

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

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR
***Aspergillus oryzae* IPT-301 EM PROCESSO SUBMERSO**

LENARA MENEGHEL SANTA CATHARINA

CAXIAS DO SUL

2013

LENARA MENEGHEL SANTA CATHARINA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR
Aspergillus oryzae IPT-301 EM PROCESSO SUBMERSO**

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

Orientador: Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

Caxias do Sul, 2013.

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

S231a Santa Catharina, Lenara Meneghel
Avaliação da produção de pectinases por *Aspergillus oryzae*
IPT-301 em processo submerso / Lenara Meneghel Santa
Catharina. – 2013.
v, 75 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.
“Orientação: Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira”

1. *Aspergillus*. 2. Pectinase. 3. Enzimas. 4. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed. : 582.282.123.4

Índice para o catálogo sistemático:

1. <i>Aspergillus</i>	582.282.123.4
2. Pectinase	577.152.34
3. Enzimas	577.15
4. Biotecnologia	57.08

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Márcia Servi Gonçalves – CRB 10/1500

LENARA MENEGHEL SANTA CATHARINA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR
Aspergillus oryzae IPT-301 EM PROCESSO SUBMERSO**

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

Orientador: Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/11/2013.



Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira



Co-orientadora: Profa. Dra. Eloane Malvessi



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior



Profa. Dra. Marli Camassola



Dra. Fernanda Bettin

*Ao Nestor e ao Lucas,
amores maiores do que eu.*

AGRADECIMENTOS

“E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas

E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar”

(Caminhos do coração – Gonzaguinha)

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio, de diversas formas, de pessoas e instituições que acreditaram no potencial desta pesquisa.

A lista de agradecimentos inicia pela própria Universidade de Caxias do Sul, pela estrutura física e recursos humanos imprescindíveis.

Às agências de fomento que financiam o projeto e fornecem as bolsas de estudo e iniciação científica: CAPES, CNPq e FAPERGS.

Aos membros da banca de avaliação, Dra. Fernanda Bettin, Profa. Dra. Marli Camassola e Prof. Dr. Agenor Furigo Jr., pela disponibilidade de avaliação deste trabalho e pelas importantes colaborações.

Aos integrantes da banca de acompanhamento e grandes amigos, Dr. Aldo José Pinheiro Dillon e Dra. Fernanda Bettin, pela paciência e dedicação nas correções e sugestões.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira, exemplo de professor, pesquisador e profissional de caráter; por exigir mais de mim e colocar-me de volta ao caminho certo, sempre que precisei; por mostrar que sempre há um caminho; pelos momentos de descontração, cheios de boas risadas; pela troca de ideias e por argumentações que nunca terminam e sempre me fazem querer mais um ensaio; por ser professor, orientador, amigo, pai, irmão e mais do que tudo, um mestre, no sentido real da palavra. Especialmente, por acreditar em meu potencial e nunca desistir.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Eloane Malvessi, exemplo de dedicação e comprometimento, pela paciência em ensinar-me todo possível em microbiologia, teoria e prática, desde fazer repiques de culturas até montar e operar um biorreator; por estar sempre disposta a discutir um resultado ou corrigir um trabalho, mesmo de última hora; pela amizade, acima de tudo.

Aos bolsistas de iniciação científica que participaram deste trabalho, Thaiza De Cesaro, Fernando Henrique Stuari, Caroline Reginatto, Guilherme Pellenz Reis e Caroline Rossi, pela imensa contribuição. Especialmente ao Gui e à Carol Reginatto que estiveram presentes em épocas de muitas amostras e alta demanda de análises, pela incrível disposição.

A quem se tornou uma amiga de muitas afinidades e que me ajudou em muitos aspectos para concluir este trabalho, Carol Reginatto.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, pela parceria e amizade que tornam nosso ambiente de trabalho extremamente prazeroso. Em especial às queridas amigas Sabrina Carra e Viviane Girardi, por estarem comigo desde o começo, sempre prontas a ajudar ou socorrer.

Aos vizinhos e parceiros do Laboratório de Enzimas e Biomassa, em especial à Dra. Roselei Claudete Fontana, por sempre disponibilizar equipamentos, reagentes e metodologias.

Aos meus familiares, pelo apoio emocional e, principalmente, à minha tia Valesca Meneghel e sua família, por cuidarem do meu filho para que eu pudesse estar no laboratório.

À minha mãe, Lirian Maria Meneghel, por ensinar-me que nenhum sonho é grande demais, basta dedicar-se a ele.

Ao meu pai, Luiz Antônio Bolsoni Santa Catharina, por mostrar-me, com seu próprio exemplo, que com paciência e dedicação, sem abrir mão do caráter, se pode atingir qualquer meta.

À minha família, meu porto seguro, meu alicerce. Ao meu marido Nestor Mussoi e ao meu filho Lucas Meneghel Mussoi, por terem respeitado e apoiado as minhas escolhas. Mesmo quando, aos fins de semana, precisei sair de casa e ir tirar uma amostra. Mesmo quando precisei ficar até tarde no laboratório, ou chegar muito cedo. Mesmo quando não saía da frente do computador. Mesmo quando me fiz ausente, mais do que gostaria. Mesmo durante crises de mau humor ou de insônia. Mesmo com tudo isso, suportaram-me e amaram-me, enfim.

Não há melhor palavra senão... OBRIGADA.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS E PECTINASES.....	3
2.1.1 <i>Fatores que influenciam a ação das pectinases</i>	6
2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PECTINASES.....	7
2.3 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE PECTINASES.....	7
2.3.1 <i>Processo submerso de obtenção de pectinases</i>	8
2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE PECTINASES EM PROCESSO SUBMERSO	9
2.4.1 <i>Meio de cultivo</i>	9
2.4.2 <i>Temperatura</i>	10
2.4.3 <i>pH</i>	11
2.4.4 <i>Agitação e mistura</i>	12
2.4.5 <i>Suprimento de oxigênio</i>	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 MICRORGANISMO.....	15
3.2 MEIOS DE CULTIVO.....	15
3.3 PREPARO DE INÓCULOS	16
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO	16
3.4.1 <i>Ensaio em frascos sob agitação</i>	16
3.4.2 <i>Ensaio em biorreator de bancada</i>	17
3.5 EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	18
3.5.1 <i>Formulação do meio de cultivo</i>	18
3.5.2 <i>Avaliação do pH sobre o cultivo</i>	20
3.5.3 <i>Avaliação da estabilidade enzimática frente ao pH</i>	20
3.5.4 <i>Avaliação do oxigênio dissolvido sobre o cultivo</i>	21
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	21
3.6.1 <i>Coleta e tratamento de amostras</i>	21
3.6.2 <i>Determinação da concentração celular</i>	22
3.6.3 <i>Determinação de açúcares redutores (AR)</i>	22
3.6.4 <i>Determinação de açúcares redutores totais (ART)</i>	22
3.6.5 <i>Determinação da concentração de ácido galacturônico</i>	23
3.6.6 <i>Determinação da atividade de pectinases</i>	23
3.6.7 <i>Determinação da atividade de proteases</i>	25
3.6.8 <i>Obtenção de imagens em microscópio eletrônico de varredura (MEV)</i>	25
3.7 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM MEIO ISENTO DE CÉLULAS	25
3.8 DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO CELULAR	26
3.9 DETERMINAÇÃO DOS FATORES DE PRODUÇÃO E CONVERSÃO E DA PRODUTIVIDADE DO PROCESSO.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 APRESENTAÇÃO DE UM PROCESSO SUBMERSO DE OBTENÇÃO DE PECTINASES PRODUZIDAS POR <i>Aspergillus oryzae</i>	29
4.2 FORMULAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES	34
4.2.1 <i>Avaliação de diferentes concentrações de farelo de trigo, glicose e sulfato de amônio</i>	34
4.2.2 <i>Avaliação do efeito da concentração de glicose</i>	36
4.2.3 <i>Avaliação da concentração do indutor – pectina cítrica</i>	38
4.3 AVALIAÇÃO DO TEMPO E DAS CONDIÇÕES DE ADIÇÃO DO INDUTOR	39

4.4 AVALIAÇÃO DO pH	46
4.4.1 Avaliação do pH inicial em cultivo em frascos sob agitação	47
4.4.2 Efeito do pH sobre o crescimento de <i>Aspergillus oryzae</i> e a produção de pectinases em cultivo em biorreator	49
4.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO SEM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO	58
4.6 DISCUSSÃO GERAL	63
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular vegetal.....	3
Figura 2 – Estrutura primária de substâncias pécnicas.....	3
Figura 3 - Modo de ação das enzimas pectinolíticas.....	4
Figura 4 – Desenho esquemático de um biorreator com agitação mecânica.....	8
Figura 5 - <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301.....	15
Figura 6 - Frascos em agitador recíproco para cultivo submerso de <i>Aspergillus oryzae</i>	16
Figura 7 - Biorreator de agitação mecânica Biostat B (RFA), B. Braun Biotech.	17
Figura 8 - Biorreator de agitação mecânica Tecbio, Tecnal.....	18
Figura 9 - Variação da atividade de pectinases, do pH e das concentrações de biomassa, açúcares reductores totais e oxigênio dissolvido em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator de bancada. ..	30
Figura 10 - Aspecto de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada.....	31
Figura 11 - Variação de pH em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator, com utilização de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico.	32
Figura 12 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura de amostras de 24h de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> IPT-301.....	33
Figura 13 - Variação das concentrações de biomassa e açúcares reductores totais, da atividade de pectinases e do pH em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator, com diferentes concentração de glicose.....	37
Figura 14 - Relação entre viscosidade e concentração de pectina do meio de cultivo F40-G5-N5, isento de células.....	39
Figura 15 - Variação da concentração de biomassa e da atividade de pectinases em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em frascos sob agitação, com diferentes concentrações de pectina adicionada em 24h de processo.....	42
Figura 16 - Variação das concentrações de biomassa e açúcares reductores totais, da atividade de pectinases e do pH, em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada com adição do indutor em 24h de processo (B4).....	44
Figura 17 - Aspecto de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada, em 24h de processo.....	45
Figura 18 - Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores empregada em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada com adição de pectina em diferentes tempos.....	46
Figura 19 - Variação da concentração de biomassa e da velocidade específica de crescimento obtidos em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada em diferentes condições de pH.....	51
Figura 20 - Variação das concentrações de biomassa e dos volumes de NaOH adicionados em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada sob diferentes condições de pH.....	52
Figura 21 - Relação entre os valores de biomassa e os volumes de NaOH adicionados em cada tempo de cultivo em biorreator de bancada em diferentes condições de pH.....	53

Figura 22 - Variação da atividade de pectinases e do pH em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada com adição de pectina em t=0h, em diferentes condições de pH	53
Figura 23 - Variação da atividade de pectinases e do pH em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada com adição de pectina em t=24h, em diferentes condições de pH	54
Figura 24 - Variação da atividade de pectinases e de proteases em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada, no Ensaio T3	55
Figura 25 – Atividade de pectinases em extrato bruto exposto a diferentes valores de pH em função do tempo.....	56
Figura 26 - Variação da atividade de pectinases, do pH e das concentrações de biomassa, açúcares redutores e açúcares redutores totais em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator de bancada, no Ensaio T5.....	57
Figura 27 - Variação da atividade de pectinases, do pH e das concentrações de biomassa, açúcares redutores e açúcares redutores totais em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator de bancada, no Ensaio T10.....	58
Figura 28 - Variação das concentrações de biomassa, açúcares redutores, açúcares redutores totais e oxigênio dissolvido, da atividade de pectinase e do pH em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator de bancada, com concentração de oxigênio mantido em mínimo de 30% da saturação, Ensaio B5.....	60
Figura 29 - Variação das concentrações de biomassa, açúcares redutores, açúcares redutores totais e oxigênio dissolvido, da atividade de pectinase e do pH em cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em biorreator de bancada, com concentração de oxigênio mantido em mínimo de 30% da saturação, Ensaio B6.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variações testadas na composição do meio WBE (<i>wheat bran extract</i>).....	19
Tabela 2 - Resultados gerais de cultivo característico de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada.	30
Tabela 3- Resultados gerais do cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em frascos sob agitação para avaliação das concentrações de farelo de trigo, glicose e sulfato de amônio.	35
Tabela 4 - Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada com diferentes concentrações de glicose.	36
Tabela 5 - Resultados gerais do cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em frascos sob agitação com diferentes concentrações de pectina.	38
Tabela 6 - Resultados de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em frascos sob agitação com adição de pectina em diferentes tempos.....	40
Tabela 7 – Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> , em frascos sob agitação, com diferentes concentrações de pectina adicionada em 24h de processo.	41
Tabela 8 - Resultados de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em ensaio em frascos sob agitação com diferentes condições de adição de 20g/L pectina.	42
Tabela 9 - Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada com adição do indutor em diferentes tempos de processo.....	43
Tabela 10 - Resultados de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em frascos sob agitação com diferentes condições de pH inicial.	47
Tabela 11 - Resultados gerais de cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada, sob diferentes condições de pH, com adição do indutor em diferentes tempos de processo.	50
Tabela 12 - Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada sem limitação de oxigênio (Ensaio B5 e B6) e respectivos cultivos controle sob limitação de oxigênio (Ensaio T9 e T10).	59
Tabela 13 - Resultados gerais do cultivo de <i>Aspergillus oryzae</i> em biorreator de bancada em diferentes condições de processo.	64

RESUMO

O cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301 em meio líquido foi estudado para avaliar a influência do pH e do suprimento de oxigênio sobre o crescimento fúngico e a formação de pectinases. Definiu-se um meio limitante para o crescimento com as seguintes concentrações: farelo de trigo em extrato aquoso, 40g/L; glicose, 5g/L; sulfato de amônio, 5g/L; pectina cítrica (indutor), 20g/L. O indutor foi estudado quanto ao momento de adição ao meio. Com adição em 24h de cultivo, a máxima concentração de biomassa foi atingida em cerca de 70h, quase 48h depois do observado no ensaio controle. A atividade enzimática máxima (27U/mL) foi semelhante à condição de referência (24U/mL), mas a ausência da pectina no início do processo facilitou a mistura e o controle do pH e do oxigênio dissolvido. No caso, reduziram-se a máxima frequência dos agitadores do biorreator (650 para 600rpm) e o período de tempo em que este nível de agitação precisou ser mantido para possibilitar a oxigenação do meio (30h para 12h), o que favoreceria a preservação do micélio. Valores constantes e variáveis de pH do meio foram comparados em ensaios com adição de pectina em 24h e sem controle de oxigênio dissolvido. Verificou-se que o pH constante de 4,0 favoreceu o crescimento, que atingiu 4,5g/L, porém a atividade enzimática foi insignificante (1,4U/mL). Quando o pH decresceu naturalmente até o mínimo de 2,7, foram atingidos concentração de biomassa de 4,0g/L e atividade de pectinases de 24U/mL; na sequência, porém, a atividade baixou para 2U/mL, acompanhando o aumento do pH após 96h de processo. Entretanto, em cultivo em que o pH foi controlado em 2,7 nas horas finais do processo, a atividade enzimática foi preservada. Estes resultados, juntamente com os de ensaios enzimáticos, demonstraram que as pectinases de *A. oryzae* perdem a estabilidade à medida que o pH aumenta. O ensaio com pH constante em 2,7 foi o único em que a atividade pectinolítica foi superior quando a pectina esteve presente desde o início do cultivo. Possivelmente, a limitação do crescimento celular (máximo de 3,5g/L) favoreceu os mecanismos de transferência e mistura, prolongando a viabilidade celular. Cultivos com pH controlado em 4,0 no período de intenso crescimento celular e em 2,7 para a produção de pectinases (Ensaio T5 e T10) resultaram em elevadas atividades enzimáticas, especialmente quando a pectina foi adicionada em 24h (43U/mL). No caso, as mais efetivas condições de transferência de oxigênio e mistura, aliadas ao pH adequado ao crescimento, permitiram que a biomassa atingisse 6,3g/L e, após a redução do pH a 2,7, a atividade pectinolítica foi incrementada. Ensaio com oxigênio dissolvido em mínimo de 30% da saturação foram conduzidos em duas condições: Ensaio B5 - pH inicial 4,0 e controlado em 2,7 após atingir este valor; Ensaio B6 - pH constante em 4,0 até 24h, seguido de redução para 2,7 e controle neste valor. As concentrações celulares atingidas em B5 (6,0g/L) e em B6 (6,8g/L) foram semelhantes à de T10, mas suas máximas atividades pectinolíticas – 106 e 120U/mL, respectivamente – foram as maiores deste estudo. Estes resultados se deveram, provavelmente, à intensificação do metabolismo fúngico associado à disponibilidade ilimitada de oxigênio. Apesar de o tempo para atingir os picos de biomassa e atividade enzimática ter sido aumentado, a produtividade do Ensaio B6 foi 3,7 vezes maior que a do controle. Os resultados deste trabalho confirmaram que o pH e o suprimento de oxigênio em cultivos de *A. oryzae* afetam decisivamente tanto o crescimento quanto a produção de pectinases. As condições operacionais definidas possibilitaram a redução do crescimento celular – permitindo, entretanto, a obtenção de atividades enzimáticas elevadas – e, em decorrência, um controle eficiente dos parâmetros estudados.

ABSTRACT

Evaluation of the production of pectinases by *Aspergillus oryzae* IPT-301 in submerged process

The cultivation of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in liquid medium was studied to assess the influence of pH and oxygen supply on the fungal growth and the formation of pectinases. A growth-limiting medium was defined with the following concentrations: wheat bran in aqueous extract, 40g/L; glucose, 5g/L; ammonium sulphate, 5g/L; citric pectin (inducer), 20g/L. The inducer was evaluated with respect to the time of addition to the medium. With the addition in 24h of cultivation, maximum biomass concentration was achieved in 70h, almost 48h after reaching the cell growth peak of the control experiment. The maximum enzyme activity (27U/mL) was similar to that of the reference run (24U/mL), but the absence of pectin at the beginning of the process favoured mixing and the control of pH and dissolved oxygen concentration. In this case, the maximum impeller speed in the bioreactor (650 to 600rpm) and the time period that this level of agitation was maintained to provide the best possible medium oxygenation were reduced (30 to 12h), a condition that could favour the preservation of mycelium. Constant and varied medium pH values were evaluated in experiments with the addition of pectin in 24h and without dissolved oxygen concentration control. It was found that a constant pH of 4.0 favoured biomass growth, but the enzyme activity was insignificant (1.4U/mL). When the pH naturally decreased up to a minimum of 2.7, biomass concentration of 4.0g/L and pectinase activity of 24U/mL were attained; in the sequence, however, the activity fell to 2U/mL following the increase of pH observed after 96h. Nevertheless, in the cultivation in which the pH 2.7 was maintained though the final hours of process, the enzyme activity was preserved. These results together with those from enzymatic tests have shown that *A. oryzae* pectinases loose stability as pH rises. The experiment with constant pH at 2.7 was the only that results in superior pectinase activity with pectin present in the medium from the beginning of the cultivation. Possibly, cell growth limitation (maximum of 3.5g/L) favoured mass transfer and mixing mechanisms and the biomass viability was extended. Cultivations with the pH controlled at 4.0 when the cell growth was more intense and, afterwards, at 2.7 for pectinase production (Experiments T5 and T10) result in high enzyme activities, especially when pectin was added in 24h (43U/mL). In the case, the more effective conditions of oxygen transfer and mixing, allied to the adequate pH for cell growth, allowed that biomass concentration achieved 6.3g/L and, after reducing the pH to 2.7, pectinolytic activity as increased. Experiments with dissolved oxygen concentration at a minimum of 30% of saturation were carried out at two conditions: Experiment B5 - initial pH 4.0 and controlled at 2.7 after reaching this value; Experiment B6 – constant pH up to 24h, followed by reduction to 2.7 and control at this value. The cell concentrations achieved in B5 (6.0g/L) and in B6 (6.8g/L) were similar to that of T10, but their maximum pectinase activities – 106 and 120U/mL, respectively – were the largest in this study. Such results were probably due to the raising fungal metabolism which is associated to the unlimited oxygen availability. Although the time to reach the peaks of biomass and enzyme activity has been increased, the productivity of Experiment B6 was 3.7 times larger than that of the control run. The results of this work have confirmed that, in cultivations of *A. oryzae*, the pH and the oxygen supply decisively affect both cell growth and pectinase production. The defined operational conditions provided the reduction of cell growth – allowing, however, the achievement of high enzyme activities – and, consequently, an efficient control of the studied parameters.

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas em processos industriais permite a obtenção de produtos de maior valor agregado em sintonia com as demandas de caráter tecnológico, de mercado e de preservação ambiental. Com aplicações em diferentes setores comerciais, em especial na indústria de alimentos, as enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são utilizadas nas etapas de extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas e vinhos. Essas enzimas degradam as substâncias pécnicas que conferem alta viscosidade a polpas e sucos de frutas, facilitando, assim, as etapas de filtração e concentração e aumentando o rendimento global do processo.

O mercado de enzimas para a indústria de alimentos e bebidas tem demonstrado constante crescimento e as pectinases têm papel destacado neste setor que, em 2005, foi o segundo maior importador de enzimas do Brasil (Bon *et al.*, 2008).

As pectinases podem ser obtidas tanto por cultivo submerso (CSm) como por cultivo em estado sólido (CES), tendo, geralmente, como agentes de produção, fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Na literatura, são encontrados diversos trabalhos publicados referentes a processos sem água livre (CES), focando a maior produção de enzima. Entretanto, quando levado a maiores escalas de produção, o CES apresenta limitações quanto ao controle de parâmetros, como suprimento de oxigênio, temperatura, umidade e pH.

Há mais de uma década, estudos relacionados à produção de pectinases por *Aspergillus* vêm sendo realizados no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, especialmente quanto à avaliação de condições de cultivo e potencial de microrganismos selecionados. A partir destes estudos e do acompanhamento do estado da arte na literatura especializada, fica evidente a necessidade de acompanhamento e controle de parâmetros como temperatura, pH e suprimento de oxigênio para favorecer o crescimento celular e, assim, proporcionar o incremento da produção de pectinases. Além disso, há claras indicações de que os parâmetros operacionais, especialmente o pH, influenciam de forma diferente o processo; ou seja, valores ideais das variáveis de processo para a produção de pectinases podem não favorecer o crescimento fúngico, assim como as condições para aumento de biomassa nem sempre promovem a liberação das enzimas de interesse.

Na produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* em CSm, a alta viscosidade do meio de cultivo, principalmente em função da presença de pectina, usada como indutor para a formação das enzimas, e as intensas modificações reológicas, decorrentes do aumento da biomassa fúngica, prejudicam consideravelmente as condições de mistura e a transferência de calor e de massa.

Cultivos em biorreatores com agitação mecânica (STR), muito utilizados neste processo em razão da sua grande flexibilidade operacional, requerem a aplicação de grande potência ao eixo do agitador para suprir oxigênio à população microbiana e para manter o sistema homogêneo. Nesta condição, as pás das turbinas promovem uma diferença significativa entre as velocidades de movimento do meio líquido e da biomassa, podendo provocar efeito de cisalhamento e destruição parcial do micélio fúngico. Deste modo, para a avaliação de um parâmetro de processo, como o pH ou

o suprimento de oxigênio ao cultivo, em biorreatores do tipo STR, é necessário que se busquem condições de operação que resguardem ao máximo a integridade do microrganismo.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo geral contribuir com o conhecimento sobre a produção de pectinases por *Aspergillus oryzae*, em cultivo submerso, observando a influência dos parâmetros operacionais identificados como os mais críticos – pH e suprimento de oxigênio – sobre o crescimento fúngico e a produção das enzimas. Nos estudos, os seguintes objetivos específicos foram enfocados:

- . formular um meio de cultivo limitante para o crescimento de *A. oryzae* IPT-301, a fim de proporcionar adequada mistura e transferência de oxigênio à fase líquida sob frequências de agitadores mais baixas que as normalmente utilizadas neste processo;
- . definir a estratégia de adição do indutor enzimático – pectina cítrica – ao meio de cultivo, de forma a minimizar o efeito prejudicial da viscosidade provocada por este polissacarídeo sobre o controle dos parâmetros operacionais em teste;
- . avaliar a influência do pH do meio de cultivo, em valores constantes e variáveis, sobre os resultados do processo;
- . analisar o processo conduzido sob condições limitadas e não limitadas com respeito à concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Substâncias pécticas e pectinases

As pectinases, ou enzimas pectinolíticas, constituem um grupo de enzimas que agem sobre as substâncias pécticas. As substâncias pécticas, por sua vez, constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos complexos que se encontram, principalmente, na lamela média e na parede celular de plantas superiores, na forma de pectato de cálcio e de magnésio (Figura 1) (Cheftel *et al.*, 1999, Jayani *et al.*, 2005).

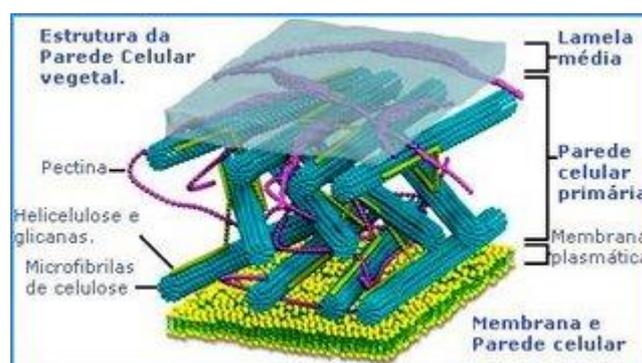


Figura 1 - Estrutura da parede celular vegetal (Grupo Virtuous, 2008).

As substâncias pécticas, representadas na Figura 2, são constituídas por uma cadeia principal composta por unidades de ácido galacturônico ligadas entre si através de ligações α -1,4 e contêm, basicamente, dois tipos de estruturas interligadas: as ramnogalacturonanas e as homogalacturonanas (Cheftel *et al.*, 1999). As primeiras 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, e o ácido poligalacturônico ou péctico, em que as carboxilas das unidades de ácido galacturônico não se encontram esterificadas (Whitaker, 1984).

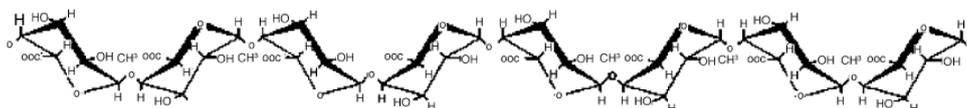


Figura 2 – Estrutura primária de substâncias pécticas (Jayani *et al.*, 2005).

Segundo a American Chemical Society, as substâncias pécticas são classificadas em protopectina, ácido pectínico, pectina e ácido péctico (Serra *et al.*, 1992; Alkorta *et al.*, 1998). A pectina é o material polimérico completamente solúvel em água que pode conter até mil resíduos de monossacarídeos por molécula e cuja estrutura pode variar de acordo com a espécie de planta de

origem e o processo de extração (Waschek *et al.*, 2008). No entanto, a solubilidade diminui com o aumento da cadeia do polissacarídeo péctico, sendo que soluções aquosas de pectina em concentrações da ordem de 1 a 2% (m/v) são altamente viscosas. Fatores como massa molecular, grau de esterificação, força iônica, temperatura e concentração influenciam fortemente esta viscosidade (Fogarty & Kelly, 1983).

A ação das enzimas pectinolíticas acontece 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).

Dependendo do mecanismo de ação, as enzimas pécticas são divididas em despolimerizantes e desmetoxilantes. 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).

Kashyap *et al.* (2001), classificam as pectinases despolimerizantes pelos seguintes critérios:

- modo pelo qual a ligação é rompida (hidrólise ou trans-eliminação);
- posição de ataque ao substrato (endopectinase ou exopectinase);
- tipo de substrato hidrolisado (ácido péctico ou pectina).

A Figura 3 apresenta o modo de ação das enzimas pectinolíticas de acordo com a classificação proposta por Kashyap *et al.* (2001).

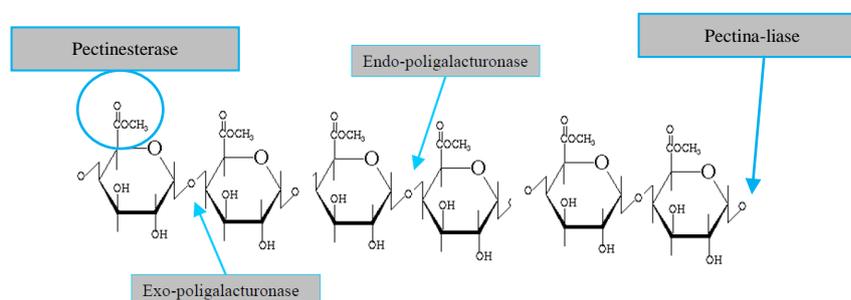


Figura 3 - Modo de ação das enzimas pectinolíticas.

As formas de ação das enzimas incluídas no grupo das pectinases são resumidas a seguir.

- Poligalacturonases (PG) - Catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de resíduos não esterificados de ácido galacturônico, tendo como substratos preferenciais ácidos pécticos ou ácidos poligalacturônicos com baixo grau de esterificação. As endo-poligalacturonases (endo-PG) quebram ao acaso as ligações internas da cadeia de ácido poligalacturônico e as exo-poligalacturonases (exo-PG) catalisam a hidrólise das ligações terminais da cadeia de pectina. Para estas enzimas, quanto maior o grau de esterificação, menor a velocidade e a proporção de hidrólise, uma vez que sua ação catalítica é facilitada na presença de grupos carboxílicos livres.
- Polimetilgalacturonases (PMG) - Hidrolisam a pectina aleatória ou sucessivamente.
- Polimetilgalacturonato liases (PMGL) ou pectina-liases - Rompem as ligações glicosídicas entre

resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação de hidrogênio.

- Poligalacturonato liases (PGL) ou pectato-liases - Atuam sobre o substrato desmetoxilado.
- Pectinesterase (PE) - Única representante das pectinases desmetoxilantes, catalisa a desesterificação dos grupos metoxila, transformando pectina em ácido péctico, liberando metanol.

As pectinases foram algumas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente, porém, a partir da década de 1960, avanços em estudos sobre a natureza dos tecidos vegetais proporcionaram o aumento da eficiência destas enzimas em processos industriais, especialmente na indústria de alimentos, na maceração de polpas durante o processamento de frutas, na extração e clarificação de sucos e na indústria de vinhos (Rombouts & Pilnik, 1980; Uenojo & Pastore, 2007).

O tratamento enzimático da polpa de frutas com preparações comerciais à base de pectinases promove a quebra das cadeias poliméricas de carboidratos, tais como pectinas, hemiceluloses, celulosas e amidos, reduzindo a viscosidade e a turbidez no processo de extração de sucos, aumentando o rendimento, promovendo a clarificação e extração de substâncias que conferem aroma e cor. A hidrólise das substâncias pécticas da ordem de 5% promove uma redução de 50% na viscosidade (Penha, 2012). Dziezak (1991) e Kurma & Sharma (2013) obtiveram aumento de cerca de 12% no rendimento de extração de sucos de mamão papaia e cenoura, utilizando enzimas pécticas. Sandri *et al.* (2011) avaliaram a utilização de preparações pectinolíticas fúngicas em processo de clarificação de sucos de maçã, butiá, mirtilo e uva. Os autores obtiveram até 40% de aumento no nível de clarificação e redução de até 30% de turbidez nos sucos tratados enzimaticamente. Olivier *et al.* (2008) verificaram que a utilização de pectinases durante a maceração pode resultar em um vinho de coloração mais intensa e mais estável, mesmo quando usadas uvas rosadas em vez de tintas.

Além da aplicação na indústria de alimentos, muitos estudos têm sido realizados sobre as aplicações de enzimas pectinolíticas em diferentes processos industriais, como resumido no Quadro 1.

Quadro 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); Olivier <i>et al.</i> (2008); Sandri <i>et al.</i> (2011); Sandri <i>et al.</i> (2013)
Tratamento e degomagem de fibras vegetais, processo de cura de café, cacau e tabaco.	Nair & Panda (1997); Silva <i>et al.</i> (2000); Kashyap <i>et al.</i> (2001); Kapoor <i>et al.</i> (2001); Sharma & Satyanarayana (2006)
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)
Produção de têxteis e de papéis	Reid & Ricard (2000); Olsson <i>et al.</i> (2003); Kaur <i>et al.</i> (2004); Jayani <i>et al.</i> (2005); Sharma & Satyanarayana (2006)
Preparação de alimentos funcionais	Lang & Dörnenburg (2000); Uenojo & Pastore (2007)
Tratamento de águas de lavagem	Aitken (1993); Karam & Nicell (1997)

2.1.1 Fatores que influenciam a ação das pectinases

A atividade catalítica das enzimas, de acordo com Cabral *et al.* (2003), é influenciada por fatores como concentração enzimática, concentração do substrato, pH e temperatura.

A velocidade da reação enzimática depende da ligação entre o sítio catalítico da enzima e o substrato específico. Assim, ao aumentar a concentração de substrato, a velocidade de reação tende a um limite proporcional à quantidade em enzimas do sistema. A partir desse ponto, nenhuma influência tem o substrato sobre a atividade enzimática (Cabral *et al.*, 2003).

A temperatura é um fator fundamental para a atividade das enzimas. O aumento de temperatura provoca maior agitação das moléculas de enzima e substrato e, portanto, maiores possibilidades de elas se chocarem para ocorrer a reação. Porém, se for ultrapassada certa temperatura, a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem e ela é desnaturada. Ueda *et al.* (1982) verificaram que a temperatura ótima de ação das poligalacturonases é de 60°C. Jayani *et al.* (2005) identifica a faixa de 30°C a 50°C como ótima, destacando que algumas pectinases mantêm a estabilidade até 75°C. Mohsen *et al.* (2009) determinaram que poligalacturonases são relativamente instáveis a altas temperaturas e que, em estudo de termoestabilidade destas enzimas, a perda de atividade é proporcional ao aumento da temperatura, sendo que a 50°C, há perda de 82% de atividade após 120 minutos de incubação.

A influência do pH sobre a atividade enzimática está relacionada ao estado de ionização de resíduos de aminoácidos da enzima, que são essenciais à catálise. Ueda *et al.* (1982) verificaram que o pH ótimo de ação de quatro enzimas do complexo pectinolítico é diferente, variando de 4,0 a 8,5. Os autores identificaram, de forma análoga, que cada enzima estudada é estável em diferentes faixas de pH e que os processos de produção devem ser conduzidos de forma a privilegiar a estabilidade da enzima de interesse, em detrimento das demais.

Uma característica que favorece a aplicação de pectinases fúngicas na indústria de alimentos é o fato de o pH ideal de ação de suas enzimas se aproximar do valor de pH de muitos sucos de frutas, ou seja, na faixa de 3,0 a 5,5 (Ueda *et al.*, 1982). Malvessi & Silveira (2004), Jayani *et al.* (2005) e Fontana *et al.* (2009) verificaram que valores ácidos de pH favorecem a atividade de pectinases, sendo 4,0 o pH ótimo de ação enzimática. Sandri *et al.* (2013) obtiveram maiores valores de atividade de pectinases de *A. niger* em pH 4,0 e verificaram que, em maiores valores, ocorre queda gradual da atividade. Já Gomes *et al.* (2010), ao caracterizarem poligalacturonases utilizando planejamento fatorial, identificaram a maior atividade em pH 5,5.

Com relação à estabilidade de pectinases frente ao pH, Gummadi *et al.* (2007) relataram que poligalacturonases fúngicas, em geral, permanecem estáveis na faixa de pH de 3,0 a 5,0. Para o caso das pectinases produzidas por *A. niger*, a espécie usada na maioria dos trabalhos, há consenso entre diferentes autores: Gomes *et al.* (2010) verificaram que as enzimas são estáveis por mais tempo em pH 5,0; Souza *et al.* (2010) definiram que, entre os valores de pH de 3,0 a 8,0, apenas na faixa de 3,5 a 5,5 o complexo enzimático se mostrou estável; Mohsen *et al.* (2009) mostraram que a estabilidade

enzimática é preservada numa faixa de pH de 3,0 a 6,0, com reduções de atividade da ordem de 54% em pH 7,0 e de 83% em pH 8,0, após 3,5h de incubação nestes valores de pH.

2.2 Microrganismos produtores de pectinases

As pectinases podem ser produzidas por muitas espécies de fungos filamentosos, algumas leveduras e bactérias. Para a seleção de microrganismos pectinolíticos, as fontes normalmente utilizadas são vegetais deteriorados e resíduos agrícolas. Microrganismos como *Bacillus*, *Erwinia*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Penicillium* e *Fusarium* são conhecidos como produtores de pectinases (Kashyap *et al.*, 2001).

As preparações enzimáticas comerciais são geralmente produzidas com fungos filamentosos, especialmente *A. niger*, uma vez que este fungo possui a classificação GRAS (“generally recognized as safe”) da “Food and Drugs Administration” (FDA), órgão do governo dos EUA responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, cujas normas são internacionalmente aceitas. No Brasil, *A. niger* e outros fungos do gênero *Aspergillus* – como *A. awamori*, *A. foetidus* e *A. oryzae* – além de *Penicillium simplicissimum*, *Rhizopus oryzae* e *Trichoderma reesei*, estão relacionados na Resolução RDC 26/2009 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como microrganismos passíveis de serem utilizados na indústria de alimentos para produção de pectinases.

2.3 Processos de produção de pectinases

A produção de enzimas microbianas pode ser realizada em dois tipos de processos, classificados de acordo com a quantidade de água envolvida:

- processo submerso, com presença de água livre;
- processo em estado sólido, caracterizado como um cultivo onde o microrganismo se desenvolve sobre uma superfície sólida sem a presença de água livre, porém com umidade na faixa de 15 a 70% (Solis-Pereira *et al.*, 1996).

Os dois tipos de processo, devido às suas características particulares, apresentam 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, não exigindo a remoção de grandes quantidades de água para a concentração do produto;
- o baixo grau de umidade nos sistemas em estado sólido torna o ambiente inapropriado para muitos microrganismos potencialmente contaminantes;
- nos sistemas submersos, a remoção do calor decorrente do processo é facilitada, assim como o controle de parâmetros de processo – pH e suprimento de oxigênio;
- a homogeneização da temperatura do meio é mais simples em sistemas submersos;
- o conhecimento da engenharia de processo dos sistemas submersos é incomparavelmente maior que o dos sistemas em estado sólido.

O cultivo em estado sólido apresenta algumas limitações que devem ser levadas em consideração nas operações em grande escala, destacando-se a grande dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo do microrganismo. Ao contrário, nos cultivos submersos, o volume de água presente no meio facilita o controle da temperatura. Outro fator a ser considerado é que a heterogeneidade da mistura no cultivo em estado sólido dificulta o controle dos parâmetros de processo, como, por exemplo, o crescimento microbiano (Lonsane *et al.*, 1991).

2.3.1 Processo submerso de obtenção de pectinases

Na produção de pectinases em processo submerso por fungos filamentosos, fatores como a composição do meio de cultivo, a temperatura, o pH, o suprimento de oxigênio e o cisalhamento provocado pela agitação, entre outros, exercem forte influência sobre os resultados do processo. Os estudos existentes na literatura descrevem o comportamento da maioria destes fatores; entretanto, são específicos para determinadas linhagens microbianas, em geral pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

Aguilar & Huitron (1986) estudaram a produção de pectinases em regime descontínuo alimentado em processo submerso e verificaram que a repressão catabólica dos produtos de degradação da pectina sobre a síntese de pectinases por *Aspergillus* é diminuída. 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.

A escolha do tipo de biorreator é definida de acordo com o microrganismo de interesse e o produto desejado. O modelo mais utilizado, responsável por cerca de 90% das aplicações, é o reator com agitação mecânica (STR) (Figura 4), por apresentar alta flexibilidade de utilização, promover homogeneização eficaz dos nutrientes, possibilitar eficientes transferências de calor e de massa para garantir a manutenção da temperatura e o suprimento de oxigênio (Schmidell *et al.*, 2001).

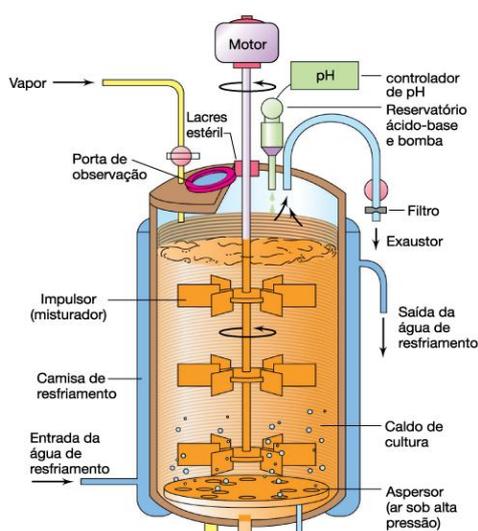


Figura 4 – Desenho esquemático de um biorreator com agitação mecânica (Madigan, 2010).

O biorreator STR consiste em um tanque cilíndrico, normalmente equipado com chicanas, cuja função é evitar a formação de vórtice durante a agitação do líquido. O eixo central do fermentador é equipado com uma ou mais turbinas, que podem ser de diferentes tipos, sendo a de pás planas a mais amplamente utilizada. Os STR possuem também sistema de aeração, normalmente instalado na parte inferior da cuba, próximo aos impelidores (Schmidel *et al.*, 2001). No entanto, a frequência de agitadores necessária para promover a transferência de massa pode, muitas vezes, provocar dano ao microrganismo, principalmente quando se trata de um fungo filamentoso, devido a zonas de alto cisalhamento causadas pelas pás dos impelidores (Chisti & Jauregui-Haza, 2002).

2.4 Fatores que influenciam a produção de pectinases em processo submerso

Os parâmetros de operação que exercem influência direta sobre os resultados do processo de produção de pectinases são: temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido. A composição do meio de cultivo, que engloba as fontes de nitrogênio e fosfatos, concentração de nutrientes e fontes de carbono e indutor, também pode afetar o processo de obtenção de pectinases. As condições de agitação e mistura do cultivo definem a eficiência das transferências de calor e de massa, a fim de garantir o suprimento adequado de nutrientes e oxigênio e a homogeneidade do sistema.

2.4.1 Meio de cultivo

A composição do meio de produção é parâmetro de fundamental importância para o crescimento celular e para a produção de enzimas microbianas, uma vez que este pode conter substâncias que afetam os fenômenos de indução, repressão catabólica, inibição de produção e, em caso de enzimas extracelulares, os mecanismos de liberação de proteínas (Galiotou *et al.*, 1997).

Segundo Rombouts & Pilnik (1980), os meios de cultivo elaborados com concentrações balanceadas de pectina com açúcares, como glicose e lactose, levam a melhores resultados na produção de enzimas pécticas em processos submersos. Além disso, a presença de pectina tem efeito indutor e favorece a excreção da enzima. No entanto, por razões econômicas, a pectina é usualmente substituída por resíduos agroindustriais com alto teor de pectina.

Maldonado & Strasser de Saad (1998) avaliaram o efeito da adição de pectina (15g/L) e glicose (5, 10 e 20g/L) em cultivo submerso. Os autores observaram que as atividades de pectinesterase e poligalacturonase aumentaram quando a pectina foi utilizada como única fonte de carbono. Em presença de glicose, houve redução da produção da enzima e aumento da concentração de biomassa.

Teixeira *et al.* (2000) estudaram a relação entre diferentes fontes de carbono e a produção de pectinesterases, endo e exo-poligalacturonases de *Aspergillus japonicus* em meio líquido. Segundo o estudo, o tipo e a concentração dos componentes utilizados, glicose, sacarose e glicerol, além de pectina, afetam diretamente a atividade enzimática e, quando adicionados ao meio de cultivo em altas quantidades, têm efeito de repressão sobre todas as enzimas analisadas.

O efeito da concentração de glicose sobre o crescimento de *A. oryzae* foi estudado por Fontana & Silveira (2012a), que avaliaram que a concentração celular é proporcional ao aumento desta fonte de carbono no meio de cultivo. No entanto, na concentração de 50g/L, a mais alta avaliada, ocorre leve redução na biomassa, sugerindo inibição do crescimento celular.

Fawole & Odunfa (2003), ao estudarem as fontes de carbono e nitrogênio do meio para a produção de enzimas pécnicas por *A. niger*, observaram que altas quantidades de glicose causam efeito de inibição sobre a produção de endo e exo-PG, porém não afetam a concentração celular. No mesmo trabalho, os autores avaliaram o efeito de oito diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade enzimática e identificaram sulfato e nitrato de amônio como fontes ideais, observando que glicina e triptofano não suportaram a produção de enzimas pectinolíticas.

Solis-Pereira *et al.* (1993) descreveram o uso de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio na composição do meio de cultivo de *A. niger*, que apresentou melhores resultados de crescimento celular. Entretanto, Galiotou-Panayotou *et al.* (1997), com a mesma espécie de fungo, observaram maiores atividades enzimáticas com fosfato de amônio.

O emprego de farelo de trigo em cultivos submersos para a produção de poligalacturonases tem sido relatado por seu efeito positivo, destacando-se os trabalhos de Maiorano (1990), Kapritchkoff (1996), Blandino *et al.* (2001), Malvessi & Silveira (2004) e Fontana & Silveira (2012) em cultivos de fungos do gênero *Aspergillus*. De acordo com Malvessi (2000), meios líquidos formulados sem farelo de trigo apresentam atividades de poligalacturonases inferiores quando comparados aos meios formulados com farelo de trigo. Blandino *et al.* (2001) avaliaram que meios formulados com farelo de trigo favorecem o crescimento celular de *A. awamori* e a produção de endo e exo-poligalacturonases quando em presença de pectina.

2.4.2 Temperatura

O efeito da temperatura sobre a produção de enzimas pectinolíticas vem sendo estudado por diversos autores que, em sua maioria, avaliaram a faixa de 15°C (Bailey, 1990) a 45°C (Shivakumar & Krishnanand, 1995). Em processos submersos, no entanto, Maiorano (1990) utilizou a faixa de 25°C a 30°C para cultivos de *A. niger* e *A. oryzae*.

Bailey (1990), em estudo sobre a produção de poligalacturonases por *A. niger* em cultivo submerso, observou que a temperatura ótima para a produção destas enzimas depende da composição do meio de cultivo, variando de 15°C a 30°C.

Patil & Dayanand (2005) isolaram cepas de *A. niger* de miolo de girassol para avaliar as variáveis do processo de produção de pectinase, identificando a temperatura como o principal parâmetro de controle do processo, quanto aos efeitos ocorridos sobre a síntese da enzima. Neste estudo, a temperatura em que houve a máxima produção foi 34°C.

Favole & Odunfa (2003) estudaram a produção de enzimas pécnicas a partir de *A. niger* e

identificaram comportamentos similares na atividade enzimática e no desenvolvimento micelial de acordo com a variação de temperatura, sendo o valor ideal para ambos de 40°C.

Fang *et al.* (2007), em cultivo de *Aspergillus carneus*, concluíram que a melhor temperatura para o crescimento celular e a produção de enzimas foi de 30°C.

O efeito da temperatura sobre o crescimento de fungos da espécie *Aspergillus fumigatus* em cultivo submerso foi estudado por Lenartovicz *et al.* (2002), que determinaram 30°C como valor ótimo e 42°C como a máxima temperatura na qual ocorre crescimento significativo, sendo que acima disso ocorre limitação.

2.4.3 pH

A influência do pH sobre a produção e a composição do complexo pectinolítico sintetizado por *A. oryzae* foi estudado por Ueda *et al.* (1982) através de ensaios de controle do parâmetro com valores fixados em 4,0 e 6,0, mantendo o pH em 4,0 por 24 horas de processo e, então, aumentando-o para 8,5. Os autores observaram que a composição do complexo enzimático foi alterada, conforme o pH, provavelmente devido ao perfil da curva de estabilidade que cada enzima apresenta.

A produção de enzimas pécicas por fungos do gênero *Aspergillus* ocorre em faixa ácida de pH, como observado nos trabalhos de Fawole & Odunfa (2003) e de Patil & Dayanand (2006), que obtiveram os melhores valores de atividade pectinolítica e crescimento celular em pH 5,0.

O efeito do pH inicial do processo de fermentação submersa sobre a produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus flavipes* foi avaliado por Martinez-Trujillo *et al.* (2009). Os autores utilizaram os valores de pH de 3,5, 4,2 e 5,0, deixando-o livre durante o processo, e reportaram que, apesar de em pH 3,5 o fungo apresentar valores inferiores de crescimento celular, foi neste pH que as maiores atividades enzimáticas de endo e exo-pectinases foram registradas. Por outro lado, as maiores produtividades em enzimas deste estudo foram obtidas em pH 4,2 e o maior crescimento celular em pH 5,0.

Malvessi & Silveira (2004) testaram a influência do pH do meio de cultivo 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 síntese de poligalacturonases foi aumentada em valores de pH em torno de 3,0. Observou-se acentuado decréscimo de atividade com o aumento do pH a níveis próximos da neutralidade. Em ensaios em que o pH foi mantido em 2,7 após decrescer naturalmente a este valor, as atividades de poligalacturonases não mostraram a tendência característica de queda ao final do processo.

De acordo com Fontana (2009), também em estudos sobre o cultivo de *A. oryzae* para produção de poligalacturonases, quando o pH foi controlado para um mínimo de 2,7, houve um aumento significativo na produção de endo e exo-poligalacturonases, enquanto que, abaixo deste valor, o metabolismo do microrganismo e a produção das enzimas foram prejudicados.

A variação do pH também exerce influência sobre a morfologia fúngica. Esta dependência pode ser explicada pelas características eletrostáticas da superfície dos esporos. Em valores baixos, a superfície dos esporos está protonada, promovendo uma espécie de repulsão que os mantêm afastados, evitando a formação dos *pellets*. Já em valores mais elevados de pH, entre 5,0 e 7,0, a aglomeração dos esporos é facilitada, promovendo maior formação de *pellets* (Wainwright *et al.*, 1993).

2.4.4 Agitação e mistura

Em biorreatores agitados mecanicamente, a agitação influencia a definição dos coeficientes de transferência de calor e de massa, evita a precipitação de sólidos e facilita sua dissolução, aumenta a capacidade de mistura gás/líquido e permite a manipulação da velocidade superficial dos gases liberados (Gogate *et al.*, 2000).

Processos submersos necessitam de condições controladas de agitação e aeração para garantir a eficiência da fermentação com adequado fornecimento de oxigênio e consequente consumo de energia. Friederich *et al.* (1994) avaliaram que, durante a fase de crescimento microbiano, quando há um alto consumo de oxigênio dissolvido, as condições de suprimento de oxigênio devem ser controladas para manter a viabilidade celular de *A. niger*.

Os fungos filamentosos, contudo, são microrganismos com diferentes morfologias e alguns apresentam formação de *pellets* ou de filamentos livres, tornando-os particularmente exigentes quanto à transferência de oxigênio durante o cultivo. Ju *et al.* (1991) relacionaram esta transferência a parâmetros operacionais como a agitação, a vazão volumétrica de ar e as dimensões geométricas do biorreator.

Como demonstrado por Bailey & Pessa (1990) e Heydarian *et al.* (2009), fungos filamentosos, quando expostos a altas frequências de agitadores, sofrem ruptura do micélio devido ao cisalhamento, gerando redução de biomassa e consequente redução na produção enzimática. Outros relatos deste efeito são apresentados a seguir.

Em estudo com *T. reesei* em fermentação submersa, Ganesh *et al.* (2000) verificaram que o aumento da frequência dos agitadores é proporcional à diminuição na atividade enzimática de celulases.

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

Objetivando estudar os efeitos causados pelo aumento da frequência de agitadores empregada em culturas fúngicas sobre a estrutura de *pellets* e a formação de produtos por *A. niger*, Lin *et al.* (2010) mantiveram a potência específica do sistema, alterando as intensidades de agitação e aeração. Os autores observaram que, quando a intensidade de aeração era maior do que a de agitação, a

velocidade de produção de glicoamilase foi 96,4% superior em relação à condição em que altas frequências de agitadores eram empregadas.

Lai *et al.* (2005), ao estudarem a influência das condições de cultivo sobre a produção de lovastatina por *Aspergillus terreus* em reator de agitação mecânica de 5L, usando 3L de meio e duas turbinas do tipo Rushton, verificaram que a máxima agitação possível para não causar a quebra das hifas do microrganismo sem regeneração foi de 425rpm. Os autores avaliaram ainda que, quando a velocidade de agitação foi superior a 425rpm, houve queda na produtividade celular, ainda que o nível de oxigênio dissolvido estivesse em 100%.

2.4.5 Suprimento de oxigênio

Os microrganismos aeróbios e os anaeróbios facultativos, quando utilizados em processos biotecnológicos, necessitam de uma disponibilidade ilimitada de oxigênio dissolvido no meio para garantir o adequado crescimento. O consumo de oxigênio dissolvido também influencia a manutenção celular e a produção de metabólitos. Quando em escassez, afeta diretamente o desempenho do processo (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

O suprimento de oxigênio em cultivos submersos é promovido através da operação de dissolução de oxigênio contido na fase gasosa (normalmente ar) para a fase líquida, para que esteja disponível para o consumo microbiano. O fato de o oxigênio ser pouco solúvel em água torna a extensão dos processos aeróbios e a obtenção de produtos completamente dependentes da capacidade de se transferir oxigênio para a fase líquida (Schmidell *et al.*, 2001). Por exemplo, à pressão ambiente de 1atm e à temperatura de 30°C – condições frequentes em processos fermentativos aeróbios – a concentração de oxigênio dissolvido em água destilada, na saturação, é de apenas 0,23mmol/L (7,5mg/L). A dissolução de substâncias, solúveis ou não, no meio de cultivo – fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, aminoácidos, sais inorgânicos, dentre outros – assim como a presença de compostos que aumentam a viscosidade, reduzem ainda mais a concentração de oxigênio na saturação.

A transferência de oxigênio e a velocidade em que ela ocorre dependem de fatores como o coeficiente volumétrico de transferência de massa, a área interfacial específica das bolhas, a força motriz do gás, dos sólidos e a velocidade de recirculação do líquido no biorreator (Merchuk & Siegel, 1995). Cultivos microbianos conduzidos em escala de laboratório, em frascos sob agitação, a aeração e a agitação são proporcionadas por meio da rotação ou da ação recíproca do sistema. Quando utilizados biorreatores, em escala de bancada e piloto, o suprimento de oxigênio é usualmente conduzido por meio de injeção de ar comprimido e dispositivos mecânicos que proporcionam a agitação do caldo de fermentação (Wang, 1979).

Em processos com microrganismos aeróbios, é esperado, em princípio, que um suprimento não limitado de oxigênio – ou seja, a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido sempre acima de

seu valor crítico – seja suficiente para garantir a eficiência do processo. Na literatura, entretanto, há relatos que sugerem que a questão requer um cuidado especial, conforme é relatado a seguir.

O efeito da velocidade de transferência de oxigênio (OTR) em processos de produção de enzimas pectinolíticas por *A. niger* foi estudado por Zetelaki-Horvath & Vas (1981). Os autores relatam que o melhor rendimento micelial foi observado a uma OTR de 100mmol/L/h, no entanto, as atividades de pectina liase e endo-polimetilgalacturonase foram aumentadas com OTR de 60mmol/L/h e, para a endopoligalacturonase, a OTR de 49mmol/L/h foi a melhor condição.

Lai *et al.* (2005), em cultivo de *A. terreus* para obtenção de metabólitos secundários, estudaram o efeito de concentrações constantes de oxigênio dissolvido entre 10 e 40% de saturação e observaram aumento de biomassa em concentrações de oxigênio dissolvido de 30% e 40%; porém, o alto cisalhamento causado pela frequência de agitadores necessária para manter o percentual de 40%, provocou destruição dos *pellets* e redução considerável do título de produto obtido em relação à condição para que se mantivesse 30% da saturação.

Li *et al.* (2008), avaliando o efeito do enriquecimento de oxigênio em cultivo de *A. niger*, verificaram que não houve qualquer indício de inibição de crescimento ou consumo de nutrientes pelo microrganismo mesmo em altos níveis de suprimento de oxigênio. No entanto, nas condições de operação que resultaram em concentração de oxigênio dissolvido acima de 50% de saturação, não houve diferença significativa em termos de títulos de biomassa.

Em estudo de cinética de crescimento e produção de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, Bettin (2010) avaliou a influência da concentração de oxigênio (OD) sobre o processo e identificou que altos valores de OD não são adequados para a produção da enzima, sendo que a limitação, mesmo que temporária, teve efeito positivo sobre os títulos enzimáticos. Já o crescimento celular só foi afetado quando o cultivo foi mantido com 0% da saturação em OD. Os níveis mais elevados de atividade foram detectados na condição de 30% de saturação, em 96 horas de cultivo.

Os relatos apresentados demonstram que há forte influência da composição do meio de cultivo e dos parâmetros de processo sobre cultivos fúngicos para obtenção de pectinases. É possível verificar que o efeito destas variáveis, apesar de largamente estudados, não foram totalmente compreendidos, uma vez que a resposta de cada microrganismo depende das condições de cultivo e do efeito combinado destes parâmetros. A compreensão aprofundada da cinética do processo pode contribuir para os aumentos de rendimento e produtividade e para a redução dos custos operacionais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Aspergillus oryzae* IPT-301, cedido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (São Paulo, SP), conhecido por sua capacidade de produzir pectinases quando cultivado em meio sólido (Maiorano, 1991) e em meio líquido (Malvessi & Silveira, 2004; Fontana *et al.*, 2005).

A conservação do microrganismo foi feita em meio sólido glicerinado, a 4°C, com repiques mensais de cultura de estoque. A incubação foi realizada em estufa a 30°C por quatro dias.

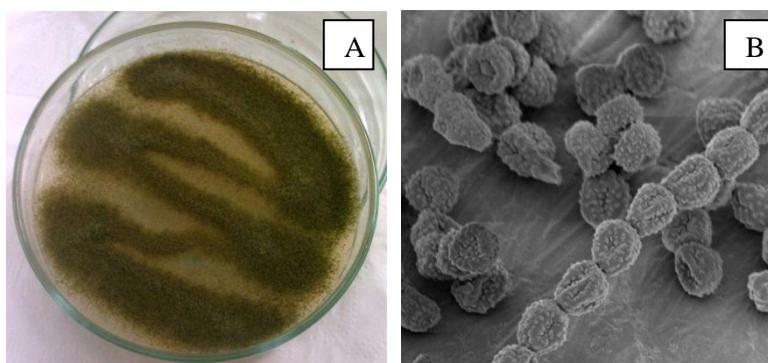


Figura 5 - *Aspergillus oryzae* IPT-301: A, cultura em meio sólido após quatro dias de incubação; B, aspecto dos esporos obtidos da placa, em microscópio eletrônico de varredura (MEV) com ampliação de 1.000 vezes.

3.2 Meios de cultivo

Para a conservação e a propagação dos microrganismos para preparo dos inóculos, foi utilizado o meio de cultura descrito por Maiorano (1982), com a seguinte composição (g/L): glicose, 25, glicerina, 25, extrato de levedura, 5, ágar-ágar, 20.

O meio de produção de pectinases WBE (*wheat bran extract*), descrito por Fontana *et al.* (2009), serviu como base para a definição das formulações testadas no presente trabalho (g/L):

Farelo de trigo ¹ (em extrato aquoso ²)	80
Pectina cítrica ³	20
Glicose	22
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	6,3x10 ⁻⁴
ZnSO ₄	6,2x10 ⁻⁴
MnSO ₄	1,0x10 ⁻⁵

¹ Vicato Alimentos (Sananduva, RS)

² Para a obtenção do extrato aquoso de farelo de trigo, a massa de material a ser empregada na formulação do meio era suspensa em 500mL de água e autoclavada a 1atm por 15min. Após resfriamento, a mistura era filtrada para evitar a presença de sólidos em suspensão e o extrato resultante utilizado na preparação do meio.

³ GENU® Pectin tipo USP-B, CPKelco (São Paulo)

O ajuste do pH do meio era realizado pela adição de NaOH 2,5mol/L ou HCl 2mol/L e o meio era autoclavado por 20 minutos.

3.3 Preparo de inóculos

O preparo de inóculos seguiu o mesmo procedimento em todos os ensaios. Em câmara de fluxo laminar, água destilada esterilizada era adicionada ao tubo ou à placa de Petri com a cultura do microrganismo. Os esporos eram raspados com ajuda de uma alça esterilizada e a suspensão resultante transferida para um frasco Duran. Este frasco era agitado até a homogeneização da suspensão, cuja concentração era determinada por contagem em câmara de Neubauer. A inoculação era feita, então, com 10^8 esporos por litro de meio.

3.4 Condições de cultivo

Os cultivos de *A. oryzae* descritos neste trabalho foram conduzidos em frascos sob agitação e em biorreatores de bancada. Na sequência, são apresentados detalhes sobre as condições experimentais utilizadas nos estudos.

3.4.1 Ensaios em frascos sob agitação

Os cultivos de *A. oryzae* em frascos foram conduzidos em agitador recíproco, construído na UCS (Figura 6). Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500mL, com gargalo alongado, contendo 100mL de meio, cobertos com uma manta de gaze e algodão hidrófobo. A frequência de agitação era mantida em 300rpm e a temperatura do ambiente em 30°C. Nos ensaios realizados nesta condição, em cada amostragem, era utilizado um frasco que não retornava ao agitador.



Figura 6 - Frascos em agitador recíproco para cultivo submerso de *Aspergillus oryzae*.

3.4.2 Ensaios em biorreator de bancada

Os ensaios em biorreator foram conduzidos em dois biorreatores diferentes – B. Braun Biotech modelo Biostat B (RFA) e Tecnal modelo Tecbio (Brasil) –, cujas características são descritas na sequência.

O biorreator B. Braun Biotech modelo Biostat B tem uma cuba de vidro com volume útil de 5L, sendo, neste trabalho, operado em volume de 3,5L. A unidade de controle do equipamento permite a determinação e a manutenção de parâmetros básicos de processo como o pH, a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido (Figura 7).



Figura 7 - Biorreator de agitação mecânica Biostat B (RFA), B. Braun Biotech.

A cuba do reator possui diâmetro interno de 160mm e a agitação, no reator, é proporcionada por três turbinas do tipo Rushton com 60mm de diâmetro, com seis lâminas planas cada, separadas a uma distância de 25mm. A dispersão do ar é feita a partir de um anel perfurado instalado na extremidade inferior do eixo central do agitador, a 20mm do fundo da cuba. O reator contém um conjunto com quatro chicanas equidistantes, com 10mm de largura cada uma.

O controle da temperatura, em 28°C, era feito a partir de um banho circulante conectado à camisa da cuba do reator.

O eletrodo de pH era calibrado antes da esterilização e o controle deste parâmetro era feito a partir de dispositivo automatizado do reator que possuía acoplado duas bombas peristálticas, uma para base (NaOH 2,5mol/L) e outra para o ácido (HCl 2,0mol/L). Este sistema permitia, ainda, registrar o volume adicionado de cada reagente.

As concentrações de oxigênio dissolvido eram obtidas na forma de percentagem da saturação do meio com oxigênio, com o auxílio de uma sonda polarográfica conectada ao reator. O sistema permitia, ainda, o controle da concentração de oxigênio dissolvido através de alterações da vazão de entrada de ar e/ou da frequência dos agitadores.

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

O biorreator de bancada Tecnal modelo Tecbio tem cuba com volume total de 7,5L, tendo sido operado, nos cultivos deste trabalho, com volume de 4L (Figura 8).



Figura 8 - Biorreator de agitação mecânica Tecbio, Tecnal.

Neste reator, apesar de o diâmetro interno da cuba ser o mesmo do reator Biostat B, 160mm, e as turbinas também serem do tipo Rushton, elas possuíam diâmetro de 55mm. Três turbinas, equidistantes eram usadas para proporcionar a agitação no biorreator. Os sistemas de aeração, coleta de amostras e inoculação eram os mesmos já descritos para o reator B. Braun Biotech.

O controle da temperatura, em 28°C, era proporcionado por um banho circulante ligado a um tubo em “U” conectado à tampa do reator, internamente à cuba.

O controle do pH era feito com um controlador Provitec modelo pH 1200 (Brasil), equipado com duas bombas peristálticas (DM5900), uma para NaOH e outra para HCl nas mesmas concentrações informadas para os cultivos no outro reator. A alimentação destes reagentes era feita a partir de uma bureta para permitir monitorar os volumes adicionados.

O biorreator Tecnal não permitia o controle automático da concentração de oxigênio dissolvido, tendo sido operado com vazão de ar e frequência de agitadores constantes.

3.5 Experimentos realizados

Os itens a seguir descrevem e os ensaios realizados neste trabalho e o objetivo de estudo em cada um. As condições experimentais e a forma de condução de cada ensaio também são descritas.

3.5.1 Formulação do meio de cultivo

Variações no meio WBE foram testadas em ensaios em frascos sob agitação. Estes ensaios tiveram o objetivo de definir uma formulação de meio que fosse limitante para o crescimento celular –

de forma a reduzir-se a demanda de oxigênio pelo cultivo e ter-se uma adequada transferência de oxigênio ao sistema –, mas que permitisse a obtenção de títulos elevados de pectinases. Nestes testes, foram avaliadas diferentes concentrações das fontes de carbono (farelo de trigo, glicose e pectina), de fonte de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio) e de indutor (pectina).

Inicialmente, variaram-se as concentrações de farelo de trigo, glicose e sulfato de amônio, mantendo-se os teores dos demais componente do meio WBE. As variações testadas para estes componentes são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Variações testadas na composição do meio WBE (*wheat bran extract*).

Meio	Farelo de trigo (extrato aquoso) (g/L)	Glicose (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)
F20-G0-N3	20	0	3,0
F20-G10-N3	20	10	3,0
F20-G0-N5	20	0	5,0
F20-G10-N5	20	10	5,0
F40-G0-N3	40	0	3,0
F40-G10-N3	40	10	3,0
F40-G0-N5	40	0	5,0
F40-G10-N5	40	10	5,0
F60-G0-N3	60	0	3,0
F60-G10-N3	60	10	3,0
F60-G0-N5	60	0	5,0
F60-G10-N5	60	10	5,0
F80-G0-N3	80	0	3,0
F80-G10-N3	80	10	3,0
F80-G0-N5	80	0	5,0
F80-G10-N5	80	10	5,0

Na sequência, o meio de cultivo F40-G0-N5, que apresentou resultados mais adequados ao estudo foi avaliado em biorreator de bancada Biostat B (Ensaio B1, B2 e B3), com diferentes concentrações de glicose (0, 5 e 10g/L). De acordo com Fontana & Silveira (2012a), a glicose tem forte influência sobre o perfil de pH do cultivo, que, por sua vez, interfere de forma decisiva sobre a produção de pectinases.

Os ensaios conduzidos para avaliação de diferentes concentrações de indutor sobre a produção de pectinases foram conduzidos preliminarmente em frascos sob agitação. Considerando a alta viscosidade conferida ao meio de cultivo pela presença do indutor, especialmente durante a fase de crescimento celular mais intenso, e objetivando proporcionar o controle mais efetivo das variáveis do processo e a melhoria na transferência de oxigênio, avaliou-se a adição do indutor ao cultivo em

frascos sob agitação, sob diferentes condições. Os ensaios conduzidos para avaliação do indutor foram os seguintes:

- F1 - concentrações de pectina cítrica de 0, 5, 10, 15, 20 e 25g/L;
- F2 - adição de 20g/L de pectina em 20, 24 e 28 horas de processo;
- F3 - concentrações de pectina entre 5 e 20g/L de pectina adicionadas após 24 horas de cultivo;
- F4 - adição de 10g/L de pectina no tempo inicial e 10g/L em 24 horas de cultivo.

Com os resultados obtidos nos ensaios em frascos sob agitação, o Ensaio B4 foi conduzido em biorreator de bancada com adição de 20g/L de pectina em 24h de processo.

3.5.2 Avaliação do pH sobre o cultivo

Os ensaios para avaliação do pH foram conduzidos com a formulação denominada F40-G5-N5, que apresentou os resultados mais adequados para o estudo. O Ensaio F5, para a avaliação do pH inicial dos meios de cultivo, foi conduzido em frascos sob agitação. Os valores de pH avaliados foram 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0. Neste ensaio, o pH não foi controlado durante o processo, apenas determinado nas amostras coletadas.

Os cultivos conduzidos em biorreator Tecnal, modelo Tecbio, com fluxo de ar de 1,67L/min e frequência de agitadores de 480rpm, com o objetivo de avaliar o efeito do pH sobre o crescimento celular e a produção de pectinases foram realizados em duplicata, sob cinco diferentes condições, durante os seguintes ensaios, em presença de pectina desde o tempo inicial:

- T1 - pH mantido constante em 4,0;
- T2 - pH mantido constante em 2,7;
- T3 - pH inicial de 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7;
- T4 - pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7 até o final do cultivo;
- T5 - pH inicial 4,0 mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

E, com adição de pectina em 24h de processo:

- T6 - pH mantido constante em 4,0;
- T7 - pH mantido constante em 2,7;
- T8 - pH inicial de 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7;
- T9 - pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7 até o final do cultivo;
- T10 - pH inicial 4,0 mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

3.5.3 Avaliação da estabilidade enzimática frente ao pH

A estabilidade do complexo pectinolítico produzido frente ao pH foi avaliada a 30°C e a partir de extrato enzimático com atividade de pectinases previamente determinada. Foram, então, realizadas

diluições em solução tampão de McIlvaine, preparadas em valores de pH de 2,0, 3,0, 4,0 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. O valor de pH da solução tampão é atingido pela variação das proporções, em volume, de fosfato dissódico 0,2mol/L e ácido cítrico 0,1mol/L, utilizadas na preparação (Assumpção & Morita, 1968).

As amostras diluídas nos tampões especificados foram mantidas em estufa a 30°C, sendo retiradas alíquotas após 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas. Posteriormente, a atividade enzimática de pectinases foi estimada conforme descrito no item 3.6.6.

3.5.4 Avaliação do oxigênio dissolvido sobre o cultivo

A partir da definição de um meio de cultivo limitante para o crescimento e de condições de adição do indutor que permitiram o controle do parâmetro oxigênio dissolvido durante o processo, foram conduzidos ensaios em biorreator de bancada B. Braun Biotech, modelo Biostat B. O biorreator foi programado de forma a manter-se a concentração de oxigênio dissolvido no nível desejado, em termos de porcentagem de saturação, pela variação automática da frequência dos agitadores e/ou do fluxo de ar.

No caso deste estudo, o objetivo foi permitir a máxima velocidade específica de respiração. Neste sentido, a concentração de oxigênio dissolvido deve ser mantida acima da concentração crítica, para que o oxigênio não se torne limitante. A concentração crítica de oxigênio, em água, para *A. oryzae* é de cerca de 0,02mmol/L (Bailey & Ollis, 1986; Schmidell *et al.*, 2001). Considerando que a concentração de oxigênio dissolvido em água, em altitude local, é de 0,213mmol/L, e que a presença dos nutrientes do meio de cultivo reduz este valor, a concentração crítica de oxigênio para *A. oryzae*, nas condições de estudo é de cerca de 10% da saturação. Assim, optou-se por manter-se a concentração de oxigênio dissolvido em 30% da saturação, admitindo-se que, neste valor, tinha-se a garantia de disponibilidade suficiente de O₂ para o microrganismo.

Os cultivos conduzidos para avaliar o efeito da disponibilidade ilimitada de O₂ sobre o crescimento celular e a produção de pectinases, foram os seguintes:

- B5 – oxigênio dissolvido mantido em 30% da saturação após decrescer até este valor e condições de pH do Ensaio T4 (pH inicial 4,0 mantido em 2,7 até o final do cultivo, após queda natural);
- B6 – oxigênio dissolvido mantido em 30% da saturação após decrescer até este valor e condições de pH do Ensaio T5 (pH mantido em 4,0 até 24 horas, queda forçada para 2,7);

3.6 Métodos analíticos

3.6.1 Coleta e tratamento de amostras

As amostras retiradas durante os ensaios eram divididas em duas alíquotas. Uma parte, cerca de 3mL, era centrifugada a 10.000rpm em centrífuga para tubos Eppendorf, Sigma, modelo 1-13,

Alemanha, equipada com rotor de 9cm de diâmetro, por 10 minutos, e o sobrenadante armazenado sob refrigeração para determinação de atividades enzimáticas e quantificação de açúcares redutores. A segunda parte, cerca de 5mL, era usada para a quantificação da concentração de biomassa fúngica.

3.6.2 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi realizada diretamente por gravimetria. Um volume conhecido de amostra foi submetido à filtração a vácuo em papel filtro Whatman n° 1 previamente seco em estufa a 80°C por 20 minutos. Durante o procedimento, as amostras foram exaustivamente lavadas para garantir a eliminação de componentes do meio que eventualmente estivessem aderidos à biomassa. As amostras foram então submetidas à secagem em estufa a 80°C, por 24 horas. Após resfriamento em desumidificador, a massa de células secas foi estimada por pesagem, descontando-se a massa inicial do filtro seco. A concentração celular foi determinada pela divisão da massa de células secas pelo volume da amostra.

3.6.3 Determinação de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores foram analisados pelo método do ácido 3,5-di-nitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). O procedimento para execução do ensaio consistia em diluir convenientemente as amostras em água destilada, levando-se em consideração o tempo de cultivo e, em tubo de ensaio, adicionar 0,25mL de amostra diluída a 0,75mL de solução DNS. Um branco era preparado substituindo-se o volume de amostra diluída por água destilada. Os tubos eram, então, levados a um banho a 100°C por 5 minutos, em seguida, resfriados em banho de gelo e 4mL de água destilada eram adicionados às preparações. A absorbância das preparações era medida em espectrofotômetro (PG Instruments, EUA), a 545nm. As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras eram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose entre 100 e 1000mg/L, submetidas ao mesmo procedimento.

3.6.4 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A concentração de ART foi determinada conforme método descrito por Bitmann (1974), que prevê a hidrólise ácida, adaptado para amostras isentas de sólidos em suspensão. Inicialmente, as amostras eram diluídas em água destilada, levando-se em consideração o tempo de cultivo. Em um tubo de ensaio, adicionava-se 1mL da amostra diluída e 1mL de ácido clorídrico 2,0,mol/L. Um branco era preparado substituindo-se a amostra por água destilada. Os tubos eram colocados em banho a 100°C por 10 minutos e resfriados em banho de gelo. Em seguida, eram adicionados a cada tubo, 2,5mL de hidróxido de sódio 1mol/L, para correção do pH e 0,5mL de água destilada para equalização do volume.

A quantificação de ART era feita a partir das amostras hidrolisadas, pelo método DNS descrito

no item 3.6.3 e os resultados foram expressos em grama de glicose por litro de meio de cultivo, levando-se em conta os volumes iniciais de amostra e a diluição.

3.6.5 Determinação da concentração de ácido galacturônico

A quantificação do ácido galacturônico formado foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em equipamento Shimadzu modelo LC 20 AD (Japão) utilizando detector de índice de refração, coluna Aminex HPX-87H (300mm x 7,8mm x 9µm) e como fase móvel H₂SO₄ 0,5mmol/L. As amostras eram previamente filtradas (filtro poliamida, 0,2 µm), carregadas no volume do *loop* de injeção (20µL) e sua eluição ocorria a 0,6mL/min, a 60°C. O cromatograma gerado foi quantificado através da curva de calibração obtida por solução de referência com concentração máxima de 10g/L.

3.6.6 Determinação da atividade de pectinases

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

Em trabalhos anteriores (Malvessi & Silveira, 2004; Fontana *et al.*, 2009), este método foi relacionado à quantificação da atividade de endo-PG, considerando-se um papel predominante desta enzima na redução da viscosidade da solução de pectina. Entretanto, tendo em vista que a hidrólise do polissacarídeo depende da ação do conjunto de enzimas do complexo pectinolítico, conforme apresentado no item 2.2, os resultados da análise, no presente trabalho, são referidos como pectinases totais.

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

O tampão foi preparado a partir de três soluções:

<u>Solução A:</u>	ácido acético (P.A.)	3g
	água destilada	100mL
<u>Solução B:</u>	acetato de sódio (3H ₂ O)	6,83g
	água destilada	100mL
<u>Solução C:</u>	benzoato de sódio	10g
	água destilada	100mL

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

A execução da técnica analítica inicia com a ambientação da solução de pectina e da solução da amostra, convenientemente diluída no próprio tampão, em um banho termostático ajustado a 30°C por

10 minutos. A um tubo de ensaio contendo 3,2mL da solução enzimática diluída eram adicionados 14,8mL da solução de pectina, agitando-se vigorosamente. Esta mistura era, então, mantida em banho termostático, a 30°C, por 30 minutos. Decorrido este tempo, a viscosidade da mistura era determinada em viscosímetro Brookfield modelo LDV-II+, a 60rpm. Para cada amostra, era preparado um branco da reação com solução enzimática inativada em banho a 100°C por 30 minutos, submetida ao mesmo procedimento da amostra.

Com os valores de viscosidade das preparações contendo a amostra ativa e a inativada, era calculado o percentual de redução de viscosidade (A) pela relação apresentada na equação (1):

$$A = \frac{\text{viscosidade da amostra inativada} - \text{viscosidade da amostra}}{\text{viscosidade da amostra inativada}} \cdot 100 \quad (1)$$

O percentual de redução de viscosidade era relacionado com a atividade de pectinases, utilizando-se curvas padrão construídas a partir de uma série de diluições (entre 1:1 e 1:1000) do sobrenadante de uma amostra de preparação pectinolítica do final do cultivo. Estas amostras diluídas eram analisadas quanto à redução de viscosidade e, com os valores obtidos, eram construídas curvas relacionando a redução de viscosidade (A) com o logaritmo decimal do inverso das diluições representando uma proporção da concentração de enzimas. Uma unidade (U) de pectinase foi definida como a quantidade de enzima (abscissa) que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padronizadas. Os demais valores de número de unidades de pectinases foram calculados proporcionalmente e uma nova curva, então, foi construída, relacionando a redução de viscosidade com o logaritmo decimal do número de unidades de pectinases. A partir do ajuste linear desta curva, foram obtidos os coeficientes utilizados para o cálculo das atividades enzimáticas de acordo com a equação (2) abaixo.

$$P = 10^{\frac{A-a}{b}} \cdot \frac{\text{dil}}{v} \quad (2)$$

Onde:

P – atividade enzimática de pectinases (U/mL)

A – redução de viscosidade (%)

a – coeficiente linear da curva de calibração

b – coeficiente angular da curva de calibração

dil – diluição da preparação enzimática

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

3.6.7 Determinação da atividade de proteases

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se como substrato azocaseína dissolvida em tampão fosfato de sódio 50mmol/L, pH 7,0. As reações ocorreram a 40°C por 40 minutos, sendo interrompidas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Para cada amostra enzimática preparou-se um branco, submetido ao mesmo procedimento, misturando, nesta ordem, enzima, TCA e azocaseína. Após, as amostras foram deixadas em repouso por 15 minutos, para a completa precipitação dos fragmentos maiores de azocaseína e centrifugadas a 10.000rpm por 5 minutos, sendo adicionado, em seguida, hidróxido de sódio 1mol/L. A absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro, a 440nm (Sarath *et al.*, 1989).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir, em cubeta de 10mm, a variação de uma unidade na absorbância, sob as condições do método.

3.6.8 Obtenção de imagens em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras para análise em MEV foram obtidas por centrifugação da biomassa seguida de lavagem com água destilada, repetida por quatro vezes. Uma alíquota de cada amostra de biomassa, isenta de resíduos de componentes do meio de cultivo, foi disposta sobre suporte específico para análises microscópicas (*stub*). Os *stubs* com as amostras foram acondicionados em estufa, a 60°C por 24h, para a remoção da umidade. A avaliação microscópica foi realizada em equipamento Shimadzu SSX550, com aumento de 200 vezes, após deposição de ouro por *Magnetron Sputtering Plasma* (Wasa *et al.*, 2004).

3.7 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em meio isento de células

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) foi determinado utilizando-se o método estático definido por Moo-Young & Blanch (1989), em que um eletrodo de oxigênio dissolvido é acoplado ao reator para registrar os valores de porcentagem de oxigênio na saturação.

Inicialmente, com a frequência de agitadores mantida no valor em que se desejava medir o K_{La} , introduzia-se um fluxo de nitrogênio no reator até que o eletrodo de oxigênio dissolvido acusasse um valor mínimo e constante. O sistema era, então, calibrado em 0% de oxigênio. Na sequência, ar comprimido seco era injetado no reator na vazão em que se desejava medir o K_{La} até que o sistema registrasse um valor máximo e constante; o medidor era, então, calibrado em 100% de oxigênio.

Feita a calibração, nitrogênio era novamente introduzido no reator até que 0% de oxigênio fosse medido. O sistema era aerado e com auxílio de um cronômetro, eram registrados os dados de tempo e percentual de oxigênio na saturação. A partir dos dados obtidos, o K_{La} era calculado a partir da equação (3):

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C) \quad (3)$$

Onde:

$\frac{dC}{dt}$ – 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 de tempo

Integrando a equação de C_1 a C_2 para os tempos de 0 a t , tem-se:

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

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

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 , tem-se:

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

$$K_L a = -\frac{1}{t} \cdot \ln \frac{1 - \beta}{1 - \alpha} \quad (4)$$

3.8 Determinação da velocidade específica de crescimento celular

A partir das concentrações celulares (X) medidas nas amostras durante o tempo de cultivo (t), ajustava-se uma curva sigmoide $X = f(t)$, com o auxílio do programa computacional Microcal Origin. A equação que descrevia esta curva ajustada era derivada, obtendo-se dados que descreviam as velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt) em função do tempo. Assim, pela divisão de dX/dt pela concentração celular no mesmo tempo de cultivo (equação 5), foi possível a determinação das velocidades específicas de crescimento (μ_x) ao longo dos cultivos.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Onde:

μ_x – velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

X – concentração celular (g/L)

t – tempo de cultivo (h)

3.9 Determinação dos fatores de produção e conversão e da produtividade do processo

O fator de produção específica relaciona a formação de enzimas com a concentração celular no processo.

$$Y_{P/X} = \frac{P_{\max}}{X_{\max}} \quad (6)$$

Onde:

$Y_{P/X}$ – fator de produção específica (U/mg)

P_{\max} – máxima atividade enzimática obtida no processo (U/mL)

X_{\max} – máxima concentração celular obtida no processo (g/L)

O fator de conversão de substrato em produto, por sua vez, relaciona a produção de enzimas com o consumo de substrato.

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\max}}{S_0 - S_{P,\max}} \quad (7)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em enzimas (U/mg)

P_{\max} – máxima atividade enzimática obtida no processo (U/mL)

S_0 – concentração inicial de substrato (g/L)

$S_{P,\max}$ – concentração de substrato no instante em que ocorreu P_{\max} (g/L)

O fator de conversão de substrato em célula relaciona a produção de biomassa com o consumo de substrato.

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\max}}{S_0 - S_{X,\max}} \quad (8)$$

Onde:

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

S_0 – concentração inicial de substrato (g/L)

$S_{X,\max}$ – concentração de substrato no instante em que ocorreu X_{\max} (g/L)

A produtividade volumétrica representa a concentração de produto acumulado por tempo de processo.

$$p_v = \frac{P_{\max}}{t_{P,\max}} \quad (9)$$

Onde:

p_v – produtividade volumétrica (U/mL/h)

P_{\max} – atividade enzimática máxima do processo (U/mL)

$t_{P,\max}$ – tempo de processo em que ocorreu P_{\max} (h)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Inicialmente, o processo submerso de produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT-301 é apresentado com o objetivo de descrever os principais eventos e a cinética característica.

Nos itens seguintes, são apresentados e discutidos os resultados de ensaios relacionados aos seguintes aspectos do processo:

- avaliação de diferentes formulações de meios de cultivos – incluindo variações das fontes de carbono, indutor e nitrogênio – com o fim de definir uma composição de meio limitante para o crescimento fúngico;
- definição do tempo e condições de adição do indutor, pectina cítrica, ao meio de cultivo, buscando-se minimizar a dificuldade operacional devida ao aumento da viscosidade provocado por este polissacarídeo;
- análise do processo conduzido sob valores constantes ou variáveis de pH;
- estudo do efeito da concentração de oxigênio dissolvido sobre o cultivo.

Ao final do capítulo, há uma discussão geral sobre os resultados, em que se procurou destacar os aspectos principais e os pontos críticos do processo estudado.

4.1 Apresentação de um processo submerso de obtenção de pectinases produzidas por *Aspergillus oryzae*

Tendo em vista a complexidade do processo submerso de produção de pectinases por *A. oryzae*, optou-se por descrever, inicialmente, um cultivo característico. Neste ensaio, o meio utilizado foi o WBE. Os resultados gerais do cultivo são apresentados na Tabela 2 e os perfis de crescimento celular, consumo de substrato, oxigênio dissolvido, pH e atividade de pectinases são mostrados na Figura 9.

Na Figura 10, são apresentados os aspectos de um cultivo, no momento da inoculação (Figura 10A) e após 24h (Figura 10B), no estágio mais crítico com respeito à reologia do meio reacional.

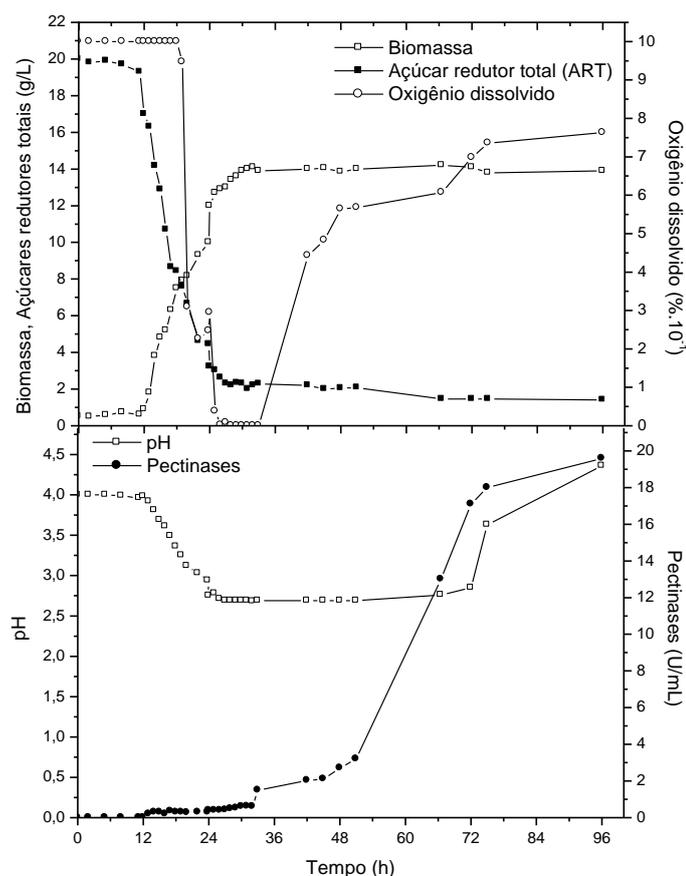
Como mostrado na Figura 9, o crescimento microbiano, nestas condições, apresenta uma fase *lag* de aproximadamente 12h. Após este período, o intenso metabolismo fúngico, evidenciado pelo aumento linear do teor de biomassa, provoca queda acentuada da concentração de oxigênio dissolvido até 24h de cultivo. A máxima concentração de biomassa (14,2g/L) foi obtida em cerca de 30h de cultivo (Tabela 2).

O aumento visível da viscosidade do meio de cultivo (Figura 10) também pode contribuir, juntamente com o aumento da biomassa, para a redução da concentração de oxigênio dissolvido a valores limitantes para o fungo. Com cerca de 32h de cultivo, observa-se uma forte desaceleração do crescimento celular e a fase estacionária é atingida em cerca de 36h de processo. Neste período, com a redução da demanda de oxigênio pelo cultivo, constata-se o aumento gradual da concentração de oxigênio dissolvido.

Tabela 2 - Resultados gerais de cultivo característico de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada.

X_{\max} (g/L)	14,2
$t_{X,\max}$ (h)	30
S_{cons} (g/L)	18,8
P_{\max} (U/mL)	20
$t_{P,\max}$ (h)	96
$Y_{P/X}$ (U/mg)	1,41
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,75
$Y_{P/S}$ (U/mg)	1,05
p_V (U/mL/h)	0,21
pH_{\min}	2,7
pH_{final}	4,3

X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; S_{cons} – consumo total de ART; P_{\max} – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\max}$ – tempo em que ocorreu P_{\max} ; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em pectinases; p_V – produtividade volumétrica; pH_{\min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo.

**Figura 9** - Variação da atividade de pectinases, do pH e das concentrações de biomassa, açúcares redutores totais e oxigênio dissolvido em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de bancada.

O consumo de açúcares redutores totais acompanhou o crescimento celular entre 12 e 24h de processo. Após, a velocidade de consumo diminuiu, chegando a concentrações constantes após 36h, possivelmente resultantes de substâncias redutoras não metabolizáveis pelo fungo.

O fator de produção específica ($Y_{p/X}$), apresentado na Tabela 2, permite verificar que 1,41 unidades de pectinases resultam de cada miligrama de biomassa formada. Este resultado é importante nas discussões deste trabalho, uma vez que se buscaram condições limitantes para o crescimento celular, mas que favorecessem a produção de enzimas, sendo que quanto maior o valor de $Y_{p/X}$ mais pectinases estão sendo formadas ou menor concentração celular está sendo obtida.

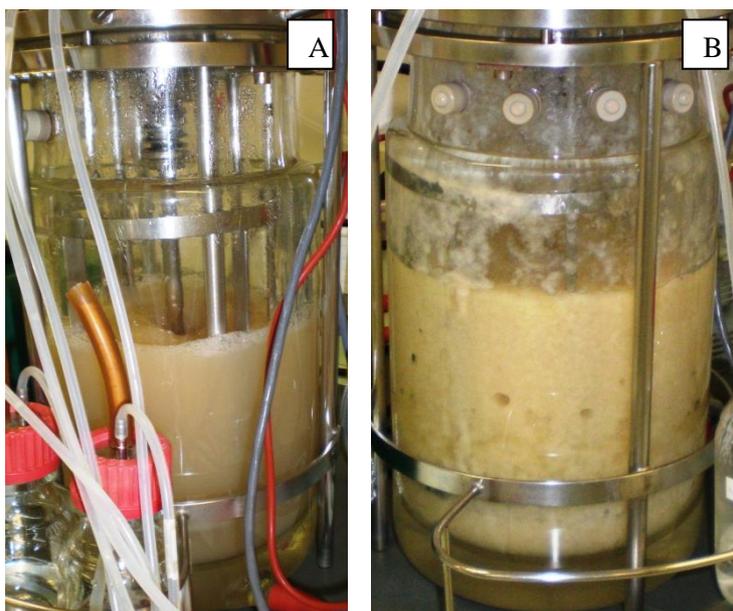


Figura 10 - Aspecto de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada: A, 0h; B, 24h de processo.

O pH inicial do meio foi de 4,0 e o perfil cinético deste parâmetro pode ser caracterizado por duas fases peculiares: queda brusca nas horas iniciais (12-24h) e aumento gradual após 72h de processo, além do período em que este parâmetro é controlado automaticamente (24-72h). Segundo Moore-Landecker (1996), o perfil de queda do pH durante a fase de intenso crescimento celular está associado à acumulação de ácidos orgânicos – especialmente glucônico, pirúvico, cítrico e succínico – formados durante o ciclo do ácido cítrico. O autor afirma, ainda, que o dióxido de carbono, subproduto do metabolismo de carboidratos, combinado com a água, em meios líquidos, forma ácido carbônico que, por sua vez, contribui para a acidificação do meio.

Por outro lado, Sternberg & Dorval (1979), em estudo sobre o fungo celulolítico *Trichoderma reesei*, sugerem que, quando a fonte de nitrogênio utilizada, seja orgânica ou inorgânica, contém o íon amônio (NH_4^+), este é preferencialmente consumido pelo microrganismo, havendo a liberação para o meio de compostos iônicos, como o SO_4^- , que reagem com água formando ácidos. Os autores

observaram também que, ao final da fase ácida da fermentação, o organismo libera a amônia previamente consumida, por lise celular, provocando aumento do pH do meio.

A fim de testar esta hipótese, considerando que os fungos filamentosos são capazes de metabolizar nitratos inorgânicos (Pereira *et al.*, 2003), um cultivo de *A. oryzae* foi conduzido substituindo-se a fonte de nitrogênio do meio WBE, o sulfato de amônio, por nitrato de potássio, em concentração que mantivesse a mesma quantidade de nitrogênio disponível para o microrganismo. Os valores de pH, ao longo do tempo, para as primeiras horas deste cultivo, são mostrados na Figura 11.

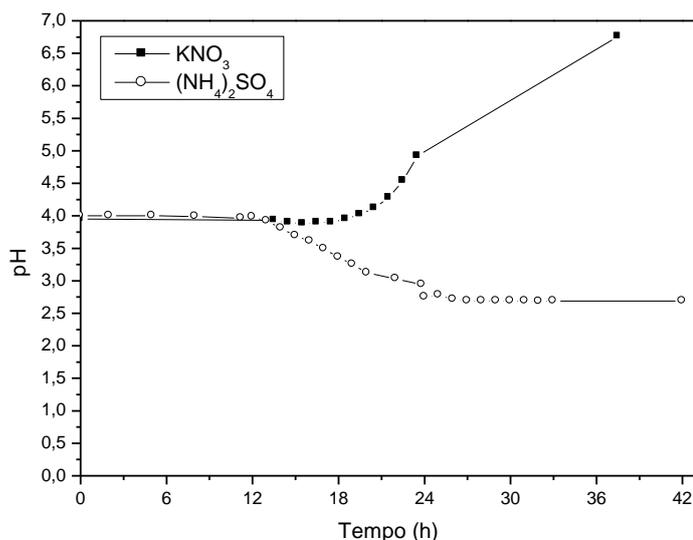


Figura 11 - Variação de pH em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator, com utilização de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico.

Verificou-se que o perfil característico de queda não ocorreu e, pelo contrário, um aumento dos valores de pH, durante a fase de intenso crescimento celular, foi constatado. Dillon *et al.* (1999) observaram comportamento similar no cultivo de *Penicillium echinulatum* para a produção de celulases. No estudo, os autores verificaram que, mesmo com altas concentrações de celulose, não houve queda de pH para valores abaixo de 5,0 em cultivo sem controle deste parâmetro.

Ainda, de acordo com Moore-Landecker (1996), a utilização de nitratos inorgânicos faz com que o meio se torne alcalino conforme o íon nitrato é removido pelo consumo fúngico e, ao passo que o uso de sais de amônio provocam a acidificação do meio durante o crescimento celular, a liberação de amônia pela desaminação de aminoácidos e proteínas pode causar o aumento do pH, quando o microrganismo se encontra em fase estacionária. Além disso, a liberação de íons hidróxido resultantes da reação de desnitrificação, necessária para o metabolismo de nitratos por fungos, também contribui para a elevação do pH.

O comportamento do pH durante o cultivo tem forte influência sobre a produção de pectinases por *A. oryzae*. Conforme Malvessi & Silveira (2004) e Fontana & Silveira (2009) demonstraram, a exposição do microrganismo a valores de pH menores que 2,7 desacelera o metabolismo fúngico e

reduz os títulos enzimáticos. No entanto, os autores afirmam que esta queda é necessária para a liberação das pectinases. De fato, como observado na Figura 9, a atividade enzimática só é observada após a diminuição do pH, em cerca de 30h de cultivo, com forte aumento da velocidade de formação de pectinases entre 54h e 72h de processo. Após este período, a velocidade se reduz, até o encerramento do processo em 96h.

Os processos com perfis cinéticos de crescimento e produção não associados são caracterizados, segundo Gaden (1959), por duas fases distintas, a primeira com alto crescimento microbiano e pouca ou nenhuma formação de produto e, a segunda, em que a formação de produto é maximizada, como é o caso do processo submerso de produção de pectinases por *A. oryzae*.

Alguns dos ensaios deste trabalho foram realizados em frascos sob agitação. Estes cultivos são úteis para obtenção de dados comparativos, mas se caracterizam pelas condições dificultadas de fornecimento de oxigênio ao cultivo e de mistura. De um modo geral, a concentração de biomassa fúngica e a atividade de pectinases alcançadas são menores que as observadas em cultivos em biorreator. Com respeito ao pH, nas primeiras horas de cultivo, o perfil de queda característico é verificado; entretanto, por não haver controle automático do parâmetro, o pH atinge mínimos em torno de 2,0, permanecendo neste patamar. Este comportamento do pH também é um fator limitante para o crescimento celular de fungos, especialmente em valores extremos, tanto ácidos quanto básicos (Moore-Landecker, 1996). Portanto, nos demais itens, a discussão dos resultados sempre levará em conta as características de cada processo e explicitará a forma como foram conduzidos.

Para efeito de comparação entre os cultivos em frascos sob agitação e em biorreator de bancada, amostras obtidas em 24h de ambos os processos foram submetidas à avaliação em microscópio eletrônico de varredura (MEV), com aumento de 200 vezes (Figura 12).

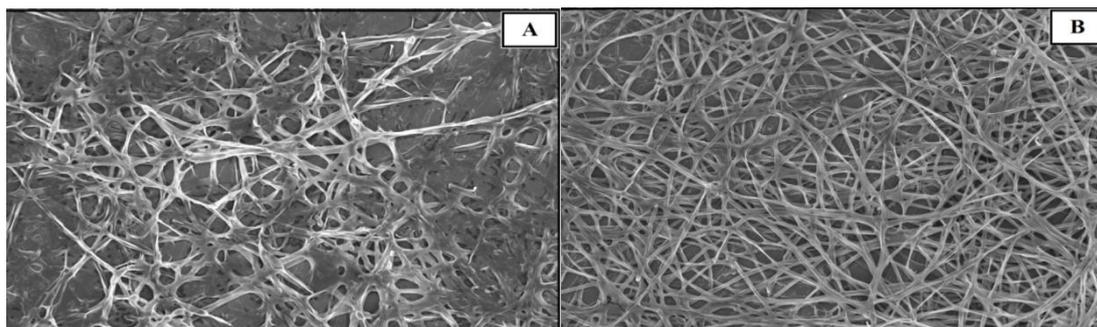


Figura 12 - Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura de amostras de 24h de cultivo de *Aspergillus oryzae* IPT-301: A, frascos sob agitação, B, biorreator de bancada.

Pela análise das imagens, é possível observar que, em ensaios em biorreator de bancada, o crescimento celular parece ter ocorrido de forma mais homogênea, com as hifas mais compactadas, possivelmente, pelas condições facilitadas e constantes de mistura e transferências de calor e massa, que reduzem o diâmetro dos *pellets* formados.

4.2 Formulação de meio de cultivo para a produção de pectinases

A produção de pectinases por *A. oryzae* sofre influência direta da composição do meio de cultivo, com seus constituintes podendo provocar efeitos de indução, inibição ou repressão da produção enzimática (Blandino *et al.*, 2001).

Os meios de cultivo normalmente empregados em produção de pectinases devem ser compostos por carboidratos, fonte de nitrogênio, vitaminas, sais minerais e indutor enzimático, que pode ser pectina ou matéria orgânica rica em pectina (Rombouts & Pilnik, 1980). O meio WBE foi otimizado por Fontana *et al.* (2009), usando planejamento fatorial, com o objetivo de alcançar altos títulos enzimáticos de poligalacturonases de *A. oryzae*. Os autores observaram que, além da presença de extrato de farelo de trigo e glicose no meio de cultivo, as alterações reológicas provocadas pela própria biomassa fúngica afetaram fortemente a transferência de oxigênio.

Neste sentido, o objetivo deste estudo de formulação foi a obtenção de um meio de cultivo solúvel, limitante para o crescimento celular fúngico e que permitisse a produção de pectinases em níveis elevados, a fim de que as condições de transferência e mistura pudessem ser facilitadas, possibilitando o controle efetivo dos demais parâmetros de processo. Ressalte-se, no caso, que o controle da concentração de oxigênio dissolvido em biorreatores de agitação mecânica é feita prioritariamente pela variação da frequência dos agitadores, o que pode ser prejudicial à estrutura do micélio do fungo, como já foi mencionado neste trabalho. Assim, condições facilitadas de transferência e mistura permitiriam a avaliação real do efeito de alterações de pH e oxigênio dissolvido sobre o cultivo, com a menor influência possível da reologia do meio.

Os ensaios para definição de meio foram divididos em três momentos: primeiramente, em frascos sob agitação, avaliaram-se as concentrações de farelo de trigo, glicose e sulfato de amônio, com base no meio WBE (Fontana *et al.*, 2009). A partir da melhor condição definida em frascos, foram realizados novos ensaios em biorreator, alterando-se a concentração de glicose. Por fim, foram avaliadas diferentes concentrações de indutor – pectina cítrica – em frascos e em biorreator.

4.2.1 Avaliação de diferentes concentrações de farelo de trigo, glicose e sulfato de amônio

Os ensaios iniciais para avaliação das concentrações de farelo de trigo – na preparação do extrato aquoso –, glicose e sulfato de amônio foram realizados em frascos sob agitação, por 96h. Na Tabela 3 são apresentados os resultados gerais destes ensaios.

Verificou-se que a máxima concentração celular atingiu níveis próximos, em torno da faixa de 8,0 a 9,0g/L, para quase todas as formulações testadas, mesmo naquelas em que os nutrientes em estudo se encontravam em menores concentrações. Entretanto, com o meio F80-G10-N5, que entre os testados era o que mais se aproximava da composição original do WBE, o X_{max} alcançado foi o mais baixo. Possivelmente, as condições dificultadas de transferência de oxigênio para o microrganismo, inerentes a cultivos em frascos sob agitação, tenham tornado o oxigênio o nutriente limitante para o crescimento celular e, no caso do meio F80-G10-N5, esta situação tenha sido mais pronunciada, uma

vez que a concentração de açúcar redutor total, ao final do cultivo, foi maior em relação às demais formulações testadas. O pH é outro parâmetro que pode ter dificultado o crescimento celular, já que, em todas as formulações, especialmente naquelas em presença de glicose, os valores finais ficaram abaixo de 2,7 e, conforme já relatado por Moore-Landecker (1996), o pH pode ser um fator limitante para o crescimento celular de fungos, especialmente em valores extremos.

Tabela 3 - Resultados gerais do cultivo de *Aspergillus oryzae* em frascos sob agitação a 300rpm, 28°C e 96h, para avaliação das concentrações de farelo de trigo (F), glicose (G) e sulfato de amônio (N).

Meio	X _{max} (g/L)	P _{max} (U/mL)	pH _{final}	Y _{P/X} (U/mg)	S _{final} (g/L)
F20-G0-N3	7,70	5,00	2,42	0,65	1,90
F20-G10-N3	7,90	3,20	2,16	0,40	1,55
F20-G0-N5	9,20	6,20	2,49	0,67	2,45
F20-G10-N5	8,50	4,20	2,20	0,50	1,75
F40-G0-N3	8,90	6,50	2,43	0,73	1,80
F40-G10-N3	8,10	4,70	2,23	0,58	2,30
F40-G0-N5	8,00	12,60	2,53	1,57	1,40
F40-G10-N5	8,50	3,90	2,36	0,46	2,45
F60-G0-N3	8,50	12,90	2,49	1,52	0,90
F60-G10-N3	7,90	6,70	2,26	0,85	2,35
F60-G0-N5	8,40	12,90	2,59	1,54	0,80
F60-G10-N5	8,00	6,20	2,36	0,78	2,35
F80-G0-N3	9,00	13,50	2,49	1,50	0,91
F80-G10-N3	9,10	6,30	2,36	0,69	2,05
F80-G0-N5	8,10	12,30	2,61	1,53	0,75
F80-G10-N5	6,70	5,50	2,21	0,82	3,80

X_{max} – máxima concentração de biomassa; P_{max} – máxima atividade de pectinases; pH_{final} – pH ao final do cultivo; Y_{P/X} – fator de produção específica; S_{final} – ART no tempo final de cultivo.

Quanto à produção de pectinases, observou-se que a presença de glicose no meio de cultivo não favoreceu a produção específica (Y_{P/X}) destas enzimas. Maldonado & Strasser de Saad (1998) relataram efeito positivo na produção de pectinases quando a pectina é utilizada como única fonte de carbono; no entanto, resultados superiores em Y_{P/X} foram obtidos com meios contendo extrato de farelo de trigo entre 40 e 80g/L, corroborando os resultados de Malvessi & Silveira (2004), em que alta atividade de pectinases foi obtida na presença de farelo de trigo no meio de cultivo.

Assim, apesar das limitações discutidas com respeito às condições de cultivo, em várias formulações testadas, foram obtidos valores de fator de produção específica (Y_{P/X}) em torno de 1,5U/mg. Dentre estas formulações, optou-se pelo meio F40-G0-N5, para o estudo seguinte deste trabalho, por conter a menor quantidade de farelo de trigo na preparação do extrato.

4.2.2 Avaliação do efeito da concentração de glicose

Apesar de ter-se verificado o efeito negativo da glicose sobre a produção de pectinases em ensaios em agitador (Tabela 3), Fontana & Silveira (2012) relataram que, em biorreator, a presença de glicose favorece o crescimento celular e, em concentrações de até 10g/L, leva à obtenção de altos títulos de pectinases. Neste sentido, foram conduzidos três ensaios em biorreator, B1, B2 e B3, com o objetivo de verificar a influência da glicose sobre o processo, com o meio de cultivo F40-G0-N5 em sua formulação original (sem glicose) e contendo 5g/L (F40-G5-N5) ou 10g/L (F40-G10-N5) do substrato. Os resultados gerais destes cultivos são apresentados na Tabela 4 e os perfis ilustrados na Figura 13.

Tabela 4 - Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com diferentes concentrações de glicose.

	B1	B2	B3
X_{max} (g/L)	6,0	6,8	7,1
t_{X,max} (h)	72	48	43
S_{cons} (g/L)	2,7	10,5	15,3
P_{max} (U/mL)	13,5	20,0	12,0
t_{P,max} (h)	96	96	72
Y_{P/X} (U/mL)	2,25	2,90	1,70
Y_{X/S} (g/g)	2,22	0,65	0,46
Y_{P/S} (U/mg)	5,00	1,85	0,80
p_V (U/mL/h)	0,14	0,20	0,17
pH_{min}	2,7	2,7	2,7
pH_{final}	4,3	4,4	2,9

X_{max} – máxima concentração de biomassa; t_{X,max} – tempo em que ocorreu X_{max}; S_{cons} – consumo total de ART; P_{max} – máxima atividade de pectinases; t_{P,max} – tempo em que ocorreu P_{max}; Y_{P/X} – fator de produção específica; Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células; Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em pectinases; p_V – produtividade volumétrica; pH_{min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo. **B1** – F40-G0-N5; **B2** – F40-G5-N5; **B3** – F40-G10-N5.

Em biorreator de bancada, em que a mistura e as transferências de calor e de massa são mais eficientes do que em frascos sob agitação, verificou-se que o crescimento de *A. oryzae* IPT-301 foi favorecido pela presença de glicose no meio. Em B2 (5g/L de glicose), obteve-se atividade enzimática (20,0U/mL) cerca de 50% maior que nas demais condições, em 96 horas de processo (Tabela 4).

O maior fator de produção específica foi obtido em B2 (Tabela 4), confirmando que, também para estes meios, a produção de enzimas não tem relação com a concentração celular, já que o título de biomassa, neste caso, foi menor que aquele obtido em B3. Já os maiores fatores de conversão de substrato em biomassa e em enzimas foram obtidos no Ensaio B1 (sem presença de glicose), justamente por conter menor concentração de açúcar.

Além disso, o perfil de pH de cada condição, após a fase de controle em mínimo de 2,7, foi diferente, mostrando que a presença de glicose tem influência sobre este parâmetro. Constatou-se que quanto maior a quantidade de glicose inicialmente adicionada ao meio de cultivo, mais tempo o pH se mantém em seu mínimo, sendo que, em presença de 10g/L do substrato (B3), o pH máximo, medido ao final do cultivo, foi 2,9, enquanto nas demais condições ficou acima de 4,0. Este comportamento corrobora os resultados de Fontana & Silveira (2012) em estudo sobre a produção de endo e exopoligalacturonases por *A. oryzae*. Os autores relataram que menores valores de pH mínimo e final foram obtidos com maiores quantidades de glicose adicionadas ao meio WBE.

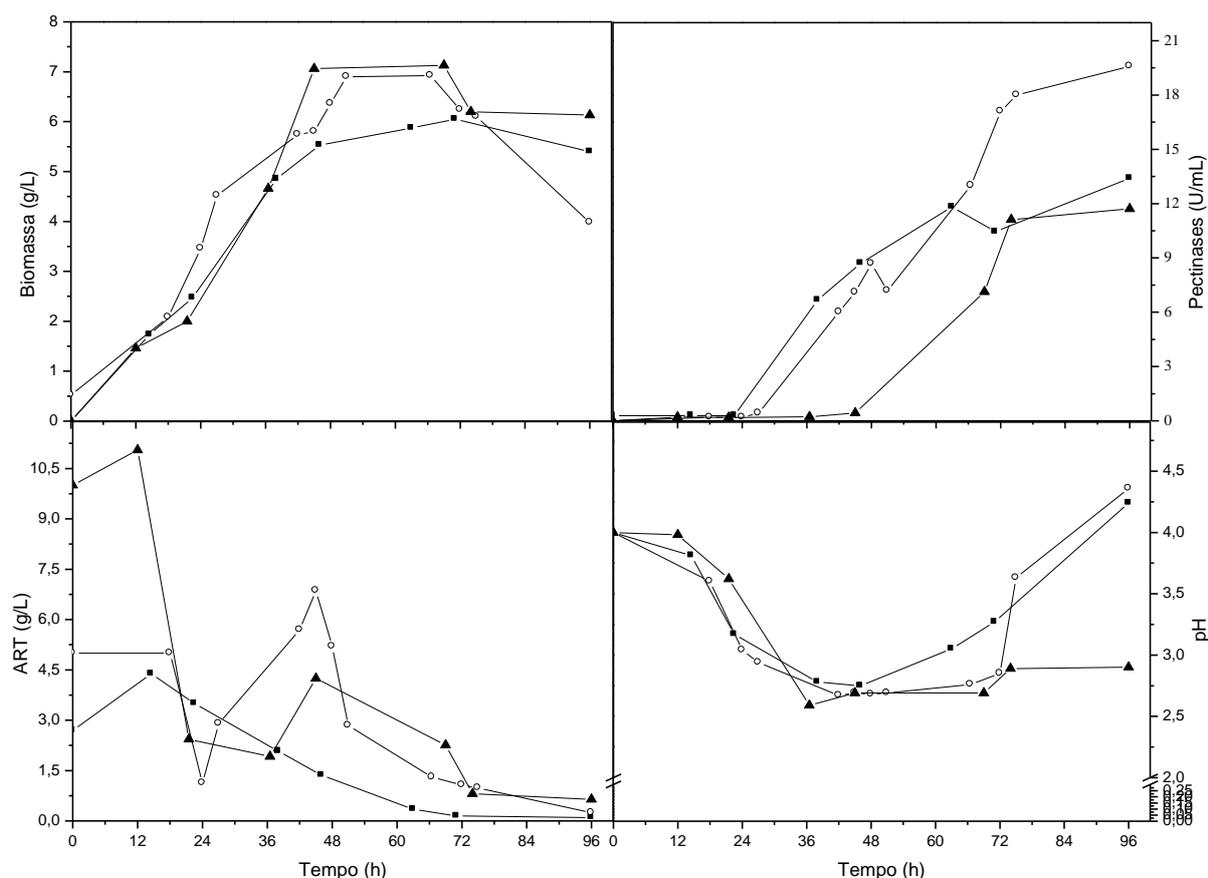


Figura 13 - Variação das concentrações de biomassa e açúcares redutores totais, da atividade de pectinases e do pH em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator, com diferentes concentrações de glicose: (■) B1, 0g/L; (○) B2, 5g/L; (▲) B3, 10g/L.

Assim, a glicose, em baixas concentrações, leva a um perfil de variação de pH favorável à formação das enzimas. A influência deste parâmetro sobre a produção de pectinases e o crescimento de *A. oryzae* é discutida, em detalhes, adiante neste trabalho.

A partir dos ensaios em biorreator, o emprego de uma concentração inicial de 5g/L de glicose ficou definido para a sequência dos estudos, nomeando-se o meio formulado como F40-G5-N5.

4.2.3 Avaliação da concentração do indutor – pectina cítrica

A partir do meio F40-G5-N5, passou-se à avaliação do indutor, pectina cítrica. Conforme já descrito no capítulo Revisão Bibliográfica, a pectina é um composto utilizado na indústria de alimentos, por sua propriedade de formar gel, na fabricação de geleias. Esta propriedade acaba aumentando consideravelmente a viscosidade do meio de cultivo e dificultando as transferências de calor e de massa e a promoção da homogeneidade da mistura.

Fontana & Silveira (2012) estudaram o efeito da concentração de indutor sobre o cultivo de *A. oryzae* utilizando o meio WBE. No entanto, a pectina, por ser extraída de frutas e vegetais, possui características únicas e inerentes a cada lote produzido, com propriedades como o grau de esterificação e a granulometria, podendo afetar a reologia do meio de cultivo de maneira diferente. Assim, a avaliação da concentração do indutor deve ser retomada a cada novo lote a ser utilizado.

Portanto, objetivando avaliar a melhor condição de trabalho, com relação à viscosidade do meio de cultivo e à atividade de pectinases, o Ensaio F1 foi conduzido com diferentes concentrações de pectina, entre 0 e 25g/L. Os resultados deste ensaio são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados gerais do cultivo de *Aspergillus oryzae* em frascos sob agitação a 300rpm, 28°C e 96h, com diferentes concentrações de pectina.

Pectina (g/L)	μ (cP)	X_{max} (g/L)	P_{max} (U/mL)	$Y_{P/X}$ (U/mg)
0	1,34	3,5	3,3	0,94
5	2,12	4,5	3,5	0,78
10	3,62	5,4	6,1	1,13
15	5,78	7,1	6,8	0,96
20	9,02	7,2	12,1	1,69
25	11,70	7,6	12,4	1,64

μ – viscosidade determinada em meios isentos de células.;
 X_{max} – máxima concentração de biomassa; P_{max} – máxima atividade de pectinases; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica

O crescimento celular foi favorecido nos cultivos com as maiores concentrações de pectina testadas – 15 a 25g/L –, demonstrando que este composto é utilizado como fonte de carbono pelo microrganismo, mesmo em presença de outras fontes.

O cultivo sem a presença de indutor revelou atividade enzimática de pectinases. Este resultado confirma que, conforme já relatado por Martín-Trujillo *et al.* (2009), em cultivo de *Aspergillus flavipes* e por Kawano *et al.* (1999), utilizando *Penicillium frequentans*, parte das enzimas do complexo pectinolítico formado é de ordem constitutiva. Os autores verificaram que exo-pectinases e pectina-liases são produzidas em níveis basais, apesar de serem estimuladas na presença do indutor. Ainda, Blandino *et al.* (2001) registraram atividade de endo-poligalacturonases em cultivo de *A. awamori* na ausência de substâncias pécticas, utilizando farelo de trigo no meio de cultivo, e atribuíram este resultado à característica constitutiva destas enzimas.

A atividade enzimática obtida em presença de 5g/L de pectina foi similar àquela de cultivo sem indutor, demonstrando que esta concentração não é suficiente para induzir a produção de pectinases.

As concentrações de pectina estudadas que proporcionaram maiores valores de atividade enzimática e produção específica foram de 20 e 25g/L (Tabela 4). No entanto, considerando a proximidade entre os resultados destas condições, a escolha da concentração de indutor a ser utilizada se deu com base na menor viscosidade do meio do cultivo (20g/L de pectina).

4.3 Avaliação do tempo e das condições de adição do indutor

A presença da pectina em meio de produção de pectinases é essencial por seu efeito indutor, conforme já discutido anteriormente. No entanto, na tentativa de facilitar o fornecimento de oxigênio para o microrganismo durante a fase de intenso crescimento celular, avaliou-se a possibilidade de adicionar o indutor ao cultivo após este período. A possibilidade de trabalhar com meio com menor viscosidade, sem prejuízo para a atividade enzimática, é fundamental para a melhoria das condições de avaliação dos parâmetros operacionais, uma vez que, conforme é possível verificar na Figura 14, há uma relação exponencial entre a viscosidade e a concentração de pectina presente no meio de cultivo.

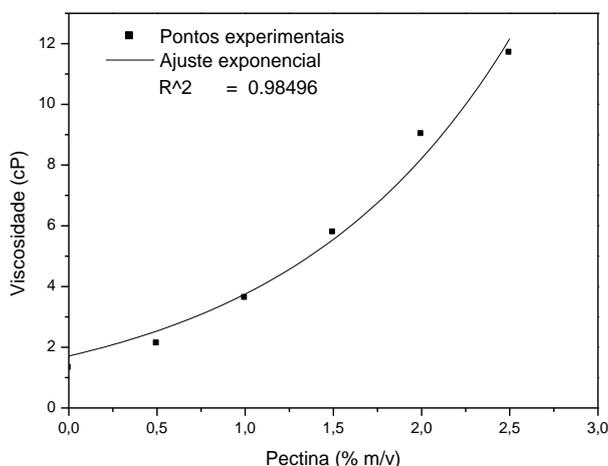


Figura 14 - Relação entre viscosidade e concentração de pectina do meio de cultivo F40-G5-N5, isento de células.

Conforme já relatado, as maiores velocidades de crescimento de *A. oryzae* ocorrem entre 12 e 24h de processo. Sendo assim, e considerando que há outras fontes de carbono disponíveis para o microrganismo, além da pectina, o Ensaio F2 foi conduzido em frascos sob agitação, para avaliar três tempos de processo para adição do indutor – 18, 24 e 28h –, em comparação com a condição controle, de adição de pectina no tempo inicial. A concentração de pectina adicionada foi de 20g/L e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados permitem verificar que, quando o indutor foi adicionado em 24 e em 28h de

processo, tanto o crescimento celular quanto a atividade pectinolítica resultantes foram semelhantes; no entanto, na condição de adição de pectina em 18h, houve redução de cerca de 40% de atividade enzimática em relação ao cultivo em presença do indutor desde o tempo inicial. Em 18h de cultivo, o pH do meio encontrava-se em 3,4 e a concentração de biomassa era de 5,3g/L. Após a adição do indutor, neste caso, não houve mais crescimento celular. A atividade de pectinases pode ter sido prejudicada tanto pela menor população microbiana quanto pelo alto valor de pH em relação às demais condições, desfavorável à produção enzimática no momento da adição do indutor.

Tabela 6 - Resultados de cultivo de *Aspergillus oryzae* em frascos sob agitação com adição de pectina em diferentes tempos.

	Tempo de adição do indutor (h)			
	0	18	24	28
X_{\max} (g/L)	7,2	5,3	7,0	6,8
pH_{add}	2,2	3,4	2,3	2,2
P_{\max} (U/mL)	12,1	7,3	12,6	11,8
$Y_{p/X}$ (U/mg)	1,69	1,37	1,80	1,73

X_{\max} – máxima concentração de biomassa; pH_{add} – valor do pH no momento da adição do indutor; P_{\max} – máxima atividade de pectinases; $Y_{p/X}$ – fator de produção específica

Em frascos sob agitação, a redução da viscosidade inicial do cultivo, pela ausência de pectina, não teve efeito sobre o crescimento celular, possivelmente porque, como já discutido anteriormente, as condições de transferência de oxigênio são dificultadas mesmo em meios aquosos e pouco viscosos, nesta condição. Por outro lado, a possibilidade de realizar-se a adição do indutor após a fase de intenso crescimento celular, sem perda de atividade enzimática, quando levada a cultivos em biorreator, facilitaria o controle de oxigênio dissolvido para o microrganismo, reduzindo as altas frequências de agitação e fluxos de aeração normalmente empregados. Fontana & Silveira (2012a), ao reduzirem a concentração de pectina do meio WBE, puderam diminuir as frequências de agitadores e vazões de ar necessárias para controlar a concentração de oxigênio no meio de cultivo de *A. oryzae*.

Neste sentido, ainda em etapa preliminar ao processo em biorreator, a concentração de pectina foi novamente estudada, agora com sua adição em 24h de cultivo (Ensaio F3). Os resultados gerais deste ensaio estão apresentados na Tabela 7 e os perfis cinéticos de crescimento celular e atividade de pectinases, na Figura 15. Nesta condição, com adição tardia do indutor, os cultivos foram levados até 191h, a fim de verificar se o pico de atividade poderia ocorrer também, tardiamente.

Apesar de o consumo de substrato ter sido similar em todas as condições avaliadas (Tabela 7), maiores concentrações de biomassa fúngica e atividade de pectinases continuaram sendo obtidos quando 20g/L de pectina foram adicionados ao cultivo em 24h de processo. Fontana & Silveira (2012a) observaram, de forma análoga, que as atividades enzimáticas de endo e exo-

poligalacturonases de *A. oryzae* aumentam de acordo com a concentração de indutor presente no meio.

Tabela 7 – Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae*, em frascos sob agitação a 300rpm, 28°C e 191h, com diferentes concentrações de pectina adicionada em 24h de processo.

	Pectina adicionada em 24h (g/L)			
	5	10	15	20
X_{\max} (g/L)	6,0	7,0	8,0	8,2
$t_{X,\max}$ (h)	120	120	120	120
S_{cons} (g/L)	12,6	12,5	12,5	12,5
P_{\max} (U/mL)	9,5	12,5	13,5	20,0
$t_{P,\max}$ (h)	166	166	166	166
$Y_{P/X}$ (U/mg)	1,58	1,79	1,69	2,43
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,48	0,56	0,64	0,64
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,75	1,00	1,08	1,60
p_V (U/mL/h)	0,06	0,07	0,08	0,12
pH_{\min}	2,02	2,05	1,84	2,06
pH_{final}	3,02	2,64	2,60	2,74

X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; S_{cons} – consumo total de ART; P_{\max} – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\max}$ – tempo em que ocorreu P_{\max} ; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em pectinases; p_V – produtividade volumétrica; pH_{\min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo.

Considerando que o método utilizado neste trabalho para determinação da concentração de substrato, neste caso ART, não sofre influência da pectina do meio, pode-se sugerir que a maior biomassa obtida com 20g/L de indutor esteja relacionada ao consumo da pectina como fonte de carbono adicional, uma vez que o consumo de substrato medido foi o mesmo em todas as condições (Tabela 7).

A observação do perfil de atividade enzimática (Figura 15) indica que o cultivo nestas condições deve ser conduzido além de 96h, uma vez que o pico de atividade enzimática ocorreu em torno de 167h de cultivo, com 20g/L de pectina. Para verificar se este atraso está associado à adaptação do microrganismo à presença de pectina, porém mantendo-se a redução de viscosidade inicial do cultivo, foi conduzido o Ensaio F4, ainda em frascos sob agitação, em que a pectina teve sua concentração de 20g/L adicionada 50% no tempo inicial e 50% em 24h de processo. Os máximos valores obtidos neste ensaio, em comparação com a adição total da pectina em 24h (ensaio controle), estão apresentados na Tabela 8.

Os resultados indicam que a presença de parte da pectina no início do cultivo não afeta os tempos dos picos de concentração de biomassa e de atividade enzimática, porém esta condição tornou-se desfavorável para o cultivo, já que os máximos valores obtidos foram menores.

Possivelmente, mesmo uma quantidade reduzida de pectina presente no início do cultivo afeta a transferência de oxigênio para o microrganismo durante a fase de intenso crescimento, indicando que os resultados obtidos não estão relacionados à adaptação do fungo ao meio com indutor.

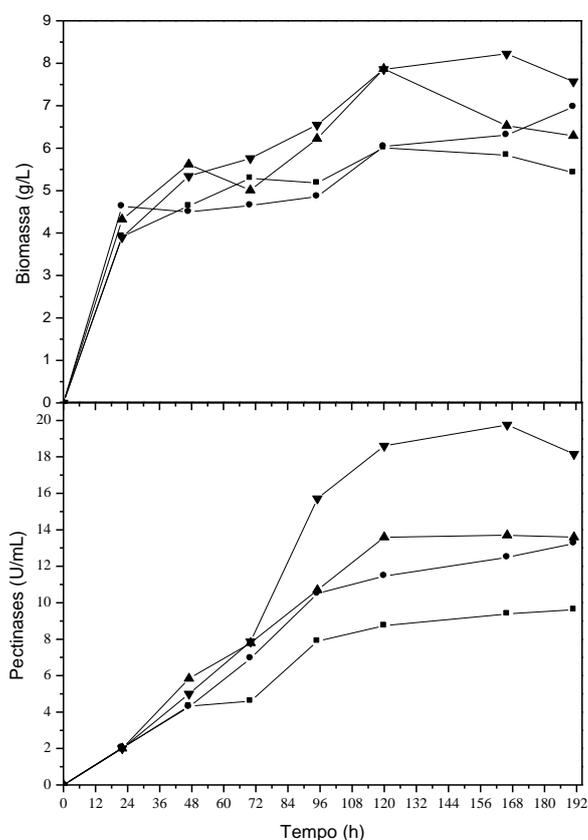


Figura 15 - Variação da concentração de biomassa e da atividade de pectinases em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em frascos sob agitação, com diferentes concentrações de pectina adicionada em 24h de processo: (■) 5g/L; (●) 10g/L; (▲) 15g/L e (▼) 20g/L.

Tabela 8 - Resultados de cultivo de *Aspergillus oryzae* em ensaio em frascos sob agitação com diferentes condições de adição de 20g/L pectina.

	F4	F3 (controle)
X_{\max} (g/L)	5,6	8,2
$t_{X,\max}$ (h)	120	120
P_{\max} (U/mL)	11,0	20,0
$t_{P,\max}$ (h)	166	166
$Y_{P/X}$ (U/mg)	1,96	2,43

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

F4 – adição de 50% da pectina em 0h e 50% em 24h; **F3** – adição de 20g/L de pectina em 24h;

Com base nos resultados atingidos nos cultivos em frascos sob agitação, a condição definida para avaliação em biorreator (Ensaio B4) foi aquela em que toda a pectina foi adicionada ao cultivo às 24h de processo. Na Tabela 9 e na Figura 16, são apresentados estes resultados, em comparação com o cultivo em que a pectina, na mesma concentração, foi adicionada no tempo inicial (ensaio controle).

Tabela 9 - Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com adição do indutor em diferentes tempos de processo.

	B4	B2 (controle)
X_{max} (g/L)	8,1	6,8
t_{X,max} (h)	70	48
S_{cons} (g/L)	11,5	10,7
P_{max} (U/mL)	23,0	27,0
t_{P,max} (h)	110	96
Y_{P/X} (U/mg)	2,84	3,97
Y_{X/S} (g/g)	0,70	0,63
Y_{P/S} (U/mg)	2,00	2,52
p_v (U/mL/h)	0,21	0,28
pH_{min}	2,7	2,7
pH_{final}	6,9	7,2
K_La (h⁻¹)	19,0	8,0
O_{2,min} (%)	20	0
Δt_{O2,min} (h)	3	20

X_{max} – máxima concentração de biomassa; t_{X,max} – tempo em que ocorreu X_{max}; S_{cons} – consumo total de ART; P_{max} – máxima atividade de pectinases; t_{P,max} – tempo em que ocorreu P_{max}; Y_{P/X} – fator de produção específica; Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células; Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em pectinases; p_v – produtividade volumétrica; pH_{min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo; K_La – coeficiente de transferência de oxigênio medido em meio isento de células, O_{2,min} – mínima concentração de oxigênio observada/mantida no processo, Δt_{O2,min} – intervalo de tempo em que foi observado/mantido O_{2,min}.

B4 – adição de pectina em 24h; **B2** – adição de pectina em 0h.

Como esperado, a concentração de biomassa foi favorecida quando o indutor foi adicionado ao cultivo após a fase de intenso crescimento celular. O teor de biomassa, neste caso, foi superior e o fungo continuou crescendo após a adição da pectina, atingindo seu máximo (8,1g/L) em cerca de 70h de processo, ou seja, quase 24h depois do pico de crescimento do ensaio controle (6,8g/L).

A atividade enzimática, apesar de não ter sido favorecida no Ensaio B4, atingiu valor similar, porém com pico 24h depois, o que levou à redução da produtividade volumétrica. Também, a produção específica do Ensaio B4 foi menor, uma vez que a maior concentração de biomassa não resultou em maior atividade enzimática (Tabela 9). Este resultado reforça a constatação de que a

produção de pectinases não é totalmente dependente da concentração celular.

Com relação ao consumo de substrato, em ambos os cultivos em estudo, um perfil de queda até 30h de cultivo foi verificado. No entanto, neste tempo de processo, no Ensaio B4, o valor de ART foi cerca de 80% menor, provavelmente em decorrência da maior disponibilidade de oxigênio para o microrganismo, que teria levado ao aumento das velocidades de crescimento celular e de consumo de substrato. O maior consumo, em B4, levou à redução do fator de conversão de substrato em enzimas ($Y_{P/S}$), porém a alta concentração de biomassa obtida proporcionou maior valor de fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) (Tabela 9).

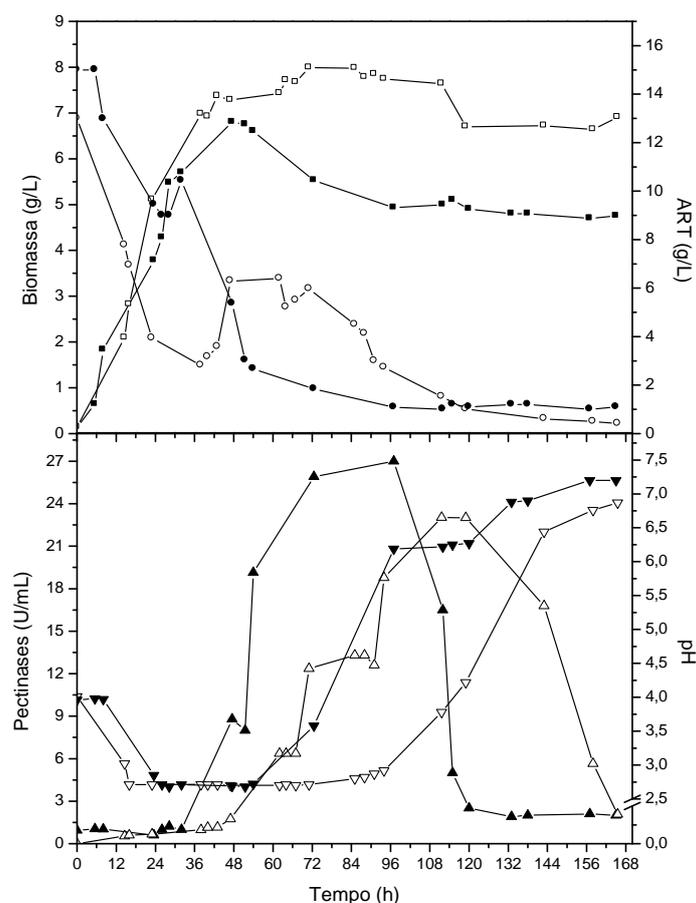


Figura 16 - Variação das concentrações de biomassa e ART, da atividade de pectinases e do pH, em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com adição do indutor em 24h de processo (B4). Símbolos abertos referem-se ao Ensaio B4 e símbolos fechados ao B2 (controle): (■, □) biomassa; (●, ○) ART; (▲, Δ) pectinase; (▼, ▽) pH.

Nas duas condições testadas, o perfil de ART apresentou um aumento súbito, em aproximadamente 30h, para o ensaio controle, e em 48h para o Ensaio B4. Verifica-se, no segundo ensaio, que o aparecimento da atividade enzimática ocorre em tempo próximo ao pico de ART. Possivelmente, a escassez de nutrientes mais acessíveis obriga o microrganismo a liberar as enzimas necessárias para hidrólise da pectina em espécies redutoras passíveis de assimilação.

O perfil de atividade enzimática, nas duas condições estudadas, apresenta queda acentuada logo após o pico. Este comportamento pode ser explicado pelo aumento do pH a valores maiores do que 6,0 e, nestas condições, a estabilidade do complexo enzimático formado poderia ser afetada (Ueda *et al.*, 1982; Galiotou-Panayotou *et al.*, 1997; Mohsen *et al.*, 2009). Outra hipótese seria o favorecimento da ação de proteases alcalinas sobre as pectinases formadas, em decorrência do aumento do pH, conforme sugerido por Malvessi & Silveira (2004).

As principais vantagens da condução de cultivo sem a presença de pectina são a capacidade de manutenção da homogeneidade do sistema, a facilidade de transferência de calor e de massa e a possibilidade de controle efetivo de parâmetros de processo. A diferença entre os cultivos, com e sem pectina, pode ser visualmente detectada, conforme mostrado na Figura 17.

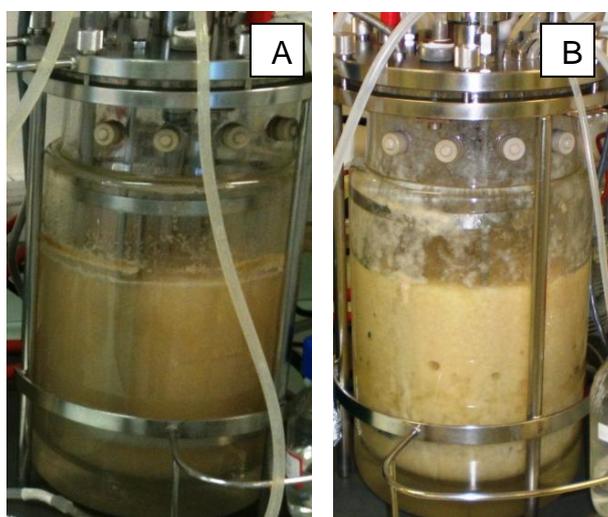


Figura 17 - Aspecto de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada, em 24h de processo: A, sem pectina; B, com 20g/L de pectina.

Além do aspecto visual, o aumento na transferência de oxigênio foi verificado pelos valores de oxigênio dissolvido medidos ao longo do tempo. Estes valores, apresentados na Figura 18, permaneceram zerados durante cerca de 20h quando em presença de pectina desde o início. Já no Ensaio B4, o valor mínimo de porcentagem de saturação ficou em torno de 20%, detectado na fase crítica de crescimento celular. Também, foram determinados os valores dos coeficientes de transferência de oxigênio ($K_L a$), em ambos os ensaios, antes da inoculação. No ensaio controle, foi obtido o valor de $7,8h^{-1}$ e, em B4, $18,9h^{-1}$, indicando claro aumento na capacidade de transferência de oxigênio da fase gasosa para o meio líquido. Segundo Posser & Tough (1991), em meios com micélios dispersos, a limitação de oxigênio exige o aumento da taxa de agitação que, devido às características reológicas, leva ao incremento da viscosidade aparente e conseqüente redução dos transportes de nutrientes, oxigênio e calor, elevando o custo e prejudicando a eficiência da mistura. Considerando este incremento na taxa de transferência de oxigênio, as taxas de agitação e aeração

empregadas puderam ser diminuídas (Figura 18). Esta redução é importante, especialmente vislumbrando-se um aumento de escala para este processo, onde altas frequências de agitadores inviabilizam a operacionalidade do sistema. O fato de a taxa de agitação não ser levada aos limites de operação do biorreator indica a possibilidade do controle de oxigênio dissolvido no cultivo.

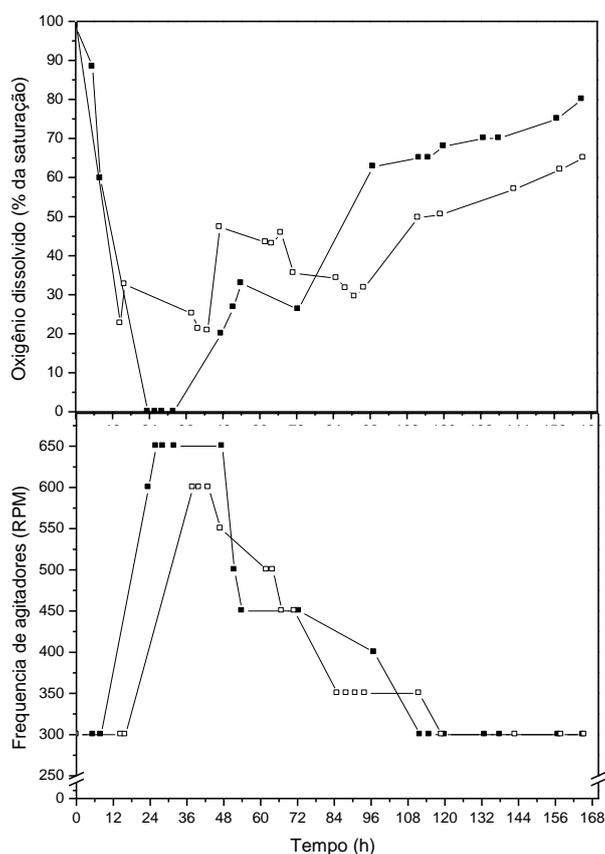


Figura 18 - Variação da concentração de oxigênio dissolvido e da frequência de agitadores empregada em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com adição de pectina em diferentes tempos: (■) 0h – B2 (□) 24h – B4.

4.4 Avaliação do pH

O efeito do pH sobre cultivos fúngicos para obtenção de pectinases foi estudado por diversos autores (Ueda *et al.*, 1982; Galiotou-Panayotou *et al.*, 1997, Bueno *et al.*, 2002; Fawole & Odunfa, 2003; Naidu & Panda, 2003; Malvessi & Silveira, 2004; Patil & Dayanand, 2006; Fontana *et al.*, 2009; Martinez-Trujillo *et al.*, 2009; Mohsen *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Fontana & Silveira, 2012a). Conforme já relatado no capítulo Revisão Bibliográfica, este parâmetro influencia fortemente e de forma diferente o crescimento celular e a produção enzimática.

Neste trabalho, a avaliação do pH inicial do meio sobre a produção de pectinases por *A. oryzae* foi realizada, preliminarmente, em frascos sob agitação. Na sequência, foram realizados ensaios em biorreator, utilizando-se diferentes estratégias para o controle do pH durante o cultivo.

4.4.1 Avaliação do pH inicial em cultivo em frascos sob agitação

Os ensaios para avaliação do pH sobre o cultivo foram realizados preliminarmente em frascos sob agitação, com o objetivo de estudar o efeito do pH inicial. Na tentativa de proporcionar uma concentração adequada de oxigênio para o microrganismo durante a fase de crescimento celular, a pectina foi adicionada ao meio após 24h de cultivo. O Ensaio F5 foi conduzido com valores iniciais de pH entre 2,0 e 6,0 e os resultados gerais estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados de cultivo de *Aspergillus oryzae* em frascos sob agitação a 300rpm e 28°C, com diferentes condições de pH inicial.

	pH inicial do cultivo				
	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
X_{\max} (g/L)	4,1	5,6	6,9	5,9	5,6
$t_{X,\max}$ (h)	72	120	96	48	48
P_{\max} (U/mL)	3,0	9,4	9,1	10,7	7,3
$t_{P,\max}$ (h)	120	120	120	120	120
pH _{min}	1,76	2,34	2,42	2,45	2,03
$t_{pH,\min}$	72	16	16	16	16
pH _{final}	2,07	2,39	2,48	2,45	2,03
S_{cons} (g/L)	10,7	11,5	10,6	10,4	10,7
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,72	1,66	1,29	1,81	1,29
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,89	0,88	1,04	0,69	0,65
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,50	1,47	1,37	1,49	0,83
p_v (U/mL/h)	0,025	0,078	0,076	0,089	0,061

X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; P_{\max} – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\max}$ – tempo em que ocorreu P_{\max} ; S_{cons} – consumo total de ART; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em pectinases; p_v – produtividade volumétrica.

Verificou-se que *A. oryzae*, assim como os demais fungos do gênero, são capazes de crescer numa faixa ampla de pH (Moore-Landecker, 1996), corroborando os estudos de Bueno *et al.* (2005), que avaliaram valores de pH inicial numa faixa de 2,5 a 6,5, relatando que os fungos identificados no estudo como do gênero *Aspergillus* cresceram em todas as condições.

No entanto, no ensaio com valor inicial de pH 4,0, foi determinada a maior concentração em biomassa, atingindo 6,9g/L em 96h de cultivo, o que corrobora as observações de Malvessi *et al.* (2004), de que o crescimento de *A. oryzae* é favorecido em pH em torno de 4,0. Akbar *et al.* (2012), avaliando o crescimento celular de *Aspergillus tamaris* e *Aspergillus carbonarius* e Baracat *et al.* (1991), em cultivo de *A. fumigatus*, relatam que o valor de pH inicial 4,0 favorece o crescimento destes fungos.

Na condição de pH inicial igual a 3,0, o crescimento celular máximo obtido foi semelhante aos dos ensaios conduzidos com pH de 5,0 e 6,0; no entanto, em pH inicial 3,0, o pico (5,6g/L) foi alcançado apenas em 120h de processo. Na condição de pH inicial 2,0, apesar de o pico de crescimento celular ter sido atingido em 72h, o valor máximo de biomassa obtido foi inferior a todas as outras condições testadas.

Com relação à variação do pH ao longo dos cultivos, em todos os casos, foram medidos valores inferiores a 3,0 antes de 20h de processo, com exceção da condição de pH inicial 2,0 em que o mínimo foi alcançado em 72h de processo. A partir deste ponto, não foi verificada variação expressiva do pH até o final do ensaio (191h) em nenhuma das condições avaliadas, tendo este parâmetro se estabilizado em torno dos respectivos valores mínimos alcançados. Galiotou-Panayotou *et al.* (1997), utilizando fungos do gênero *Aspergillus* para a produção de pectinases, verificaram um comportamento similar do pH durante o cultivo em frascos sob agitação, apresentando queda nas primeiras horas de cultivo para valores próximos de 2,3, mantendo-se neste valor até aproximadamente 120h de processo.

Verificou-se que, em todas as condições analisadas, o consumo de substrato (S_{cons}) foi semelhante; no entanto, os valores dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e em pectinases ($Y_{P/S}$) foram diferentes. Em condição de pH inicial 4,0, obteve-se o maior valor de $Y_{X/S}$, evidenciando que o crescimento celular foi favorecido neste ensaio. Já os maiores valores de $Y_{P/S}$ resultaram dos ensaios com pH inicial 3,0, 4,0 e 5,0. Porém, quando o indutor enzimático foi adicionado ao cultivo (em 24h), o pH de todas as condições já era menor do que 3,0. No caso, os resultados se justificam pelas maiores concentrações de biomassa, no momento da adição de indutor, nos cultivos com pH inicial 3,0, 4,0 e 5,0 (2,0, 2,5 e 2,3g/L, respectivamente) em comparação com os demais, o que teria favorecido a produção no mesmo tempo de processo.

Observou-se que houve produção de pectinases em todos os ensaios. Entretanto, com pH inicial em 2,0, a atividade enzimática atingida foi inferior a dos demais cultivos, possivelmente pelo fato de o crescimento celular ter sido prejudicado nesta condição.

A maior atividade pectinolítica foi obtida no cultivo com pH inicial 5,0 (10,7U/mL); entretanto, nas demais condições, foram alcançadas atividades enzimáticas também expressivas, o que pode ser justificado pelo fato de o pH ter permanecido em valores em torno de 2,5 por um longo período até o final dos cultivos, corroborando os relatos de Malvessi & Silveira (2004) e de Fontana & Silveira (2012), que identificaram o valor de pH de 2,7 como ideal para produção de poligalacturonases. Os cultivos que apresentaram as maiores atividades enzimáticas foram aqueles com pH inicial de 3,0, 4,0 e 5,0, atingindo valores de P_{max} superiores a 9,0U/mL. Da mesma forma, Galiotou-Panayotou *et al.* (1997) relatam maiores atividades de pectinases, em cultivos com fungos do gênero *Aspergillus*, numa faixa de pH inicial de 3,0 a 5,0.

4.4.2 Efeito do pH sobre o crescimento de *Aspergillus oryzae* e a produção de pectinases em cultivo em biorreator

O estudo do efeito do pH sobre o cultivo de *A. oryzae* IPT-301 em biorreator foi conduzido com base no Ensaio F5, em que 4,0 foi o valor inicial que proporcionou maior obtenção de biomassa, assim como, nos estudos de Malvessi & Silveira (2004) e Fontana & Silveira (2009).

Conforme discutido anteriormente, em ausência de indutor, os parâmetros de cultivo são mais facilmente controláveis e o efeito do pH pode ser estudado sem grande influência da reologia do meio. No entanto, como a presença de pectina é indispensável para obtenção de alta atividade enzimática, os ensaios para avaliação do pH em biorreator foram conduzidos, de forma comparativa, com a pectina adicionada no início (T1 a T5) e em 24h de cultivo (T6 a T10). As seguintes condições para o pH foram testadas: T1 e T6, pH mantido constante em 4,0; T2 e T7, pH mantido constante em 2,7; T3 e T8, pH inicial de 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7; T4 e T9, pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7 até o final do cultivo; T5 e T10, pH inicial 4,0 mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

Ressalte-se que, neste grupo de ensaios, não houve o controle do oxigênio dissolvido, uma vez que o objetivo foi avaliar unicamente o efeito do pH e, para isso, as condições de agitação e aeração foram mantidas constantes durante todo o processo (480rpm e 0,42vvm, respectivamente).

Os resultados gerais dos cultivos, para todas as condições de pH avaliadas são resumidos na Tabela 11. O crescimento celular e a produção de pectinases foram favorecidos nos Ensaios T5 e T10, os quais foram conduzidos nas mesmas condições com respeito ao pH. No entanto, o maior fator de produção específica ($Y_{p/x}$) foi obtido em T2, sendo que nos ensaios em que a pectina foi adicionada ao cultivo em 24h, os valores de $Y_{p/x}$ foram similares. Estes resultados indicam que, nesta condição, maiores concentrações de biomassa resultaram em altas atividades de pectinases.

Na Figura 19, são ilustrados os perfis de crescimento celular e velocidades específicas em função do tempo nos ensaios T1 a T3 (indutor adicionado em $t=0h$) e T6 a T8 (indutor adicionado em $t=24h$). Esta análise inicial foi feita considerando-se as 33 primeiras horas de cultivo, visto que, após este período, o crescimento microbiano nestes ensaios já se encontrava em fase estacionária. Ressalte-se que os Ensaios T4, T5, T9 e T10, no período 0 a 33h, tiveram condições operacionais idênticas às de T3, T1, T8 e T6, respectivamente.

Com relação aos cultivos com pectina presente no meio desde o seu início, constata-se que em T2, com pH 2,7 constante, o pico de concentração celular e, também, a máxima velocidade específica de crescimento foram os menores entre as condições testadas. Este comportamento se deveu, muito provavelmente, ao fato de o metabolismo fúngico ter sido negativamente afetado pelo baixo valor do pH do meio. Estes resultados estão de acordo com o descrito no já comentado trabalho de Malvessi & Silveira (2004), que mostraram que um pH da ordem de 3,0 favorece a produção mas não o crescimento de *A. oryzae*, que, por sua vez, ocorre com maior intensidade em pH mantido em 4,0. Entretanto, em T3, com pH inicial de 4,0, porém decrescente no decorrer do cultivo, foi obtida uma

Tabela 11 - Resultados gerais de cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada, sob diferentes condições de pH, com adição do indutor em diferentes tempos de processo.

	Adição do indutor em t=0h					Adição do indutor em t=24h				
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
X_{\max} (g/L)	3,7	3,1	4,5	4,3	5,0	4,6	3,3	3,8	3,6	6,3
$t_{X,\max}$ (h)	23	24	25	24	92	28	27	24	24	36
$\mu_{X,\max}$ (h ⁻¹)	0,18	0,14	0,20	0,20	0,18	0,16	0,15	0,16	0,16	0,18
$t_{\mu X,\max}$ (h)	18	15	15	15	18	13	15	17	17	19
S_{cons} (g/L)	12,1	9,8	10,7	10,1	10,9	11,8	10,0	10,8	10,2	10,8
P_{\max} (U/mL)	1,4	35	27	23	36	n.d.	20	24	24	43
$t_{P,\max}$ (h)	62	136	96	96	140	n.d.	153	115	72	140
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,38	11,3	6,00	5,35	7,20	n.d.	6,06	6,32	6,67	6,82
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,31	0,32	0,42	0,43	0,46	0,39	0,33	0,35	0,35	0,58
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,12	3,57	2,52	2,28	3,30	n.d.	2,00	2,22	2,35	3,98
p_v (U/mL/h)	0,02	0,26	0,28	0,24	0,26	n.d.	0,13	0,21	0,33	0,31
pH_{\min}	4,0	2,7	2,7	2,7	2,7	4,0	2,7	2,7	2,7	2,7
pH_{final}	4,0	2,7	7,5	2,7	2,7	4,0	2,7	7,2	2,7	2,7

X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; $\mu_{X,\max}$ – máxima velocidade específica de crescimento celular; $t_{\mu X,\max}$ – tempo em que ocorreu $\mu_{X,\max}$; S_{cons} – consumo total de ART; P_{\max} – máxima atividade de pectinases; $t_{P,\max}$ – tempo em que ocorreu P_{\max} ; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em pectinases; p_v – produtividade volumétrica; pH_{\min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo.
n.d. – não determinado.

Condições: T1 e T6, pH mantido constante em 4,0; T2 e T7, pH mantido constante em 2,7; T3 e T8, pH inicial de 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7; T4 e T9, pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7 até o final do cultivo; T5 e T10, pH inicial 4,0 e mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

maior concentração de biomassa em relação a T1, com pH 4,0 constante, embora os valores das máximas velocidades específicas de crescimento nestes ensaios tenham sido próximos. A observação do mais alto valor de $Y_{X/S}$ em T3, em comparação com T1 e T2, sugere que a disponibilidade de outra fonte de carbono, a pectina, em condição de pH que possibilita a produção de pectinases pode ter favorecido o crescimento celular. Assim, as pectinases teriam agido sobre a pectina presente no meio, liberando carboidratos assimiláveis pelo microrganismo e, assim, possibilitando um maior crescimento fúngico. No caso, é preciso salientar que o método de dosagem de ART adotado neste trabalho não é capaz de quantificar a pectina.

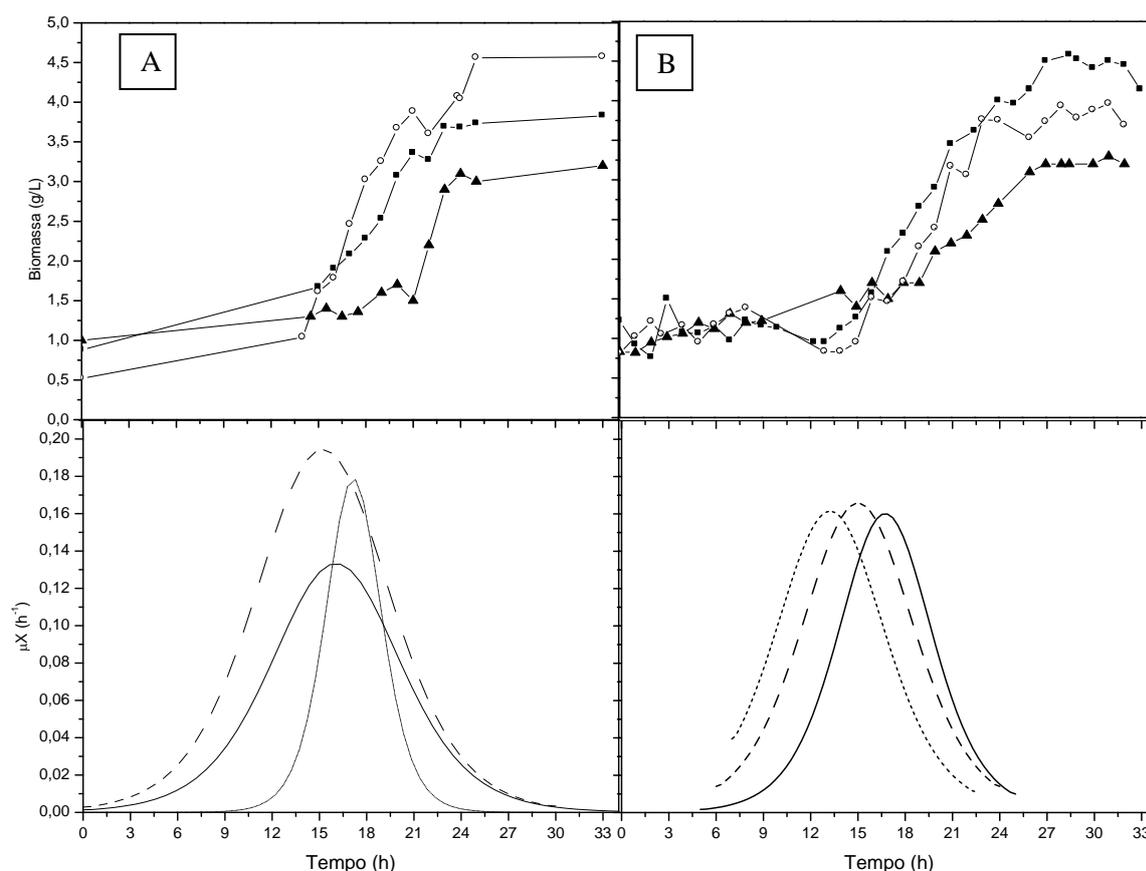


Figura 19 - Variação da concentração de biomassa e da velocidade específica de crescimento obtidos em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada em diferentes condições de pH: **A**, em presença de pectina: (■, ...) T1: pH mantido constante em 4,0; (▲, -) T2: pH mantido constante em 2,7; (○, - - -) T3, pH inicial de 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7. **B**, adição de pectina em 24h: (■, ...) T6: pH mantido constante em 4,0; (▲, -) T7: pH mantido constante em 2,7; (○, - - -) T8, pH inicial de 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7.

Nos cultivos conduzidos sem pectina até 24h, verificou-se que o controle do pH em 4,0 (Ensaio T6) favoreceu o crescimento celular, proporcionando a obtenção de maiores títulos de biomassa em relação às demais condições testadas. Os perfis de velocidade específica de crescimento (μ_X) apresentaram comportamento similar, com valores de $\mu_{X,max}$ muito próximos; porém, estes picos

foram alcançados em tempos diferentes de processo para cada condição, sugerindo que a adaptação do microrganismo a cada condição de pH ocorre de forma diferente. No Ensaio T6, o valor de $\mu_{X,max}$ foi atingido em menor tempo de cultivo (13h), em razão do favorecimento do crescimento celular neste pH. Por outro lado, no Ensaio T7, em pH 2,7 constante, o pico de μ_X ocorreu mais tarde, alcançando-se menor concentração de biomassa.

Verifica-se que o pH afeta diretamente o crescimento celular de *A. oryzae*, sendo que o efeito deste parâmetro depende da condição de adição do indutor ao cultivo. Os ensaios mantidos em pH 2,7 constante, T2 e T7, foram os que apresentaram menores concentrações de biomassa, em todos os tempos de processo.

Nos Ensaios T1 e T2, o pH foi controlado pela adição de NaOH 2mol/L. O volume deste reagente, adicionado ao longo do cultivo, foi registrado e verificou-se que há semelhança entre os perfis de crescimento celular e de adição de base, conforme mostrado na Figura 20. Esta constatação reforça as afirmações de Moore-Landecker (1996), discutidas anteriormente neste trabalho, referentes ao perfil de queda do pH durante a fase de intenso crescimento celular estar associada à acumulação de ácidos orgânicos oriundos do metabolismo fúngico. Assim, em cultivos conduzidos com o meio F40-G5-N5 e com controle de pH em valores constantes, o volume de NaOH adicionado pode ser um indicador de acúmulo de biomassa ou mesmo ser utilizado como medida indireta de crescimento celular, a partir do equacionamento da relação entre as grandezas, conforme apresentado na Figura 21.

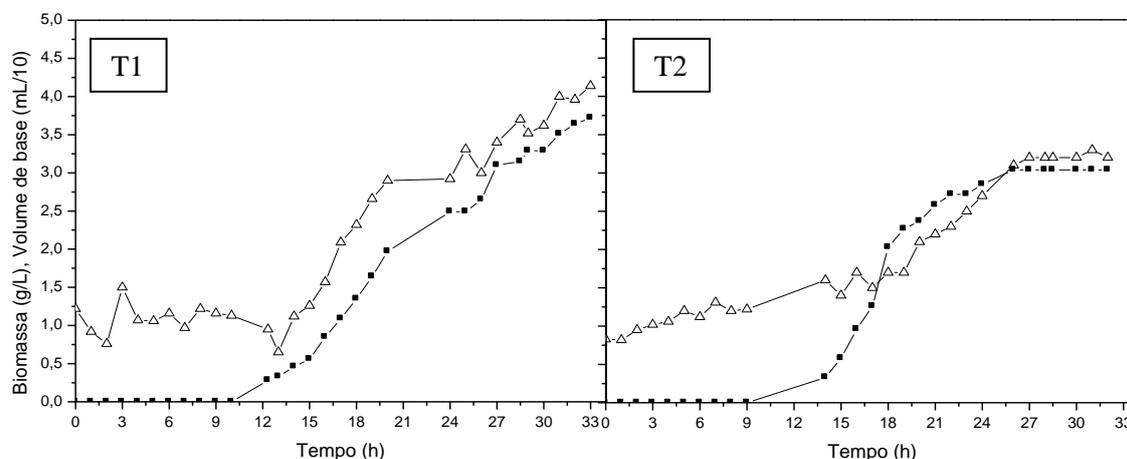


Figura 20 - Variação das concentrações de biomassa e dos volumes de NaOH adicionados em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada sob diferentes condições de pH: T1 - pH mantido constante em 4,0; T2 - pH mantido constante em 2,7: (■) volume de NaOH, (Δ) biomassa.

O estudo do efeito do pH sobre a produção e a atividade de pectinases obtidas em cultivo de *A. oryzae* foi realizado utilizando todas as condições apresentadas na Tabela 11 (Ensaios T1 a T10). Os perfis de pH e atividade de pectinases para os cultivos em presença de pectina desde o tempo inicial (T1 a T5) estão apresentados na Figura 22, e para os cultivos com adição de pectina em 24h (T6 a T10), na Figura 23. Nestes ensaios, avaliou-se o cultivo até 160h.

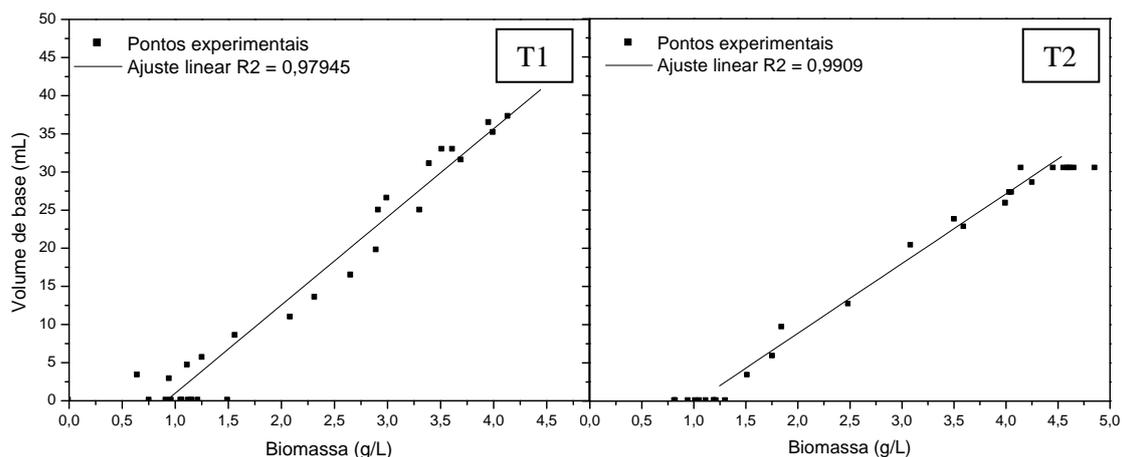


Figura 21 – Variação dos volumes de NaOH adicionados em relação à concentração de biomassa em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada: T1 - pH mantido constante em 4,0; T2 - pH mantido constante em 2,7.

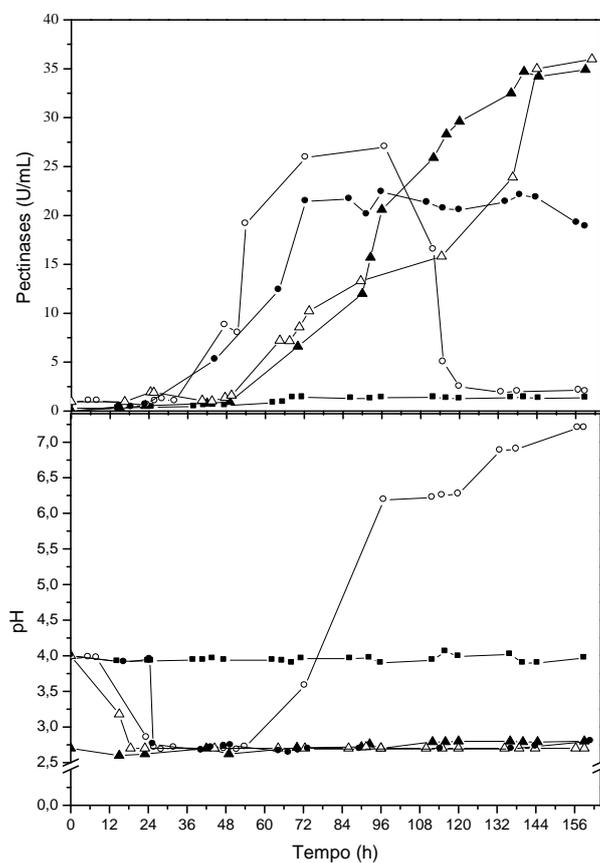


Figura 22 - Variação da atividade de pectinases e do pH em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com adição de pectina em $t=0h$, (■) T1 - pH mantido constante em 4,0; (▲) T2 - pH mantido constante em 2,7; (○) T3 - pH inicial de 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7, (●) T4 - pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7 até o final do cultivo; (Δ) T5 - pH inicial 4,0 e mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

Os resultados permitem verificar a forte influência do pH sobre a produção e a atividade de pectinases. Os Ensaio T1 (pH 4,0 constante) se mostrou favorável ao crescimento celular (Figura 19A), embora os títulos enzimáticos obtidos tenham sido praticamente nulos, mesmo em presença de pectina (Tabela 11). Assim, esta condição não foi avaliada quanto à produção de pectinases com adição do indutor em 24h de cultivo.

Contudo, o Ensaio T2 (pH 2,7 constante), apesar de proporcionar baixos valores de concentração de biomassa em relação às demais condições testadas, permitiu a obtenção de altos valores de atividade enzimática, atingindo pico em 136h de processo e resultando no mais alto valor de $Y_{P/X}$ entre as condições testadas (Tabela 11). Estes resultados confirmam que o valor de pH de 2,7 favorece fortemente a produção de pectinases. Quando a pectina foi adicionada em 24h de cultivo, em T7, a máxima atividade pectinolítica obtida foi semelhante aos Ensaios T8 e T9, porém este valor foi atingido apenas em cerca de 153h, aproximadamente 38h mais tarde que em T8 e 81h mais tarde que em T9.

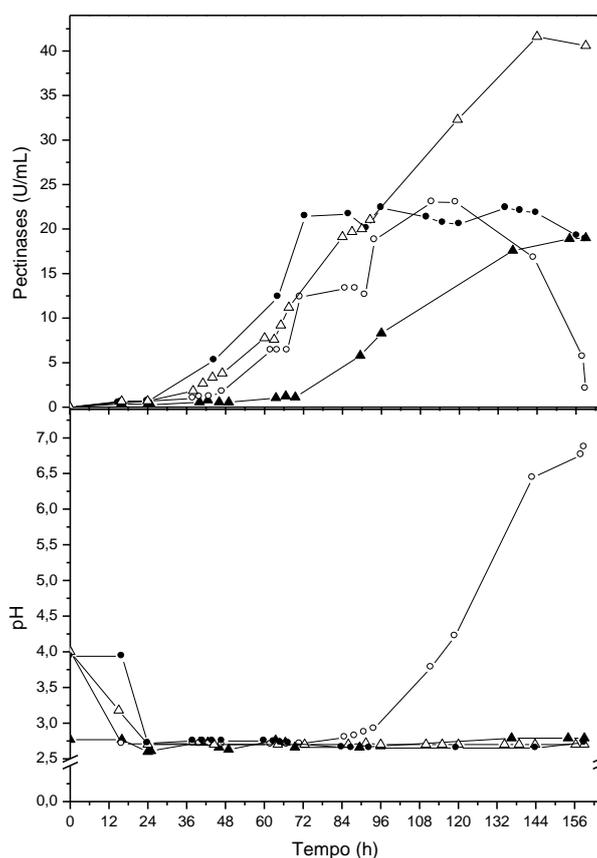


Figura 23 - Variação da atividade de pectinases e do pH em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada com adição de pectina em $t=24h$, (▲) T7 – pH mantido constante em 2,7; (○) T8 - pH inicial 4,0 e, após queda, controlado em mínimo de 2,7, (●) T9 - pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7, até o final do cultivo; (△) T10 - pH inicial 4,0 mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

Assim como Malvessi & Silveira (2004), Fontana *et al.* (2009) e Fontana & Silveira (2012) já demonstraram que altas produções de pectinases são observadas em meios com valor pH em torno de 3,0, que é desfavorável para o crescimento fúngico, sugerindo que a produção destas enzimas se dá preferencialmente em condições de estresse do microrganismo.

Nos Ensaios T3, T4, T8 e T9, a queda natural do pH do cultivo foi permitida até 2,7, quando então este parâmetro passou a ser controlado. A máxima atividade de pectinases obtida foi semelhante, no entanto, após 120h de processo, observou-se redução gradual dos títulos enzimáticos, nos Ensaios T3 e T8, até atingir valores quase nulos, em 160h de cultivo. Este comportamento pode estar associado ao perfil de pH, o qual apresentou aumento gradual, por não ser controlado, a partir de 96h, atingindo valores acima de 6,0 após 140h de processo. Ao contrário, nos Ensaios T4 e T9, o controle do pH em 2,7 até o final do cultivo possibilitou a manutenção da atividade enzimática máxima até 160h.

Malvessi & Silveira (2004), em estudo da influência do pH sobre a produção de poligalacturonases, também verificaram queda da atividade enzimática em valores de pH acima de 6,0 e associaram esse fato à condição favorável de ação de proteases, que seriam liberadas no meio de cultivo e teriam capacidade de degradar as pectinases formadas no processo, conforme previamente descrito por Kusters van Sorensen *et al.* (1992) para pectina-liase produzida por *A. niger*. A fim de verificar se a redução da atividade enzimática ocorreria por ação de proteases, o perfil de atividade destas enzimas foi determinado para o Ensaio T3. Os resultados de atividade de proteases em comparação com a de pectinases, para este ensaio, estão mostrados na Figura 24.

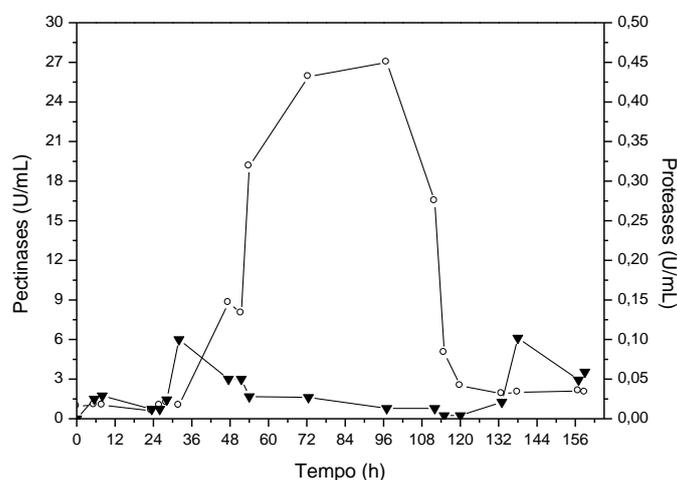


Figura 24 - Variação da atividade de pectinases e de proteases em cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada, no Ensaio T3 – pH inicial 4,0 e controlado em mínimo de 2,7: (○) pectinases, (▼) proteases.

O pico de atividade de proteases, em torno de 0,1U/mL ocorreu quando a atividade de pectinases já havia decaído para cerca de 2U/mL. Portanto, a queda da atividade de pectinases, neste caso, não teve relação com a presença de proteases, nas condições do método de determinação das

atividades enzimáticas. Possivelmente, a redução da atividade enzimática esteja relacionada com o aumento do pH, uma vez que, segundo Ueda *et al.* (1982) e Mohsen *et al.* (2009), o complexo pectinolítico formado durante o processo se mantém estável apenas em valores de pH entre 3,0 e 6,0 e, segundo os autores, a estabilidade se reduz drasticamente quando a enzima é exposta a valor de pH fora desta faixa.

Para avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das pectinases de *A. oryzae* IPT-301 formadas no cultivo, o extrato enzimático bruto foi exposto a diferentes valores de pH (2,0 a 8,0) e mantido à temperatura do cultivo. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25. Confirmou-se que baixos valores de pH são favoráveis à preservação da atividade de pectinases. Nos caldos enzimáticos submetidos a pH de 2,0, 3,0 e 4,0, houve preservação de 80% da atividade enzimática, em relação ao valor inicial, até 96 h, sendo o pH 3,0, entre os testados e assim como relatado por Mohsen *et al.* (2009), a melhor condição, com manutenção de cerca de 93% do valor inicial.

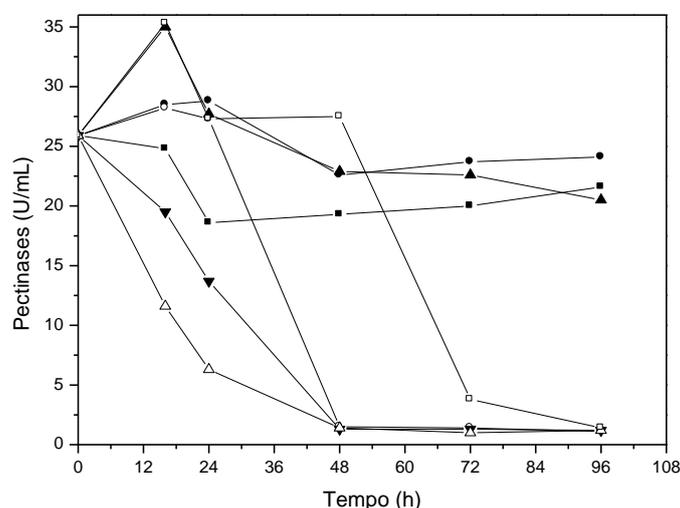


Figura 25 – Atividade de pectinases em extrato bruto exposto a diferentes valores de pH em função do tempo: (■) 2,0; (●) 3,0; (▲) 4,0; (□) 5,0; (○) 6,0; (▼) 7,0; (△) 8,0.

Observou-se um aumento acentuado da atividade enzimática nas condições de pH de 4,0 e 5,0, nas primeiras 16h de incubação, possivelmente por estas condições terem favorecido o crescimento celular, o que foi constatado visualmente. Na condição de pH 5,0, foi observada a preservação da atividade enzimática por cerca de 48h, enquanto pH 6,0, 7,0 e 8,0 se mostraram altamente desfavoráveis à manutenção da atividade enzimática, apresentando queda brusca na atividade pectinolítica já nas primeiras horas de incubação. Estes resultados corroboram os estudos de Mohsen *et al.* (2009), que verificaram que em pH 7,0 e 8,0, apenas 54% e 17% da atividade inicial foi mantida, respectivamente, após 3,5 horas de incubação. Assim, é possível afirmar que, conforme observado nos Ensaio T3 e T8 (Figuras 22 e 23), valores de pH acima de 6,0 afetam drasticamente a atividade de pectinases, possivelmente levando à desnaturação da enzima, uma vez que o ensaio para determinação da atividade enzimática foi realizado em pH 4,0.

Os Ensaios T5 e T10, conduzidos em condições de pH que dividem o cultivo em dois momentos – crescimento celular e produção de pectinases –, foi o que resultou nas mais altas atividades enzimáticas, especialmente quando a pectina foi adicionada ao cultivo em 24h (T10). Aparentemente, as condições facilitadas de transferência de oxigênio e mistura, aliadas ao pH ideal para o desenvolvimento microbiano, além de favorecerem o acúmulo de biomassa, mantiveram as células viáveis por mais tempo, tornando-as aptas à produção de pectinases quando forçou-se a queda do pH para 2,7. Os resultados destes ensaios estão mostrados nas Figuras 26 e 27.

Apesar de ter sido verificada queda de biomassa logo após a redução de pH, em presença de pectina desde o início do cultivo, o perfil de aumento de concentração celular, observado entre 40 e 84h de cultivo, indica que o microrganismo se adaptou rapidamente às novas condições. Já quando o pH foi reduzido sem a presença de pectina, a biomassa fúngica não teria sofrido influência negativa por esta operação. A concentração de biomassa, neste caso, decresceu após 48h de cultivo, mantendo-se, no entanto, no mesmo patamar até 160h.

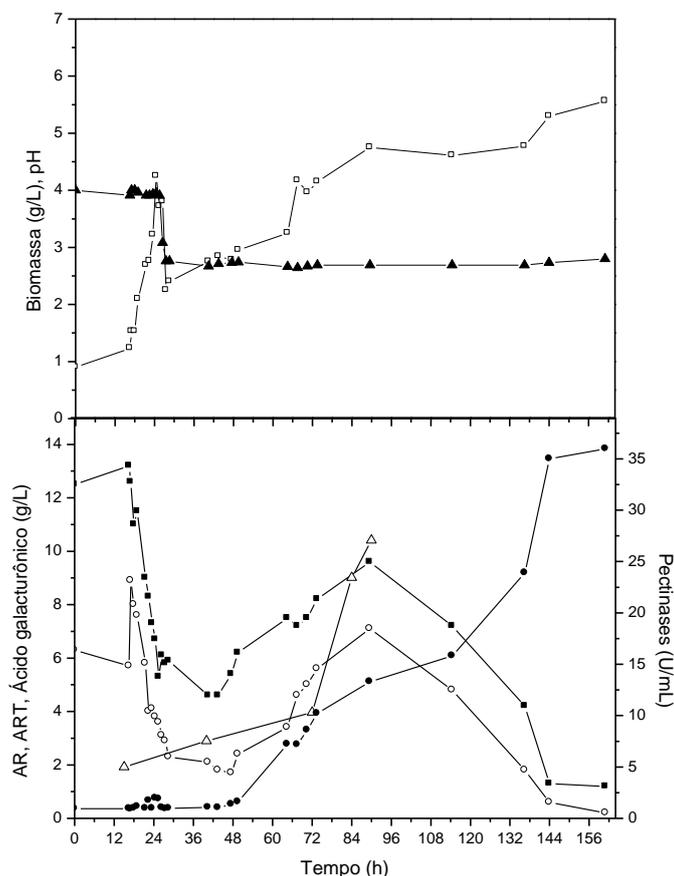


Figura 26 - Variação da atividade de pectinases, do pH e das concentrações de biomassa, açúcares redutores e açúcares redutores totais em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de bancada, no Ensaio T5 - pH ajustado e mantido em 4,0 até 24 horas de processo e queda forçada para 2,7, com pectina presente desde o início do cultivo: (□) biomassa, (▲) pH, (○) AR, (■) ART, (●) pectinases, (Δ) ácido galacturônico.

Com respeito à análise apresentada a seguir, é importante ressaltar que o método utilizado para determinação de ART não contabiliza a pectina presente no meio. Assim, os perfis cinéticos de AR e ART indicam que as pectinases formadas promoveram a hidrólise da pectina do meio a compostos que foram consumidos pelo fungo, mesmo em fase estacionária. Esta afirmação está baseada nos valores de concentração de ácido galacturônico determinados em alguns tempos de cultivo (Figura 26). Este composto é o principal monômero da cadeia de pectina e sua presença no meio está diretamente associada à atividade hidrolítica das pectinases. No ensaio em que a pectina foi adicionada em 24h de cultivo, a constatação da liberação de pectinases ocorreu em menor tempo de cultivo (36h - Figura 27) em relação ao ensaio em presença de indutor desde o início (64h - Figura 26); além disso, o valor máximo obtido, no primeiro caso, foi cerca de 10% maior.

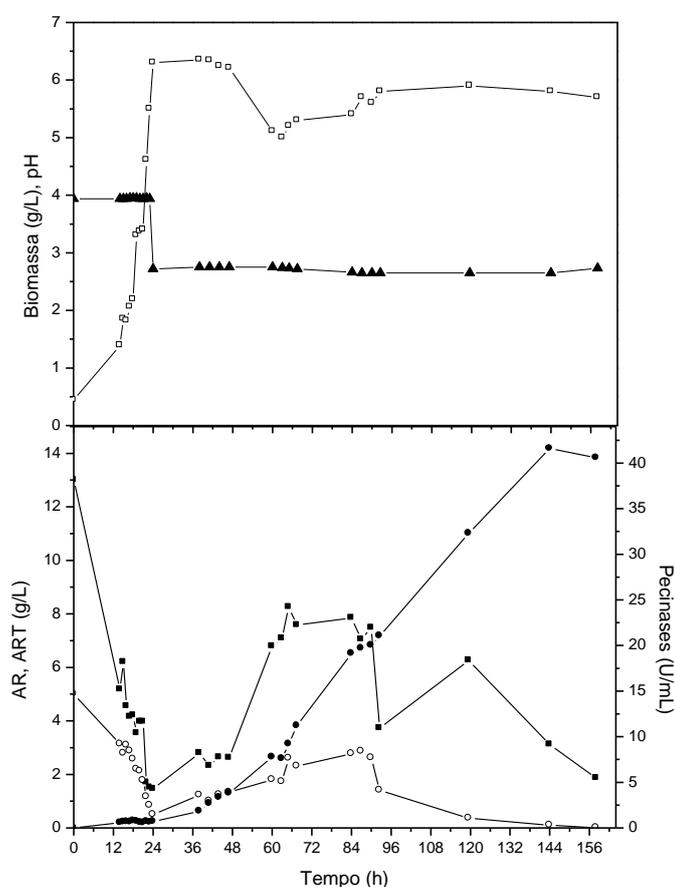


Figura 27 - Variação da atividade de pectinases, do pH e das concentrações de biomassa, açúcares redutores e açúcares redutores totais em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de bancada, no Ensaio T10 - pH ajustado e mantido em 4,0 até 24 horas de processo e queda forçada para 2,7, com adição de pectina em 24h de cultivo: (□) biomassa, (▲) pH, (○) AR, (■) ART, (●) pectinases.

4.5 Avaliação do processo sem limitação de oxigênio dissolvido

Nos Ensaios T9 e T10, em que a pectina foi adicionada ao meio de cultivo em 24h, observaram-se elevadas atividades enzimáticas em decorrência das condições facilitadas de transferência de

oxigênio e mistura, conforme já discutido anteriormente. Assim, nos Ensaios B5 e B6, nos quais o oxigênio dissolvido foi mantido automaticamente em torno de 30% da saturação, mantiveram-se as formas de operação empregadas em T9 e T10, respectivamente. Na Tabela 12, são mostrados os resultados gerais dos Ensaios B5 e B6 e repetidos os dos seus respectivos controles, Ensaios T9 e T10. Nas Figuras 28 e 29, são ilustrados os perfis cinéticos observados em B5 e B6, respectivamente.

Tabela 12 - Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada sem limitação de oxigênio (Ensaios B5 e B6) e respectivos cultivos controle sob limitação de oxigênio (Ensaios T9 e T10).

	B5	T9 (controle de B5)	B6	T10 (controle de B6)
X_{max} (g/L)	6,0	3,6	6,8	6,3
t_{X,max} (h)	42	24	36	36
μ_{X,max} (h⁻¹)	0,18	0,16	0,30	0,18
t_{μX,max} (h)	15,5	17	17,5	19
S_{cons} (g/L)	11,8	10,2	11,2	10,8
P_{max} (U/mL)	106	24	120	43
t_{P,max} (h)	156	72	120	140
Y_{P/X} (U/mg)	18,2	6,67	17,6	6,82
Y_{X/S} (g/g)	0,47	0,35	0,62	0,58
Y_{P/S} (U/mg)	8,47	2,35	10,7	3,98
p_v (U/mL/h)	0,64	0,33	1,0	0,31
pH_{min}	2,7	2,7	2,7	2,7
pH_{final}	2,7	2,7	2,7	2,7

X_{max} – máxima concentração de biomassa; t_{X,max} – tempo em que ocorreu X_{max}; μ_{X,max} – máxima velocidade específica de crescimento celular; t_{μX,max} – tempo em que ocorreu μ_{X,max}; S_{cons} – consumo total de ART ; P_{max} – máxima atividade de pectinases; t_{P,max} – tempo em que ocorreu P_{max}; Y_{P/X} – fator de produção específica; Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células; Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em pectinases; p_v – produtividade volumétrica; pH_{min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo.

B5 – O₂ dissolvido mantido em 30% da saturação; **T9** – sem controle de oxigênio dissolvido. pH inicial 4,0 e, após queda, mantido constante em 2,7 até o final do cultivo.

B6 – O₂ dissolvido mantido em 30% da saturação; **T10** – sem controle de oxigênio dissolvido. pH inicial 4,0 e mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo.

Como mostrado na Tabela 12 e na Figura 28, a concentração celular no Ensaio B5 atingiu valor máximo de 6,0g/L, cerca de 40% maior que no ensaio controle, evidenciando que o fornecimento ilimitado de oxigênio ao microrganismo favoreceu o crescimento. No entanto, após 120h, observou-se redução progressiva da concentração de biomassa até cerca de 2,5g/L. Este perfil pode estar associado à escassez de substrato no meio de cultivo, revelada pelos baixos valores de AR e ART verificados a partir de 96h de processo. Segundo Li *et al.* (2008), a disponibilidade ilimitada de oxigênio leva ao

aumento das atividades metabólicas de fungos do gênero *Aspergillus* e, apesar de a velocidade específica de crescimento do ensaio B5 ser similar à do ensaio T9, houve maior consumo de nutrientes. O decréscimo da concentração celular de *A. oryzae* em B5 levou ao aumento dos níveis de oxigênio dissolvido, atingindo 90% de saturação após 96h de processo.

A alta concentração de biomassa atingida no Ensaio B5 pode ter levado à obtenção de atividade enzimática máxima de 106U/mL, praticamente quatro vezes maior que a do controle (24U/mL). Ao contrário do que foi observado por Zeteláki-Horváth & Vas (1981), Lai *et al.* (2005), Li *et al.* (2008) e Bettin (2010), conforme descrito na Revisão Bibliográfica, a não limitação de oxigênio dissolvido favorece o crescimento celular e também, a produção da enzima. Acrescente-se que, ainda que o tempo de cultivo em que foi observado o pico de atividade de pectinases em B5 tenha ocorrido mais de 80h mais tarde que em T9, tanto os fatores de conversão quanto o fator de produção específica e a produtividade volumétrica foram maiores, indicando aumento no rendimento global do processo, em relação ao controle.

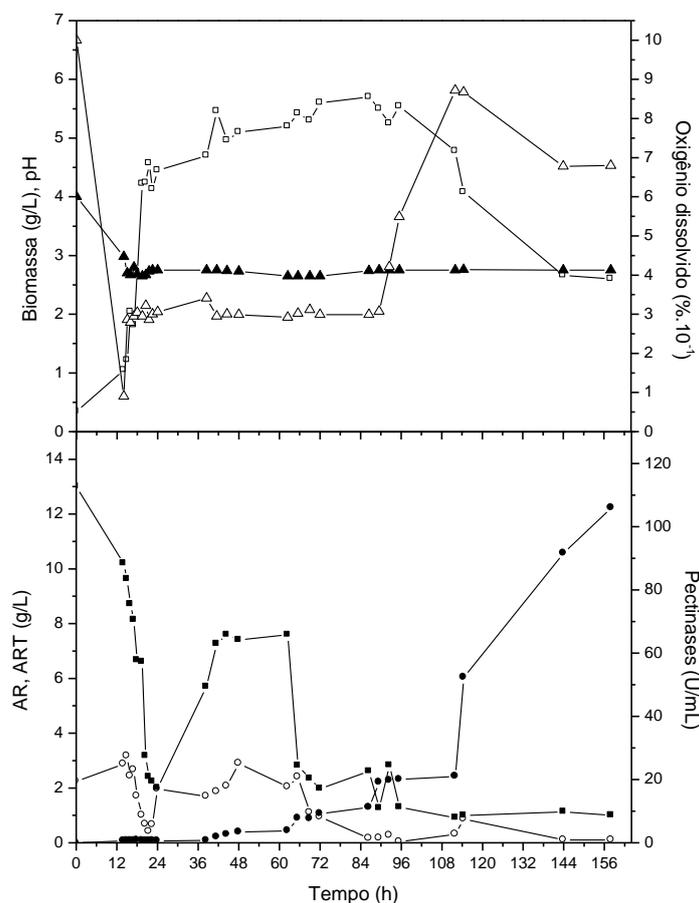


Figura 28 - Variação das concentrações de biomassa, açúcares redutores, açúcares redutores totais e oxigênio dissolvido, da atividade de pectinase e do pH em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de bancada, com concentração de oxigênio mantido em mínimo de 30% da saturação, no Ensaio B5 - pH inicial 4,0 e mantido constante em 2,7, após decrescer naturalmente até este valor: (□) biomassa, (▲) pH, (■) ART, (○) AR, (●) pectinases, (Δ) oxigênio dissolvido.

As concentrações de biomassa alcançadas nos Ensaios B6 e T10 foram similares, podendo ter sido favorecidas pela condição de pH. Em ambos os ensaios, estas concentrações sofreram leve decréscimo após 48h, mantendo-se praticamente constantes até o cultivo ser encerrado (Figuras 27 e 29). No entanto, em B6, a velocidade específica de crescimento celular foi superior. Aparentemente, a não limitação de oxigênio dissolvido para o fungo, combinada com a condição de pH que favorece o desenvolvimento do microrganismo, acelerou o crescimento celular.

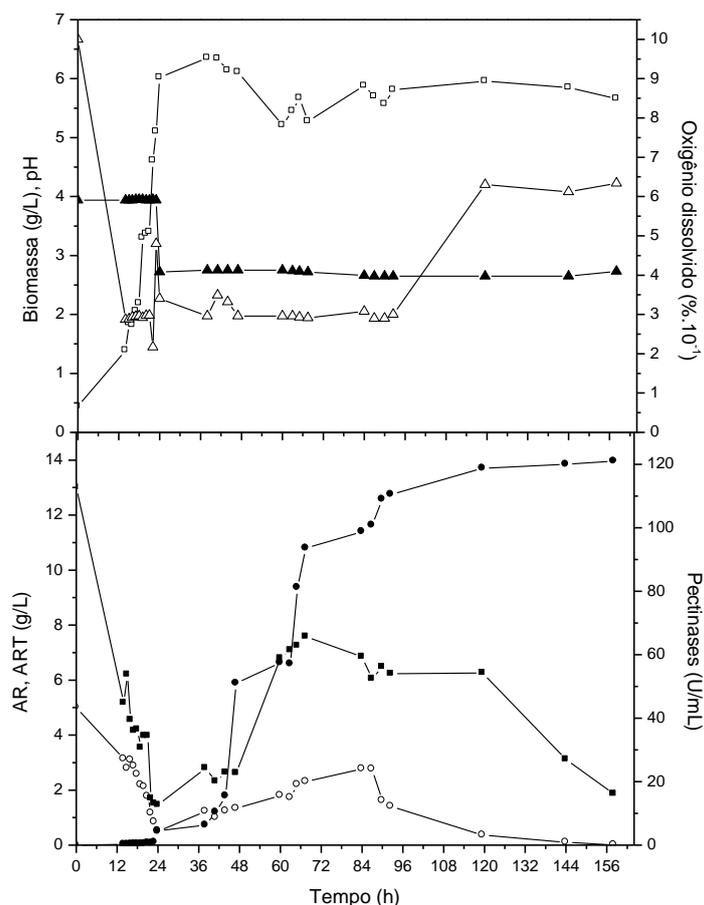


Figura 29 - Variação das concentrações de biomassa, açúcares redutores, açúcares redutores totais e oxigênio dissolvido, da atividade de pectinase e do pH em cultivo de *Aspergillus oryzae*, em biorreator de bancada, com concentração de oxigênio mantido em mínimo de 30% da saturação, no Ensaio B6 - pH ajustado e mantido em 4,0 até 24 horas de processo e queda forçada para 2,7: (□) biomassa, (▲) pH, (■) ART, (○) AR, (●) pectinases, (Δ) oxigênio dissolvido.

Em B6, o máximo teor de oxigênio dissolvido ao fim do cultivo foi de 65% da saturação, menor que o de B5, sugerindo uma maior demanda de oxigênio pelo cultivo. Este dado, aliado à manutenção da concentração de biomassa até o final do processo, indica que, nesta condição, foi possível manter a viabilidade celular por mais tempo. No caso, a maior concentração de células viáveis, em B6, teria proporcionado os altos valores de atividade enzimática obtidos neste ensaio. O pico de atividade de pectinases foi cerca de três vezes maior que o controle, sendo observado cerca de 20h antes, fazendo

com que fosse obtida a maior produtividade de todos os ensaios deste trabalho, 1,0U/mL/h.

A adição de pectina aos cultivos em 24h levou a um sensível aumento de AR e ART em torno de 36h de processo, resultante de substâncias redutoras liberadas pela hidrólise do indutor pela ação das pectinases formadas no processo. No entanto, em B5, o substrato foi totalmente consumido até 72h e, em B6, mesmo em 160h, o valor de ART ainda era superior.

A atividade enzimática começou a ser verificada a partir de 36h, tanto em B5 quanto em B6. No Ensaio B5, a atividade de pectinases aumentou gradativamente até cerca de 20U/mL, em 110h de cultivo. Após este período, ocorreu rápido incremento, até aproximadamente 106U/mL, associado à queda brusca da concentração de biomassa. Este comportamento pode estar relacionado à liberação de enzimas intracelulares, por autólise celular. Segundo Kawano *et al.* (1999), parte considerável das enzimas pectinolíticas produzidas por *Penicillium frequentans* são encontradas no interior da célula. Os autores descrevem que as pectinases endógenas podem ser resultantes de diferentes padrões de glicosilação ou da formação de agregados entre as cadeias polipeptídicas das poligalacturonases. Stack *et al.* (1980), por sua vez, verificaram que apenas 25% das poligalacturonato liases produzidas por *Erwinia carotovora* são secretadas para o meio de cultivo. Slezárik & Rexóva (1967) observaram produção de endo-poligalacturonases intra e extracelulares em mesma proporção, em cultivo de *Monilinia laxa*. Mill & Tuttobello (1966) identificaram duas exo-poligalacturonases, obtidas em cultivo de *A. niger*, como sendo intracelulares. Já em B6, a maior disponibilidade de substrato teria possibilitado a liberação de maior quantidade de enzimas (120U/mL), atingindo pico de atividade em 120h e mantendo-se este valor até o final do cultivo. As condições de consumo de substrato deste ensaio podem estar relacionadas aos valores de pH proporcionados pela estratégia adotada para o controle deste parâmetro. Após a redução forçada para o valor de 2,7, em 24h, o consumo de substrato foi mais lento em B6.

Os altos valores de atividade enzimática obtidos podem estar relacionados ao aumento da concentração de biomassa, em razão da não limitação de oxigênio disponível para o microrganismo. Li *et al.* (2008) afirmam que o consumo de nutrientes, especialmente carbono e nitrogênio, em cultivo de *A. niger* com disponibilidade ilimitada de oxigênio, é direcionado a outras atividades metabólicas além da síntese de biomassa. Segundo os autores, os fungos se adaptam ao ambiente, reforçando a atividade proteolítica intracelular e o estresse oxidativo gerado na célula leva ao aumento na liberação de enzimas hidrolíticas para obtenção de substrato. Este relato respalda os resultados obtidos nos Ensaios B5 e B6, uma vez que se observou o consumo mais acelerado de substrato em relação ao cultivo com meio WBE com pectina adicionada em 0h, apresentado no início deste capítulo. Em 24h, a concentração de ART em B5 e B6 era de cerca de 2g/L, enquanto no cultivo com meio WBE se encontrava em torno de 4g/L. O consumo mais rápido de substrato não levou a maiores títulos em biomassa; no entanto, constitui-se num indicativo de que pode haver redução no tempo de processo quando o cultivo for conduzido sem limitação de oxigênio.

4.6 Discussão geral

Neste trabalho, foi possível obterem-se condições de cultivo que permitiram o controle efetivo do pH e do oxigênio dissolvido, minimizando a interferência da reologia do meio sobre o crescimento de *A. oryzae* e a produção de pectinases por este fungo filamentososo.

Os resultados gerais de um processo podem ser avaliados pelos valores de fatores de conversão e produtividade obtidos, além das condições de frequência de agitadores e fluxo de ar empregados e do consumo de reagentes. Para efeito de comparação, na Tabela 13, são novamente listados os resultados gerais do Ensaio T3 (pH inicial 4,0 e controlado em mínimo de 2,7, sem controle de oxigênio dissolvido), como condição de partida em que foi utilizado o meio formulado no presente trabalho, e o Ensaio B6 (concentração de oxigênio mantido em mínimo de 30% da saturação, pH inicial 4,0 mantido constante até 24 horas, em seguida reduzido para 2,7 pela adição de HCl e controlado até o final do cultivo).

Verificou-se que a disponibilidade de oxigênio em B6 possibilitou a obtenção de maior concentração celular em relação a T3. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi semelhante, uma vez que se tratavam de meios de cultivo idênticos, com a mesma concentração de fontes de carbono.

Apesar de o tempo para atingir os picos de concentração de biomassa e atividade de pectinases em B6 terem sido aumentados em cerca de 12h e 24h, respectivamente, em relação a T3, a alta atividade pectinolítica obtida fez com que a produtividade do Ensaio B6 fosse 3,7 vezes maior que a do ensaio controle. Da mesma forma, os fatores de conversão de substrato em produto e produção específica foram maiores em B6. Estes resultados indicam que menor quantidade de nutrientes e substratos pode ser utilizada no cultivo, pois mesmo com concentração reduzida de biomassa, foi obtida a alta atividade de pectinases.

A adição do indutor ao cultivo após a fase de crescimento celular mais intenso possibilitou não só a redução da máxima frequência de agitadores utilizada, bem como o intervalo de tempo que este valor precisou ser mantido para garantir o fornecimento de oxigênio ao microrganismo. Acrescente-se que o máximo fluxo de ar empregado precisou ser mantido por 12 horas a menos em B6. Em comparação, a menor concentração de oxigênio dissolvido no ensaio controle chegou a manter-se em 0% da saturação por 12 horas, porém valores abaixo de 30% foram observados por mais de 18 horas. Já no Ensaio B6, foi possível controlar este parâmetro em mínimo de 30% de saturação com relativa facilidade, fazendo com que o microrganismo estivesse menos sujeito a algum efeito de cisalhamento, aumentando, em consequência, a viabilidade celular.

Adicionalmente, verificou-se que, mesmo que o tempo total de cultivo em B6 tenha sido aumentado em relação à condição controle, o ganho em produtividade e a redução de potência empregada durante o cultivo poderiam garantir a operacionalidade de um sistema em uma eventual ampliação de escala. Além disso, os custos de instalação e operação do processo poderiam ser reduzidos, assim como o consumo energético, uma vez que motores com menores potências poderiam ser empregados.

Tabela 13 - Resultados gerais do cultivo de *Aspergillus oryzae* em biorreator de bancada em diferentes condições de processo.

	T3	B6
X_{max} (g/L)	4,5	6,8
t_{X,max} (h)	24	36
S_{cons} (g/L)	10,7	11,2
P_{max} (U/mL)	27	120
t_{P,max} (h)	97	120
Y_{P/X} (U/mg)	6,0	17,6
Y_{X/S} (g/g)	0,4	0,6
Y_{P/S} (U/mg)	2,6	10,7
p_V (U/mL/h)	0,27	1,00
V_{NaOH} (mL)	32	202
V_{HCl} (mL)	0,0	82,0
N_{max} (RPM)	700	550
Δt_{N,max} (h)	28	20
Q_{esp,max} (vvm)	1,43	1,43
Δt_{Qesp,max} (h)	30	18
O_{2min} (%)	0,0	30
Δt_{O2,min} (h)	12	82
K_La (h⁻¹)	8	19
pH_{min}	2,7	2,7
pH_{final}	7,2	2,7

X_{max} – máxima concentração de biomassa; t_{X,max} – tempo em que ocorreu X_{max}; S_{cons} – consumo total de ART; P_{max} – máxima atividade de pectinases; t_{P,max} – tempo em que ocorreu P_{max}; Y_{P/X} – fator de produção específica; Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células; Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em pectinases; p_V – produtividade volumétrica; V_{NaOH} – volume total de NaOH adicionado durante o cultivo; V_{HCl} – volume total de HCl adicionado durante o cultivo; N_{max} – máxima frequência de agitadores empregada no cultivo; Δt_{N,max} – intervalo de tempo em que foi mantido N_{max}; Q_{esp,max} – máximo fluxo de ar empregado no cultivo; Δt_{Qesp,max} – intervalo de tempo em que foi mantido Q_{esp,max}; O_{2min} – mínima concentração de oxigênio dissolvido observada/mantida no processo; Δt_{O2,min} – intervalo de tempo em que foi observado/mantido O_{2min}; K_La – coeficiente de transferência de oxigênio, medido em meio isento de células; pH_{min} – mínimo valor de pH do cultivo; pH_{final} – valor final de pH do cultivo.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho confirmam que o pH e o suprimento de oxigênio afetam decisivamente o crescimento de *A. oryzae*, assim como a sua capacidade de produção de pectinases. As condições de operação estudadas possibilitaram a redução do crescimento celular – mantendo-se, entretanto, a formação de atividades enzimáticas elevadas – e, em decorrência, o controle efetivo dos parâmetros em estudo.

A análise dos resultados permite concluir que:

- o meio de cultivo formulado limita o crescimento de *A. oryzae* IPT-301, uma vez que obtém-se concentração de biomassa fúngica reduzida;
- a adição do indutor enzimático – pectina cítrica – ao meio de cultivo, em 24h de processo, minimiza o efeito prejudicial da viscosidade provocada por este polissacarídeo sobre o controle dos parâmetros operacionais em teste, proporcionando adequada mistura e transferência de oxigênio à fase líquida, empregando frequências de agitadores mais baixas que as normalmente utilizadas neste processo;
- o pH 4,0 é adequado ao crescimento celular de *A. oryzae* IPT-301, mas para a produção de pectinases, valores ainda mais ácidos, como 2,7, são necessários;
- a condição de controle do pH em 4,0 até 24h de cultivo, seguido de redução forçada até 2,7 e manutenção deste valor constante proporciona maiores valores de concentração celular e de atividade enzimática;
- a perda de atividade enzimática, observada em cultivos sem controle de pH não está relacionada à ação de proteases, como sugerido na literatura, e sim à estabilidade da enzima frente ao pH;
- a estabilidade das pectinases formadas durante o cultivo é preservada sob baixos valores de pH (2,0 a 4,0), sendo que em pH 3,0, há manutenção de cerca de 93% da atividade inicial;
- a condução do processo sob condições não limitadas com respeito à concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo resulta em ganho substancial na produção de pectinases.

Como perspectivas para a continuidade da pesquisa, sugere-se o aprofundamento dos estudos a respeito do efeito do controle do oxigênio dissolvido sobre o cultivo de *A. oryzae* para obtenção de pectinases, utilizando meio de cultivo não limitante, nos seguintes sentidos:

- avaliação de ferramentas que proporcionem o aumento da fração molar de oxigênio ou da pressão parcial do gás no fluxo de ar;
- incremento da pressão total do sistema;
- uso de vetores de oxigênio, líquidos imiscíveis em água nos quais o oxigênio é significativamente solúvel.

Ainda, durante a realização deste trabalho, observou-se que o estresse causado ao microrganismo pela falta de substratos em tempos ligeiramente anteriores à adição da pectina, associado à desaceleração do crescimento celular, provoca a liberação de enzimas hidrolíticas. Como possível perspectiva, um novo meio de cultivo, com ainda maior redução de substratos poderia ser

estudado, para cultivos com controle de oxigênio dissolvido, a fim de reduzir o tempo de consumo de substrato e de adição de pectina. Possivelmente, o tempo de cultivo para atingir-se o pico de atividade pectinolítica seria reduzido. Sobre isto, pode-se sugerir, ainda, a busca por indutores enzimáticos, alternativos à pectina cítrica, que permitam a preparação de meios de cultivo menos viscosos.

Estudo sobre a reologia do cultivo ao longo do tempo também poderiam contribuir para a elucidação de comportamentos fluidodinâmicos e sua relação com a transferência de oxigênio e a morfologia fúngica, a fim de possibilitar maior controle de parâmetros e, em decorrência, a obtenção de maiores atividades enzimáticas.

Além da morfologia microbiana, o estudo da forma de produção de pectinases pelo fungo poderia levar ao estudo de enzimas intracelulares, conforme já discutido. Caso parte das enzimas permaneça no interior da célula, caberia o estudo da utilização de ferramentas que pudessem causar lise celular.

Finalmente, através do estudo do efeito da agitação dos impelidores sobre o cultivo, seria possível revelar se o cisalhamento estaria ou não inviabilizando parte da biomassa fúngica formada durante o processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Akbar, S.; Prasuna, R.G.; Theja, B.; Chakradhar, Y.M.S. (2012). Exploitation of natural substrates and oil cakes for pectinase production by *Aspergillus tamaris* and *Aspergillus carbonarius*. **Internat. J. Pharma Bio Sci.** 3: 615-624.
- Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M.J.; Serra, J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochem.** 33: 21-28.
- Assumpção, R.M.; Morita, T. (1968). **Manual de soluções.** São Paulo: Edgard Blucher, 627p.
- Aitken, M.D. (1993). Waster water treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. **Chem. Eng. J.** 52: 49-58.
- Bailey, J.E.; Ollis, D.F. (1986). **Biochem. Eng. Fund.** Singapore: McGraw-Hill, Inc. 984 p.
- 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 of production of polygalacturonase. **Enzyme Microb. Technol.** 12: 266-271.
- Baracat, M.C.; Vanetti, M.C.D.; Araujo, E.F.; Silva, D.O. (1991). Growth conditions of a pectinolytic *Aspergillus fumigatus* for degumming of natural fibres. **Biotechnol. Lett.** 13: 693-696.
- Bastos, R.G. (2010). **Tecnologia das fermentações: Fundamentos de bioprocessos.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos – Editora Universitária.
- Bettin, F. (2010). Cinética de crescimento e produção e lacases do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 (Fr.) Singer em processo submerso em biorreator com agitação mecânica. **Tese de doutorado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Bittman, R. (1974). Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods. **J. Chem. Education.** 51: 49.
- Blandino, A.; Drabillas, K.; Cantero, D.; Pandiella, S.S.; Webb, C. (2001). Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochem.** 37: 497-503.
- Bon, E.P.S.; Costa, R.B.; Silva, M.V.A.; Ferreira-Leitão, V.S.; Freitas, S.P.; Ferrara, M.A. (2008). **Mercado e perspectivas de uso de enzimas industriais e especiais no Brasil.** In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Ed.) **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência, pp. 463-488.
- Borzani, W.; Aquarone, E.; Lima, U.A.; Schmidell, W. (2001) **Biotecnologia industrial: Fundamentos.** São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. pp. 254.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 26 de 26 de maior de 2009. Aprova a lista

- de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem, constante do Anexo desta Resolução, em substituição ao Anexo I da Resolução RDC Nº 205 de 14 de novembro de 2006. **Disponível (online)** http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0026_26_05_2009.html (15 de julho de 2013).
- Busto, M.D.; García-Tramontín, K.E.; Ortega, N.; Perez-Mateos, M. (2006). Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresour. Technol.** 97: 1477-1483.
- Cabral, J.M.S.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M. (2003). **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas Ltda., pp.250.
- Cannel, E.; Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. **Process Biochem.** 15: 24-28.
- Cheftel, J.C.; Cheftel, H. (1999). **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. Acibia, p. 162-175.
- 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 *Aspergillus niger* 3T5B8. **J. Braz. Soc. Microbiol.** 26: 318-322.
- Couri, S.; Park, Y.; Pastore, G.; Domingos, A. (2008). **Enzimas na produção de alimentos e bebidas**. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Ed.) **Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, pp. 153-173.
- Cruz-Guerrero, A.; Barzana, E.; García-Garibay, M.; Gómez-Ruiz, L. (1999). Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Klyveromyces marxianus*. **Process Biochem.** 34: 621-624.
- Cui, Y.Q.; Van der Lans, R.G.J.M.; Giuseppin, M.L.F.; Luyben, K.C.A.M. (1998). Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme Microb. Technol.** 23: 157-167.
- Dillon, A.J.P.; Malvessi, E.; Turelly, N.; Silveira, M.M. (1999). Produção de celulasas por *Penicillium echinulatum*. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – Enzitec. **Anais**. pp. III3 – III5. Rio de Janeiro, 1999.
- Dziezak, J.D. (1991). Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technol.** 45: 78-85.
- Fang, H.Y.; Chang, S.M.; Hsieh, M.C.; Fang, T.J. (2007). Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **J. Mol. Catal.** 49: 36-42.
- Fawole, O.B.; Odunfa, S.A. (2003). Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biodeter. Biodegr.** 52: 223-227.
- Fernandes-Salomão, T.M.; Amorim, 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. (1983). **Pectic enzymes**. In: Fogarty, W.M. **Microbial enzymes and biotechnology**. London: Applied Science Publishers. pp. 382.
- Fontana, R.C. (2009). Estudo da produção de poligalacturonases em processo submerso em biorreatores de agitação mecânica e *airlift*. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Fontana, R.C.; Salvador, S.; Silveira, M.M. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32: 371-377.
- Fontana, R.C.; Polidoro, T.A.; Silveira, M.M. (2009). Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresour. Technol.** 100: 4493-4498.
- Fontana, R.C.; Silveira, M.M. (2012a). Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. **Braz. J. Chem. Eng.** 29: 683-690.
- Fontana, R.C.; Silveira, M.M. (2012b). Production of polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal- and external-loop airlift reactors. **Bioresour. Technol.** 123: 157-163.
- Friederich, J.; Cimerman, A.; Steiner, W. (1994). Concomitant biosynthesis of *Aspergillus niger* pectinolytic enzymes and citric acid on sucrose. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 703-707.
- Gaden, E.L. (1959). Fermentation process kinetics. **J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.** 1: 413-419.
- Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M.; Kalantzi, O. (1997). Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 425-429.
- Ganesh, K.; Joshi, J.B.; Sawant, S.B. (2000). Cellulases desactivation in stirred reactor. **Biochem. Eng. J.** 4: 137-141.
- Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnol. Adv.** 27: 153-176.
- Geöeze, 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.
- Gogate, P.R.; Beenackersb, A.A.C.M.; Pandita, A.B. (2000) Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. **Biochem. Eng. J.** 6: 109-144.
- Gomes, J.; Zeni J.; Cence K.; Toniazzo, G.; Treichel, H.; Valduga E. (2011). Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC9642. **Food Bioprod. Process.** 89: p. 281-287.
- Grupo Virtous (2008). A célula vegetal. **Disponível (online)** http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Morfofisiologia_vegetal/morfovegetal14.php (9 de julho de 2013).
- Gummadi, S.N.; Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochem.** 38: 987-996.

- Gummadi, S.N.; Manoj, N.; Kumar, D.S. (2007). **Structural and biochemical properties of pectinases**. In: Polania, J.; MacCabe, A.P. (Ed.). **Industrial enzymes**. Dordrecht: Springer. pp. 642.
- Hadj-Taieb, N.; Ayadi, M.; Khlif, 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 Microb. Technol.** 39: 1072-1076.
- Heydarian, S.M.; Bonakdarpour, B.; Mirhoseini, J. (2009). Polygalacturonase production by *Aspergillus* sp. in air-lift and agitated fermentor. **Iran. J. Chem. Chem. Eng.** 28: 103-107.
- Hoondal, G.S.; Tewari, R.P.; Dahiya, N. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biot.** 59: 409-418.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochem.** 40: 2931-2944.
- Jianlong, W. (2000). Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using n-dodecane as an oxygen-vector. **Process Biochem.** 35: 1079-1083.
- 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. **Biotechnol. Bioeng.** 38: 1223-1232.
- 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 hem (*Crotalaria juncea*) bast Wbers. **Process Biochem.** 36: 803-807.
- 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.
- Karam, J.; Nicell, J. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 69: 141-153.
- Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.** 77: 215-227
- Kaur, G.; Kumar, S.; Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile apinis*. **Bioresour. Technol.** 94(3): 239-243.
- Kawano, C.Y.; Chellegatti, M.A.; Said, S.; Fonseca, M.J. (1999). Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 2: 133-140.
- Kelly, S.; Grimm, L.H.; Hengster, J.; Schultheis, E.; Krull, R.; Hempel, K.C. (2004). Agitation effects on submerged growth and product formation of *Aspergillus niger*. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 26: 315-323.
- Knoll, A.; Bartsch, S.; Husemann, B.; Engel, P.; Schorer, K.; Ribeiro, B.; Stöckmann, C.; Seletzky, J.;

- Buchs, J. (2007). High cells density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. **J. Biotechnol.** 132: 167-179.
- Kusters van Someren, M.A.; Flipphi, M.; Graff, L.; Van Den Broeck, H.; Kester, H.; Hinnen, A.; Visser, J. (1992). Characterization of the *A. niger* *pel* B gene: structure and regulation of expression. **Mol. Gen. Genetics.** 34: 113-120.
- Lai, L.T.; Tsai, T.; Wang, T.C. (2002). Application of oxygen vectors to *Aspergillus terreus* cultivation. **J. Biosci. Bioeng.** 94: 453-459.
- Lai, L.T.; Tsai, T.H.; Wang, T.C.; Cheng, T.Y. (2005). The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 737-748.
- Lenartoviz, V.; Souza, C.G.M.; Moreira, F.G.; Peralta, R.M. (2003). Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochem.** 38: 1775-1780.
- Levin, L.; Forchiassin, F. (1998). Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes by the white-rot fungus *Trametes trogii* on a laboratory scale. **Acta Biotechnol.** 18: 157-166.
- Li, Q.; Harvey, L.M.; McNeil, B. (2008). Oxygen enrichment effects on protein oxidation, proteolytic activity and the energy status of submerged batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D. **Process Biochem.** 43: 238-243.
- Lin, P.J.; Scholz, A.; Krull, R. (2010). Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochem. Eng. J.** 49: 213-220.
- Lonsane, B.K.; Saucedo-Castañeda, G.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra-Gonzales, G.; Ghildyal, N.P.; Ramakrishna, M.; Krishnaiah, M.M. (1991). Scale-up strategies for solid state fermentation systems: a review. **Process Biochem.** 26: 1-15.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlap, P.V.; Clark, D.P. (2010). **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Artmed. pp. 1091.
- Maiorano, A.E. (1982). Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. **Dissertação de mestrado.** Escola Politécnica. Universidade de São Paulo/SP.
- Maiorano, A.E. (1990). Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. **Tese de doutorado.** Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- Maldonado, M.C.; Strasser de Saad, A.M. (1998). Production of pectinase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20: 34-38.
- Malvessi, E. (2000). Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Braz. Arch. Biol Technol.** 47: 693-702.

- Martínez-Trujillo, A.; Aranda, J.S.; Gómez-Sánchez, C.; Aguilar, B.T.; Aguilar-Osorio, G. (2009). Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. **Braz. J. Microbiol.** 40: 40-47.
- Mill, P.J.; Tuttobello, R. (1960). The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. **Biochem. J.** 79:57-64.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426.
- Mohsen, S.M.; Bazaraa, W.A.; Doukani, K. (2009). Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. In: 4^o Conference on Recent Technologies in Agriculture. **Anais.** pp. 805 – 817. Egito, 2009.
- Moo-Young, M.; Blanch, H.W. (1989). Transport phenomena and bioreactor design. **Basic Biotechnol.** 3: 135-151.
- Moore-Landecker, E. (1996). **Fundamentals of fungi.** New Jersey: Prentice Hall. 574p.
- Naidu, G.S.N.; Panda, T. (2003). Studies on pH and thermal deactivation of pectinolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochem. Eng. J.** 16: 57-67.
- Nair, S.R.; Panda, T. (1997). Statistical optimization of medium components from improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. **Bioprocess Eng.** 16: 169-173.
- Olivier, M.N.; Cerutti, E.C.; Tomim, G.C.; Freitas, M.B.; Rotili, M.C.C.; Gregório, N.P. (2008). Aplicação da enzima pectinase na vinificação. **Arq. Ciência Saúde Unipar.** 12: 133-138.
- 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). Influence of oxygen tension, biomass, concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. **Biotechnol. Bioeng.** 40: 1293-1299.
- Papagianni, M.; Moo-Young, M. (2001). Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochem.** 37: 1271-1278.
- Parley, A.F.; Page, O.T. (1971). Different induction of pectinolytic enzymes of *Fusarium roseum* (LK). **J. Microbiol.** 17: 415-420.
- Patil, S.R.; Dayanand, A. (2006). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresour. Technol.** 97: 2054-2058.
- Penha, E.M. (2012). Aplicação industrial de enzimas na clarificação de sucos de frutos. In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – Enzitec. **Anais.** Blumenau, 2012.
- Pereira, J.F.; Lima, J.O.; Rocha, R.B.; Medina, P.X.L.; Araújo, E.F.; Queiroz, M.V. (2003). Nitrate reductase in filamentous fungi. **Rev. Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.** 31: 74-85.
- Pilnik, W.; Rombouts, F.M. (1981). **Pectic enzymes.** In: Birch, G. G.; Blakebrough, N.; Parker, K. J. **Enzymes and food processing.** London: Applied Science Publishers. pp. 296.
- Posser, J.I.; Tough, A.J. (1991). **Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous**

- microorganism.** In: Burnet, J.H.; Trinci, A.P.J. (Ed.) **Fungal walls and hyphal growth.** Cambridge: Cambridge University Press. pp. 1979.
- Quijano, G.; Revah, S.; Gutiérrez-Rojas, M.; Flores-Cotera, L.B.; Thalasso, F. (2009). Oxygen transfer in three-phase airlift and stirred tank reactors using silicone oil as transfer vector. **Process Biochem.** 44: 619-624.
- Reid, I.; Ricard, M. (2000). Pectinase in paper making, solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme Microb. Technol.** 12: 115-123.
- Rols, J.L.; Condoret, J. S.; Fonade, C.; Goma, G. (1990). Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors. **Biotechnol. Bioeng.** 35: 427-435.
- Rols, J.L.; Goma, G. (1991). Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil-in-water dispersions. **Biotechnol. Lett.** 13: 7-12.
- Roumbouts, E.M.; Pilnik, W. (1980). **Pectic enzymes.** In: Rose. A. (Ed). **Economic microbiology.** vol. 5. London: Academic Press. pp. 693.
- Sandri, I.G. (2010). Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos. **Tese de doutorado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Sandri, I.G.; Fontana, R.C.; Barfknecht, D.M.; Silveira, M.M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. **LWT - Food Sci. Technol.** 44: 2217-2222.
- Sandri, I.G.; Lorenzoni, C.M.T.; Fontana, R.C.; Silveira, M.M. (2013). Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT - Food Sci. Technol.** 51: 469-475.
- Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J.; Vandamme, E.J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Adv. Appl. Microbiol.** 39: 213-294.
- Sarath, G.; Motte, R.W.; Wagner, F.W. (1989). **Protease assay methods.** In: Beynon, R.J.; Bond, J.S. (Ed.). **Proteolytic enzymes: A practical approach.** Oxford: IRL Press. pp 25-55.
- Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). **Biotecnologia industrial.** Vol. 2 – Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. pp. 541.
- Serra, J.L.; Alkorta, I.; Llama M.J. (1992). Aplicación industrial de los enzimas pécticos: Producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina lisa de *Penicillium italicum*. **Aliment. Equipos Technol.** 11: 127-134.
- Sharma, D.C.; Satyanarayana T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresour. Technol.** 97(5): 727-733.
- Shivakumar, P.D.; Krishnanand, S.S. (1995). Anaerobic degradation of pectin by mixed consortia and optimization of fermentation parameters for higher pectinase activity. **Let. Appl. Microbiol.** 20: 117-119.
- Silva, A.P.V.; Maia, G.A.; Oliveira, G.S.F.; (1999). Estudo da produção do suco clarificado de cajá

- (*Spondias lutea* L.). **Ciência Tecnol. Aliment.** 19: 33-36.
- Silveira, M.M. (1991). Estudo cinético da fermentação butileno-glicólica de sacarose por *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199. **Tese de doutorado**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- Silveira, M.M.; Molina, M.A.B. (2005). Indirect estimation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* biomass concentration using oxygen balance data. **Braz. J. Chem. Eng.** 22: 495-500.
- Slezárik, A.; Rexóva, L. (1967). Characterization of extracellular pectinolytic enzyme of *Monilia laxa*. **Biologia (Bratislava)**. 22: 407-413.
- Sobotka, M.; Prokop, A.; Dunn, I.J.; Einsele, A. (1982). Review of methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems. **Ann. Rep. Ferment. Proc.** 5: 127-210.
- Solis-Pereira, S.; Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G.; Gutiérrez-Rojas, M.; Roussos, S.; Saucedo-Castañeda, G.; Gunasekaran, P. (1996). Production of pectinase by *Aspergillus niger* in solid state fermentations at high initial glucose concentrations. **J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 257-260.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 95: 267-272.
- Souza, R.L.A.; Oliveira, L.S.C.; Silva, F.L.H.; Amorim, B.C. (2010). Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Rev. Bras. Eng. Agríc Ambient.** 14: 9-12.
- Stak, J.P.; Mount, M.S.; Berman, P.M.; Hubbard, J.P. (1980). Pectic enzyme from *Erwinia carotovora*: a mode for degradation and assimilation of host pectic fractions. **Physiol. Biochem.** 70: 267-272.
- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Takors, R. (2012). Scale-up of microbial process: Impacts, tools and open questions. **J. Biotechnol.** 160: 3-9.
- Teixeira, M.F.S.; Lima-Filho, J.L.; Durán, N. (2000). Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Braz. J. Microbiol.** 31: 286-290.
- Ueda, S.; Fujio, Y.; Lim, J.Y. (1982). Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. **J. Appl. Biochem.** 4: 524-532.
- Uenojo, M.; Pastore, G.M. (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quím. Nova.** 30: 388-394.
- Wainwright, M.P.; Trinci, A.P.J.; Moore, D. (1993). Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process. **Mycol. Res.** 97: 801-806.
- Wang, D.I.C.; Cooney, C.L.; Demain, A.L.; Dunnill, P.; Humphrey, A.E.; Lilli, M.D. (1979). **Fermentation and enzyme technology**. New York: John Wiley & Sons. pp. 374.
- Wasa, K.; Kitabatake, M.; Adachi, H. (2004). **Thin film materials technology: sputtering of compound materials**. Norwich: Springer. pp. 132.

- Waschek, R.C.; Dutra, A.R.; Grandsire, C.; Almeida, O.C.; Moreira, S.O.L. (2008). Pectina: um carboidrato complexo e suas aplicados. **Estudos, Goiânia**. 35: 343-355.
- Whitaker, J.R. (1984). Review: pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 341-349.
- Zeteláki-Horváth, K.; Vas, K. (1981). Effect of oxygen transfer rate on the composition of the pectinolytic enzyme complex of *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Bioeng.** 23: 2231-2241.