endo-poligalacturonase (U/mL)

Exo-PG – exo-poligalacturonase (U/mL)

$\text{Exo-PG}_{\max}$ – máxima atividade de exo-poligalacturonase (U/mL)

FES – fermentação em estado sólido

FSm – fermentação submersa

K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

MC – meio de conservação

OD – oxigênio dissolvido

P - atividade enzimática de endo-poligalacturonase (U/mL)

$P_{\text{endo-PG}}$ –produtividade de endo-poligalacturonase

$P_{\text{exo-PG}}$ –produtividade de exo-poligalacturonase

$pH_{\min}$ - valor de pH mínimo

pH_{final} - valor do pH em 96 h de processo

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

S_0 – concentração inicial de substrato (glicose)

S_{cons} - substrato consumido

STR – biorreator de agitação mecânica

t – tempo (h)

$t_{\text{PG,max}}$ - tempo em que foi atingida a máxima atividade de endo e exo-PG

t_{Xmax} - tempo de máxima concentração celular

U - unidade

V – volume do meio de cultura (L)

v – volume de preparação enzimática utilizada na análise de endo-PG (3,2 mL)

V_e – volume de preparação enzimática diluída utilizada

V_t – volume total na reação enzimática (2,05 mL)

vvm – vazão volumétrica específica de ar

WB – meio de produção de poligalacturonases formulado com farelo de trigo

WBE – meio de produção de poligalacturonases formulado com extrato de farelo de trigo

X – concentração celular (g/L)

X_{max} - concentração celular máxima

$Y_{\text{x/rs}}$ – fator de rendimento em células

$Y_{\text{endo-PG}}$ – fator de rendimento em endo-poligalacturonase

$Y_{\text{exo-PG}}$ – fator de rendimento em exo-poligalacturonase

RESUMO

Nesse trabalho, foi estudada a produção de endo e exo-poligalacturonases (PG) por *Aspergillus oryzae* IPT 301, em biorreatores com agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna e externa em escala de bancada.

Utilizando um planejamento experimental, foi definida uma formulação de meio isento de sólidos em suspensão (WBE), com o qual foram obtidas atividades máximas de endo e exo-PG comparáveis com as atingidas com um meio formulado com farelo de trigo integral. Com o meio WBE, a produção de PG foi comparada em STR e *airlift* de circulação interna. Nesses ensaios, foram alcançadas atividades superiores de endo-PG (91,3 unidades por mililitro de meio, U/mL) e exo-PG (65,2 U/mL) com o STR, enquanto que com o biorreator *airlift* as atividades máximas de endo-PG e exo-PG foram 86,2 U/mL e 60,6 U/mL, respectivamente. Esses resultados demonstram a viabilidade do emprego da configuração *airlift* na produção de poligalacturonases por *A. oryzae*.

Em cultivos em STR, foi avaliada a influência da presença, no meio WBE, de diferentes concentrações de pectina (0, 10 e 20 g/L) e glicose (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 g/L) sobre o processo. Adicionalmente, em meios contendo 20 g/L de pectina e 20, 30 e 50 g/L de glicose, o pH foi controlado em um valor mínimo de 2,7. Nos testes em que o pH foi controlado nesse valor mínimo, foi observado um forte incremento das atividades de endo e exo-PG, destacando-se a concentração de glicose de 30 g/L com a qual atividades enzimáticas de 175,0 U/mL de endo-PG e 103,0 U/mL de exo-PG foram obtidas.

Em STR, foram ainda testados meios de cultivo formulados com pectina em sua forma normal (WBE) e pectina que sofreu hidrólise enzimática parcial, com o fim de promover a redução da viscosidade do meio e, dessa forma, favorecer a transferência de oxigênio para o cultivo. Numa das condições testadas (WBE5), o meio foi formulado com

metade da pectina parcialmente hidrolisada e com a outra metade não tratada. Nessa condição, atividades de endo-PG de 149,0 U/mL e de exo-PG de 82,2 U/mL foram obtidas, enquanto que com o uso do meio com a pectina integral atividades estatisticamente inferiores – 130,0 e 78,0 U/mL, respectivamente – foram determinadas.

A produção de PG foi avaliada na condição WBE5 e na condição WBE6, com pectina não hidrolisada, em que os sais nutrientes foram adicionados parceladamente ao meio durante o cultivo, em biorreatores STR e *airlift* de circulação interna e externa. Após 96 h de processo, atividade superior de endo-PG (145,0 U/mL) foi atingida no STR, na condição WBE5, seguindo-se a condição WBE6 (140,0 U/mL) no mesmo reator. Em biorreatores *airlift*, títulos superiores de endo-PG (116,0 U/mL) e exo-PG (80,4 U/mL) foram atingidos no sistema de circulação externa, na condição WBE6, observando-se, para exo-PG, atividade semelhante à obtida no STR.

O processo foi avaliado em meios com diferentes concentrações de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 . Em análises individuais de cada um desses sais, em ensaios em frascos agitados, evidenciou-se a influência das concentrações de sulfatos de NH_4^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} sobre a produção de poligalacturonases. Em STR, sob condições controladas, foi comparada a produção enzimática no meio padrão WBE e com diferentes condições de adição dos sais ao cultivo. Entre as condições avaliadas em STR, as mais altas atividades de endo-PG (175 U/mL) e de exo-PG (86,5 U/mL) foram atingidas quando KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 foram adicionados parceladamente ao meio durante o processo, com ganho significativo em relação ao meio WBE em que essas atividades alcançaram 130,0 e 78,6 U/mL, respectivamente.

Os resultados do presente trabalho demonstram o alto potencial dos biorreatores *airlift*, como um sistema de relativa simplicidade de construção e operação, para a produção de poligalacturonases em grande escala.

ABSTRACT

In this work, the production of endo and exo-polygalacturonase (PG) by *Aspergillus oryzae* IPT 301 was studied in a stirred tank bioreactor (STR) and in airlift bioreactors with internal and external circulation loop.

Using a factorial experimental design, a soluble culture medium (WBE) was defined which allowed the production of exo and endo-PG comparable to that obtained in a medium containing suspended wheat bran. With the WBE medium, the production of PG was compared in STR and internal-circulation-airlift bioreactor. In these tests, superior enzymatic activities for both endo-PG (91.3 units per mL of medium, U/mL) and exo-PG (65.2 U/mL) were obtained in the STR, whereas in the airlift reactor the maximum activities were 86.2 U/mL and 60.6 U/mL, respectively. These results indicate the feasibility of airlift reactors for producing polygalacturonases by *A. oryzae*.

In STR cultivations, the influence of different concentrations of pectin (0, 10, and 20 g/L) and glucose (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 g/L), in WBE medium, on the process was assessed. Furthermore, in media containing 20 g/L pectin and 20, 30, and 50 g/L glucose, tests where pH was controlled to a minimum value of 2.7 were carried out. In tests where pH was controlled to this minimum value, strong improvement of both endo and exo-PG activities was attained, especially in the run with 30 g/L glucose in which enzyme activities of 175.0 U/mL for endo-PG and 103.0 U/mL for exo-PG.

In STR, cultivation media formulated with regular pectin (WBE) and with partially enzyme-hydrolysed pectin – to reduce the viscosity of medium and as such to improve the oxygen transfer to the culture – were evaluated. In one condition (WBE5), the medium was formulated with half of the pectin partially hydrolysed and half of the pectin untreated. In this condition, activities of endo-PG of 149.0 U/mL and exo-PG of 82.2 U/mL were achieved,

whereas with the non-hydrolysed-pectin medium statistically inferior activities – 130.0 and 78.0 U/mL, respectively – were measured.

PG production was compared in STR and in both airlift bioreactors (internal and external circulation loop), using the condition WBE5 and a further condition (WBE6), with non-hydrolysed pectin medium, in which the nutrient salts were fed to the medium in lots during the cultivation. After 96 h of process, a higher activity of endo-PG (145.0 U/mL) was attained in STR followed by the condition WBE6 in the same reactor (140.0 U/mL). In airlift bioreactors, superior titres of endo-PG (116.0 U/mL) and exo-PG (80.4 U/mL) were obtained in the condition WBE6, with the external loop configuration, the activity of exo-PG being similar to that measured in STR.

The process was evaluated in media with different concentrations of KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 . In individual analysis of each salt, performed in shake-flasks experiments, the influence of the concentrations of NH_4^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} sulphates on the production of polygalacturonases was evidenced. In STR, under controlled conditions, the enzyme production in WBE medium was compared with different conditions of salt feeding to the culture. Among the conditions tested in STR, the highest activities for endo-PG (175.0 U/mL) and exo-PG (86.5 U/mL) were achieved when KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 were fed to the medium in lots, with a significant improvement in comparison to the use of WBE medium that resulted in activities of 130.0 and 78.6 U/mL, respectively.

The results of this work reveal the high potential of airlift bioreactors as a relatively simple building operating system to be used in large-scale polygalacturonase production.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e correlatos. Entre essas enzimas, destacam-se as enzimas pectinolíticas, ou pectinases, que atuam sobre substâncias pécticas, que fazem parte da composição da parede celular dos vegetais, provocando a sua despolimerização e desesterificação.

As enzimas pectinolíticas têm ampla aplicação, especialmente no processamento de frutas e vegetais, na produção de vinhos e sucos de frutas e na extração de óleos vegetais, tendo ainda utilizações nas indústrias de papel e têxtil, entre outras.

As enzimas pectinolíticas podem ser obtidas tanto por processo fermentativo submerso (FSm) como por processo fermentativo em estado sólido (FES). Muitos trabalhos se referem à maior produção de enzimas pectinolíticas em FES e, por outro lado, à maior facilidade de acompanhamento e controle em FSm com relação a parâmetros como pH, temperatura e suprimento de oxigênio. Entretanto, no caso de maiores escalas de produção, os processos em estado sólido apresentam seríssimas limitações com respeito ao controle de parâmetros operacionais críticos como o suprimento de oxigênio e o controle de temperatura, especialmente em reatores de coluna e de tambor rotativo. Em processos submersos, por sua vez, normalmente são utilizados reatores com agitação mecânica que apresentam dois problemas principais: i) a elevada tensão de cisalhamento, que pode levar à destruição parcial do micélio; ii) a necessidade de aplicação de grande potência ao eixo do agitador para manter o sistema homogêneo e auxiliar na transferência de oxigênio para o cultivo.

A produção de pectinases é feita com meios que contêm uma fonte de indutor de atividade enzimática (pectina), sendo que, tanto para processo em estado sólido como para submerso, os melhores resultados relatados foram obtidos com formulações contendo resíduos da agroindústria, como o farelo de trigo. Em FSm, com a presença dos elevados teores de

sólidos em suspensão, característicos desse tipo de meio, a operação é dificultada em aspectos como a transferência de oxigênio, a homogeneização e a condução do sistema em regimes descontínuo alimentado ou contínuo.

Nesse contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi comparar a produção de endo e exo-poligalacturonases por *Aspergillus oryzae*, em processo submerso, utilizando biorreatores *airlift* e com agitação mecânica. Para que o objetivo geral fosse alcançado, foram desenvolvidas atividades que focaram os seguintes objetivos específicos:

- . construir biorreatores *airlift* de circulação interna e de circulação externa em escala de bancada;
- . definir formulações de meio de cultivo isentos de sólidos em suspensão que permitam a obtenção de atividades enzimáticas elevadas, em condições reológicas favoráveis à condução do processo, especialmente com biorreatores *airlift*;
- . aprofundar o conhecimento sobre a produção de poligalacturonases por *A. oryzae* em processo submerso, em biorreatores de agitação mecânica e *airlift*, principalmente com respeito a parâmetros como o pH e a transferência de oxigênio para o meio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Substâncias pécticas e enzimas pectinolíticas

Substâncias pécticas são heteropolissacarídeos estruturais que ocorrem principalmente na lamela média e na parede celular de plantas superiores, em quantidades não excedentes a 1% (Rombouts & Pilnik, 1980), representadas por moléculas ácidas (homogalacturonanas e ramnogalacturonanas) e neutras (arabinanas, galactanas, arabinogalactanas) (Willats *et al.* 2001; Riberéau-Gayon *et al.* 2003; Nakagawa *et al.* 2004). As ramnogalacturonanas são formadas por unidades de ácido galacturônico entremeadas de unidades de ramnose, com cadeias laterais compostas de galactose e arabinose. Por sua vez, as homogalacturonanas são formadas por unidades de ácido galacturônico, podendo ser subdivididas em dois grupos: as pectinas, que se caracterizam por ter, pelo menos, 75% dos seus grupos carboxila esterificados com radicais metoxila (Whitaker, 1984), e o ácido poligalacturônico, ou péctico, em que as carboxilas das unidades de ácido galacturônico não se encontram esterificadas.

Em presença de Ca^{+2} , as cadeias pécticas com baixo grau de metilesterificação associam-se, formando um gel rígido e insolúvel. Essa forma é frequentemente encontrada em paredes de células maduras que cessaram seu crescimento (Willats *at al.* 2001). O grau de metilesterificação tem influência sobre as propriedades gelificantes das pectinas e também limita ou impede a ação de pectinases sobre os polissacarídeos (Sakai *et al.* 1993).

De acordo com a American Chemical Society (Kertesz, 1951), as substâncias pécticas, apresentam as subdivisões apresentadas na sequência.

Protopectina

Essa denominação se refere a substâncias pécticas insolúveis em água. A maior parte das pectinas de frutas imaturas está presente como protopectina; com o amadurecimento, é

convertida em pectina solúvel. O tamanho do polímero e a presença de cátions divalentes como Ca^{+2} estão relacionados com a insolubilidade. Sob ação enzimática, forma-se pectina, ácidos pectínicos e por fim ácido péctico.

Pectina

É o material polimérico solúvel em água, no qual pelo menos 75% dos grupos carboxílicos das unidades de ácido galacturônico estão metoxilados.

Ácido péctico

São substâncias pécticas compostas de ácido poligalacturônico coloidal, completamente isentas de grupos metoxila.

Ácido pectínico

São ácidos poligalacturônicos coloidais que possuem um número significativo de grupos metil éster. Esses, em adequadas condições, podem formar gel com açúcares e ácidos e, caso o conteúdo em metoxila seja reduzido, formar gel com alguns íons metálicos.

Os polissacarídeos pécticos são solúveis em água e outros solventes, tais como dimetilsulfóxido, formamida e glicerol, a quente, e insolúveis na maioria dos principais solventes orgânicos. A facilidade de dissolução em água diminui com o aumento do comprimento da cadeia. Soluções aquosas de pectina 1-2% (m/v) são altamente viscosas. Essa viscosidade é função, principalmente, do peso molecular, mas é também influenciada pelo grau de esterificação, força iônica, pH, temperatura e concentração (Fogarty & Kelly, 1983).

As enzimas pectinolíticas são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras, nematoides, insetos e plantas (Pilnik & Rombouts, 1981). Essas enzimas

correspondem a um grupo de enzimas que atuam sobre substâncias pécticas através de reações de hidrólise e de trans-eliminação, provocando a despolimerização das moléculas, e através de reações de desesterificação, hidrolisando a ligação éster entre os grupos carboxila e metil das pectinas (Kashyap *et al.* 2001).

Existe uma grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos de plantas, e dependendo de seu mecanismo de ação sobre essas substâncias, as enzimas pécticas são divididas em despolimerizantes e desmetoxilante. As enzimas despolimerizantes agem catalisando a quebra das ligações α -1,4 da cadeia principal do polissacarídeo péctico, enquanto a desmetoxilante desesterifica a pectina a ácido péctico por remoção dos resíduos metoxila (Pilnik & Rombouts, 1981; Kashyap *et al.* 2001).

De acordo com Kashyap *et al.* (2001), pectinases despolimerizantes são classificadas segundo os critérios:

- modo pelo qual a ligação é rompida (hidrólise ou trans-eliminação);
- posição de ataque no substrato (endopectinase ou exopectinase);
- tipo de substrato hidrolisado (ácido péctico ou pectina).

As enzimas incluídas no grupo das pectinases, segundo Kashyap *et al.* (2001), são apresentadas em seguida.

Poligalacturonases (PG)

- Endo-PG (E.C.3.2.1.15): hidrolisa aleatoriamente as ligações α -1,4 entre unidades de ácido poligalacturônico.
- Exo-PG 1 (E.C.3.2.1.67): hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico, a partir da extremidade não-redutora, liberando ácidos galacturônicos.
- Exo-PG 2 (E.C.3.2.1.82): hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico, a partir do terminal não-redutor, liberando ácidos digalacturônicos.

Na Figura 1 é ilustrado o modo de ação das enzimas endo e exo-poligalacturonase, objetos de estudo desse trabalho.

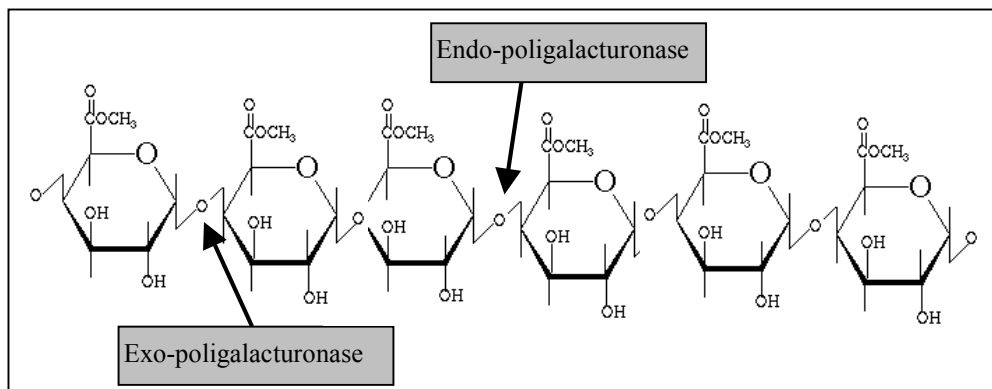


Figura 1. Modo de ação da endo e da exo-poligalacturonase (www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy33/jugos01.htm).

Polimetilgalacturonases (PMG)

- Endo-PMG: hidrolisa a pectina aleatoriamente.
- Exo-PMG: hidrolisa a pectina sucessivamente.

Polimetilgalacturonato liases (PMGL)

- Endo-PMGL ou endo-pectina liase (E.C.4.2.2.10): rompe as ligações glicosídicas entre resíduos de ácidos galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação.
- Exo-PMGL ou exo pectina liase: causa a quebra da pectina, sequencialmente, por trans-eliminação.

Poligalacturonato liases (PGL)

- Endo-PGL ou endo-pectato liase (E.C.4.2.2.2): rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido pécico por trans-eliminação.
- Exo-PGL ou exo-pectato liase (E.C.4.2.2.9): rompe as ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, a partir de terminais não-redutores.

A classificação “enzima pectinolítica desmetoxilante” inclui apenas uma representante, a pectinesterase (PE) (E.C.3.1.1.11), que catalisa a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, transformando-a em ácido péctico e liberando metanol.

2.2 Aplicações das pectinases e microrganismos produtores

Na década de 1930, quando foi intensificada a produção industrial de sucos de frutas, o rendimento do processo era baixo e muitas dificuldades eram encontradas para filtrar os sucos e atingir uma clarificação estável. A partir de então, pesquisas utilizando pectinases, celulasas e hemicelulasas de microrganismos, juntamente com o conhecimento dos componentes vegetais das frutas, diminuíram essas dificuldades (Jayani *et al.* 2005).

As enzimas pectinolíticas são extensivamente usadas na indústria para clarificação de vinhos e sucos de frutas, devido à sua ação na degradação de substâncias pécticas que são constituintes das frutas (Spagna *et al.* 1995; Alkorta *et al.* 1998; Hansen, 2003; Uenojo & Pastore, 2007). O tratamento de frutas com enzimas pectinolíticas auxilia o processo de extração e ainda diminui a viscosidade e a turbidez dos sucos. A extração é facilitada pela desintegração dos tecidos, aumentando assim o rendimento do suco e melhorando o rendimento de substâncias contidas no fruto (substâncias que conferem aroma e cor), promovendo a clarificação dos sucos, liquefazendo completamente o fruto e aumentando o rendimento em polpa (Blanco *et al.* 1999; Bastos *et al.* 2002; Hoondal *et al.* 2002).

Muitos estudos têm sido realizados sobre aplicações de enzimas pectinolíticas, não somente em processamento de alimentos, mas também para outras aplicações industriais (Tabela 1).

Tabela 1. Principais aplicações das enzimas pectinolíticas.

Aplicações	Referências
Clarificação de sucos e vinhos	Reid & Ricard, (2000); Hoondal <i>et al.</i> (2002); Gummadi & Panda (2003); Busto <i>et al.</i> (2006)
Tratamento e a degomagem de fibras vegetais, processo de cura de café, cacau e tabaco.	Nair & Panda, (1997); Kashyap <i>et al.</i> (2001); Kapoor <i>et al.</i> (2001); Sharma & Satyanarayana (2006); Silva <i>et al.</i> (2000)
Extração de óleos essenciais e pigmentos de materiais vegetais	Coelho <i>et al.</i> (1995); Hoondal <i>et al.</i> (2002); Gummadi & Panda, (2003); Hadj-Taieb <i>et al.</i> (2006)
Indústria têxtil e de papel	Reid & Ricard, (2000); Olsson <i>et al.</i> (2003); Kaur <i>et al.</i> (2004); Jayani <i>et al.</i> (2005); Sharma & Satyanarayana (2006)

As substâncias pécticas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, produzidas em diferentes combinações pelas plantas e por microrganismos como fungos, leveduras e bactérias. Diversos microrganismos como *Bacillus*, *Erwinia*, *Khuyveromyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Penicillium* e *Fusarium* são conhecidos como bons produtores de pectinases (De Gregorio *et al.* 2002; Kashyap *et al.* 2001). Na produção em larga escala, entretanto, é utilizado o fungo *Aspergillus niger*, visto que essa espécie recebe a classificação GRAS ("generally recognized as safe") do FDA, órgão do governo dos EUA responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, cujas normas são internacionalmente aceitas. Nesse caso, é importante lembrar que as principais aplicações das pectinases dão-se na indústria de alimentos (Schuster *et al.* 2002). O uso de outros fungos, como *Aspergillus oryzae* (Maiorano, 1990; Kapritchkoff, 1996), *Penicillium italicum* e *Penicillium expansum* (Alkorta *et al.* 1998; Fernandes-Salomão *et al.* 1996), também é relatado.

Condições de processo, como as concentrações de oxigênio dissolvido, substrato, nitrogênio, fosfato e micronutrientes, além do pH e do teor de inóculo, afetam de forma distinta a morfologia de diferentes linhagens dos fungos. Consequentemente, essas condições devem ser avaliadas a fim de que favoreçam o desenvolvimento e a produção pelo

microrganismo. Acuña-Arguelles *et al.* (1995) relataram distintas respostas fisiológicas com a mesma linhagem de *A. niger*, de acordo com a técnica de fermentação utilizada, mostrando vantagens na produção de pectinases em estado sólido sobre o processo submerso. Por outro lado, a necessidade de seleção de linhagens adaptadas a cada tipo de produção foi enfatizada por Minjarres-Carranco *et al.* (1997).

2.3 Processos submerso e em estado sólido

Para a produção de enzimas microbianas são utilizados basicamente, dois tipos de processos, classificados conforme a quantidade de água no meio:

- processo submerso, caracterizado pela presença de água livre;
- processo em estado sólido, também denominado processo semi-sólido, que se caracteriza pela ausência de água livre e um máximo de 80% de umidade no meio (Cannel & Moo-Young, 1980).

Esses dois tipos de processo apresentam, devido a suas características, vantagens e desvantagens, como é exemplificado a seguir a partir do trabalho de Cannel & Moo-Young (1980):

- devido à ausência de água livre, os sistemas em estado sólido operam com menores volumes e não exigem a remoção de grandes volumes de água para a concentração do produto;
- baixo grau de umidade nos sistemas sólidos, torna o ambiente inapropriado para muitos microrganismos potencialmente contaminantes;
- nos sistemas submersos, a remoção de calor decorrente do processo é facilitada;
- o controle de parâmetros de processo, como pH, suprimento de oxigênio e temperatura é muito mais simples em sistemas submersos;

- o conhecimento de engenharia de processo dos sistemas submersos é incomparavelmente maior que o dos sistemas em estado sólido.

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.

O cultivo em estado sólido apresenta algumas limitações que devem ser levadas em consideração em operações em grande escala, destacando-se o fato de o metabolismo do microrganismo gerar calor que é removido com grande dificuldade, ao contrário dos cultivos submersos em que a grande quantidade de água presente no meio facilita o controle da temperatura (Lonsane *et al.* 1991). Segundo os mesmos autores, outro fator a ser considerado é a heterogeneidade da mistura no cultivo em estado sólido que dificulta o controle dos parâmetros de processo mais importantes como o crescimento microbiano.

Muitos dos estudos sobre a produção de pectinases têm sido feitos em processo submerso. Entretanto, parece haver um consenso entre muitos pesquisadores que quantidades significativas de pectinases podem ser obtidas em processo em estado sólido, com a vantagem que o espectro de tipos diferentes de enzimas produzidas é maior nesse tipo de processo. Na produção de pectinases em processo submerso em batelada por fungos filamentosos, fatores como a temperatura, o pH, o suprimento de oxigênio, o cisalhamento provocado pela agitação e a formulação do meio de cultivo, entre outros, exercem uma grande influência sobre os resultados do processo. Para a maioria desses parâmetros – como, por exemplo, o pH e o cisalhamento (Kapritchkoff, 1996), temperatura (Bailey, 1990) e suprimento de oxigênio - existem estudos descritos na literatura. Esses trabalhos, entretanto, são específicos para determinadas linhagens microbianas, em geral pertencentes ao gênero *Aspergillus*. A seguir

serão citados diversos fatores que afetam a produção de poligalacturonases em cultivo submerso.

2.4 Principais fatores que influenciam na produção de pectinases em cultivo submerso

Os principais fatores que afetam a produção de poligalacturonases são: temperatura, pH, fonte de nitrogênio e fosfatos, concentração de nutrientes, concentração de oxigênio dissolvido, fonte de carbono e indutor. Em cultivos submersos, esses fatores apresentam controle relativamente simples, devido à relativa simplicidade de homogeneização do meio de cultivo.

2.4.1 Meio de cultivo

A produção de enzimas microbianas requer uma consideração especial quanto a elaboração dos meios de cultivo, visto que esses podem conter substâncias que influenciam os fenômenos de indução, repressão catabólica e inibição de produção e, em caso de enzimas extracelulares, os mecanismos de liberação de proteínas (Galiotou-Panayotou, 1997).

Thomas *et al.* (1996) relatam que a produção de enzimas comporta-se de maneira diferente dependendo do tipo de nutriente limitante. Além da fonte de carbono adequada, outros nutrientes podem ser igualmente importantes na composição do meio.

Na grande maioria dos estudos sobre a síntese de pectinases por fungos, os meios de cultivo empregados apresentam concentrações balanceadas de pectina com açúcares como glicose e lactose. Apesar de alguns autores se referirem à pectina como fonte de carbono, nem sempre são apresentadas constatações científicas de que a mesma esteja sendo de fato consumida. Em contraste, o metabolismo da síntese de pectinases por bactéria apresenta vasto estudo científico (Pilnik & Rombouts, 1981). Por outro lado, em estudos de cultivo em estado

sólido em meios com diferentes concentrações de pectina cítrica, Fontana *et al.* (2005) verificaram incremento do crescimento de *A. niger* com o aumento do teor de pectina, até certo nível, e sugeriram que o fungo utilizou produtos de hidrólise do polissacarídeo como fonte de carbono.

Segundo Rombouts & Pilnik (1980), meios de cultivo com adequado balanceamento de açúcares simples e pectina levam a melhores resultados na produção de enzimas pécnicas em processo submerso. Segundo os mesmos autores, a presença de pectina tem efeito indutor e favorece a excreção da enzima. No entanto, por razões econômicas, a pectina é normalmente substituída por resíduo agro-industriais com alto teor de pectina. De acordo com Aguilar & Huitron (1987), a adição de carboidratos como ácido galacturônico e glicose ao meio de produção de pectinases por *Aspergillus* sp. estimula a produção dessas enzimas.

Maldonado & Strasser (1998), avaliaram o efeito da adição de pectina (15 g/L) e glicose (5, 10 e 20 g/L) em cultivo submerso e em estado sólido. Observaram que a atividade de pectinesterase e poligalacturonase aumentou tanto em cultivo submerso como em estado sólido, mas o efeito da pectina e da glicose foi diferente, sendo que as atividades máximas foram maiores em cultivo em estado sólido. Em cultivo em estado sólido, atividades máximas foram obtidas utilizando 15 g/L de pectina e 10-20 g/L de glicose, em cultivo submerso maior atividade foi obtida utilizando somente 15 g/L de pectina. A produção da enzima é diferente nos cultivos submerso e em estado sólido, o efeito da glicose também é diferente, dessa maneira observa-se a necessidade de maiores estudos na formulação de meios de cultivo.

Entretanto, Aguilar & Huitrón (1990) demonstraram a produção de exo-pectinases constitutivas por *Aspergillus* sp CH-Y-1043 em diferentes fontes de carbono. Os mesmos autores, em trabalho anterior (Aguilar & Huitrón, 1987), estudando a influência exercida pelo ácido galacturônico e glicose, demonstraram que a síntese de enzimas pécnicas depende de um balanço entre indução e repressão, relação essa que é função da concentração do ácido

galacturônico resultante da degradação da pectina no meio de cultivo. Leone & Heuvel (1987) sugeriram que alguns microrganismos podem produzir baixos níveis de pectinases constitutivas, que degradam o polímero péctico, gerando moléculas menores, as quais servem como indutoras de outras pectinases e como fonte de energia para o crescimento celular.

Minussi *et al.* (1998) avaliaram diferentes indutores, além da pectina, na produção de pectina liase e poligalacturonases por *Penicillium griseoroseum*. O microrganismo foi cultivado em meio mineral suplementado com extrato de levedura, sacarose ou caldo de cana. A adição de caldo de cana promoveu maior formação de pectina liase e biomassa, quando comparado com a adição de pectina. Na presença de caldo de cana e extrato de levedura no meio, a produção de poligalacturonase foi semelhante à obtida na presença de sacarose e extrato de levedura ou pectina. Os autores observaram que, mesmo em baixas concentrações, o caldo de cana foi capaz de induzir a produção da pectina liase e poligalacturonases.

Said *et al.* (1991) utilizaram *Penicillium frequentans* para avaliar diferentes fontes de carbono como indutores da produção de pectinases em cultivo submerso. Maiores títulos enzimáticos de endo e exo-PG e pectinesterase foram obtidos em meios formulados com pectina, ácido poligalacturônico e cascas de cítrico. Utilizaram, também, arabinose, xilose, celobiose, celulose, frutose, galactose, glicose, maltose, manitol, manose e sacarose, tendo observado crescimento, mas não indução da atividade enzimática.

Solis-Pereira *et al.* (1993) avaliaram a formação de poligalacturonases em cultivo submerso na presença de glicose, sacarose e ácido galacturônico. Conforme os mesmos autores, a adição de glicose e sacarose no meio de cultivo diminui a atividade de endo e exo-poligalacturonases e que o ácido galacturônico induz mais a síntese de exo-poligalacturonase.

Moreira *et al.* (2005) avaliaram a produção de xilanase, pectinase e protease por *Myrothecium verrucaria*, utilizando diferentes fontes de carbono. De acordo com os mesmos autores a associação da pectina com outras fontes de carbono (amido, xilana e caseína)

resultaram em incremento da atividade de pectinases, quando comparado com meios formulados somente com pectina. Utilizando farelo de trigo, a atividade enzimática para as três enzimas foi elevada, justificado pela composição do substrato, rico em carboidratos solúveis e insolúveis e proteínas.

Braga *et al.* (1999) observaram que após o esgotamento da fonte de carbono exógena, nesse caso, a glicose, há o início da lise celular em várias espécies de fungos filamentosos. Segundo Reyes & Lahoz (1977), durante o crescimento há um balanço entre a síntese e a lise de polímeros que formam a parede celular. A presença da glicose no meio reprime a síntese de enzimas hidrolíticas, a qual é induzida pela presença de oligômeros e monômeros solúveis, presentes no meio. Essas substâncias são derivadas da degradação da parede celular.

Piccoli-Valle *et al.* (2001) avaliaram a produção de pectina liase por *P. griseoroseum* em meio mineral suplementado com extrato de levedura e sacarose. Maior atividade de pectina liase foi obtida em meio mineral com extrato de levedura, seguido pelo meio mineral, enquanto o meio com extrato de levedura apresentou atividade elevada no início do processo e, após, acentuado decréscimo. Utilizando meio não suplementado as atividades foram inferiores.

Galiotou-Panayotou *et al.* (1997) avaliaram diferentes condições de cultivo de *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 e verificaram que, na produção de endo e exopoligalacturonases, maiores títulos enzimáticos de endo e exo-PG foram obtidos utilizando 0,25% (m/v) de extrato de levedura. Geöze *et al.* (1995) reportaram que a suplementação do meio com 0,06% (m/v) de extrato de levedura, em cultivo de *Penicillium expansum*, provocou queda na atividade de exo-PG, atingindo atividade máxima entre 36-48h. Em meios não suplementados, a atividade máxima foi obtida entre 24-48h.

Em alguns trabalhos de produção de pectinases em FES e FSm, com *A. niger*, utilizou-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio no meio (Solis-Pereira *et al.* 1993; Maldonado & Strasser, 1998; Gouda *et al.* 1998). Entretanto, Galiotou-Panayotou *et al.* (1997), também utilizando uma linhagem de *A. niger*, observaram maiores atividades com fosfato de amônio e atividades inferiores com sulfato de amônio e nitratos de potássio ou de amônio.

O emprego de farelo de trigo em cultivos submersos para a produção de poligalacturonases tem apresentado resultados satisfatórios, destacando-se os trabalhos de Maiorano (1990), Kapritchkoff (1996) e Malvessi & Silveira (2004) em cultivos de *A. oryzae*. De acordo com Malvessi (2000), meios líquidos formulados sem farelo de trigo apresentam atividades de poligalacturonases inferiores, quando comparado aos meios formulados com farelo de trigo.

2.4.2 Temperatura e pH

Em sua maioria, em trabalhos em cultivo submerso para a produção de enzimas pectinolíticas, foram utilizadas temperaturas na faixa de 25 a 30°C: Maiorano (1990), com *A. niger* e *A. oryzae*, 30°C; Galiotou-Panayotou *et al.* (1997), com *Aspergillus* sp., 25°C; Malvessi & Silveira (2004), com *A. oryzae*, 28°C; Olsvik & Kristiansen (1992), com *A. niger*, 28°C.

Bailey (1990) em estudo sobre a produção de poligalacturonases por *A. niger* em cultivo submerso, observou que a temperatura ótima para a produção dessas enzimas depende da composição do meio de cultivo.

Segundo Fawole & Odunfa (2003) diferentes temperaturas apresentam diferentes efeitos sobre a produção de pectinases por *A. niger*. Esses autores avaliaram a produção de enzimas pectinolíticas em cultivo submerso de *A. niger*, em temperaturas entre 20 e 45°C,

tendo observado maior atividade enzimática e formação de biomassa a 40°C e, a 45°C, um acentuado decréscimo.

Ueda *et al.* (1982) avaliaram a influência do pH na produção e composição do complexo pectinolítico sintetizado por *A.oryzae* A-3. Foram feitos ensaios sem controle de pH e, controlando o pH em 4,0 e 6,0, e mantendo o pH em 4,0, por 24 h, seguindo-se de aumento para 8,5. Segundo os autores, cultivos fúngicos com pH controlado ou não resultam na formação de diferentes complexos pectinolíticos e as variações das atividades em função do pH do meio de cultivo pode estar relacionada ao perfil da curva de estabilidade com o pH, que cada enzima apresenta.

Kapritchkoff (1996) estudando a produção de pectinases em regime descontínuo com linhagem de *A. oryzae*, em FES e FSm, verificou atividades mais altas nos ensaios com pH 3,5 na fase exponencial, seguido de queda para pH 2,0 em 24 h e mantendo-se esse valor constante até o final do cultivo, e também com pH inicial de 4,0, sem controle, e com aumento para valores próximos a 3,0, em 20 e 40 h de cultivo.

Malvessi & Silveira (2004) testaram a influência do pH do meio sobre a produção de poligalacturonases por *A. oryzae* em processo submerso, verificando que o crescimento celular, foi favorecido em valores de pH em torno de 4,0 e que a formação de poligalacturonases foi maior em valores de pH em torno de 3,0. Observou-se acentuado decréscimo de atividades com o aumento do pH a níveis próximos da neutralidade. Em ensaios com pH 3,0 constante e com pH 4,0 inicial e controlado após decrescer naturalmente a 2,7, as atividades de ambas poligalacturonases não mostraram a tendência característica de queda ao final do processo.

Jin *et al.* (1999) avaliaram as linhagens DAR 1679, 3699 e 3863 de *A. oryzae* e observaram que as diferentes linhagens apresentaram morfologia distinta dependendo do pH:

micélio disperso, micélio plumoso, pedaços de micélio e *pellets* compactos. Esse comportamento é particularmente importante em cultivos em biorreator *airlift*.

2.5 Biorreatores e regimes de operação utilizados em processos submersos

Industrialmente, são utilizadas diferentes configurações de biorreatores em cultivos submersos, sendo a aplicabilidade de cada tipo de reator dependente do microrganismo e do que se pretende produzir. Na Figura 2, estão representadas algumas configurações básicas de biorreatores utilizados em cultivos submersos. Tradicionalmente, o tipo mais utilizado é o biorreator com agitação mecânica (STR). Embora muito utilizados, os biorreatores STR não são perfeitamente adequados para cultivo de microrganismos filamentosos sobretudo, porque o grau de agitação requerido para atingir a transferência de massa adequada, em muitos casos, causa danos aos microrganismos devido às zonas de alto cisalhamento das pás do agitador, além de caracterizar-se pelo alto consumo de energia (Royse, 1987; Chisti & Jauregui-Haza, 2002).

Entre os biorreatores utilizados em cultivos submersos, destaca-se o biorreator *airlift* (Figura 2d e 2e) em que a circulação do líquido é forçada pelo próprio ar que provoca uma redução da densidade da porção rica em bolhas, no tubo central ou lateral, que tendem, dessa forma, a subir. Existem duas classes básicas de biorreatores *airlift* (Chisti, 1989; Siegel & Robinson, 1992):

- *airlift* com circulação interna – apresenta uma coluna dividida em duas regiões. Essas regiões são denominadas de subida (*riser*) e de descida (*downcomer*).
- *airlift* com circulação externa – as regiões de subida e de descida do líquido ocupam dois tubos conectados por seções horizontais próximas ao topo e a base da coluna do biorreator.

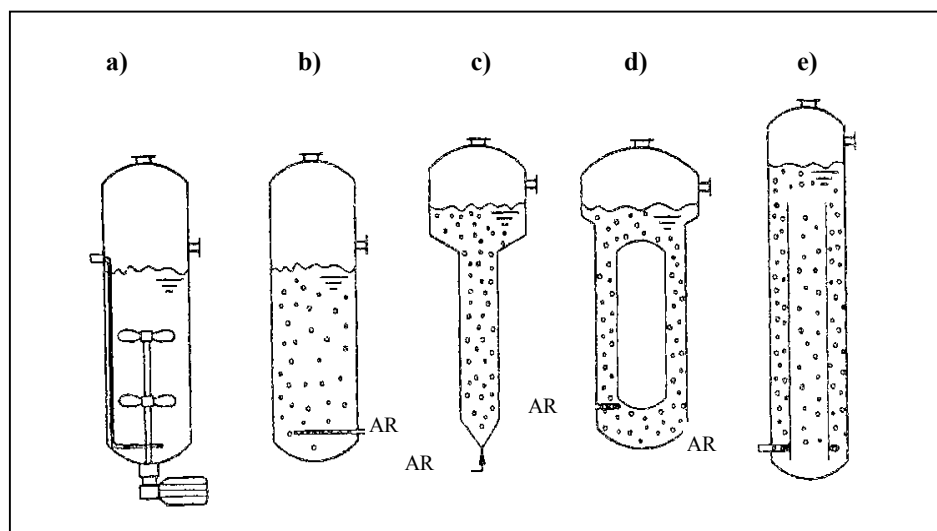


Figura 2. Diferentes configurações de biorreatores utilizados em cultivos submersos. a) biorreator com agitação mecânica; b) biorreator de coluna de bolhas; c) biorreator de leito fluidizado; d) biorreator de circulação externa de ar (*airlift*); e) biorreator de circulação interna de ar (*airlift*) (Moo-Young & Chisti, 1994).

De acordo com Schmidell & Facciotti (2001), encontram-se indicados na literatura várias formas de classificar os biorreatores:

- quanto ao tipo de biocatalisador (células ou enzimas);
- quanto à configuração do biocatalisador (células/enzimas livres ou imobilizadas);
- quanto à forma de se agitar o líquido no reator.

Muitas aplicações dos biorreatores em escala de bancada e em escala piloto tem sido estudadas para uma variedade de microrganismos e culturas celulares. Fungos filamentosos são utilizados para a produção de metabólitos e, em cultivos submersos, apresentam diferentes morfologias, *pellets* ou filamentos livres, dependendo do microrganismo e das condições de cultivo. Cultivos com a formação de *pellets* são particularmente exigentes em termos de transferência de oxigênio. A transferência de oxigênio é uma função complexa, relacionada com parâmetros operacionais, incluindo agitação, vazão volumétrica de ar e dimensões geométricas do biorreator (Ju *et al.* 1991).

Em comparação, o reator *airlift* apresenta vantagens sobre os reatores com agitação mecânica como simplicidade na construção, nível de cisalhamento mais tolerável por organismos sensíveis, excelente capacidade de transferência de calor, razoável taxa de transferência de massa, boa capacidade de mistura do meio de cultivo com baixo consumo de energia, sendo que a fase gasosa apresenta duas funções: aeração e agitação (Vial *et al.* 2002).

Os biorreatores *airlift* podem ser empregados em cultivos com caldos mais viscosos, ao contrário dos biorreatores tipo torre ou coluna de bolhas. No entanto, a transferência de massa entre os elementos de fluido é menor que a observada nos biorreatores convencionais e, dependendo da escala, o período transiente de circulação desde a base até o topo e novamente do topo até a base pode ser importante. Nos últimos anos, os biorreatores *airlift* vem sendo cada vez mais empregados em bioprocessos que antes utilizavam os biorreatores convencionais. Apesar das vantagens apresentadas, a aplicação dos biorreatores *airlift* em escala de produção industrial ainda é limitada. Os biorreatores do tipo *airlift* são menos flexíveis para as mudanças de processo que os STR, uma vez que os parâmetros geométricos são determinados para um determinado processo durante o projeto; a velocidade do fluxo de gás é, em princípio, o único parâmetro que pode ser ajustado durante a operação. Portanto, os biorreatores *airlift* são menos adaptáveis a outros processos com necessidade muito diferente de mistura e agitação, distribuição de gás e características de transferência de massa, em relação aos STR, que apresentam controles independentes de aeração e agitação (Chisti, 1989).

Alguns trabalhos comparam o desempenho dos diferentes biorreatores utilizados em cultivos submersos, constatando-se que cada microrganismo e cada processo apresenta-se mais ou menos adaptado aos diferentes biorreatores. Dentre esses trabalhos, destacam-se o cultivo de *Grifola frondosa* (Lee *et al.* 2004), *Metarbizium anisopliae* (Tamerler-Yildir *et al.* 1997), *A. niger* (Bizukojc & Ledakowics, 2004), *Aspergillus terreus* (Yahiro *et al.* 1997).

Aguilar & Huitron (1986) estudaram a produção de pectinases em regime descontínuo alimentado em processo submerso. Segundo os autores, em regime descontínuo, a produção de pectinases por *Aspergillus* sp. sofre repressão catabólica pelos produtos de degradação da pectina. Desse modo, a condução do processo em regime descontínuo alimentado é interessante porque possibilitaria eliminar, ou diminuir, a repressão catabólica. Entretanto, dada a diversidade de produtos formados pela ação do complexo pectinolítico sobre o substrato, não foi possível identificar quais as substâncias diretamente envolvidas no processo de repressão, ou, ainda, se um produto do metabolismo desses compostos foi o responsável por tal repressão.

A forma de operação e condução do biorreator é de fundamental importância no desempenho de um determinado processo. A seguir, são resumidas algumas características dos dois tipos de biorreator utilizados nesse trabalho: agitação mecânica e *airlift*.

2.5.1 Biorreatores com agitação mecânica

Os reatores com agitação mecânica se caracterizam pela presença de agitadores e chicanas que são indispensáveis para promover a transferência de calor e de massa e a manutenção da homogeneidade do sistema. A agitação mecânica permite eficiência na mistura de substâncias, ruptura de bolhas de ar e dispersão de agregados celulares (Schmidell & Facciotti, 2001). No entanto, como demonstrado por Bailey & Pessa (1990), em cultivos de fungos filamentosos, a exposição a altas frequências de agitação pode provocar ruptura do micélio, devido ao alto cisalhamento, gerando a redução tanto da biomassa como da produção enzimática.

A transferência de oxigênio em biorreator com agitação mecânica é função do coeficiente volumétrico de transferência de massa, dependente, principalmente, da área interfacial específica das bolhas de gás. A transferência do oxigênio depende da força motriz

do gás, dos sólidos e da taxa de recirculação do líquido (Merchuk & Siegel, 1995). Conforme Lee (1992), o biorreator de mistura pode ser empregado para cultivos aeróbios e anaeróbios de grande escala, com microrganismos, células animais e vegetais. A intensidade da mistura pode ser modificada pela escolha de adequados tipos de turbinas e por variadas velocidades de agitação. Podem ser, também, usados para meios com viscosidade elevada. Na Figura 3, é apresentado um esquema básico de um biorreator com agitação mecânica, incluindo todas as principais partes.

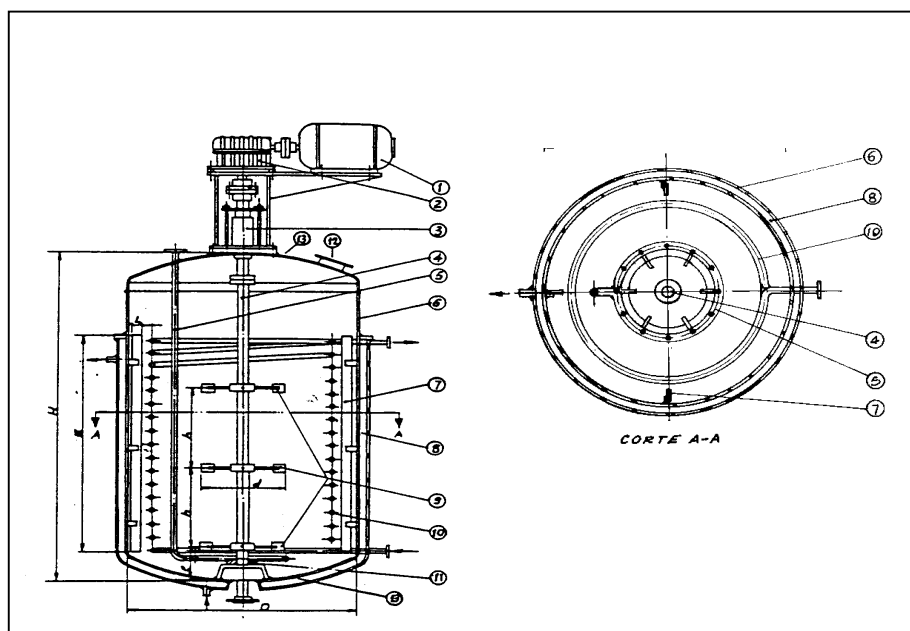


Figura 3. Esquema de um fermentador com agitação mecânica: (1) motor; (2) redutor; (3) vedação do eixo; (4) eixo; (5) dispersor de ar; (6) tanque de fermentação; (7) chicana; (8) camisa; (9) turbina; (10) serpentina; (11) mancal; (12) boca de visita; (13) tampos abaulados (Eboli, 1975).

Friedrich *et al.* (1994), em cultivo de *A. niger* para a produção de enzimas pectinolíticas e ácido cítrico, observaram que na fase do cultivo em que ocorre pronunciado crescimento celular e, conseqüentemente, ocorre aumento do consumo de oxigênio dissolvido, a aeração deve ser mantida em nível que garanta uma percentagem mínima de oxigênio em solução para manter a viabilidade do microrganismo.

Olsvik & Kristiansen (1992) avaliaram a reologia de um cultivo de *A. niger* em biorreator com agitação mecânica, com aeração específica de 1 vvm e agitação de 300, 360 e 420 rpm. Utilizando 360 e 420 rpm, a consistência e a concentração das células foram afetadas e acentuadamente diminuídas em comparação com o processo conduzido a 300 rpm.

2.5.2 Biorreator *airlift*

O biorreator do tipo *airlift* é reconhecido como apropriado para uma série de processos em que o organismo ou o produto apresentam sensibilidade ao cisalhamento. A aplicação do *airlift* não está condicionada apenas a esses casos, sendo que muitos bioprocessos tem sido estudados com obtenção de resultados satisfatórios. A configuração desses reatores baseia-se nos de coluna de bolhas, sendo que a principal diferença entre eles a alteração do fluxo aleatório do fluido para padrões cíclicos claros e definidos (Merchuk & Asenjo, 1995; Vial *et al.* 2002). Na Figura 4, estão representados os biorreatores *airlift* de circulação externa e *airlift* de circulação interna.

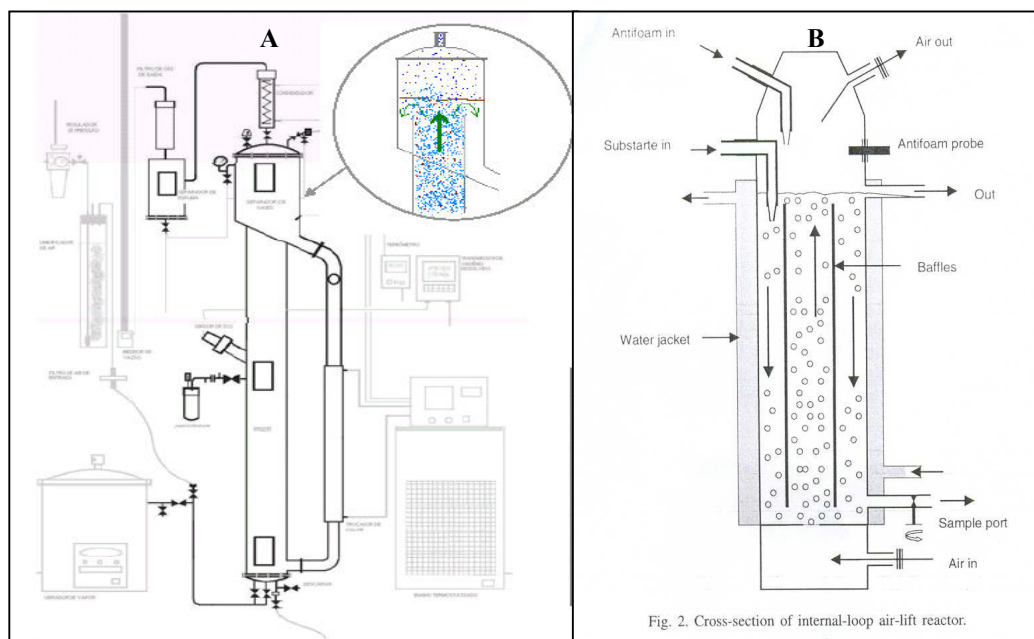


Figura 4. Diferentes configurações de biorreatores *airlift*. a) *airlift* com circulação externa (Rossi, 2005a); b) *airlift* com circulação interna (Jovetic *et al.* 2003).

Segundo Merchuk & Asenjo (1995) em biorreator *airlift* combina-se uma mistura eficiente das fases através do controle das condições do fluxo e o baixo cisalhamento, que nos reatores de mistura decorre de agitação mecânica, obtendo-se velocidades de reação elevadas. A diferença de densidades entre as duas fases líquidas é pequena, o que dificulta a concepção da zona de decantação no topo do reator. Esse problema é agravado na presença de agentes emulsificantes presentes na solução inicial ou segregados pelas células.

A diferença de *holdup* de gás entre a zona aerada (*riser*) e a zona não aerada (*downcomer*) resulta em diferença de densidade do líquido entre essas regiões, causando a circulação do fluido no biorreator. O *holdup* refere-se à fração de gás na dispersão gás-líquido que, em combinação com o tamanho das bolhas, determina o tempo de residência do gás no líquido, influenciando a área de interface disponível para a transferência de oxigênio. O volume total projetado em um biorreator *airlift* deve considerar o *holdup* máximo que se pretende alcançar (Chisti, 1989).

Em um biorreator *airlift*, a aeração e a agitação requerida durante o cultivo são fornecidos com baixo consumo de energia, sendo atingido bom crescimento em processos industriais. A simplicidade da configuração e construção, o fluxo padrão, a baixa potência, a boa mistura e a prolongada operação asséptica são vantagens na aplicação do biorreator *airlift* (Chisti, 1989).

De acordo com Lin *et al.* (2004) um biorreator *airlift* possibilita grandes vazões de ar, além do tempo de contato das bolhas persistir durante todo o deslocamento das bolhas pelo *riser*, aumentando a transferência de oxigênio gás-líquido.

Em um biorreator *airlift* de circulação interna, o tubo concêntrico deve obedecer alguns parâmetros geométricos, pois essa proporção afeta a circulação do gás e do líquido, o tempo de mistura e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}). São desenvolvidos extensivamente estudos sobre a configuração de parâmetros geométricos em

escala do tubo concêntrico do biorreator *airlift* (Gavrilescu & Tudose, 1998). Segundo Merchuk *et al.* (1996), a transferência de massa e, em particular, a transferência de oxigênio para o meio de cultivo e o microrganismo são importantes variáveis na construção do biorreator. Segundo Gouveia *et al.* (2003) em trabalho sobre o efeito da geometria, condições operacionais, circulação de líquido e transferência de massa em biorreator *airlift*, o coeficiente de transferência volumétrica de massa é afetado por pequenas mudanças na geometria do sistema, particularmente pelo espaço superior do biorreator. Os autores observaram também, que é difícil a comparação dos resultados apresentados na literatura, devido às diferenças na geometria dos biorreatores *airlift* utilizados nos diferentes estudos.

Nos últimos anos, a configuração de biorreatores *airlift* tem sido bem estudada, principalmente em termos de capacidade de transferência de oxigênio, incluindo o uso desse sistema em cultivos em regime descontínuo alimentado (Gallindez-Mayer *et al.* 2001) e em cultivos com microrganismos que formam *pellets* (Freitas & Teixeira, 2001).

2.5.3 Aplicações do biorreator *airlift* de circulação interna e externa

Apesar de haver grande volume de dados disponível sobre biorreatores *airlift*, muitos estudos não têm obtido sucesso na aplicação, devido, frequentemente, à especificidade dos sistemas de cada projeto. Chisti (1989) observa que os estudos são conduzidos tipicamente utilizando fluidos simples como a água, e raramente em meios de cultivos, onde ocorrem alterações nas propriedades do fluido, com implicações no desempenho do biorreator. Normalmente são realizados estudos em relação à transferência de oxigênio (Chisti & Jauregui-Haza, 2002; Fu *et al.* 2003; Gouveia *et al.* 2003; Fadavi & Chisti, 2005), velocidade de circulação do líquido (Blazej *et al.* 2004; Mohanty *et al.* 2006), distribuição do ar (Lin *et al.* 2004; Vial *et al.* 2002), caracterização hidrodinâmica (Carvalho *et al.* 2000, Blazej *et al.* 2004, Talvy *et al.* 2005; Mohanty *et al.* 2006, Rossi *et al.* 2005a).

Biorreatores *airlift* podem ser utilizados em qualquer processo de contato gás-líquido. A aplicação prática depende da capacidade de se alcançar a velocidade de transferência de oxigênio, calor e massa, com um investimento e custos operacionais economicamente viáveis. Os biorreatores do tipo *airlift* são utilizados na produção de cerveja, vinagre, ácido cítrico, biomassa de levedura e cultivo de bactérias e fungos, sendo conduzidos com diferentes capacidades de trabalho. Na Tabela 2, são apresentados alguns exemplos de processos e aplicações dos biorreatores *airlift* de circulação interna e externa.

Tabela 2. Utilização dos biorreatores *airlift* de circulação interna e externa em diferentes processos e aplicações.

Biorreator <i>airlift</i>	Microrganismo	Objetivo	Referência
circulação externa	<i>Neurospora crassa</i>	produzir fosfatase ácida	Su & He (1997)
circulação externa	<i>Rhizopus oligosporus</i>	produzir biomassa	Jin <i>et al.</i> (2001)
circulação externa	<i>Aspergillus niger</i>	produzir ácido cítrico	Yuguo <i>et al.</i> (1999)
circulação externa	<i>Bacillus subtilis</i>	produzir α -amilase	Yuguo <i>et al.</i> (2000)
circulação interna	<i>Rhizopogon nigrescens</i>	produzir biomassa	Rossi <i>et al.</i> (2005b)
circulação interna	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	produzir de ácido clavulânico	Cerri <i>et al.</i> (2005)
circulação externa	<i>Phanerochaet chrysosporium</i>	produzir enzimas	Darah & Ibrahim (1998)
circulação externa	<i>Aspergillus oryzae</i>	produzir biomassa e α -amilase	Jin <i>et al.</i> (1998); Jin <i>et al.</i> (1999)
circulação externa	<i>Aspergillus niger</i>	produzir xilanase e celulase	Kim <i>et al.</i> (1997)
circulação externa	<i>Aspergillus niger</i>	produzir biomassa	Gluszczyk & Michalski (1994)
circulação externa	<i>Gongronella butleri</i>	produzir quitosana	Vendruscolo <i>et al.</i> (2005)
circulação interna	<i>Synechococcus</i> sp. e <i>Anacystis nidulans</i>	produzir biomassa	Suh & Lee (2001)
circulação interna	<i>Rhodiola sachalinensis</i>	obter biomassa	Xu <i>et al.</i> (1998)
circulação externa	<i>Acetobacter xylinum</i>	produzir celulose	Chao <i>et al.</i> (1997)

Os biorreatores de circulação externa apresentam menor variedade de configuração, mas permitem mais adequações com relação aos desenhos das conexões horizontais entre o *riser* e o *downcomer*, particularmente na conexão do topo. Modificações adicionais podem ser introduzidas no topo do biorreator, onde a eficiência do separador de gás pode influenciar significativamente o desempenho do biorreator. Além disso, a possibilidade de ter-se um escoamento horizontal no biorreator de circulação externa permite uma melhor separação do gás, com influência no comportamento geral do biorreator. Além disso, o biorreator do tipo *airlift* de circulação externa tem sido recomendado para cultivos em larga escala de microrganismo aeróbio e processo de tratamento de água, também é recomendado para meio com alta viscosidade (Gluszczyk & Michalski, 1994; Jin *et al.* 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Foi utilizada a linhagem IPT301 de *Aspergillus oryzae*, cedida pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (Brasil). A manutenção da linhagem foi feita a 4°C, após cultivo a 30°C em meio de conservação sólido (MC) até completa esporulação. Essa condição de cultivo também foi utilizada para o preparo dos inóculos nos diferentes cultivos descritos nesse trabalho.

3.2 Meios de cultivo

O meio de conservação sólido (MC), descrito por Maiorano (1982), tem a seguinte formulação: glicerina, 25 mL/L; glicose, 25 g/L; extrato de levedura, 5 g/L; agar-agar, 20 g/L. Antes da solidificação, o pH desse foi corrigido para 6,5 com NaOH 1 M. Após esterilizado, a 121°C por 20 min, aproximadamente 20 mL desse meio foram distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas em estufa, a 170°C, por 3 h.

O meio de produção (WB) de poligalacturonases (PG), definido por Maiorano (1990), serviu como base para a definição de formulações isentas de sólidos em suspensão.

Esse meio tem a seguinte composição (g/L):

Farelo de trigo*	40
Pectina cítrica**	20
Extrato de levedura	0,05
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	2,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	$6,3 \times 10^{-4}$
ZnSO ₄	$6,2 \times 10^{-4}$
MnSO ₄	$1,0 \times 10^{-5}$

*Moinho NORDESTE - Antônio Prado/RS/Brasil.

**FARMAQUÍMICA INDUSTRIAL LTDA.

Com base no meio WB, foram avaliadas diferentes composições de meio de produção, visando, principalmente, a definição de um meio com a ausência de sólidos em suspensão. Tendo em vista que meios com a presença de farelo de trigo apresentam boa produção de PG, procurou-se extrair os compostos presentes nessa matéria-prima. Dessa forma, o farelo de trigo foi substituído por seu extrato aquoso. Para a obtenção do extrato aquoso, a massa de farelo de trigo foi triturada (10 mesh), misturada com água destilada e essa mistura foi autoclavada a 1 atm por 15 min. Após resfriamento, a mistura foi filtrada e o extrato utilizado na preparação do meio isento de sólidos em suspensão (WBE). A partir do meio WBE, diferentes formulações foram avaliadas, conforme é descrito a seguir.

Com a utilização de um planejamento experimental, foram testados meios contendo extrato de farelo de trigo em quantidade equivalente a 0, 20, 40, 60 e 80 g/L da matéria-prima integral, glicose com 12, 17, 22, 27 e 32 g/L e peptona com 3, 8, 13, 18 e 23 g/L. O pH inicial dos meios foram ajustados em 4,0 utilizando NaOH 1 M ou H₂SO₄ 1.5 M. Os meios foram esterilizados a 121°C por 20 min.

Avaliaram-se meios com diferentes concentrações de pectina cítrica (0, 10 e 20 g/L) e de glicose (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 g/L, experimentos G0, G5, G10, G15, G20, G20*, G25, G30, G30*, G50 e G50*, respectivamente). O pH inicial dos meios foram ajustados em 4.0 utilizando NaOH 1 M ou H₂SO₄ 1.5 M. Nos ensaios G20*, G30* e G50* o pH mínimo foi controlado em 2,7. Os meios foram esterilizados a 121°C por 20 min.

Foram realizados testes em que a pectina cítrica – utilizada no meio de cultivo como indutor da produção de endo e exo-PG – foi hidrolisada parcialmente por ação enzimática. Para os testes de produção com o indutor (pectina), utilizou-se pectina não hidrolisada e parcialmente hidrolisada. Foram testados meios formulados com solução de pectina não tratada (meio WBE), com viscosidade (μ) de 12,8 cP, e parcialmente hidrolisada, com μ = 10,5, 6,1 e 2,3 cP, para formular os meios WBE2, WBE3 e WBE4, respectivamente.

Posteriormente, realizou-se um teste de produção com o meio WBE5 em que metade da pectina do meio foi parcialmente hidrolisada (6.1 cP) e a outra metade não foi tratada enzimaticamente (12.8 cP). Avaliou-se, ainda, uma condição de cultivo (WBE6) em que 1/4 do total de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 e MnSO_4 estava presente no meio no momento da inoculação e os restantes 3/4 foram adicionados ao meio em 48, 60 e 72 h de processo, em parcelas iguais.

Estudaram-se variações das concentrações de sais em comparação aos teores padrão do meio WBE, da seguinte forma: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0, 3,0, 7,0 e 9,0 g/L; KH_2PO_4 , 0, 0,5 1,5 e 3,5 g/L; MgSO_4 , 0, 0,25, 0,75 e 1,0 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0, 0,0063, 0,063 e 0,63 g/L; ZnSO_4 , 0, 0,0062, 0,062 e 0,62 g/L; MnSO_4 , 0, 0,0001, 0,001 e 0,01 g/L. Em biorreator com agitação mecânica (STR) foram avaliadas, ainda, diferentes concentrações e estratégias de adição dos sais que apresentaram maior influência na produção de poligalacturonases.

O pH inicial dos meios foram ajustados em 4,0 utilizando NaOH 1 M ou H_2SO_4 1,5 M e controlados em pH mínimo de 2,7. Os meios foram esterilizados a 121°C por 20 min.

3.3 Condições experimentais

Os ensaios preliminares para definição do meio de produção foram realizados, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 500 mL com gargalo alongado, contendo 100 mL de meio, cobertos com uma fina manta de algodão e gaze, em agitador recíproco a 300 rpm (B. BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT, RFA).

Os demais estudos sobre a formulação do meio de produção foram conduzidos em fermentador de bancada B. BRAUN BIOTECH, modelo BIOSTAT® B (RFA), com volume útil de 5 L e volume de trabalho entre 3,2 e 4,1 L. A cuba de fermentação, em vidro refratário, possui parede dupla e tampa de aço inoxidável. À tampa, é acoplado um conjunto de quatro chicanas com 10 mm de largura por 204 mm de comprimento, disposto num diâmetro de 154

mm, e distanciado do tampo em 96 mm. A agitação é proporcionada por três turbinas de 60 mm de diâmetro, com seis lâminas planas, separadas a uma distância de 37 mm. A dispersão do ar é feita a partir de um anel perfurado instalado abaixo da extremidade do eixo central do agitador, a 20 mm do fundo da cuba. Durante os cultivos, a frequência dos agitadores foi variada entre 300 e 800 rpm e a vazão específica de ar entre 0,5 e 2,5 vvm (volume de ar por volume de líquido por minuto).

O biorreator *airlift* de circulação interna utilizado apresenta um cilindro externo (*downcomer*) que foi construído em vidro refratário e o tubo interno (*riser*) em cloreto de polivinila (PVC). O biorreator de circulação externa foi construído em vidro refratário. Os biorreatores do tipo *airlift* apresentam um volume útil de 5 L e volume de trabalho entre 3,2 e 4,1 L. O sistema de aeração para os biorreatores *airlift* foram constituídos por um tubo de aço inoxidável e anéis de silicone com perfurações para a saída do ar. As tampas dos biorreatores *airlift* foram construídas em *nylon*. Para o controle da temperatura foi utilizado um banho circulante com um tubo em forma de “U” interno. Os biorreatores foram conectados à unidade de controle do sistema B. BRAUN BIOTECH, modelo BIOSTAT® B (RFA). A vazão específica de ar usada foi entre 0,5 e 2,5 vvm (volume de ar por volume de líquido por minuto).

A amostragem foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica (MASTERFLEX® modelo 7518-60, EUA) que circula o meio por uma mangueira de silicone na qual é instalado o ponto de amostragem. Para a medida e controle do pH e oxigênio dissolvido foi utilizado um sensor de pH (METTLER TOLEDO, 405-DPAS-SC-K8S, EUA) e um eletrodo de oxigênio dissolvido (METTLER TOLEDO, série InPro 6000, EUA), respectivamente.

Como forma de prever o desempenho do biorreator *airlift* construído, os valores experimentais do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), em função da

vazão específica de ar (Q: 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,00 volumes de ar por volume de meio líquido por minuto, vvm), foram medidos em comparação com o biorreator com agitação mecânica descrito adiante, operado nos mesmos fluxos de ar e com frequência de agitação de 300 rpm.

Os meios de cultivo foram inoculados com uma suspensão de esporos de *A. oryzae* IPT301 com uma concentração inicial de 10^6 esporos/L (Solis-Pereira *et al.* (1993). A temperatura de cultivo foi controlada em 28°C.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Amostragem e determinação do pH

As amostras foram coletadas periodicamente, centrifugadas a 10000 rpm, por 10 min, e armazenadas a 4°C para posteriores análises.

Em ensaios em frascos agitados, as amostras foram retiradas e os valores de pH medidos em pH-metro (Analion PM 608, Brasil). Em ensaios em biorreator com agitação mecânica e *airlift*, o pH foi determinado por um sensor de pH (METTLER TOLEDO, 405-DPAS-SC-K8S, EUA).

3.4.2 Determinação de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART)

O teor de açúcares redutores presentes nos meios foi determinado pelo método do DNS (ácido 3,5-di-nitro-salicílico) (Miller, 1959).

Para a determinação dos açúcares redutores totais, foi utilizado o método proposto por Bittman (1974), que prevê a hidrólise do material:

- à massa centrifugada, resultante de amostras com volumes entre 10 e 20 mL, foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico 1,5 M, sendo os tubos de ensaio vedados;
- os tubos foram colocados em banho a 100°C por 30 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- o conteúdo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 100 mL, previamente tarados, adicionados de 3 gotas de fenolftaleína (1,2 % em etanol 70%) como indicador, sendo as amostras tituladas com NaOH 4 M até neutralização;
- as amostras foram tratadas com 0,5 mL de ferrocianeto de potássio (150 g/L) e 0,5 mL de sulfato cúprico (3000 g/L) para desproteinização e clarificação;
- o volume foi completado para 50 mL com água destilada e as misturas filtradas em papel filtro.

Após, os açúcares redutores obtidos foram quantificados pelo método de DNS (Miller, 1959) e os resultados expressos em grama (g) de glicose por litro (L) de meio de cultivo. As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras foram determinadas com o uso de curva de calibração construída com soluções de glicose entre 100 e 1000 mg/L.

3.4.3 Atividade de exo-poligalacturonase (Exo-PG)

A atividade de exo-poligalacturonase foi estimada pela quantificação, pelo método de Somogyi (1952), de substâncias redutoras liberadas de solução 0,25% (m/v) de ácido poligalacturônico em tampão acetato 0,1 M pH 4, tendo ácido galacturônico como padrão. O procedimento analítico completo é o seguinte:

- 50 µL da preparação enzimática diluída foram adicionados a um tubo de ensaio contendo 2 mL da solução de ácido poligalacturônico;
- a mistura reacional foi colocada em banho, a 35°C, por 30 min;

- após esse período, 0,3 mL da amostra foi colocado em tubo de Folin-Wu contendo 0,7 mL de água destilada para a quantificação de espécies redutoras;
- ao tubo, foi adicionado 1 mL de uma mistura 4:1, respectivamente, das soluções A e B de Somogyi;
- os tubos foram agitados e colocados em banho a 100°C por 10 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo;
- a cada tubo foi, então, adicionado 2 mL da solução C de Somogyi, agitando-os até cessar o desprendimento de gás, e o volume dos tubos foi completado para 25 mL com água destilada;
- a absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro (Aurora Instruments, EUA), a 540 nm, contra um branco preparado com tampão acetato 0,1 M submetido ao mesmo procedimento.

Os valores de absorbância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração através de curva de calibração construída com soluções de ácido galacturônico (Sigma), entre 100 a 500 mg/L, analisadas pelo método de Somogyi (1952). Conforme proposto por Couri & Farias (1995), uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições da reação, e expressa em unidades/mL (U/mL). A atividade de exo-poligalacturonase é calculada pela Equação 1:

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

Onde:

P_{exo} - atividade enzimática de exo-poligalacturonase (U/mL)

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

V_t - volume total na reação enzimática (2,05 mL)

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

V_e - volume de preparação enzimática diluída utilizado (0,050 mL)

t - tempo de reação (30 min)

dil - diluição aplicada à preparação enzimática

3.4.4 Atividade de endo-poligalacturonase (Endo-PG)

A atividade de endo-PG foi estimada pela medida da redução da viscosidade de solução padrão de pectina cítrica 0,63% (m/v), em tampão acetato 0,05 M pH 4,0. Para a realização desse método, foram seguidos os procedimentos descritos por Malvessi (2000). A técnica utilizada é detalhada a seguir.

A solução padrão de pectina foi preparada pela dissolução de 0,63 g de pectina cítrica em 70 mL de solução tampão acetato 0,05 M pH 4. Após agitação durante uma noite, foi completado o volume da solução a 100 mL com a mesma solução tampão.

A solução tampão acetato 0,05 M pH 4,0 foi preparada utilizando-se três soluções:

Solução A - ácido acético, 3,0 g; água destilada 100 mL;

Solução B - acetato de sódio.3H₂O, 6,83 g; água destilada 100 mL;

Solução C - benzoato de sódio, 10 g; água destilada 100 mL.

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

A execução da técnica analítica consistiu dos seguintes passos:

- a solução de pectina e a amostra diluída foram colocadas em banho termostático ajustado a 30°C por 10 min;
- a um tubo de ensaio, contendo 3,2 mL da amostra diluída, foram adicionados 14,8 mL da solução de pectina;
- a mistura foi incubada em banho termostático, a 30°C, por 30 min;

- transcorrido o tempo de reação, a viscosidade da mistura reacional foi medida em viscosímetro BROOKFIELD modelo DV-II+ (EUA);
- para cada amostra, foi feito um branco da reação com solução enzimática inativada a 100°C por 10 min, submetida ao mesmo procedimento descrito para a amostra.

Com os valores de viscosidade das preparações contendo a amostra ativa e inativada, foi calculada a redução de viscosidade (A) através da Equação 2:

$$A = \frac{\text{viscosidade da amostra inativada} - \text{viscosidade da amostra}}{\text{viscosidade da amostra inativada}} \cdot 100 \quad (2)$$

Para a conversão de "A" em atividade de endo-poligalacturonase, foram construídas curvas padrão da seguinte forma:

- a amostra foi submetida a uma série de diluições, sendo analisadas de acordo com a metodologia descrita e calculando-se o valor de "A" para cada diluição;
- a partir dos valores de "A", foram construídas curvas relacionando esses valores com o logaritmo decimal do inverso das diluições, representando uma proporção da concentração de enzimas;
- a concentração que resultou em 50% de redução de viscosidade foi considerada como contendo 1 unidade (U) de endo-PG no volume de amostra analisada.

Após, foi construída uma nova curva correlacionando A com o log U. Para o cálculo da atividade de endo-PG utilizou-se a equação 3.

$$P = 10^{\left(\frac{A-a}{b}\right)} \cdot \frac{1}{v} \cdot \text{dil.} \quad (3)$$

Onde:

P - atividade enzimática de endo-PG (U/mL)

A - redução de viscosidade (%)

a e b - coeficientes da curva de calibração

dil. - diluição da preparação enzimática

v - volume de preparação enzimática utilizado na análise (mL)

Finalmente, o número de unidades para cada concentração foi calculado de forma proporcional. De acordo com Gainvors *et al.* (2000), uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas expressa em unidades/mL (U/mL).

3.4.5 Concentração celular

Em ensaios com meios de cultivo isentos de sólidos em suspensão, a determinação da concentração celular (X) foi realizada da seguinte maneira:

- no decorrer do cultivo as amostras foram retiradas e um volume conhecido filtrado em membrana (*cellulose nitrate filter*), com massa conhecida, de porosidade 0,45 μm e 47 mm de diâmetro, em um sistema de filtração (MILLIPORE);
- as células foram intensamente lavadas com água destilada, com a finalidade de remover sólidos solúveis provenientes do meio de cultivo;
- a membrana foi colocada em uma estufa a 90°C até peso constante;
- após resfriamento da membrana em dessecador, a massa de células secas foi estimada descontando-se a massa da membrana sem células previamente conhecida;
- a concentração celular em gramas (g) de massa seca por litro (L) de meio foi determinada pela divisão da massa de células pelo volume da amostra.

3.4.6 Coeficiente volumétrico da transferência de oxigênio (k_La) em meio isento de células

Para a determinação do K_La foi utilizando o método estático conforme Moo-Young e Blanch (1989), em que é empregado um eletrodo de oxigênio dissolvido acoplado ao reator

para registrar percentagens da concentração de oxigênio na saturação. Os seguintes passos experimentais foram realizados:

- ligou-se a agitação do reator na condição em que se desejava medir o $K_L a$ (no caso do biorreator com agitação mecânica);
- o nitrogênio foi introduzido no reator até que o medidor de oxigênio dissolvido acusasse um valor mínimo e constante;
- calibrou-se o medidor em 0 % de oxigênio;
- o ar foi introduzido no reator, na vazão em que se desejava medir o $K_L a$, até que o medidor de oxigênio dissolvido registrasse um valor máximo e constante;
- calibrou-se o medidor em 100 % de oxigênio;
- o nitrogênio foi novamente introduzido até "zerar" o medidor de oxigênio dissolvido;
- o sistema foi aerado;
- com o auxílio de um cronômetro, foram registrados os dados de tempo e percentagem de oxigênio dissolvido.

De posse dos dados registrados, foi calculado o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, utilizando a equação 4:

$$dC/dt = K_L a(C^* - C) \quad (4)$$

Onde:

dC/dt - variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo

C^* - concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio

C – concentração de oxigênio dissolvido num dado instante

A integração entre as concentrações de oxigênio dissolvido C_1 e C_2 , com os respectivos tempos 0 e t , temos:

$$\int_{C_2}^{C_1} \frac{1}{C^* - C} dC = \int_0^t K_L a dt$$

$$\ln (C^* - C_2) - \ln (C^* - C_1) = -K_L a \cdot (t - 0)$$

Sendo $C_1 = \alpha \cdot C^*$ e $C_2 = \beta \cdot C^*$, onde α e β são os percentuais da saturação para C_1 e C_2 , respectivamente, tem-se:

$$\ln \frac{C^* - \beta C^*}{C^* - \alpha C^*} = -K_L a \cdot t$$

$$K_L a = -\frac{1}{t} \ln \frac{1 - \beta}{1 - \alpha}$$

3.4.7 Planejamento experimental

Foram testados meios com volumes de extrato de farelo de trigo equivalentes a 0, 20, 40, 60 e 80 g/L do material integral, tendo sido avaliados, também, meios contendo glicose (12, 17, 22, 27 e 32 g/L) e peptona (3, 8, 13, 18 e 23g/L). Nos testes de avaliação do efeito da composição do meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonases foi aplicado um planejamento composto central 2^3 com a finalidade de observarem-se as possíveis interações entre as três variáveis. O planejamento consistiu de vinte ensaios, incluindo seis pontos axiais e seis repetições no ponto central. Na Tabela 3, são apresentados os valores utilizados na matriz do planejamento fatorial 2^3 .

Tabela 3. Valores utilizados no delineamento fatorial 2^3 .

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
Glicose (g/L)-X ₁	12	17	22	27	32
Extrato de farelo de trigo (g/L)-X ₂	0	20	40	60	80
Peptona (g/L)-X ₃	3	8	13	18	23

Utilizando esse modelo, é possível avaliar as propriedades relacionadas com a atividade enzimática, conforme a seguinte expressão:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_2 x_2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_3 x_3 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

Onde:

Y - atividade de endo ou exo-PG em função das variáveis: x_1 , x_2 e x_3 ;

β_0 - termo de intercepção;

β_1 , β_2 e β_3 - coeficientes lineares;

β_{11} , β_{22} e β_{33} - coeficientes quadráticos;

β_{12} , β_{13} e β_{23} - coeficientes de interação dos termos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados alcançados no presente trabalho.

Primeiramente, no item 4.1, são descritos os principais eventos de um cultivo de *Aspergillus oryzae* em processo submerso, em reator com agitação mecânica (STR), em que o foco principal da discussão foi a produção de endo e exo-poligalacturonases (PG).

No item 4.2, apresenta-se a descrição de alguns detalhes da construção dos biorreatores *airlift* de circulação interna e externa de escala de bancada, avaliando-se, para o primeiro, a influência da geometria de algumas partes mais importante do reator com respeito ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) medido em água.

Na sequência, os resultados são apresentados na forma de artigos:

4.3 - Artigo 1: "Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*". Bioresource Technology, 100: 4493-4498, 2009.

Nesse artigo, discutem-se experimentos realizados com diferentes composições de meio de cultivo - incluindo farelo de trigo integral, extrato de farelo de trigo, glicose e peptona - e composições de meios de cultivo isentos de sólidos em suspensão. A definição de um meio solúvel teve por finalidade reduzir a influência da viscosidade sobre o processo, especialmente em reator *airlift* de circulação interna, como também permitir a determinação direta de concentrações celulares pelo método de massa seca.

4.4 - Artigo 2: "Influence of pectin, glucose, and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in liquid medium".

Nessa parte do trabalho, foram avaliadas diferentes concentrações de pectina, como indutor, e de glicose, como fonte de carbono, no meio de produção de poligalacturonases por

A. oryzae. Adicionalmente, foi avaliado o efeito do pH mínimo do meio sobre os resultados do processo.

4.5 - Artigo 3: "Produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em biorreatores com agitação mecânica e *airlift* de circulação interna e externa".

Foram testados meios de cultivo em STR, formulados com solução de pectina não hidrolisada (meio WBE) e parcialmente hidrolisada (WBE2, WBE3 e WBE4). A produção de PG foi também avaliada no meio WBE5 em que metade da pectina do meio foi hidrolisada e a outra metade não foi tratada enzimaticamente. A produção de PG em biorreatores STR e *airlift* foi avaliada na condição WBE5 e na condição WBE6, com pectina não hidrolisada, em que os sais nutrientes foram adicionados parceladamente ao meio durante o cultivo.

4.6 - Artigo 4: "Avaliação de diferentes concentrações de sais na produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae*".

A produção de poligalacturonases foi avaliada em meios com diferentes concentrações de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 , em cultivos em frascos. Em ensaios em biorreator com agitação mecânica, foram testadas as condições que resultaram em atividades enzimáticas superiores, sendo ainda feitos ensaios com adição parcelada dos sais ao meio de cultivo.

Ao final do capítulo, no item 4.7, é feita uma discussão geral em que se procura destacar os aspectos principais do presente trabalho.

4.1 Caracterização de um cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de agitação mecânica (STR)

O cultivo de *A. oryzae* se caracteriza por vários fatores que influenciam o processo ao longo do tempo, como a variação do pH, da temperatura, do suprimento de oxigênio e a composição do meio, entre outros. Neste item, é descrito, em detalhes, um cultivo característico de *A. oryzae* que servirá como base para a discussão apresentada no capítulo. Na Figura 5, são apresentados os aspectos de culturas de *A. oryzae* IPT 301 em meio glicerinado, após 3 dias de propagação (Figura 5a), e em biorreator de agitação mecânica, em diferentes tempos de processo, em meio isento de sólidos em suspensão (Figura 5b-5e).

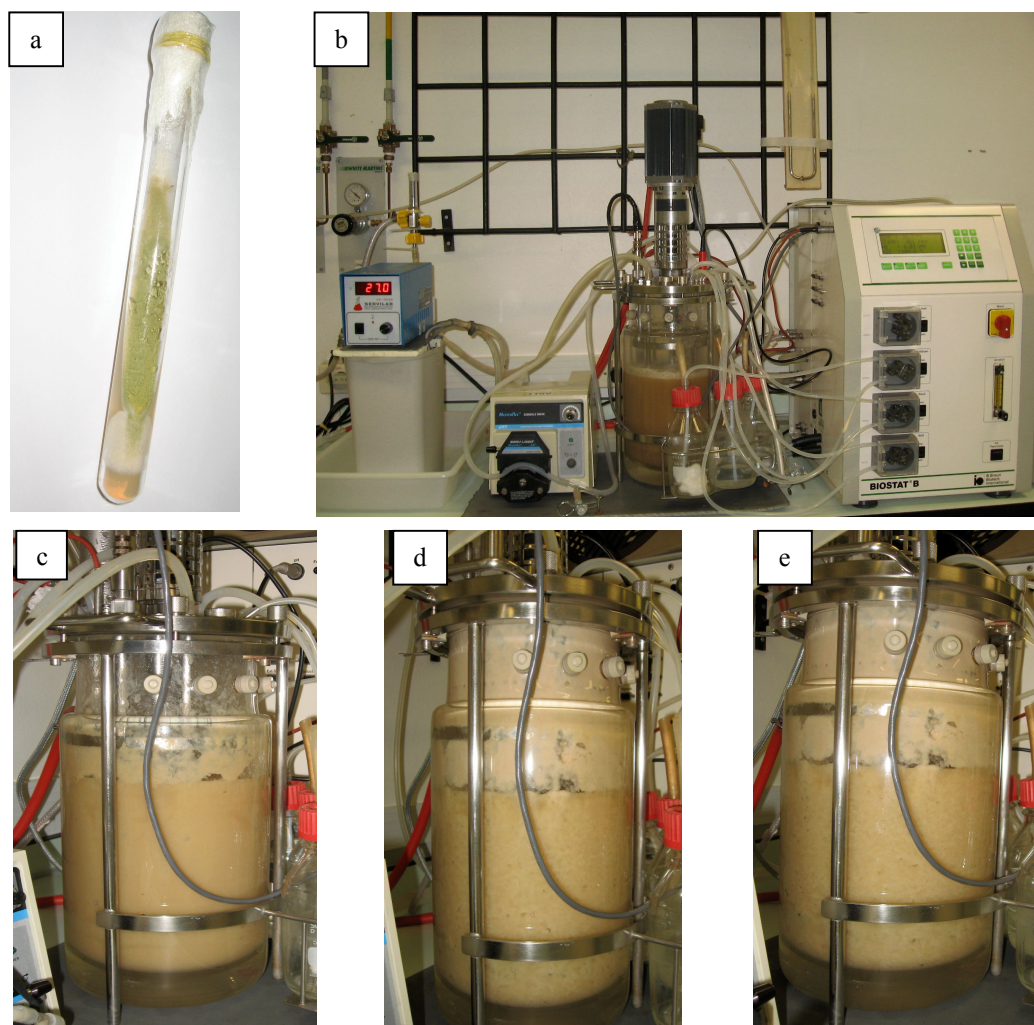


Figura 5. Aspecto do cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio sólido (a) e em biorreator de agitação mecânica (STR): b, 0 h; c, 24 h de processo; d, 48 h de processo; e, 96 h de processo.

As variações das concentrações de biomassa fúngica, do oxigênio dissolvido e da concentração de açúcares redutores com o tempo em cultivo de *A. oryzae* em um biorreator de agitação mecânica são apresentados na Figura 6. Após uma fase “lag”, com duração entre 5 e 10 h, o crescimento celular passou a apresentar um perfil linear em relação ao tempo, acompanhado pelo decréscimo do pH. A partir de cerca de 30 h de processo, observou-se uma forte redução da velocidade de crescimento, com o cultivo tendendo a entrar na fase estacionária, fato também evidenciado pelo decréscimo da demanda de oxigênio. A curva de concentração celular apresentou um perfil decrescente no final do processo, provavelmente causado por lise celular decorrente da escassez de algum nutriente.

O consumo de açúcares redutores foi gradual até 30 h de processo, acompanhando o crescimento, seguindo-se um período com concentrações residuais constantes, possivelmente devido à interferência sobre o método do DNS de substâncias redutoras não metabolizáveis por *A. oryzae* presentes no meio (Figura 6).

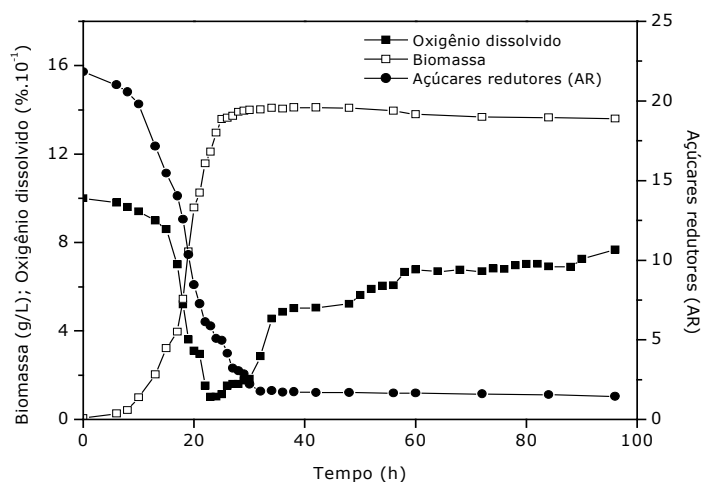


Figura 6. Variação das concentrações de biomassa, oxigênio dissolvido e açúcares redutores (AR) em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de agitação mecânica (STR), em meio líquido isento de sólidos em suspensão.

A concentração de oxigênio dissolvido durante o cultivo de *A. oryzae* decresceu rapidamente após a fase “lag” em razão do intenso metabolismo microbiano, contribuindo para isso também o aumento da viscosidade do meio decorrente do crescimento celular. A

concentração de oxigênio dissolvido atingiu valores da ordem de 10 % em relação à saturação, entre 24 e 30 h de processo, voltando a crescer ao final da fase de crescimento e durante a fase estacionária (Figura 6).

Na Figura 7, observa-se a variação do pH e das atividades de endo e exo-PG em função do tempo de processo, sendo que as atividades enzimáticas máximas, obtidas em 96h de processo, foram de 65 e 91 U/mL, respectivamente. A observação das Figuras 6 e 7 permite verificar-se que a formação das poligalacturonases apresentam perfis cinéticos não associados ao crescimento de *A. oryzae*.

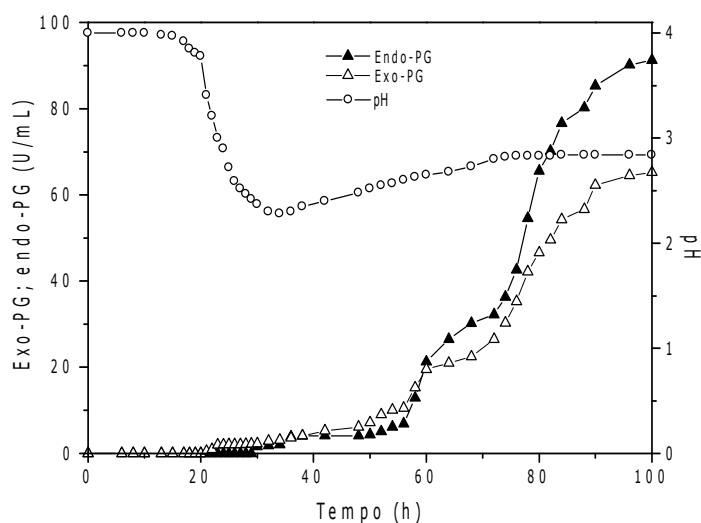


Figura 7. Variação do pH, atividade de endo e exo-PG em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de agitação mecânica (STR), em meio líquido isento de sólidos em suspensão.

Durante o processo, o pH decresceu naturalmente (Figura 7), atingindo valor mínimo de 2,30, em 36 h, seguido de aumento até 2,85. Constatou-se que as máximas atividades enzimáticas são atingidas após o decréscimo do pH, corroborando os resultados de Malvessi & Silveira (2004) quanto à necessidade deste decréscimo para a excreção de PG. O aumento do pH na fase estacionária é característico deste tipo de cultivo.

4.2 Construção de biorreator *airlift* de circulação interna e externa em escala de bancada

Na Figura 8, são apresentados os desenhos esquemáticos com a configuração final e o aspecto dos cultivos de *A. oryzae* nos biorreatores *airlift* de circulação interna e externa.

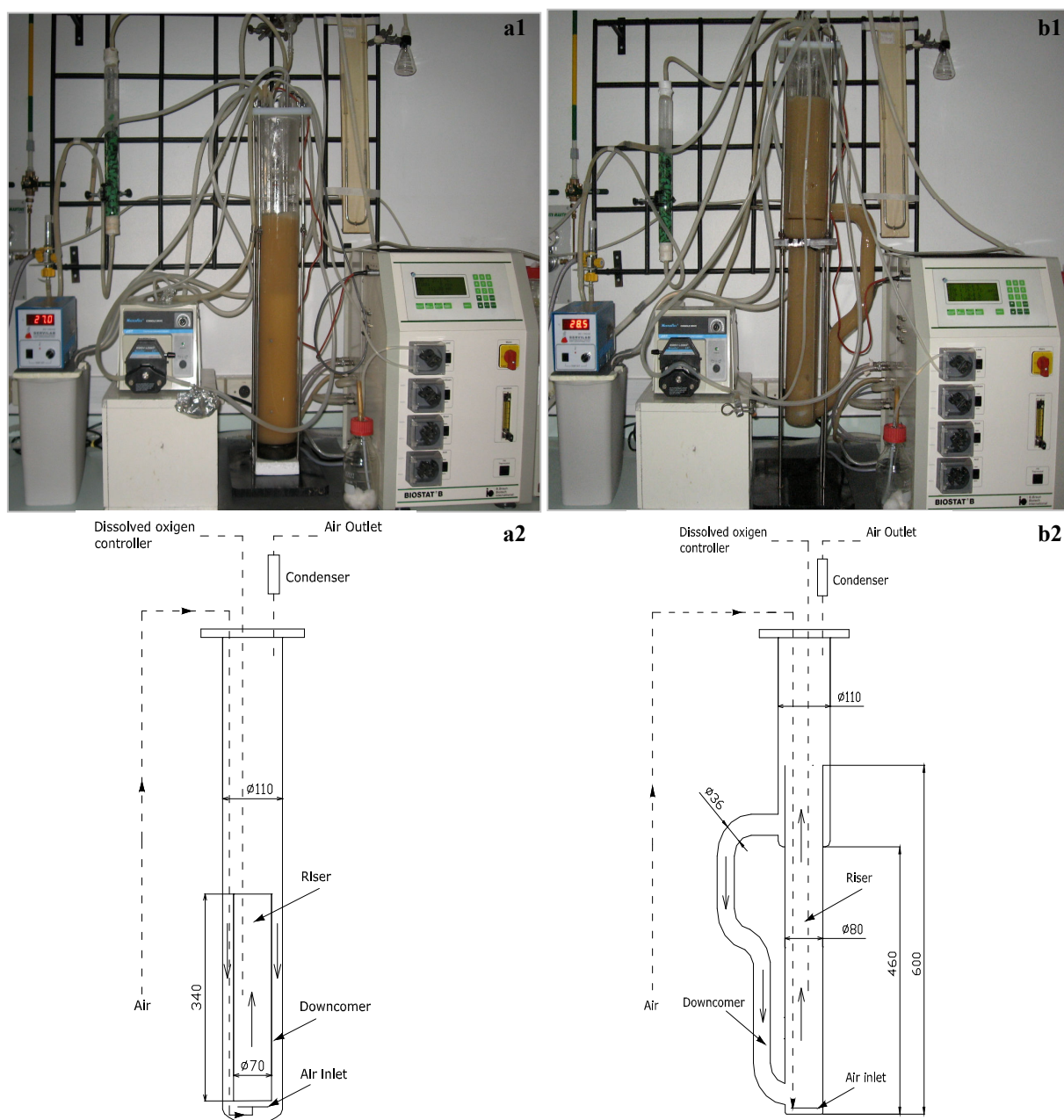


Figura 8. Dimensões (mm) e aspecto do cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreatores *airlift*: sistema de circulação interna (a1 e a2); sistema de circulação externa (b1 e b2). Os biorreatores foram conectados à unidade de controle de um sistema B. BRAUN BIOTECH, modelo BIOSTAT® B (Alemanha).

Os biorreatores *airlift* foram projetados e construídos seguindo as recomendações básicas de Chisti (1989) com respeito à geometria, observando-se, ainda, variações de projetos descritos na literatura. O parâmetro de avaliação de desempenho dos protótipos foi, principalmente, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La). O cilindro externo do biorreator *airlift* de circulação interna (*downcomer*) foi construído em vidro refratário e o tubo interno (*riser*) em cloreto de polivinila (PVC). O biorreator *airlift* de circulação externa foi construído em vidro refratário. O sistema de aeração consiste em um tubo de aço inoxidável e anéis de silicone com perfurações para a saída do ar. As tampas do biorreatores foram construídas em *nylon*, fixadas em três hastes de aço, conectadas sobre bases também feitas com *nylon*. Nas tampas, foram feitas perfurações para a passagem dos eletrodos de oxigênio dissolvido e de pH, do sensor de temperatura e das tubulações (Figura 8).

4.2.1 Influência do desenho do aerador sobre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) em biorreator *airlift* de circulação interna

Foi avaliado o efeito de diferentes configurações de aeradores sobre o K_La (Figura 9). Utilizando um aerador em forma de anel, dois anéis concêntricos e dois anéis em diferentes alturas, os valores de K_La , à vazão de ar de 1,5 L/min, foram, respectivamente, 45, 62 e 78 h⁻¹, em biorreator *airlift* de circulação interna. O sistema de aeração foi montado com mangueiras de silicone, posteriormente, substituído por um tubo de aço conectado a anéis perfurados em silicone (Figura 9d). Os diferentes valores de K_La nas configurações avaliadas estão relacionados com o tamanho das bolhas de ar, que determina o tempo de residência do gás no líquido, influenciando na transferência de oxigênio para o líquido. Entretanto, o aumento do número de bolhas pode resultar em coalescência, resultando em limitação da transferência de oxigênio (Gluszczyk & Michalski, 1994).

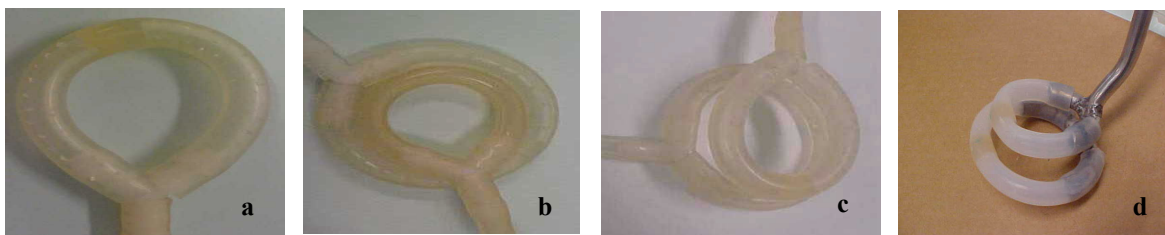


Figura 9. Aeradores testados em relação ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em biorreator de circulação interna. (a) aerador em forma de anel; (b) dois aeradores concêntricos; (c) dois aeradores concêntricos em diferentes alturas; (d) dois aeradores concêntricos em diferentes alturas com tubulação fixa.

4.2.2 Influência da geometria do *riser* sobre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em biorreator *airlift* de circulação interna

Em virtude de restrições, já citadas, com respeito às razões dimensionais de áreas e alturas das regiões de subida e descida do fluxo de líquido, foram avaliados dois diâmetros internos de *riser*: 5,5 e 7,0 cm (Figura 10). Valores superiores de K_{La} foram obtidos, em todas as vazões testadas, utilizando-se um diâmetro de *riser* maior. Nesse caso, o aumento do diâmetro do *riser* resultou em um espaço menor entre o *riser* e o *downcomer*, levando ao aumento da velocidade descensional.

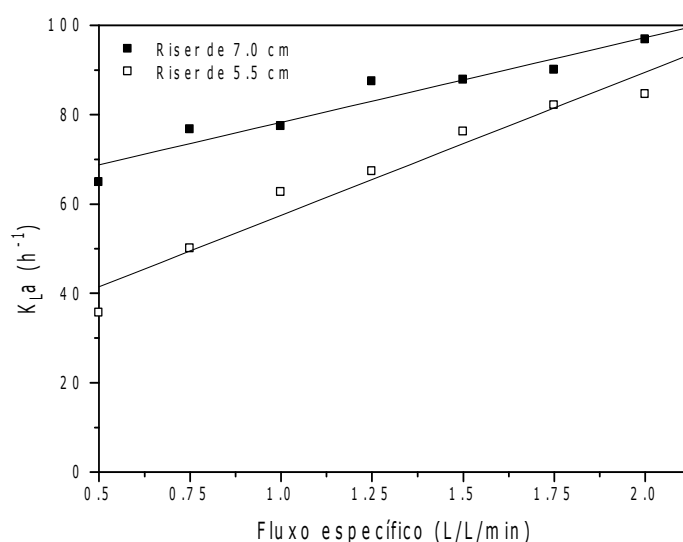


Figura 10. Variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em água a 25°C em reator *airlift* de circulação interna para diferentes fluxos específicos de ar, em sistemas montados com *riser* de 5,5 e 7,0 cm de diâmetro.

Definido o diâmetro, a altura do *riser* do biorreator *airlift* de circulação interna, 29 e 34 cm, foi avaliada, tendo o K_{La} como parâmetro de comparação. Em média, maiores valores de K_{La} foram determinados com o *riser* de altura maior (Figura 11).

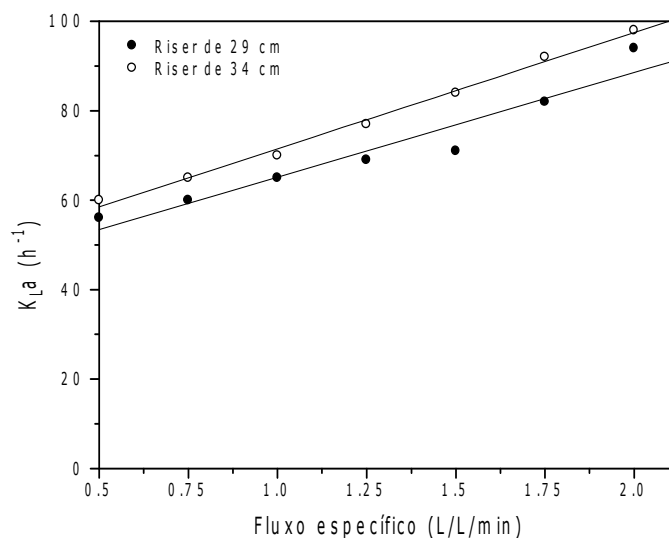


Figura 11. Perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em água a 25°C em reator *airlift* de circulação interna para distintas vazões específicas de ar: 0.5; 0.75; 1.0; 1.25; 1.5; 1.75 e 2.0 em *riser* de 29 e 34 cm de altura.

Após a realização de um ensaio preliminar com *A. oryzae* IPT 301 em biorreator *airlift* de circulação interna, foram observados alguns problemas relacionados com a configuração testada:

- arraste excessivo de água causado pelo elevado fluxo de ar, resultando em decréscimo do nível de meio;
- acúmulo de meio na parte superior dos biorreatores.

Desta forma, algumas alterações foram necessárias para melhorar o desempenho do biorreator:

- utilização de um condensador com maior eficiência;
- alteração da altura do *downcomer*, de 500 mm para 800 mm.

4.3 Artigo 1: Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*

Artigo publicado no periódico Bioresource Technology, 100: 4493-4498 (2009)

Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*

Abstract

The production of endo and exo-polygalacturonase (PG) by *Aspergillus oryzae* IPT 301 was studied in a stirred tank bioreactor (STR) and an internal circulation airlift bioreactor. Using a factorial experimental design, a soluble culture medium was defined which allowed the production of exo and endo-PG comparable to that obtained in a medium containing suspended wheat bran. The soluble medium was used in tests to compare the production of these enzymes in the STR and airlift bioreactor. In these tests, after 96 h, maximum enzymatic activity values achieved for exo and endo-PG were 65.2 units (U) per mL and 91.3 U.mL⁻¹, in the STR, with similar activity values of 60.6 U.mL⁻¹ and 86.2 U.mL⁻¹, respectively, being achieved in the airlift bioreactor. The airlift bioreactor also showed satisfactory results regarding the oxygen transfer rate in this process, indicating its potential to be used in an eventual larger scale production of exo and endo-PG, with lower costs for both installation and operation.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, endo-polygalacturonase, exo-polygalacturonase, stirred tank bioreactor, airlift bioreactor

1. Introduction

Pectinases are enzymes which act on pectic substances, through hydrolysis and trans-elimination reactions, causing depolymerization of the molecules, and deesterification, breaking the ester bond between the carboxyl and methyl groups of the pectin (Kashyap et al. 2001). These enzymes are extensively used in industry for the clarification of wines and fruit juices, due to their action in the degradation of pectic substances which are constituent of fruits (Alkorta et al. 1998; Hansen, 2003). Other applications have also been reported, such as

the treatment and degumming of plant fibers, the curing of coffee, cacao and tobacco, and the extraction of essential oils and pigments from plant materials (Coelho et al. 1995; Kashyap et al. 2001).

Pectinolytic enzymes can be produced in both solid state and submerged processes (Acuña-Arguelles et al. 1995; Blandino et al. 2002; Maldonado and Strasser, 1998; Patil and Dayanand, 2006; Solis-Pereira et al. 1993). In the submerged process, stirred tank bioreactors (STR) are normally used. STR have two main problems, both related to the stirring of the medium, which are the shearing of mycelium and the energy required to maintain a homogeneous system and aid the transfer of oxygen to the culture (Hess et al. 2002; Wu et al. 2002). Thus, the use of tubular airlift bioreactors, which do not require mechanical action, may offer an alternative with regard to these problems, in addition to offering a greater simplicity of construction (Chisti, 1989). On the other hand, in an STR, the oxygen transfer is significantly favored by the presence of stirrers and baffles. In this type of system, it is possible to alter the stirring rate, allowing a greater flexibility to deal with important rheological changes in the medium that influence both mixing and oxygen transfer and the increase in the oxygen demand due to the biomass growth. In an airlift bioreactor, however, the supply of oxygen depends, fundamentally, on aeration, which is also responsible for the homogenization of the medium, and therefore the system is less flexible than the STR (Merchuk and Asenjo, 1995). In the case of airlift bioreactors, the geometry of the system must be carefully defined since it greatly affects the gas and liquid circulation, the mixing time, and the volumetric oxygen transfer coefficient (Gavrilescu and Tudose, 1998).

The rheological characteristics of a liquid medium are particularly affected in cultures of filamentous fungi. Gluszczyk and Michalski (1994), in a study on the cultivation of *Aspergillus niger* in a pilot airlift bioreactor, observed that an increase in the fungal biomass had a significant influence on the rheological properties of the medium. The authors also

observed that the increase in viscosity intensified the coalescence of air bubbles, strongly affecting the dissolution of oxygen in the medium.

In the production of microbial enzymes, one aspect which requires special consideration is the development of the culture media, since they may contain substances which influence the induction phenomena, catabolic repression and inhibition, and, in the case of extra-cellular enzymes, the protein release mechanism (Galiotou-Panayotou et al. 1997). According to Roumbouts and Pilnik (1980), culture media with an appropriate balance of simple sugars and pectin give the best results in the production of pectic enzymes in the submerged process. The use of wheat bran in submerged cultures for the production of polygalacturonases has led to satisfactory results in the cultivation of *Aspergillus oryzae* (Malvessi and Silveira, 2004).

According to Moreira et al. (2005), the presence of wheat bran leads to greater activity of pectinases, xylanases, and proteases, since wheat bran is a substrate rich in soluble and insoluble proteins and carbohydrates, thus allowing the occurrence of synergism in the secretion of hydrolytic enzymes for the degradation of the actual bran components. According to the same authors, the increase in viscosity due to the presence of wheat bran in the culture medium is an additional difficulty to the operation of the pectinase production process in airlift bioreactors.

Factorial design, in addition to reducing cost and time, provides an evaluation of the interactions among the different variables studied (Damaso et al. 2002; Weuster-Botz, 2000). Such an experimental approach has been successfully used in recent years to optimize the production of heterologous protein (Wang et al. 2003), α -amylase (Djekrif-Dakhmouche et al. 2006), and xylanase (Cao et al. 2008) by the filamentous fungus *A. niger*. By using factorial design, Gigras et al. (2002) defined a predictive model for the optimization of medium constituents for the production of α -amylase by *A. oryzae*.

In this context, the aim of the present work was to evaluate the production of endo and exo-polygalacturonases, hydrolases of the pectinase group, by *A. oryzae*, in two laboratory-scale reactors: a STR and an internal circulation airlift. For this purpose, different culture medium compositions without suspended solids were tested, with the aim of achieving high enzymatic quantities with the least possible influence on the rheology of the medium.

2. Material and methods

2.1. Microorganism

A. oryzae IPT301, from the culture collection of the Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (Brazil), was used in the experiments. The strain was propagated in glycerin agar medium (Maiorano, 1982), incubated at 30°C for 5 days. After this period, the sporulated cultures were stored at 4°C or used for the inoculation of culture media.

2.2. Culture media

The production medium (WB) of polygalacturonases (PG) defined by Maiorano (1990) was used as the base for the formulations tested in this study. This medium has the following composition (g.L⁻¹): wheat bran (Moinho NORDESTE, Antônio Prado, Brazil), 40; citric pectin (ESKISA S.A. Brazil), 20; yeast extract, 0.05; (NH₄)₂SO₄, 5; MgSO₄, 0.5; KH₂PO₄, 2.5; FeSO₄.7H₂O, 6.3×10^{-4} ; ZnSO₄, 6.2×10^{-4} ; MnSO₄, 1×10^{-5} .

To avoid the presence of insoluble solids in the medium, the wheat bran was replaced with its aqueous extract. For obtaining wheat bran extract, the mass of wheat bran was finely milled (finer than 10 mesh), mixed with distilled water, and the mixture was autoclaved at 1 atm for 15 min. After cooling, the mixture was filtered and the extract was used in the preparation of the soluble media (WBE).

Media with volumes of wheat bran extract equivalent to 0, 20, 40, 60 and 80 g.L⁻¹ of

the whole material were tested, as well as media containing glucose (12, 17, 22, 27 and 32 g.L⁻¹) and peptone (3, 8, 13, 18 and 23 g.L⁻¹). In the tests to evaluate the effect of the culture medium composition on the production of polygalacturonases, a 2³ factorial central composite design was applied, with the aim of observing possible interactions between the three variables. The design consisted of twenty tests, including six axial points and six repetitions at the central point. A similar factorial design was used by Gigras et al. (2002) for the evaluation of starch, yeast extract, and K₂HPO₄ as medium components in the production of α -amylase by the strain *A. oryzae* ITCC 4768.

Using this model, it is possible to evaluate the properties related to enzymatic activity (Equation 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_2x_2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_3x_3 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \quad (1)$$

where Y represents the activity of endo- or exo-PG as a function of the variables: x_1 , x_2 , and x_3 ; β_0 – interception term; β_1 , β_2 , and β_3 – linear coefficients; β_{11} , β_{22} , and β_{33} – quadratic coefficients; β_{12} , β_{13} , and β_{23} – coefficients of the interaction of terms.

The initial pH of all media was adjusted to 4 with the addition of 2 N HCl or 3 M NaOH. The media were autoclaved at 1 atm for 20 min before being inoculated.

2.3. Experimental conditions

The preliminary tests for the definition of the medium without suspended solids for the production were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks, containing 100 mL of medium, covered with a fine sheet of cotton and gauze. The media were inoculated with a suspension of *A. oryzae* spores, so as to give an initial concentration of 10⁶ spores/L, and the flasks were incubated at 28°C and 200 rpm in a reciprocal shaker (B. BRAUN BIOTECH model CERTOMAT, Germany). Samples were collected every 24 h, up to 96 h of the process, centrifuged for 10 min at 10000 rpm, and kept at 4°C for later evaluation of the endo- and

exo-PG activity. The results were compared in terms of the average enzymatic activity obtained for four tests.

The internal circulation airlift bioreactor used, with a total volume of 4 L and a working volume of 3.2 L, had the dimensions (mm) given in Figure 1. The external cylinder (downcomer) was made of refractory glass and the internal tube (riser) of polyvinyl chloride (PVC). The aeration system was comprised of a stainless steel tube and silicone rings with perforations for the air exit. The lid of the airlift bioreactor was made of nylon. To control the temperature, a circulating bath with an internal U-shaped tube was used. This reactor was connected to a control unit of a B. BRAUN BIOTECH model BIostat® B (Germany) system.

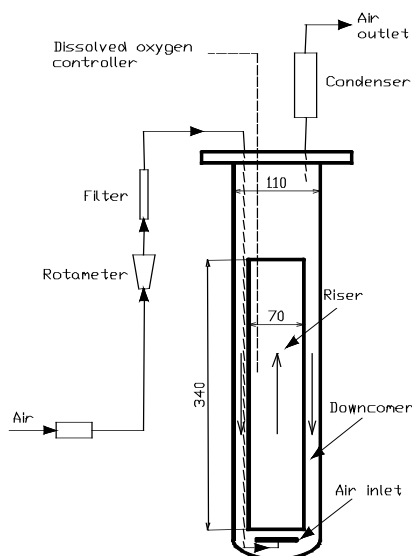


Fig.1. Configuration of the internal circulation airlift bioreactor.

The experimental values of the volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}) of the airlift bioreactor as a function of the specific air flow rate (Q : 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, and 2.00 volume of air per volume of liquid medium per minute, vvm) were measured in this reactor and compared with those of the STR described below, operating with the same air flows and with a stirring speed between 200 and 700 rpm. To carry out this hydrodynamic study, the K_{La} was determined in non-inoculated WBEG medium, which was defined in

initial experiments of this work and contained wheat bran extract, glucose, peptone, and salts as further described in the “Results and Discussion” section. In the polygalacturonase production tests with the airlift bioreactor, the specific air flow rate (Q) varied between 0.5 and 2.5 vvm.

In the cultivations in the STR, a B. BRAUN BIOTECH, model BIOSTAT® B (Germany) bioreactor, with a total volume of 5 L and a working volume of 3.2 L, was used. The system is equipped with three turbines with six flat blades 6 cm in diameter. During the cultivations, the stirring speed varied from 200 to 700 rpm and the specific air flow between 0.5 and 2.5 vvm. The media for the STR and airlift bioreactor cultivations were inoculated with a suspension of *A. oryzae* IPT301 spores so as to give an initial concentration of 10^6 spores/L. The temperature was controlled at 28°C during the cultivations. The samples were collected periodically, centrifuged for 10 min at 10000 rpm, and kept at 4°C for later analysis.

2.4. Analytical methods

The concentration of reducing sugars in the culture media was determined by the DNS (3,5 di-nitro-salicylic acid) method (Miller, 1959). The endo-PG activity was determined by the measurement of the viscosity reduction of a standard solution of citric pectin (ESKISA S.A.) 0.63% (w/v), in 0.05 M acetate buffer pH 4.0. The analysis was carried out using 3.2 mL of sample diluted in 14.8 mL of citric pectin solution, and the reaction was carried out at 30°C for 30 minutes. After the reaction time, the viscosity of the reaction mixture was measured using a viscosimeter (BROOKFIELD ENGINEERING, USA) model DV-II+. One endo-PG unit was defined as the quantity of enzyme which causes a 50% reduction in the solution viscosity, under standardized conditions (Gainvors et al. 2000). The endo-PG activity is expressed in units per mL of medium (U.mL⁻¹).

The exo-PG activity was estimated in a reaction mixture containing 50 μL of the appropriately diluted sample and 2 mL of polygalacturonic acid (SIGMA, USA) in 0.1 M acetate buffer (pH 4), the reaction being carried out at 35°C for 30 minutes. The galacturonic acid released in the reaction was quantified by the Somogyi method (1952). One unit of exo-PG was defined as the quantity of enzyme which leads to the release of 1 μmol of galacturonic acid per minute per mL of enzymatic extract, under the reaction conditions (Couri and Farias, 1995). The exo-PG activity is expressed in units per mL (U.mL^{-1}). The spores to be used for the inoculation of culture media were enumerated by direct counting using a Neubauer chamber as previously described by Solis-Pereira et al. (1993). The cellular concentration was determined gravimetrically only in the tests with media which did not contain suspended solids. The volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}) was determined by the static method (Moo-Young and Blanch, 1989).

2.5 Statistical analysis

The statistical tests were carried out by analysis of variance (one-way ANOVA) and the post-test of Tukey, using a probability level of less than 5% ($p < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Definition of a wheat bran extract - based medium without suspended solids for the production of polygalacturonases

In view of the fact that for this study, as already stated, it was necessary to define a culture medium without solids, which resulted in polygalacturonase activities similar or higher than those obtained in the media containing wheat bran (WB), preliminary tests were carried out with formulations in which this component was replaced by its aqueous extract (WBE). In these tests, the base formulation of the WB medium, with 40 g.L^{-1} of wheat bran,

was used, while in the WBE medium wheat bran extract prepared with the same mass of dry material was used. After 96 h of cultivation, the highest endo- and exo-PG activity levels were obtained in the WB medium – 40.3 and 18.6 U.mL⁻¹, respectively – whereas with the WBE medium, lower enzymatic activities were achieved: 33.1 U.mL⁻¹ for endo-PG, and 16.1 U.mL⁻¹ for exo-PG. These results, however, indicated that it was possible to achieve the desired production level with a medium without insoluble solids. In Table 1, the delimitation of the 2³ factorial design (glucose, X₁; wheat bran extract, X₂; peptone, X₃) is shown along with the results obtained after 96 h of the process.

Table 1 Coded values used in the complete 2³ factorial design and the endo- and exo-polygalacturonase activities in *Aspergillus oryzae* cultivation in shake flasks.

Experiment	Variable			Enzyme activity	
	X ₁	X ₂	X ₃	Endo-PG (U.mL ⁻¹)	Exo-PG (U.mL ⁻¹)
1	-1(17)	-1(20)	-1(8)	23.7 ± 0.1	16.3 ± 0.02
2	+1(27)	-1(20)	-1(8)	40.1 ± 0.02	17.2 ± 0.06
3	-1(17)	+1(60)	-1(8)	37.1 ± 0.06	19.6 ± 0.02
4	+1(27)	+1(60)	-1(8)	20.3 ± 0.01	15.2 ± 0.08
5	-1(17)	-1(20)	+1(18)	0.24 ± 0.01	5.9 ± 0.06
6	+1(27)	-1(20)	+1(18)	37.7 ± 0.1	22.4 ± 0.1
7	-1(17)	+1(60)	+1(18)	0.31 ± 0.01	9.2 ± 0.1
8	+1(27)	+1(60)	+1(18)	43.5 ± 0.01	22.3 ± 0.3
9	-2(12)	0(40)	0(13)	16.5 ± 0.01	10.4 ± 0.2
10	+2(32)	0(40)	0(13)	15.6 ± 0.01	12.3 ± 0.1
11	0(22)	-2(0)	0(13)	36.9 ± 0.01	18.8 ± 0.1
12	0(22)	+2(80)	0(13)	43.7 ± 0.03	24.7 ± 0.2
13	0(22)	0(40)	-2(3)	12.6 ± 0.04	14.2 ± 0.1
14	0(22)	0(40)	+2(23)	0.27 ± 0.01	5.4 ± 0.2
15	0(22)	0(40)	0(13)	41.3 ± 0.01	24.5 ± 0.2
16	0(22)	0(40)	0(13)	41.6 ± 0.01	24.2 ± 0.6
17	0(22)	0(40)	0(13)	40.2 ± 0.01	24.5 ± 0.1
18	0(22)	0(40)	0(13)	42.2 ± 0.01	23.6 ± 0.2
19	0(22)	0(40)	0(13)	41.6 ± 0.05	23.8 ± 0.2
20	0(22)	0(40)	0(13)	42.1 ± 0.06	24.0 ± 0.1

The enzymatic activity values correspond to the average of four tests. Enzymatic activities after 96 hours of process. X₁ - glucose (g/L); X₂ - wheat bran extract (g/L) and X₃ - peptone (g/L).

Along with the wheat bran extract (WBE), the presence and the concentration of other components in the medium, glucose and peptone, were also evaluated, according to the information given in Table 1, in order to reinforce its content of organic carbon and nitrogen sources.

The resulting models for endo- and exo-PG production (U.mL^{-1}), as a function of different levels of glucose (X_1), wheat bran extract (X_2), and peptone (X_3), were used to determine the regression coefficients of Equations 2 and 3. All parameters with $p < 0.05$ were considered significant. With the exception of the interaction of wheat bran extract and glucose (x_1x_2), all of the model parameters were significant. The increase in glucose (x_1) and wheat bran extract (x_2) concentrations showed positive effects on the endo- and exo-PG production, while the increase in peptone (x_3) concentration showed a negative effect.

$$Y(\text{Endo-PG}) = 41.15 + 5.77x_1 - 7.74x_1^2 + 0.80x_2 + 0.82x_2^2 - 4.4x_3 - 11.1x_3^2 - 3.43x_1x_2 + 0.14x_1x_3 + 1.54x_2x_3 \quad (2)$$

$$Y(\text{Exo-PG}) = 24.04 + 2.15x_1 - 4.03x_1^2 + 1.06x_2 - 0.34x_2^2 - 1.71x_3 - 4.56x_3^2 - 1.09x_1x_2 + 4.14x_1x_3 + 0.238x_2x_3 \quad (3)$$

For the endo- and exo-PG activities, it was found that F_{calc} was highly significant ($p < 0.00014$; $p < 0.0007$), with 85.86% and 92.76% of the variation explained, respectively. The results indicated a good agreement between the experimental values and those predicted by the model. Greater endo-PG (43.7 U.mL^{-1}) and exo-PG (24.8 U.mL^{-1}) activities were obtained under condition 12 in which the culture medium contained 22 g.L^{-1} of glucose, 80 g.L^{-1} of wheat bran extract, and 13 g.L^{-1} of peptone. This medium, henceforth, is called WBEG.

3.2. Comparison of volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}) in STR and airlift bioreactors.

The internal circulation airlift and the STR were compared with respect to the K_{La} in tests performed in non-inoculated WBEG medium (Figure 2). As shown in this figure, in the tests with the STR, the effect of the stirring speed on the K_{La} was much more intense than that of the air flow rate. By comparing the airlift reactor and the STR operated at 300 rpm, one can observe that equivalent K_{La} values were measured for Q from 1.25 to 2.0 vvm. However, for stirring speeds from 400 to 700 rpm in the STR, the significantly higher K_{La} values disclose the strong limitation of the airlift reactor in terms of oxygen transfer. As such, in fermentation conditions in the airlift reactor, one could expect large difficulties in supplying the microorganism with dissolved oxygen, especially considering that, besides the presence of wheat bran extract and pectin in the medium, the fungus biomass itself strongly affects the oxygen transfer rate.

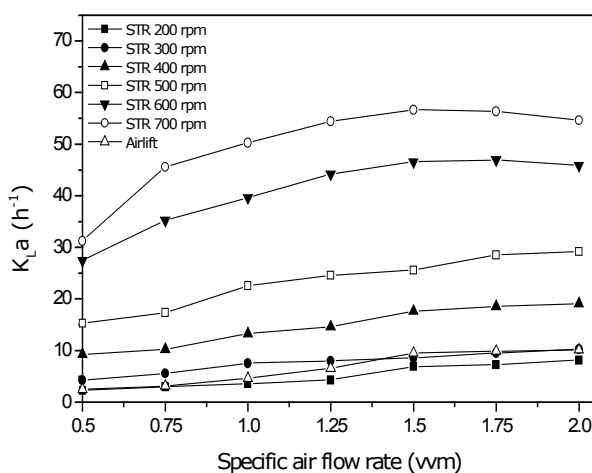


Fig. 2. Variation in the volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}) with the specific air flow in the stirred tank bioreactor (STR), operating at 200-700 rpm, and the internal circulation airlift bioreactor, in non-inoculated WBEG medium, at 28°C.

3.3. Growth of *Aspergillus oryzae* and polygalacturonase production in STR and airlift bioreactors

A. oryzae IPT301 was cultivated in WBEG medium in the STR and airlift bioreactors. The results of these tests are summarized in Table 2. It can be observed that, in general, slightly higher results were achieved for the STR, both in terms of the enzyme yields and productivities.

Table 2 General results obtained for the *Aspergillus oryzae* cultivation in WBEG medium in the stirred tank bioreactor (STR) and the internal circulation airlift bioreactor.

	Stirred tank bioreactor	Internal circulation airlift bioreactor
X_m (g.L ⁻¹)	14.1±0.13	10.1±0.03
tx_m (h)	36	36
Endo-PG (U.mL ⁻¹)	91.3±0.18	86.2±0.23
Exo-PG (U.mL ⁻¹)	65.2±0.25	60.6±0.1
$Y_{X/RS}$ (g.g ⁻¹)	0.68	0.49
$Y_{exo-PG/RS}$ (U.g ⁻¹)	3.16	2.98
$Y_{endo-PG/RS}$ (U.g ⁻¹)	4.42	4.23
p_{exo-PG} (U.mL ⁻¹ h ⁻¹)	0.68	0.63
$p_{endo-PG}$ (U.mL ⁻¹ h ⁻¹)	0.95	0.89

X_m – maximum cellular concentration ; tx_m – time maximum cellular concentration; Endo-PG – maximum endo-polygalacturonase activity in 96 hours of process; Exo-PG – maximum exo-polygalacturonase activity in 96 hours of process; $Y_{X/RS}$ – yield factor in cells; Y_{exo-PG} , $Y_{endo-PG}$ – yield factor in exo- and endo-polygalacturonase; $p_{endo-PG}$, p_{exo-PG} – productivity in endo- and exo-polygalacturonase.

In Figures 3 and 4, the time courses of the variables monitored during the cultivation of *A. oryzae* in the STR and the airlift bioreactor, respectively, are depicted. After a lag phase of 5 and 10 h, for both conditions, an intense cellular growth was observed, with similar cellular concentrations being reached up to around 20 h of cultivation (Figures 3A and 4A). From this point onward, a reduction in the growth rate was observed in the airlift bioreactor. Thus, on reaching the stationary growth phases, between 30 and 35 h of process, the maximum cellular concentration in the STR (14.1 g.L⁻¹) was higher than that obtained in the airlift (10.1 g.L⁻¹).

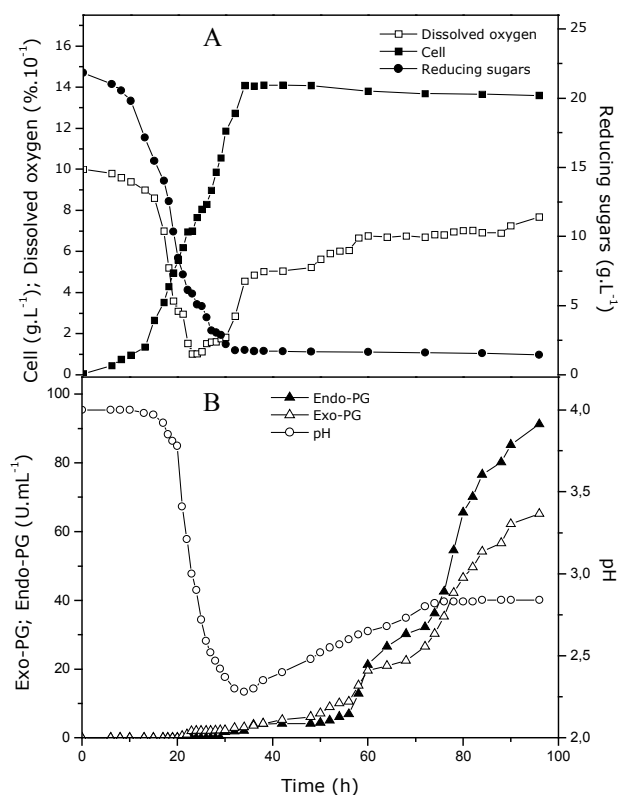


Fig. 3. Time course of *Aspergillus oryzae* cultivation in WBEG medium in the stirred tank reactor. (A) cell, reducing sugar, and dissolved oxygen concentration. (B) endo-polygalacturonase (endo-PG) and exo- polygalacturonase (exo-PG) activities, and pH.

The consumption of reducing sugars was gradual up to 30 h of process, accompanying the fungal growth, both in the STR and the airlift bioreactors. This was followed by a period with constant residual concentrations, possibly due to the presence in the medium of reducing substances which *A. oryzae* is unable to metabolize (Figures 3A and 4A).

Also in Figures 3A and 4A, one can see that the dissolved oxygen concentration during *A. oryzae* cultivation in both types of bioreactors decreased rapidly after the lag phase as a consequence of the intense microbial metabolism, with an increase in apparent viscosity due to the cellular growth also contributing to this decrease. For both reactors, the time course for the dissolved oxygen concentration presented a similar behavior, decreasing to values of around 15% of the saturation value, between 20 and 30 h of process, and increasing again at the end of the growth phase and during the stationary phase. It is interesting to remark that,

with the STR, a stirring speed of 700 rpm was needed to avoid having the minimum dissolved oxygen concentration decreased to below 15% of the saturation value. With the airlift reactor, despite the already discussed oxygen transfer limitation, such a minimum oxygen concentration was also observed.

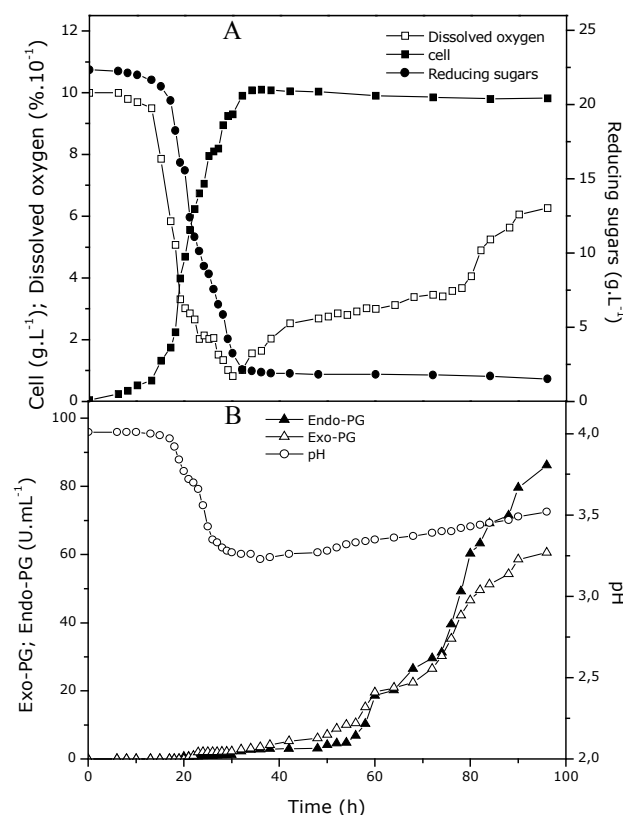


Fig. 4. Time course of *Aspergillus oryzae* cultivation in WBEG medium in the airlift bioreactor. (A) cell, reducing sugar, and dissolved oxygen concentration. (B) endo-polygalacturonase (endo-PG) and exo-polygalacturonase (exo-PG) activities, and pH.

The endo and exo-PG activity levels, in both types of bioreactors, showed profiles which were not kinetically associated with the cellular growth; levels of 91.3 U.mL⁻¹ of endo-PG and 65.2 U.mL⁻¹ of exo-PG being reached in the STR bioreactor and 86.2 U.mL⁻¹ of endo-PG and 60.6 U.mL⁻¹ of exo-PG in the airlift bioreactor in approximately 96 h of cultivation (Figures 3B and 4B). The same figures also show that the minimum pH of the process in the STR was around 2.3, while in the airlift bioreactor this value was approximately 3.3.

According to Kahar et al. (2002), the mycelium growth, the morphology, and the formation of products are related to the type of bioreactor used. In *A. oryzae* cultivation, the intense cellular growth results in high oxygen consumption. Thus, the difference in terms of biomass concentration, favoring the STR, could be due to the mechanical stirring, which would allow a better oxygen supply to the culture. However, the minimum values determined for dissolved oxygen concentration were very similar in the two cases, as mentioned before in this work, invalidating this hypothesis. For *A. oryzae* IPT301, apparently, the expected shearing effect of the STR turbines is not so critical, even though, during the operation, high stirring rates were used in order to meet the oxygen uptake rate of the culture. Since in the STR the shearing is dependent on the terminal velocity (v_{tip}) of the turbines, the results are even more interesting considering that with an increase in the scale of an aerobic bioprocess - taking as scaling criteria the maintenance of the K_La and the specific air flow - the v_{tip} value in the industrial bioreactor is lower than that in the laboratory.

According to studies by Lazaridou et al. (2002), with *Aureobasidium pullulans*, and Xu et al. (2006), with *Paecilomyces tenuipes*, the growth and performance of these microorganisms were favored by the stirring in the STR bioreactor. According to the latter authors, the assimilation of sugars increases with an increase in stirring, which may explain the better results obtained with STR in the present work.

As previously mentioned, the airlift bioreactor has been extensively studied as an alternative for the STR, mainly for the cultivation of microorganisms which are sensitive to shearing. It is possible, however, that the problem of shearing also occurs in the airlift bioreactor when high air flows are used. According to Jin et al. (1999), the increase in air flow during *A. oryzae* cultivation in an airlift bioreactor resulted, up to a certain point, in an increase in biomass, with damage to the mycelium being observed for flows above 1.6 vvm. In the *A. oryzae* cultivation in the airlift bioreactor in this study, there was a need for intense

aeration of the culture medium – with a peak of 2.5 vvm – in order to maintain an oxygen concentration over the critical value, allowing shearing to be included in the hypotheses proposed to explain the results found.

Regarding the polygalacturonase production in the STR bioreactor, conversion factors were determined for both enzymes of between 4% and 6% higher than those calculated for the airlift bioreactor, with similar differences also being observed for the productivities. These data suggest that the enzyme production is not proportional to the fungal biomass formed, given that the yield factor in cells in the STR was around 39% higher than that calculated for the airlift bioreactor (Table 2). One aspect which may have influenced the formation of enzymes is the variation in the pH of the medium. As previously noted, the pH of the medium during *A. oryzae* cultivation in the airlift bioreactor showed a less accentuated drop than that observed in the STR bioreactor. In a work with the same strain of *A. oryzae*, Malvessi and Silveira (2004) obtained higher pectinolytic activity levels in experiments in which the pH decreased from 4.0 to 2.7, these lower values being controlled in the experiment. When these authors controlled the pH at values close to 4.0 for the whole duration of the run, insignificant enzymatic levels were observed.

4. Conclusions

In terms of the volumetric oxygen transfer coefficient, measured in non-inoculated culture medium, the laboratory-scale airlift bioreactor tested showed a performance similar to the stirred tank bioreactor only for stirring speeds up to 300 rpm. Despite this result, even without mechanical stirring, it was possible, with the airlift bioreactor, to guarantee the oxygen supply for the *A. oryzae* cultivation. On comparing the STR and airlift bioreactors in this process, lower cellular growth was achieved in the latter. However, the close results for the final endo and exo-polygalacturonase activities suggest that the airlift bioreactor has

potential for use in the production of these enzymes in larger scale operation, with lower installation and operation costs in comparison to a STR.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Universidade de Caxias do Sul (UCS) for the financial support of this work.

References

- Acuña-Arguelles, M.E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48, 808-814.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L., 1998. Industrial applications of enzymes: a review. Process Biochemistry. 33, 21-28.
- Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 164-169.
- Cao, Y., Meng, De-jing., Lu, J., Long, Jie., 2008. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. African Journal of Biotechnology. 7, 631-638.
- Chisti, M.Y., 1989. Airlift bioreactors. Elsevier Science Publishers LTD, England.
- Coelho, M.A.Z., Medronho, R.A., Leite, S.G.F., Couri, S., 1995. Partial purification of a polygalacturonase produced by solid state cultures of *Aspergillus niger* 3T5B8. Journal of the Brazilian Society for Microbiology. 26, 318-322.

- Couri, S., Farias, A., 1995. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. Rev. Microbiol. 26, 314-317.
- Damaso, M.C.T., Andrade, C.M.M.C., Pereira, Jr. N., 2002. Production and properties of the cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145, Braz. J. Microbiol. 33, 333–338.
- Djekrif-Dakhmouche, S., Gheribi-Aoulmi, Z., Meraihi, Z., Bennamoun, L., 2006. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. Journal of Food Engineering. 73, 190-197.
- Gainvors A., Nedjaoum, N., Gognies, S., Muzart, M., Nedjma, M., Belarbi, A., 2000. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGLI-I gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Fems Microbiol. Lett. 183, 131-135.
- Galiotou-Panayotou, M., Kapantai, M., Kalantzi, O., 1997. Growth conditions of *Aspergillus* sp ATHUM-3482 for polygalacturonase production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47, 425-429.
- Gavrilescu, M., Tudose, R.Z., 1998. Concentric-tube airlift bioreactors. Part 1: Effects of geometry on gas holdup. Bioprocess Eng. 19(1), 37-44.
- Gigras, P., Sahai, V., Gupta, R., 2002. Statistical media optimization and production of ITS α -Amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor. Current Microbiology. 45, 203-208.
- Gluszczyk, P., Michalski, H., 1994. Cultivation of *Aspergillus niger* in a pilot plant external-loop air-lift bioreactor. FEMS Microbiology Reviews. 14(1), 83-88.
- Hansen, D.N., 2003. XXL – A nova geração de pectinases. Biotimes – Revista Bioindustrial Novozymes. 1, 04-05.

- Hess, J., Leitner, C., Galhaup, C., Kulbe, K.D., Hinterstoisser, B., Steinwender, M., Haltrich, D., 2002. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl. Biochem Biotechnol.* 98-100, 229-41.
- Jin, B., Van-Leeuwen, H.J., Patel, B., 1999. Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry.* 34, 335-340.
- Kahar, P., Kobayashi, K., Iwata, T., Hiraki, J., Kojima, M., Okabe, M., 2002. Production of polylysine in an airlift bioreactor (ABR). *J. Biosci. Bioeng.* 93, 274-280.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology.* 77, 215-227.
- Lazaridou, A., Roukas, T., Biliaderis, C.G., Vaikousi, H., 2002. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank reactor under varying agitation. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 122-132.
- Maiorano, A.E., 1982. Influência da concentração de inóculo e da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas aminolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. Dissertação de mestrado. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.
- Maiorano, A.E., 1990. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. Tese de Doutorado. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.
- Maldonado, M.C., Strasser de Saad, A.M., 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 34-38.
- Malvessi, E., Silveira, M.M., 2004. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* 47, 693-702.

- Merchuk, J.C., Asenjo, J.A., 1995. Fundamentals of bioreactor design. Reactor System Design. Marcel Dekker. Inc. EUA.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426.
- Moo-Young, M., Blanch, H.W., 1989. Transport Phenomena and Bioreactor Design. Basic Biotchenology. Academic Press. 3, 135-151
- Moreira, G.M., Reis, S., Costa, M.A.F., Souza, C.G.M., Peralta, R.M., 2005. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. Brazilian Journal of Microbiology. 36, 7-11.
- Patil, S.R., Dayanand, A., 2006. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. Bioresource Technology. 97, 2054-2058.
- Rombouts, F.M., Pilnik, W., 1980. Pectic enzymes. In: Rose, A. H., Ed. Economic Microbiology. London: Academic Press. 5, 227.
- Solis-Pereyra, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M., 1993. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in Submerged and solid state fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 36-41.
- Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 95, 267-272.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M., 2003. Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. Journal of Chemical Technology and biotechnology. 78, 1259-1266.
- Weuster-Botz, D., 2000. Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search. J. Biosci. Bioeng. 90, 473–483.
- Wu, W.T., Hsu, Y.L., Ka, Y.F., Yao, L.L., 2002. Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 175-177.

Xu, C.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W., 2006. Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. *Bioresource Technology*. 97, 770-777.

4.4 Artigo 2: Influence of pectin, glucose, and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in liquid medium

Influence of pectin, glucose, and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in liquid medium

Abstract

Endo- and exo-polygalacturonase (PG) production by *Aspergillus oryzae* IPT 301 was evaluated in submerged process in a batch bioreactor. Media containing 0, 10, and 20 g/L pectin and 0 to 30 g/L glucose were tested. For cultivations where pH was not controlled, the use of 20 g/L pectin and 10 g/L glucose resulted in superior enzyme activities compared to control media with 0 and 10 g/L of the inducer and the same glucose concentration. Endo-PG activity was 125 U/L (twice that of the control media), and exo-PG activity was 76.3 U/mL (thirteen times higher than the control). For cultivations where pH was controlled to a minimum value of 2.7, media containing 20 g/L pectin and 20 to 50 g/L glucose were tested. In these cultivations, significant improvement of both endo- and exo-PG activities was attained. Maximum enzyme activities (175.0 U/mL for endo-PG and 103.0 U/mL for exo-PG) were obtained in pH-controlled batch experiments with 30 g/L glucose. These results indicate that the production of polygalacturonases by *A. oryzae* is especially dependent on the composition of the cultivation media and the variation of pH during the process.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, polygalacturonases, effects of glucose and pectin, pH control.

Introduction

Pectinases, or pectinolytic enzymes, are naturally produced by plants, filamentous fungi, bacteria and yeasts [1, 2]. Because of their ability to degrade pectic substances, these enzymes are widely used in the food industry to assist in the extraction and clarification of fruit and vegetable juices [3, 4, 5].

Pectinases can be produced by solid-state or submerged processes, and filamentous fungi belonging to the genus *Aspergillus* are most often used [6, 7, 8, 9, 10]. This genus has long been known by the variety of pectinolytic enzymes produced by its members [11].

Generally, the fermentative production of enzymes requires special attention to the composition of the culture medium. Media can contain components involved in the induction, repression or inhibition of enzyme formation and secretion (in the case of extracellular enzymes) [9, 12]. Besides the carbon source, other medium components must be carefully chosen to achieve good results [13]. According to Roumbouts and Pilnik [3], culture media with an adequate balance of simple carbohydrates and pectin lead to the best production of pectinases in a submerged process. Due to their role as pectinase inducers, pectin or agricultural residues with high pectin content are essential components of the culture medium, and Aguilar and Huitron [14] describe a stimulating effect by galacturonic acid and glucose on the production of pectinases by *Aspergillus* sp. Nevertheless, the same authors observed that production of pectinases was strongly repressed by high concentrations of these compounds in the cultivation medium. Similar results were published by Teixeira et al. [11], who described a repression of endo- and exo-PG production in *Aspergillus japonicus* when concentrations of glucose, pectin and sucrose were above certain levels. Solis-Pereyra et al. [6] and Acuña-Arguelles et al. [7] also reported that an excess of glucose in solid media reduced the formation of pectinases by *Aspergillus niger*. These authors claim that this result was due to a strong drop in the pH of the medium rather than catabolic repression or growth inhibition.

Previous published data suggest that the production of pectinases by *A. oryzae* is associated with the variation of medium pH. Ueda et al. [15] evaluated the influence of pH on the formation and the composition of the *A. oryzae* A-3 pectinolytic complex, and they observed significant differences between cultivations with and without pH control. These

authors also related their results to the stability profile of each enzyme in the pectinase complex. Malvessi and Silveira [16] studied the production of polygalacturonases by *A. oryzae* and observed that the fungus growth is favored by pH values close to 4 while pH values around 3 are needed for endo- and exo-PG production.

The aim of this study was to evaluate the production of endo- and exo-polygalacturonases (the hydrolases of the pectinase group) by *A. oryzae*, using media containing different concentrations of glucose and pectin. Additionally, the effect of pH on the process was assessed.

Material and methods

Microorganism

A. oryzae IPT301 from the Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (Brazil) culture collection was used in these experiments. The strain was propagated in glycerin agar medium [17] and incubated at 30°C for 5 days. After incubation, the sporulated cultures were stored at 4°C or were used for the inoculation of production media.

Culture media

The influence of culture medium composition on fungal growth and on the production of endo- and exo-polygalacturonases (endo- and exo-PG) by *A. oryzae* was evaluated in this work. WBE medium [18], used as the basis for the formulations tested, contains aqueous extract from 80 g of wheat bran, 500 mL; citric pectin (ESKISA S.A., Brazil), 20 g; glucose, 22 g; yeast extract, 0.05 g; (NH₄)₂SO₄, 5.0 g; MgSO₄, 0.5 g; KH₂PO₄, 2.5 g; FeSO₄·7H₂O, 6.3×10^{-4} g; ZnSO₄, 6.2×10^{-4} g; MnSO₄, 1×10^{-5} g; and distilled water, qsp 1 L. To prepare the wheat bran extract, 80 g of wheat bran (Moinho NORDESTE, Antônio Prado, Brazil) was finely milled (10 mesh) and mixed with 500 mL of distilled water,

and the mixture was autoclaved at 1 atm for 15 minutes. After cooling, the mixture was filtered, and the extract was used in the preparation of WBE medium.

The effect of citric pectin concentration present in WBE medium was evaluated in batch cultures. In these experiments, WBE medium was formulated with 0 and 10 g/L pectin and with 10 g/L glucose. In additional batch runs, WBE medium with glucose concentrations of 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 50 g/L was used (experiments G0, G5, G10, G15, G20, G25 and G30, and G20^{*}, G30^{*} and G50^{*}). All media were autoclaved at 1 atm for 15 minutes.

Operational conditions

The experiments were carried out in batch mode using a 5-L BIOSTAT B bioreactor (B. BRAUN BIOTECH, Germany) with a working volume of 4 L and 3 flat-blade impellers. The temperature was controlled at 28 °C, and the initial pH of all experiments was adjusted to 4.0 with 2 N HCl or 3 M NaOH. In experiments G0 through G30, no further pH control was done. In runs G20^{*}, G30^{*} and G50^{*}, after the normal decrease in pH, the pH was held at a minimum value of 2.7 by adding 3 M NaOH. In an attempt to keep the dissolved oxygen concentration at non-limiting levels for the organism, the stirring speed was varied from 300 to 750 rpm, and the specific air flow rate was between 0.5 and 2.5 vvm (volume of air per volume of medium per minute). Samples were collected periodically, centrifuged for 10 min at 10000 rpm, and stored at 4°C for later analysis.

Analytical methods

The concentration of soluble reducing sugars was quantified by the dinitrosalicylic acid (DNS) method [19], and the total reducing sugars were assayed using an adaptation of the method proposed by Bittman [20]. Briefly, the material was hydrolyzed in 1.5 M H₂SO₄,

neutralized with 4 M NaOH, clarified with $K_4F_6(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (150 g/L) and $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (300 g/L), and then the liberated reducing sugars were quantified using the DNS method.

The endo-polygalacturonase (endo-PG) activity measurements were based on the viscosity reduction of a 0.63% (w/v) solution of citric pectin (ESKISA S.A., Brazil) prepared with 0.05 M acetate buffer (pH 4.0). The analysis mixture was 3.2 mL of conveniently diluted sample with 14.8 mL of the citric pectin solution. This reaction was carried out at 30°C for 30 minutes, and the viscosity of the reaction mixture was determined using a DV-II+ viscosimeter (BROOKFIELD ENGINEERING, USA). One endo-PG unit was defined as the quantity of enzyme that causes a 50% reduction in solution viscosity under the standardized conditions [21]. The exo-polygalacturonase (exo-PG) activity was estimated in a reaction mixture containing 50 μ L of appropriately diluted sample and 2 mL of polygalacturonic acid (SIGMA, USA) in 0.1 M acetate buffer (pH 4). The exo-PG reaction was carried out at 35°C for 30 minutes. The galacturonic acid released in the reaction was quantified by the Somogyi [22] method. One unit of exo-PG was defined as the quantity of enzyme that leads to the release of 1 μ mol of galacturonic acid per minute per milliliter of enzymatic extract [23]. The activity of both enzymes is expressed in units per milliliter of medium (U/mL).

The spores used to inoculate the cultivation medium were enumerated by direct counting using a Neubauer chamber as previously described by Solis-Pereyra et al. [6]. The biomass concentration was determined gravimetrically using cellulose membranes with a pore size of 0.45 μ m. The volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) in non-inoculated WBE medium was determined using the static method described by Moo-Young and Blanch [24]. For this determination, the stirring speed was 300 rpm, the specific air flow rate was 2.0 vvm, and the medium temperature was held at 28°C.

Statistical analysis

Statistical tests were carried out by analysis of variance (one-way ANOVA) and the Tukey post-test using a probability level of less than 5% ($p \leq 0.05$).

Results and discussion

As already described in the present work, the addition of pectin to the cultivation medium is essential for inducing high titers of pectinase in *Aspergillus* fungi. In WBE medium, the concentration of citric pectin is 20 g/L, resulting in a viscosity of approximately 48 cP (at 30°C). This viscosity is significantly higher than the viscosity of the media without pectin (approximately 2.0 cP).

This increase in viscosity leads to a decrease in the oxygen transfer rate to the liquid phase, which can become a serious operational problem, especially in large-scale processing. To estimate the effect that pectin has on oxygen transfer in the medium, the volumetric oxygen transfer coefficient (K_La) was measured in WBE medium formulations containing 0 or 20 g/L pectin. The K_La was measured in non-inoculated media using aeration and agitation conditions described in the Material and Methods section. For the medium containing pectin, a K_La of 16 h^{-1} was determined, and the K_La of WBE medium without pectin was 26 h^{-1} . In addition to reducing the cost of the medium, the use of lower pectin concentrations could therefore improve the process by improving the efficiency of oxygen transfer.

To examine this hypothesis, experiments were conducted with WBE medium containing 0 and 10 g/L pectin. The medium containing 10 g/L pectin had a viscosity of approximately 18 cP, and the results from these cultivations were compared with those obtained using 20 g/L of the inducer. Typical time courses for the main process variables are shown for an *A. oryzae* cultivation in liquid WBE medium containing 20 g/L pectin (Figure 1). As depicted in Figure 1, after a lag phase of 10 h, the cellular growth was intense up to

approximately 36 h of cultivation. After 36 h, the culture reached the stationary phase, and a maximum cellular concentration of 12.3 g/L was achieved. The consumption of reducing sugars accompanied fungal growth and was gradual through 48 h of cultivation. At longer times, assays indicated constant residual sugar concentrations, possibly due to the presence of reducing substances that *A. oryzae* is unable to metabolize. After the lag phase, dissolved oxygen concentration decreased rapidly due to microbial metabolism. Between 24 and 30 h, dissolved oxygen decreased to approximately 30% saturation and then increased at the end of the growth phase and also during the stationary phase.

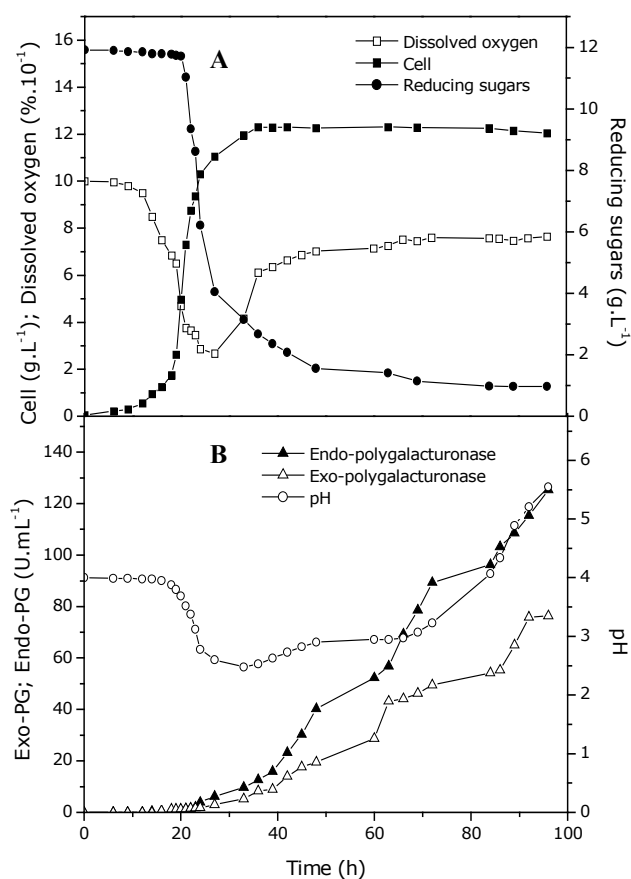


Figure 1. Time courses for cultivations of *Aspergillus oryzae* IPT301 in WBE medium with 20 g/L citric pectin and 10 g/L glucose. (A) Cell, reducing sugar, and dissolved oxygen concentration. (B) Endo-polygalacturonase (endo-PG) activity, exo-polygalacturonase (exo-PG) activity, and pH.

The endo- and exo-PG activities showed non-growth-associated production, and their maximum values were attained after approximately 96 h of cultivation (125 and 76.3 U/mL, respectively). During the growth phase, the pH dropped to values close to 2.5. After this time, increasing pH values were measured in association with polygalacturonase formation (Figure 1).

Table 1 compares the results of cultivations in WBE medium containing three different pectin concentrations.

Table 1. Results obtained for batch cultivations of *Aspergillus oryzae* IPT301 in WBE medium containing 10 g/L glucose and different initial concentrations of citric pectin.

Citric pectin (g/L)	0	10	20
Viscosity (cP)	2.0	18	48
S ₀ (g/L)	11.6	12.1	11.9
S _{cons} (g/L)	9.60	10.9	9.60
X _{max} (g/L)	11.9 ± 0.001 ^c	12.3 ± 0.1 ^a	12.3 ± 0.2 ^{ab}
t _{Xmax} (g/L)	24	36	36
pH _{min}	2.33	2.45	2.48
pH _{final}	7.76	7.60	5.55
Endo-PG _{max} (U/mL)	9.40 ± 0.1 ^c	67.5 ± 0.3 ^b	125 ± 0.2 ^a
t _{endo-PG max} (h)	96	96	96
Exo-PG _{max} (U/mL)	6.00 ± 0.2 ^c	47.5 ± 0.2 ^b	76.3 ± 0.3 ^a
t _{exo-PG max} (h)	60	96	96

Means followed by the same letter are not significantly different at a level of 5% (p < 0.05)

S₀, initial reducing substance concentration (expressed as glucose); S_{cons}, reducing substance concentration (expressed as glucose) consumed; X_{max}, maximum cell concentration; t_{Xmax}, time for achieving X_{max}; pH_{min}, minimum pH value; pH_{final}, pH value after 96 h of cultivation; Endo-PG_{max}, maximum endo-PG activity; Exo-PG_{max}, maximum exo-PG activity; t_{PGmax}, time for achieving endo-PG_{max} and exo-PG_{max}.

Dissolved oxygen concentration (at non-limiting levels for *A. oryzae*) was achieved by varying the stirring speed and the air flow rate. As expected, the control of dissolved oxygen was notably easier in reduced-pectin or pectin-free cultivation media. Similar

maximum cell concentrations (approximately 12 g/L) were measured in all three media conditions, indicating that pectin has little effect on growth of the culture. Higher endo- and exo-PG activities, however, were found in media with increased pectin content, demonstrating pectin essential role as enzyme inducer for this process. Based on these results, subsequent batch runs were performed with a citric pectin concentration of 20 g/L in WBE-based cultivation (Table 1).

The effect of glucose concentration on the batch process were tested in WBE medium containing initial glucose concentrations up to 50 g/L in runs with uncontrolled pH (G0 to G30) or with pH controlled to a minimum value of 2.7 (G20* to G50*). The results of these experiments are presented in Table 2. Increasing maximum concentrations of *A. oryzae* were obtained as the initial glucose concentration in WBE medium increased. This positive effect of glucose concentration on the growth of filamentous fungi has been specific reported by Gibson et al. [25] and by Taragano et al. [26]. An exception to this behavior was observed in run G50*, in which a cell concentration of 13.7 g/L was measured, suggesting that the high initial glucose concentration (approximately 50 g/L) may lead to some inhibition of cell growth.

For the experiments described in Table 2, the formation of endo- and exo-PG activities was not dependent on cell concentration. Among experimental runs performed without pH control, the highest activities for both endo- and exo-PG were obtained with 10 g/L glucose (G10), whereas the remaining runs (experiments G0, G5, G15, G20, G25 and G30) had significantly lower titers.

Table 2. Results obtained for batch cultivations of *Aspergillus oryzae* in WBE medium containing 20 g/L citric pectin and different initial glucose concentrations. Cultivations were operated with and without pH control.

	G0	G5	G10	G15	G20	G25	G30	G20*	G30*	G50*
S₀ (g/L)	2.40	7.50	11.9	15.4	21.4	26.3	31.1	21.5	31.6	51.3
S_{cons} (g/L)	-	6.90	10.9	14.2	20.1	25.0	29.7	19.0	30.5	47.2
X_{max} (g/L)	11.0 ^j	11.9 ⁱ	12.4 ^{fgh}	12.6 ^{fg}	13.1 ^e	13.8 ^c	14.8 ^{ab}	12.8 ^{fg}	14.9 ^a	13.7 ^{cd}
t_{Xmax} (g/L)	24	27	24	24	36	36	36	36	36	42
pH_{min}	3.03	2.69	2.48	2.11	2.10	2.02	2.00	2.70	2.70	2.70
pH_{final}	6.78	6.03	5.55	2.78	2.50	2.46	2.00	3.02	3.58	2.98
Endo-PG_{max} (U/mL)	11.0 ^j	86.3 ^f	125 ^c	98.6 ^d	98.0 ^{de}	81.3 ^g	67.3 ^h	158 ^b	175 ^a	18.6 ⁱ
t_{endo-PG max} (h)	72	96	96	96	96	96	96	96	96	96
Exo-PG_{max} (U/mL)	4.86 ^j	62.7 ^e	76.3 ^c	68.8 ^d	61.5 ^{ef}	58.6 ^g	22.5 ^h	83.6 ^b	103 ^a	12.3 ⁱ
t_{exo-PG max} (h)	92	96	96	96	96	96	89	96	96	96

Means followed by the same letter are not significantly different at a level of 5% ($p < 0.05$)

*pH controlled at a minimum value of 2.7 with 3 M NaOH

S₀, initial reducing substance concentration (expressed as glucose); S_{cons}, reducing substance concentration (expressed as glucose) consumed; X_{max}, maximum cell concentration; t_{Xmax}, time for achieving X_{max}; pH_{min}, minimum pH value; pH_{final}, pH value after 96 h of cultivation; Endo-PG_{max}, maximum endo-PG activity; Exo-PG_{max}, maximum exo-PG activity; t_{PGmax}, time for achieving endo-PG_{max} and exo-PG_{max}.

Figure 2 depicts the variation of pH with process time for experimental runs without pH control. Lower pH values were observed as the initial glucose concentration present in the WBE medium increased. In the sequence, pH presented growing values, especially in cultivations with 0, 5 and 10 g/L glucose.

One potential reason for the low activity titers in runs G15 to G30 (Table 2 and Figure 2) is that the pH of the cultures was too low for *A. oryzae* metabolism and that enzyme production was hindered. Another possibility, according Ueda et al. [15], is that the low pH has a negative effect on the stability of enzymes. To examine the effect of pH variation on the

production of endo- and exo-PG, a new series of experiments (G20*, G30* and G50*) was carried out in which the pH was controlled to a minimum value of 2.7. As shown in Table 2, the activities of both endo- and exo-PG were dramatically increased in experimental runs with initial glucose concentrations of 20 to 30 g/L and minimum pH of 2.7 (experiments G20* and G30*). On the other hand, in WBE medium containing 50 g/L glucose (experiment G50*), negligible polygalacturonase activities were achieved, despite the control of pH and the considerable biomass production. As reported by other authors [7, 27], this result may be due to the catabolic repression exerted by the high glucose concentration.

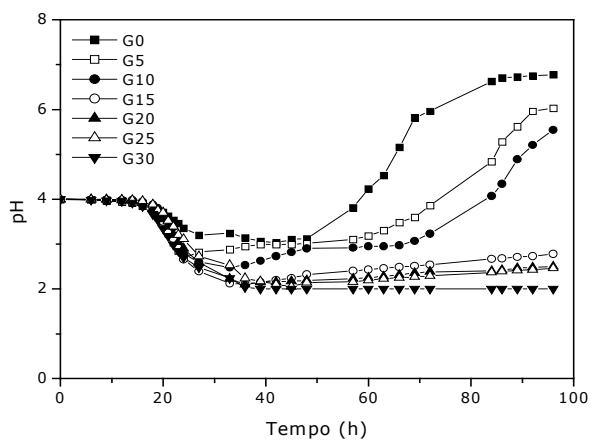


Figure 2. Time course of pH in batch cultivation of *Aspergillus oryzae* IPT301 without pH control. Cultivations were performed using WBE medium with initial glucose concentrations ranging from 0 to 30 g/L (G0 to G30).

Literature reports indicate both positive and negative effects of glucose on the production of enzymes belonging to the pectinase group. The results presented here confirm, as previously observed for different *Aspergillus* species, that the presence of high glucose concentrations in the cultivation medium can hinder the production of fungal pectinases. This hindrance is likely due to excessively low pH values as well as catabolic repression. Nevertheless, it was demonstrated that high enzyme titers could be obtained in liquid media

with glucose concentrations as high as 30 g/L, since pH is controlled to an adequate minimum level.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Universidade de Caxias do Sul (UCS) for the financial support of this work.

References

1. Gainvors A, Frézier V, Lemaesquier H, Lequart C, Aigle M, Belarbi A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast* 1994; 10:1311-1319.
2. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59:426-435.
3. Rombouts FM, Pilnik W. Pectic enzymes. In: Rose AH, Ed. *Economic Microbiology*. New York: Academic Press; 1980. p. 5-227.
4. Hansen DN. XXL – A nova geração de pectinases. *Biotimes Revista Bioindustrial Novozymes* 2003;1:04-05.
5. Semenova MV, Grishutin SG, Gusakov AV, Okunev ON, Sinitsyn AP. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry* 2003;68:559-569.
6. Solis-Pereyra S, Favela-Torres E, Viniegra-González G, Gutiérrez-Rojas M. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993;39:36-41.

7. Acuña-Arguelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-González G, Favela-Torres E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995;48:808-814.
8. Maldonado MC, Strasser de Saad AM. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998;20:34-38.
9. Blandino A, Dravillas K, Cantero D, Pandiella SS, Webb C. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. *Process Biochem* 2001;37:497-503.
10. Patil SR, Dayanand A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technol* 2006;97:2054-2058
11. Teixeira MFS, Lima Filho JL, Duran N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazil J Microbiol* 2000;31:286-290.
12. Galiotou-Panayotou M, Kapantai M, Kalantzi O. Growth conditions of *Aspergillus* sp ATHUM-3482 for polygalacturonase production. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;47:425-429.
13. Thomas KC, Hyness SH, Ingledew WM. Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. *Biotechnol Lett* 1996;18:1165-1168.
14. Aguilar G, Huitrón C. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microb Technol* 1987;9:690-696.
15. Ueda S, Fujio Y, Lim JY. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A 3. *J Appl Biochem* 1982;4:524-53.

16. Malvessi E, Silveira MM. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Brazil Arch Biol Technol 2004;47:693-702
17. Maiorano A E. Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. Brazil: Universidade de São Paulo, Msc. Thesis; 1982. p.63.
18. Fontana RC, Polidoro TA, Silveira MM. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Bioresource Technol 2009;100:4493-4498.
19. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;31:426.
20. Bittman R. Analysis of reducing sugar in breakfast cereal and other foods. J. Chem. Education 1974;51:49.
21. Gainvors A, Nedjaoum N, Gognies S, Muzart M, Nedjma M, Belarbi A. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGLI-I gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Fems Microbiol Lett 2000;183:131-135.
22. Somogyi M. Notes on sugar determination. J Biol Chem 1952;95:267-272.
23. Couri S, Farias A. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. Rev Microbiol 1995;26:314-317.
24. Moo-Young M, Blanch HW. Transport Phenomena and Bioreactor Design. Basic Biotchenology. New York: Academic Press 1989;3:135-151.
25. Gibson AM, Baranyi J, Pitt JI, Eyles MJ, Roberts TA. Predicting fungal growth: the effect water activity of *Aspergillus flavus* and related species. Int J Food Microbiol 1994;23:419-431.

26. Taragano V, Sanchez VE, Pilosof AMR. Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. Biotechnol Lett 1997;19:233-236.
27. Solis-Pereyra S, Favela-Torres E, Gutiérrez-Rojas M, Roussos S, Saucedo-Castañeda G, Gunasekaran P, Viniegra-González G. Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. World J Microbiol Biotechnol 1996;12:257-260.

4.5 Artigo 3: Produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica e *airlift* de circulação interna e externa

Produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em biorreatores com agitação mecânica e *airlift* de circulação interna e externa

RESUMO

A produção de endo e exo-poligalacturonase (PG) por *Aspergillus oryzae* IPT 301 foi avaliada em biorreator de agitação mecânica (STR) e em biorreatores *airlift* de circulação interna e externa. Foram testados meios de cultivo em STR, formulados com solução de pectina não hidrolisada (WBE), parcialmente hidrolisada (WBE2, WBE3 e WBE4) e metade da pectina não hidrolisada e a outra metade parcialmente hidrolisada (WBE5). A produção de PG em biorreatores STR e *airlift* foi avaliada na condição WBE5 e na condição WBE6, com pectina não hidrolisada, em que os sais nutrientes foram adicionados parceladamente ao meio durante o cultivo. Entre os meios com pectina parcialmente hidrolisada, valores superiores de endo-PG (149,0 U/mL) e exo-PG (80,2 U/mL) foram obtidos na condição WBE5, sendo que o uso do meio WBE resultou em atividades de endo e exo-PG estatisticamente inferior: 130,0 e 78,0 U/mL, respectivamente. Após 96 h de processo, atividade superior de endo-PG (145,0 U/mL) foi atingida no STR, na condição WBE5, seguindo-se a condição WBE6 (140,0 U/mL) no mesmo reator. Em biorreatores *airlift*, títulos superiores de endo-PG (116,0 U/mL) e exo-PG (80,4 U/mL) foram atingidos no sistema de circulação externa, na condição WBE6, observando-se, no segundo caso, atividade semelhante à obtida no STR.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*, biorreator de agitação mecânica, biorreatores *airlift* de circulação interna e externa, viscosidade, poligalacturonases.

1. INTRODUÇÃO

As pectinases são enzimas que agem sobre as substâncias pécticas por reações de hidrólise, transeliminção e desesterificação (Kashyap *et al.* 2001). Industrialmente, essas enzimas são empregadas, principalmente, na clarificação de sucos e de vinhos,

proporcionando a hidrólise da pectina, a solubilização do polissacarídeo, o decréscimo da viscosidade do líquido e a aglomeração do material particulado na forma de flocos que podem ser separados por filtração ou centrifugação (Blanco *et al.* 1999; Hoondal *et al.* 2002).

Na produção de pectinases são utilizados, geralmente, fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* que se destacam pela diversidade de enzimas pectinolíticas produzidas (Semenova *et al.* 2003, Teixeira *et al.* 2000). Na produção em larga escala, são empregados microrganismos da espécie *A. niger* que têm a classificação GRAS ("generally recognized as safe") do FDA (Food and Drugs Administration), órgão do governo dos EUA cujas normas são internacionalmente reconhecidas (Schuster *et al.* 2002).

Fungos filamentosos são frequentemente utilizados para a produção de metabólitos e, em cultivos submersos, apresentam diferentes morfologias – *pellets* ou filamentos livres – dependendo do microrganismo e das condições de cultivo. Cultivos com a formação de *pellets* são particularmente exigentes em termos de transferência de oxigênio, pois a biomassa exerce grande influência sobre as propriedades reológicas do meio. Ressalte-se, no caso, que a transferência de oxigênio é uma função complexa, relacionada com parâmetros operacionais, incluindo agitação, vazão volumétrica e dimensões geométricas do biorreator (Prosser & Tough, 1991; Ju *et al.* 1991).

Biorreatores de agitação mecânica (STR) e *airlift* são amplamente utilizados em bioprocessos (Nienow, 1998). Biorreatores *airlift* são usados para fluidos com baixa viscosidade e que não exijam agitação mecânica, resultando em baixo custo para a transferência de oxigênio (Nicolella *et al.* 2000; Chisti, 1998). Os *airlift* são considerados uma importante classe de biorreatores de coluna de bolhas modificados (Vial *et al.* 2002) e têm recebido atenção devido à sua simplicidade de projeto e construção, versatilidade, simplicidade de operação, baixo consumo de energia e altas taxas de transferência de massa e calor (Yuguo *et al.* 2000).

Apesar das vantagens apresentadas, a aplicação dos biorreatores *airlift* em escala industrial é ainda limitada, pois eles apresentam menor flexibilidade na resposta às mudanças do meio durante processo que os STR, devendo sua geometria, portanto, ser definida para processos específicos (Vial *et al.* 2002). Análise semelhante foi feita por Gouveia *et al.* (2003), em trabalho sobre o efeito da geometria, condições operacionais, circulação de líquido e transferência de massa em biorreator *airlift*, que observaram que a transferência de oxigênio para o meio líquido é afetada por pequenas mudanças na geometria do sistema, particularmente pelo espaço superior do biorreator. Esses mesmos autores ressaltam a dificuldade de compararem-se os resultados de pesquisas com reatores *airlift* devido às diferenças na sua geometria nos diferentes estudos. Na literatura, são encontrados trabalhos em que são comparados os desempenhos de diferentes tipos de biorreatores utilizados em cultivos submersos de fungos como *Grifola frondosa* (Lee *et al.* 2004), *Metarhizium anisopliae* (Tamerler-Yildir *et al.* 1997), *Aspergillus niger* (Bizukoje & Ledakowics, 2004), *Aspergillus terreus* (Yahiro *et al.* 1997). De um modo geral, constata-se nesses trabalhos que o uso de um tipo ou outro de biorreator vai depender das características de cada processo e de cada microrganismo em particular.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de endo e exopoligalacturonase, duas hidrolases do grupo das pectinases, por *Aspergillus oryzae*, em biorreatores STR e *airlift* de circulação interna e externa, em escala de laboratório. Adicionalmente, foram realizados ensaios em que foi avaliada a hidrólise parcial da pectina, que faz parte da composição do meio de cultivo, como indutor e, a limitação do crescimento celular, com o fim de buscar-se diminuir a viscosidade do meio e, com isso, facilitar a mistura e a transferência de oxigênio para o meio de cultivo de *A. oryzae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Microrganismo*

A. oryzae IPT 301 (Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo) foi utilizado nos experimentos. A linhagem foi propagada em meio glicerinado agarizado (Maiorano, 1982), a 30°C, por 5 dias. Após esse período, a cultura foi estocada a 4°C ou usada como inóculo do meio de produção.

2.2 *Meios de cultivo*

Nos ensaios foram utilizadas formulações isentas de sólidos em suspensão a base de extrato aquoso de farelo de trigo. O meio básico de produção (WBE) utilizado tinha a seguinte composição (Fontana *et al.* 2009): extrato aquoso de 80 g de farelo de trigo, 500 mL; pectina cítrica (ESKISA S.A., Brasil), 20 g; glicose, 20 g; peptona, 13 g; extrato de levedura, 0,05 g; (NH₄)₂SO₄, 5 g; MgSO₄, 0,5 g; KH₂PO₄, 2,5; FeSO₄.7H₂O, 6,3 × 10⁻⁴ g; ZnSO₄, 6,2 × 10⁻⁴ g; MnSO₄, 1 × 10⁻⁵ g; água destilada q.s.p. 1 L. Para a obtenção do extrato de farelo de trigo, uma massa de 80 g de farelo integral foi triturada em moinho, selecionada em peneira de classificação de 10 mesh, misturada com 500 mL de água destilada, sendo a mistura autoclavada a 1 atm por 15 min. Após o resfriamento, a mistura foi filtrada e o extrato utilizado na composição dos meios de cultivo.

Com a finalidade de diminuir a viscosidade do meio de cultivo, foram realizados testes em que a pectina cítrica – utilizada no meio de cultivo como indutor da produção de endo e exo-PG – foi hidrolisada parcialmente por ação enzimática. Para isto, preparou-se uma solução de pectina oito vezes concentrada em relação à concentração desse componente no meio, sendo adicionados à solução 10 mL de extrato enzimático bruto, oriundo de cultivo líquido de *A. oryzae*, com uma atividade de endo-PG de 150 U/mL. A reação foi conduzida a 28°C e sob constante agitação. Para a medida da viscosidade, alíquotas foram retiradas

periodicamente e submetidas à temperatura de 100°C, por 10 min, para a inativação enzimática e interrupção da reação. Para os testes de produção com o indutor (pectina), utilizou-se pectina não hidrolisada e parcialmente hidrolisada. Foram testados meios formulados com solução de pectina não tratada (meio WBE), com viscosidade (μ) de 12,8 cP, e parcialmente hidrolisada, com μ = 10,5, 6,1 e 2,3 cP, para formular os meios WBE2, WBE3 e WBE4, respectivamente. Posteriormente, realizou-se um teste de produção com o meio WBE5 em que metade da pectina do meio foi parcialmente hidrolisada (6,1 cP) e a outra metade não foi tratada enzimaticamente (12,8 cP). Avaliou-se, ainda, uma condição de cultivo (WBE6) em que 1/4 da massa total de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 e MnSO_4 estava presente no meio no momento da inoculação e os restantes 3/4 foram adicionados ao meio em 48, 60 e 72 h de processo, em parcelas iguais. Nesse último caso, a pectina presente no meio não foi hidrolisada. O pH inicial de todos os meios foi ajustado a 4,0 com a adição de soluções de HCl 2 M ou NaOH 3 M. Os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 min.

2.3 Condições experimentais

Nos cultivos em biorreator de agitação mecânica (STR), foi utilizado um equipamento B. BRAUN BIOTECH modelo BIOSTAT[®] B (Alemanha), com volume total de 5 L e volume de trabalho de 4,1 L. O sistema é equipado com três turbinas com seis pás planas com 6 cm de diâmetro. Durante os cultivos, a frequência dos agitadores foi variada de 300 a 780 rpm e a vazão específica de ar de 0,5 e 2,5 vvm (volume de ar por volume de líquido por minuto). Os biorreatores *airlift* de circulação interna e externa tinham um volume total de 5 L e volume de trabalho de 4,1 L. As dimensões dos reatores (mm) são apresentadas na Figura 1.

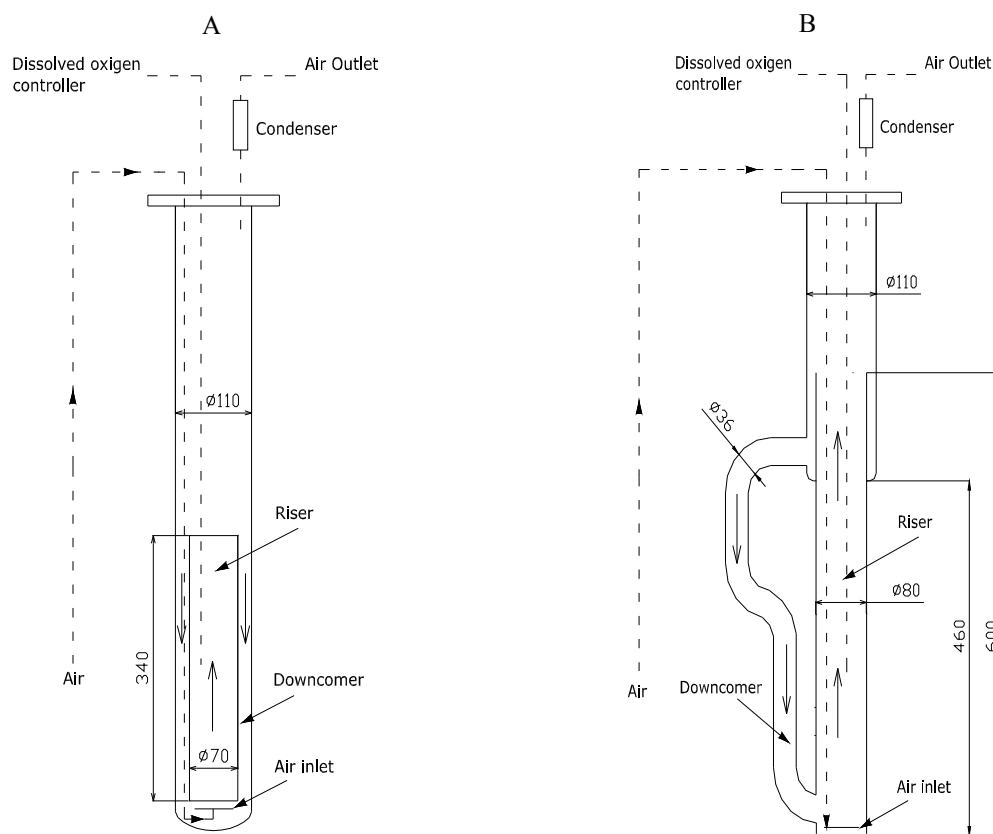


Figura 1. Configuração dos biorreatores *airlift* de circulação interna (A) e de circulação externa (B) utilizados em cultivos de *Aspergillus oryzae* em processo submerso.

O cilindro externo do biorreator *airlift* de circulação interna (*downcomer*) foi construído em vidro refratário e o tubo interno (*riser*) em cloreto de polivinila (PVC). O biorreator *airlift* de circulação externa foi totalmente construído em vidro refratário. O sistema de aeração nesses sistemas foi constituído por um tubo de aço inoxidável e anéis de silicone com perfurações para a saída do ar. As tampas dos biorreatores *airlift* foram construídas em *nylon*. Para o controle da temperatura foi utilizado um banho circulante com um tubo interno em forma de “U”. Os reatores *airlift* foram conectados à unidade de controle do sistema B. BRAUN BIOTECH, modelo BIOSTAT® B (Alemanha).

Os meios de cultivo foram inoculados com uma suspensão de conídios de *A. oryzae* IPT 301 de forma a ter-se no tempo inicial de processo uma concentração de 10^6 conídios/L. Em todos os cultivos, a temperatura de operação foi de 28°C e o pH foi controlado em um

valor mínimo de 2,7 com NaOH 3 M. As amostras foram coletadas periodicamente, centrifugadas por 10 min, a 10000 rpm, e mantidas a 4°C para posteriores análises de açúcares redutores solúveis, atividade de endo e exo-poligalacturonase. Para os três biorreatores, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) foi medido em meio de cultivo não inoculado à vazão específica de ar de 1,5 vvm e, no caso do STR, a 400 rpm.

2.4. Métodos analíticos

A concentração de açúcares redutores solúveis nos meios de cultivo foi determinada pelo método do DNS (ácido 3,5-di-nitro-salicílico) (Miller, 1959).

A atividade de endo-PG foi determinada pela medida da redução da viscosidade de solução padrão de pectina cítrica (ESKISA S. A. Indústria e Comércio) 0,63% (m/v), em tampão acetato 0,05 M pH 4,0. A análise foi realizada utilizando-se 3,2 mL da amostra diluída em 14,8 mL da solução de pectina cítrica, sendo a reação realizada a 30°C por 30 min. Transcorrido o tempo de reação, a viscosidade da mistura reacional foi medida em viscosímetro (BROOKFIELD ENGINEERING, USA) modelo DV-II+. Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas (Gainvors *et al.* 2000). A atividade de endo-PG é expressa em unidades por mL de meio (U/mL).

A atividade de exo-PG foi estimada em mistura reacional contendo 50 µL de amostra convenientemente diluída e 2 mL de solução de ácido poligalacturônico (SIGMA, EUA) em tampão acetato 0,1 M (pH 4), sendo a reação conduzida a 35°C por 30 min. As substâncias reductoras liberadas na reação foram quantificadas pelo método de Somogyi (1952). Uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que leva à liberação de 1 µmol

de ácido galacturônico por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições da reação (Couri & Farias 1995). A atividade de exo-PG foi expressa em unidades por mL (U/mL).

A concentração celular foi determinada por gravimetria, utilizando membranas de celulose (0,45µm). O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), em meio não inoculado, foi determinado pelo método descrito por Moo-Young & Blanch (1989).

2.5 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados por análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da produção de poligalacturonases (PG) em meio contendo pectina parcialmente hidrolisada em biorreator de agitação mecânica (STR)

Em trabalho anterior (Fontana *et al.* 2009), foi demonstrado que a presença da pectina no meio é essencial para a obtenção de títulos significativos de poligalacturonases por *A. oryzae* IPT-301. Entretanto, a presença do indutor no meio resulta em significativo aumento da viscosidade, influenciando a reologia do líquido e dificultando a transferência de oxigênio para o cultivo, o que motivou a realização de cultivos de *A. oryzae*, em STR, em meios líquidos contendo pectina parcialmente hidrolisada em comparação com o meio básico contendo o indutor não hidrolisado (WBE). Os resultados gerais dos ensaios são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus oryzae* em processo submerso, utilizando meios com pectina integral (WBE) ou parcialmente hidrolisada (WBE2 a WBE5) em biorreator de agitação mecânica.

	WBE	WBE2	WBE3	WBE4	WBE5*
Viscosidade (cP)	12,80	10,50	6,10	2,30	-
K_La (h⁻¹)	10	22	25	31	21
S₀ (g/L)	23,05	23,5	22,6	24,6	23,7
S_{cons} (g/L)	20,45	22,3	20,5	22,7	21,8
X_{max} (g/L)	12,5±0,1 ^{de}	14,8±0,1 ^a	14,5±0,1 ^{ab}	13,6±0,1 ^c	12,8±0,1 ^d
t_{X,max} (g/L)	48	48	48	36	36
pH_{min}	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
pH_{final}	5,02	4,82	4,90	4,93	5,10
Endo-PG_{máx} (U/mL)	130,0±0,1 ^b	119,0±0,1 ^d	124,0±0,2 ^c	112,0±0,3 ^c	149,0±0,1 ^a
t_{endo-PG máx} (h)	96	96	96	96	96
Exo-PG_{máx} (U/mL)	78,0,2±0,2 ^b	68,6±0,1 ^d	74,4±0,2 ^c	64,4±0,2 ^c	80,2±0,2 ^a
t_{exo-PG máx} (h)	96	96	96	96	96

K_La, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio medido em meio não inoculado; S₀, substrato inicial; S_{cons}, substrato consumido; X_{max}, concentração celular máxima; t_{X,max}, tempo de máxima concentração celular; pH_{min}, menor valor de pH; pH_{final}, valor do pH em 96 h de processo; Endo-PG, atividade máxima de endo-PG; Exo-PG, atividade máxima de exo-PG; t_{PG,máx}, tempo em que foi atingida a máxima atividade de endo e exo-PG.

*O meio WBE5 corresponde a uma mistura em quantidades iguais, de WBE e WBE3.

Como mostrado na Tabela 1, com os meios de cultivo contendo apenas hidrolisado parcial de pectina (WBE2 a WBE4), foi possível a obtenção de valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) significativamente superiores ao medido em WBE em que a pectina integral estava presente. Com esses meios, concentrações celulares superiores foram determinadas. Apesar disso, as máximas atividades de endo e exo-PG, determinadas em 96 h de processo, não foram positivamente afetadas pelas condições de cultivo mais adequadas (WBE2 a WBE4), constatando-se, ao contrário, que o uso do meio com pectina integral (WBE) resultou em atividades de endo (130,0 U/mL) e exo-PG (78,0 U/mL) significativamente superiores. Observou-se, entretanto, que as atividades de exo e endo-PG foram superiores, até aproximadamente 60 e 70 h de processo, respectivamente, nas condições em que foi utilizada a pectina tratada enzimaticamente em comparação à condição

WBE (Figura 2). Esse fato sugere que a pectina parcialmente hidrolisada resulta em uma indução em tempo menor. Também pode ser observado que o aumento da atividade ocorre até um certo período, indicando a carência de indutor a partir desse ponto.

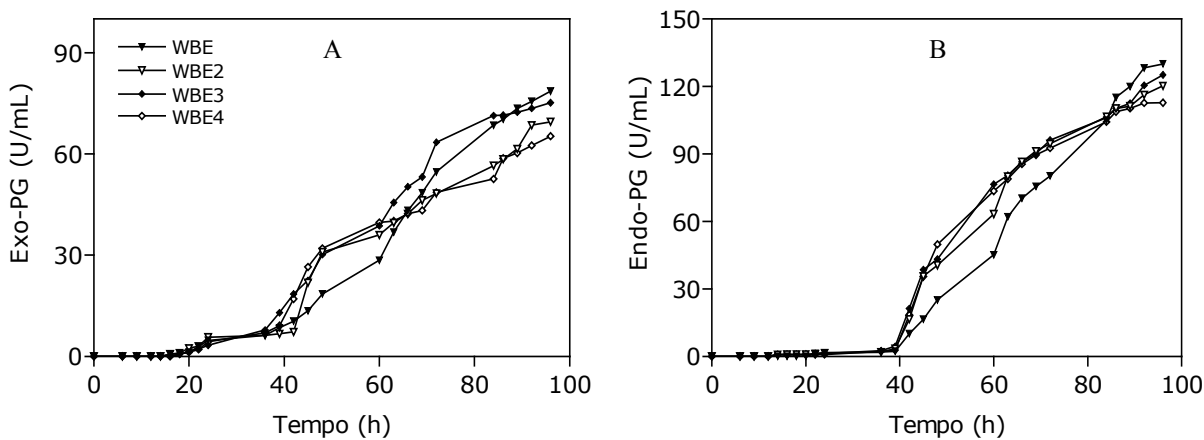


Figura 2. Variação das atividades de exo-poligalacturonase (Exo-PG) (A) e de endo-poligalacturonase (Endo-PG) (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreator de agitação mecânica (STR), em meios de cultivo contendo pectina integral (WBE) ou parcialmente hidrolisada (WBE2 a WBE4).

Com base nesses resultados, foi realizado um novo ensaio em que a metade da massa de pectina usada como indutor foi hidrolisada e a outra parte não (WBE5). Nessa condição, foi medido, em meio não inoculado, um valor de K_{La} cerca de duas vezes maior que o determinado com o meio básico WBE. No processo, obteve-se, em relação ao meio básico (WBE), uma concentração celular máxima igual e atividades enzimáticas superiores, 149,0 U/mL para endo-PG e 80,2 U/mL para exo-PG (Tabela 1).

3.2 Comparação do cultivo de *Aspergillus oryzae* e produção de poligalacturonases (PG) em biorreator de agitação mecânica (STR) e biorreatores airlift de circulação interna e externa

Os ensaios comparativos entre os biorreatores de agitação mecânica e *airlift* de circulação interna e externa foram feitos inicialmente com a condição WBE5, sendo que nesta

condição, K_{La} superior foi medido em relação a condição WBE, o que poderia compensar, até certo ponto, as limitações operacionais dos biorreatores *airlift*. O processo foi avaliado, também, nos três reatores, na condição WBE6 em que, pela adição parcelada de nutrientes ao meio WBE, pretendeu-se limitar o crescimento do microrganismo e facilitar o atendimento à demanda de oxigênio pelo cultivo. Nesse último caso, esse aspecto é especialmente crítico nos reatores *airlift* pelo fato de esse sistema não disporem de agitação mecânica. Antes da inoculação, os biorreatores *airlift* foram testados quanto ao K_{La} na condição WBE5, observando-se melhor resultado com o sistema de circulação interna ($K_{La} = 24 \text{ h}^{-1}$) em comparação ao de circulação externa ($K_{La} = 21 \text{ h}^{-1}$).

Na Tabela 2 são apresentados os resultados gerais obtidos em STR, *airlift* de circulação interna e externa, utilizando a condição WBE5.

Tabela 2. Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna e externa, utilizando a condição WBE5.

	STR	<i>Airlift</i> de circulação interna	<i>Airlift</i> de circulação externa
S_0 (g/L)	21,4	22,2	22,05
S_{cons} (g/L)	20,2	20,4	20,1
X_{max} (g/L)	12,8±0,1 ^a	9,8±0,1 ^c	10,4±0,4 ^b
$T_{x\text{max}}$ (g/L)	36	42	42
pH_{min}	2,70	2,92	3,28
pH_{final}	5,10	3,11	3,82
Endo-PG _{max} U/mL)	145,0±0,1 ^a	82,1±0,5 ^c	106,0±0,2 ^b
$t_{\text{endo-PG max}}$ (h)	96	96	96
Exo-PG _{max} (U/mL)	80,4±0,1 ^a	56,5±0,3 ^c	74,5±0,3 ^b
$t_{\text{exo-PG max}}$ (h)	96	96	96

S_0 , substrato inicial; S_{cons} , substrato consumido; X_{max} , concentração celular máxima; $t_{x,\text{max}}$, tempo de máxima concentração celular; pH_{min} , menor valor de pH; pH_{final} , valor do pH em 96 h de processo; Endo-PG, atividade máxima de endo-PG; Exo-PG, atividade máxima de exo-PG; $t_{\text{PG,max}}$, tempo em que foi atingida a máxima atividade de endo e exo-PG.

Na Figura 3, são apresentadas as variações da concentração celular e do consumo de açúcares redutores com o tempo em cultivos de *A. oryzae* nos diferentes biorreatores na condição WBE5. Após uma fase *lag* com duração de cerca de 10 h, para os três biorreatores, constatou-se um intenso crescimento celular, sendo atingidas concentrações celulares semelhantes até cerca de 24 h de cultivo. A partir desse ponto, constatou-se redução da velocidade de crescimento nos reatores *airlift* de circulação interna e externa. Desse modo, ao serem atingidas as fases estacionárias de crescimento, a concentração celular final no STR foi superior (12,8g/L) à obtida no *airlift* de circulação interna (9,8 g/L) e de circulação externa (10,4 g/L). É possível que a forma de agitação do meio nas três configurações de reatores testadas tenha influenciado a multiplicação e a morfologia do microrganismo, afetando, em consequência, os resultados gerais do processo, inclusive a própria produção de enzimas. Alguns trabalhos anteriormente publicados embasam essa suposição. Márquez-Rocha *et al.* (1999) observaram que o aumento da agitação diminui o tamanho dos *pellets* e a velocidade específica de crescimento de *Pleurotus ostreatus* ECS-0110 (IE8). Por sua vez, Treskatis *et al.* (1997) e Rossi *et al.* (2002) afirmam que o controle da morfologia e do tamanho dos *pellets* é importante para o aumento da produção enzimática por fungos filamentosos em meio líquido, a fim de evitar a limitação de oxigênio no interior dos *pellets* e, consequentemente, a autólise de células. Em contrapartida, já foi demonstrado por Bailey & Pessa (1990) que em cultivos de fungos filamentosos com altas frequências de agitação, pode-se provocar a ruptura do micélio, tendo Jüsten *et al.* (1996) sugerido que deve haver um balanço entre o efeito da agitação e a fragmentação do micélio.

O consumo de açúcares redutores foi gradual até 60 h de processo, tanto no STR como em *airlift* de circulação interna e externa, seguindo-se um período com concentrações residuais constantes e ligeiramente superiores nos dois biorreatores tubulares (Figura 3B).

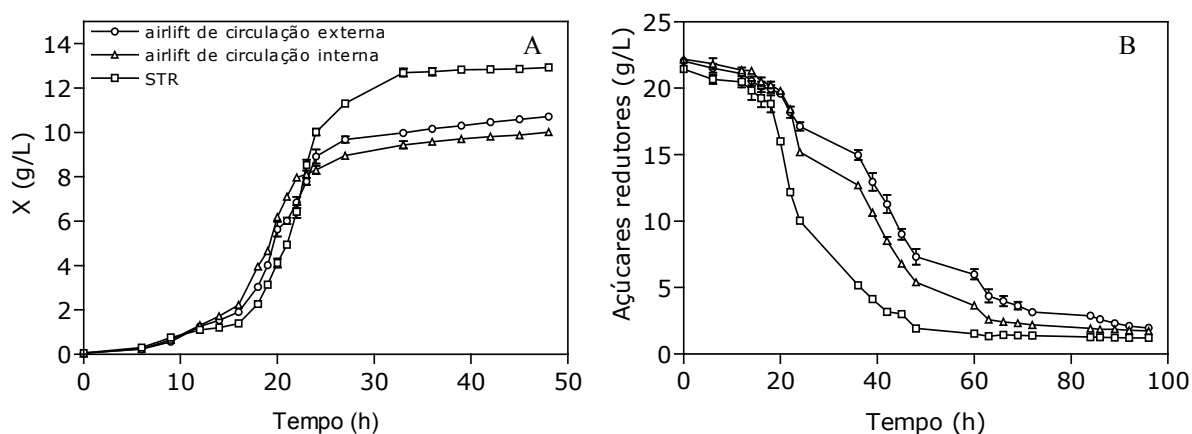


Figura 3. Variação das concentrações de células (X) (A) e de açúcares redutores (AR) (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna e externa na condição WBE5.

A concentração de oxigênio dissolvido (OD) durante o cultivo de *A. oryzae*, nos três biorreatores, decresceu rapidamente após a fase *lag*, indicando intenso metabolismo microbiano, contribuindo para isso, também, o aumento da viscosidade do meio devido às maiores concentrações celulares (Figura 4A). A concentração de oxigênio dissolvido foi semelhante nos diferentes biorreatores até cerca de 20 h de processo, observando-se, após este período, percentuais abaixo de 30% da saturação. Para os biorreatores do tipo *airlift*, valores de OD inferiores foram atingidos quando comparado com o STR, sendo que em biorreator *airlift* de circulação interna, valores mínimos foram de 13% e, após 40 h, concentrações acima de 30% foram observadas. Já para o biorreator *airlift* de circulação externa, valores abaixo de 30% foram atingidos após 22 h, permanecendo a OD em patamar próximo a esse valor até o final do processo, indicando uma maior dificuldade operacional nesse tipo de sistema quando concentrações celulares elevadas encontravam-se presentes no meio. É necessário, porém, ressaltar que os dados de OD medidos nos *airlift* não são completamente confiáveis, já que em reatores tubulares, mesmo em pequena escala, tem-se um sistema heterogêneo e, assim, é possível que as determinações feitas não representem o sistema como um todo. O pH mínimo do processo em STR com o meio WBE5 foi de 2,70, chegando a 4,05 ao final do processo. Já

com os biorreatores *airlift* de circulação interna e externa, valores mínimos de pH foram 2,92 e 3,28, respectivamente, sendo estes valores praticamente constantes até o final do processo (Figura 4B).

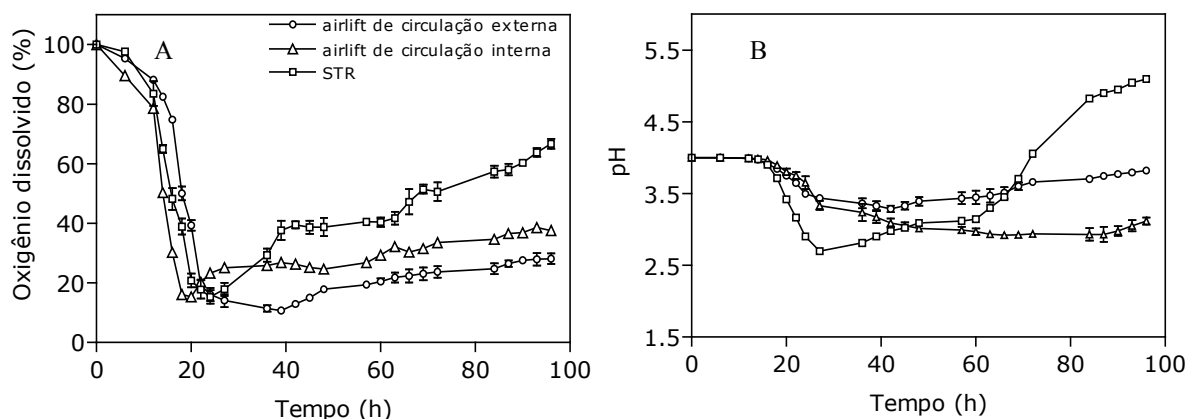


Figura 4. Variação da concentração de oxigênio dissolvido (A) e do pH (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica e *airlift* de circulação interna e externa na condição WBE5.

As atividades de endo e exo-PG apresentaram perfis cineticamente não associados ao crescimento celular (Figura 3A e Figura 5) nos três casos. As atividades de endo e exo-PG em biorreatores *airlift* foram significativamente inferiores às obtidas com o STR.

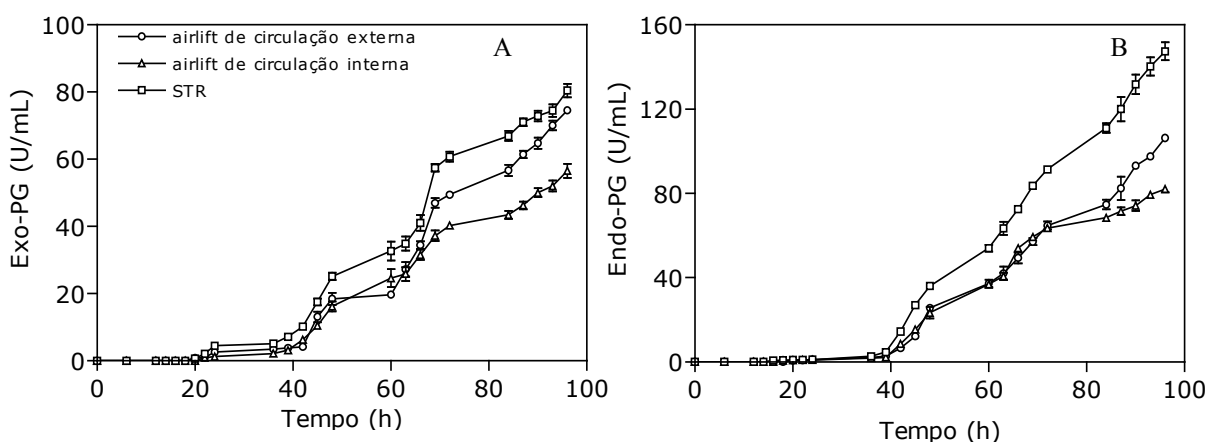


Figura 5 Variação das atividades de exo-poligalacturonase (Exo-PG) (A) e de endo-poligalacturonase (Endo-PG) (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna e externa na condição WBE5.

Na Tabela 3, são mostrados os resultados relativos aos testes realizados com a adição parcelada de sais nutrientes ao meio WBE com os três biorreatores. No caso, com a presença de pectina integral e concentração reduzida de sais no meio de cultivo antes da inoculação, os valores K_La medidos em STR, *airlift* de circulação interna e *airlift* de circulação externa foram 16, 9 e 12 h⁻¹.

Tabela 3. Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna e externa, utilizando a condição WBE6.

	STR	<i>Airlift</i> de circulação interna	<i>Airlift</i> de circulação externa
S₀ (g/L)	22,1	22,05	22,1
S_{cons} (g/L)	20,1	19,05	19,5
X_{max} (g/L)	10,9±0,01 ^a	9,7±0,2 ^c	10,2±0,5 ^b
T_{xmax} (g/L)	42	45	45
pH_{min}	2,70	3,02	3,31
pH_{final}	4,06	3,21	3,53
Endo-PG_{max} U/mL)	140,0±0,4 ^a	93,8±0,01 ^c	116,0±0,4 ^b
t_{endo-PG max} (h)	96	96	96
Exo-PG_{max} (U/mL)	81,7±0,2 ^a	66,2±0,2 ^c	80,4±0,5 ^b
t_{exo-PG max} (h)	96	96	96

S₀, substrato inicial; S_{cons}, substrato consumido; X_{máx}, concentração celular máxima; t_{x,máx}, tempo de máxima concentração celular; pH_{min}, menor valor de pH; pH_{final}, valor do pH em 96 h de processo; Endo-PG, atividade máxima de endo-PG; Exo-PG, atividade máxima de exo-PG; t_{PG,máx}, tempo em que foi atingida a máxima atividade de endo e exo-PG.

As variações da concentração celular e do consumo de açúcares redutores com o tempo em cultivos de *A. oryzae* nos diferentes biorreatores na condição WBE6 são apresentados na Figura 6. A concentração celular máxima em STR foi superior (10,9 g/L) à obtida no *airlift* de circulação interna (9,7 g/L) e de circulação externa (10,2 g/L) (Tabela 3 e Figura 5A). Pode ser observado que as concentrações celulares no STR (condição WBE6) foram inferiores às observadas nas demais condições testadas nesse trabalho, indicando que, para esse tipo de reator, o objetivo de limitar o crescimento microbiano pela adição gradual

dos sais do meio WBE foi alcançado, ao contrário do ocorrido com os *airlift* em que concentrações celulares muito semelhantes às medidas no meio WBE5 foram atingidas. Com respeito ao consumo de açúcares redutores, em STR as concentrações mínimas foram medidas em 48 h de processo, enquanto que com os *airlift* esse tempo se estendeu a 72 h (Figura 6B).

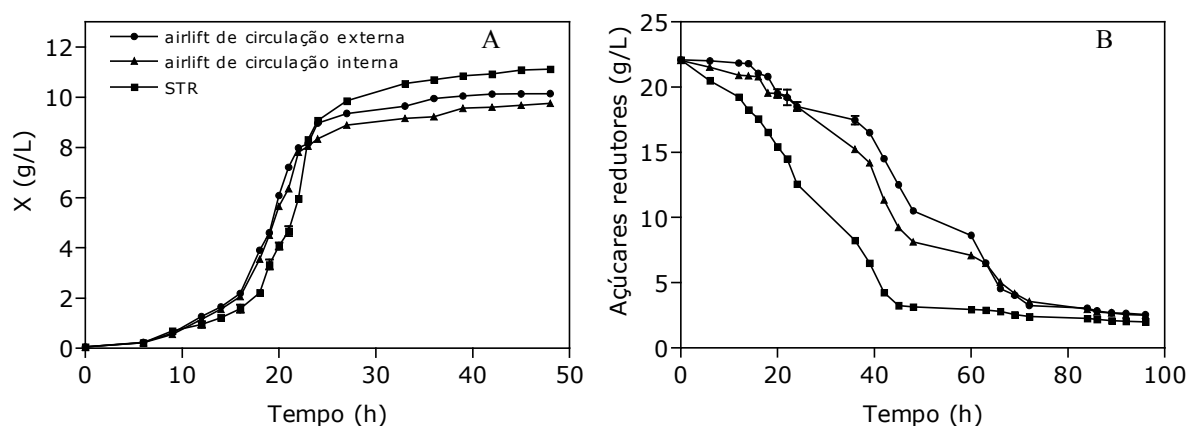


Figura 6. Variação das concentrações de células (X) (A) e de açúcares redutores (AR) (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna e externa na condição WBE6.

Na condição WBE6, os perfis de variação de concentração de oxigênio dissolvido e pH, com os três reatores testados, foram muito semelhantes aos observados nos testes com o meio WBE5 (Figura 7).

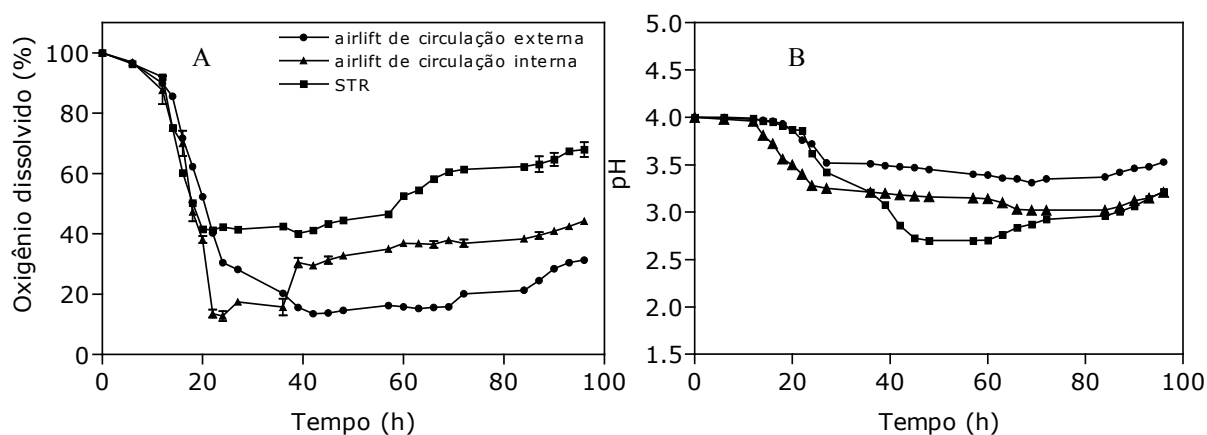


Figura 7. Variação da concentração de oxigênio dissolvido (A) e do pH (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica e *airlift* de circulação interna e externa na condição WBE6.

Nos reatores *airlift*, apesar de não se ter conseguido limitar o crescimento de *A. oryzae* com o fornecimento gradual de sais nutrientes ao cultivo, constatou-se que a condição WBE6 favoreceu claramente a formação de poligalacturonases (Tabela 3 e Figura 8), especialmente o sistema com circulação externa, sugerindo a necessidade de avaliarem-se novas estratégias de operação de alimentação parcelada desses biorreatores.

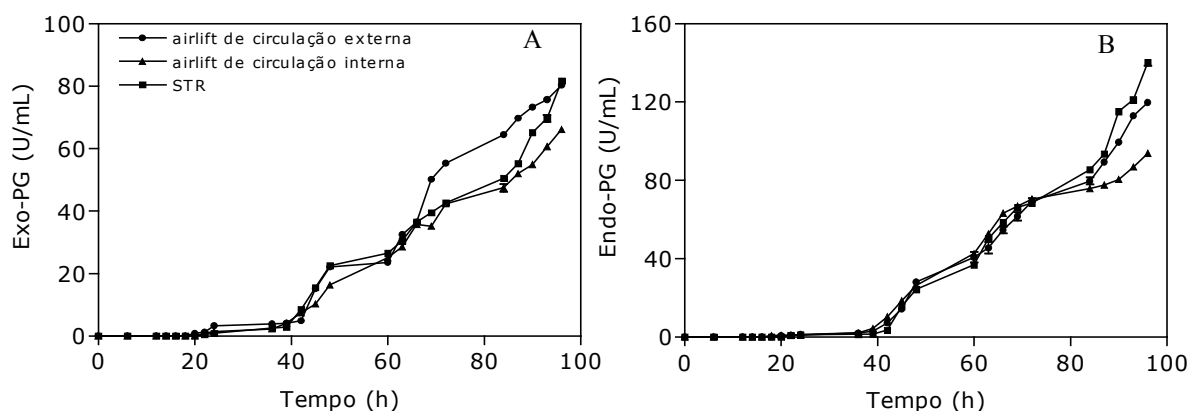


Figura 8 Variação das atividades de exo-poligalacturonase (Exo-PG) (A) e de endo-poligalacturonase (Endo-PG) (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna e externa na condição WBE6.

Para os resultados desse trabalho, em termos de formação de endo e exo-PG, podem ter contribuído dois aspectos: o crescimento celular e a variação de pH em cada tipo de biorreator testado. Quanto ao primeiro aspecto, nos reatores *airlift*, as concentrações celulares máximas foram inferiores às atingidas em STR, nas duas condições avaliadas (Tabelas 2 e 3). No caso, embora cineticamente tenha sido observada, em qualquer condição, uma produção de enzimas não associada ao crescimento celular, uma maior biomassa fúngica atingida no STR teria levado à obtenção de títulos mais altos em PG. Com respeito ao segundo aspecto mencionado, a variação do pH ao longo do processo, foi evidenciado em trabalho anterior (Fontana *et al.* 2009) que a produção de PG por *A. oryzae* se dá em maior intensidade em meio com valores de pH inadequados ao crescimento, em torno de 2,7, sugerindo que a

formação dessas hidrolases seja favorecida em condição de estresse. Assim, no caso do presente trabalho, é possível que o decréscimo do pH nos ensaios em reatores *airlift* não tenha sido suficiente para uma produção mais eficiente das enzimas.

Apesar das atividades enzimáticas inferiores, embora significativas, observadas nos biorreatores *airlift* em comparação ao reator de agitação mecânica, os resultados desse trabalho estimulam a realização de novos estudos visando o aperfeiçoamento do processo neste tipo de biorreator, tendo em vista as suas vantagens em termos de custo de construção e de operação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey, M.J. & Pessa, E. (1990). Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microb. Technol.** 12: 266-271.
- Bizukojc, M. & Ledakowicz, S. (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. **Process Biochem.** 39: 2261-2268.
- Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T.G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol Lett.** 175: 1-9.
- Chisti, Y. (1998). Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena. **Applied Mechanics Review.** 51: 101-102.
- Couri, S. & Farias, A. (1995). Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Rev. Microbiol.** 26: 314-317.
- Fontana R.C.; Polidoro T.A.; Silveira, M.M. (2009) Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology.** 100: 4493-4498.

- Gainvors, A.; Nedjaoum, N.; Gognies, S.; Muzart, M.; Nedjma, M.; Belarbi, A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGLI-I gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiol. Lett.** 183:131-135.
- Gouveia, E.R.; Hokka C.O.; Badino-Jr, A.C. (2003). The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 20 (04):363-374.
- Hoondal, G.S.; Tewari, R.P.; Tewari, R.; Dahiya, N. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 409-418.
- Kayshap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.** 77: 215-227.
- Jüsten, P.; Paul, G.C.; Nienow, A.W.; Thomas, C.R. (1996). Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. **Biotechnol. Bioeng.** 52: 672–684.
- Ju, L.K.; Ho, C.S.; Shanahan, J.F. (1991). Effects of Carbon dioxide on the Rheological behavior and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. 38(10): 1223-1232.
- Lee, B.C.; Bae, J.T.; Pyo, H.B.; Choe, T.B.; Kim, S.W.; Hwang, H.J.; Yun, J.W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**. 35: 369-376.
- Maiorano, A.E. (1982). Influência da concentração de inóculo e da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas aminolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. **Dissertação de mestrado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.

- Márquez-Rocha, F.J.; Guillén G.K.N.; Sánchez, J.E.V.; Vázquez-Duhalt, R. (1999). Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. **Biotechnology Techniques**. 13: 29–32.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426.
- Moo-Young, M. & Blanch, H.W. (1989). Transport Phenomena and Bioreactor Design. Basic Biotechnology. **Academic Press**. 3: 135-151.
- Nienow, A.W. (1998). Hydrodynamics of stirred bioreactors. **App. Mech. Rev.** 51: 1–32.
- Nicolella, C.; Van Loosdrecht, M.C.M; Heijnen, J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. **Journal of Biotechnology**.80: 1-33.
- Prosser, J.I.; Tough, A.J. (1991). Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Crit. Rev. Biotechnol.** 10: 253-274.
- Rossi, M.J.; Souza, J.A.R.; Oliveira, V.L. (2002). Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **App. Microbiol. Biotechnol.** 59: 175-181.
- Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.C.; Van Dijck, P.W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl Microbiol Biotechnol.** 59: 426-435.
- Semenova, M.V.; Grishutin, S.G.; Gusakov, A.V.; Okunev, O.N.; Sinitsyn, A.P. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry**. 68(5): 559-569.
- Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 95: 267-272.
- Tamerler-Yildir, C.; Adlard, M. W.; Keshavarz, T. (1997). Production of swainsonine from *Metarhizium anisopliae* in stirred-tank and air-lift reactors. **Biotechnology letters**. 9: 919-922.

- Teixeira, M.F.S.; Lima Filho, J. L.; Duran, N. (2000). Carbon Sources Effect on Pectinase Production from *Aspergillus Japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31: 286-290.
- Treskatis, S.K.; Orgeldinger, V.; Wolf, H.; Gilles, E.D. (1997). Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. **Biotechnol. Bioeng**. 53: 191–201.
- Vial, C.; Poncin, S.; Wild, G.; Midoux, N. (2002). Experimental and theoretical analysis of the hydrodynamics in the riser of an external loop airlift reactor. **Chemical Engineering Science**. 57: 4745–4762.
- Yahiro, K.; Takahama, T.; Jai, S.; Park, Y.; Okabe, M. (1997). Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology letters**. 19: 619-621.
- Yuguo, Z.; Zhao, W.; Xiaolong, C. (2000). α -Amilase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 5: 115-121.

4.6 Artigo 4: Avaliação de diferentes concentrações de sais no meio de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae*

**Avaliação de diferentes concentrações de sais no meio de produção de
poligalacturonases por *Aspergillus oryzae***

RESUMO

A produção de endo e exo-poligalacturonase (PG) por *Aspergillus oryzae* IPT 301 foi avaliada em meios com diferentes concentrações de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 . Em análises individuais de cada um desses sais, em testes em frascos agitados, observou-se influência significativa das concentrações de sulfatos de NH_4^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} sobre as atividades de ambas as enzimas. Em biorreator de agitação mecânica, sob condições controladas, foi comparada a produção de PG no meio padrão (WBE) e nas diferentes condições de adição dos sais (WBES1 – WBES5). Entre as condições avaliadas em STR, atividades superiores de endo-PG de 175,0 unidades/mL (U/mL) e exo-PG de 86,5 U/mL foram atingidas com a condição WBES5, onde os sais (KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4) foram adicionados durante o processo, com ganho significativo em relação ao meio WBE em que endo e exo-PG alcançaram valores máximos de 130,0 e 78,6 U/mL, respectivamente.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; poligalacturonases, sais, meio de cultivo, biorreator de agitação mecânica.

1. INTRODUÇÃO

Substâncias pécticas são heteropolissacarídeos estruturais que ocorrem na parede celular e lamela média de plantas superiores (Alkorta *et al.* 1998; Willats *et al.* 2001) compostos de resíduos de ácido galacturônico, unidos por ligações α -1,4, parcialmente esterificados por grupos metil éster (Kayshap *et al.* 2001). As substâncias pécticas podem ser degradadas por enzimas pectinolíticas, ou pectinases, que são naturalmente produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Jayani *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2006).

Estas enzimas são utilizadas, principalmente, nas indústrias de alimentos para extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, pois agem sobre as substâncias pécnicas, aumentando o rendimento dos processos (Gumamadi & Panda, 2003; Crook & Corredig, 2006).

Para a produção de enzimas pectinolíticas, em geral, são utilizados os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, que se destacam pela diversidade de enzimas pectinolíticas produzidas (Teixeira *et al.* 2000). De um modo geral, processos de produção de enzimas requerem uma consideração especial quanto à composição dos meios de cultivo, sendo que estes podem conter componentes que induzam a produção ou resultem em repressão catabólica, inibição da produção e controle de pH e, ainda, no caso de enzimas extracelulares, que estejam envolvidos com o mecanismo de excreção das proteínas (Galiotou-Panayotou *et al.* 1997; Blandino *et al.* 2001). Dessa forma, além da fonte de carbono adequada, outros nutrientes podem ser igualmente importantes na composição do meio (Thomas *et al.* 1996).

A produção das pectinases por fungos filamentosos varia de acordo com a linhagem, condições de cultivo (pH, temperatura, aeração, agitação e período de incubação) e da composição do meio de cultivo, principalmente as fontes de carbono e de nitrogênio (Benett, 2001). O conhecimento sobre a concentração ideal dos componentes do meio de cultivo é de grande interesse para a indústria, com a finalidade de obterem-se formulações de meio de cultivo de baixo custo (Parra *et al.* 2005; Tari *et al.* 2006) que, para a produção de enzimas industriais, são estimados em 30-40% do total (Laxman *et al.* 2005).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de endo e exopoligalacturonases, duas hidrolases do grupo das pectinases, por *Aspergillus oryzae*, em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A. oryzae IPT 301 (Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo) foi utilizado nos experimentos. A linhagem foi propagada em meio glicerinado agarizado (Maiorano, 1982), a 30°C, por 5 dias. Após esse período, a cultura foi estocada a 4°C ou usada como inóculo do meio de produção.

2.2 Meios de produção

O meio solúvel WBE, utilizado como base para as demais formulações testadas, tem a seguinte composição (Fontana *et al.* 2009): extrato aquoso de 80 g de farelo de trigo, 500 mL; pectina cítrica (ESKISA S.A., Brasil) 20 g; glicose, 20 g; peptona, 13 g; extrato de levedura, 0,05 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,0 g; KH_2PO_4 , 2,5 g; MgSO_4 , 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,00063 g; ZnSO_4 , 0,00062 g; MnSO_4 , 0,00001 g; água destilada q.s.p. 1L. Para a obtenção do extrato de farelo de trigo, uma massa de 80 g de farelo integral foi triturada em moinho, selecionada em peneira de classificação de 10 mesh, misturada com 500 mL de água destilada, sendo a mistura autoclavada a 1 atm por 15 min. Após o resfriamento, a mistura foi filtrada e o extrato utilizado na composição dos meios de cultivo.

O pH inicial de todos os meios foi ajustado em 4,0 com a adição de soluções de HCl 2M ou NaOH 3 M. Em ensaios em biorreator, o pH foi controlado em um valor mínimo de 2,7 com NaOH 3 M. Os meios foram autoclavados a 1 atm por 15 min.

Foram testadas variações das concentrações de sais do meio WBE, da seguinte forma: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0, 3,0, 7,0 e 9,0 g/L; KH_2PO_4 , 0, 0,5 1,5 e 3,5 g/L; MgSO_4 , 0, 0,25, 0,75 e 1,0 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0, 0,0063, 0,063 e 0,63 g/L; ZnSO_4 , 0, 0,0062, 0,062 e 0,62 g/L; MnSO_4 , 0, 0,0001, 0,001 e 0,01 g/L. Nos ensaios iniciais em frascos agitados, cada

concentração dos diferentes sais foi avaliada individualmente, mantendo-se constantes os demais componentes da formulação padrão.

Em biorreator com agitação mecânica (STR), foi testadas diferentes concentrações de sais, variando-se, também, a forma de adição desses sais ao meio (Tabela 1). Na condição WBES1, o meio de cultivo continha as concentrações de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 que resultaram em atividades enzimáticas superiores em ensaios em frascos agitados. Na condição WBES2, as concentrações de sais foram iguais às da condição WBES1, sendo que a adição foi parcelada durante o processo. Na condição WBES3, foram retirados da formulação do meio KH_2PO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 e na condição WBES4 apenas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi adicionado no meio de cultivo. Na condição WBES5, todos os sais foram adicionados a partir de 24 h de processo.

Tabela 1. Variação da concentração de sais utilizados na formulação do meio de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de agitação mecânica (STR).

Condições	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	MgSO_4 (g/L)	FeSO_4 (g/L)	ZnSO_4 (g/L)	MnSO_4 (g/L)
WBE	5	2,5	0,5	0,00063	0,00062	0,00001
WBES1	7	2,5	0,75	0,0063	0,0062	0,0001
WBES2	7	2,5	0,75	0,0063	0,0062	0,0001
WBES3	7	-	-	0,0063	-	-
WBES4	7	-	-	-	-	-
WBES5	7	2,5	0,75	0,0063	0,0062	0,0001

WBE, WBES1, WBES3 e WBES4 - sais adicionados no início do processo; WBES2 - sais adicionados em 4 parcelas iguais (0, 24, 48 e 72 h de processo); WBES5 - sais adicionados a partir de 24 h, em intervalos de 6 h, até 90 h de processo.

2.3 Condições experimentais

Ensaios com as diferentes concentrações de sais no meio WBE foram inicialmente realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio, cobertos com uma

fina manta de algodão e gaze, incubados, a 28°C e 200 rpm, em agitador recíproco (B. BRAUN BIOTECH modelo CERTOMAT, RFA). Os meios de cultivo em teste foram inoculados com uma suspensão de conídios de *A. oryzae* IPT 301 de forma a ter-se no tempo inicial de processo uma concentração de 10^6 conídios/L. As amostras foram coletadas a cada 24 h, centrifugadas por 10 min, a 10000 rpm, e mantidas a 4°C para posteriores análises.

Nos cultivos em STR, foi utilizado um fermentador de bancada B. BRAUN BIOTECH, modelo BIOSTAT® B (RFA), com volume total de 5 L e volume útil de 4,1 L. Nos cultivos em que os sais foram adicionados durante o processo, o volume inicial de meio foi de 4 L, com os sais sendo concentrados em 100 mL de solução. Durante os cultivos, a frequência dos agitadores foi variada de 300 a 820 rpm e a vazão específica de ar entre 0,5 e 2,5 vvm (volume de ar por volume de líquido por minuto) a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido num valor mínimo entre 20 e 30% da saturação no meio.

2.4 Métodos analíticos

A concentração de açúcares redutores livres nos meios de cultivo foi determinada pelo método do DNS (ácido 3,5-di-nitro-salicílico) (Miller, 1959).

A atividade de endo-PG foi determinada pela medida da redução da viscosidade de solução padrão de pectina cítrica (ESKISA S. A. Indústria e Comércio) 0,63% (m/v), em tampão acetato 0,05 M pH 4,0. A análise foi realizada utilizando-se 3,2 mL da amostra diluída em 14,8 mL da solução de pectina cítrica, sendo a reação realizada a 30°C por 30 min. Transcorrido o tempo de reação, a viscosidade da mistura reacional foi medida em viscosímetro BROOKFIELD ENGINEERING, modelo DV-II+ (EUA). Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas (Gainvors *et al.* 2000). A atividade de endo-PG, neste trabalho, é expressa em unidades por mL de meio (U/mL).

A atividade de exo-PG foi quantificada em mistura reacional contendo 50 μL de amostra convenientemente diluída e 2 mL de ácido poligalacturônico (SIGMA, USA) 0,1 M em tampão acetato (pH 4), sendo a reação conduzida a 35°C por 30 min. As substâncias redutoras liberadas na reação, medidas como ácido galacturônico, foram quantificadas pelo método de Somogyi (1952). Uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que leva à liberação de 1 μmol de ácido galacturônico por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições da reação (Couri & Farias, 1995). A atividade de exo-PG é expressa em unidades por mL (U/mL).

A concentração celular foi determinada por gravimetria, após a secagem, em estufa a 100°C, de suspensões celulares centrifugadas e lavadas em água destilada.

2.5 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados por análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, utilizando nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ensaios em frascos agitados, atividades superiores de endo e exo-PG foram observadas em 96 h de cultivo para todas as condições avaliadas (Tabela 2). Verificou-se que o aumento das concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ resultou em um incremento significativo da atividade de endo e exo-PG, não sendo observado efeito relevante para a variação de concentrações de MnSO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 , em comparação com a condição padrão. Para $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, resultado particularmente positivo foi obtido com a concentração de 0,0063 g/L, dez vezes superior à concentração presente no meio padrão, atingindo-se atividades de 46,8 U/mL para endo-PG e 34,7 U/mL para exo-PG. Em termos de crescimento celular (dados não apresentados), com 36 h de processo, a adição de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ao meio levou a valores máximos semelhantes ($\approx 12,5$ g/L), exceto para a concentração de 0,63 g/L, em que valores inferiores (4,25 g/L) foram atingidos sugerindo que esta concentração resultou em inibição do crescimento de *A. oryzae* e, conseqüentemente da atividade de endo e exo-PG. Comportamentos semelhantes foram observados para ZnSO_4 e MnSO_4 quando foram utilizados 0,62 e 0,01 g/L, respectivamente, no meio de cultivo.

Tabela 2. Atividades de endo e exo-PG em meio WBE contendo diferentes concentrações de sais, após 96 h de cultivo de *Aspergillus oryzae* em frascos agitados.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	0	3,0	5,0	7,0	9,0
Endo-PG (U/mL)	$1,1 \pm 0,1^e$	$25,9 \pm 0,7^c$	$26,7 \pm 0,2^{bc}$	$35,3 \pm 0,5^a$	$24,1 \pm 0,2^{cd}$
Exo-PG (U/mL)	$4,5 \pm 0,2^e$	$18,8 \pm 0,1^c$	$22,8 \pm 0,1^b$	$25,9 \pm 0,1^a$	$17,3 \pm 0,4^{cd}$
KH_2PO_4 (g/L)	0	0,5	1,5	2,5	3,5
Endo-PG (U/mL)	$9,1 \pm 0,1^e$	$13,2 \pm 0,2^d$	$21,1 \pm 0,1^c$	$25,7 \pm 0,2^a$	$24,9 \pm 0,1^{ab}$
Exo-PG (U/mL)	$13,4 \pm 0,5^e$	$15,9 \pm 0,1^d$	$20,1 \pm 0,4^c$	$22,8 \pm 0,1^a$	$22,1 \pm 0,05^{ab}$
MgSO_4 (g/L)	0	0,25	0,5	0,75	1,0
Endo-PG (U/mL)	$20,7 \pm 0,4^{de}$	$22,8 \pm 0,1^c$	$25,9 \pm 0,1^b$	$27,9 \pm 0,01^a$	$21,5 \pm 0,3^{cd}$
Exo-PG (U/mL)	$16,7 \pm 0,2^e$	$21,7 \pm 0,2^{abc}$	$21,9 \pm 0,1^{ab}$	$22,4 \pm 0,1^a$	$18,2 \pm 0,5^d$
FeSO_4	0	0,00063	0,0063	0,063	0,63
Endo-PG (U/mL)	$24,3 \pm 0,3^{de}$	$36,4 \pm 0,5^c$	$46,8 \pm 0,01^a$	$45,7 \pm 0,01^{ab}$	$24,8 \pm 0,01^d$
Exo-PG (U/mL)	$20,1 \pm 0,5^e$	$33,7 \pm 0,2^c$	$34,7 \pm 0,2^{ab}$	$35,2 \pm 0,4^a$	$28,8 \pm 0,01^d$
ZnSO_4	0	0,00062	0,0062	0,062	0,62
Endo-PG (U/mL)	$24,8 \pm 0,1^c$	$32,4 \pm 0,5^b$	$33,7 \pm 0,1^a$	$16,3 \pm 0,5^d$	$6,7 \pm 0,1^e$
Exo-PG (U/mL)	$19,4 \pm 0,5^d$	$26,7 \pm 0,01^b$	$30,6 \pm 0,2^a$	$21,4 \pm 0,01^c$	$7,9 \pm 0,01^e$
MnSO_4 (g/L)	0	0,00001	0,0001	0,001	0,01
Endo-PG (U/mL)	$21,7 \pm 0,1^c$	$26,4 \pm 0,2^b$	$29,4 \pm 0,2^a$	$15,1 \pm 0,1^d$	$10,5 \pm 0,2^e$
Exo-PG (U/mL)	$14,2 \pm 0,1^{de}$	$16,2 \pm 0,1^c$	$21,4 \pm 0,1^a$	$20,3 \pm 0,05^b$	$14,5 \pm 0,1^d$

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

Em meio contendo 7,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, atividades superiores de endo-PG (35,3 U/mL) e de exo-PG (25,9 U/mL) foram obtidas, medindo-se, nestas condições, após 36 h de cultivo, concentração celular de 13,9 g/L. Na ausência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, atividades enzimáticas

muito baixas foram medidas, 1,1 U/mL para endo-PG e 4,5 U/mL para exo-PG (Tabela 2), acompanhando o menor crescimento celular (8,5 g/L). Nessa última condição, os valores de pH não apresentaram a queda característica observada em cultivos de *A. oryzae* (dados não apresentados) que está associada à formação de poligalacturonases.

O incremento dos teores de MnSO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 não resultou em variação significativa das atividades de endo e exo-PG em comparação com os valores medidos com o meio padrão (Tabela 1). A partir dos resultados obtidos em experimentos com diferentes concentrações de sais, foram determinadas, então, as seguintes concentrações de sais a serem utilizadas na sequência do trabalho: KH_2PO_4 , 2,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7,0 g/L; FeSO_4 , 0,0063 g/L; MnSO_4 , 0,0001 g/L; MgSO_4 , 0,75 g/L; ZnSO_4 , 0,0062 g/L.

Ensaio em frascos agitados, embora práticos, já que permitem avaliar várias condições simultaneamente, podem, por outro lado, ser prejudicados principalmente pela dificuldade no controle de parâmetros fundamentais como o suprimento de oxigênio e o pH. Desta forma, foram realizados novos ensaios em reator com agitação mecânica (STR), em que foram testadas variações da composição em sais do meio WBE, conforme descrito na Tabela 1. Na Tabela 3, são apresentados os resultados gerais obtidos nesses cultivos.

Nos ensaios em biorreator, concentração celular superior (14,0 g/L) foi atingida na condição WBES1 em que os sais, nas concentrações definidas nos ensaios em frascos, foram adicionados no início do processo (Tabela 3 e Figura 1A). O efeito de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sobre o crescimento celular é claramente observado pela comparação das condições WBES3 e WBES4 (Tabela 3 e Figura 1A). No primeiro caso (WBES3), em meio com 0,0063 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a concentração celular máxima foi de 12,5 g/L, enquanto em WBES4, em que não houve a adição desse sal, a concentração máxima de *A. oryzae* foi de apenas 10,1 g/L.

Tabela 3. Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em processo submerso em diferentes concentrações e condições de adição de sais, em ensaios em biorreator de agitação mecânica.

	WBE	WBES1	WBES2	WBES3	WBES4	WBES5
S₀ (g/L)	23,1	23,1	22,9	23,1	23,0	22,1
S_{cons} (g/L)	20,5	20,4	20,2	20,4	20,3	19,6
X_{max} (g/L)	12,5 ± 0,1 ^b	14,0 ± 0,3 ^a	10,9 ± 0,2 ^d	12,5 ± 0,2 ^b	10,1 ± 0,1 ^e	11,3 ± 0,1 ^c
T_{xmax} (g/L)	39	42	42	45	42	39
pH_{min}	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
pH_{final}	5,01	4,58	4,05	4,72	5,41	3,60
Endo-PG_{max} (U/mL)	130,0 ± 0,1 ^e	158,0 ± 0,1 ^b	140,0 ± 0,2 ^d	156,0 ± 0,1 ^c	76,6 ± 0,1 ^f	175,0 ± 0,2 ^a
t_{endo-PG max} (h)	96	96	96	96	96	96
Exo-PG_{max} (U/mL)	78,0 ± 0,3 ^e	82,5 ± 0,02 ^c	81,7 ± 0,2 ^d	84,2 ± 0,2 ^b	30,1 ± 0,3 ^f	86,5 ± 0,4 ^a
t_{exo-PG max} (h)	96	96	96	96	96	96

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

S₀, substrato inicial; S_{cons}, substrato consumido; X_{max}, concentração celular máxima; t_{x,max}, tempo de máxima concentração celular; pH_{min}, menor valor de pH; pH_{final}, valor do pH em 96 h de processo; Endo-PG, atividade máxima de endo-PG; Exo-PG, atividade máxima de exo-PG; t_{PG,max}, tempo em que foi atingida a máxima atividade de endo e exo-PG.

Quando foram utilizadas as condições WBES2 e WBES5, em que os sais foram adicionados durante o processo, atingiram-se concentrações celulares inferiores – 10,9 e 11,3 g/L, respectivamente – em comparação às atingidas com o meio padrão WBE (12,5 g/L) e com o a condição WBES1 (Tabela 3 e Figura 1A). Em todas as condições testadas, o teor de açúcares redutores (AR) decresceu gradualmente até 45 h de processo, evidenciando-se a partir deste ponto um patamar de concentração de AR (Figura 1B) que pode estar relacionado à interferência de substâncias redutoras não metabolizáveis por *A. oryzae* sobre o método analítico utilizado.

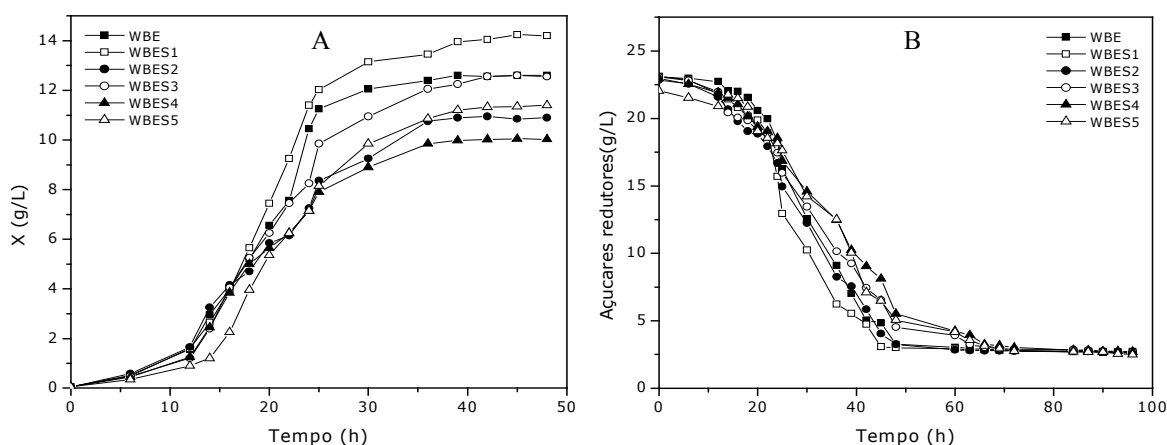


Figura 1. Variação das concentrações de células (X) (A) e de açúcares redutores (AR) (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreator de agitação mecânica (STR), em meios com diferentes concentrações ou estratégias de adição de sais.

O pH mínimo do processo em STR em todas as condições avaliadas foi 2,70, apresentando uma queda acentuada até 30-40 h, permanecendo praticamente estável por um período (40-60 h). Após este ponto, valores crescentes foram observados. Para as condições em que houve a adição dos sais durante o cultivo (WBES2 e WBES5), foi observado valores inferiores de pH no final do processo (Figura 2A).

O aumento da biomassa de *A. oryzae* exerceu influência significativa sobre as propriedades reológicas do meio e, conseqüentemente, sobre a transferência de oxigênio (Figura 1 e Figura 2B). Esse fato foi especialmente observado nas condições WBE, WBES1 e WBES3, em que, para manter-se a concentração de O_2 dissolvido nos níveis desejados, valores de frequência de agitador de 750 a 820 rpm e vazões específicas de ar de 2,2 vvm foram empregados. Como referência, nas condições WBES2, WBES4 e WBES5 esses parâmetros foram de, no máximo, 700 rpm e 1,9 vvm.

Em processo fermentativos, especialmente naqueles que têm fungos filamentosos como agentes de transformação, a transferência de oxigênio para o meio de cultivo é limitada em razão do aumento da viscosidade resultante do intenso crescimento celular. No caso do meio WBE, a presença de extrato de farelo de trigo e de pectina são fatores que tornam ainda

mais difícil a dissolução de O_2 . Justificam-se, assim, os valores inferiores de oxigênio dissolvido medidos nas condições WBE, WBES1 e WBES3 (Figura 2B) – 10, 15 e 24 %, respectivamente – em que as elevadas concentrações celulares tiveram uma forte influência tanto pelo aspecto da maior demanda respiratória quanto pelo prejuízo à transferência de massa. É interessante destacar, por outro lado, que nas condições de cultivo WBES2 e WBES5, em que os sais foram adicionados durante o processo, e em WBES4, com meio de cultura pobre, a concentração mínima de O_2 desejada (30% da saturação no meio) foi facilmente controlada. Observe-se que, em qualquer desses últimos casos, o crescimento celular foi menos intenso.

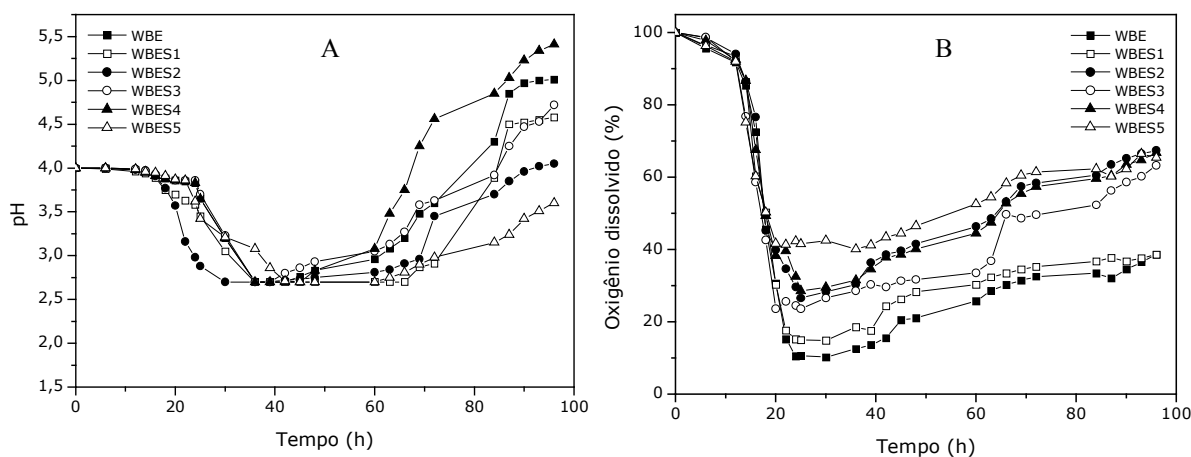


Figura 2. Variação do pH (A) e da concentração de oxigênio dissolvido (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreator de agitação mecânica (STR), em meios com diferentes concentrações ou estratégias de adição de sais.

Com respeito à formação de endo e exo-PG, observou-se, para todas as condições, perfis cineticamente não associados ao crescimento celular (Figura 1A e Figura 3A-B). Como mostrado na Tabela 3 e ilustrado nas Figuras 3A e 3B, com exceção da condição WBES4, um meio sem a adição de sais, atividades enzimáticas apreciáveis foram obtidas. Destaquem-se os resultados atingidos com a condição WBES5 em que atividades estatisticamente superiores foram alcançadas para endo-PG (175,0 U/mL) e exo-PG (86,5 U/mL).

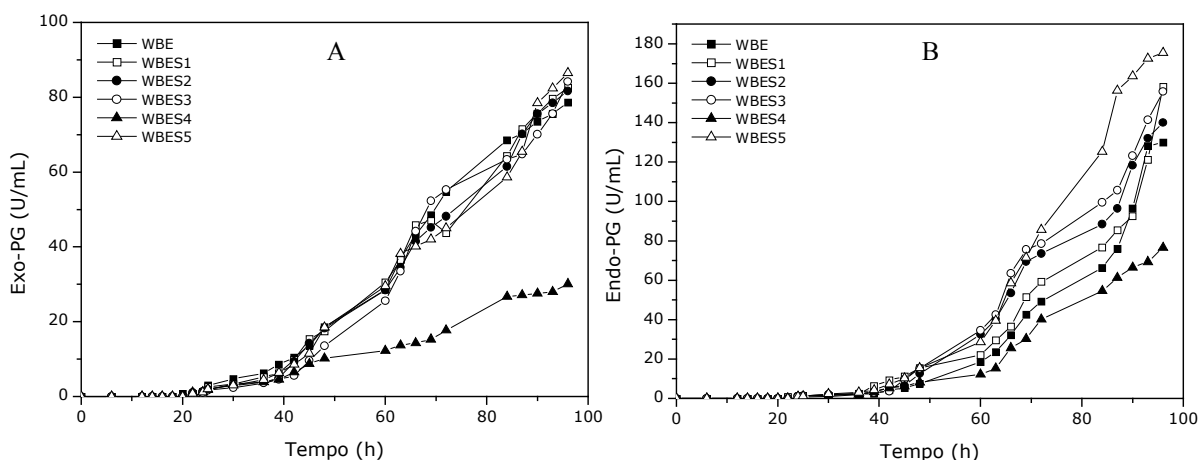


Figura 3. Variação da atividade de exo-PG (exo-PG) (A) e da atividade de endo-PG (endo-PG) (B) com o tempo em cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreator de agitação mecânica (STR), em meios com diferentes concentrações ou estratégias de adição de sais.

A presença do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, em termos de atividade enzimática influencia positivamente a atividade de endo e exo-PG, pois quando este sal não estava presente no meio de cultivo (WBES4), as atividades de endo-PG (76,6 U/ml) e de exo-PG (30,1 U/mL) foram inferiores em comparação com a condição em que este sal estava presente (WBES3) (endo-PG de 155,8 U/mL e exo-PG 84,2 U/mL) (Tabela 3 e Figura 3).

Os resultados do presente trabalho permitem constatar a grande influência que as concentrações de sais de NH_4^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} no meio de cultivo exercem sobre o crescimento e a produção de poligalacturonases em cultivos de *A. oryzae*. Na formação de endo-PG, a principal enzima responsável pela hidrólise de substâncias pécicas na indústria de alimentos, a atividade na condição WBES5 foi cerca de 35% superior à obtida com a formulação original (WBE), além de crescimento celular inferior, o que facilita o controle de oxigênio dissolvido no meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M.J.; Serra, J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochem.** 33: 21-28.
- Benett, J.W. (2001). *Aspergillus* and koji: history, practice and molecular biology. **Soc. Ind Enzymes News.** 51: 65–71.
- Blandino, A.; Dravillas, K.; Cantero, D.; Pandiella, S. S.; Webb, C. (2001). Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochem.** 37: 497-503.
- Couri, S. & Farias, A. (1995). Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Rev. Microbiol.** 26: 314-317.
- Crook, S. & Corredig, M. (2006). The role of pectin in orange juice stabilization. Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles. **Food Hydrocolloides.** 20: 961–967.
- Fontana, R.C.; Polidoro, T.A.; Silveira, M.M. (2009). Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology.** 100: 4493-4498.
- Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M.; Kalantzi, O. (1997). Growth conditions of *Aspergillus* sp ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Appl Microbiol Biotechnol.** 47: 425-429.
- Gainvors, A.; Nedjaoum, N.; Gognies, S.; Muzart, M.; Nadjma, M.; Belarbi, A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGLI-I gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiol. Lett.** 183:131-135.
- Gumamadi, S.N. & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review. **Process Biochem.** 38: 987–996.

- Kayshap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technol.** 77: 215-227.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytical enzymes: a review. **Process Biochem.** 40: 2931–2944.
- Laxman, R.S.; Sonawane, A.P.; More, S.V.; Rao, B.; Rele, M.V.; Jogdand, V.V.; Deshpande, V.V.; Rao, M.B. (2005). Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochem.** 40: 3152–8.
- Maiorano, A.E. (1982). Influência da concentração de inóculo e da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas aminolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426.
- Oliveira, K.F.; Malavolta, L.; Souza, C.S.; Vicente, E.J.; Lalue, C. (2006). Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. **J. Appl. Microbiol.** 100: 633–640.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 95: 267-272.
- Parra, R.; Aldred, D.; Magan, N. (2005). Medium optimization for the production of secondary metabolite squalstatin S1 by a *Phoma* sp. Combining orthogonal design and response surface methodology. **Enzyme Microb Technol.** 37: 704–711.
- Tari, C.; Genckal, H.; Tokatli, F. (2006). Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. L21. **Process Biochem.** 41: 659–665.

- Teixeira, M.F.S.; Lima Filho, J.L.; Duran, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31: 286-290.
- Thomas, K.C.; Hyness, S.H.; Ingledew, W.M. (1996). Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. **Biotechnology Letters**. 18:1165-1168.
- Willats, W.G.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, J.P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Mol. Biol.** 47: 9–27.

4.7 Discussão geral

No presente trabalho, definiu-se um meio de cultivo isento de sólidos em suspensão, para *Aspergillus oryzae*, com o qual se atingiram atividades de endo e exo-PG (poligalacturonase) comparáveis às obtidas com meio formulado com farelo de trigo integral. A preparação do meio isento de sólidos (WBE) significa, de fato, em acréscimo de tempo e custo de elaboração. Entretanto, esse procedimento apresenta vantagens como a viabilização da determinação direta da concentração de biomassa fúngica e, considerando um dos principais objetivos do trabalho, uma maior facilidade na operação dos biorreatores *airlift*, tendo em conta a limitação desse tipo de sistema em termos de agitação e dissolução de oxigênio. Utilizando-se o meio WBE, a produção de PG foi comparada em biorreator de agitação mecânica (STR) e *airlift* de circulação interna, sendo atingidas atividades superiores de endo-PG (91,3 U/mL) e exo-PG (65,2 U/mL), em STR, quando comparada com as atividades de endo-PG (86,2 U/mL) e exo-PG (60,6 U/mL), em *airlift* de circulação interna. Esses bons resultados indicam a possibilidade de utilizarem-se reatores *airlift* para a obtenção de pectinases em maior escala, o que significaria, em comparação a biorreatores de agitação mecânica, uma redução dos custos de instalação e de operação.

A partir da formulação inicial do meio WBE, foram realizados estudos variando-se as concentrações de pectina, glicose e sais. Nesses ensaios, foi possível evidenciar que a produção de poligalacturonases por *A. oryzae* é fortemente dependente da composição do meio de cultivo e da variação do pH durante o processo. A presença da pectina na formulação do meio de cultivo resulta em significativo aumento da viscosidade (48 cP com 20 g pectina/L) em comparação ao meio formulado sem pectina (2 cP). Em ensaios com diferentes concentrações de pectina (0, 10 e 20 g/L), atividades superiores foram atingidas em meio contendo 20 g/L, 125,0 U/mL para endo-PG e 76,3 para exo-PG. Dessa forma, confirma-se que a presença da pectina é essencial para a indução da produção de enzimas no processo,

apesar de influenciar diretamente na viscosidade do meio de cultivo e, assim, dificultar a transferência de oxigênio.

Visando à definição de um meio de cultivo com baixa viscosidade, principalmente para ser utilizado em biorreatores do tipo *airlift*, foi realizada a hidrólise parcial da pectina cítrica utilizada como indutor. Entre as condições avaliadas, em meios com pectina parcialmente hidrolisada, valores superiores de endo-PG (149,0 U/mL) e exo-PG (82,2 U/mL) foram obtidos na condição WBE5 (metade da pectina hidrolisada e a outra metade não), sendo que o uso do meio WBE resultou em atividades de endo e exo-PG estatisticamente inferiores: 130,0 e 78,0 U/mL, respectivamente. Utilizando o meio com pectina parcialmente hidrolisada (WBE5) foram realizados ensaios comparativos entre os biorreatores STR e *airlift* de circulação interna e externa. Antes da inoculação, os biorreatores *airlift* foram testados quanto ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), observando-se melhor resultado com o sistema de circulação interna ($K_{La} = 24 \text{ h}^{-1}$) em comparação ao de circulação externa ($K_{La} = 21 \text{ h}^{-1}$). Apesar da satisfatória transferência de oxigênio nos *airlift*, resultados superiores de endo-PG (145,0 U/mL) e exo-PG (80,4 U/mL) foram atingidos em STR, quando comparado com as determinadas nos sistemas tubulares de circulação interna (endo-PG – 82,1 U/mL e exo-PG – 56,5 U/mL) e de circulação externa (endo-PG – 106,0 U/mL) e exo-PG – 74,5 U/mL).

Além da condição WBE5 em que houve um decréscimo da viscosidade inicial do meio, foi avaliada a condição WBE6 em que o crescimento celular foi limitado pela adição parcelada de sais que, como avaliado previamente, influenciam diretamente no crescimento e na produção de endo e exo-PG. Dessa forma, ensaios comparativos em STR e *airlift* de circulação interna e externa foram realizados em uma condição de cultivo (WBE6) em que 1/4 da massa dos diferentes sais do meio WBE estava presente no meio no momento da inoculação e os restantes 3/4 foram adicionados ao reator em 48, 60 e 72 h de processo, em

parcelas iguais. Atividade superior de endo-PG foi atingida em STR, 140,0 U/mL. Em biorreatores *airlift*, títulos superiores de endo-PG (116,0 U/mL) e exo-PG (80,4 U/mL) foram atingidos no sistema de circulação externa, atividade semelhante à obtida no STR.

Os resultados do presente trabalho mostraram que, com os biorreatores *airlift*, é possível a obtenção de atividades de poligalacturonases semelhantes às atingidas com o reator agitado mecanicamente. Essa constatação estimula a realização de novos estudos visando ao aperfeiçoamento do processo em biorreatores *airlift*, tendo em vista as suas vantagens em termos de custos de construção e de operação.

Em um último grupo de ensaios, a produção de endo e exo-PG foi avaliada em meios com diferentes concentrações de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 . Quando testados separadamente, em ensaios em frascos sob agitação, os sais de NH_4^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} apresentaram significativa influência sobre as atividades de endo e exo-PG. Em ensaios em biorreator STR, sob condições controladas, atividades superiores de endo-PG de 175,0 U/mL e exo-PG de 86,5 U/mL foram atingidas numa condição de operação (WBES5) em que os sais, nas melhores concentrações observadas em frascos agitados, foram adicionados parceladamente ao meio durante o processo, com ganho significativo em relação ao meio básico WBE. Destaque-se, no caso, que o crescimento celular na condição WBSE5 foi limitado, o que facilitou o suprimento de oxigênio ao cultivo. Essa condição de operação pode vir a favorecer a operação em reatores do tipo *airlift*.

5. CONCLUSÕES

Utilizando um planejamento experimental, definiu-se uma formulação de meio isento de sólidos em suspensão com o qual é possível obterem-se resultados, em termos de endo e exo-PG (poligalacturonase), comparáveis aos atingidos com o meio formulado com farelo de trigo integral. Apesar da alta viscosidade do meio de cultivo solúvel definido, e mesmo sem o recurso da agitação mecânica, os resultados demonstram ser possível suprir o cultivo de *Aspergillus oryzae* adequadamente com oxigênio.

Utilizando-se meios formulados com pectina em diferentes concentrações, foi possível observar que o aumento da concentração desse componente leva ao incremento da viscosidade, mas, também, as mais altas atividades de poligalacturonases.

A adição de glicose ao meio de produção, até o nível de 30 g/L, é favorável à produção de poligalacturonases, desde que o pH seja controlado em um valor mínimo próximo a 2,7, a fim de não prejudicar o metabolismo microbiano.

A presença do indutor (pectina cítrica) no meio resulta em significativo aumento da viscosidade do meio líquido, dificultando a transferência de oxigênio para o cultivo, especialmente em biorreatores *airlift*. Os resultados mostram que, com a substituição de parte do indutor por um hidrolisado parcial de pectina, é possível reduzir-se a viscosidade do meio, facilitando a dissolução de oxigênio, e, assim, atingirem-se atividades de poligalacturonases próximas às obtidas com o meio formulado com pectina integral.

De um modo geral, os resultados desse trabalho indicam que o sistema *airlift* tem potencial para ser utilizado na produção em maior escala dessas enzimas, prevendo-se menores custos de instalação e de operação. Entretanto, considerando-se a sensibilidade dos *airlift* a variações, ainda que pequenas, na geometria, sugere-se a realização de novos estudos com esses biorreatores em que seja feita uma gradual ampliação de escala.

Com concentrações convenientes de sais no meio WBE, é possível limitar o crescimento de *A. oryzae*, facilitando o atendimento à demanda de oxigênio pelo cultivo e proporcionando a obtenção de atividades enzimáticas elevadas.

6. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Acuña-Arguelles, M.E.; Gutiérrez -Rojas, M.; Viniegra-González, G.; Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid – state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 808-814.
- Aguilar, G. & Huitrón, C. (1986). Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 541-545.
- Aguilar, G. & Huitrón, C. (1987). Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 690-696.
- Aguilar, G. & Huitrón, C. (1990). Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. **Biotechnol. Lett.** 12: 655-660.
- Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J.L. (1998). Industrial applications of enzymes: a review. **Process Biochemistry.** 33: 21-28.
- Bailey, M.J. (1990). Effect of temperature on polygalacturonase production by *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.** 12: 622-624.
- Bailey, M.J. & Pessa, E. (1990). Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microb. Technol.** 12: 266-271.
- Bittman, R. (1974). Analysis of reducing sugar in breakfast cereal and other foods. **J. Chem. Education.** 51: 49.
- Bizukojc, M. & Ledakowicz, S. (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. **Process Biochemistry.** 39: 2261-2268.
- Blazej, M.; Kisa, M.; Markos, J. (2004). Scale influence on the hydrodynamics of an internal

- loop airlift reactor. **Chemical Engineering Processing**. 43: 1519-1527.
- Bastos, M.S.R.; Gurgel, T.E.P.; Sousa Filho, M.S.M.; Lima, I.F.B.; Souza, A.C.R.; Silva, J.B. (2002). Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Rev. Bras. Frutic**. 24: 240-242.
- Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T.G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol Lett**. 175: 1-9.
- Braga, G.U.L.; Destéfano, R.H.R.; Messias, C.L. (1999). Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia**. 30: 107-113.
- Busto, M.D.; García-Tramontín, K.E.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. (2006). Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresource Technology**. 97: 1477-1483.
- Cannel, E. & Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. **Proc. Biochem**. Jun/Jul: 2-7.
- Carvalho, E.; Camarasa, E.; Meleiro, L.A.C.; Filho, R.M.; Domingues, A.; Vial, Ch.; Poncin, S.; Midoux, N.; Bouillard, J. (2000). Development of a hydrodynamic model for air-lift reactors. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 17: 4-7.
- Cerri, M.O.; Teodoro, J.C.; Ortiz, S.C.A.; Baptista-Neto, A.; Cruz-Hernández, I.L.; Badino Jr., A.C. (2005). Comparação entre biorreator convencional e biorreator airlift de circulação interna para cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para produção de ácido clavulânico. In: **SINAFERM: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife, 2 a 5 de agosto.
- Chao, Y.P.; Sugano, Y.; Kouda, T.; Yoshinaga, F.; Shoda, M. (1997). Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* with an air-lift reactor. **Biotechnology Techniques**. 11(11): 829-832.

- Chisti, M.Y. (1989). Airlift bioreactors. **Elsevier Science Publishers LTD**. England.
- Chisti, Y. & Jauregui-Haza, U.J. (2002). Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochem. Eng. J.** 10(2): 143-153.
- Coelho, M.A.Z.; Medronho, R.A.; Leite, S.G.F.; Couri, S. (1995). Partial purification of a polygalacturonase produced by solid state cultures of *A. niger* 3T5B8. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**. 26: 318-322.
- Couri, S. & Farias, A. (1995). Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Rev. Microbiol.** 26: 314-317.
- Darah, I. & Ibrahim, C.O. (1998). Laboratory-scale production of lignin-degrading enzymes by free and entrapped cells of *Phanerochaete chrysosporium* in a tubular air-lift bioreactor. **Folia Microbiol.** 43(2): 161-168.
- De Gregorio, A.; Mandalani, G.; Arena, N.; Nucita, F.; Tripodo, M. M.; Lo Curto, R. B. (2002). SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresour. Technol.** 83 (2): 89-94.
- Éboli, (1975). In: Borzani, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. Construção do equipamento. **Biotecnologia Industrial. V. 3.** Edgard Blucher LTDA. 2: 212-257.
- Fadavi, A. & Chisti, Y. (2005). Gas-liquid mass transfer in a novel forced circulation loop reactor. **Chemical Engineering Journal.** 112: 73-80.
- Falcone, M. & Marques, A.B. (1965). Estudo sobre condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. **Technol. Alim. Beb.** 4: 24-30.
- Fawole, O.B. & Odunfa, S.A. (2003). Some factors affecting production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodegradation.** 52: 223-227.
- Fenice, M.; Sermanni, G.G.; Federici, F.; D'Annibale, A. (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology.** 100: 77-85.

- Fernandes-Salomão, T.M.; Amorin, A.C.R.; Chaves-Alves, V.M.; Coelho, J.L.; Silva, D.O.; Araújo, E.L. (1996). Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Rev. Microbiol.** 27: 15-18.
- Fogarty, W.M. & Kelly, C.T. Pectic Enzymes (1983). In: Fogarty, W.N. Microb. Enzymes and Biotech. Dublin, **Appl. Sci. Publishers**. 131-182.
- 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. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 32: 371-377.
- Freitas, C. & Teixeira, J.A. (2001). Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. **Chem. Eng. Jornal.** 84: 57-61.
- Friedrich, J.; Cimerman, A.; Steiner, W. (1994). Concomitant biosynthesis of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes and citric acid on sucrose. **Enzyme Microbial Technol.** 16: 703-707.
- Fu, C-C.; Wu, W-T.; Lu S-Y. (2003). Performance of airlift bioreactors with net draft tube. **Enzyme Microbial Technol.** 33: 332-342.
- Gallindez-Mayer, J.; Sanchez-Teja, O.; Christiani-Urbina, E.; Ruiz-Ordaz, N. (2001). A novel splitcylinder airlift reactor for fed-batch cultures. **Biopr. Biosystem. Eng.** 24: 171-177.
- Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M.; Kalantzi, O. (1997). Growth conditions of *Aspergillus* sp ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 425-429.
- Gavrilescu, M. & Tudose, R.Z. (1998). Concentric-tube airlift bioreactors. Part 1: Effects of geometry on gas holdup. **Bioprocess Eng.** 19: 37-44.
- Gainvors A.; Nedjaoum, N.; Gognies, S.; Muzart, M.; Nedjma, M.; Belarbi, A. (2000). Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGLI-I gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fems Microbiol. Lett.** 183: 131-135.

- Geöze, M.L.A.; Coelho, J.L.C.; Araújo, E.F.; Silva, D.O. (1995). Effect of yeast extract and medium pH on polygalacturonase production by *Penicillium expansum*. **Rev. Microbiol.** 26: 165-168.
- Gluszczyk, P. & Michalski, H. (1994). Cultivation of *Aspergillus niger* in a pilot plant external-loop air-lift bioreactor. **FEMS Microbiology Reviews**.14(1): 83-88.
- Gouda, M.K.; Omar, S.H.; Pape, H. (1998). Effect of cultural conditions on polygalacturonase production by *Aspergillus niger*. **Adv. Food Sci.** 20: 83-88.
- Gouveia, E.R.; Hokka C.O.; Badino-Jr, A.C. (2003). The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 20 (04): 363-374.
- Gummadi, S.N. & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochem.** 38: 987-996.
- Hadj-Taieb, N.; Ayadi, M.; Khelif, M.; Mrad, K.; Hassairi, I.; Gargouri A. (2006). Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology**.39: 1072–1076
- Hansen, D.N. (2003). XXL–A nova geração de pectinases. Biotimes – **Revista Bioindustrial Novozymes**. 1: 04-05.
- Hoondal, G.S.; Tewari, R.P.; Tewari, R.; Dahiya, N. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 409-418.
- Kapritchkoff, F.M. (1996). Estudo comparativo dos processos de produção de pectinase por fermentação semi-sólida e fermentação submersa. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de São Paulo.
- Kapoor, M.; Beg, Q.K.; Bushan, B.; Sing, K.; Dadhich, K.S.; Hoondal, G.S. (2001). Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-CP-2

- in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and Sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast Wbers. **Process Biochem.** 36: 803–807.
- Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases In the commercial sector: a review. **Bioresource Technology.** 77: 215-227.
- Kaur, G.; Kumar, S.; Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology.** 94(3): 239-243
- Kertesz, I. (1951). The pectic substances. Interscience Pubeishing. **New York.**
- Kim, S.W.; Kang, S.W.; Lee, J.S. (1997). Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology.** 50(1): 63-67.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry.** 40 (9): 2931-2944.
- Jin, B.; Van-Leeuwen, H. J.; Patel, B.; Yu, Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal alpha-technol. **Bioresour Technol.** 66 (3): 201-206.
- Jin, B.; Van-Leeuwen, H. J.; Patel, B. (1999). Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. **Process Biochemistry.** 34: 335-340.
- Jin, B.; Yu Q.; Yan, X. Q.; Van-Leeuwen, H.J. (2001). Characterization and improvement of oxygen transfer in pilot plant external air-lift biorreactor for mycelial biomass production. **World Journal of Microbiology e Biotechnology.** 17: 265-272.
- Jovetic, S.; Bresser, L.; Tramper, J.; Marinelli, F. (2003). Deacylation of antibiotic A40926 by immobilized *Actinoplanes teichomyceticus* cells in an internal-loop air-lift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology.** 32: 546-552.
- Ju, L.K.; Ho, C.S.; Shanadan, J.F. (1991). **Biotech. Biotech.** 38: 1223-1232.

- Lee, J.M. (1992). Biochemical Engineering. **Printice Hall**.
- Lee, B.C.; Bae, J.T.; Pyo, H.B.; Choe, T.B.; Kim, S.W.; Hwang, H.J.; Yun, J.W. (2004). Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial Technology**. 35: 369-376.
- Leone, G. & Heuvel, V.D. (1987). Regulation by carbohydrates of the sequential in vitro production of pectin enzymes by *Botrytis cineres*. **Ca. J. Bot.** 65: 2133-2141.
- Lin, J.; Han, M.; Wang, T.; Zhang, T.; Wang, J.; Jin, Y. (2004). Influence of the gas distributor on the local hydrodynamic behavior of an external loop airlift reactor. **Chemical Engineering Journal**. 102: 51-59.
- Lonsane, B.K.; Saucedo-Castañeda, G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra-Gonzales, G.; Ghildyal, N.P.; Ramakrishna, M.; Krishnaiah, M.M. (1991). Scale-up strategies for solid state fermentation systems: a review. **Process Biochemistry**. 26: 1-15.
- Maiorano, A.E. (1982). Influência da concentração de inóculo e da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas aminolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. **Dissertação de mestrado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.
- Maiorano, A.E. (1990). Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. **Tese de Doutorado**. Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.
- Maldonado, M.C. & Strasser de Saad, A.M. (1998). Production of pectinasterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20: 34-38.
- Malvessi, E. (2000). Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.

- Malvessi, E. & Silveira, M.M. (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazil. Arch. Biol. Technol.** 47: 693-702.
- Merchuk, J.C. & Asenjo, J.A. (1995). Fundamentals of bioreactor design. Reactor System Design. **Marcel Dekker**. Inc, EUA.
- Merchuk, J.C. & Siegel, M.H. (1995). Air-lift reactors in chemical and biological technology. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 41: 105-120.
- Merchuk, J.C.; Ladwa, N.; Cameron, A.; Bulmer, M.; Berzin, I.; Pickett, M. (1996). Liquid flow and mixing in concentric tube air-lift reactor. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 66: 174-182.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426.
- Minjarres-Carranco, A.; Trejo-Aguilar, B.A.; Aguilar, G.; Viniegra-González, G. (1997). Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enzyme Microbial. Technol.** 21: 25-31.
- Minussi, R.C.; Soares-Ramos, J.R.L.; Coelho, J.L.C.; Silva, D.O. (1998) Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Rev. Microbiol.** 29: 246-250.
- Mohanty, K.; Das, D.; Biswas, M.N. (2006). Hydrodynamics of a novel multi-stage external loop airlift reactor. **Chemical Engineering Science.** 61: 4617-4624.
- Moo-Young, M. & Blanch, H.W. (1989). Transport Phenomena and Bioreactor Design. Basic Biotchenology. **Academic Press.** 3: 135-151
- Moo-Young, M. & Chist, Y. (1994). Biochemical engineering in biotechnology. **Pure & Appl. Chem.** 66(01): 117-136.

- Moreira, G.M.; Reis, S.; Costa, M.A.F.; Souza, C.G.M.; Peralta, R.M. (2005). Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**. 36: 7-11.
- Nair, S.R. & Panda, T. (1997). Statistical optimization of medium componentes from improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. **Bioprocess Engineering**. 16: 169-173.
- Nakagawa, T.; Nagaoka, T.; Taniguchi, S.; Miyaji, T.; Tomizuka, N. (2004). Isolation and characterization of psychrophilic yeasts producing cold-adapted pectinolytic enzymes. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 383-387.
- Olsson, L.; Christensen, T.M.I.E.; Hansen, K.P.; Palmqvist, E.A. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 612-619.
- Olsvik, E.S. & Kristiansen, B. (1992). On-line rheological measurements and control in fungal fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. 40: 375-387.
- Piccoli-Valle, R.H.; Passos, F.M.L.; Passos, F.J.V.; Silva, D.O. (2001). Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**. 32: 135-140.
- Pilnik, W. & Rombouts, F.M. (1981). Pectic enzymes. In: Birch, G. G.; Blakebrough, N.; Parker, K. J. Enzymes and food processing. **Appl. Science. London**. p.105-128.
- Reyes, F. & Lahoz, R. (1977). Variation in lysis of walls of *Sclerotinia fructigena* with age of culture. **J. Gen. Microbiol.** 98: 607-610.
- Reid, I. & Ricard, M. (2000). Pectinase in paper making, solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme Microbiol. Technol.** 26: 115-123.

- Riberéau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2003). Tratado de Enologia. Tomo 2. Química del vino. **Estabilización y Tratamientos**. Buenos Aires: 1 ed. 57-107, 177-255.
- Rossi, M.J.; Streit, H.C.; Oliveira, V.L.; Furigo Jr.; A. (2005a). Construção e caracterização hidrodinâmica de um biorreator airlift com circulação externa. *In: SINAFERM: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Recife, 2 a 5 de agosto.
- Rossi, M. J.; Streit, H. C.; Oliveira, V. L.; Furigo Jr.; A. (2005b). Transferência e consumo de oxigênio durante cultivo de fungo ectomicorrízico em biorreator airlift com circulação externa: determinação do K_{La} e do Q_{O_2} . *In: SINAFERM: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Recife, 2 a 5 de agosto.
- Roubouts, E.M. & Pilnik, W. (1980) Pectic Enzymes. In: Rose, A . Ed. Economic Microb. London: **Academic Press**. 5: 227-282.
- Royse, S. (1987). Scaling up for mammalian cell culture. **Chem. Engineer**. 11: 12-13.
- Said, S.; Fonseca, M. J. V.; Siéssere, V. (1991). Pectinase production by *Penicillium frequentans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 7: 607-608.
- Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J.; Vandamme, E.J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances and Applications in Microbiology**. 39: 213-294.
- Schmidell, W. & Facciotti, M.C.R. (2001). Biorreatores e processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, V. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher LTDA. 2: 277-331.
- Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.C.; Van Dijck, P.W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl Microbiol Biotechnol**. 59: 426-435.

- Sharma, D.C. & Satyanarayana T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technology**. 97(5): 727-733
- Silva, C.F; Schwanm, R.F.; Dias, E.S.; Wheals, A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. 60(2-3): 251-260.
- Siegel, M.H. & Robinson, C.W. (1992) Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. **Chemical Engineering Science**. 47(13-14): 3387-3394.
- Solis-Pereira, S.; Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G.; Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in Submerged and solid state fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 39: 36-41.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem**. 95: 267-272.
- Spagna, G.; PiVeri, P.G.; Gilioli, E. (1995). Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology. **Enzyme Microb. Technol**. 17 (8): 729–738.
- Su, W.W. & He, B. (1997). Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor. **J. Biotechnol**. 54: 43-52.
- Suh, I.S. & Lee, S.B. (2001). Cultivation of a cyanobacterium in an internally radiating air-lift photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**. 13: 381-388.
- Talvy, S.; Cockx, A.; Line, A. (2005). Global modelling of a gas-liquid-solid airlift reactor. **Chemical Engineering Science**. 60: 5991-6003.
- Tamerler-Yildir, C.; Adlard, M.W.; Keshavarz, T. (1997). Production of swainsonine from *Metarhizium anisopliae* in stirred-tank and air-lift reactors. **Biotechnology letters**. 9: 919-922.

- Thomas, K.C.; Hyness, S.H.; Ingledew, W.M. (1996). Effect of nitrogen limitation on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. **Biotechnology Letters**. 18: 1165-1168.
- Ueda, S.; Fujio, Y. & Lim, J.Y. (1982). Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A. 3. **J. Appl. Biochem**. 4: 524-532.
- Uenojo, M. & Pastore, G.M. (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**. 30: 388-394.
- Whitaker, J.R (1984). Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme Microb. Technol**. 6: 341-349.
- Willats, W.G.T.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**. 47: 9-27.
- Yahiro, K.; Takahama, T.; Jai, S.; Park, Y.; Okabe, M. (1997). Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology letters**. 19: 619-621.
- Yuguo, Z.; Zhao, W.; Xiaolong, C. (1999). Citric acid production from the mash of dried sweet potato with its dregs by *Aspergillus niger* in an external-loop airlift bioreactor. **Process Biochemistry**. 35: 237-242.
- Yuguo, Z.; Zhao, W.; Xiaolong, C. (2000). α -Amilase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. 5: 115-121.
- Vendruscolo, F.; Koch, F.; Pitol, L.O. Ninow, J.L. (2005). Produção de *Gongronella butleri* em biorreator airlift visando a obtenção de quitosana fúngica. In: **SINAFERM: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife, 2 a 5 de agosto.

- Vial, Ch.; Poncin, S.; Wild, G.; Midoux, N. (2002). Experimental and theoretical analysis of the hydrodynamics in the riser of an external loop airlift reactor. **Chem. Eng. Sci.** 57(22-23): 4745-4762.
- Xu, J.; Jian, X.; Pusun, F.; Zhiguo, S. (1998). Suspension nodule culture of the Chinese herb, *Rhodiola sachalinensis*, in an air-lift reactor: kinetics and technical characteristics. **Biotechnology Techniques**. 12(1): 1-5.