



ELIA NATALIA MEZA RAMIREZ

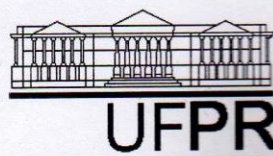
PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO ITACÔNICO POR DIFERENTES
METODOLOGIAS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO O FUNGO
FILAMENTOSO *Aspergillus terreus*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe

CURITIBA 2015



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos três dias do mês de Março de 2015, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof. Dr. Júlio César de Carvalho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Oitava Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Agroindústria e Biocombustíveis. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe (UFPR), Profa. Dra. Cristine Rodrigues (UFPR), Profa. Dra. Susan Grace Karp (UP), Prof. Dr. Júlio César de Carvalho (UFPR – orientador da dissertação).

Às 09h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Elia Natália Meza Ramírez** a fazer a apresentação da dissertação intitulada: **“PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO ITACÔNICO POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO O FUNGO FILAMENTOSO *Aspergillus terreus*”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Profa. Dra. Cristine Rodrigues, Profa. Dra. Susan Grace Karp e Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 03 de Março de 2015.

Prof. Dr. Júlio César de Carvalho

Profa. Dra. Luciana P. S. Vandenberghe

Profa. Dra. Cristine Rodrigues

Profa. Dra. Susan Grace Karp

Dedico este trabajo a mis padres, eterna motivación para seguir adelante y alcanzar los sueños, y a la persona que me enseñó a no contar los días, sino a hacer que los días cuenten.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

Ao Professor Dr. Júlio Cesar de Carvalho, por sua orientação, acompanhamento e valioso auxílio técnico durante a execução deste trabalho.

À Professora Dra. Luciana P. S. Vandenberghe, pela recepção acolhedora na Instituição e no país, e pela constante colaboração técnica durante minha estadia no Brasil.

À Eloisa Souza da Assessoria de Relações Internacionais da UFPR, pelo auxílio e colaboração antes e durante o começo do Mestrado.

Aos membros da banca, pelas contribuições e sugestões realizadas ao presente trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos pelo apoio técnico prestado durante os trabalhos experimentais realizados.

Ao Programa de Alianças para Educação e a Capacitação PAEC-OEA-GCUB, no âmbito do Acordo de Cooperação entre a Organização dos Estados Americanos e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (CGUB), pelo suporte financeiro concedido durante o período de Mestrado.

*En la vida algunas veces se gana,
otras veces se aprende.*

RESUMO

O ácido itacônico (AI) ou ácido metilsuccínico é um composto orgânico de alto potencial na indústria química e considerado uma das moléculas mais promissoras para sua implementação como *bio-building block* ou bioproduto químico de base. Esse ácido carboxílico insaturado apresenta um amplo espectro de aplicações na síntese de novos polímeros, aditivos para óleos, super-absorventes, nanofibras, resinas sintéticas e produtos relacionados. De acordo com o *US Department of Energy* (2010), o ácido itacônico é considerado um dos 12 candidatos com maior potencial para ser gerado de maneira sustentável a partir de biomassa por meio de processos biotecnológicos. Com um preço final próximo aos US\$ 2/kg, o AI apresenta um volume de mercado de aproximadamente 80 000 toneladas/ano, sendo que o eventual incremento da produção depende da possibilidade de aperfeiçoar a tecnologia existente e o entendimento relacionado aos fatores chave do processo produtivo.

O presente trabalho teve por objetivo implementar um processo fermentativo eficiente para síntese de AI, avaliando diferentes substratos, condições e tipos de sistema de cultivo. Em uma etapa inicial foi cultivado o fungo filamentoso *Aspergillus terreus* em sistema de fermentação submersa em escala laboratorial, empregando meio sintético com 100 g/L de sacarose comercial como fonte de carbono. Adicionalmente, foi realizada a otimização do processo de produção de inóculo, identificando o parâmetro pH como um fator determinante no desenvolvimento de uma morfologia específica que permite maximizar o intercâmbio gasoso e de nutrientes, além da produção de AI. As condições de cultura e composição do meio de cultivo definido permitiram estabelecer um processo que atinge 49,9 g/L de produto com um rendimento de 0,55 g de AI por grama de substrato consumido e uma produtividade volumétrica horária de 0,25 g/L h. Em uma segunda etapa, foi avaliada a produção de AI empregando extratos aquosos de substratos complexos em condições pré-definidas para fermentação submersa e matérias primas *in natura* para testes de fermentação em estado sólido. No caso dos extratos aquosos, o melhor tratamento foi observado utilizando extrato de polpa cítrica com suplementação de sacarose comercial. Este tratamento atingiu 27,05 g/L de AI, rendimento $Y_{p/s}$ de 0,29 g de produto / g substrato e produtividade horária de 0,188 g/L h. Finalmente, a fermentação em estado sólido demonstrou ser pouco viável devido a condições próprias do processo, como altos requerimentos de aeração e necessidade de concentrações mínimas de fósforo para limitação do crescimento da biomassa. Conclui-se que no presente trabalho foi estabelecida uma metodologia escalonável para obtenção de um produto com grande potencial na indústria química.

Palavras-chave: ácido itacônico, ácido metilsuccínico, biopolímeros, *Aspergillus terreus*, fermentação submersa, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Itaconic acid (IA) or methylsuccinic acid is an organic compound of high potential in the chemical industry and it is considered one of the most promising molecules for implementation as bio-building block or base chemical. This unsaturated carboxylic acid has a wide range of applications in the synthesis of new polymers, additives for oils, superabsorbents, nanofibers, synthetic resins and related products. According to the US Department of Energy (2010), itaconic acid is considered one of the 12 candidates with the greatest potential to be sustainably generated from biomass through biotechnological processes. With a final price close to US\$ 2/kg, IA has a worldwide market volume of approximately 80,000 tons/year and the eventual production increase depends on the possibility to enhancing the existing technology, as well as understanding the key factors for the productive process. This study aimed to implement an efficient fermentation process for itaconic acid synthesis, evaluating different substrates, conditions and types of culture systems. At an initial stage the filamentous fungus *Aspergillus terreus* was cultivated in a submerged fermentation system on a laboratory scale, using a synthetic medium with 100 g/L of commercial sucrose as a carbon source. Additionally, optimization for inoculum production was carried out by identifying the pH parameter as a determining factor in the development of a specific morphology that maximizes the gas exchange and nutrients, overall enhancing the IA production. The definition of culture conditions and medium composition allowed us to establish a process that reached 49.9 g/L of product with a yield of 0.55 g of itaconic acid per gram of substrate consumed, and an average volumetric productivity of 0.25 g/L h. In a second stage, itaconic acid production was assessed using aqueous extracts of complex substrates on predefined conditions for submerged fermentation and raw materials *in natura* for solid-state fermentation. In the case of aqueous extracts, the best treatment was observed using citrus pulp extract, with commercial sucrose supplementation. This treatment reached 27.05 g/L of IA, with an $Y_{p/s}$ of 0.29 g/g, with an average productivity of 0.188 g/L h. Finally, the solid-state fermentation has shown to be impractical due to inherent process conditions such as high aeration requirements and the probable need of low phosphorus concentrations to limit the biomass growth. In conclusion, the present study established a scalable methodology for obtaining a product with great potential in the chemical industry.

Key-words: itaconic acid, methylene succinic acid, biopolymers, *Aspergillus terreus*, submerge fermentation, solid-state fermentation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO ITACÔNICO E FAMÍLIAS DE COMPOSTOS DERIVADOS.....	19
FIGURA 2 - ROTA METABÓLICA DE SÍNTESE DO ITACONATO E SUA COMPARTIMENTALIZAÇÃO EM MITOCÔNDRIA E CITOSOL.....	21
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REAÇÕES DE DESIDRATAÇÃO DO CITRATO E DESCARBOXILAÇÃO DO CIS-ACONITATO NA SÍNTESE DO ÁCIDO ITACÔNICO	22
FIGURA 4 - MACROMORFOLOGIA DO FUNGO <i>A. terreus</i> INOCULADO EM ÁGAR EXTRATO DE MALTE (A) E ÁGAR CZAPEK (B)..	23
FIGURA 5 - ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DO FUNGO <i>A. terreus</i>	24
FIGURA 6 - DETALHE DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NO CICLO DE KREBS E DOS COFATORES ENZIMÁTICOS QUE INTERVÊM NO PROCESSO DE SÍNTESE DE AI.....	30
FIGURA 7 - EFEITO DE PAUSAS NA AERAÇÃO DO CULTIVO DE <i>A. terreus</i> NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO.....	34
FIGURA 8 - BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS EMPREGADO NA FASE DE AUMENTO DE ESCALA.....	46
FIGURA 9 - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) COM SISTEMA DE AERAÇÃO FORÇADA EM COLUNA RAIMBAULT.....	52
FIGURA 10 - DIAGRAMA DE PARETO PARA OS EFEITOS ESTIMADOS DOS FATORES FÍSICOS AVALIADOS COM O MEIO “INÓCULO B” PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO.	63
FIGURA 11 - DIFERENÇAS OBSERVADAS NA MORFOLOGIA DE <i>Aspergillus terreus</i> NRRL 1960 NO MEIO “INÓCULO A” SOB CONDIÇÕES FÍSICAS VARIÁVEIS.	66
FIGURA 12 - DIFERENÇAS OBSERVADAS NA MORFOLOGIA DE <i>Aspergillus terreus</i> NRRL 1960 NO MEIO “INÓCULO B” SOB CONDIÇÕES FÍSICAS VARIÁVEIS.	67
FIGURA 13 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO EMPREGANDO <i>A. terreus</i> NRRL 1960.	70

FIGURA 14 - OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO MISTA A EMPREGAR NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO POR *Aspergillus terreus* NRRL 1960..... 71

FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO SOB DIFERENTES VALORES INICIAIS DE pH NA FASE FERMENTATIVA. 73

FIGURA 16 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE AI E BIOMASSA, CONSUMO DE SUBSTRATO E pH PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EMPREGANDO *A. terreus* NRRL 1960. 76

FIGURA 17 - CRESCIMENTO APICAL DE *A. terreus* NRRL 1960 EM DIFERENTES SUBSTRATOS. 83

FIGURA 18 - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE FARELO DE TRIGO EM DIFERENTES ALTURAS DE CAMADA SÓLIDA (A) E QUIRERA DE MILHO COM TAMPÃO pH 3 E HCl 10% (B, C). 89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO AI.....	20
TABELA 2 - PARÂMETROS FÍSICOS E NÍVEIS AVALIADOS NO ESTUDO DE MORFOLOGIA ÓTIMA DE <i>A. terreus</i> PARA A PRODUÇÃO DE AI	38
TABELA 3 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA O ESTUDO DE MORFOLOGIA ÓTIMA PARA PRODUÇÃO DE AI.	39
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO EMPREGADOS NO ESTUDO DE MORFOLOGIA ÓTIMA PARA PRODUÇÃO DE AI.....	40
TABELA 5 - DETALHE DA COMPOSIÇÃO DIFERENCIAL DA FONTE DE NITROGÊNIO (g/L) TESTADA PARA PRODUÇÃO DE AI.	41
TABELA 6 - OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO PARA PRODUÇÃO DE AI.....	42
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES DE FONTES DE CARBONO TESTADAS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO.....	49
TABELA 8 - DESCRITIVO DA COMPLEMENTAÇÃO DE FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA OS EXTRATOS AQUOSOS TESTADOS.....	50
TABELA 9 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA DUAS METODOLOGIAS DE PREPARO DE INÓCULO DE <i>A. terreus</i> NRRL 1960. .	57
TABELA 10 - PRODUÇÃO FINAL DE AI EMPREGANDO BIOMASSA GERADA NO TRATAMENTO “MEIO DE INÓCULO A” PARA OS ENSAIOS REALIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL DE CONDIÇÕES FÍSICAS.	58
TABELA 11 - ANOVA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO EMPREGANDO BIOMASSA GERADA NO TRATAMENTO “MEIO DE INÓCULO A”	60
TABELA 12 - PRODUÇÃO FINAL DE AI EMPREGANDO BIOMASSA GERADA NO TRATAMENTO “MEIO DE INÓCULO B” PARA OS ENSAIOS REALIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL DE CONDIÇÕES FÍSICAS.	61
TABELA 13 - ANOVA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO NO MEIO “INÓCULO B”	62

TABELA 14 - RESULTADOS PRELIMINARES DOS MEIOS SINTÉTICOS TESTADOS INICIALMENTE PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO. ...	68
TABELA 15 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES VALORES INICIAIS DE pH.	72
TABELA 16 - RENDIMENTOS E PRODUTIVIDADE CALCULADA AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE <i>A. terreus</i> PARA PRODUÇÃO DE AI.....	74
TABELA 17 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM DADOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A PRODUÇÃO DE AI EMPREGANDO <i>A. terreus</i>	75
TABELA 18 - EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁLCOOIS INFERIORES NA PRODUÇÃO DE AI POR <i>A. terreus</i> NRRL 1960.	78
TABELA 19 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO PARA AS CEPAS <i>A. terreus</i> NRRL 1960 e NRRL 265.	78
TABELA 20 - PRODUÇÃO DE AI EM BIOREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS DE 1 L.	80
TABELA 21 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS PRIMAS AVALIADAS PARA PRODUÇÃO DE AI.....	82
TABELA 22 - RESULTADOS PRELIMINARES PARA PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO COM FONTE ALTERNATIVA DE CARBONÓ.....	84
TABELA 23 - PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	86
TABELA 24 - RESUMO DOS RESULTADOS DAS FES REALIZADAS PARA PRODUÇÃO DE AI COM O FUNGO <i>A. terreus</i>	88
TABELA 25 - PRODUÇÃO DE AI EM FES EMPREGANDO SUPORTE INERTE IMPREGNADO COM MEIO SINTÉTICO.	91
TABELA 26 - RESUMO DA ORDEM CRONOLÓGICA DE REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS E DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

a_w	-	Atividade de água
X	-	Biomassa (g/L)
S	-	Substrato (g/L)
S_r	-	Substrato residual após fermentação (g/L)
AI	-	Ácido itacônico (g/L)
pH	-	Potencial de hidrogênio
$Y_{p/x}$	-	Rendimento de produto / biomassa (g/g)
$Y_{p/s}$	-	Rendimento de produto / substrato consumido (g/g)
r_p	-	Produtividade volumétrica horária para ácido itacônico (g/L h)
NRRL	-	Northern Regional Research Laboratory
G.L.	-	Graus de liberdade
STR	-	<i>Stirred Tank Reactor</i> (Reator de Tanque Agitado)
μ	-	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
td	-	Tempo de duplicação (h)
r_{smax}	-	Proporção volumétrica máxima de consumo de substrato (g/L h)
VF/Vf	-	Proporção volume fermentação / volume frasco
vvm	-	Volume [de ar] por volume [de meio] por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. ÁCIDOS ORGÂNICOS: ASPECTOS GERAIS	18
3.2. ÁCIDO ITACÔNICO (AI)	18
3.2.1. Rota de biossíntese	20
3.3. <i>Aspergillus terreus</i>	23
3.4. FATORES QUÍMICOS E FÍSICOS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO	25
3.4.1. Fonte de Carbono	25
3.4.2. Fonte de Fósforo	26
3.4.3. Fonte de Nitrogênio	28
3.4.4. Outros macronutrientes e metais traço	29
3.4.5. Álcoois inferiores	30
3.4.6. pH	31
3.4.7. Temperatura	32
3.4.8. Aeração	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. MICRO-ORGANISMOS EMPREGADOS	35
4.2. RECUPERAÇÃO DOS ESPOROS	36
4.3. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO DE INÓCULO	36
4.3.1. Produção de inóculo vegetativo: Estudo da morfologia ótima de <i>A. terreus</i> para produção de AI	37
4.4. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO SINTÉTICO	40
4.4.1. Fonte de Nitrogênio (N)	41
4.4.2. Efeito do pH	42
4.4.3. Cinética de produção em meio sintético	43
4.4.4. Álcoois inferiores	45
4.4.5. Comparação entre cepas NRRL 1960 e 265	45
4.4.6. Aumento de escala	46
4.5. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO	47
4.5.1. Caracterização físico-química de substratos	47
4.5.2. Estudo de crescimento apical	48

4.5.3. Testes iniciais de fermentação submersa empregando fonte de carbono complexa	48
4.5.4. Fermentação submersa empregando extratos aquosos de substratos complexos	49
4.5.5. Fermentação em estado sólido (FES)	51
4.5.5.1. Simulação da FES com meio sintético em suporte inerte	53
4.6. PROTOCOLOS ANALÍTICOS	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1. METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE INÓCULO	56
5.1.1. Estudo da morfologia ótima de <i>A. terreus</i> para produção de AI	57
5.2. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO SINTÉTICO	68
5.2.1. Fonte de Nitrogênio	69
5.2.2. Efeito do pH	72
5.2.3. Cinética de produção em meio sintético	74
5.2.4. Álcoois inferiores	77
5.2.5. Comparação entre cepas NRRL 1960 e 265	78
5.2.6. Aumento de escala	79
5.3. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO	81
5.3.1. Caracterização físico-química de substratos	81
5.3.2. Crescimento apical	82
5.3.3. Testes iniciais de fermentação submersa empregando fonte de carbono complexa	83
5.3.4. Fermentação submersa empregando extratos aquosos de substratos complexos	85
5.3.5. Fermentação em estado sólido (FES)	87
5.3.5.1. Simulação da FES com meio sintético em suporte inerte	90
6. CONCLUSÃO	92
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	94
8. REFERÊNCIAS	96
9. ANEXOS	101

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios atuais da humanidade é o desenvolvimento de sociedades industrializadas e sustentáveis, onde o sucesso dos países não seja ao mesmo tempo sinônimo de exploração excessiva dos recursos naturais. Para isso, ainda é necessário estabelecer fontes alternativas que permitam vencer a nossa dependência do petróleo como matéria prima. Uma das áreas de maior importância para atingir esse objetivo é a pesquisa de materiais e compostos que possam agir como substituintes de baixo custo na indústria química. Sob essa perspectiva, os chamados bioprodutos químicos de base (*bio-building blocks*) são considerados promissores para implementação como blocos construtivos em processos industriais.

Diversas pesquisas têm sido efetuadas procurando estabelecer um processo viável para bioconversão de matérias primas vegetais em substâncias com características similares às aquelas encontradas em compostos obtidos a partir de fontes fósseis de carbono. Porém, os altos custos associados às novas tecnologias desenvolvidas ainda resultam em baixa competitividade dos processos de síntese de biocombustíveis, bioplásticos e produtos químicos gerados biotecnologicamente.

Em anos recentes, tem aumentado o interesse em monômeros orgânicos com potencial para serem empregados como blocos de construção na indústria química. Este é o caso do ácido itacônico (AI), considerado pelo *US Department of Energy* (2010) uma das 12 moléculas candidatas mais promissoras para ser gerada de maneira sustentável a partir de biomassa.

O ácido metilsuccínico ou AI é um monômero insaturado, de cinco carbonos (C5), que apresenta dois grupos carboxila. É produzido naturalmente por micro-organismos como *A. terreus*, *Aspergillus itaconicus*, *Ustilago maydis*, *Pseudozyma antarctica* e *Candida* sp (BENTLEY; THIESSEN, 1957; BONNARME *et al.*, 1995; KUO; KURTZMAN; LEVIN, 2009). Atualmente, é empregado em nível comercial como co-monômero em algumas borrachas sintéticas (nitrílica e estireno-butadieno) e como plastificante em outros polímeros. O processo fermentativo para produção industrial de AI foi objeto de

pesquisa na década de 60 (BATTI; SCHWEIGER, 1963; NUBEL *et al.*, 1962), porém a baixa competitividade do Al com os derivados da indústria petroquímica (como ácido acrílico e anidrido maleico) ocasionou uma escassa difusão e aprimoramento da tecnologia. Na atualidade e como já foi comentado previamente, existe um interesse crescente em consolidar opções viáveis para a mudança gradual a novas fontes de recursos renováveis.

O volume de mercado para o Al supera as 80.000 toneladas por ano, com um preço de mercado de US\$ 2/kg. A China é o principal produtor mundial, com uma capacidade instalada que supera a presente demanda (BLAZECK *et al.*, 2014). Atualmente Al é comercializado em forma de sólido cristalizado, com pureza maior que 99%. A nacionalização da tecnologia de produção de Al para o Brasil depende do aperfeiçoamento de um processo eficiente de baixa demanda energética e reduzido custo de substratos.

Em sistemas industriais, como o desenvolvido pela empresa Pzifer o Al é produzido geralmente pelo fungo *A. terreus* em fermentação submersa, empregando melaços derivados da produção de açúcar (KLEMENT; BÜCHS, 2013). Em escala laboratorial, existem relatos da utilização de hidrolisados ácidos e enzimáticos de matérias primas complexas, mas o processo de pré-tratamento descrito incrementa os custos de produção e reduz as vantagens econômicas de empregar resíduos como substrato. Quanto à fermentação no estado sólido, a informação encontrada na literatura é mínima, o que representa um desafio para a avaliação de matérias primas de origem agroindustrial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo biotecnológico eficiente de produção de ácido itacônico utilizando uma linhagem industrial do fungo *A. terreus*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecer as condições ótimas para produção de inóculo metabolicamente ativo para síntese de ácido itacônico (AI).
- ✓ Determinar os parâmetros de operação apropriados para maximizar a produção de AI por fermentação submersa com *A. terreus* NRRL 1960 em escala laboratorial.
- ✓ Testar a cepas *A. terreus* NRRL 265 utilizando as condições ótimas estabelecidas para *A. terreus* NRRL 1960.
- ✓ Realizar um estudo de cinética de produção de AI com os micro-organismos selecionados.
- ✓ Caracterizar e avaliar substratos complexos para a formulação de um meio de baixo custo para a produção de AI em fermentação submersa.
- ✓ Avaliar a possibilidade de produzir AI por fermentação em estado sólido.
- ✓ Realizar o aumento de escala do processo produtivo para reator tipo coluna de bolhas de 1 litro de capacidade.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ÁCIDOS ORGÂNICOS: ASPECTOS GERAIS

Os ácidos orgânicos constituem um grupo chave dentro dos bioprodutos químicos base, conhecidos como *building-blocks* ou blocos base de construção em síntese orgânica, os quais apresentam múltiplos grupos funcionais e possuem o potencial de serem transformados em novas famílias de moléculas de utilidade industrial (US DEPARTMENT OF ENERGY, 2004).

A maior parte dos ácidos orgânicos são produtos naturais ou intermediários do metabolismo microbiano, e são principalmente úteis na indústria química devido à presença dos grupos carboxila, não obstante o mercado atual desses compostos ainda seja relativamente reduzido e seu crescimento dependa do desenvolvimento de novos processos de produção economicamente sustentáveis (SAUER *et al.*, 2008).

Os ácidos succínico, málico e fumárico são alguns exemplos de moléculas que poderiam substituir o anidrido maleico, um derivado do petróleo de amplo uso industrial. Outros exemplos clássicos de ácidos orgânicos produzidos tradicionalmente correspondem ao ácido acético, cítrico e láctico, com um volume de mercado combinado de mais de 9 milhões de toneladas produzidas por ano (SAUER *et al.*, 2008). O ácido itacônico encontra-se dentro do grupo dos *building-block* mais promissores, identificados assim pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (*US Department of Energy*), o que tem motivado novas pesquisas para a redução dos custos produtivos (KLEMENT; BÜCHS, 2013).

3.2. ÁCIDO ITACÔNICO (AI)

Conhecido também como ácido metilsuccínico, o AI é um composto dicarboxílico insaturado de cinco carbonos, de cor branca e cristalino, precursor químico de uma grande quantidade de substâncias de uso industrial,

principalmente empregado na síntese de resinas e usado como bloco de construção para a produção de bio-plásticos, materiais absorventes, poliésteres, vidro artificial e preparação de compostos ativos em agricultura e farmácia (EL-IMAM; DU, 2014; OKABE *et al.*, 2009; KLEMENT; BÜCHS, 2013; STEIGER *et al.*, 2013). Na FIGURA 1 é apresentada a fórmula estrutural do AI e um resumo de algumas das famílias de compostos que podem ser derivadas a partir dele.

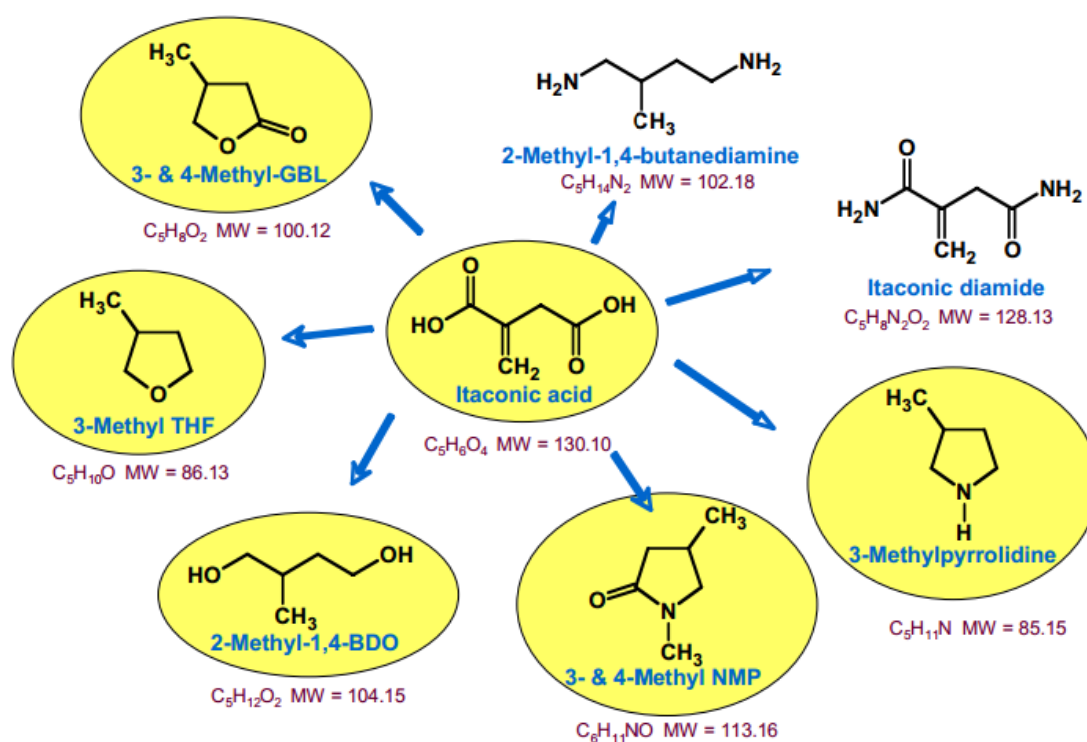


FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO ÁCIDO ITACÔNICO E FAMÍLIAS DE COMPOSTOS DERIVADOS. FONTE: US DEPARTMENT OF ENERGY (2004).

O AI apresenta uma solubilidade em água de aproximadamente 81 g/L (a 20°C), e massa molar de 130,1 g/L, sendo também solúvel em metanol, isopropanol e etanol. O resumo das principais propriedades físicas e químicas do composto é apresentado na TABELA 1.

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO AI.

ITEM	DESCRIÇÃO
Nome:	Ácido itacônico
Outros nomes:	Ácido 2-metilsuccínico, Ácido 2-metilenobutanodioco
Fórmula química:	C ₅ H ₆ O ₄
Massa Molar:	130,1 g/mol
Constante de Ionização (pKa):	3,85 / 5,45
Ponto de Fusão:	165°C
Ponto de Ebulição:	268°C
Densidade:	1,63 g/mL
Solubilidade em água:	81 g/L

FONTE: CARSTENSEN *et al.* (2013).

3.2.1. Rota de biossíntese

Originalmente, o AI foi descoberto por Baup, em 1837, como resultado da pirólise do ácido cítrico (BRESSLER; BRAUN, 2000), no entanto, só em 1932 foi reportado como um produto biológico sintetizado por *Aspergillus itaconicus*. Mais tarde, em 1939, Calam *et al.* identificaram o fungo *A. terreus* como um produtor mais promissor para esse composto (CALAM; OXFORD; RAISTRICK, 1939).

A síntese do AI é feita pela ação da enzima *cis-aconitato descarboxilase* (CAD), a qual age no Ciclo de Krebs ou Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), sendo uma rota metabólica similar à necessária para obtenção de ácido cítrico (CARSTENSEN *et al.*, 2013).

A compartimentalização das reações envolvidas na rota de biossíntese tem sido amplamente estudada por diversos autores, incluindo novas pesquisas para a expressão dos genes envolvidos na produção microbiana de AI (BLUMHOFF *et al.*, 2013). O TCA é um processo aeróbio de geração energética que ocorre na mitocôndria em eucariotos, enquanto a descarboxilação do *cis-aconitato* é realizada no citosol (JAKLITSCH *et al.*, 1991). Isso implica que além da enzima CAD, na síntese de AI, é preciso contar também com transportadores de

membrana mitocondrial, regulação das reações subsequentes do TCA e um sistema para reposição do oxalato e malato no citosol para seu transporte à matriz da mitocôndria (DWIARTI *et al.*, 2002). Na FIGURA 2 é apresentado o esquema proposto por Steiger *et al.* (2013) para a rota geral de biossíntese do AI.

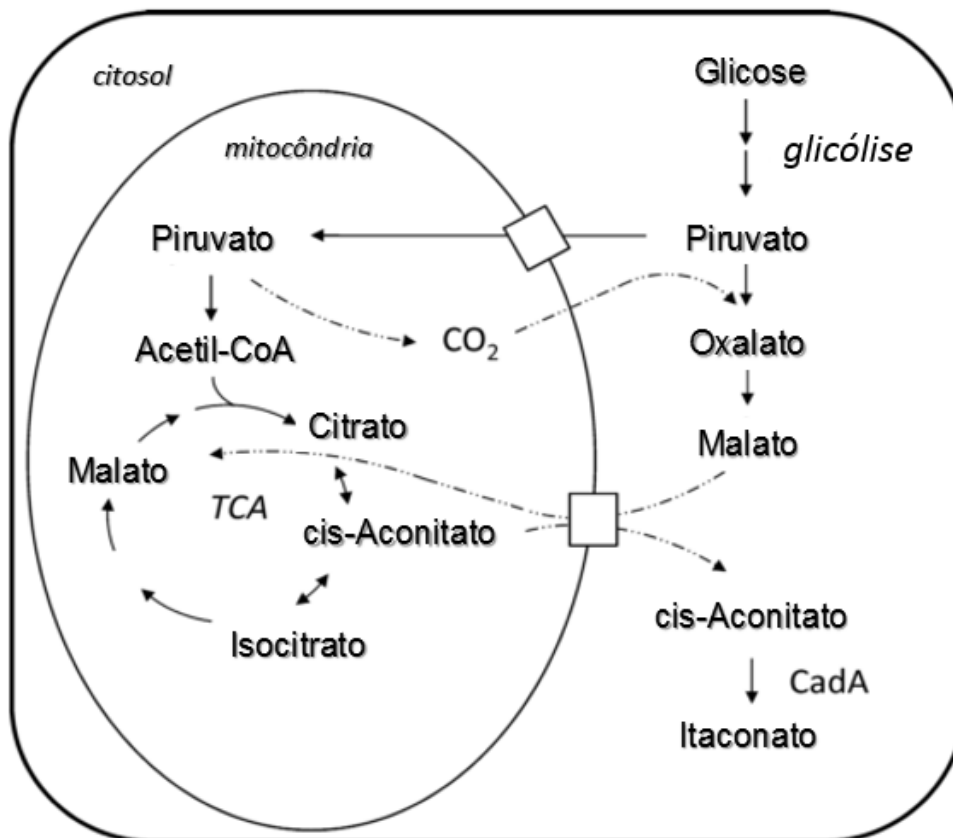


FIGURA 2 - ROTA METABÓLICA DE SÍNTESE DO ITACONATO E SUA COMPARTIMENTALIZAÇÃO EM MITOCÔNDRIA E CITOSOL. FONTE: STEIGER *et al.* (2013)

No Ciclo de Krebs, o piruvato obtido via *Embden–Meyerhof–Parnas* (EMP) ingressa sofrendo uma descarboxilação, que dá origem a acetil-CoA, e é condensado junto ao oxalacetato para formar citrato. Por meio da enzima aconitase, o citrato é convertido a isocitrato, em uma reação de dois passos: primeiro ocorre a desidratação para formar *cis*-aconitato e, posteriormente, uma reidratação para obter isocitrato. Na síntese do AI, o *cis*-aconitato é exportado para o citosol e sofre a descarboxilação mediada por CAD, gerando assim

itaconato ou AI (em meio ácido). O papel da enzima aconitase é fundamental, já que sua atividade deve manter-se em baixos níveis que favoreçam principalmente a formação de cis-aconitato, e evitando ao mesmo tempo o fluxo convencional de síntese de isocitrato. Isso é possível restringindo a disponibilidade do íon ferro, o qual funciona como cofator enzimático para este caso em específico.

As reações específicas envolvidas na geração do AI a partir de citrato se resumem na FIGURA 3.

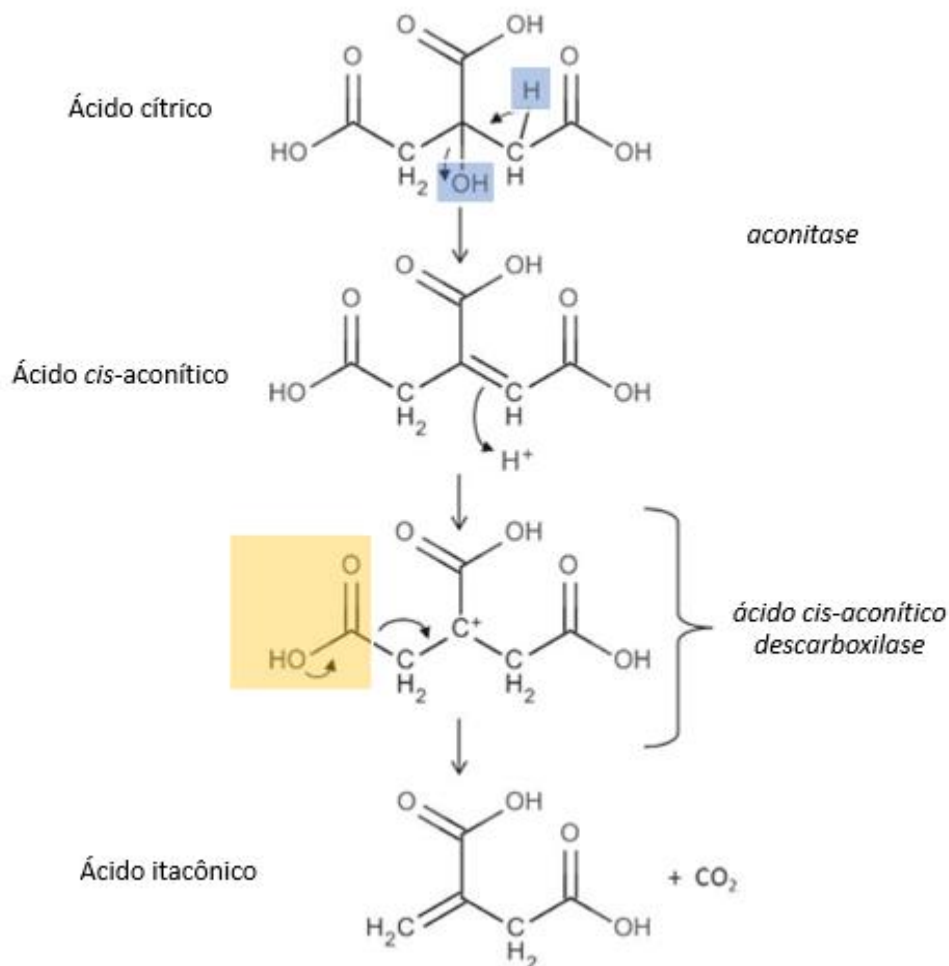


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REAÇÕES DE DESIDRATAÇÃO DO CITRATO E DESCARBOXILAÇÃO DO CIS-ACONITATO NA SÍNTESE DO ÁCIDO ITACÔNICO. FONTE: STEIGER *et al.* (2013)

3.3. *Aspergillus terreus*

Isolado inicialmente a partir de amostras de solo de Connecticut, Virginia e Califórnia nos Estados Unidos, *A. terreus* foi descrito no começo do século XX (THOM; CHURCH, 1918). Membro da família Trichocomaceae, *Aspergillus terreus* é um fungo esporulado e saprófito amplamente distribuído no solo, predominante em habitats ricos em matéria orgânica e vegetação em decomposição (LASS-FLÖRL, 2012; LEITE *et al.*, 2012). Isolado em meio Czapek ou Extrato de Malte, apresenta uma macromorfologia de colônias típica dos fungos filamentosos, formando hifas septadas e produzindo conídios que variam a coloração do cultivo de branco a marrom-canela durante a fase de esporulação (FIGURA 4).

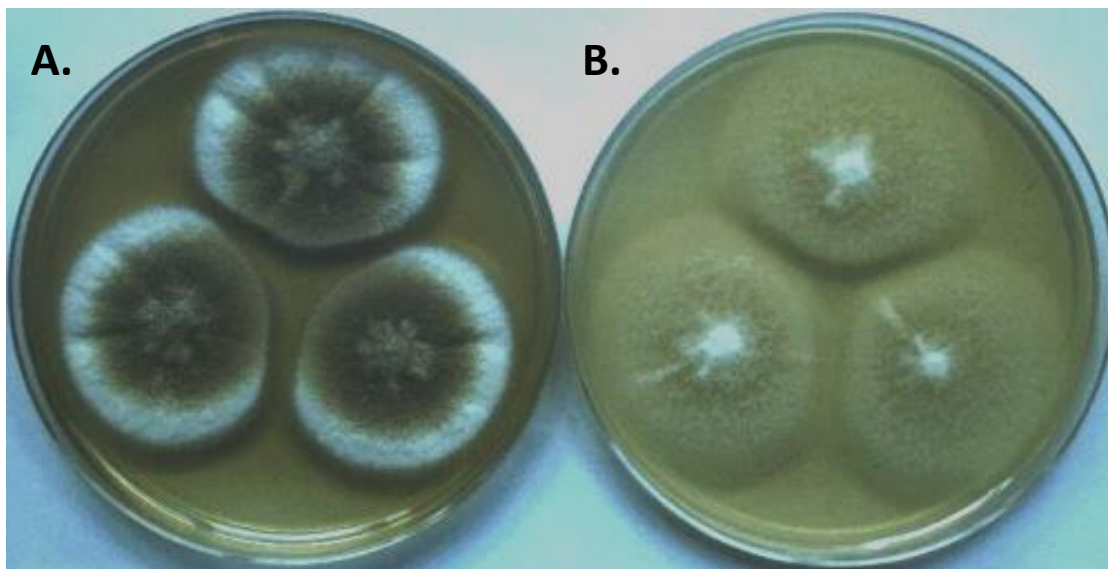


FIGURA 4 - MACROMORFOLOGIA DO FUNGO *A. terreus* INOCULADO EM ÁGAR EXTRATO DE MALTE (A) E ÁGAR CZAPEK (B). FONTE: ATHERTON (2003).

A. terreus distingue-se pela formação de conidióforos densos, com cabeças conidiais colunares e hialinas, vesículas semiesféricas de 10-20 μm de diâmetro

(FIGURA 5), esporos (conídios) marrons de 3-5 μm de diâmetro e estruturas globulares reprodutivas ligadas às hifas e conhecidas como aleurioconídias (STEINBACK *et al.* 2004). É um micro-organismo termotolerante, com crescimento ótimo na faixa de 35-40°C, e resistente a condições de pH baixo (2-3) (HEVEKERL; KUENZ; VORLOP, 2014).

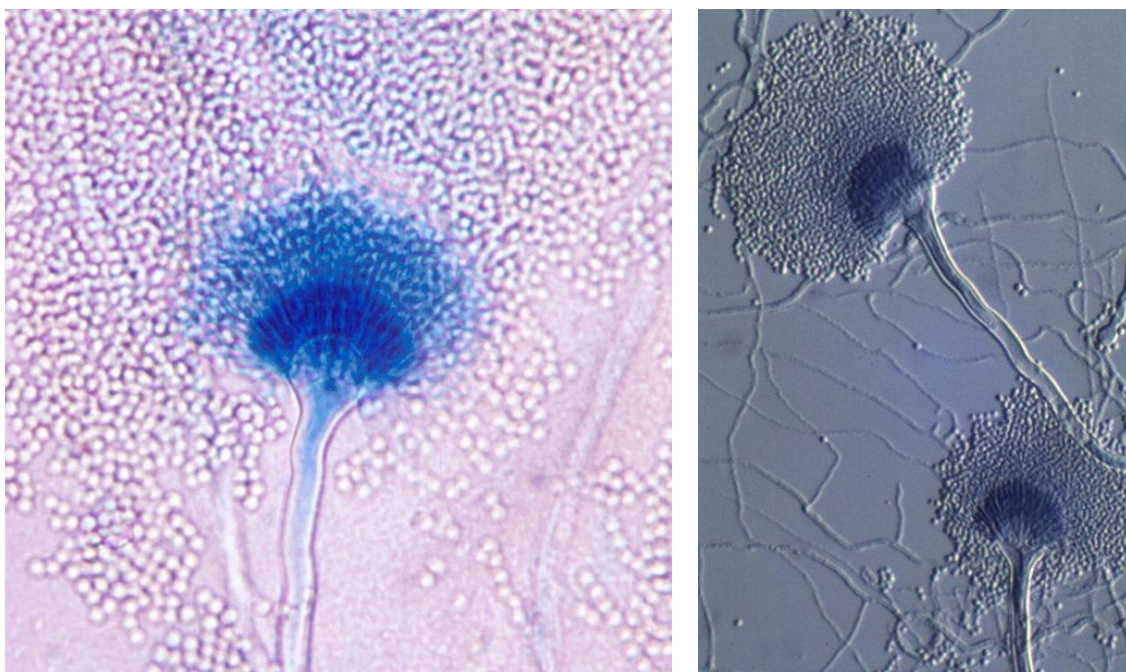


FIGURA 5 - ESTRUTURAS REPRODUTIVAS DO FUNGO *A. terreus*. FONTE: ATHERTON (2003).

Além de ser o maior produtor de AI reportado no âmbito industrial, *A. terreus* é usado também para síntese de ácido cis-aconítico e xilanase (KOCABAS; OGEL; BAKIR, 2014). É um produtor promissor de lovastatina, um fármaco empregado para controlar os níveis de colesterol em sangue (LAI; HUNG; LO, 2007).

3.4. FATORES QUÍMICOS E FÍSICOS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO

3.4.1. Fonte de Carbono

Considerando que o processo de produção de AI depende diretamente do Ciclo de Krebs, e um alto fluxo metabólico através da glicólise para gerar piruvato, é razoável que a utilização de glicose como fonte de carbono permita obter os melhores resultados possíveis. Porém, existem relatos acerca da capacidade de *A. terreus* para utilizar xilose ou sacarose para a síntese de AI (KAUTOLA *et al.*, 1985; SHIN *et al.*, 2013). No caso da sacarose, trata-se de um dissacarídeo gerado da união de glicose e frutose, dois açúcares facilmente incorporáveis na rota metabólica e, portanto, representa também uma fonte de carbono que permite obter elevados rendimentos (KAUTOLA, 1989).

No âmbito industrial, tem sido reportado o uso de melaço de cana ou beterraba para a produção de AI (KOBAYASHI; NAKAGAWA, 1975; NUBEL *et al.*, 1962; WILLKE; VORLOP, 2001). Pesquisas feitas em escala laboratorial indicam também a possibilidade de empregar hidrolisados de materiais amiláceos como farinhas de mandioca, trigo, batata, sorgo, batata doce (PETRUCCIOLI; PULCI; FEDERICI, 1999). Também tem sido reportado o uso de amido da palma de sagu (*Metroxylon sagus*) (DWIARTI *et al.*, 2007) mas obtendo rendimentos na faixa de 0,20-0,35 g de AI/g de açúcar consumido, o que representa aproximadamente 50% do rendimento obtido com outras fontes de carbono simples como sacarose ou glicose. Reddy e Singh (2002) relatam também o melhoramento de cepas industriais de *A. terreus* para o aproveitamento de amido de milho e frutas recusadas para venda no mercado, obtendo produtividades e rendimentos ligeiramente inferiores àqueles reportados para cepas convencionais usando glicose como única fonte de carbono (REDDY; SINGH, 2002). Resultados similares foram obtidos por Yahiro *et al.* (1997) com cepas melhoradas por mutagênese aleatória com luz UV (YAHIRO *et al.*, 1997).

Quanto a materiais ricos em lignocelulose, existem pesquisas que utilizam hidrólise ácida e enzimática para pré-tratamento do resíduo obtido no processamento de sementes de *Jatropha curcas* na produção de óleo, obtendo concentrações finais de aproximadamente 24 g de AI/L (MURALIDHARARAO *et al.*, 2007).

Finalmente, tem sido reportado mais recentemente o uso de glicerol como fonte de carbono viável na produção de AI. Neste caso, a rota metabólica de incorporação desse composto ainda permanece sem ser esclarecida, porém os resultados de concentração final de AI e produtividade para determinadas cepas de *A. terreus* se assemelham aos obtidos com a utilização de glicose (JAHIM *et al.*, 2006; JARRY; SERAUDIE, 1997; JUY; OREJAS; LUCCA, 2010; VASSILEV *et al.*, 2012).

3.4.2. Fonte de Fósforo

Em bioprocessos, quando o produto final a ser obtido é um metabólito, é preciso restringir a síntese de biomassa para favorecer a geração do composto de interesse e direcionar a atividade metabólica e transformação da fonte de carbono no produto desejado. Isto é possível limitando um dos nutrientes básicos necessários para o crescimento e proliferação celular. No caso da produção de AI por *A. terreus*, é empregada limitação da fonte de fósforo.

O fósforo (P) é um componente essencial de moléculas biológicas, imprescindível para a síntese de ácidos nucleicos e crítico nas reações bioquímicas de liberação e armazenamento de energia mediadas pelo ATP (adenosina trifosfato), sendo fundamental no metabolismo intermediário de proteínas, lipídios e carboidratos. Os grupos fosfatos apresentam um papel primário na regulação de proteínas intracelulares mediante mecanismos de fosforilação ou desfosforilação, e agem sobre o equilíbrio ácido-base dos fluidos através do sistema tampão fosfato. Além disso, o fósforo é um elemento constituinte de fosfolipídios estruturais nas membranas celulares, tornando-se

necessário para a absorção, movimentação, deposição e utilização de diferentes substâncias em nível celular (VIERA, 2010).

Diversos estudos têm sido realizados para determinar a fonte ótima de fósforo na produção de AI. A limitação de P ocasiona uma restrição da capacidade de gerar biomassa e uma redução na concentração do ATP e, portanto, uma diminuição no nível energético da célula, acelerando assim o fluxo através da glicólise. Isto ocorre devido a uma diminuição nas reações de fosforilação oxidativa e conseqüente incremento da fosforilação ao nível de substrato e a regeneração do NAD(P)H. Assim, as rotas da glicólise e respiração celular operam dissociadas, permitindo um alto fluxo metabólico de conversão de glicose a cis-aconitato e, finalmente, a AI (KLEMENT; BÜCHS, 2013).

De acordo com a literatura, o KH_2PO_4 é a fonte de P predileta para obtenção de AI, utilizado em uma faixa variável de 0,025- 1,25 g/L (GAO *et al.*, 2013; KLEMENT; BÜCHS, 2013; KUENZ *et al.*, 2012; LI; PFELZER; *et al.*, 2013; LI; SACHDEVA; *et al.*, 2013; OKABE; OHTA; PARK, 1993; SHIN *et al.*, 2013; STEIGER *et al.*, 2013; VASSILEV; KAUTOLA; LINKO, 1992). Existem também numerosos relatos do uso de milhocina (*corn steep liquor*) na formulação do meio de cultivo, a qual aporta entre 2-3% de fósforo adicional (DWIARTI *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2013; GYAMERAH, 1995a, b; KOCABAS; OGEL; BAKIR, 2014; PARK *et al.*, 1994; YAHIRO; SHIBATA; *et al.*, 1997).

A influência da concentração de fosfato no meio foi testada por Kuenz *et al.* (2012), cuja pesquisa estabeleceu uma dose ótima de 0,1 g/L KH_2PO_4 como única fonte de P (KUENZ *et al.*, 2012). Adicionalmente, Gao *et al.* (2013) indicam que para biomassa produzida em um meio exclusivo de germinação de esporos, e transferida a um segundo meio de produção, os maiores teores de AI foram obtidos quando foi eliminada a fonte de P na fase produtiva. Além disso, o estudo demonstrou que concentrações crescentes de KH_2PO_4 interferem na estrutura dos *pellets* gerados em sistema de fermentação submersa, incrementando os diâmetros dos agregados celulares, os quais poderiam afetar a transferência de oxigênio aos estratos internos e reduzir assim a síntese de AI (GAO *et al.*, 2013).

3.4.3. Fonte de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento estrutural básico e imprescindível de moléculas orgânicas fundamentais como as proteínas, ácidos nucleicos (DNA, RNA), lipídios complexos, entre outros. Portanto, constitui um componente essencial do meio de cultura (SMITH, 2009).

Em diversas pesquisas tem sido comprovado que a fonte de N exerce uma influência importante na ativação de rotas metabólicas específicas, afetando os resultados e rendimentos de um determinado processo fermentativo. Por exemplo, na produção de ácido cítrico, existe ampla informação que expõe o efeito da concentração e natureza da fonte de N na síntese do referido ácido orgânico (RODRIGUES, 2006).

De acordo com os dados encontrados na literatura, o amônio é a fonte de N predileta utilizada na produção de AI por *A. terreus*. No entanto, ainda não existe consenso referente ao seu metabolismo. Uma das teorias mais fortes propostas por Papagianni *et al.* (2005) estabelece que o amônio poderia atuar evitando a inibição da enzima fosfofrutoquinase (PFK) na glicólise quando existe um alto nível energético ocasionado por altas proporções de C:N (Carbono:Nitrogênio) no meio de cultivo. Neste cenário, a enzima PKF apresenta um funcionamento afetado devido ao incremento do fluxo da rota metabólica Embden-Meyerhof, induzido pela depleção da fonte de P no meio de cultura (KLEMENT; BÜCHS, 2013).

Adicionalmente, o estudo efetuado por Kuenz *et al.* (2013) estabeleceu que a redução da fonte de N simultânea à limitação do P afeta os resultados finais de AI obtido, devido a uma limitação excessiva da biomassa que pode ser gerada a partir de um meio de cultura mínimo para N e P.

A limitação na fonte de nitrogênio como estratégia para produção do AI tem sido empregada unicamente em estudos com micro-organismos como *Ustilago maydis* e *Pseudozyma antarctica*, porém não existem registros de estudos metabólicos referentes ao mecanismo de regulação ocorrido em tais fungos (CHANDRAGIRI; SASTRY, 2011; KLEMENT; BÜCHS, 2013).

3.4.4. Outros macronutrientes e metais traço

Na produção de AI, a presença de determinados elementos traço no meio de cultura é um dos fatores que poderia interferir na obtenção de resultados positivos, e uma das razões pelas quais pode ser difícil a utilização de matérias-primas complexas em sistemas produtivos (KAUTOLA *et al.*, 1991).

Como foi previamente dito (Ver 3.2.1 *Rota de biossíntese*), a síntese do AI é dependente de uma estrita regulação no Ciclo de Krebs, sendo especialmente importante a atividade parcial da enzima aconitase, cujo cofator é o íon ferro. Portanto, altos níveis desse metal podem incrementar a atividade da enzima e ocasionar que seja gerado isocitrato em vez do itaconato. Outros metais como manganês e magnésio agem também como cofatores enzimáticos no TCA. Na FIGURA 6 são ilustradas as reações enzimáticas do Ciclo de Krebs onde intervêm os metais mencionados.

Adicionalmente, os elementos Ca^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} são determinantes para a formação de *pellets* de micélio com diâmetro reduzido e pouco densos (GYAMERAH, 1995a). Segundo Kuenz *et al.* (2012), doses de até 20 g/L de CaCl_2 permitem obter um crescimento tipo pseudo-levedura que favorece o intercâmbio de gases e nutrientes com o meio de cultura, sendo a concentração ótima para produção de AI de 5 g/L CaCl_2 .

O cálcio atua ao mesmo tempo como inibidor da enzima itaconato oxidase, a qual catalisa a degradação de AI a ácido itatartárico (GYAMERAH, 1995a). Esse elemento é também cofator da enzima fosfoenol piruvato descarboxilase (PEPC), a qual conduz à formação de oxaloacetato a partir de piruvato na matriz mitocondrial. Esta última reação é necessária para repor os intermediários metabólicos do Ciclo de Krebs que são condensados posteriormente com uma segunda molécula de piruvato para formar citrato e finalmente itaconato (KLEMENT; BÜCHS, 2013).

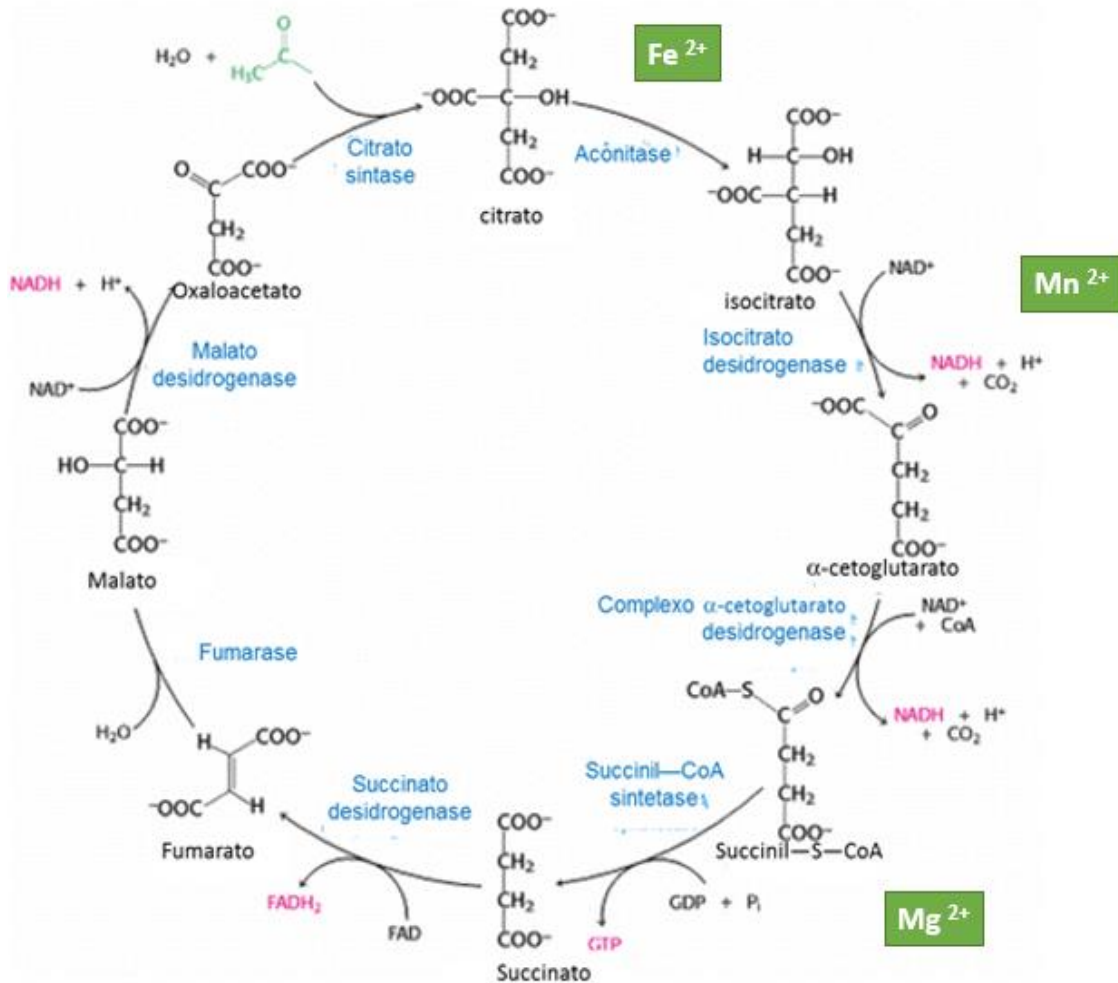


FIGURA 6 - DETALHE DAS REAÇÕES ENVOLVIDAS NO CICLO DE KREBS E DOS COFATORES ENZIMÁTICOS QUE INTERVÊM NO PROCESSO DE SÍNTESE DE AI.
 FONTE: MOTTA (2009).

3.4.5. Álcoois inferiores

A utilização de álcoois inferiores para produção de ácidos orgânicos foi proposta inicialmente por Moyer (1954). Como reportado em sua patente, comprovou-se o efeito de etanol, metanol e isopropanol na produção de ácido cítrico, ácido itacônico e outros ácidos carboxílicos para o acondicionamento do micélio, incrementando a permeabilidade da membrana celular (MOYER, 1954). A estratégia tem sido amplamente utilizada na produção de ácido cítrico, onde é possível observar um aumento no rendimento quando são utilizados

carboidratos não processados. Na síntese de citrato, alguns dos efeitos negativos ocasionados pelas altas concentrações de metais traço podem ser vencidos mediante a adição de 1-5% de álcoois como metanol, etanol ou isopropanol (VANDENBERGHE *et al.*, 1999).

No caso do Al não existem relatos posteriores ao trabalho de Moyer para o uso de álcoois inferiores, sendo portanto um dos fatores de interesse que deve ser abordado e representando uma variável promissora para a fermentação de substratos complexos.

3.4.6. pH

O potencial de hidrogênio (pH) do meio de cultivo é um dos principais fatores que intervêm na produção de Al. Porém, na literatura não existe um consenso sobre a faixa ótima quando é empregado o fungo *A. terreus*, sendo que diferentes autores reportam que para cepas distintas dessa espécie o pH pode variar de 1,55 e 5,8 como valor inicial da fermentação (AHMED EL-IMAM *et al.*, 2013; GYAMERAH, 1995a).

Para a cepa NRRL 1960, Riscaldati *et al.* (2000) realizaram um estudo do efeito das variáveis agitação e pH, no qual foi comprovado que em sistemas de biorreator STR (*Stirred Tank Reactor*) um valor de pH inferior a 2 ocasiona uma maior vulnerabilidade ao estresse hidromecânico produzido pela agitação constante do meio. Nessa pesquisa concluiu-se também que valores de pH próximos a 3,0 permitem uma maior transferência de oxigênio que a observada em faixas de pH menores (RISCALDATI *et al.*, 2000).

O controle de pH é relevante também para evitar a formação de subprodutos não desejados. Na patente de Batti e Schweiger (1963) indicou-se que, em fermentações lançadas com pH inferior a 3, foi observada a síntese conjunta de ácido succínico e ácido itatartárico como produtos secundários, representando aproximadamente 15% da acidez do meio (BATTI; SCHWEIGER, 1963).

Na fase de produção de biomassa, a morfologia de *A. terreus* pode ser negativamente influenciada por valores de pH inferiores a 2 ou superiores a 5. Além disso, a acidez do meio, unida à pressão osmótica ocasionada pelas altas concentrações iniciais de açúcares fermentáveis, permite gerar condições assépticas no sistema, o que é de grande utilidade em processos industriais (KLEMENT; BÜCHS, 2013).

Um estudo recente publicado por Hevekerl *et al.* (2014) indicou que uma troca no pH do meio fermentativo, logo após 48 horas do início do processo, pode incrementar os rendimentos, produtividades e teores volumétricos obtidos para Al. Demonstrou-se a eficácia da estratégia para a cepa *A. terreus* DSM-23081, empregando-se como inóculo uma suspensão de esporos e pH inicial de 3,1. As cinéticas do processo demonstraram um aumento de aproximadamente 30% no produto final quando foi realizada uma troca para pH 6 durante o terceiro dia de fermentação. Neste caso, a mudança no pH foi realizada logo após a fase de germinação de esporos e no começo da fase de produção de Al (HEVEKERL; KUENZ; VORLOP, 2014).

Finalmente, o pH é uma variável que influencia a solubilidade máxima do Al no meio de cultura e, portanto, é também um fator de importância nas fases de recuperação e purificação do produto. Condições ácidas de fermentação reduzem os custos associados ao controle para neutralização do pH, além de permitir a cristalização direta do Al encontrado no sobrenadante (KLEMENT; BÜCHS, 2013).

3.4.7. Temperatura

Em termos gerais, os processos fermentativos apresentam uma faixa ótima de temperatura para o crescimento e proliferação de micro-organismos específicos. No caso da síntese de Al por *A. terreus*, os dados encontrados na literatura indicam uma faixa adequada de 30-40°C, o que varia de acordo com a cepa utilizada, mas se mantém na média de 35°C (JAHIM *et al.*, 2006; LI; SACHDEVA; *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 1994; VAN DER WERF *et al.*, 2013;

YAHIRO *et al.*, 1995). O desenvolvimento de um processo biotecnológico tolerante a altas temperaturas apresenta as vantagens de requerer um menor esforço para o controle do calor gerado pela fermentação, além de incrementar a solubilidade do composto final sintetizado e, portanto, facilitar o *downstream* do produto.

3.4.8. Aeração

O fornecimento contínuo e ininterrupto de oxigênio é fundamental na síntese de AI. De acordo a Klement e Büchs (2013), é preciso 1,5 mol de O₂ por cada mol de AI produzido a partir de glicose. Devido ao fluxo desacoplado entre a glicólise e o Ciclo de Krebs, é preciso também uma alta atividade da cadeia transportadora de elétrons, a qual permite regenerar o NAD a partir do NADH produzido na glicólise, utilizando o O₂ como acceptor final de elétrons. A reação é essencial para evitar a inibição da enzima fosfofrutoquinase (PFK) da glicólise e a citrato sintase (CS) do TCA, as quais são reguladas pelas concentrações de NADH (KLEMENT; BÜCHS, 2013).

Em fermentação submersa tem sido demonstrado que interrupções no abastecimento de oxigênio podem resultar na perda da capacidade de conversão do açúcar em AI, embora não sejam observados efeitos colaterais na síntese de biomassa celular. A FIGURA 7 exemplifica os resultados obtidos por Gyamerah (1995) para culturas de *A. terreus* NRRL1960 que foram submetidas a períodos curtos de privação da fonte de O₂, sendo evidente a perda de mais de 50% da produtividade logo após alguns minutos em anoxia.

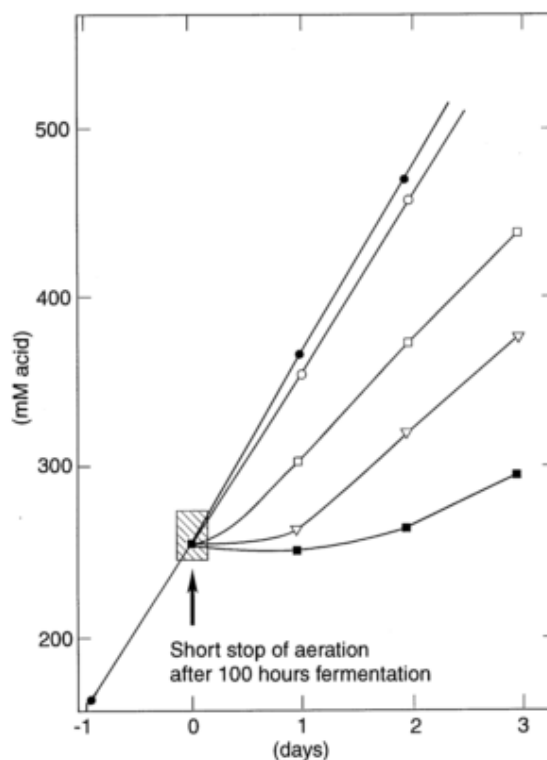


FIGURA 7 - EFEITO DE PAUSAS NA AERAÇÃO DO CULTIVO DE *A. terreus* NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO. ● 0 min, ○ 1 min, □ 3 min, △ 5 min, ■ 10 min. FONTE: GYAMERAH (1995b)

A alta dependência de oxigênio e sensibilidade aos períodos curtos de anoxia dificulta a reutilização da biomassa gerada em um processo em batelada, ou a implementação de processos semicontínuos em escala industrial. Isso foi corroborado por Park *et al.* ao tentarem escalonar sem sucesso um processo tipo *repeated batch* (PARK *et al.*, 1994).

Para garantir uma concentração ótima de oxigênio dissolvido em sistemas de escala ampliada, é preciso incrementar a velocidade de agitação nos biorreatores STR. Como ocorre com outros fungos filamentosos, *A. terreus* pode sofrer danos celulares devido ao estresse hidromecânico e forças de cisalhamento próprias desse tipo de sistema, afetando os resultados finais obtidos. Devido a isto, diversos autores têm trabalhado com o escalonamento em reatores tipo *air-lift*, os quais permitem maximizar os rendimentos e produtividades do processo (OKABE; OHTA; PARK, 1993; YAHIRO; TAKAHAMA *et al.*, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A fase experimental do projeto foi realizada no Laboratório de Processos Biotecnológicos I (LPBI) da Universidade Federal do Paraná, localizado em Curitiba. Na TABELA 26 da seção de 9. ANEXOS apresenta-se um esquema com o resumo da ordem cronológica da realização dos experimentos e os resultados para fermentação submersa, enquanto as seções 4. MATERIAL E MÉTODOS e 5. RESULTADOS são descritas na ordem lógica de apresentação de dados.

4.1. MICRO-ORGANISMOS EMPREGADOS

Duas cepas do fungo *A. terreus* foram testadas para a produção de AI. Os micro-organismos foram adquiridos da coleção NRRL (*National Center for Agricultural Utilization Research*, Peoria, Illinois) e correspondem às cepas NRRL 1960 e NRRL 265. As duas cepas foram conservadas em tubos inclinados contendo ágar Sabouraud a uma temperatura de 4°C por um período de até três meses. Para a manutenção dos micro-organismos em condições metabolicamente ativas e produção dos esporos, foram realizados repiques em ágar Czapek e ágar Sabouraud, os quais foram incubados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL de meio de cultivo. As culturas foram mantidas por 12 dias em estufa a 28°C até que se atingisse a esporulação.

A maior parte dos experimentos realizados na presente pesquisa foram realizados empregando a cepa NRRL 1960, já que se trata de um micro-organismo reportado como produtor em nível industrial. A cepa NRRL 265 foi utilizada para fins de comparação em dois dos experimentos adiante indicados, e testada unicamente sob condições previamente otimizadas para *A. terreus* NRRL 1960.

4.2. RECUPERAÇÃO DOS ESPOROS

Para atingir esporulação, as cepas de *A. terreus* foram cultivadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de ágar Sabouraud ou ágar Czapek a 28°C, durante 8-10 dias.

Os esporos foram coletados adicionando-se 50 mL de solução aquosa 0,01% de Tween 80 e uma barra magnética, previamente esterilizadas. A remoção das estruturas reprodutivas foi realizada de forma mecânica com auxílio de agitador magnético por um período de 15 minutos.

Estimou-se a concentração de esporos na suspensão, diluída 10^{-1} ou 10^{-2} , através de contagem direta empregando-se uma câmara de Neubauer e microscópio óptico.

A suspensão de esporos de *A. terreus* foi mantida a 4°C por um período máximo de 4 dias, até seu uso.

4.3. ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO DE INÓCULO

Duas metodologias de inoculação foram avaliadas para a produção de Al por *A. terreus* em fermentação submersa. A primeira delas consistiu na utilização direta de uma alíquota da suspensão de esporos, inoculada no meio de produção de Al (0,1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 g/L ureia, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L de glicose, e pH 3 ajustado com HCl 10%) baseado na composição descrita por Kuenz *et al.* (2012) mantendo uma concentração final de 1×10^6 esporos/mL, 120 rpm, 32°C durante 10 dias. As condições físicas foram definidas segundo dados da literatura (KUENZ *et al.*, 2012; PETRUCCIOLI; PULCI; FEDERICI, 1999; VASSILEV *et al.*, 2012).

Adicionalmente testou-se um inóculo vegetativo, cuja biomassa foi produzida em um meio sintético composto por: 0,1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L NH_4NO_3 ,

1 g/L MgSO₄ 7H₂O, 0,5 g/L CaCl₂ 2H₂O, 10 mg/L FeSO₄ 7H₂O, 8 mg/L ZnSO₄ 7H₂O, 13,1 mg/L CuSO₄ 5H₂O, 50 g/L de glicose, e pH 3 ajustado com HCl 10%. Neste caso, a suspensão de esporos foi utilizada como pré-inóculo, mantendo-se a concentração de 1x10⁶ esporos/mL, e incubando-se durante 48 horas a 32°C e 140 rpm em *shaker* orbital. Segundo o indicado na literatura (JAHIM *et al.*, 2006; KAUTOLA *et al.*, 1985; OKABE; OHTA; PARK, 1993; PARK; OHTA; OKABE, 1993; PETRUCCIOLI; PULCI; FEDERICI, 1999; RISCALDATI *et al.*, 2000; YAHIRO; TAKAHAMA; *et al.*, 1997), a suspensão de biomassa gerada foi usada em uma proporção de 10% (v/v) para inocular o meio de produção de Al, indicado anteriormente, incubando-se a 120 rpm, 32°C durante 8 dias adicionais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo.

4.3.1. Produção de inóculo vegetativo: Estudo da morfologia ótima de *A. terreus* para produção de Al

Com base nos dados encontrados na literatura, as variáveis físicas pH, concentração inicial de esporos no pré-inóculo e proporção entre o volume de fermentação e o volume do frasco (devido a variações no intercâmbio gasoso) foram identificadas como fatores que poderiam influenciar a morfologia da biomassa gerada na produção de inóculo vegetativo (GAO *et al.*, 2013; KAUTOLA; VASSILEV; LINKO, 1990; OKABE; OHTA; PARK, 1993; RISCALDATI *et al.*, 2000). Além disso, foram testadas duas composições de meio, com diferenças na fonte de nitrogênio, ferro e concentração de cálcio, devido a uma falta de consenso entre diferentes grupos de pesquisa (EL-IMAM; DU, 2014; JUY; OREJAS; LUCCA, 2010; OKABE *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2013; TEVZ; BENCINA; LEGISA, 2010).

Realizou-se um planejamento fatorial de dois níveis, três fatores e três repetições nas condições de pontos centrais para determinar o efeito das variáveis físicas na fase de produção de inóculo. Na TABELA 2 são apresentados os níveis escolhidos para cada fator. A proporção de volume

fermentação / volume frasco corresponde a volumes de 50 mL, 75 mL e 100 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, diâmetro de 82 mm.

TABELA 2 - PARÂMETROS FÍSICOS E NÍVEIS AVALIADOS NO ESTUDO DE MORFOLOGIA ÓTIMA DE *A. terreus* PARA A PRODUÇÃO DE AI

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
pH	3	3,5	4
Esporos/mL	1×10^5	$5,5 \times 10^5$	1×10^6
Proporção volume fermentação / volume frasco (VF/Vf)	0,2	0,3	0,4

O planejamento e análise dos dados gerados foram realizados com o auxílio do *software* STATISTICA 7 de StatSoft. A matriz experimental e o detalhe da distribuição dos experimentos efetuados são ilustrados na TABELA 3.

TABELA 3 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO PARA O ESTUDO DE MORFOLOGIA ÓTIMA PARA PRODUÇÃO DE AI.

Experimento	pH	Esporos/mL	Proporção volume fermentação / volume frasco (VF/Vf)
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9(C)	0	0	0
9(C)	0	0	0
9(C)	0	0	0

Esse planejamento foi repetido para as duas composições de meio de cultivo, indicadas na TABELA 4 como meio de cultivo “Inóculo A” e meio de cultivo “Inóculo B”. Cada tratamento foi inoculado com esporos da cepa industrial *A. terreus* NRRL 1960 e incubado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, *shaker* orbital a 120 rpm, 32°C durante 48 horas para obter a biomassa com morfologia diferenciada, a qual foi utilizada como inóculo no meio de produção descrito (TABELA 4). As condições de fermentação na fase de geração de AI foram fixadas para todos os tratamentos, mantendo pH inicial de 3, volume de fermentação de 50 mL (proporção de 0,2 com o volume do frasco), 32°C e 120 rpm durante 6 dias. Após finalizada a fermentação, as imagens de diferenças morfológicas foram registradas com câmara Samsung GT-S5830 de 5 MP, empregando uma placa de Petri para a observação de macromorfologia e microscópio óptico para a micromorfologia de cada cultura.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO EMPREGADOS NO ESTUDO DE MORFOLOGIA ÓTIMA PARA PRODUÇÃO DE AI.

Componente	Meio Inóculo A	Meio Inóculo B	Meio de Produção AI
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,1	0,1	0,1
NH ₄ NO ₃ (g/L)	-	5	-
NH ₄ Cl (g/L)	1	-	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	1,25	-	1,25
Ureia - CH ₄ N ₂ O (g/L)	1,15	-	1,15
MgSO ₄ 7H ₂ O (g/L)	1	1	1
CaCl ₂ 2H ₂ O (g/L)	5	0,5	5
FeCl ₃ 6H ₂ O (mg/L)	1,67	-	1,67
FeSO ₄ 7H ₂ O (mg/L)	-	10	-
ZnSO ₄ 7H ₂ O (mg/L)	8	8	8
CuSO ₄ 5H ₂ O (mg/L)	13,1	13,1	13,1
Glicose (g/L)	50	50	100

4.4. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO SINTÉTICO

Neste trabalho, a síntese de AI em meio quimicamente definido ou sintético foi empregada como sistema modelo. Como parte das avaliações preliminares foram testados os meios Czapek com incremento na fonte de carbono (3 g/L NaNO₃; 0,5 g/L MgSO₄ 7H₂O; 0,5 g/L KCl; 0,01 g/L FeSO₄ 7H₂O; 1,0 g/L K₂HPO₄; 100 g/L sacarose) e o meio proposto por Kuenz *et al.* (2012) com modificação na fonte de nitrogênio (0,1 g/L KH₂PO₄; 3 g/L NaNO₃; 1g/L MgSO₄ 7H₂O; 10 g/L CaCl₂ 2H₂O; 1,67mg/L FeCl₃ 6H₂O; 8 mg/L ZnSO₄ 7H₂O; 13 mg/L CuSO₄ 5H₂O; 100 g/L glicose). As fermentações foram iniciadas em pH 3,1, 120 rpm e 30°C, com inóculo de 1x10⁶ esporos/mL *A. terreus* NRRL 1960, durante 12 dias.

A partir dos resultados obtidos, foram efetuados novos testes para identificar a composição ideal do meio sintético para produção de AI.

4.4.1. Fonte de Nitrogênio (N)

Com base nos dados encontrados na literatura (DWIARTI *et al.*, 2007; JUY; OREJAS; LUCCA, 2010; KUENZ *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 1994; VASSILEV *et al.*, 2012), foi testado o nitrato de amônio (NH_4NO_3) como fonte de nitrogênio e comparado com composições alternativas, empregando reagentes de menor custo e maior facilidade de aquisição no território brasileiro. Seguindo a composição basal estabelecida por Kuenz *et al.* (2012), os meios foram preparados para uma concentração final de 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,67 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 13 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 100 g/L glicose, pH 3. No estúdio de Kuenz *et al.* (2012) o NH_4NO_3 é empregado como única fonte de nitrogênio, indicando que o nitrato e o amônio são consumidos em diferentes etapas do processo fermentativo. Devido às dificuldades técnicas relacionadas à aquisição e uso do NH_4NO_3 , foram desenhadas composições alternativas mantendo a mesma concentração global de nitrogênio e/ou mesma concentração de amônio. A TABELA 5 apresenta as fontes de nitrogênio e concentrações avaliadas. Uma vez autoclavados, os meios foram inoculados com 1×10^6 esporos/mL de *A. terreus* NRRL 1960 e incubados a 120 rpm e 33°C, durante 12 dias.

TABELA 5 - DETALHE DA COMPOSIÇÃO DIFERENCIAL DA FONTE DE NITROGÊNIO (g/L) TESTADA PARA PRODUÇÃO DE AI.

Fonte de N	A	B	C	D	E	F
NaNO_3	3	-	2	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	3,1	1,5	-	1,5	-
Ureia $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	-	-	-	2,25	1,5	-
NH_4NO_3	-	-	-	-	-	3

Partindo dos resultados obtidos no teste inicial para determinação de fonte de nitrogênio, foi realizada uma segunda etapa com o objetivo de estabelecer as

melhores fontes e proporções de amônio e ureia. Na TABELA 6 são apresentadas as novas variações testadas para a fonte de nitrogênio. Os tratamentos mantêm a concentração global de nitrogênio em 1,05 g/L, variando a natureza da fonte. A composição básica dos sais e parâmetros físicos de fermentação foram mantidos nos mesmos níveis descritos anteriormente. As culturas foram avaliadas durante 6 dias de incubação, sob condições previamente indicadas.

TABELA 6 - OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO PARA PRODUÇÃO DE Al.

Fonte de N	E	E-1	E-2	E-3
NH ₄ Cl	-	-	2	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	2	-	1,25
Ureia CH ₄ N ₂ O	1,5	1,35	1,15	1,15

4.4.2. Efeito do pH

O valor do parâmetro físico pH foi avaliado para o início da fase de produção de Al por *A. terreus*. Estudos recentes indicam que um incremento pontual do pH após germinação e desenvolvimento dos esporos (aproximadamente 2,1 dias) pode maximizar a produção de Al em até 68% (HEVEKERL; KUENZ; VORLOP, 2014), quando é empregado um inóculo de estruturas reprodutivas diretamente no meio de produção.

Com o objetivo de comparar o efeito do pH na fase de síntese de Al e devido à relevância das informações emergentes, decidiu-se testar as condições de pH 5 e 6 no começo da etapa de produção do ácido orgânico, comparando com um controle de pH 3 padronizado na presente pesquisa. Para isso, foi preparado um inóculo vegetativo de acordo com a metodologia otimizada previamente, utilizando uma concentração de 1×10^6 esporos/mL no meio de produção de biomassa (0,1 g/L KH₂PO₄, 5 g/L NH₄NO₃, 1 g/L MgSO₄ 7H₂O, 0,5

g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L de glicose, pH 3), incubando-se durante 48 horas a 32°C e 140 rpm em *shaker* orbital. A suspensão de biomassa gerada nesta etapa foi empregada como inóculo em uma proporção de 10% (v/v) para os tratamentos com pH inicial de 3, 5 e 6, em um meio de produção de Al contendo 0,1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 g/L ureia, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L de glicose, e incubando-se a 140 rpm, 32°C durante 6 dias.

4.4.3. Cinética de produção em meio sintético

Uma vez estabelecida tanto a composição do meio sintético como o protocolo de cultivo de inóculo vegetativo, foi realizada uma cinética de produção de Al durante 8 dias. Para cada ponto determinou-se em triplicata a massa seca, pH, açúcar residual e concentrações de Al no sobrenadante.

A biomassa empregada como inóculo foi gerada segundo o protocolo estabelecido na presente pesquisa, otimizada para garantir a morfologia ótima que maximizasse a síntese de Al. O meio de produção de biomassa (0,1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L NH_4NO_3 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L de glicose, pH 3) foi inoculado com 1×10^6 esporos/mL, e incubado a 32°C, 140 rpm por 48 horas. Uma vez transcorrida essa etapa, a suspensão de biomassa gerada foi inoculada em proporção de 10% (v/v) em 24 frascos Erlenmeyer contendo 45 mL do meio de produção de Al (0,1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 g/L ureia, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L de glicose, e pH 3), incubando-se a 32°C e 120 rpm. A cada dia de cultivo foram retirados três frascos Erlenmeyer correspondentes a réplicas de um mesmo ponto (tempo de fermentação), e realizadas as análises correspondentes.

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos de velocidade específica de crescimento (μ), tempo de duplicação (td), velocidade volumétrica máxima de

consumo de substrato (r_{smax}), rendimento de substrato em AI ($Y_{P/S}$), rendimento de AI por biomassa produzida ($Y_{P/X}$) e produtividade volumétrica horária (r_p), foram utilizadas as seguintes equações:

$$\mu_{max} = \frac{\ln X - \ln X_0}{\Delta t} \quad (1)$$

$$r_{s \max} = \frac{dS_{max}}{dt} \quad (2)$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (3)$$

$$r_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (4)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (5)$$

$$r_{p \max} = \frac{dP_{max}}{dt} \quad (6)$$

$$Y_{p/x} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad (7)$$

4.4.4. Álcoois inferiores

Avaliou-se o efeito da adição de álcoois inferiores durante a fase de produção de AI. Para isso, empregou-se como controle a metodologia padronizada para obtenção de biomassa e síntese de AI (Ver 4.4.2), adicionando-se 2% (v/v) de metanol ou 2-propanol em relação ao volume total do meio de produção. O pH inicial foi ajustado a 3 e cada tratamento foi inoculado com uma proporção de 10% (v/v) de biomassa metabolicamente ativa, e incubado a 32°C durante 7 dias a 130 rpm.

4.4.5. Comparação entre cepas NRRL 1960 e 265

A cepa *A. terreus* NRRL 1960 é um micro-organismo reportado em diversas patentes para produção industrial de AI (BATTI; SCHWEIGER, 1963; CROS; SCHNEIDER, 1993; JARRY; SERAUDIE, 1997). Para comparar o efeito da cepa empregada no processo foi utilizada como comparativo a cepa *A. terreus* NRRL 265, isolada pelo mesmo grupo de pesquisa que a cepa NRRL 1960 a partir de amostras de solo obtidas da mesma região dos Estados Unidos.

As duas cepas foram cultivadas sob idênticas condições já padronizadas na presente pesquisa, com uma etapa inicial de produção de inóculo (pH 3, 1×10^6 esporos/mL, volume de 100 mL em Erlenmeyer de 500 mL) e uma fase fermentativa de síntese de AI em meio de produção a pH 3, incubando a 140 rpm, 32°C durante 6 dias.

4.4.6. Aumento de escala

O processo de produção de Al foi escalonado para fermentação em biorreator do tipo coluna de bolhas de 1,5 L de capacidade e comparado em paralelo com um controle fermentando em volume de 50 mL em *shaker* orbital. Para ambos os tratamentos foi preparado o mesmo inóculo de acordo à metodologia padronizada na presente pesquisa, empregando frascos Erlenmeyer de 500 ml de capacidade com 100 mL de meio de produção de biomassa (0,1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L NH_4NO_3 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 g/L de sacarose, pH 3), inoculado com 1×10^6 esporos/mL, incubado a 32°C, 140 rpm por 48 horas. A biomassa obtida foi empregada em proporção de 10% (v/v) como inóculo para o meio de produção de Al (0,1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 g/L ureia, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L de glicose, e pH 3), incubado a 32°C. Finalmente, a coluna de bolhas contendo 1 L de meio de produção foi acoplada a um sistema de aeração com o objetivo de alimentar uma vazão de ar de 2 vvm, enquanto o tratamento controle foi mantido em *shaker* orbital a 140 rpm durante os 6 dias do experimento. Para a fermentação na coluna de bolhas foi preciso empregar 5 mL de antiespumante (NitroFoam H10). O esquema do biorreator empregado é apresentado na FIGURA 8.

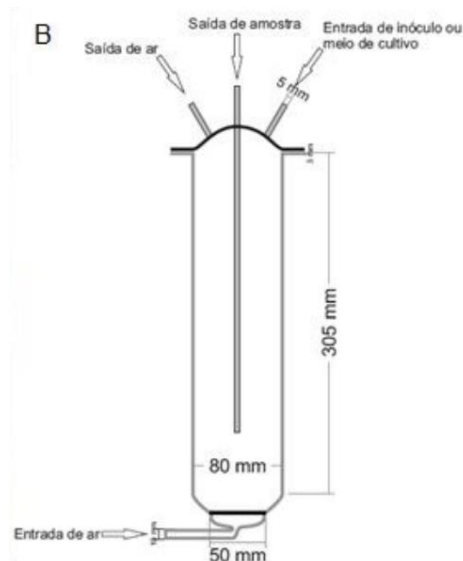


FIGURA 8 - BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS EMPREGADO NA FASE DE AUMENTO DE ESCALA. FONTE: DE OLIVEIRA (2012).

4.5. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO

4.5.1. Caracterização físico-química de substratos

Os substratos sólidos testados para produção de AI foram polpa cítrica, casca de soja, soja *in natura*, farelo de trigo, quirera de milho, batata, batata doce, mandioca, bagaço de mandioca e bagaço de cana. As matérias primas com alto teor de umidade foram submetidas inicialmente a um processo de secagem. Posteriormente, os substratos foram triturados em moinho de facas e peneirados de forma a obter granulometria de 0,8-2mm para Fermentação em Estado Sólido (FES), pó fino (<0,3mm) para testes de crescimento apical e material moído sem peneiramento para a preparação de extratos empregados em fermentação submersa. O melação de cana e glicerol foram empregados como substratos para fermentação submersa e mantidos sob congelamento até o seu uso.

A determinação da umidade dos materiais sólidos foi realizada por método termogravimétrico a 105°C em analisador de umidade por infra-vermelho, e a atividade de água (a_w) foi analisada por ponto de orvalho com auxílio de um equipamento Aqua Lab modelo CX-2. O pH foi determinado por medição em potenciômetro, no caso das amostras sólidas foi preparada uma suspensão com 5 g de cada substrato em 50 mL de água deionizada, e após decantação mediu-se o pH do sobrenadante. Finalmente, a quantificação de açúcares totais fermentescíveis foi efetuada mediante dosagem pela metodologia Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). Esse protocolo foi empregado também para determinação de açúcares presentes em extratos aquosos das matérias primas sólidas a 5% (m/v).

4.5.2. Estudo de crescimento apical

Avaliou-se a capacidade do fungo *A. terreus* NRRL 1960 para se desenvolver em substratos complexos e meio acidificado. Para isso, foi realizado um teste de crescimento apical em pH 3, empregando 1,5% de ágar e uma concentração de 3% (m/v) dos seguintes substratos: polpa cítrica, casca de soja, soja *in natura*, farelo de trigo, quirera de milho, batata, batata doce, mandioca, bagaço de mandioca e bagaço de cana, em granulometria menor que 0,3 mm. Os meios foram autoclavados a 121°C por 15 min e, posteriormente, o pH foi ajustado com uma solução de 10% HCl estéril. O meio em placa de Petri foi inoculado em um único ponto central e, diariamente, foram medidos os diâmetros do micélio em 10 diferentes pontos com ajuda de uma régua e papel milimétrico, durante 14 dias.

4.5.3. Testes iniciais de fermentação submersa empregando fonte de carbono complexa

O meio sintético otimizado para produção do Al foi empregado como base para o desenho de um meio complexo alternativo de menor custo. Inicialmente, testou-se a substituição parcial da glicose por glicerol e melaço de cana. Em ambos os casos, na fase de produção de inóculo utilizou-se o meio de cultura com a concentração padronizada de sais (0,1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L NH_4NO_3 , 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pH 3), e fonte de carbono segundo a composição da TABELA 7. Cada meio foi inoculado com 1×10^6 esporos/mL, incubado a 32°C, 130 rpm por 48 horas. Posteriormente, a suspensão de biomassa gerada foi empregada em uma proporção de 10% (v/v) para inocular o meio de produção de Al (0,1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 g/L ureia, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

13,1 mg/L CuSO₄ 5H₂O, 10% (m/v) de fonte de carbono e pH 3,1). Foram realizados tratamentos controle com glicose grau analítico e sacarose comercial, fazendo substituição parcial da fonte de carbono devido aos baixos resultados obtidos em teste preliminares. As fermentações foram avaliadas ao longo de 7 dias de incubação a 32°C e 130 rpm.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES DE FONTES DE CARBONO TESTADAS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO.

IDEM	Tratamento	Composição do meio	
		Inóculo	Produção AI
1	Melaço de cana	2% Melaço cana; 3% Glicose	7% Melaço cana; 3% Glicose
2	Glicerol	2% Glicerol; 3% Glicose	7% Glicerol; 3% Glicose
3	Controle – Glicose	5% Glicose	10% Glicose
4	Controle Sacarose	5% Sacarose	10% Sacarose

4.5.4. Fermentação submersa empregando extratos aquosos de substratos complexos

De acordo aos resultados obtidos para o teste de crescimento apical, foi realizado um teste de fermentação submersa empregando extratos aquosos 5% (m/v) das seguintes matérias primas: polpa cítrica, farelo de trigo, casca de soja, milho, batata, batata doce, mandioca e bagaço de mandioca. Os extratos foram obtidos adicionando-se 10 g de substrato com granulometria <0,8 mm em 200 mL de água destilada, e incubando-se em autoclave com vapor fluente por 20 minutos. Posteriormente o sólido foi retirado por filtração qualitativa e o filtrado foi empregado na determinação de açúcares totais (Seção 4.5.1) e como base para formulação dos meios de cultura avaliados na fermentação submersa.

A partir dos resultados da caracterização química dos extratos, e realizando um levantamento dos dados da literatura, foi estimado o conteúdo de N e

determinada a concentração de C, empregando ambos os dados no cálculo das proporções de fonte de carbono e/ou nitrogênio necessárias para cada extrato, visando manter uma concentração inicial de 100 g/L de açúcar total e 1,05 g/L de N total para as fermentações submersas. Neste último ponto, foi estimada a concentração de N necessária e adicionada na forma das sais NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ureia, mantendo a proporção 1:1,25:1,15 estabelecida previamente. Tanto a sacarose como as fontes de nitrogênio foram pesadas e adicionadas individualmente a cada um dos extratos. O descritivo da formulação testada apresenta-se na TABELA 8.

TABELA 8 - DESCRITIVO DA COMPLEMENTAÇÃO DE FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO PARA OS EXTRATOS AQUOSOS TESTADOS.

Substrato	Extrato 5% (m/v)		Suplementado	
	Açúcar total (g/L)	N (g/L)	Sacarose (g/L)	N* (g/L)
Polpa cítrica	9,74	0,53	90,26	0,52
Casca de soja	1,16	0,75	98,84	0,30
Farelo de Trigo	3,96	1,27	96,04	-
Milho	1,88	1,03	98,12	0,02
Batata	3,43	0,14	96,57	0,91
Batata doce	13,46	0,15	86,54	0,90
Mandioca	11,43	0,12	88,57	0,93
Bagaço de mandioca	6,35	0,11	93,65	0,94

Para todos os tratamentos foi preparado um inóculo vegetativo empregando a metodologia previamente descrita. O pH inicial de cada meio foi ajustado a 3 utilizando uma solução de HCl 10%. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio, incubadas a 32°C durante 6 dias a 140 rpm, e comparadas com um controle de meio sintético com sacarose a 100 g/L.

4.5.5. Fermentação em estado sólido (FES)

Para os testes iniciais de FES foram empregados os substratos que deram média de diâmetro de 4 cm no teste de crescimento apical (próximo à média total do grupo de substratos avaliados). Em uma primeira etapa, a quirera de milho e o farelo de trigo foram utilizados em fermentação em frasco de vidro de 200 mL, com umidade de 60% e 70%, respectivamente, a_w de 0,99 para ambos os tratamentos e 5 g de substrato inicial. Como aditivo foi testado unicamente tampão pH 3 (0,1 M de H_2SO_4 , 0,1 M NaOH, 1,2 M Na_2SO_4), e 25% de uma solução de NH_4Cl (0,12 g/mL) e HNO_3 2,5%, isto com objetivo de testar condições adequadas para manter um pH próximo a 3 durante a fermentação. Cada meio foi inoculado com a cepa *A. terreus* NRRL 1960 em uma concentração final de 1×10^7 esporos/g, incubado a 32°C em câmara fechada com atmosfera saturada de umidade, por um período de 10 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Em uma segunda etapa, avaliou-se o efeito da altura da camada do substrato na produção de Al, empregando farelo de trigo como matéria prima. O teste foi realizado sob mesmas condições descritas previamente, empregando tubos de ensaio e massa inicial variável com o objetivo de atingir camadas de 1 cm, 2 cm, 3 cm e 4 cm de altura.

Posteriormente, optou-se por avaliar a polpa cítrica como substrato para estabelecer um processo de fermentação sólida para produção de Al. Os experimentos foram realizados inicialmente em frasco de vidro contendo 5 g do substrato com granulometria 0,8-2 mm, e umidade inicial de 65%. As fermentações foram realizadas utilizando polpa cítrica *in natura* e matéria prima enriquecida com solução nutritiva composta de 4 g/L NH_4Cl , 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 8 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 13,1 mg/L $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ e 80 g/L glicose. O pH foi ajustado a 3 empregando 100 μ L de HCl 10% por cada grama de polpa cítrica, e o meio foi inoculado com 1×10^7 esporos/g e incubado a 32°C em câmara fechada com atmosfera saturada, durante 10 dias.

Este último experimento foi repetido empregando um sistema de aeração forçada, com o objetivo de estabelecer se os altos requerimentos de O_2

representam uma limitante na FES. Para isso, foram realizadas fermentações em coluna de Raimbault modificada, com incubação em câmara com temperatura controlada a 32°C. Colocou-se 15 g de polpa cítrica seca em cada coluna de vidro e umedecida com solução nutritiva até atingir a umidade inicial desejada, empregando-se o mesmo tratamento descrito previamente e uma vazão de ar de 0,5 L/min. O sistema incluía uma etapa de umidificação do ar estéril, como é mostrado na FIGURA 9.



FIGURA 9 - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) COM SISTEMA DE AERAÇÃO FORÇADA EM COLUNA RAIMBAULT.

Finalmente, foi realizado um teste comparativo empregando as cepas *A. terreus* NRRL 1960 e NRRL 265 sob mesmas condições de cultura, utilizando polpa cítrica com granulometria 0,8-2mm como substrato, e mantendo as condições descritas previamente (umidade 65%, 1×10^7 esporos/g, enriquecido com solução nutritiva e pH inicial ajustado em 3). As fermentações foram realizadas em frascos de vidro contendo 5 g de substrato em câmara fechada com atmosfera saturada durante 10 dias a 32°C. Neste último teste foi incluído um processo de agitação manual vigorosa dos frascos de fermentação com

frequência de três vezes ao dia para evitar a compactação do micélio e favorecer o intercâmbio gasoso.

4.5.5.1. Simulação da FES com meio sintético em suporte inerte

Para esclarecer o efeito da composição complexa do substrato empregado na fermentação em estado sólido, foi realizado um experimento onde um suporte inerte foi impregnado com o meio de produção utilizado em fermentações submersas em meio sintético.

Os materiais perlita e vermiculita foram selecionados como suportes inertes. Em ambos casos foi realizada uma lavagem inicial dos materiais com solução de HCl pH 3, incubando-se por 24 horas e repetindo-se novamente o processo de lavagem por outras 24 horas. Posteriormente a perlita e a vermiculita foram secadas em estufa a 60°C por 24 horas. O objetivo desta etapa foi estabilizar o pH dos suportes para evitar sua interferência ao longo da fermentação e garantir uma umidade inicial controlada próxima a 65%.

As fermentações foram realizadas em frasco de vidro contendo 5 g de vermiculita ou 2,5 g de perlita, o que corresponde a uma altura de camada de aproximadamente 4 cm em ambos casos. Os materiais foram impregnados com o meio de produção de AI padronizado na presente pesquisa (0,1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,15 g/L ureia, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,1 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 g/L de glicose, pH 3) com proporções de líquido e acordo com a massa inicial de cada suporte e mantendo uma umidade inicial de 65%. Os materiais foram autoclavados e inoculados com 1×10^7 esporos/g da cepa NRRL 1960 e incubados a 32°C em câmara fechada com atmosfera saturada durante 10 dias.

4.6. PROTOCOLOS ANALÍTICOS

Em todos os experimentos de fermentação submersa a biomassa foi separada por filtração com auxílio de uma bomba a vácuo e empregando filtro Whatman No. 1. O resíduo foi utilizado para determinação da biomassa por peso seco, com secagem a 75°C durante 24 horas e efetuando-se as medições correspondentes por gravimetria. O sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm (1900 g) por 10 minutos, diluído e utilizado para as análises de AI, açúcares residuais e pH. Este último foi determinado utilizando-se um potenciômetro MS Tecnocon MPA 210.

O AI foi quantificado usando o método de Hartford (1962), que consiste em adicionar a 1 mL de amostra diluída, 1,3 mL de piridina e 6,5 mL de anidrido acético, incubando-se em seguida a mistura a 32°C por 30 minutos, e realizando-se a leitura de absorbância a 385 nm. Para cada batelada de leituras foi preciso realizar uma curva padrão de acompanhamento, com o objetivo de garantir que os resultados não fossem afetados por variações no conteúdo de umidade dos reagentes empregados.

Os açúcares redutores e totais foram determinados pelos métodos do ácido dinitrosalicílico (DNS) e método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945). Para as matérias primas complexas foi realizada uma hidrólise inicial empregando 1 g de amostra em 50 mL de água e 4% (v/v) de HCl. As amostras foram hidrolisadas em autoclave com vapor fluente durante 20 min e, posteriormente, resfriadas a temperatura ambiente, neutralizadas a pH 7 com NaOH 1N e 10 N e o volume foi aferido para 100 mL. Para o método DNS empregou-se 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de reagente DNS (5 g de ácido 3,5 – dinitrosalicílico, 100 mL NaOH 2N, 150 g tartarato duplo de sódio e potássio aferido a 500 mL com água destilada). Posteriormente, as reações foram incubadas a 95°C durante 5 min e resfriadas em banho-maria a temperatura ambiente. Adicionou-se 4 mL de água destilada a cada amostra, e realizou-se as leituras em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de açúcares redutores foi estimada de acordo à regressão obtida para uma curva padrão de sete pontos. Para o método de Somogyi-Nelson as reações foram realizadas

empregando 1 mL de amostra diluída 1:10 e 1 mL do Reagente A (4 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 24 g/L Na_2CO_3 , 12 g/L $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 16 g/L NaHCO_3 , 18 g/L Na_2SO_4). As amostras foram incubadas a 95°C durante 10 min e resfriadas em banho-maria com água a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 1 mL do Reagente B (50g/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 42 mL HSO_4 concentrado, 12 g/L $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 10 mL de água destilada e, finalmente, foram realizadas as leituras de absorvância em espectrofotômetro a 535 nm.

No caso das fermentações em estado sólido (FES), realizou-se a extração do Al diluindo-se o material fermentado em proporção 1:10 em água deionizada, agitou-se por 15 min e separou-se os sólidos por filtração qualitativa. O sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm (1900 g) por 15 minutos e empregado para determinação de Al usando o método Hartford (1962) previamente descrito. Os sólidos separados do líquido filtrado foi submetida a um novo processo de extração com o objetivo de garantir a maior recuperação possível do ácido orgânico gerado. Esse processo consistiu em realizar uma nova diluição do material filtrado, repetindo novamente os passos descritos. As alíquotas obtidas foram analisadas separadamente e o cálculo do Al foi obtido como resultado da somatória do produto recuperado em cada uma das extrações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE INÓCULO

A qualidade e estado fisiológico do inóculo empregado em qualquer fermentação é um fator determinante na obtenção de resultados positivos. No caso de *A. terreus*, os relatos da literatura estabelecem a existência de duas metodologias amplamente aceitas para o preparo de inóculo. A primeira delas consiste na utilização de uma suspensão de esporos em concentração variável da ordem de 10^5 - 10^8 esporos/mL (AHMED EL-IMAM *et al.*, 2013; DWIARTI *et al.*, 2007; KUENZ *et al.*, 2012; VASSILEV *et al.*, 2012), enquanto a segunda emprega um inóculo vegetativo gerado em uma etapa de fermentação prévia e aplicado em uma proporção de 5-10% (v/v) (GAO *et al.*, 2013; KOCABAS; OGEL; BAKIR, 2014; PETRUCCIOLI; PULCI; FEDERICI, 1999; RAISTRICK; SMITH, 1935; SHIN *et al.*, 2013; YAHIRO; SHIBATA; *et al.*, 1997).

O uso de inóculo vegetativo apresenta uma série de vantagens, principalmente devido à alta atividade metabólica das células, a qual permite suprimir a fase de latência na cinética de crescimento e formação de produto, reduzindo assim os tempos de fermentação e aumentando a produtividade horária do processo (TEVZ; BENCINA; LEGISA, 2010). Além disso, no caso específico de produção de AI, a biomassa obtida em uma etapa prévia encontra-se adaptada às condições físicas estressantes como pH baixo e alta pressão osmótica.

Devido à falta de consenso na literatura, decidiu-se testar as duas metodologias reportadas para produção de inóculo. Na TABELA 9 apresentam-se os resultados comparativos para os métodos avaliados.

TABELA 9 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA DUAS METODOLOGIAS DE PREPARO DE INÓCULO DE *A. terreus* NRRL 1960.

Tipo de inóculo	X (g/L)	AI (g/L)	pH	Y_{p/x}	Y_{p/s}	r_p AI (g/L h)	Dias
Suspensão de esporos	9,50 ±0,52	20,88 ±3,95	2,20 ±0,04	2,20	0,22	0,09	10
Vegetativo	8,33 ±0,41	49,90 ±3,32	2,10 ±0,01	5,99	0,55	0,26	8

Observa-se que possivelmente devido à sua alta atividade metabólica, e ao emprego de um meio de cultura adequado para produção de biomassa, os resultados da fermentação lançada com inóculo vegetativo são superiores em termos de concentração final de AI, rendimento de produto a partir de biomassa, rendimento de produto a partir de substrato consumido e produtividade horária. O tratamento com inóculo vegetativo apresentou um incremento de aproximadamente 150% na concentração de AI e uma produtividade de 0,26 g/L h, o que representa o triplo do valor obtido para o inóculo com suspensão de esporos e, simultaneamente, uma redução de dois dias no processo fermentativo. Os aumentos substanciais nos rendimentos e produtividade horária volumétrica refletem a melhora estabelecida em referência ao inóculo com estruturas de resistência em estado de dormência.

5.1.1. Estudo da morfologia ótima de *A. terreus* para produção de ácido itacônico

O processo metabólico de *A. terreus* para síntese de AI requer uma alta disponibilidade contínua de oxigênio e, possivelmente, a retirada constante do CO₂ gerado na descarboxilação do cis-aconitato. Considerando a forte dependência do rigoroso intercâmbio gasoso necessário, é plausível então supor um importante efeito de uma determinada morfologia da biomassa na produção final de AI, sendo que unidades de organização menores terão uma maior proporção superfície/volume e, portanto, um incremento na velocidade de

transferência gasosa. Da mesma forma, ao testar diferentes volumes de fermentação é possível avaliar indiretamente o efeito da disponibilidade diferencial de oxigênio aportado pela agitação do sistema.

Nesta etapa do trabalho, foram testadas três condições físicas e duas composições de meio de germinação de esporos (identificados como meio de Inóculo A e meio de Inóculo B), avaliando seu efeito final na morfologia da biomassa e na síntese de Al (seção 4.3.1 – Material e Métodos). Os resultados para o experimento realizado com o meio de Inóculo A (mesma composição de sais e redução de 50% na concentração da fonte de carbono do meio de produção, sob diferentes condições físicas na fase de produção da biomassa) são apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 - PRODUÇÃO FINAL DE Al EMPREGANDO BIOMASSA GERADA NO TRATAMENTO “MEIO DE INÓCULO A” PARA OS ENSAIOS REALIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL DE CONDIÇÕES FÍSICAS.

Tratamento	X (g/L)	S _r (g/L)	Al (g/L)	pH final	Y _{P/S}	Y _{P/X}	r _p Al (g/L h)
1- InocA	4,92	59,32 ±0,34	12,66 ±0,38	2,58	0,31	2,57	0,09
2- InocA	4,87	60,44 ±1,99	14,67 ±0,03	2,56	0,37	3,01	0,10
3- InocA	5,12	64,41 ±0,60	15,64 ±0,48	2,58	0,44	3,05	0,11
4- InocA	5,05	55,59 ±1,31	15,80 ±0,37	2,55	0,36	3,13	0,11
5- InocA	4,97	54,55 ±1,19	18,74 ±0,59	2,4	0,41	3,77	0,13
6- InocA	4,51	63,93 ±0,96	17,12 ±0,73	2,38	0,47	3,80	0,12
7- InocA	4,74	62,66 ±1,26	11,07 ±0,27	2,65	0,30	2,33	0,08
8- InocA	5,33	62,03 ±0,60	12,61 ±0,73	2,55	0,33	2,37	0,09
9- InocA (C)	5,43	62,66 ±1,72	11,73 ±0,89	2,56	0,31	2,16	0,08
9- InocA (C)	5,22	59,56 ±1,49	13,74 ±0,61	2,47	0,34	2,63	0,09
9- InocA (C)	5,40	67,03 ±2,63	12,70 ±0,39	2,49	0,39	2,35	0,09

De acordo aos dados apresentados na TABELA 10, foi observada uma produção máxima de 18,74 g/L de AI para o tratamento 5-InocA, e rendimento máximo de 0,47 g AI/ g substrato consumido para o tratamento 6-InocA. Os valores do pH final do meio foram próximos a 2,5 e a concentração de biomassa encontrou-se na faixa de 4,74-5,43 g/L, sem diferenças significativas entre tratamentos para as últimas duas variáveis resposta mencionadas. Porém, observou-se também que para a totalidade dos tratamentos o substrato foi escassamente consumido, tendo sido encontrados valores de aproximadamente 60 g/L de açúcar residual após término do período de fermentação. Esse fato poderia estar relacionado à natureza da fonte de nitrogênio empregada durante a fase de desenvolvimento de biomassa, uma vez que tem sido reportada a preferência de NH_4NO_3 para crescimento de *Aspergillus terreus* (KUENZ *et al.*, 2012). Isto será comentado com maior profundidade na seção 5.2.1 *Fonte de Nitrogênio*.

A análise estatística dos dados permite estabelecer que as diferenças significativas observadas no teste com biomassa produzida no meio “Inóculo A” foram obtidas devido à interação entre a concentração de esporos e o volume de fermentação empregado, estimadas para um intervalo de confiança de 95%. Os resultados da análise de variância (ANOVA) considerando a concentração final de AI como variável dependente são apresentados na TABELA 11. Adicionalmente, o ANOVA efetuado empregando os rendimentos alcançados ($Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$) como variáveis dependentes apresentaram resultados similares, sendo que a interação esporos/mL x proporção volume fermentação / volume frasco (VF/Vf) foi estabelecida como o único fator significativo (dados não mostrados).

TABELA 11 - ANOVA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO EMPREGANDO BIOMASSA GERADA NO TRATAMENTO “MEIO DE INÓCULO A”

Variável	Soma dos quadrados	G.L	Quadrado médio	Valor F	Valor P
pH	0,548	1	0,548	0,152	0,717
Esporos/mL	8,143	1	8,143	2,255	0,208
VF/Vf	0,072	1	0,072	0,011	0,895
pH x esporos/mL	0,210	1	0,210	0,058	0,821
pH x VF/Vf	0,633	1	0,633	0,175	0,697
esporos/mL x VF/Vf	33,197	1	33,197	9,193	0,039
Erro experimental	14,445	4	3,61129		
Total soma quadrados	57,248	10			
R ²	0,75				

VF/Vf: Proporção volume fermentação / volume frasco

Por outro lado, o mesmo planejamento de avaliação de condições físicas foi repetido empregando uma variação na composição do meio de produção de biomassa. De acordo com Kuenz *et al.* (2012), *A. terreus* mostra uma certa preferência pelo amônio durante a fase de crescimento da biomassa, consumindo posteriormente o nitrato na etapa de produção de AI, quando é adicionado o NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio. Diversos autores têm reportado o uso do nitrato de amônio na formulação de meios sintéticos para produção de AI (DWIARTI *et al.*, 2007; JAHIM *et al.*, 2006; OKABE; OHTA; PARK, 1993; PARK; OHTA; OKABE, 1993; REDDY; SINGH, 2002; YAHIRO; SHIBATA; *et al.*, 1997). Porém, testes preliminares realizados no LPBI permitiram estabelecer a conveniência de empregar uma fonte alternativa de N, com altos rendimentos de produção e menores dificuldades técnicas para a sua compra (o nitrato de amônio tem venda controlada). Mesmo assim, no experimento realizado foram introduzidas as variantes de empregar NH_4NO_3 para a fase de produção de

biomassa, além de diminuir a concentração final de CaCl_2 e modificar a fonte de ferro por FeSO_4 em lugar de FeCl_3 . Essas modificações foram baseadas nos dados encontrados na literatura e representam também uma variação da proporção C/N em relação ao tratamento “Inóculo A”. Os resultados são apresentados na TABELA 12.

TABELA 12 - PRODUÇÃO FINAL DE Al EMPREGANDO BIOMASSA GERADA NO TRATAMENTO “MEIO DE INÓCULO B” PARA OS ENSAIOS REALIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL DE CONDIÇÕES FÍSICAS.

Tratamento	X (g/L)	S _r (g/L)	Al (g/L)	pH final	Y _{P/S}	Y _{P/X}	r _p Al (g/L h)
1- InocB	6,33	16,88 ±0,72	48,23 ±2,03	2,05	0,58	7,62	0,335
2- InocB	5,01	46,05 ±1,62	24,33 ±2,02	2,28	0,45	4,86	0,169
3- InocB	7,58	12,11 ±0,63	41,83 ±2,29	2,00	0,48	5,52	0,291
4- InocB	7,29	17,76 ±0,96	38,90 ±0,17	2,07	0,47	5,34	0,270
5- InocB	7,21	33,33 ±1,04	29,91 ±0,11	2,18	0,45	4,15	0,208
6- InocB	5,36	45,81 ±0,99	19,54 ±0,37	2,37	0,36	3,64	0,136
7- InocB	6,80	16,96 ±1,31	45,29 ±3,40	2,00	0,55	6,66	0,314
8- InocB	6,98	25,39 ±0,90	36,13 ±1,72	2,07	0,48	5,18	0,251
9- InocB (C)	6,05	31,43 ±1,24	28,47 ±0,81	2,15	0,42	4,71	0,198
9- InocB (C)	6,65	34,29 ±0,86	29,69 ±1,94	2,11	0,45	4,47	0,206
9- InocB (C)	6,54	20,54 ±1,31	33,80 ±1,89	2,05	0,43	5,17	0,235

Para a biomassa produzida no meio “Inóculo B”, o tratamento 1-InocB atingiu os melhores resultados, com uma concentração final de 48,23 g/L de Al com rendimento $Y_{P/S}$ de 0,58 g/g e produtividade horária de 0,335 g/L h. Adicionalmente, o tratamento 7-InocB apresentou resultados semelhante, com concentração final de 45,29 g/L de Al, rendimento de 0,55 g de Al por g substrato consumido e produtividade horária de 0,314 g/L h. De acordo com a análise de variância realizada para os tratamentos com o meio “Inóculo B” (TABELA 13), o fator físico pH corresponde à única variável independente de importância na

obtenção de biomassa com a capacidade de produzir altas concentrações de AI, para um intervalo de confiança de 95%. Finalmente, foi observado que para os tratamentos com as menores concentrações de AI o consumo de substrato foi igualmente reduzido, apresentando assim altas concentrações finais de açúcar residual e rendimentos $Y_{P/S}$ próximos a 0,45 g/g, o que indica uma diminuição na capacidade de conversão de substrato a AI.

TABELA 13 - ANOVA PARA A VARIÁVEL RESPOSTA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO NO MEIO "INÓCULO B".

Variável	Soma dos quadrados	G.L	Quadrado médio	Valor F	Valor P
pH	268,73	1	268,73	9,2684	0,038
Esporos/mL	201,42	1	201,42	6,947	0,058
VF/Vf	62,92	1	62,92	2,170	0,215
pH x esporos/mL	61,49	1	61,49	2,121	0,219
pH x VF/Vf	6,668	1	6,668	0,230	0,657
Esporos/mL x VF/Vf	70,82	1	70,82	2,442	0,193
Erro experimental	115,98	4	28,9941		
Total soma quadrados	788,02	10			
R ²	0,85				

Adicionalmente, na FIGURA 10 apresenta-se o gráfico de Pareto ilustrando os efeitos estimados das variáveis e suas interações avaliadas para a produção de AI. Observou-se que o incremento na concentração final de AI é beneficiado por valores de pH baixos na fase de produção da biomassa.

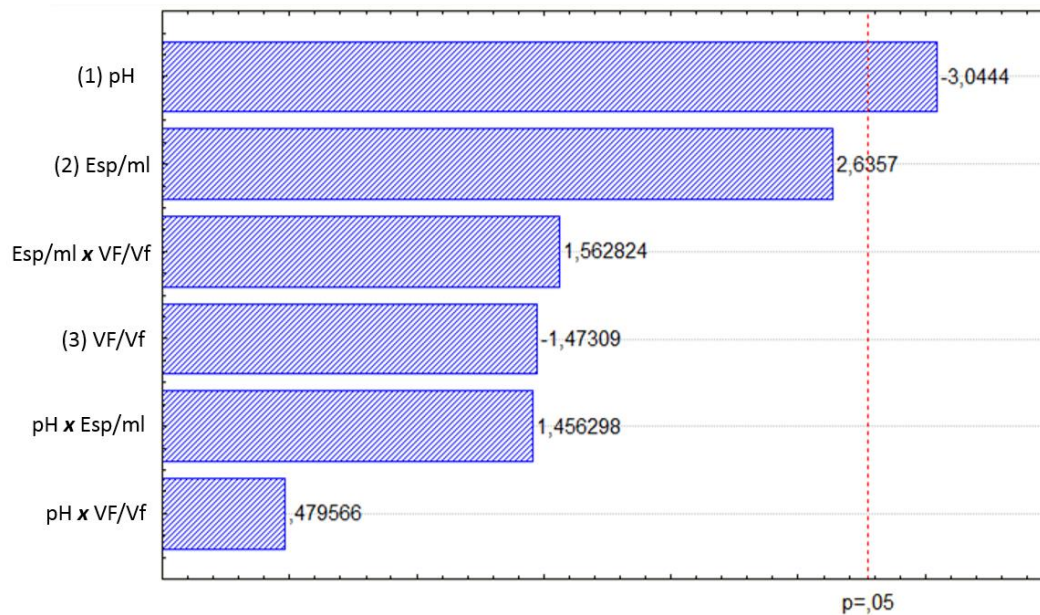


FIGURA 10 - DIAGRAMA DE PARETO PARA OS EFEITOS ESTIMADOS DOS FATORES FÍSICOS AVALIADOS COM O MEIO "INÓCULO B" PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO.

No experimento realizado foi evidente que a melhora nos resultados finais foi atingida principalmente pela variação na composição do meio de cultura, e em segundo plano pelos fatores físicos ou suas interações, sendo os resultados do tratamento do meio "Inóculo B" superiores ao "Inóculo A".

Adicionalmente, foi possível observar uma relação entre boa produção de AI e a morfologia desenvolvida pela biomassa empregada como inóculo. Nos tratamentos onde o fungo cresceu de maneira pouco densa, sem formar agregados celulares de diâmetro superior a 0,5 mm, e sem se estruturar em forma de pellet compacto, a concentração de produto, os rendimentos e produtividade horária foram superiores. Na FIGURA 11 e FIGURA 12 são apresentadas as imagens capturadas para a macro e micromorfologia de crescimento de *A. terreus* sob diferentes tratamentos. No caso do meio "Inóculo A", na totalidade de experimentos realizados a biomassa cresceu formando pellets, os quais apresentaram diferenças na longitude das hifas projetadas fora do núcleo, grau de aparente compactação da estrutura e capacidade de decantação. Os tratamentos 1-InocA e 2-InocA formaram pellets muito densos, compactos e com poucas hifas sobressaindo do núcleo. Por outro lado, os

experimentos 3-InocA, 4-InocA, 5-InocA e 6-InocA mostraram uma morfologia semelhante, com maior proporção e longitude das hifas. Finalmente, os tratamentos 7-InocA, 8-InocA e 9 InocA apresentaram um núcleo de pellet com diâmetro de núcleo de aproximadamente 60% menor, com numerosas hifas compridas e diâmetro total da estrutura (incluindo núcleo do pellet e hifas) similar ao observado para os outros grupos de tratamento. Para o meio de geração de biomassa “Inóculo A”, a morfologia mostrada no grupo composto pelos tratamentos 3-InocA, 4-InocA, 5-InocA e 6-InocA apresentou os melhores resultados de produção final de AI após término do período de fermentação.

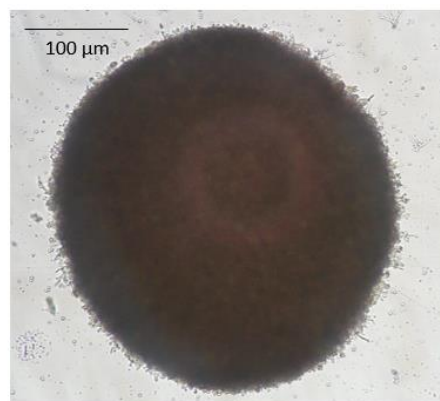
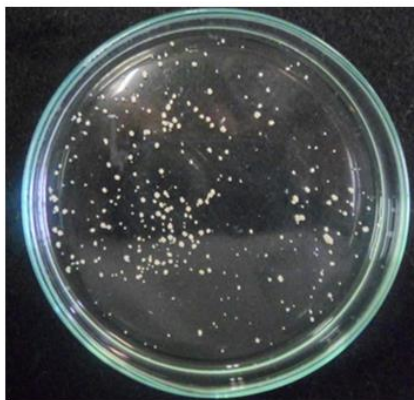
Com relação ao meio “Inóculo B”, foram observados três grupos principais de morfologia diferenciada. No caso dos tratamentos 2-InocB e 6-InocB, foram obtidos pellets com diâmetro superior a 1 mm, núcleos densos e abundantes hifas compridas sobressaindo a partir deles. A produção de AI para estes tratamentos com morfologia tipo pellet foi de 24,33 g/L e 19,54 g/L, respectivamente, sendo os menores valores reportados para a composição de meio “Inóculo B”. Adicionalmente, para os tratamentos 1-InocB, 3-InocB e 7-InocB (todos eles com pH 3) foi obtida uma morfologia tipo *clump*, a qual facilita a transferência de massas, reduz a viscosidade do meio de cultura e facilita o intercâmbio gasoso. Esses tratamentos apresentaram os melhores resultados com concentrações finais de AI de 48,23 g/L, 41,83 g/L e 45,29 g/L, respectivamente. Assim é evidenciada a correlação entre a morfologia de crescimento da biomassa empregada como inóculo e a produção final atingida pelo processo fermentativo. O terceiro grupo morfológico identificado corresponde a uma morfologia de crescimento mista onde é possível observar morfologia *clump* e estrutura de organização tipo pellet com diâmetro inferior a 0,3 mm em um mesmo tratamento. Este terceiro grupo está formado pelos experimentos 4-InocB, 5-InocB, 8-InocB e 9-InocB, cujas concentrações finais de AI correspondem também a resultados intermediários entre os outros grupos previamente discutidos.

O comparativo geral das morfologias observadas para os meios “Inóculo A” *versus* “Inóculo B” demonstra também que as variações na fonte de nitrogênio, relação C/N, concentração de cálcio e fonte de ferro repercutem na formação de estruturas compactas e de maior complexidade que não necessariamente

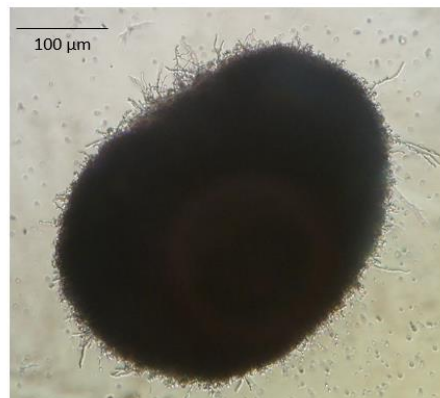
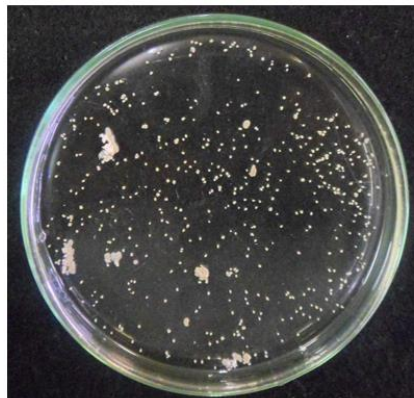
favorecem o processo de síntese de compostos que precisam alta disponibilidade de oxigênio. A relação entre morfologia de *A. terreus* e produção de ácido itacônico foi objeto de estudo para Gao *et al.* (2013). Nessa pesquisa, foram identificadas três estruturas com rendimentos e produtividade diferenciadas: micélio disperso, *clump* e pellets. As distintas morfologias foram obtidas variando unicamente a concentração inicial de esporos e mediante a presença de defletores no sistema de fermentação, sendo a morfologia *clump* aquela que demonstrou os melhores resultados (28,2 g/L de AI). Adicionalmente o efeito da concentração de CaCl_2 foi testado por Kuenz *et al.* (2012), cujo estudo determinou influência desse composto em concentrações crescentes. Os resultados obtidos no presente trabalho são consistentes com os reportados previamente em ambos os estudos. Conclui-se que uma taxa de inoculação de 1×10^6 esporos/mL, pH 3 e proporção de volume de fermentação/volume do frasco (VF/Vf) de 0,2 (volume inicial de fermentação de 100 mL para frasco de 500 mL, ou volume inicial de 50 mL em frasco de 250 mL) são as condições físicas adequadas para produzir biomassa com morfologia específica tipo *clump*, que permite maximizar os resultados finais de produção de AI durante o processo fermentativo.

1 – InocA

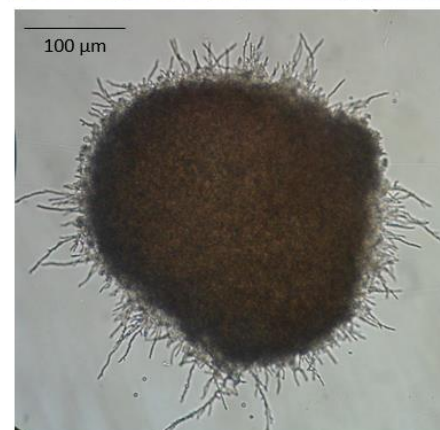
pH 3
 1×10^5 esp/mL
 VF/Vf: 0,2

**2 – InocA**

pH 4
 1×10^5 esp/mL
 VF/Vf: 0,2

**6 – InocA**

pH 4
 1×10^5 esp/mL
 VF/Vf: 0,4

**7 – InocA**

pH 3
 1×10^6 esp/mL
 VF/Vf: 0,4

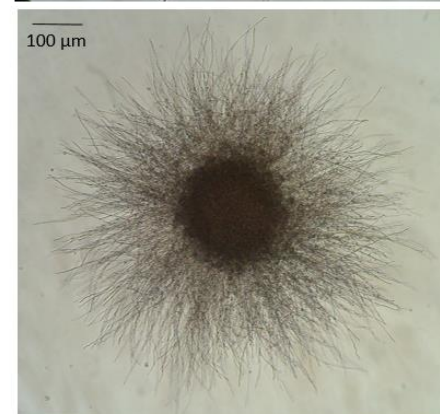
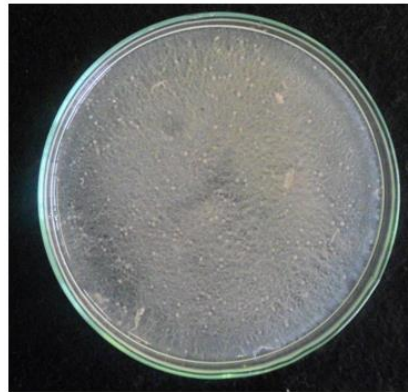


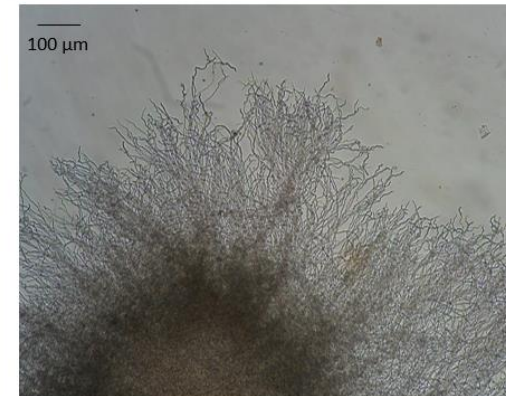
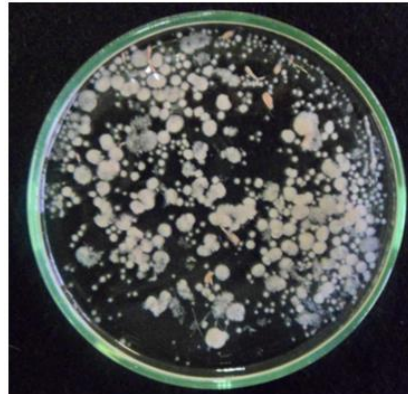
FIGURA 11 - DIFERENÇAS OBSERVADAS NA MORFOLOGIA DE *A. terreus* NRRL 1960 NO MEIO "INOCULO A" SOB CONDIÇÕES FÍSICAS VARIÁVEIS.

1 – InocB

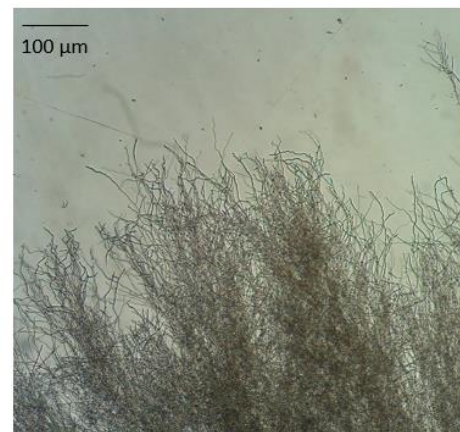
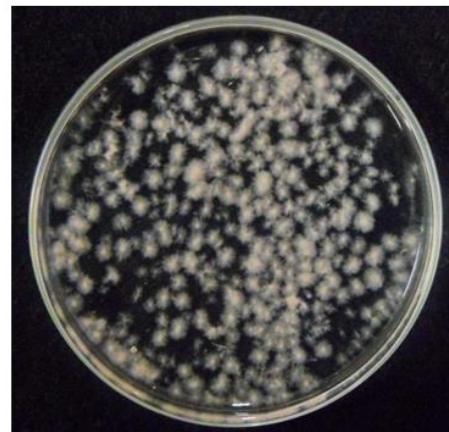
pH 3
 $1 \times 10^5 \text{ esp/mL}$
VF/Vf: 0,2

**2 – InocB**

pH 4
 $1 \times 10^5 \text{ esp/mL}$
VF/Vf: 0,2

**6 – InocB**

pH 4
 $1 \times 10^5 \text{ esp/mL}$
VF/Vf: 0,4

**7 – InocB**

pH 3
 $1 \times 10^6 \text{ esp/mL}$
VF/Vf: 0,4

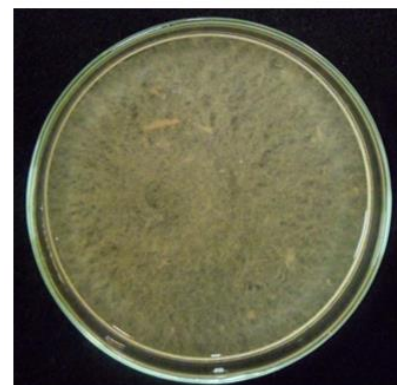


FIGURA 12 - DIFERENÇAS OBSERVADAS NA MORFOLOGIA DE *A. terreus* NRRL 1960 NO MEIO "INOCULO B" SOB CONDIÇÕES FÍSICAS VARIÁVEIS.

5.2. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO SINTÉTICO

Os meios sintéticos utilizados em processos biotecnológicos industriais apresentam a vantagem de ser quimicamente bem definidos e constantes, facilitando a reprodutibilidade dos processos, porém são de alto custo, o que limita sua aplicação em produtos de baixo valor de mercado. Apesar disso, a sua utilização em etapas iniciais de uma pesquisa permite estabelecer uma base para a formulação de meios alternativos a partir de matérias primas complexas.

Nas fases iniciais do presente trabalho foram testados os meios Czapek modificado e Kuenz modificado, com o objetivo de estabelecer o meio modelo para produção de AI. Como se observa na TABELA 14, os resultados obtidos não ultrapassaram a concentração final de 0,2 g/L após 12 dias de fermentação. Para as duas formulações, a fonte de nitrogênio foi NaNO_3 , cujo consumo ocasiona a sua substituição por OH^- como contra-íon e, portanto, um incremento no pH, o que desfavorece o transcurso normal da fermentação (DUETZ, 2007). Devido às baixas concentrações de AI obtidas, decidiu-se realizar um teste empregando fontes alternativas de nitrogênio.

TABELA 14 - RESULTADOS PRELIMINARES DOS MEIOS SINTÉTICOS TESTADOS INICIALMENTE PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO.

Meio	X (g/L)	AI (g/L)	pH	Y _{p/x}
Czapek modificado	7,15 ±0,87	0,12 ±0,09	5,74	0,02
Kuenz modificado	20,18 ±0,41	0,11 ± 0,08	5,64	0,005

5.2.1. Fonte de Nitrogênio

A natureza da fonte de nitrogênio é um fator de influência na produção de ácidos orgânicos com rota metabólica de biossíntese relacionada ao Al, como é o ácido cítrico (RODRIGUES, 2006). Devido às baixas produções obtidas com a modificação dos meios Czapek e Kuenz, decidiu-se estabelecer o efeito da fonte de N e definir se os resultados foram afetados principalmente pela falta de um tampão com a capacidade de manter o pH próximo a 3 ou pela ineficácia da fonte de nitrogênio empregada originalmente.

As substâncias testadas no presente trabalho correspondem a compostos reportados na literatura para produção de Al empregando diferentes cepas de *A. terreus*. Segundo o estudo realizado por Kuenz *et al.* (2012), o amônio é preferido como fonte de nitrogênio na fase de germinação de esporos e consumido paralelamente junto ao nitrato na fase de crescimento quando é adicionado NH_4NO_3 no meio de cultivo. Posteriormente, na fase de produção é consumido exclusivamente o NO_3^- , mantendo estáveis as concentrações residuais de NH_4^+ até o final da fermentação.

A composição proposta por Kuenz *et al.* (2012) foi reproduzida e identificada como meio *F*. Para o desenho dos meios de cultivo com fontes sintéticas alternativas, manteve-se a mesma concentração global de nitrogênio e/ou mesma concentração de amônio. A ureia foi testada devido a relatos exibidos em patentes onde era indicado o uso de uma fonte mista de N (CROS; SCHNEIDER, 1993; JARRY; SERAUDIE, 1997). Como se pode observar na FIGURA 13, os melhores resultados foram obtidos para o tratamento *E*, com uma produção final de 38,52 g/L de Al e onde foi empregada a mistura de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ureia. Os tratamentos *B*, *C* e *F* não apresentaram diferenças significativas entre eles, atingindo concentrações de Al de 22,45 g/L, 24,66 g/L e 20,24 g/L, respectivamente. Observou-se que novamente ao empregar NaNO_3 como única fonte de nitrogênio, os resultados não ultrapassaram os 0,16 g/L de Al após 12 dias de fermentação. Porém o tratamento *C*, contendo NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mostrou o segundo melhor grupo de resultados obtidos, o qual permite induzir que o incremento no pH observado em testes preliminares (TABELA 14), devido ao consumo de NO_3^- , desfavorece o processo fermentativo, sendo que os

melhores resultados foram obtidos para fermentações com pH final menor que 3. Finalmente, os baixos resultados de apenas 12,44 g/L de AI observados para o tratamento *D* (unicamente ureia com concentração final de N equivalente) demonstram a necessidade de contar com uma fonte de amônio para o desenvolvimento inicial da biomassa e atingir concentrações finais superiores de AI.

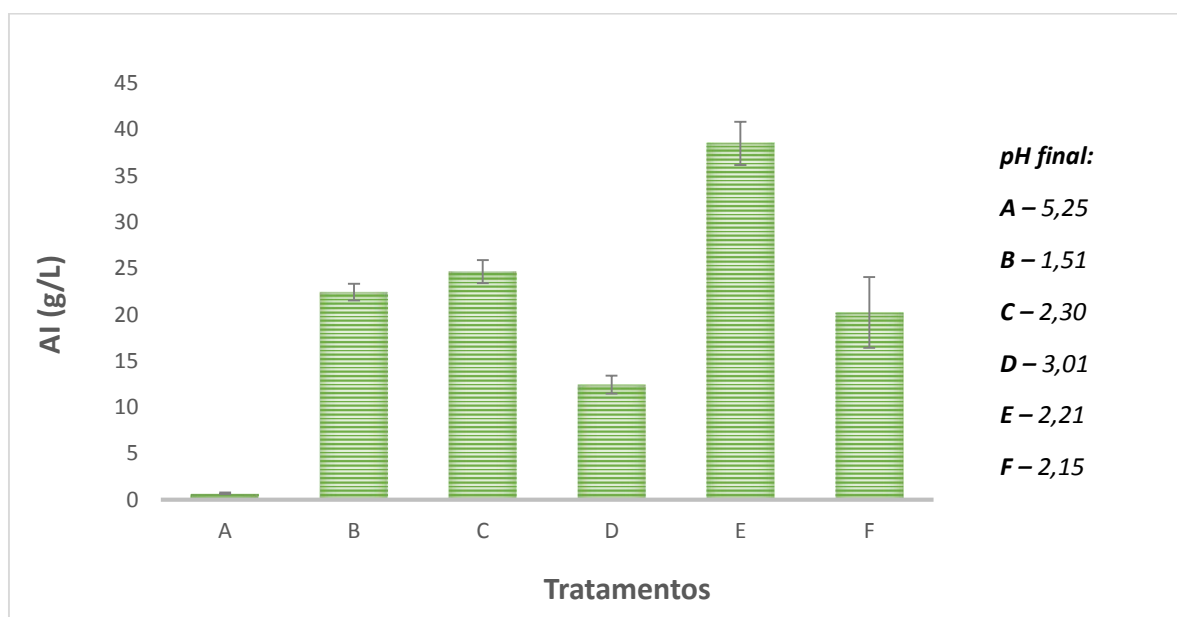


FIGURA 13 - EFEITO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO EMPREGANDO *A. terreus* NRRL 1960.

A: 3 g/L NaNO_3 . **B:** 3,1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **C:** 2 g/L NaNO_3 + 1,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **D:** 2,25 g/L ureia. **E:** 1,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1,5 g/L ureia. **F:** 3 g/L NH_4NO_3 .

Em uma segunda etapa, foi realizada a otimização da fonte mista de N. Para isto, foi mantida a concentração global de nitrogênio elementar em 1,05 g/L, variando unicamente a natureza da fonte e avaliando os resultados após 6 dias de fermentação, o que corresponde à metade do tempo considerado para os experimentos da FIGURA 13. Os tratamentos realizados nesta segunda etapa tiveram a sua composição baseada no meio *E*, isto é, fornecendo uma fonte de amônio para a fase inicial de desenvolvimento da biomassa e ureia, a qual possivelmente é consumida em uma fase posterior, similar ao reportado para o nitrato quando é empregado NH_4NO_3 no meio de cultura (KUENZ *et al.*, 2012).

Nos testes realizados foi incluído o NH_4Cl , o qual foi reportado para produção de AI em fermentações com *A. terreus* em concentrações ideais na faixa de 0,25-0,35 g/L como única fonte de N (MEENSA *et al.*, 2010).

Pode-se verificar que ao incrementar a proporção de amônio no meio de cultivo obtém-se um aumento na produção de AI atingindo uma concentração final de 20,88 g/L no tratamento E-3 após 6 dias de fermentação. Este tratamento teve suplementação de duas fontes de amônio, além da ureia, e sem controle de pH e apresentou resultados superiores ao tratamento E original, o qual produziu 6,22 g/L de AI em 6 dias (FIGURA 14). Porém, não houve diferenças significativas entre os tratamentos E-2 e E-3. Pode-se concluir que a produção de AI encontra-se relacionada diretamente com a disponibilidade de uma fonte de nitrogênio mista composta por 50% de N-amoniacal.

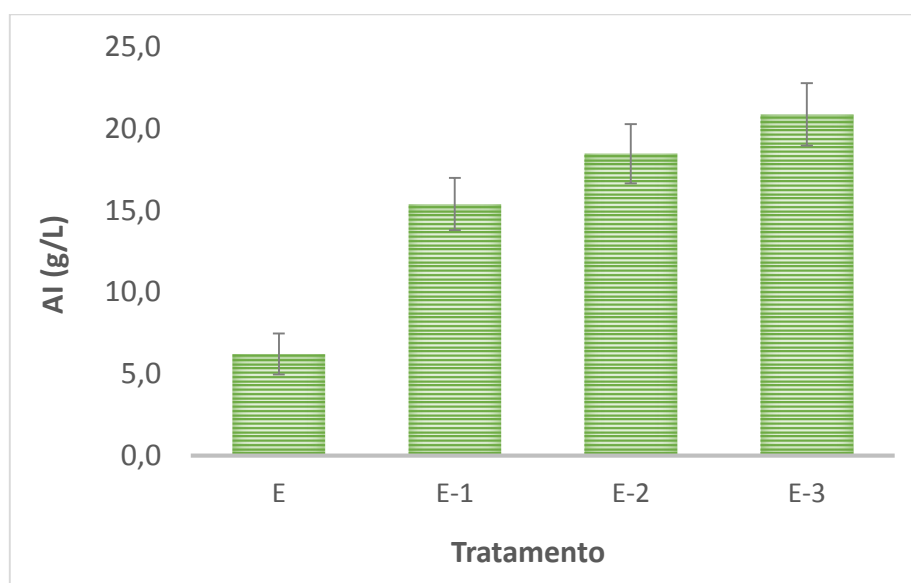


FIGURA 14 - OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO MISTA A EMPREGAR NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO POR *A. terreus* NRRL 1960.

E: 1,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1,5 g/L ureia. **E-1:** 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1,35 g/L ureia. **E-2:** 2 g/L NH_4Cl + 1,15 g/L ureia. **E-3:** 1 g/L NH_4Cl + 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1,25 g/L ureia.

5.2.2. Efeito do pH

Na fase de produção de inóculo o parâmetro físico pH foi identificado como um fator de significância na geração de biomassa adaptada para maximizar a produção de AI. Na seção anterior, foi comentada a importância de manter o pH em níveis próximos a 3 durante a etapa de síntese do ácido. Porém, estudos recentes realizados pelo grupo de pesquisa de Hevekerl, Kuenz e Vorlop (2014) indicam que quando é utilizada uma suspensão de esporos como inóculo no meio de produção, é possível obter melhores resultados quando é realizada um incremento pontual no pH. Assim o valor de pH do meio é ajustado para os valores de 5-6, após o desenvolvimento da biomassa (2,1 dias logo depois de iniciado o cultivo) e permitindo que o curso normal da fermentação acidifique novamente o meio. De acordo com os autores, a estratégia propicia condições de menor estresse fisiológico que permitem incrementar a produção de AI em até 68% e reduzir a formação de subprodutos (HEVEKERL; KUENZ; VORLOP, 2014).

Nesta pesquisa os valores de pH 5 e 6 foram avaliados no início da fase de síntese de AI, o que simula o aumento de pH realizado pelo grupo de Hevekerl, Kuenz e Vorlop (2014) após dois dias de iniciada a fermentação. Os experimentos foram comparados com um grupo controle com pH inicial de 3 e inóculo de biomassa gerada a partir da metodologia proposta na Seção 5.1.1. Os resultados são apresentados na TABELA 15.

TABELA 15 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO EM TRATAMENTOS COM DIFERENTES VALORES INICIAS DE pH.

Tratamento	X (g/L)	AI (g/L)	S _r (g/L)	pH final	Y _{p/s}	Y _{p/x}	r _p AI (g/L h)
pH 3 (C+)	5,75 ±0,37	49,73 ±2,39	6,96 ±3,03	2,14	0,53	8,65	0,35
pH 5	5,95 ±0,14	45,05 ±0,19	4,94 ±0,74	2,15	0,47	7,57	0,31
pH 6	6,44 ±0,81	41,21 ±1,03	8,78 ±3,06	2,11	0,45	6,40	0,29

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que o tratamento com pH inicial 3 atingiu a menor concentração de biomassa com 5,75 g/L, a maior produção de AI com 49,73 g/L. Também o tratamento apresentou o maior rendimento de produto a partir de substrato consumido com um valor de 0,53 g/g, o maior rendimento de produto a partir de biomassa produzida (8,65g AI/ g biomassa) e a maior produtividade horária (0,35 g/L h), sendo portanto superior para todos os aspectos avaliados. A FIGURA 15 mostra a comparação entre os resultados obtidos para cada tratamento considerando a produção final de AI como variável resposta.

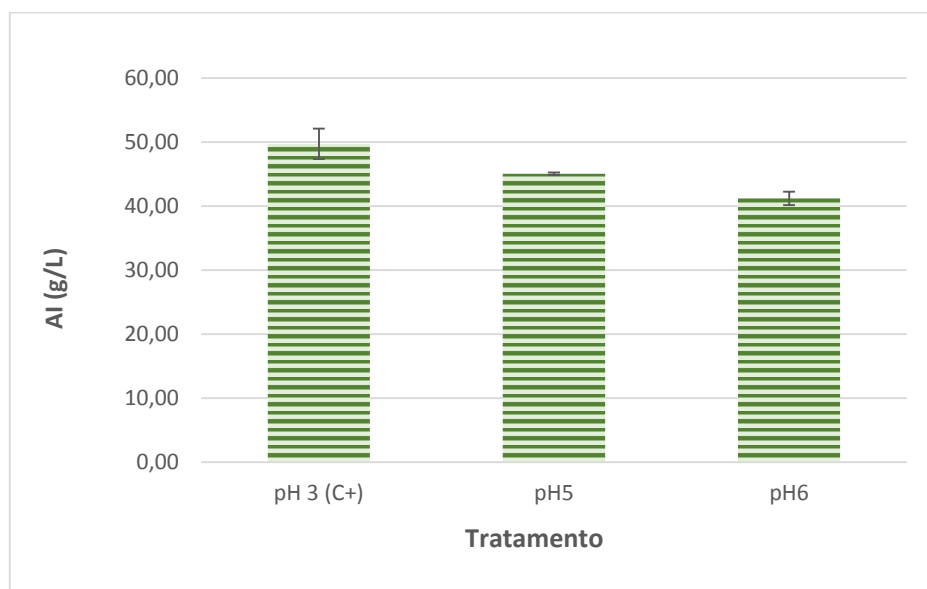


FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO SOB DIFERENTES VALORES INICIAIS DE pH NA FASE FERMENTATIVA.

Os resultados observados para a cepa *A. terreus* NRRL 1960 diferem dos reportados por Hevekerl, Kuenz e Vorlop (2014), os quais trabalharam com a cepa melhorada DSM-23081. Esse fato pode ser ocasionado precisamente pelas diferenças e propriedades fisiológicas de cada micro-organismo.

Finalmente, é importante destacar que ao se empregar um sistema de fermentação com pH baixo existe uma série de vantagens, tais como reduzir a possibilidade de contaminação do meio de produção e facilitar a recuperação e purificação do produto final.

5.2.3. Cinética de produção em meio sintético

Uma vez atingidas as condições de preparo do inóculo e estabelecido o meio de cultivo da fase de produção, foi realizado um estudo da cinética de produção de AI com o objetivo de avaliar os rendimentos e produtividades horárias ao longo de diferentes pontos do processo, e determinar assim o tempo ideal de fermentação.

Na TABELA 16, são apresentados os resultados de AI e biomassa, valores calculados para rendimento de produto sobre substrato consumido, produto sobre biomassa produzida e produção horária de AI.

TABELA 16 - RENDIMENTOS E PRODUTIVIDADE CALCULADA AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE *A. terreus* PARA PRODUÇÃO DE AI.

Dia	X (g/L)	AI (g/L)	Y _{P/X}	Y _{P/S}	r _p AI (g/L h)
0	0,84 ± 0,10	0,10 ± 0,03	0,12	-	-
1	2,74 ± 0,28	0,18 ± 0,01	0,07	0,01	0,01
2	4,78 ± 0,49	2,48 ± 1,24	0,52	0,11	0,05
3	5,90 ± 0,36	7,43 ± 2,58	1,26	0,33	0,10
4	6,73 ± 0,50	15,13 ± 4,58	2,25	0,36	0,16
5	7,18 ± 0,04	22,55 ± 4,73	3,10	0,40	0,19
6	7,15 ± 0,15	32,69 ± 4,68	4,57	0,50	0,23
7	7,31 ± 0,29	41,30 ± 4,93	5,65	0,52	0,25
8	8,33 ± 0,41	49,90 ± 3,32	5,99	0,55	0,26

Após 8 dias de avaliação, foram obtidos resultados próximos aos máximos reportados na literatura para a cepa *A. terreus* NRRL 1960 em cultivo realizado em frascos Erlenmeyer. O rendimento atingido para AI produzido por grama de glicose consumido foi de 0,55 g/g, com uma produtividade horária de 0,26 g/L h, e uma redução de 2 dias no tempo da fermentação em relação ao processo empregando esporos como inóculo (KUENZ *et al.* 2012). Na TABELA 17 encontra-se a comparação dos resultados da presente pesquisa *versus* dados de outros estudos onde foi empregado meio sintético de produção e a cepa *A.*

terreus NRRL 1960. É apresentado também como referência o resultado da pesquisa efetuada por Kuenz *et al.* (2012), onde se utilizou uma concentração inicial superior de fonte de carbono, uma cepa melhorada (*A. terreus* DSM 23081) e o processo foi otimizado em reator de tanque agitado (STR), o qual permitiu obter uma concentração final de 86,2 g/L de AI em 7 dias. Portanto, o escalonamento do processo desenvolvido na presente pesquisa e o uso de uma fonte de carbono em maiores concentrações permitiria atingir resultados mais favoráveis.

TABELA 17 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM DADOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A PRODUÇÃO DE AI EMPREGANDO *A. terreus*.

Referência	Fonte de C (g/L)	Sistema	AI (g/L)	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$	r_p AI (g/L h)	Tempo (dias)
Este trabalho ¹	100 g/L Glicose	Erlenmeyer	49,90	5,99	0,55	0,26	8
Kocabas <i>et al.</i> (2013) ¹	100 g/L Glicose	Erlenmeyer	18	-	0,18	0,11	7
Gyamerah (1995) ¹	100 g/L Glicose	Erlenmeyer	51,54	6,50	0,52	0,22	10
Riscaldati <i>et al.</i> (2000) ¹	100 g/L Glicose	STR	57,2	5,40	0,54	0,23	10
Jarry e Seraudie (1997) – Patente ¹	110 g/L Sacarose	STR	69,7	-	0,63	0,43	6,7
Kuenz <i>et al.</i> (2012) ²	180 g/L Glicose	Erlenmeyer	90	10,71	0,58	0,29	13
	180 g/L Glicose	STR	86,2	6,63	0,62	0,51	7

Estudos com cepas A. terreus NRRL 1960¹ e A. terreus DSM 23081²

A FIGURA 16 mostra a representação gráfica dos parâmetros monitorados ao longo dos 8 dias de fermentação. Durante o período avaliado, não foi detectada degradação do AI produzido, porém é possível que isso aconteça uma vez que seja totalmente esgotada a fonte de carbono. A proporção máxima de

consumo de substrato calculada para o processo foi de 0,57g/L h, estimada segundo os dados cinéticos obtidos.

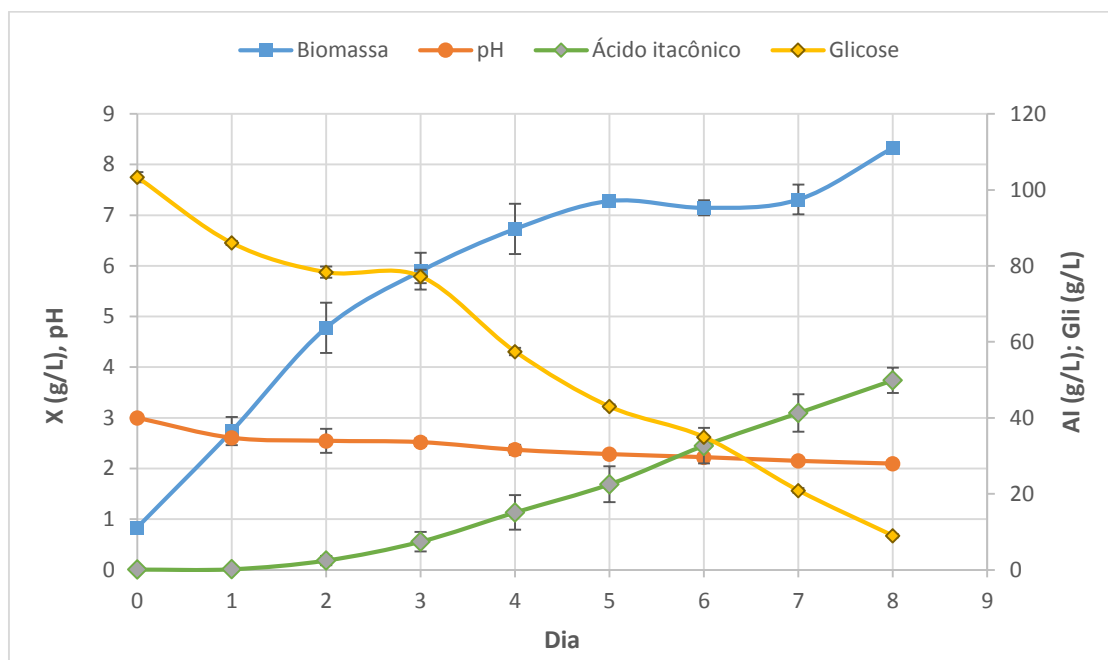


FIGURA 16 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE AI E BIOMASSA, CONSUMO DE SUBSTRATO E pH PARA FERMENTAÇÃO SUBMERSA EMPREGANDO *A. terreus* NRRL 1960.

A velocidade específica de crescimento (μ) calculada para a fase exponencial (até 48 horas) apresentou um valor de $0,04 \text{ h}^{-1}$, o que é similar ao valor reportado por Meensa *et al.* (2010) de $0,042 \text{ h}^{-1}$ para fermentação com *A. terreus* na produção de AI. Esse valor encontra-se fora do intervalo normal esperado para μ em fungos filamentosos ($0,1-0,45 \text{ h}^{-1}$), porém condições físicas como o baixo pH do meio e alta pressão osmótica podem interferir reduzindo a proporção de crescimento normal do fungo (SHANKAR; KAPOOR, 2010).

Adicionalmente, durante o intervalo de 3-8 dias foi calculado um valor de produtividade volumétrica máxima de AI (r_{pmax}) de $0,33 \text{ g/L h}$, superior ao valor global calculado de $0,26 \text{ g/L h}$. Isso indica que, uma vez gerada a biomassa necessária, a velocidade de síntese do produto aumenta, o que é um aspecto de interesse para futuros processos industriais contínuos.

Além disso, observa-se que o início da produção de AI coincide com uma pequena desaceleração da produção de biomassa, o que está de acordo com a cinética de geração de produto esperada para um metabólito secundário parcialmente associado ao crescimento (SHANKAR; KAPOOR, 2010).

De acordo com os dados de rendimento teórico ($Y_{P/S}$) calculado para produção de ácido itacônico a partir de glicose (0,72 g/g), estabeleceu-se que no presente projeto foi possível desenvolver um processo biotecnológico que em escala laboratorial atinge o 76,4% do valor máximo possível de AI.

Conclui-se que a otimização da metodologia de produção de inóculo vegetativo e da composição do meio de cultivo sintético alcançaram em conjunto rendimentos e concentrações finais máximas similares às encontradas na literatura para a cepa NRRL 1960 (GYAMERAH, 1995a; KOCABAS; OGEL; BAKIR, 2014; KUENZ *et al.*, 2012; OKABE *et al.*, 2009; RISCALDATI *et al.*, 2000; SHIN *et al.*, 2013; STEIGER *et al.*, 2013).

5.2.4. Álcoois inferiores

O uso de álcoois inferiores como aditivos na fermentação é amplamente usado para condicionamento do micélio em processos de produção de ácidos orgânicos, especialmente de ácido cítrico (RODRIGUES, 2006). Portanto, no presente trabalho avaliou-se o efeito da adição de 2% (v/v) de metanol ou isopropanol ao meio sintético otimizado. Na TABELA 18 são apresentados os resultados obtidos comparados com o tratamento controle (sem aditivos). Observou-se que para as concentrações testadas não foi obtido nenhum efeito significativo na produção de AI. Porém, existem relatos do uso de álcoois inferiores para incrementar a produção de ácidos orgânicos quando são empregados substratos complexos com teores de metais traço superiores aos requeridos na síntese de AI, sendo necessário avaliar mediante futuros trabalhos também o efeito do metanol e propanol na formulação de um meio de cultivo complexo.

TABELA 18 - EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁLCOOIS INFERIORES NA PRODUÇÃO DE AI POR *A. terreus* NRRL 1960.

Tratamento	X (g/L)	AI (g/L)	pH	Y _{P/X}	Y _{P/S}	r _p AI (g/L h)
Metanol 2%	5,62 ± 0,23	33,88 ± 2,00 a	2,16	6,03	0,34	0,20
Isopropanol 2%	5,55 ± 0,27	41,46 ± 0,60 b	2,11	7,48	0,42	0,25
Controle	6,04 ± 0,31	40,60 ± 2,20 b	2,13	6,72	0,41	0,24

5.2.5. Comparação entre cepas NRRL 1960 e 265

A cepa NRRL 265 foi empregada como parâmetro comparativo do processo otimizado para NRRL 1960. De acordo com a base de dados do *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL), as duas cepas acima indicadas foram isoladas a partir de amostras de solo do estado de Texas, USA no ano 1935 (ARS, 2015). Porém, unicamente a cepa NRRL é reportada como um excelente produtor de AI.

Na presente pesquisa os dois micro-organismos foram avaliados sob mesmas condições de cultivo, aplicando o protocolo padronizado na presente pesquisa para preparo de pre-inóculo, produção de biomassa com morfologia ótima e síntese de AI durante um período de 6 dias. A TABELA 19 apresenta os resultados obtidos para as duas cepas.

TABELA 19 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO ITACÔNICO PARA AS CEPAS *A. terreus* NRRL 1960 e NRRL 265.

Cepa	X (g/L)	AI (g/L)	Sr (g/L)	pH	Y _{p/s}	Y _{p/x}	r _p AI (g/L h)
NRRL 1960	5,75 ± 0,37	49,73 ± 2,39	6,96 ± 3,03	2,14	0,53	8,65	0,35
NRRL 265	13,76 ± 1,04	19,79 ± 2,05	19,20 ± 3,70	2,10	0,24	1,44	0,14

Os dados apresentados na TABELA 19 demonstram a superioridade da cepa NRRL 1960 para o objetivo de estudo na presente pesquisa, a qual atingiu 49,73 g/L de Al com uma produtividade horária de 0,35 g/L h, sendo evidente que os melhores resultados obtidos são para a cepa industrial, concordando assim com as informações encontradas na literatura. Isso é de especial importância considerando-se que existem relatos de cepas melhoradas que atingem rendimentos $Y_{P/S}$ de 0,72 g/g ou produtividades volumétricas de 0,55-0,64 g/L h (SHIN *et al.*, 2013; YAHIRO; TAKAHAMA; *et al.*, 1997), valores muito superiores aos obtidos na presente pesquisa.

5.2.6. Aumento de escala

Em processos biotecnológicos, uma fase fundamental é o escalonamento ou aumento de escala, realizado com o objetivo de confirmar a viabilidade de um determinado bioprocessamento para a produção em nível industrial. Fatores como a viscosidade e reologia do meio, agitação ou aeração podem interferir nos fenômenos de transporte e intercâmbio gasoso ou calórico, afetando a síntese do produto final ou a velocidade e produtividade global horária do processo.

Para a produção biológica de Al usando o fungo *A. terreus*, tem sido reportado o escalonamento em fermentadores *Stirred Tank Reactor* (STR) (GAO *et al.*, 2013; JUY; OREJAS; LUCCA, 2010; KUENZ *et al.*, 2012; PETRUCCIOLI; PULCI; FEDERICI, 1999; RISCALDATI *et al.*, 2000; SHIN *et al.*, 2013; YAHIRO; TAKAHAMA; *et al.*, 1997), reatores tipo *Air-lift* (OKABE; OHTA; PARK, 1993; PARK *et al.*, 1994; TSAI *et al.*, 2001; YAHIRO *et al.*, 1995; YAHIRO; TAKAHAMA; *et al.*, 1997) e reatores com células imobilizados (KAUTOLA; VASSILEV; LINKO, 1990; KAUTOLA, 1989; KAUTOLA *et al.*, 1985). No estudo realizado por Yahiro *et al.* (1997) foi comparada a produção de Al em reatores STR e *Air-lift*. Os melhores dados obtidos pelo grupo de pesquisa para a cepa melhorada *A. terreus* TN-484 foram de 51,5 g/L de Al a 300 rpm e 0,5 vvm em reator STR e 65,5 g/L de Al a 2,0 vvm em reator *Air-lift*. Na pesquisa mencionada os autores indicam que, ao empregar ar enriquecido com oxigênio no sistema *Air-lift*, é

possível produzir 62,4 g/L com uma vazão de ar de 0,5 vvm, reduzindo assim os custos relacionados à aeração e antiespumante necessário.

Considerando tanto os resultados obtidos por Yahiro *et al.* (1997), como a importância da morfologia de crescimento de *A. terreus* na produção de Al, foi escolhido o biorreator do tipo coluna de bolhas para o escalonamento do processo, pois o sistema oferece um baixo estresse hidrodinâmico e alta disponibilidade de oxigênio. Os resultados obtidos no presente trabalho e a sua comparação com um controle de fermentação realizado em *shaker* orbital apresentam-se na TABELA 20.

TABELA 20 - PRODUÇÃO DE Al EM BIOREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS DE 1 L.

Tratamento	X (g/L)	Al (g/L)	S _r (g/L)	pH	Y _{P/S}	Y _{P/X}	r _p Al (g/L h)
Coluna de bolhas	7,88 ±1,03	46,24 ±3,48	9,05 ±0,82	2,20	0,51	5,87	0,321
Controle	8,39 ±0,72	47,83 ±2,52	8,65 ±1,33	2,13	0,52	5,70	0,332

De acordo com os dados apresentados na TABELA 20, é possível concluir que o processo proposto, empregando meio sintético, pode ser escalonado empregando um sistema *Air-Lift* com vazão de ar de 2 vvm, atingindo uma concentração final de 46,24 g/L com rendimento Y_{P/S} de 0,51 e produtividade horária de 0,321 g/L h de Al, sendo que este não apresentou diferenças significativas com o controle realizado em *shaker* orbital.

5.3. PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO

Como parte do presente projeto foi avaliada a possibilidade de produzir AI em meio complexo formulado a partir de matérias primas de baixo custo, como resíduos ou substratos de origem agrícola amplamente distribuídos no Brasil. O objetivo final foi estabelecer um processo economicamente sustentável de síntese biológica de AI.

5.3.1. Caracterização físico-química de substratos

Para estabelecer um comparativo adequado entre os substratos avaliados na formulação do meio complexo, e contar com um sistema padronizado para suplementação da fonte de carbono, foi realizada a caracterização físico-química das matérias primas. Na Tabela 21 apresentam-se os dados correspondentes à porcentagem de açúcares totais calculada usando a metodologia de Somogyi-Nelson, e a quantidade de açúcares disponíveis em um extrato aquoso (obtido a partir de 5 g de substrato / 100 mL de água), pH, umidade e atividade de água. Observa-se que os materiais com maior teor de açúcares disponíveis após hidrólise ácida correspondem a matérias primas amiláceas, o que é previsível considerando que o tratamento realizado procura fornecer açúcares simples a partir de carboidratos complexos. Porém, é preciso determinar a capacidade de *A. terreus* para aproveitar essas fontes de carbono sob condições de fermentação ácida, onde as enzimas α e β -amilase poderiam se encontrar inativadas.

Finalmente, foi observado que o extrato aquoso de polpa cítrica 5% (m/v) apresentou a maior concentração de açúcares totais com 9,74 g/L, enquanto o milho, a casca de soja e o bagaço de cana apresentaram as menores concentrações. Conclui-se que o extrato de polpa cítrica representa o substrato com maior potencial para ser empregado em processos de fermentação submersa.

TABELA 21 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS PRIMAS AVALIADAS PARA PRODUÇÃO DE AI.

Material	% Açúcares Totais (base seca)	g/L Açúcar / extrato 5% (m/v)	pH	Umidade (%)	a _w
Polpa cítrica	29,49 ± 0,79	9,74 ± 0,34	5,06	10,80 ± 0,19	0,594 ± 0,007
Casca de soja	11,63 ± 0,32	1,16 ± 0,30	6,25	7,63 ± 1,02	0,391 ± 0,012
Farelo de Trigo	35,99 ± 0,64	3,96 ± 0,75	6,11	5,71 ± 1,59	0,112 ± 0,004
Milho	46,44 ± 0,32	1,88 ± 0,74	6,02	10,39 ± 0,72	0,640 ± 0,005
Batata	37,01 ± 0,64	3,43 ± 0,37	6,17	9,76 ± 1,17	0,401 ± 0,002
Batata doce	48,69 ± 0,32	13,46 ± 1,00	5,58	9,81 ± 1,06	0,477 ± 0,006
Mandioca	50,71 ± 0,95	11,43 ± 0,93	5,05	4,78 ± 0,47	0,206 ± 0,011
Bagaço de cana	15,34 ± 0,79	0,98 ± 1,23	4,98	11,03 ± 0,58	0,537 ± 0,010
Bagaço de mandioca	45,88 ± 1,42	6,35 ± 1,23	5,39	14,72 ± 0,97	0,692 ± 0,009
Melaço de cana	71,23 ± 0,21	-	4,95	19,04 ± 0,72	-

5.3.2. Crescimento apical

A avaliação do crescimento apical em placa teve como objetivo estabelecer se o fungo *A. terreus* NRRL 1960 tem a capacidade de se desenvolver em condições de meio ácido (pH 3 ajustado com HCl 10% após autoclavagem) em substratos complexos. Os resultados do experimento (FIGURA 17), monitorado durante 14 dias, demonstram que a cepa pode se adaptar e proliferar na totalidade dos substratos testados, sendo menor o diâmetro do micélio para aqueles que possuem uma fonte de carbono amilácea e aparentemente maiores teores de nitrogênio disponível. Isso é devido possivelmente a uma diminuição na atividade das enzimas necessárias para o aproveitamento de carboidratos complexos, o que acontece geralmente em valores de pH inferiores a 5 (NIELSEN; BORCHERT; VRIEND, 2001).

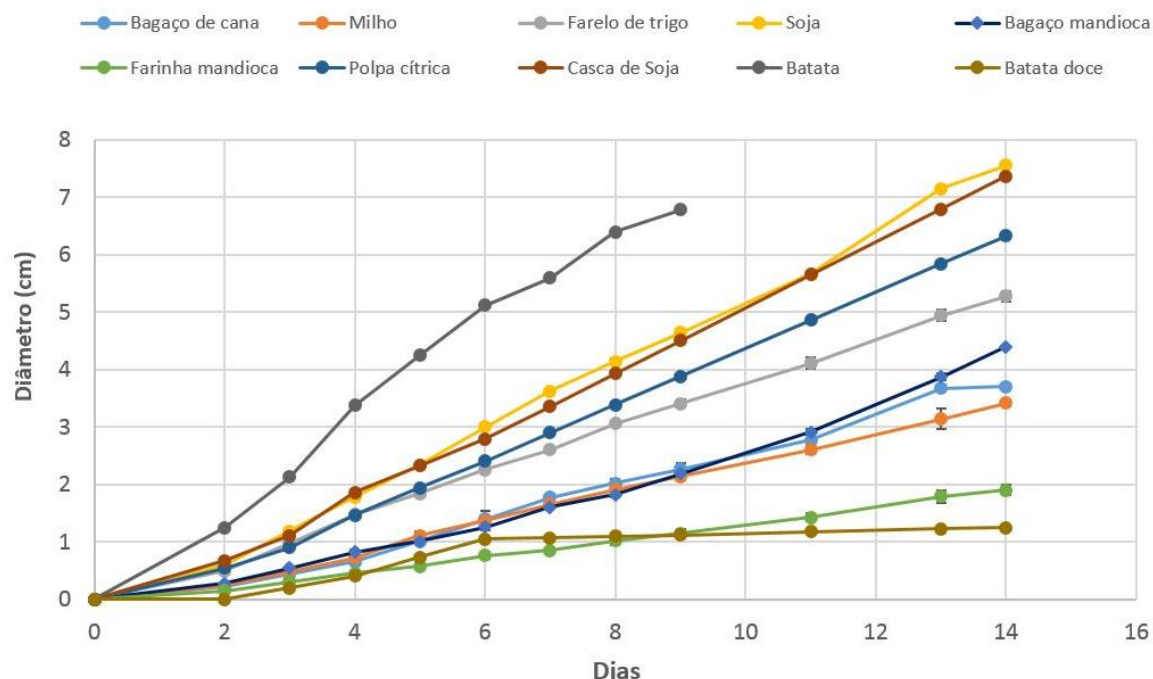


FIGURA 17 - CRESCIMENTO APICAL DE *A. terreus* NRRL 1960 EM DIFERENTES SUBSTRATOS.

5.3.3. Testes iniciais de fermentação submersa empregando fonte de carbono complexa

O melaço de cana e o glicerol são fontes de carbono reportadas para produção industrial de AI, com processos patenteados pela Pzifer e Rhône-Poulenc Chimie, respectivamente (NUBEL *et al.* 1962; JARRY e SERAUDIE, 1997). Para ambos os substratos o rendimento máximo reportado é de aproximadamente 0,5 g AI/g fonte de carbono. No presente trabalho foram realizados testes preliminares substituindo a glicose por melaço de cana, glicerol e sacarose comercial, mantendo as concentrações de sais e condições físicas estabelecidas na fase de produção em meio sintético. Os resultados são apresentados na TABELA 22.

TABELA 22 - RESULTADOS PRELIMINARES PARA PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO COM FONTE ALTERNATIVA DE CARBONO.

Tratamento	X (g/L)	AI (g/L)	pH	Y _{P/X}	Y _{P/S}	r _p AI (g/L h)
<i>Melaço de cana</i>	13,88 ± 0,29	11,49 ± 1,36	1,84	0,83	0,17	0,07
<i>Glicerol</i>	6,25 ± 0,19	31,55 ± 1,32	2,29	5,05	-	0,19
<i>Sacarose</i>	4,81 ± 0,23	44,25 ± 1,22	2,22	9,19	0,46	0,26
<i>Controle - Glicose</i>	6,04 ± 0,31	40,60 ± 2,20	2,13	6,72	0,41	0,24

Pode-se observar que para o melaço de cana a produção de AI foi muito menor do que o esperado, gerando uma concentração final de 11,49 g/L e um Y_{P/S} de 0,17 g/g com base no açúcar total consumido. Porém, a biomassa obtida foi duas vezes maior em relação à obtida para os outros tratamentos, apresentando um valor de 13,88 g/L. Isso pode ter sido resultado de um excesso de nutrientes no meio de cultura e diferente proporção de C/N, produto da adição de sais na formulação do meio.

De acordo com o levantamento de dados da literatura, o melaço de cana contém altas concentrações de ferro (249 mg/kg) e manganês (35 mg/kg), o que poderia afetar o uso pelo micro-organismo da rota metabólica necessária para produção de AI (Ver seção 3.4.4). Além disso, segundo os dados de composição, o melaço sem adição de fontes de nitrogênio ou fósforo poderia fornecer os requerimentos nutricionais necessários para o desenvolvimento da biomassa de *A. terreus* e posterior produção de AI.

Quanto ao glicerol, a concentração de AI foi de 31,55 g/L após término da fermentação, resultado inferior ao atingido com o controle empregando glicose como fonte de carbono (40,60 g/L de AI). Não foi possível realizar o cálculo do valor Y_{P/S} devido à falta dos reagentes necessários para estabelecer uma metodologia de análise de glicerol. Como foi comentado previamente, na literatura existem relatos do uso de glicerol para produção de AI. Na patente de Jarry e Seraudie (1997), foi reportada uma concentração máxima de 49,6 g/L de AI após 10 dias de fermentação, para uma produtividade volumétrica de 0,21g/L h, um valor próximo ao alcançado no presente trabalho (0,19 g/L h). Isso poderia

indicar que para o uso de glicerol é preciso incrementar o tempo de fermentação para maximizar a conversão de substrato a AI. É possível que o uso de fonte mista de carbono incluindo sacarose permita maximizar as concentrações finais obtidas na fermentação submersa.

Finalmente, como se pode observar na TABELA 22, as concentrações finais obtidas para o tratamento de sacarose (grau comercial, não analítico) como única fonte de carbono apresentaram melhores resultados que o controle com glicose. A utilização desse açúcar representa portanto uma opção para a produção de AI em meio sintético de menor custo.

5.3.4. Fermentação submersa empregando extratos aquosos de substratos complexos

Os extratos aquosos das matérias primas selecionadas foram avaliados com o objetivo de estabelecer a possibilidade de serem empregados na formulação de um meio alternativo de menor custo. Porém, de acordo aos dados da caracterização físico-química dos substratos (TABELA 21), foi observado que nenhum deles superava a concentração de 15 g/L de açúcar, sendo necessária a suplementação com sacarose comercial para atingir uma concentração de 100 g/L de carbono. Adicionalmente, foi realizada também a suplementação da fonte de N, visando manter uma proporção C/N similar à do tratamento controle com meio sintético. As fontes de C e N foram as únicas adicionadas, sendo que os metais traço e sais foram fornecidos pelos extratos complexos. Os resultados das fermentações submersas apresentam-se na TABELA 23.

TABELA 23 - PRODUÇÃO DE AI EM MEIO COMPLEXO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Tratamento	X (g/L)	AI (g/L)	S _r (g/L)	pH	Y _{p/s}	Y _{p/x}	AI (g/L h)
Polpa cítrica	10,64 ± 0,44	27,05 ± 2,19	6,28 ± 4,02	2,03	0,29	2,54	0,188
Casca de soja	16,70 ± 0,81	11,40 ± 3,73	13,61 ± 1,20	2,27	0,13	0,68	0,079
Farelo de Trigo	13,12 ± 0,44	17,92 ± 0,62	14,61 ± 0,82	2,43	0,21	1,37	0,124
Milho	11,22 ± 0,37	11,16 ± 0,35	27,84 ± 1,73	2,43	0,15	0,99	0,077
Batata	15,26 ± 0,32	10,03 ± 1,69	4,00 ± 0,43	2,27	0,10	0,66	0,070
Batata doce	15,53 ± 0,44	14,01 ± 0,60	3,42 ± 0,25	2,07	0,15	0,90	0,097
Mandioca	10,14 ± 0,17	10,02 ± 0,72	24,98 ± 2,67	2,73	0,13	0,99	0,070
Bagaço de mandioca	16,05 ± 0,38	16,70 ± 0,12	2,40 ± 0,04	2,13	0,17	1,04	0,116
Controle	7,50 ± 1,23	39,74 ± 1,51	1,66 ± 0,12	2,20	0,41	5,30	0,276

Dos extratos avaliados, o tratamento contendo polpa cítrica apresentou os melhores resultados, atingindo uma concentração final de 27,05 g/L de AI, rendimento $Y_{p/s}$ de 0,29 g/g e produtividade horária de 0,188 g/L h. A superioridade da polpa cítrica é um resultado previsível considerando que se trata de um substrato empregado com sucesso para produção de ácido cítrico via FES (RODRIGUES, 2006), o qual é um composto orgânico com rota de biossíntese similar à requerida para AI. Porém, observou-se que nenhum dos tratamentos avaliados apresentou resultados comparáveis ao tratamento controle de meio sintético com sacarose como fonte de carbono. Este último produziu 39,74 g/L de AI e 7,50 g/L de biomassa, com rendimentos $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$ de 0,41 g/g e 5,30 g/g, respectivamente.

Observa-se que para a totalidade dos extratos testados a quantidade de biomassa produzida supera ao grupo controle, sendo que para os tratamentos com casca de soja, batata, batata doce e bagaço de mandioca foi obtida duas vezes mais a biomassa em relação ao meio sintético. Conseqüentemente, a fonte de carbono foi consumida em maior proporção nas atividades de síntese e

manutenção de biomassa. Este incremento na produção de biomassa pode ter sido em função de um excesso na fonte de fósforo, a qual age como substrato limitante no processo. Adicionalmente, como foi observado na Seção 5.2.3, na cinética de produção de AI a produtividade volumétrica máxima foi atingida uma vez gerada a biomassa necessária para o processo, e portanto, uma fase de crescimento de maior tempo pode retardar o início da etapa de síntese de produto. Isso é evidenciado na TABELA 23, onde maiores concentrações finais de biomassa correspondem a um menor consumo de substrato e baixa produção de AI após 6 dias de fermentação.

5.3.5. Fermentação em estado sólido (FES)

Inicialmente, as fermentações em estado sólido foram realizadas empregando quirera de milho e farelo de trigo como substratos, sem adição de fontes adicionais de carbono ou nutrientes. A escolha das matérias primas foi produto dos resultados obtidos no teste de crescimento apical em condições ácidas do meio, sendo que o diâmetro atingido foi relacionado com a capacidade de aproveitamento do substrato. Assim valores próximos à média geral foram considerados como promissores para os testes em FES, já que correspondem a matérias primas que aparentemente favorecem o crescimento limitado da biomassa.

A avaliação preliminar dos substratos *in natura* teve por objetivo estabelecer a capacidade de *A. terreus* para produzir AI em baixas concentrações a partir de substratos não aditivados. Devido aos resultados obtidos (TABELA 24) decidiu-se testar a polpa cítrica enriquecida com fonte de nitrogênio (NH₄Cl), fonte de carbono em concentração adequada para atingir 100 g/kg de açúcar total e metais traço importantes (Zn, Cu e Mg). A escolha da polpa cítrica se deve ao fato de que representa um substrato já reportado com sucesso para produção de ácido cítrico (RODRIGUES, 2006), além de apresentar características próprias que poderiam favorecer o processo de produção de AI em fermentação em estado sólido, por exemplo pH natural

próximo a 5, um teor de aproximadamente 20% de açúcares fermentescíveis e baixas concentrações de fósforo e manganês. Os experimentos empregando polpa cítrica enriquecida com solução nutritiva foram realizados em paralelo para fermentação em frasco de vidro e em coluna com aeração forçada. O objetivo de empregar ambos os sistemas foi estabelecer o efeito da aeração no processo, o qual poderia ser a causa dos baixos resultados obtidos devido a possíveis altos requerimentos de oxigênio. Finalmente, foi realizado um teste de comparação entre as cepas NRRL 1960 e NRRL 265. O resumo dos experimentos efetuados se apresenta na TABELA 24.

TABELA 24 - RESUMO DOS RESULTADOS DAS FES REALIZADAS PARA PRODUÇÃO DE AI COM O FUNGO *A. terreus*.

Cepa	Substrato	Tratamento	AI g/kg	pH
NRRL 1960	Quirera de milho	<i>In natura</i>	0,62 ± 0,17	n.d
		Metais traço (Cu, Zn, Mg) adicionados	0,57 ± 0,21	n.d
		<i>In natura</i> + Tampão pH 3	0,51 ± 0,11	4,93
		NH ₄ Cl a 5g/kg + HNO ₃ 0,1%	0,52 ± 0,16	2,71
	Farelo de trigo	<i>In natura</i> , altura leito de 1cm	0,71 ± 0,13	n.d
		<i>In natura</i> , altura leito de 2cm	0,49 ± 0,17	n.d
		<i>In natura</i> , altura leito de 3cm	0,68 ± 0,23	n.d
		<i>In natura</i> , altura leito de 4cm	0,93 ± 0,24	n.d
		<i>In natura</i> + Tampão pH 3	0,62 ± 0,20	7,39
		NH ₄ Cl a 5g/kg + HNO ₃ 0,1%	1,60 ± 0,19	3,52
Polpa cítrica	Solução nutritiva: metais traço + 4g/L NH ₄ Cl + 80 g/L glicose. Aeração por difusão	1,96 ± 0,10	7,22	
	Solução nutritiva: metais traço + 4g/L NH ₄ Cl + 80 g/L glicose. Aeração forçada a 0,5 L/min	1,6 ± 0,04	4,96	
	Solução nutritiva: metais traço + 4g/L NH ₄ Cl + 80 g/L glicose. Agitação manual intensiva diária.	4,51 ± 0,44	7,18	
NRRL 265	Polpa cítrica	Solução nutritiva: metais traço + 4g/L NH ₄ Cl + 80 g/L glicose. Agitação manual intensiva diária.	3,11 ± 0,15	7,22

n.d. = não disponível

Como pode-se observar, para nenhum dos testes efetuados foi possível obter uma concentração final superior a 5 g Al/kg de substrato, mesmo quando foi feita a adição de solução nutritiva, tampão ou usado um sistema de aeração forçada. Os melhores resultados de 4,51 g Al/ kg de substrato foram obtidos implementando agitação manual intensiva, o que evitou a compactação excessiva do substrato pelo crescimento do micélio. Este último teste foi repetido empregando a cepa NRRL 265, com o objetivo de estabelecer um comparativo similar ao experimento feito para a fermentação submersa em meio sintético. No caso da cepa NRRL foi produzido um máximo de 3,11 g Al/ kg de substrato sob mesmas condições.

Na presente pesquisa não foi monitorado o crescimento da biomassa na FES, porém, na FIGURA 18 pode-se notar que *A. terreus* alcançou uma boa colonização do substrato sólido mesmo nos frascos que não foram aditivados com fonte de carbono, nitrogênio ou metais traço.

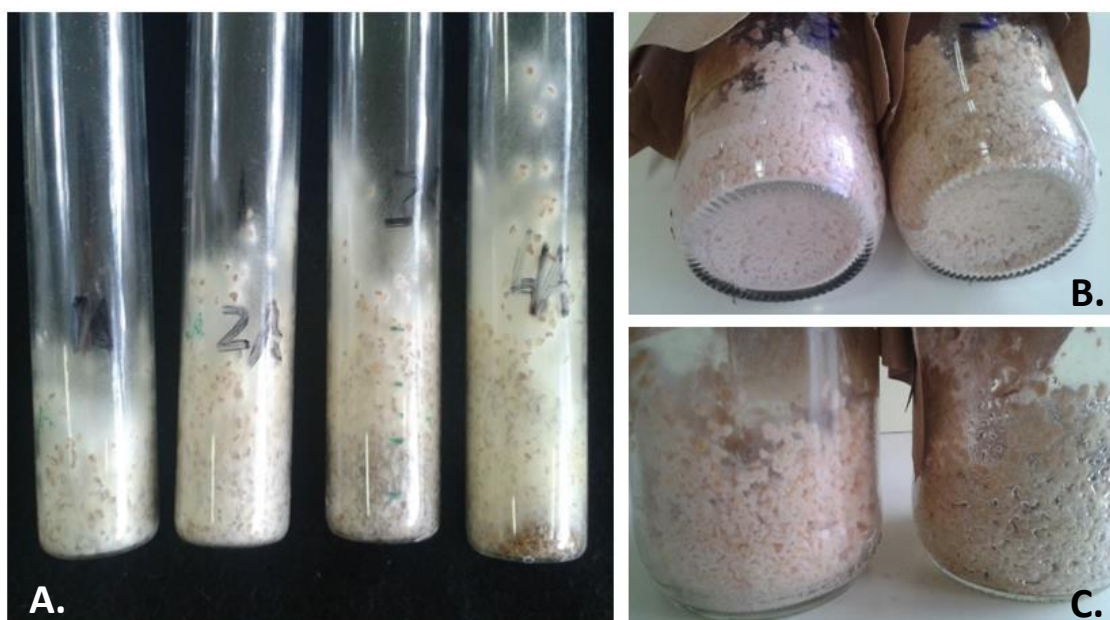


FIGURA 18 - FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE FARELO DE TRIGO EM DIFERENTES ALTURAS DE CAMADA SÓLIDA (A) E QUIRERA DE MILHO COM TAMPÃO pH 3 E HCl 10% (B, C).

Na literatura a informação que relata a produção bem sucedida de AI via fermentação em estado sólido é escassa, sendo nula para as cepas *A. terreus* NRRL 1960 e NRRL 265. Na patente do *National Science Council* de Tapei é indicada a produção de AI usando *A. terreus* M8 geneticamente modificada (cepa original ATCC 10020) empregando um suporte inerte impregnado com meio de cultivo sintético (TSAI *et al.*, 2001). Essa técnica permite gerar 55 g de AI partindo de uma solução de 100 g de glicose ($Y_{p/s} = 0,55$ g/g), porém não consiste em um processo real de aproveitamento de resíduos, e não apresenta maior rendimento que aquele reportado para fermentação submersa.

Recentemente foi publicada uma pesquisa que reporta o uso de *Ustilago maydis* na FES de resíduos agroindustriais para síntese de ácido itacônico. Neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos empregando polpa cítrica como substrato, 60% umidade, 32°C e pH inicial 3, para uma concentração final de 35,16 g AI/kg substrato (RAFI; HANUMANTHU; RAO, 2014). Isso reforça a hipótese de que a polpa cítrica poderia ser um substrato ideal para sintetizar ácido itacônico em FES, porém os resultados obtidos na presente pesquisa indicam que esta técnica é aparentemente inviável no caso de *A. terreus*.

5.3.5.1. Simulação da FES com meio sintético em suporte inerte

Para determinar se as limitações encontradas durante as fermentações em estado sólido obedecem a condições próprias do sistema de cultivo ou são influenciadas principalmente pela composição da matéria prima, foi planejado um teste de FES com meio sintético impregnado em suporte inerte, simulando assim as condições físicas da FES com uma fonte de nutrientes de composição conhecida.

Os substratos vermiculita e perlita foram selecionados devido à sua capacidade de absorção de líquido, sendo que podem atingir valores de 75% e 85% de umidade, respectivamente, sem apresentar água livre. Estes dados

correspondem a resultados experimentais obtidos no Laboratório de Processos Biotecnológicos I (LPB1). Para ambos os suportes foi avaliada uma condição de 65% de umidade, testada previamente com matérias primas como polpa cítrica ou farelo de trigo. Os resultados do experimento de simulação da FES são apresentados na TABELA 25.

TABELA 25 - PRODUÇÃO DE AI EM FES EMPREGANDO SUPORTE INERTE IMPREGNADO COM MEIO SINTÉTICO.

Tratamentos	Glicose inicial no suporte (g /kg)	Glicose residual no suporte (g /kg)	AI (g/kg de suporte)	Y _{p/s}	AI (g/kg h)	pH
Vermiculita	151,2	3,070	24,36	0,164	0,10	3,57
Perlita	153,4	9,377	33,69	0,234	0,14	2,77

Observou-se que a cepa *A. terreus* NRRL 1960 tem condições para produzir AI em um processo tipo FES, porém é possível que a composição complexa e excesso de fonte de fósforo nos substratos empregados em etapas e experimentos prévios tenha proporcionado um efeito negativo notável, inibindo a capacidade do fungo de gerar AI. Como foi comentado previamente, na patente do *National Science Council* de Tapei é reportada a produção de AI em FES usando a cepa *A. terreus* M8, com rendimento $Y_{p/s}$ de 0,55 g/g e sob condições similares de simulação do processo fermentativo em estado sólido. Na presente pesquisa foi obtida uma concentração máxima de 33 g/kg com rendimento $Y_{p/s}$ de 0,234 g/g, sendo que as diferenças observadas em comparação à patente indicada podem ser em decorrência da capacidade de cada cepa. Finalmente, foi comprovada a possibilidade de empregar um sistema FES para produção de AI com a cepa *A. terreus* NRRL 1960, porém o seu aproveitamento e aplicação ficam limitados pelo baixo rendimento na utilização de substratos complexos.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi estabelecida uma metodologia de produção biotecnológica de Al, realizando uma exploração dos tipos de fermentação, micro-organismos e substratos disponíveis para um produto com grande potencial na indústria química.

Como parte da pesquisa foi estabelecido um protocolo de produção de biomassa com morfologia específica para maximizar o intercâmbio gasoso e a produção final de Al. As condições físicas ótimas para preparo de inóculo foram pH 3, concentração inicial de esporos de 1×10^6 esporos/mL e proporção de volume de fermentação/volume do frasco (VF/Vf) de 0,2. Igualmente, foi identificada uma composição de meio de produção de biomassa que, sob as condições físicas mencionadas, permite obter um inóculo com morfologia tipo *clump* específica para otimizar a síntese de Al e maximizar o processo de intercâmbio gasoso e calórico.

A partir dos dados obtidos na etapa de estudo de fonte de nitrogênio, foi possível concluir que a produção de Al encontra-se relacionada diretamente com a disponibilidade de uma fonte de nitrogênio mista composta por 50% de N-amoniacal. Na presente pesquisa, a adição de 1 g/L NH_4Cl , 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,15 g/L ureia foi identificada como a composição adequada.

Adicionalmente, determinou-se que o pH é um fator de importância no processo fermentativo, sendo que é preciso dar início à fermentação com pH 3 e deve manter-se em um valor inferior a este limite. É importante destacar que valores de pH baixos apresentam uma série de vantagens, como reduzir a possibilidade de contaminação do meio de produção e facilitar a recuperação e purificação do produto final.

O estudo de cinética de produção em meio sintético empregando inóculo vegetativo demonstrou que é possível obter até 49,90 g/L de Al com rendimentos $Y_{p/s}$ de 0,55 g/g e $Y_{p/x}$ de 5,99 g/L, produtividade volumétrica de 0,26 g/L h de Al e taxa de consumo de substrato de 0,57g/L h de glicose.

Quanto à adição de álcoois inferiores, observou-se que para as concentrações testadas de metanol e isopropanol, não foi obtido nenhum efeito significativo na produção de ácido itacônico.

Por outro lado, a comparação entre as cepas NRRL 1960 e NRRL 265 demonstrou a necessidade de empregar um micro-organismo adaptado para produção em escala industrial. Esse fato é de especial importância ao considerar que existem relatos de cepas patenteadas que atingem rendimentos $Y_{P/S}$ de 0,72 g/g ou produtividades volumétricas de 0,55-0,64 g/L h.

Adicionalmente, a partir dos resultados do teste de crescimento apical em meio acidificado empregando substratos complexos como única fonte de nutrientes, foi possível concluir que a cepa NRRL 1960 tem a capacidade de proliferar na totalidade das matérias primas testadas, sendo que os menores diâmetros de micélio foram observados para aqueles substratos que possuem uma fonte de carbono amilácea e aparentemente maiores teores de nitrogênio disponível.

Nos testes de produção de AI em meio com fontes de carbono alternativas, foi observado que o glicerol é um substrato que poderia ser empregado para obtenção sustentável do produto de interesse, atingindo-se uma concentração final de 31,55 g/L de AI com produtividade volumétrica horária de 0,19 g/L h. Adicionalmente, a sacarose grau comercial permitiu obter resultados similares ao tratamento controle com glicose grau analítico, sendo uma opção que permite reduzir os custos do meio sintético.

A avaliação dos extratos 5% (m/v) das diferentes matérias primas permitiu estabelecer que possivelmente o excesso na fonte de fósforo favorece um maior crescimento e proliferação da biomassa, atrasando o início da fase de síntese de AI e reduzindo o consumo de substrato. O teste empregando polpa cítrica apresentou os melhores resultados, atingindo uma concentração final de 27,05 g/L de AI, rendimento $Y_{p/s}$ de 0,29 g/g e produtividade horária de 0,188 g/L h. É possível concluir que este substrato possui condições adequadas para ser empregado na produção industrial de AI.

Finalmente, foi possível concluir que a produção industrial de AI mediante FES não é viável devido a condições próprias do processo, sendo que a

composição complexa dos substratos avaliados foi o principal obstáculo para promover adequadamente a produção biológica de AI. Além disso, os altos requerimentos de oxigênio na fase de síntese representam uma limitação adicional para a geração de AI na FES.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos na presente pesquisa, podem ser sugeridos alguns pontos que poderiam ser explorados futuramente:

- Testar outros micro-organismos na produção de AI, tais como *Ustilago maydis* e *Pseudozyma antarctica*, os quais podem apresentar uma menor dependência de altos níveis de aeração, e reduzir as dificuldades técnicas do processo fermentativo.
- Avaliar a possibilidade de realizar melhoramento genético da cepa *Aspergillus terreus* NRRL 1960 mediante técnicas de engenharia metabólica, para incremento na expressão das enzimas e transportadores mitocondriais envolvidos na síntese de AI, e analisar estratégias para redução na dependência de oxigênio. Adicionalmente, é recomendável avaliar a super expressão dos genes envolvidos nas rotas metabólicas de outros micro-organismos produtores como *Ustilago maydis*, *Pseudozyma antarctica* ou *Candida* sp.
- Realizar um processo de aumento de escala a volume de fermentação maior que 20 L, empregando o meio sintético proposto e sacarose comercial como fonte de carbono.
- Avaliar o efeito de álcoois inferiores em tratamentos contendo fonte de carbono ou meio complexo, com o objetivo de estabelecer se a sua adição

reduz o possível efeito negativo de alguns metais traço como ferro e manganês.

- Testar o extrato de polpa cítrica 5% (m/v) suplementado com fontes alternativas de carbono de menor custo que a sacarose comercial, como por exemplo glicerol ou caldo de cana.

8. REFERÊNCIAS

AHMED EL-IMAM, A. *et al.* Production of Itaconic Acid from *Jatropha curcas* Seed Cake by *Aspergillus terreus*. *Not Sci Biol*, v. 5, n. 1, p. 57–61, 2013.

BATTI, M.; SCHWEIGER, L. *Process for the production of itaconic*. United States Patent: 3.078.217.1963.

BENTLEY, R.; THIESSEN, C. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*: I. Tracer studies with C¹⁴-Labeled Substrates. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 673–687, 1957.

BLAZECK, J. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for itaconic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 98, n. 19, p. 8155–8164, 2014.

BLUMHOFF, M. L. *et al.* Targeting enzymes to the right compartment: Metabolic engineering for itaconic acid production by *Aspergillus niger*. *Metab Eng*, v. 19C, p. 26–32, 29 maio 2013.

BONNARME, P. *et al.* Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 12, p. 3573–3578, 1995.

BRESSLER, E.; BRAUN, S. Conversion of citric acid to itaconic acid in a novel liquid membrane bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 75, p. 66–72, 2000.

CALAM, C.; OXFORD, A.; RAISTRICK, H. Itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Aspergillus terreus* Thom. *Biochem J*, v. 33, p. 1488–1495, 1939.

CARSTENSEN, F. *et al.* Continuous production and recovery of itaconic acid in a membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.*, v. 137, p. 179–87, 2013.

CHANDRAGIRI, R.; SASTRY, R. Synthesis of itaconic acid using *Ustilago maydis*. *Can. J. Chem. Eng.*, v. 2, n. 7, p. 128–135, 2011.

CROS, P.; SCHNEIDER, D. *Microbiological production of itaconic acid*. United States Patent: 5.231.016. 1993.

DE OLIVEIRA, J. *Produção de ácido giberélico por fermentação submersa e por fermentação no estado semissólido em diferentes modelos de biorreatores utilizando polpa cítrica*. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia). Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

DUETZ, W. A. Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Tr in microbiol*, v. 15, n. 10, p. 469–75, out. 2007.

DWIARTI, L. *et al.* Itaconic acid production using sago starch hydrolysate by *Aspergillus terreus* TN484-M1. *Bioresour. Technol.*, v. 98, n. 17, p. 3329–37, dez. 2007.

DWIARTI, L. *et al.* Purification and characterization of cis-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, v. 94, n. 1, p. 29–33, jan. 2002.

EL-IMAM, A. A.; DU, C. Fermentative Itaconic Acid Production. *J Biodivers Biopros Dev*, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2014.

GAO, Q. *et al.* Relationship between morphology and itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *J Microbiol Biotechnol*, v. 24, n. 2, p. 168–176, 30 out. 2013.

GYAMERAH, M. Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 44, p. 356–361, dez. 1995a.

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

HEVEKERL, A.; KUENZ, A.; VORLOP, K.-D. Influence of the pH on the itaconic acid production with *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 12 set. 2014.

JAHIM, J. *et al.* Factor Analysis in Itaconic Acid Fermentation using Filtered POME by *Aspergillus terreus* IMI 282743. *J Kejuruter.*, v. 18, p. 39–48, 2006.

JAKLITSCH, M. *et al.* The subcellular organization of itaconate biosynthesis *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 137, p. 533–539, 1991.

JARRY, A.; SERAUDIE, Y. *Production of itaconic acid by fermentation*. United States Patent: 449,947. 1997.

JUY, M. I.; OREJAS, J.; LUCCA, M. E. Study of itaconic acid production by *Aspergillus terrus* MJL05 strain with different variable. *Rev. Colomb. Biote*, v. 12, n. 2, p. 187–193, 2010.

KAUTOLA, H. *et al.* Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose ad glucose. *Biotechnol. Lett.*, v. 7, n. 3, p. 167–172, 1985.

KAUTOLA, H. Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* on sucrose medium. *Biotechnol. Lett.*, v. 11, n. 5, p. 313–318, 1989.

KAUTOLA, H. *et al.* Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* with varied metal additions. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 35, p. 154–158, 1991.

KAUTOLA, H.; VASSILEV, N.; LINKO, Y. Y. Continuous itaconic acid production by immobilized biocatalysts. *J. Biotechnol*, v. 13, n. 4, p. 315–323, mar. 1990.

KLEMENT, T.; BÜCHS, J. Itaconic acid--a biotechnological process in change. *Bioresour. Technol.*, v. 135, p. 422–31, maio 2013.

KOBAYASHI, T.; NAKAGAWA, M. *Process for producing itaconic acid*. United States Patent: 3,873,425.1975.

KOCABAS, A.; OGEL, Z. B.; BAKIR, U. Xylanase and itaconic acid production by *Aspergillus terreus* NRRL 1960 within a biorefinery concept. *Ann Microbiol*, v. 64, p. 75–84, 9 abr. 2014.

KUENZ, A. *et al.* Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 96, n. 5, p. 1209–16, dez. 2012.

KUO, T. M.; KURTZMAN, C. P.; LEVIN. *Production of Itaconic Acid by Pseudozyma antarctica*. United States Patent. 7.479.381 B1. 2009.

LAI, L.; HUNG, C.; LO, C. Effects of lactose and glucose on production of itaconic acid and lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biosc Bioeng*, v. 104, n. 1, p. 9–13, jul. 2007.

LASS-FLÖRL, C. *Aspergillus terreus*: how inoculum size and host characteristics affect its virulence. *JID*, v. 205, n. 8, p. 1192–4, 15 abr. 2012.

LEITE, D. *et al.* Original Article Trichocomaceae : biodiversity of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp residing in libraries. *J Infect Dev Ctries*, v. 6, n. 10, p. 734–743, 2012.

LI, A.; SACHDEVA, S.; *et al.* In-Stream Itaconic Acid Recovery from *Aspergillus terreus* Fedbatch Fermentation. *Ind Biotech*, v. 9, n. 3, p. 139–145, jun. 2013.

LI, A.; PFELZER, N.; *et al.* Reduced by-product formation and modified oxygen availability improve itaconic acid production in *Aspergillus niger*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, n. 9, p. 3901–11, maio 2013.

MEENSA, V. *et al.* Production of Itaconic Acid Through submerged fermentation employing different species of *Aspergillus*. *Rasayan J. Chem*, v. 3, n. 1, p. 100–109, 2010.

MOYER, A. J. *Production of Organics Acids*. United States Patent: 183,890. 1954.

MURALIDHARARAO, D. *et al.* Fermentative production of itaconic acid by *Aspergillus terreus* using *Jatropha* seed cake. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 6, n. 18, p. 2140–2142, 2007.

NIELSEN, J. E.; BORCHERT, T. V.; VRIEND, G. The determinants of α -amylase pH – activity profiles. *Protein Eng*, v. 14, n. 7, p. 505–512, 2001.

NUBEL, R. *et al.* Process for producing itaconic acid. United States Patent: 3.044.941. 1962.

OKABE, M. *et al.* Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 84, n. 4, p. 597–606, 2009.

OKABE, M.; OHTA, N.; PARK, Y. S. Itaconic acid production in an air-lift bioreactor using a modified draft tube. *J. Ferment Bioeng*, v. 76, n. 2, p. 117–122, jan. 1993.

PARK *et al.* Itaconic Acid Production Using an Air-Lift Bioreactor in Repeated Batch Culture of *Aspergillus terreus*. *J. Ferment Bioeng*, v. 1, n. 3, p. 329–331, 1994.

PARK, Y. S.; OHTA, N.; OKABE, M. Effect of dissolved oxygen concentration and impeller tip speed on itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.*, v. 15, n. 6, p. 583–586, jun. 1993.

PETRUCCIOLI, M.; PULCI, V.; FEDERICI, F. Itaconic acid production by *Aspergillus terreus* on raw starchy materials. *Lett Appl Microbiol*, v. 28, p. 309–312, 1999.

RAFI, M.; HANUMANTHU, M. G.; RAO, D. M. Production of itaconic acid by *Ustilago maydis* from agro wastes in solid state fermentation. *J BioSci Biotech*, v. 3, n. 2, p. 163–168, 2014.

RAISTRICK, H.; SMITH, G. The metabolic products of *Aspergillus terreus* Thom. A new mould metabolic product - Terrein. *Biochem J*, v. 29, n. 3, p. 606–611, 1935.

REDDY, C.; SINGH, R. Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated *Aspergillus terreus* SKR10. *Bioresour. Technol.*, v. 85, n. 1, p. 69–71, out. 2002.

RISCALDATI, E. *et al.* Effect of pH and stirring rate on itaconate production by *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol*, v. 83, n. 3, p. 219–30, 13 out. 2000.

RODRIGUES, C. *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica*. 107 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

SAUER, M. *et al.* Microbial production of organic acids : expanding the markets. *Trends Biotechnol*, v. 26, n. 2, p. 100–108, 2008.

SHANKAR, U.; KAPOOR, K. *Microbial Biotechnology*. Delhi: Oxford Book Company, 2010. p. 314

SHIN, W. *et al.* Application of Scale-Up Criterion of Constant Oxygen Mass Transfer Coefficient for Production of Itaconic Acid in 50L Pilot-Scale Fermentor

by Fungal Cells of *Aspergillus terreus*. *J Microbiol Biotechnol*, v. 23, n. 10, p. 1445–1453, 2013.

SMITH, J. *Biotechnology*. 5th ed. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p. 275

STEIGER, M. G. *et al.* Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front Microbiol*, v. 4, n. 23, p. 1–5, jan. 2013.

TEVZ, G.; BENCINA, M.; LEGISA, M. Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 87, n. 5, p. 1657–64, ago. 2010.

THOM, C.; CHURCH, M. *Aspergillus fumigatus* , *A. nidulans* , *A. terreus* N. Sp. and Their Allies. *Am. J Bot.*, v. 5, n. 2, p. 84–104, 1918.

TSAI, Y.-C. *et al.* Method for the production of itaconic acid using *Aspergillus terreus* solid state fermentation. Taipei: United States Patent: 6.171.831 B1. 2001.

US DEPARTMENT OF ENERGY. *Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. . Tennessee, US. 2004.

VAN DER WERF, M. J. *et al.* Production of itaconic acid. United States Patent: 12/669,955. 2013.

VASSILEV, N. *et al.* Animal bone char solubilization with itaconic acid produced by free and immobilized *Aspergillus terreus* grown on glycerol-based medium. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 168, n. 5, p. 1311–8, nov. 2012.

VASSILEV, N.; KAUTOLA, H.; LINKO, Y. Immobilized *Aspergillus terreus* in itaconic acid production from glucose. *Biotechnology letters*, v. 14, n. 3, p. 201–206, 1992.

WILLKE, T.; VORLOP, K.-D. Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 56, n. 3-4, p. 289–295, 2001.

YAHIRO, K. *et al.* Breeding of *Aspergillus terreus* mutant TN-484 for itaconic acid production with high yield. *J. Ferment Bioeng*, v. 79, n. 5, p. 506–508, jan. 1995.

YAHIRO, K.; TAKAHAMA, T.; *et al.* Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.*, v. 19, n. 7, p. 619–621, 1997.

YAHIRO, K.; SHIBATA, S.; *et al.* Efficient itaconic acid production from raw corn starch. *J. Ferment Bioeng*, v. 84, n. 4, p. 375–377, jan. 1997.

9. ANEXOS

TABELA 26 - RESUMO DA ORDEM CRONOLÓGICA DE REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS E DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBTIDOS.

Teste	Cepa <i>A. terreus</i> NRRL	Pre-inóculo	Meio produção	Condições	Resultados	
					AI (g/L)	r _p AI (g/L h)
1. Testes preliminares	1960	Não	Czapek modificado	pH 3 120 rpm, 30°C, 12 dias	0,12	0,0004
	1960	Não	Kuenz modificado	pH 3, 120 rpm, 30°C, 12 dias	0,11	0,0004
2. Fonte de Nitrogênio - preliminar	1960	Não	Fonte de N variável	pH 3, 120 rpm, 33°C, 12 dias	38,52	0,134
3. Fonte de Nitrogênio - Base Medio E	1960	Não	Fonte de N variável	pH 3, 120 rpm, 33°C, 6 dias	21,08	0,146
4. Estudo de morfologia de pré-inóculo	1960	Sim	Kuenz	pH 3, 120 rpm, 33°C, 6 dias	48,23	0,335
5. Cinética de produção AI	1960	Sim	Kuenz	pH 3, 120 rpm, 33°C, 8 dias	49,9	0,260
6. Comparação métodos de Pré-inóculo	1960	Não	Kuenz	pH 3, 120 rpm, 32°C, 10 dias	20,88	0,087
	1960	Sim	Kuenz	pH 3, 120 rpm, 32°C, 8 dias	49,9	0,260
7. Álcoois inferiores	1960	Sim	Kuenz + isopropanol	pH 3, 130 rpm, 32°C, 7 dias	41,46	0,247
	1960	Sim	Kuenz Melaço Cana	pH 3, 130 rpm, 32°C, 7 dias	11,49	0,068
8. Testes iniciais Melaço, Glicerol	1960	Sim	Kuenz Glicerol	pH 3, 130 rpm, 32°C, 7 dias	31,55	0,188
	1960	Sim	Kuenz Sacarose	pH 3, 130 rpm, 32°C, 7 dias	44,25	0,263
9. Comparação cepas	1960	Sim	Kuenz	pH 3, 140 rpm, 32°C, 6 dias	49,73	0,345
	265	Sim	Kuenz	pH 3, 140 rpm, 32°C, 6 dias	19,79	0,137
	1960	Sim	Kuenz	pH 3, 140 rpm, 32°C, 6 dias	49,73	0,345
10. Estudo pH meio de produção	1960	Sim	Kuenz	pH 5, 140 rpm, 32°C, 6 dias	45,05	0,313
	1960	Sim	Kuenz	pH 6, 140 rpm, 32°C, 6 dias	41,21	0,286
11. Extractos aquosos substratos	1960	Sim	Extrato Polpa cítrica	pH 3, 140 rpm, 32°C, 6 dias	27,05	0,188
12. Aumento de escala	1960	Sim	Kuenz + sacarose	(C+) 140 rpm, 32°C, 6 dias	47,83	0,332
	1960	Sim	Kuenz + sacarose	Coluna bolhas	46,24	0,321