

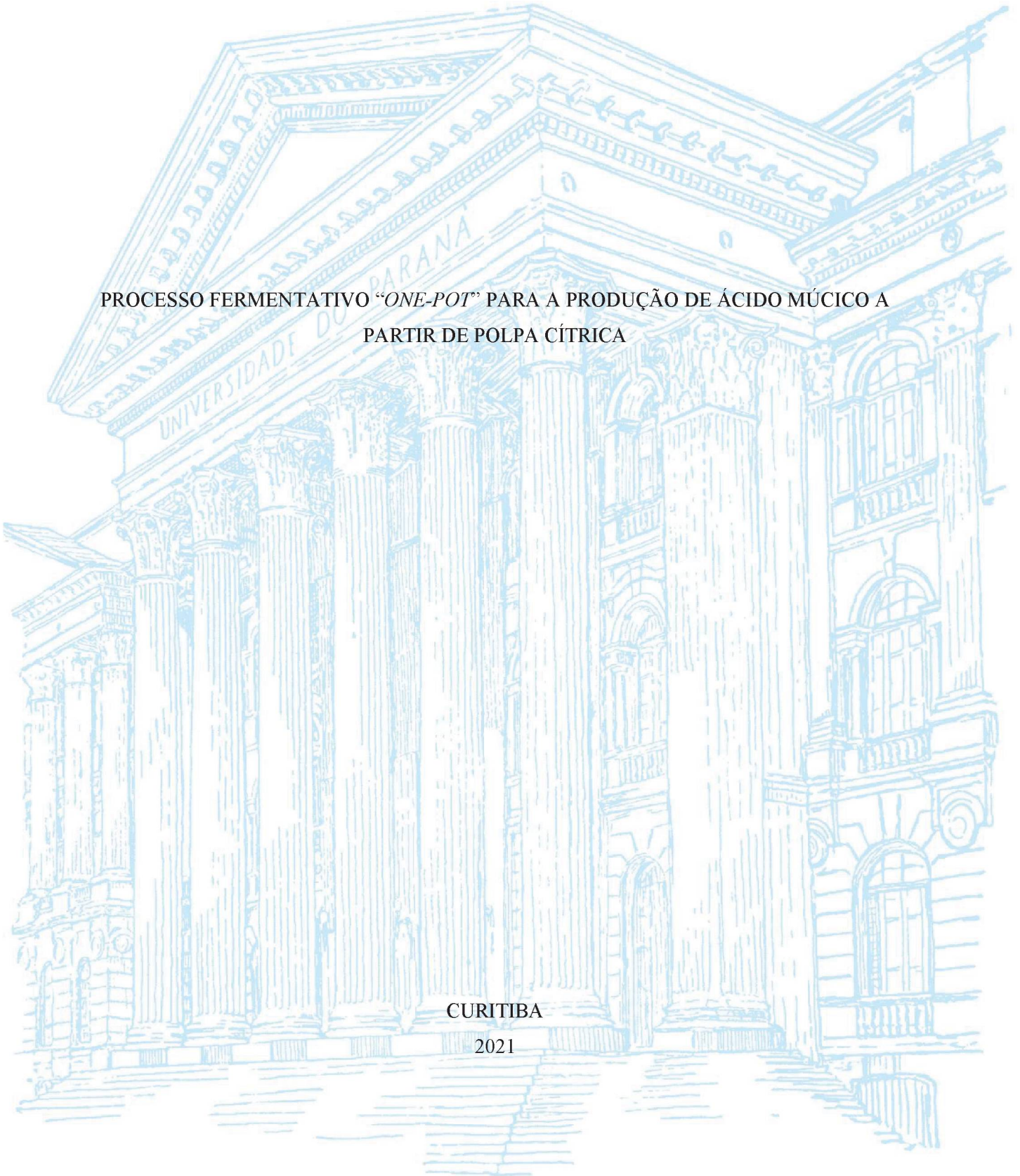
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA CONOR FIGUEIREDO

PROCESSO FERMENTATIVO “*ONE-POT*” PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO A
PARTIR DE POLPA CÍTRICA

CURITIBA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA CONOR FIGUEIREDO

PROCESSO FERMENTATIVO “*ONE-POT*” PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO A
PARTIR DE POLPA CÍTRICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências BiológicasBioquímica.

Orientador: David Alexander Mitchell

Coorientadora: Maura Harumi Sugai Guérios

Mestranda: Gabriela Conor Figueiredo.

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Figueiredo, Gabriela Conor.

Processo fermentativo “one-Pot” para a produção de ácido múcico a partir de polpa cítrica. / Gabriela Conor Figueiredo. – Curitiba, 2021.

27 f. : il.

Orientador: David Alexander Mitchell.

Coorientadora: Maura Harumi Sugai Guérios.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. *Aspergillus niger*. 2. Suco de laranja – Indústria. 3. Fermentação. 4. Ácido cítrico. I. Título. II. Mitchell, David Alexander. III. Guérios, Maura Harumi Sugai. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 634.31

TERMO DE APROVAÇÃO

GABRIELA CONOR FIGUEIREDO

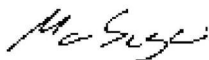
PROCESSO FERMENTATIVO “ONE-POT” PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO A
PARTIR DE POLPA CÍTRICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas- Bioquímica.



Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Orientador – Departamento de Ciências Biológicas- Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.



Prof^ª. Dr^ª. Maura Harumi Sugai Guérios

Coorientadora – Professora do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Positivo.



Prof. Dr. Marcelo Muller dos Santos

Departamento de Ciências Biológicas- Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

Alessandra Biz

Dr^a Alessandra Biz

Curitiba, 24 de setembro de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Cesar e Mara, ao meu irmão, Gregory, à minha avó, Leia, ao meu sobrinho, Arthur e ao meu companheiro de jornada, Gustavo. Vocês foram as minhas bases, me deram forças quando achei que não tinha mais e me inspiraram a ser uma pessoa melhor a cada dia. Meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS:

A Deus, por me dar forças pra seguir em frente, mesmo em tempos difíceis, e também por colocar pessoas boas ao meu redor, que sempre me apoiaram quando eu precisei.

Aos meus pais, Cesar e Mara, por estarem sempre presentes na minha jornada acadêmica, mesmo de longe. Obrigada por serem meu porto seguro, me dando forças quando eu achei que já não tinha mais. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu namorado Gustavo, por todas as vezes que me salvou quando precisei, além de estar sempre por perto para me fazer sorrir. Você foi meu braço direito muitas vezes, muito obrigada.

A minha família, por serem exemplo de amor e união. Vocês me dão forças para seguir em frente, especialmente minha avó Leia, meu irmão Gregory, minha cunhada Bianca, meu sobrinho Arthur e meu primo Vyctor, por isso muito obrigada.

Aos meus amigos, que me deram seus ombros e seus ouvidos pra eu chorar as pitangas tantas vezes, além de nunca desistirem de tentar me animar. Agradeço especialmente a Anna, Iago, Bianca, André, Aline, Thaisa, Emerson, Lu e Pamela, por estarem sempre presentes.

Ao meu orientador, David Alexander Mitchell, e minha coorientadora, Maura Harumi Sugai-Guérios, por todo o apoio na escrita do projeto e da dissertação e pela ajuda nos experimentos de laboratório. Agradeço pela paciência e pelo tempo que dedicaram a mim, ainda mais durante a pandemia de COVID-19, que não foi fácil especialmente para vocês professores.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, que sempre me ajudaram quando eu precisei, além de sempre me darem valiosos conselhos. Agradeço especialmente ao Leonardo, Gleydison, Leandro, Rafaela P., Robson, Marcos, Fernanda e Welton, a ajuda de vocês fez toda a diferença.

Aos professores da pós graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica, em especial àqueles que não mediram esforços para converter suas aulas para o formato de Ensino a Distância.

Às agencias de fomento, CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

TATAKAE. (Eren Yeager, 2020)

RESUMO

A alta produção de suco de laranja industrializado gera uma grande quantidade de polpa cítrica, que geralmente é usada em ração animal ou descartada. No entanto, a polpa cítrica residual pode ter usos mais lucrativos, como, por exemplo, na conversão da pectina presente na polpa em ácido D-galacturônico e, posteriormente, em ácido múcico. O ácido múcico, além de suas propriedades como agente acidificante e tensoativo, pode ser convertido em ácido 2,5 furandicarboxílico, utilizado na produção de garrafas 2,5-furanodicarboxilato de polietileno. A produção de ácido múcico por processo “one-pot” é de grande interesse comercial, pois transforma a polpa cítrica de laranja em ácido múcico em uma única etapa. Esse processo produz o ácido múcico com uma rota biológica a partir da polpa cítrica, diferentemente dos processos químicos industriais utilizados hoje em dia para este fim, que ocorrem em várias etapas, precisando primeiro obter o ácido D-galacturônico para apenas então o converter a ácido múcico. Esse processo apresenta potencial lucrativo para as indústrias ao dispensar o custo das diversas etapas de reação utilizadas nas rotas químicas tradicionais, além de ser mais sustentável ao não utilizar ácidos fortes. O uso do processo “one-pot” para a produção de ácido múcico já foi estudado anteriormente, em fermentação submersa com uma cepa de *Aspergillus niger* geneticamente modificada, a *ΔgaaA-Δ39114-udh*, com um rendimento de 30% de ácido múcico pelo total de ácido D-galacturônico presente na polpa cítrica. Contudo, ainda havia potencial de aumentar essa produção. Com isso, em um estudo posterior, foi usada fermentação em estado sólido, com essa mesma cepa, com suplementação do meio de polpa cítrica com fontes de nitrogênio seguindo um delineamento experimental de Plackett-Burman. A suplementação gerou um rendimento de 63% de ácido múcico, consideravelmente maior do que o uso de polpa cítrica pura, porém ainda com potencial para ser melhorado. Desta forma, o presente trabalho propôs otimizar o processo “one-pot” para a produção de ácido múcico, utilizando a cepa *A. niger ΔgaaA-Δ39114-udh*, através de um Delineamento Composto Central Rotacional de quatro fatores, sendo eles ureia, farelo de trigo, umidade e temperatura. Foi também estudada a otimização do processo “one-pot” para a produção de ácido múcico com o uso da cepa *A. niger ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX*, através da ferramenta analítica de Delineamento de Compósito Central. A deleção do gene *gaaX* tem o potencial de aumentar a produção de ácido múcico pela remoção da repressão catabólica de poligalacturonases.

Palavras-chave: Processo “one-pot”; Ácido múcico; *Aspergillus niger*; Otimização; Ácido D-galacturônico.

ABSTRACT

The production of industrialized orange juice creates a large amount of citrus peel, which is usually used in animal feed or simply discarded. However, citrus peel can be used more profitably; for example, the pectin can be extracted and hydrolyzed to liberate D-galacturonic acid, which can then be converted to mucic acid. Mucic acid is commonly used as an acidulant or surfactant, but it also can be converted to 2,5-furandicarboxylic acid, which can be used to produce polyethylene 2,5-furandicarboxylic bottles. It would be advantageous to produce mucic acid in a “one-pot” process, with citrus peel being converted to mucic acid in a single fermentation step. Such a one-pot biological process would maximize profits by minimizing processing steps and is significantly more sustainable than the chemical process that is currently used industrially, which uses strong acids. The use of a “one-pot” process to produce mucic acid has already been studied, using a genetically modified strain of *Aspergillus niger*, $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$. In submerged fermentation, this strain gave a mucic acid yield of 30% (based on the amount of D-galacturonic acid contained in the original pectin). A subsequent study with the same strain aimed to improve the mucic acid yield, in solid-state fermentation of citrus pulp supplemented with various nitrogen sources, following a Plackett-Burman design. This gave mucic acid yields as high as 63%. The present study aimed to increase the mucic acid yields with *A. niger* $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$ even further, through the use of a Rotational Central Composite Design (RCCD) with 4 factors, temperature, moisture, urea and wheat bran. Studies were also done with the strain *A. niger* $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh-\Delta gaaX$. The deletion of *gaaX* in this strain has the potential to improve the rate of production of mucic acid by removing catabolite repression of polygalacturonase expression.

Key-words: “One-pot” process; Mucic acid; *Aspergillus niger*; Optimization; D-galacturonic acid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CONSUMO DO ÁCIDO D-GALACTURÔNICO COMO FONTE DE CARBONO (SETAS LARANJAS) OU SUA TRANSFORMAÇÃO EM ÁCIDO MÚCICO (SETA VERDE) POR <i>A. NIGER</i>	14
FIGURA 2: DIAGRAMA DE PARETO PARA AS VARIÁVEIS RESPOSTAS DE HIDRÓLISE DA PECTINA (A) E ÁCIDO MÚCICO (B).....	16
FIGURA 3: FLUXOGRAMA DE BLOCOS PARA TESTES DE ESTUDO DE PLACKETT-BURMAN E DCCR E DCC PARA AS DUAS CEPAS.....	18
FIGURA 4: GRÁFICO DOS PADRÕES DE ÁCIDO MÚCICO E D-GALACTURÔNICO PARA O HPLC.....	12
FIGURA 5: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO E MÚCICO OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA NO PRESENTE TRABALHO (A) E NOS ESTUDOS DE KUIVANEN ET AL. (2016) (B).....	18
FIGURA 6: PICOS DE ÁREA DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO E ÁCIDO MÚCICO NA CORRIDA DE HPLC.....	19
FIGURA 7: DIAGRAMA DE PARETO E GRÁFICO DE VALORES EXPERIMENTAIS E PREDITOS PARA OS RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO POR DCC COM A CEPA <i>ΔGAAA-Δ39114-UDH-ΔGAAX</i>	21
FIGURA 8: DIAGRAMA DE PARETO E GRÁFICO DE VALORES PREDITOS E EXPERIMENTAIS PARA O RESULTADO DE HIDRÓLISE DA PECTINA.....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NÍVEIS UTILIZADOS NO PLACKETT-BURMAN REALIZADO POR PINTER (2018), COM RESULTADO DA HIDRÓLISE DE PECTINA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO.	17
TABELA 2: FORMULAÇÃO ESPECÍFICA DOS ERLLENMEYERS PARA O DCCR E RESULTADOS OBTIDOS POR PINTER (2018).....	19
TABELA 3: TABELA DE VALORES DE FONTES DE NITROGÊNIO PARA O ESTUDO DE PLACKETT-BURMAN UTILIZADOS.....	14
TABELA 4: FORMULAÇÃO PARA O EXPERIMENTO DE DCCR PARA A CEPA <i>ΔGAAA-Δ39114- UDH</i>	15
TABELA 5: TABELA DE VALORES DE FONTES DE NITROGÊNIO PARA O ESTUDO DE PLACKETT-BURMAN REFERENTE À CEPA <i>ΔGAAA-Δ39114-UDH-ΔGAAX</i>	16
TABELA 6: RESULTADOS DE ESTUDO DE PLACKETT-BURMAN PARA A CEPA <i>ΔGAAA- Δ39114-UDH-ΔGAAX</i>	20
TABELA 7: VARIÁVEIS OBTIDAS PELO DCC PARA GERAR O DIAGRAMA DE PARETO PARA O RESULTADO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO.	21
TABELA 8: VARIÁVEIS OBTIDAS PELO DCC PARA GERAR O DIAGRAMA DE PARETO PARA O RESULTADO DE HIDRÓLISE.....	22

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 ROTAS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO	13
3 JUSTIFICATIVA	10
3.1 OBJETIVOS.....	10
3.1.1 Objetivo Geral.....	10
3.1.2 Objetivos Específicos.....	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Protocolos utilizados para as fermentações.....	11
4.1.1 Fermentação em estado sólido	11
4.1.2 Fermentação submersa.....	11
4.2 Análise dos valores obtidos por HPLC	12
4.3 Estudo de Plackett-Burman	13
4.4 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	14
4.5 Estudo de DCC com a cepa <i>Δgaaa-Δ39114-udh-Δgaax</i>	16
4.5.1 Quantificação dos óleos essenciais	16
5 RESULTADOS	17
5.1 EXPERIMENTOS COM A CEPA <i>ΔgaaA-Δ39114-udh</i>	17
5.1.1 Fermentação em estado sólido com uma nova amostra de polpa cítrica....	17
5.1.2 Quantificação de óleos essenciais	17
5.1.3 Fermentação Submersa com a cepa <i>ΔgaaA-Δ39114-udh</i>	17
5.2 Estudo de DCC referente à cepa <i>ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX</i>	20
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	24
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

O suco de laranja é atualmente a bebida mais consumida no mundo, sendo o Brasil seu maior produtor, com uma safra de $1,096 \times 10^{10}$ kg de frutos produzidos no ano de 2020 (FUNDECITRUS, 2021). É estimado que 70% da safra de laranjas ($7,67 \times 10^9$ kg) seja destinado à produção do suco, e estas laranjas, por sua vez, geram cerca de 50% de polpa cítrica úmida residual ($3,83 \times 10^9$ kg) (NEVES, 2010). A polpa cítrica residual contém de 20 a 25% de matéria seca. Dessa forma, estas $3,83 \times 10^9$ kg de polpa cítrica úmida residual geram até $9,59 \times 10^8$ kg de polpa cítrica seca residual.

Apresentar um destino economicamente favorável a esse resíduo é um grande desafio à indústria de suco de laranja. O destino mais comum para a polpa cítrica de laranja é sua venda para a produção de ração de animais de pecuária, contudo, é necessário secar a polpa cítrica antes de sua venda. Os custos dessa secagem diminuem a margem de lucro da indústria, de forma que muitas vezes é preferível, economicamente, o simples descarte do resíduo. Esse descarte pode gerar problemas ambientais devido à alta quantidade de polpa cítrica, que se decompõe rapidamente (MOJZITA et al, 2010).

Em vista disso, novas alternativas vêm sendo propostas para o melhor aproveitamento da polpa cítrica residual, a fim de convertê-la em produtos de maior valor agregado, quando comparado ao seu uso em ração animal, através de seu processamento em uma biorrefinaria. Esses reaproveitamentos de polpa cítrica são vantajosos industrialmente não apenas pelo lucro gerado sobre um material de baixo custo, mas também por tornar o uso dos resíduos mais sustentável do ponto de vista ambiental (RICHARD; HILDITCH, 2009).

Dentre os diversos componentes presentes na polpa está a pectina, compondo cerca de 25% da massa seca da polpa cítrica de laranja (LOHRASBI et al, 2010). A pectina é comumente utilizada na indústria alimentícia como agente gelificante, sendo que seu mercado de venda já se encontra saturado, não sendo vantajoso sua produção para venda (BIZ, 2012). O ácido D-galacturônico (DGaLA) é o principal açúcar presente na pectina cítrica (cerca de 75%), tendo aplicações nas indústrias química e alimentícia. O DGaLA pode também ser convertido para outros ácidos com maior valor no mercado, como os ácidos ascórbico (vitamina C), meso-galactárico (múxico) e L-galactônico (LOHRASBI et al, 2010; KUIVANEN et al, 2014).

Ácido múxico tem potenciais aplicações nas indústrias de cosméticos e farmacêutica como agente quelante, e também como substituto do ácido tartárico na produção de refrigerantes, com função antioxidante e conservante (BARTH; WIEBE, 2017). No entanto, a característica mais atrativa do ácido múxico é seu potencial de ser quimicamente transformado a ácido 2,5 furandicarboxílico (FDCA), composto utilizado na produção de garrafas PEF (2,5-furanodicarboxilato de polietileno), que podem substituir as garrafas PET (tereftalato de

polietileno) tradicionais. Dessa forma, o FDCA substituiria o tereftalato vindo do petróleo, uma fonte não-renovável, por um furano produzido a partir da polimerização enzimática de polpa residual de laranja, com impacto ambiental positivo (WERPY; PETERSEN, 2004).

No presente trabalho foi estudado a produção de ácido múcico a partir de polpa cítrica em uma única etapa, num processo de fermentação (FES) em estado sólido realizado com cepas de *Aspergillus niger* geneticamente modificadas. A principal vantagem da fermentação em estado sólido quando comparada à submersa é o baixo teor de água livre disponível no meio, o que permite o uso direto de resíduos agro industriais, tais como a polpa cítrica úmida. Dessa forma, a FES tende a ser mais rentável economicamente quanto ao seu baixo teor de água livre no meio, pois além da economia de água em si, também dispensa os custos de homogeneização do sistema (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL; 2000).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ROTAS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO MÚCICO

O ácido múcico, na indústria, é obtido predominantemente através da oxidação de ácido D-galacturônico com o uso de ácidos fortes, principalmente com ácido nítrico. O ácido D-galacturônico, por sua vez, precisa ser hidrolisado e separado de algum substrato (tal como a polpa cítrica) através de várias etapas de reação, para só então ser transformado em ácido múcico. No entanto, a técnica de oxidação do DGalA requer intensivo tratamento de efluentes para tentar diminuir o impacto ambiental negativo gerado pelo uso de ácidos fortes (KUIVANEN et al, 2016). Outra técnica disponível industrialmente para obtenção de ácido múcico é a oxidação eletrolítica de ácido D-galacturônico, que evita os problemas ambientais da primeira rota. Entretanto, é relativamente pouco usada na indústria devido ao seu custo elevado (KUIVANEN et al, 2016).

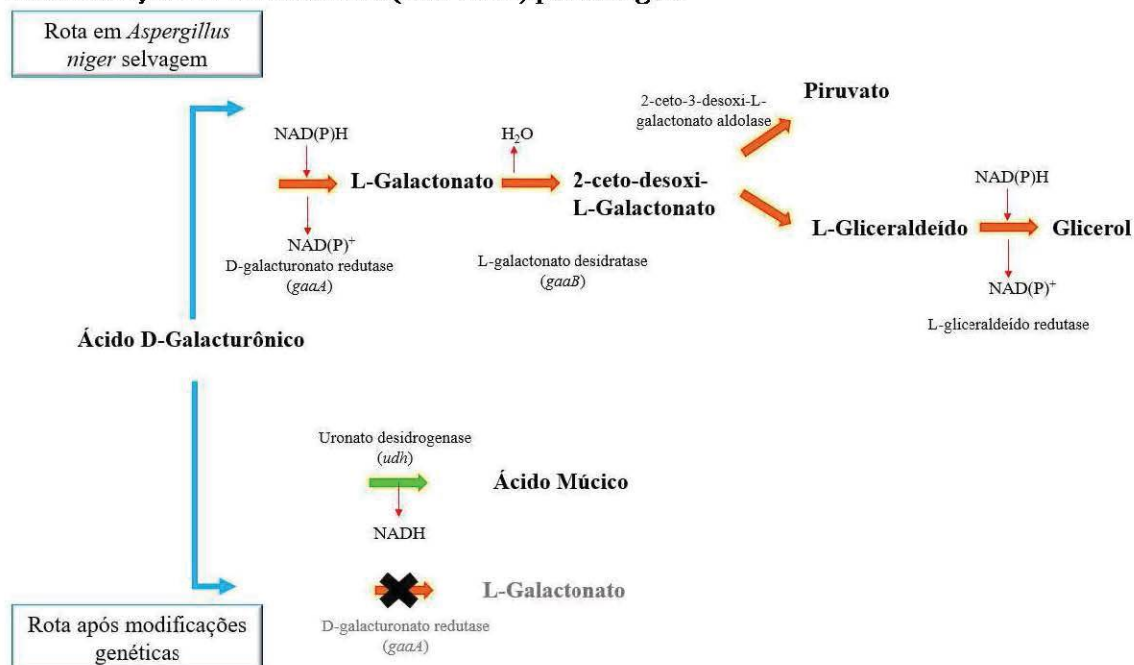
Frente a estes problemas com as rotas químicas, foi sugerido o uso de uma rota biológica utilizando polpa cítrica, envolvendo várias etapas: primeiro, a pectina é extraída da polpa cítrica gerada durante a produção de suco de laranja industrializado, segundo, a pectina extraída é hidrolisada enzimaticamente, liberando ácido D-galacturônico (LOHRASBI et al, 2010), e, terceiro, o ácido D-galacturônico é biotransformado em ácido múcico (KUIVANEN et al, 2016). O uso da polpa cítrica não somente barateia o custo do processo de produção de ácido múcico quando comparado à sua produção na rota química, mas também evita o descarte desta polpa em aterros sanitários. Uma estratégia para diminuir os custos do processo ainda mais seria cultivar um micro-organismo capaz de transformar pectina em ácido múcico, diretamente na polpa cítrica; em outras palavras, um processo “one-pot”. Um processo “one-pot” vem sendo estudado no Centro de Pesquisa Técnica da Finlândia (Valtion Teknikillen Tutkimuskeskus – VTT, Espoo, Finlândia), onde são usadas cepas de *Aspergillus niger* geneticamente modificadas.

O *Aspergillus niger* selvagem hidrolisa pectina e metaboliza o ácido D-galacturônico liberado, conforme mostrado na Figura 1 (MARTENS-UZUNOVA; SCHAAP, 2008). Para produzir uma cepa de *A. niger* capaz de acumular ácido D-galacturônico, são necessárias modificações genéticas, tanto para interromper a metabolização do ácido D-galacturônico quanto para promover sua conversão em ácido múcico.

A construção de uma cepa geneticamente modificada foi iniciada por Mojzita et al. (2010), através de duas modificações em *A. niger* ATCC 1015 (Figura 1). Primeiro, o gene *gaaA* foi deletado. Este gene codifica a D-galacturonato redutase, que converte o DGalA em ácido L-galactônico. Segundo, o gene *udh* foi inserido. Este gene codifica a uronato desidrogenase, que converte o ácido D-galacturônico em ácido múcico. Dessa forma, a cepa *A. niger* Δ *gaaA-udh* não

converte o ácido D-galacturônico (liberado de pectina) para L-galactonato pela via normal, mas o converte em ácido múcico (MOJZITA et al, 2010).

Figura 1: Consumo do ácido D-galacturônico como fonte de carbono (setas laranjas) ou sua transformação em ácido múcico (seta verde) por *A. niger*.



Fonte: A autora (2021).

A. niger Δ *gaaA-udh* foi cultivado em meio contendo ácido D-galacturônico por fermentação submersa. O rendimento de ácido múcico obtido foi de 16% em 250 h. Para calcular o rendimento de ácido múcico, é considerado que todo o DGalA presente na solução pode ser transformado em ácido múcico (mol para mol) (MOJZITA et al, 2010). Entretanto, em um estudo posterior, foi observado que o nível de ácido múcico produzido no meio chegava a um valor máximo e passava a diminuir com o tempo, indicando que o *A. niger* consome o ácido múcico (KUIVANEN et al, 2016).

O consumo de ácido múcico pelo *A. niger* Δ *gaaA-udh* foi associado à presença do gene ID 39114, de forma que a deleção deste gene interrompeu o consumo deste ácido pelo fungo (KUIVANEN et al, 2016). A cepa com a deleção deste gene, denominada Δ *gaaA-39114-udh*, obteve rendimento máximo de 30% de ácido múcico em 120 h quando cultivada em polpa cítrica por fermentação submersa.

Visando melhorar a produção de ácido múcico, Alazi et al. (2016) deletou o gene *gaaX*, que é induzido pela presença de ácido D-galacturônico no meio e codifica para uma proteína produtora de repressores transcricionais de genes que codificam em várias pectinases, como a poligalacturonase PGAX. Quando a quantidade de ácido D-galacturônico se eleva no meio a produção de pectinases é interrompida pela ação da proteína (NIU et al, 2015). Portanto, com essa deleção, o *Aspergillus niger* deveria hidrolisar a pectina mais eficientemente, liberando mais

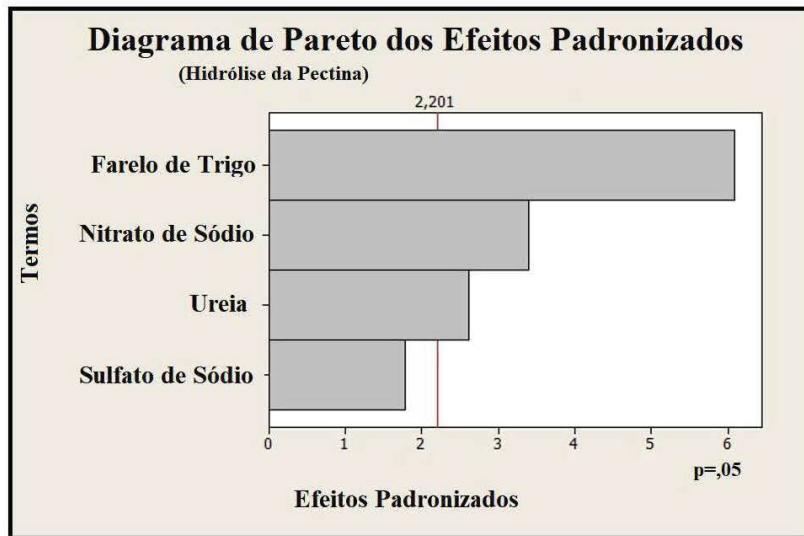
ácido D-galacturônico para ser convertido em ácido múcico. Essa deleção foi incluída na cepa *A. niger ΔgaaA-Δ39114-udh*, gerando a cepa *A. niger ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX*. Entretanto, Alazi et al. (2016) não determinaram a atividade pectinolítica e rendimento de ácido múcico.

2.2 MELHORAMENTO DO RENDIMENTO DE ÁCIDO MÚCICO POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

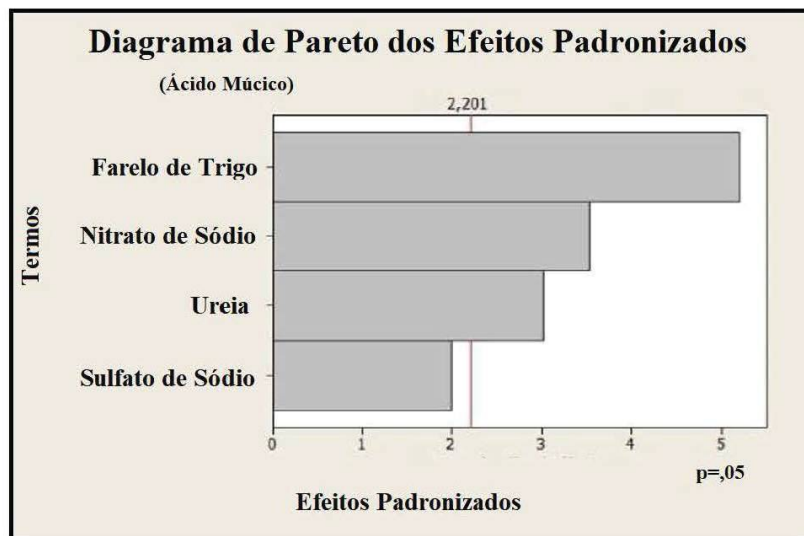
A polpa cítrica de laranja pura é rica em carbono (49,59% do peso úmido), mas tem baixo teor de nitrogênio (0,66% do peso úmido) (ZAPATA et al, 2009). Nas suas fermentações, Kuivanen et al. (2016) não adicionou suplementos nutricionais à polpa cítrica. Dessa forma, Pinter (2018) usou planejamento experimental para estudar o efeito da suplementação do meio de fermentação em estado sólido (FES) com fontes de nitrogênio na produção de ácido múcico pela cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*, no tempo de 72 horas. Foram testadas 4 diferentes fontes de nitrogênio em um estudo de Plackett-Burman: ureia, farelo de trigo, nitrato de sódio e sulfato de amônio. As fontes que tiveram influência positiva na produção de ácido múcico foram ureia e farelo de trigo, enquanto o sulfato de amônio não foi significativo e o nitrato de sódio mostrou ter efeito negativo na hidrólise da pectina (Figura 2). Por essa razão, posteriormente foi descartado o uso de nitrato de sódio. Dessa forma, o maior rendimento de ácido múcico, de 63%, foi obtido ao se suplementar cada Erlenmeyer contendo 5 g de polpa cítrica (seca) com 0,08 g de ureia e 1 g de farelo de trigo (Tabela 1), de acordo com os resultados de Plackett-Burman (Pinter, 2018).

Figura 2: Diagrama de Pareto para as variáveis respostas de hidrólise da pectina (A) e ácido múcico (B).

(A)



(B)



Fonte: Pinter (2018)

Tabela 1: Níveis utilizados no Plackett-Burman realizado por Pinter (2018), com resultado da hidrólise de pectina e produção de ácido múcico.

Experimento	Nitrato de Sódio (g/5 g de Polpa Cítrica)	Sulfato de Amônio (g/5 g de Polpa Cítrica)	Ureia (g/5 g de Polpa Cítrica)	Farelo de Trigo (g/5 g de Polpa Cítrica)	Ácido Múcico (%)	Hidrólise (%)
1	0,2355	0	0,0839	0	28%	50%
2	0,2355	0,175	0	1	40%	71%
3	0	0,175	0,0839	0	49%	77%
4	0,2355	0	0,0839	1	40%	73%
5	0,2355	0,175	0	1	38%	68%
6	0,2355	0,175	0,0839	0	24%	48%
7	0	0,175	0,0839	1	63%	96%
8	0	0	0,0839	1	51%	80%
9	0	0	0	1	42%	72%
10	0,2355	0	0	0	26%	49%
11	0	0,175	0	0	32%	54%
12	0	0	0	0	23%	52%
13 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5	41%	78%
14 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5	38%	73%
15 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5	47%	86%
16 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5	44%	79%
17 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5	47%	86%

Fonte: Pinter (2018)

¹ O teor de ácido D-galacturônico foi estimado em 153 mg/g polpa cítrica seca, através da hidrólise da pectina presente no lote de polpa cítrica utilizado, com o uso da enzima comercial Pectinex Ultra SP-L (Novozymes).

² O rendimento foi calculado somando a quantidade de ácido múcico obtida (mg/g de polpa cítrica) e a quantidade de ácido D-galacturônico obtida (mg/g de polpa cítrica) e dividindo esta soma pelo rendimento máximo de ácido D-galacturônico na hidrólise da polpa cítrica.

Fonte: Pinter (2018)

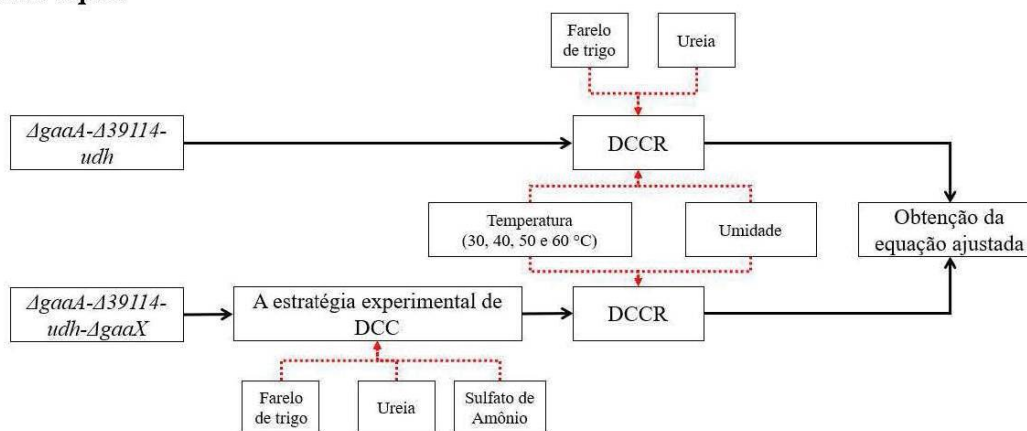
O aumento no rendimento de ácido múcico para 63% obtido por Pinter (2018), quando comparado ao rendimento de 30% de ácido múcico obtido por Kuivanen et al. (2016), também pode estar relacionado ao uso da FES ao invés da fermentação submersa. O substrato utilizado em FES gera um ponto de ancoragem para os microrganismos, tornando seu uso eficiente principalmente fungos filamentosos, visto que eles acessam os nutrientes mais facilmente que outros microrganismos, pelas suas hifas (RAIMBAULT, 1998). Também há uma menor incidência de contaminações em FES, devido a baixa disponibilidade de água.

Uma vez definidas as melhores fontes de nitrogênio para o experimento como ureia e farelo de trigo, através do estudo de Plackett-Burman, Pinter (2018) fez um estudo de

Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com o objetivo de definir as condições ótimas de fermentação, variando as quantidades de ureia e farelo de trigo, a umidade do meio e a temperatura (Tabela 2). O DCCR foi feito em fermentação em estado sólido com 5 g polpa cítrica de laranja, com a adição de 10^5 esporos por g de polpa cítrica. A fermentação foi feita em Erlenmeyers de sacrifício por um total de 24 horas. Entretanto, os resultados de produção de ácido múcico foram insuficientes para definir as condições ótimas de fermentação, visto que o maior valor de produção obtido foi 25,7% de ácido múcico, sendo ainda muito distante do valor de 63% obtido pelo estudo de Plackett-Burman. Uma possível causa desse resultado foi o período de fermentação, sendo necessário aumentá-lo para 48 horas, visando maior tempo de fermentação e maior produção de ácido múcico.

Um estudo de produção de ácido múcico com essa mesma metodologia de processo “one-pot” utilizando a cepa *A. niger* $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh-\Delta gaaX$ também foi sugerido por Pinter (2018), porém não foi executado. As metodologias para o estudo dessa segunda cepa envolveriam o uso das ferramentas de Plackett-Burman para determinar as melhores fontes de nitrogênio para o meio e o DCCR para otimizar a umidade, temperatura e quantidade das fontes de nitrogênio ótimas ao processo. Entretanto, no caso dessa segunda cepa, o estudo de Plackett-Burman foi substituído por um estudo de Delineamento de Compósito Central (DCC), pois, de acordo com os resultados obtidos no Plackett-Burman da cepa $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$, foi descartado o uso de nitrato de sódio devido a sua influência negativa na hidrólise da pectina. Dessa forma, restaram apenas três fontes de nitrogênio a serem testadas, sendo mais apropriado utilizar a ferramenta de DCC, pois essa técnica é recomendada quando o número de variáveis (fontes de nitrogênio) é menor do que quatro. Um fluxograma de blocos referente aos experimentos com ambas as cepas está representado na Figura 3.

Figura 3: Fluxograma de blocos para testes de estudo de Plackett-Burman e DCCR e DCC para as duas cepas.



Fonte: A autora (2021).

Tabela 2: Formulação específica dos Erlenmeyers para o DCCR e resultados obtidos por Pinter (2018)

Experimento	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Ureia (g/5 g de Polpa Cítrica)	Farelo De Trigo (g/5 g de Polpa Cítrica)	Ácido Múxico (%)
1	65	25	0,025	0,5	10
2	75	25	0,025	0,5	7
3	65	35	0,025	0,5	19
4	75	35	0,025	0,5	26
5	65	25	0,075	0,5	5
6	75	25	0,075	0,5	7
7	65	35	0,075	0,5	9
8	75	35	0,075	0,5	21
9	65	25	0,025	1,5	12
10	75	25	0,025	1,5	12
11	65	35	0,025	1,5	25
12	75	35	0,025	1,5	36
13	65	25	0,075	1,5	13
14	75	25	0,075	1,5	12
15	65	35	0,075	1,5	14
16	75	35	0,075	1,5	22
17	70	30	0,05	1	8
18	70	30	0,05	1	8
19	70	30	0,05	1	9
20	70	30	0,05	1	8
21	60	30	0,05	1	9
22	80	30	0,05	1	11
23	70	20	0,05	1	10
24	70	35	0,05	1	9
25	70	30	0	1	10
26	70	30	0,1	1	10
27	70	30	0,05	0	5
28	70	30	0,05	2	13
29	70	30	0,05	1	6
30	70	30	0,05	1	8

Fonte: Pinter (2018)

3 JUSTIFICATIVA

Até o momento, a melhor produção de ácido múcico por processo “one-pot” em fermentação submersa a partir de polpa cítrica de laranja é de 30% (ácido múcico produzido por unidade de ácido D-galacturônico presente no substrato péctico), com o uso da cepa *A. niger* $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$ (KUIVANEN et al, 2016). Há também o rendimento de 63% em 168 h por fermentação em estado sólido em polpa cítrica de laranja suplementada com farelo de trigo e ureia, obtidos com o uso de um estudo de Plackett-Burman (PINTER 2018). Restam dois desafios com esta cepa: aumentar o rendimento do processo “one-pot” e diminuir o tempo de fermentação. Pinter (2018) não testou o efeito da umidade inicial do meio e, uma vez que está variável tem grande efeito na geração de produtos em FES, ela precisa ser investigada para este sistema. O resultado de DCCR de Pinter (2018), obtido com 24 horas de fermentação, foi inconclusivo, visto que os valores de produção de ácido múcico ficaram muito abaixo dos 63% obtidos com o Plackett-Burman. Dessa forma, foi proposta uma fermentação de 48 horas, como forma de aumentar a produção de ácido múcico acima dos 63% obtidos. O presente trabalho também testa a cepa $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh-\Delta gaaX$ para a produção de ácido múcico, com suplementação de fontes de nitrogênio através do uso da técnica de Delineamento de Compósito Central (DCC).

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

Aprimorar o processo “one-pot” para a produção de ácido múcico em FES a partir de polpa de laranja, utilizando as cepas de *Aspergillus niger* $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$ e $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh-\Delta gaaX$.

3.1.2 Objetivos Específicos

- I. Otimizar a concentração de fonte de ureia e farelo de trigo, umidade inicial e temperatura através do desenvolvimento de um estudo do tipo Plackett-Burman e Delineamento Composto Central Rotacional para a cepa $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$.
- II. Determinar quais são as melhores fontes de nitrogênio, dentre farelo de trigo, ureia e sulfato de sódio, para a produção de ácido múcico com a cepa $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh-\Delta gaaX$, utilizando a técnica analítica de Delineamento de Compósito Central (DCC).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA AS FERMENTAÇÕES

4.1.1 Fermentação em estado sólido

Inicialmente, foi feito o cultivo individual de cada cepa em meio batata dextrose (BDA) em estufa à 30°C, por um período mínimo de 5 dias. Após esse período, os esporos foram raspados em uma solução de Tween 80%, filtrados com um tecido de tule, e contados com o auxílio da câmara de Neubauer, para seu posterior uso na fermentação.

Essa fermentação foi feita tanto para a polpa cítrica de Pinter (2018) quanto para a nova amostra de polpa cítrica, que também foi utilizada. A fermentação em estado sólido foi feita em Erlenmeyer de 250 mL, com a adição de 5,55 g de massa seca de polpa cítrica de laranja. A polpa cítrica de laranja foi fornecida pela Cooperativa agroindustrial Corol de Rolândia-PR. Para o inóculo, foram usados 10⁷ esporos de *A. niger* (cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh* ou *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX*) por grama de substrato. A polpa cítrica seca utilizada como o meio sólido para a fermentação foi previamente caracterizada por Pinter (2018), sendo estimada a presença de 153 mg de ácido D-galacturônico (dentro da estrutura da pectina) por grama de polpa cítrica, que corresponde a 764 mg por Erlenmeyer (o mesmo lote de polpa cítrica foi utilizado para este estudo). As fontes de nitrogênio escolhidas para suplementar o meio de fermentação deste trabalho foram as mesmas que geraram o rendimento de 63% de ácido múcico de Pinter: 1,11 g de Farelo de Trigo (em peso seco).

Os experimentos foram feitos em Erlenmeyers de sacrifício, com 72 horas de fermentação para o estudo de Plackett-Burman e DCC e 48 horas para o estudo de DCCR. Os ácidos foram extraídos do meio reacional com uso de tampão acetato de sódio (200 mM e pH 4,5), a 30°C por 30 min e 121 rpm, sendo em seguida autoclavados à 121 °C por 15 min. Após isso, a solução passou por filtragem utilizando papel filtro com diâmetro do poro de 0,45 μm, seguido pela transferência de 0,5 mL de sobrenadante para um vial de 1 mL (KUIVANEN et al, 2016). Esses experimentos foram baseados no protocolo de Kuivanen et al. (2016) adaptado por Pinter (2018) (o protocolo foi adaptado ao incluir o uso da autoclave, 15 min a 121°C, no meio de cultivo pós fermentação). A análise do sobrenadante foi feita em HPLC.

4.1.1.1 Fermentação submersa

Um experimento de fermentação submersa foi feito, em Erlenmeyers de 250 mL para avaliar a transformação direta de ácido D-galacturônico em ácido múcico. Para este experimento, a cepa de *A. niger ΔgaaA-Δ39114-udh* foi cultivada por 5 dias em meio BDA a 30°C. Os esporos foram suspensos 40 mL de solução Tween 80 e contados com o auxílio de uma câmara de

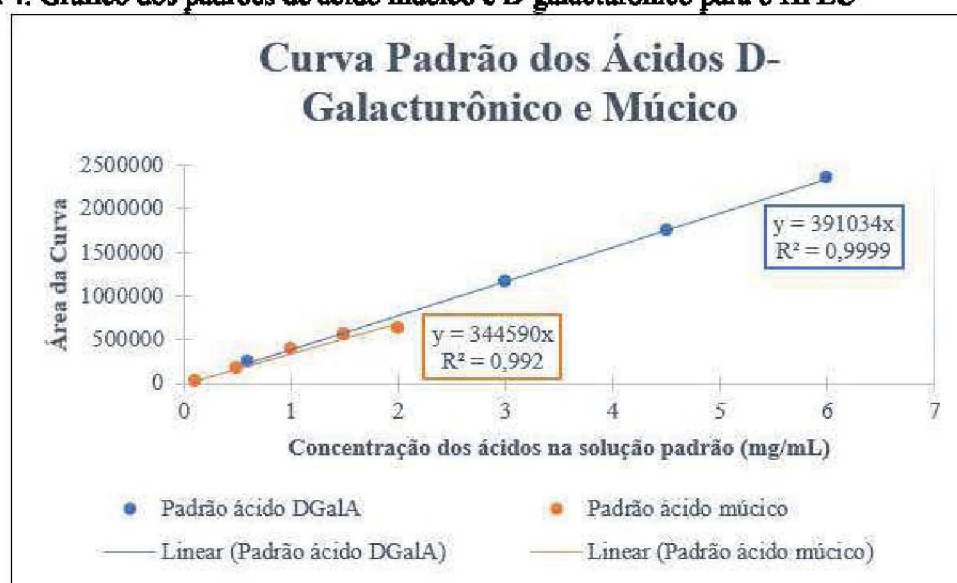
Neubauer. O volume equivalente a 10^8 esporos foi adicionado em 50 mL de uma solução de peptona dextrose, com 30 g.L^{-1} de gelatina, 10 g.L^{-1} de extrato de levedura, 20 g.L^{-1} de peptona, com a adição de 20 g.L^{-1} de ácido D-galacturônico. Os meios foram fermentados por 24 h a 30°C , em Shaker com agitação de 200 rpm. Os pellets formados foram secos com auxílio de papel filtro e bomba à vácuo, e pesados.

Foi preparado 50 mL de uma nova solução YP, contendo 0,25 g de extrato de levedura, 0,5 g de peptona e 1 g de ácido d-galacturônico. Dessa solução, foram separados 41 mL e adicionados 0,41 g de pellets, para a fermentação submersa. Os meios foram fermentados por 72 h em Shaker a 180 rpm, a 28°C . Uma amostra de 1 mL foi retirada de cada frasco a cada 24 h, sendo armazenadas em Eppendorfs em freezer -20°C .

4.2 ANÁLISE DOS VALORES OBTIDOS POR HPLC

Para as análises, foi utilizado o equipamento HPLC Agilent 1260 Infinity, com a coluna HI-PLEX H $8 \mu\text{m}$ (adequada para ácidos urônicos). A fase móvel utilizada para as corridas foi de ácido sulfúrico 1 mM, com uma vazão de $0,45 \text{ mL.min}^{-1}$. A coluna foi aquecida à 50°C , com o detector IR a 40°C , e pressão máxima de 50 bar. Para quantificar os valores de ácido D-galacturônico e ácido múcico produzidos, foram feitas curvas-padrão para cada um desses ácidos (Figura 4).

Figura 4: Gráfico dos padrões de ácido múcico e D-galacturônico para o HPLC



Fonte: A autora (2021)

Desta maneira, as concentrações dos ácidos nas amostras analisadas foram calculadas usando as seguintes equações.

$$\text{Ácido m\u00fasico (mg.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{\u00e1rea da curva}}{344590}$$

$$DGaLA \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{\u00e1rea da curva}}{391034}$$

Para a obten\u00e7\u00e3o do valor de cada \u00e1cido em mg:

$$\text{\u00c1cido m\u00fasico (mg)} = \text{\u00c1cido m\u00fasico (mg.mL}^{-1}\text{)} \times 100 \text{ mL de tamp\u00e3o}$$

$$DGaLA \text{ (mg)} = DGaLA \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} \times 100 \text{ mL de tamp\u00e3o}$$

As porcentagens foram calculadas conforme as f\u00f3rmulas abaixo.

$$\text{\u00c1cido m\u00fasico (\%)} = \left(\frac{\text{\u00c1cido m\u00fasico (mg)}}{5 \text{ g de polpa c\u00edtrica}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ g de polpa c\u00edtrica}}{165 \text{ mg de \u00e1cido m\u00fasico}} \right) \times 100$$

$$DGaLA \text{ (\%)} = \left(\frac{DGaLA \text{ (mg)}}{5 \text{ g de polpa c\u00edtrica}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ g de polpa c\u00edtrica}}{153 \text{ mg de \u00e1cido m\u00fasico}} \right) \times 100$$

Para o c\u00e1lculo da efici\u00eancia da hidr\u00f3lise da rea\u00e7\u00e3o foi feito da seguinte maneira (sendo que 1 mol de \u00e1cido m\u00fasico equivale 1,08 mol de \u00e1cido D-galactur\u00f4nico):

$$\text{Hidr\u00f3lise (\%)} = \left(\frac{\text{\u00c1cido m\u00fasico (mg.g de PC}^{-1}\text{)}}{1,08(\text{mg})} \right) + DGaLA \text{ (mg.g de PC}^{-1}\text{))/153 mg de \u00e1cido m\u00fasico} \times 100$$

4.3 ESTUDO DE PLACKETT-BURMAN

Para montar tabelas de varia\u00e7\u00e3o de fontes de nitrog\u00eanio, com farelo de trigo, sulfato de am\u00f4nio, ureia e nitrato de s\u00f3dio, e analisar os resultados com o diagrama de Pareto, Pinter (2018) utilizou o software Protimiza Experimental Design®, de Rodrigues e Costa.

Os experimentos de estudo de Plackett-Burman (Tabela 3) foram feitos por fermenta\u00e7\u00e3o em estado s\u00f3lido, em Erlenmeyers de sacrif\u00edcio de 250 mL, com 5,55 g de polpa c\u00edtrica em cada frasco (como h\u00e1 10% de umidade, isto corresponde a 5 g de polpa c\u00edtrica seca). Todos os frascos j\u00e1 contendo a polpa c\u00edtrica foram autoclavados \u00e0 121\u00b0C por 15 min. Quando usado, o farelo de trigo (adquirido pela Relva Verde e utilizado como recebido) foi adicionado \u00e0 polpa c\u00edtrica antes da autoclavagem, enquanto as outras fontes de nitrog\u00eanio foram autoclavadas em frascos separados em forma de solu\u00e7\u00f5es, de 60 g.L⁻¹ (sulfato de am\u00f4nio e ureia) e 15 g.L⁻¹ (nitrato de

sódio). Os esporos de *ΔgaaA-Δ39114-udh*, produzidos conforme descrito na seção 4.1.1, foram diluídos e raspados em 40 mL de solução Tween 80, sendo contados em Câmara de Neubauer. Em cada frasco, foi adicionado 5×10^7 esporos de *ΔgaaA-Δ39114-udh*. A umidade foi ajustada em 70%, levando em consideração as soluções de esporos e das fontes de nitrogênio, além da umidade da polpa cítrica (10%) e do farelo de trigo (10%). A fermentação foi feita em estufa, a 30°C, por 72 h.

Após a fermentação, foi feita a extração, com a adição de 100 mL de tampão acetato de sódio (200 mM e pH 4,5) em cada Erlenmeyer, com agitação em *Shaker* a 180 rpm por 30 min, sendo em seguida levado à autoclave a 121°C por 15 min. O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de uma seringa e filtros de 0,45 μm, sendo 0,5 mL armazenados congelados em vials de 1 mL até o momento da leitura. As concentrações de ácido D-galacturônico e ácido múcico foram medidas com o uso de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Tabela 3: Tabela de valores de fontes de nitrogênio para o estudo de Plackett-Burman utilizados na fermentação com a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*

Experimento	Nitrato de Sódio (g/5 g de polpa cítrica)	Sulfato de Amônio (g/5 g de polpa cítrica)	Ureia (g/5 g de polpa cítrica)	Farelo de Trigo (g/5 g de polpa cítrica)
1	0,2355	0	0,0839	0
2	0,2355	0,175	0	1
3	0	0,175	0,0839	0
4	0,2355	0	0,0839	1
5	0,2355	0,175	0	1
6	0,2355	0,175	0,0839	0
7	0	0,175	0,0839	1
8	0	0	0,0839	1
9	0	0	0	1
10	0,2355	0	0	0
11	0	0,175	0	0
12	0	0	0	0
13 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5
14 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5
15 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5
16 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5
17 (C)	0,11775	0,0875	0,04195	0,5

Fonte: Pinter (2018)

¹ Os experimentos com (C) ao lado se referem aos pontos centrais.

4.4 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*, as variáveis avaliadas foram as fontes de nitrogênio ureia e farelo de trigo (apontadas por

Pinter (2018) como as mais eficientes para uma maior produção de ácido múcido) temperatura de fermentação e porcentagem de umidade do meio.

Para a fermentação, foram mantidas as mesmas condições experimentais usadas por Pinter (2018): fermentação em estado sólido com polpa cítrica (70% de umidade inicial) com adição de 5 g de massa seca de polpa cítrica com 5×10^7 esporos de *ΔgaaA-Δ39114-udh*. Os meios de fermentação foram incubados em estufa a 30 °C por 48 h. O processo de extração foi feito conforme ao descrito para o Plackett-Burman. A formulação para o DCCR está representada na Tabela 4.

Tabela 4: Formulação para o experimento de DCCR para a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*.

Experimento	Umidade	Temperatura (°C)	Ureia (g/5 g de Polpa Cítrica)	Farelo De Trigo (g/5 g de Polpa Cítrica)
1	65	25	0,025	0,5
2	75	25	0,025	0,5
3	65	35	0,025	0,5
4	75	35	0,025	0,5
5	65	25	0,075	0,5
6	75	25	0,075	0,5
7	65	35	0,075	0,5
8	75	35	0,075	0,5
9	65	25	0,025	1,5
10	75	25	0,025	1,5
11	65	35	0,025	1,5
12	75	35	0,025	1,5
13	65	25	0,075	1,5
14	75	25	0,075	1,5
15	65	35	0,075	1,5
16	75	35	0,075	1,5
17	70	30	0,05	1
18	70	30	0,05	1
19	70	30	0,05	1
20	70	30	0,05	1
21	60	30	0,05	1
22	80	30	0,05	1
23	70	20	0,05	1
24	70	35	0,05	1
25	70	30	0	1
26	70	30	0,1	1
27	70	30	0,05	0
28	70	30	0,05	2
29	70	30	0,05	1
30	70	30	0,05	1

Fonte: Pinter (2018).

4.5 ESTUDO DE DCC COM A CEPA *Δgaaa-Δ39114-udh-ΔgaaX*

Para montar tabelas de variação de fontes de nitrogênio, com farelo de trigo, sulfato de amônio e ureia, e analisar os resultados com o diagrama de Pareto, Pinter (2018) utilizou o software Protimiza Experimental Design®, de Rodrigues e Costa. Já para a cepa *Δgaaa-Δ39114-udh-ΔgaaX*, seria feito planejamento do estudo de Plackett-Burman foi feito assim como foi para a cepa *Δgaaa-Δ39114-udh*, já que Pinter (2018) não estudou esta cepa. Porém a ferramenta analítica foi mudada para um DCC, já que foram usadas apenas três fontes de nitrogênio. As fontes de nitrogênio testadas foram farelo de trigo, ureia e sulfato de amônio. Os níveis testados das fontes de nitrogênio para esta cepa estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Tabela de valores de fontes de nitrogênio para o estudo de Plackett-Burman referente à cepa *Δgaaa-Δ39114-udh-ΔgaaX*

Experimento	Sulfato de Amônio (g/5 g de Polpa Cítrica)	Ureia (g/5 g de Polpa Cítrica)	Farelo de Trigo (g/5 g de polpa cítrica)
1	0	0,0839	0
2	0	0,0839	1
3	0,175	0,0839	0
4	0,175	0,0839	1
5	0	0	0
6	0,175	0	1
7	0,175	0	0
8	0	0	1
9 (C)	0,0875	0,04195	0,5
10 (C)	0,0875	0,04195	0,5
11 (C)	0,0875	0,04195	0,5
12 (C)	0,0875	0,04195	0,5

Fonte: A autora (2021).

4.5.1 Quantificação dos óleos essenciais

Para a quantificação dos óleos essenciais presentes no lote de polpa cítrica utilizado, foram adicionados, em um balão de 1000 mL, 50 g de polpa cítrica e 500 mL de água destilada. O balão foi colocado em uma manta térmica a 100°C, acoplado a um sistema de arraste à vapor, com um destilador. Também foram adicionadas 4 esferas de vidro para tornar a ebulição homogênea. Após a decantação, foi adicionado éter no balão contendo a solução decantada, para a separação dos óleos essenciais. Ao final, o éter foi evaporado e os óleos essenciais foram pesados.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTOS COM A CEPA *ΔgaaA-Δ39114-udh*

Foram feitos alguns experimentos iniciais para determinar as melhores condições reacionais com o uso do estudo de DCCR, porém os resultados não foram conclusivos. Isso aconteceu porque haviam problemas nos experimentos desta metodologia. Dessa forma, não serão apresentados resultados específicos para as seções 4.3 e 4.4. No entanto, foram feitos experimentos para ajustar a metodologia através da comparação de resultados obtidos no laboratório com os resultados já publicados na literatura.

5.1.1 Fermentação em estado sólido com uma nova amostra de polpa cítrica

Dentre os experimentos testados, esteve o uso de uma amostra mais recente de polpa cítrica de laranja. Essa amostra foi cedida a um aluno da pós graduação pela Super Suco. O objetivo desse teste era detectar se a amostra de polpa cítrica utilizada por Pinter (2018) não estava velha e, conseqüentemente, com degradação de componentes importantes para a fermentação em estado sólido. Entretanto, os resultados obtidos de ácido D-galacturônico e múxico, com o uso da nova polpa cítrica, foram muito baixos (4,4 mg de ácido D-galacturônico e 1,1 mg de ácido múxico por g de polpa cítrica, respectivamente). Entretanto, essa nova amostra de polpa cítrica de laranja não era apropriada para uma fermentação em estado sólido, pois o diâmetro das partículas era muito pequeno. Com um diâmetro pequeno, as partículas ficam muito próximas umas das outras, restringindo a passagem de ar no meio de fermentação, limitando tanto a propagação quanto o metabolismo do fungo. Dessa forma, não foi possível descartar a possibilidade de a amostra de polpa cítrica de Pinter (2018) estar comprometida nutricionalmente pela idade.

5.1.2 Quantificação de óleos essenciais

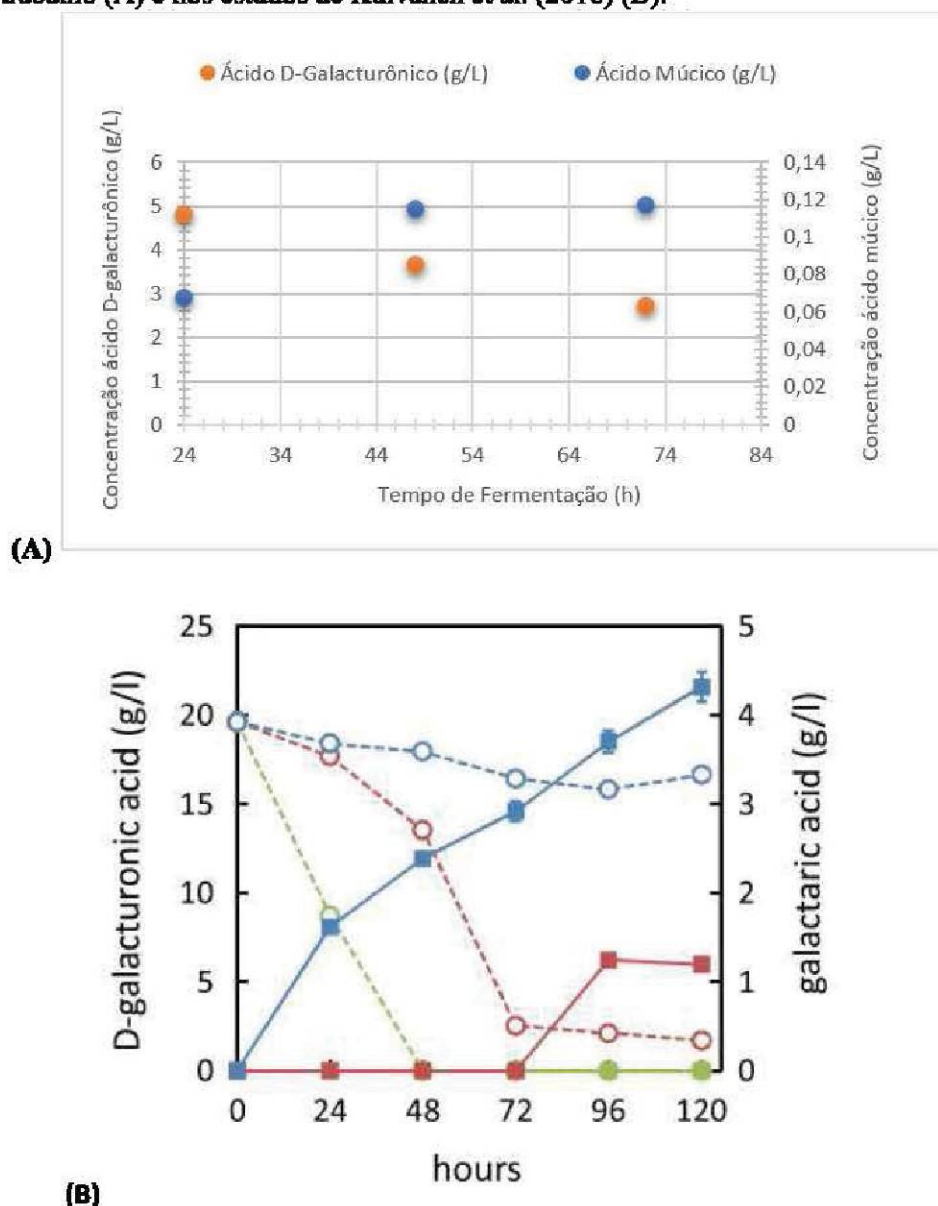
A quantificação de óleos essenciais resultou em 26,8 mg de óleos em 50 g de polpa cítrica. Essa quantidade de óleos é baixa, de forma que não atrapalham o processo. A remoção dos óleos essenciais aumenta o tempo total do processo “*one-pot*” não apenas pelo período de remoção em si, mas pela necessidade de secar a polpa cítrica após seu uso (cerca de 3 dias para a secagem). Sendo assim, a etapa de remoção dos óleos essenciais não foi considerada para este processo.

5.1.3 Fermentação Submersa com a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*

Para verificar se a baixa produção de ácido múxico pelos ensaios preliminares de DCCR estava ligada a uma falha técnica na metodologia de fermentação em estado sólido, foi feita uma

fermentação submersa conforme o protocolo de Kuivanen et al. (2016). Contudo, a produção de ácido múcico também foi baixa, com máximo de $0,04 \text{ g.L}^{-1}$. Por fermentação submersa com ácido D-galacturônico como substrato inicial, Kuivanen et al. (2016) produziu em torno de $2,9 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido múcico, utilizando a mesma cepa em um intervalo de tempo de 72 h. Os gráficos correspondentes a formação e consumo de ácido múcico e D-galacturônico, respectivamente, para os dois estudos, estão demonstrados na Figura 5. Devido a um erro na metodologia, não foi feito o tempo zero de concentração, contudo, pela revisão do material utilizado durante os experimentos, foi estimado que a concentração era de 5 g.L^{-1} .

Figura 5: Concentração de ácido D-galacturônico e múcico obtidos por fermentação submersa no presente trabalho (A) e nos estudos de Kuivanen et al. (2016) (B).

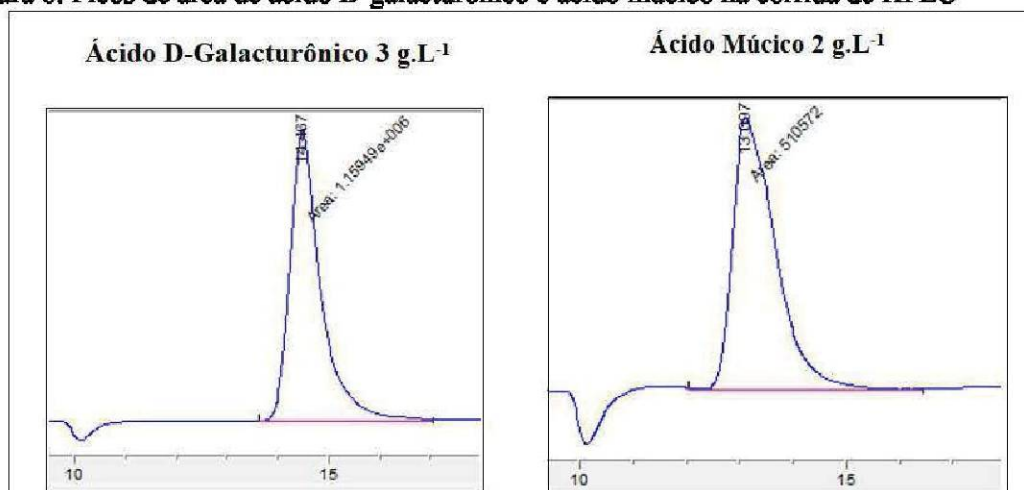


Fonte: (A) A autora (2021); (B) Kuivanen et al. (2016).

O desaparecimento do ácido D-galacturônico no meio reacional está ocorrendo de maneira similar ao que acontece nos estudos de Kuivanen et al. (2016), de aproximadamente 1

g.L⁻¹ a cada 24 h. No entanto, a formação de ácido múcico não está sendo detectada conforme o esperado. Dentre as possibilidades de isso estar acontecendo está a sobreposição de picos de ácido múcico e ácido D-galacturônico no HPLC, conforme pode ser visto nos padrões demonstrados na Figura 6. É possível observar a formação de calda em ambos os picos, e no caso do ácido múcico, a formação de calda torna possível que, durante a leitura de uma amostra, ele seja quantificado erroneamente como ácido D-galacturônico.

Figura 6: Picos de área de ácido D-galacturônico e ácido múcico na corrida de HPLC



Fonte: A autora (2021)

Os tempos de retenção do ácido D-galacturônico (cerca de 14 minutos de corrida) e do ácido múcico (cerca de 13 minutos de corrida) são bem próximos, de forma que problemas na coluna podem acarretar em sua sobreposição. Durante o treinamento de metodologia do HPLC, foi necessário diminuir a vazão de corrida da amostra na coluna, pois a vazão utilizada por Pinter (2018) (0,5 mL.min⁻¹) fazia com que a pressão máxima do sistema (50 bar) se excedesse (a mesma coluna foi utilizada em ambos estudos). A pressão da coluna durante a calibragem do sistema era levemente instável, formando ruído na linha de pressão. Sendo assim, é possível que o ácido D-galacturônico quantificado durante a corrida de HPLC esteja superestimado devido a sobreposição de picos, ou seja, que ácido múcico na verdade esteja sendo quantificado como ácido D-galacturônico.

Além disso, foi identificado que a inclinação das áreas das soluções padrões dos dois ácidos estavam significativamente menores quando comparadas às de Pinter (2018). Posteriormente os padrões foram refeitos de forma que as inclinações de ambos os estudos fossem equivalentes. Porém, a fermentação submersa foi feita anteriormente a essa correção da área das curvas. Sendo assim, os resultados de fermentação submersa foram estipulados com base nas inclinações obtidas no mesmo dia pelo equipamento que, por sua vez, contavam com falhas na metodologia ou no equipamento e coluna de HPLC.

5.2 ESTUDO DE DCC REFERENTE À CEPA *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX*

O resultado de melhor fonte de nitrogênio para a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX* não pode ser definido. Isso ocorreu porque a variação entre os valores de produção de ácido múcico foram muito diferentes entre si, mesmo nos pontos centrais, onde os experimentos eram iguais entre si em sua composição (Tabela 6).

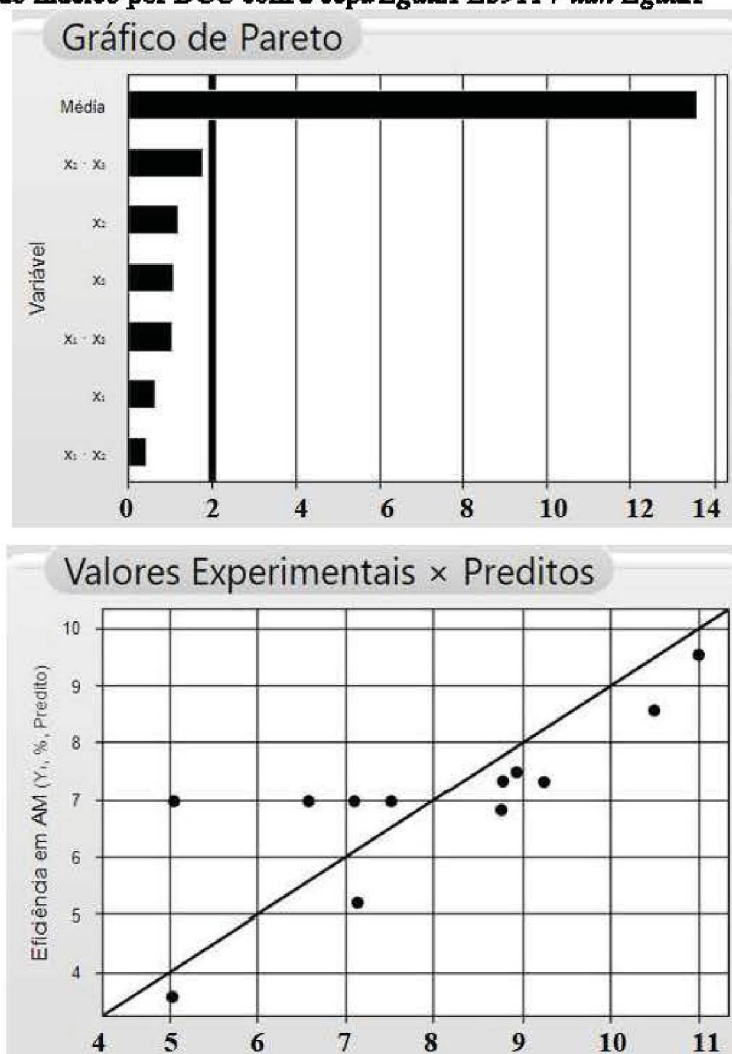
Tabela 6: Resultados de Estudo de Plackett-Burman para a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX*

Experimento	Sulfato de Amônio (g/5 g de polpa cítrica)	Ureia (g/5 g de polpa cítrica)	Farelo de Trigo (g/5 g de polpa cítrica)	Ácido múcico (%)	Hidrólise (%)
1	0,175	0	0	4,0	45,8
2	0,175	0	1	10,0	17,6
3	0,175	0,0839	0	7,7	15,4
4	0,175	0,0839	1	6,1	22,4
5	0	0	0	9,5	13,9
6	0	0	1	7,9	12,7
7	0	0,0839	0	7,8	18,2
8	0	0,0839	1	8,2	13,2
9 (C)	0,0875	0,04195	0,5	5,6	12,2
10 (C)	0,0875	0,04195	0,5	6,5	14,8
11 (C)	0,0875	0,04195	0,5	4,0	19,0
12 (C)	0,0875	0,04195	0,5	6,1	12,3

Fonte: A autora (2021)

O diagrama de Pareto gerado a partir dos dados na Tabela 6 mostra que nenhum resultado foi positivamente significativo ao se considerar um nível de significância de 10% (Figura 7). A análise dos dados no diagrama de Pareto foi feita com base nas informações geradas pela Tabela 7. O gráfico dos valores experimentais e preditos (Figura 7) mostra que o ajuste do sistema analítico não está preciso para os resultados obtidos, sendo mais um indicativo de que não é possível concluir qual a melhor fonte de nitrogênio para o sistema.

Figura 7: Diagrama de Pareto e gráfico de valores experimentais e preditos para os resultados de produção de ácido múcico por DCC com a cepa *AgaaA-Δ39114-udh-AgaaX*



Fonte: A autora (2021).

Tabela 7: Variáveis obtidas pelo DCC para gerar o diagrama de Pareto para o resultado de produção de ácido múcico.

Nome	Coefficiente	Erro Padrão	t Calculado	p-valor
Média	6,96	0,51	13,59	0
x1 (Farelo de Trigo)	0,41	0,63	0,65	0,5459
x2 (Sulfato de Amônia)	0,77	0,63	1,23	0,2737
x3 (Ureia)	0,69	0,63	1,1	0,3208
x1-x2	0,27	0,63	0,43	0,6836
x1-x3	-0,68	0,63	-1,08	0,3288
x2-x3	1,12	0,63	-1,79	0,1333

Fonte: A autora (2021)

Apesar de um valor consideravelmente baixo (máximo de 10%) de produção de ácido múcico, a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX* teve um desempenho melhor quando comparada a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*, cujos resultados foram inconclusivos. Há algumas hipóteses para esse melhor desempenho: a primeira é que a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX* está funcionando corretamente quanto às suas modificações genéticas, diferentemente da cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*. A segunda causa é de que a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX*, assim como no caso da cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh*, tem uma via desconhecida de conversão de ácido D-galacturônico, tornando baixa a produção de ácido múcico; A terceira hipótese é a de que a metodologia analítica só foi suficientemente ajustada no final dos estudos, ou seja, quando a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX* estava sendo estudada, de forma que os resultados foram melhores. Além disso, novamente se repete o problema de sobreposição dos picos de ácido múcico e ácido D-galacturônico, assim como na seção 5.1.1, de forma que a quantidade de ácido D-galacturônico possa estar superestimada, contabilizando também parte do ácido múcico.

Apesar disso, a produção de ácido múcico pela cepa de *ΔgaaA-Δ39114-udh-ΔgaaX* foi baixa quando comparada aos resultados obtidos por Pinter (2018), com a cepa *ΔgaaA-Δ39114-udh* (63%). Como ambas as cepas compartilham três das mesmas mutações, a deleção do gene *gaaX* deveria aumentar a produção de ácido múcico.

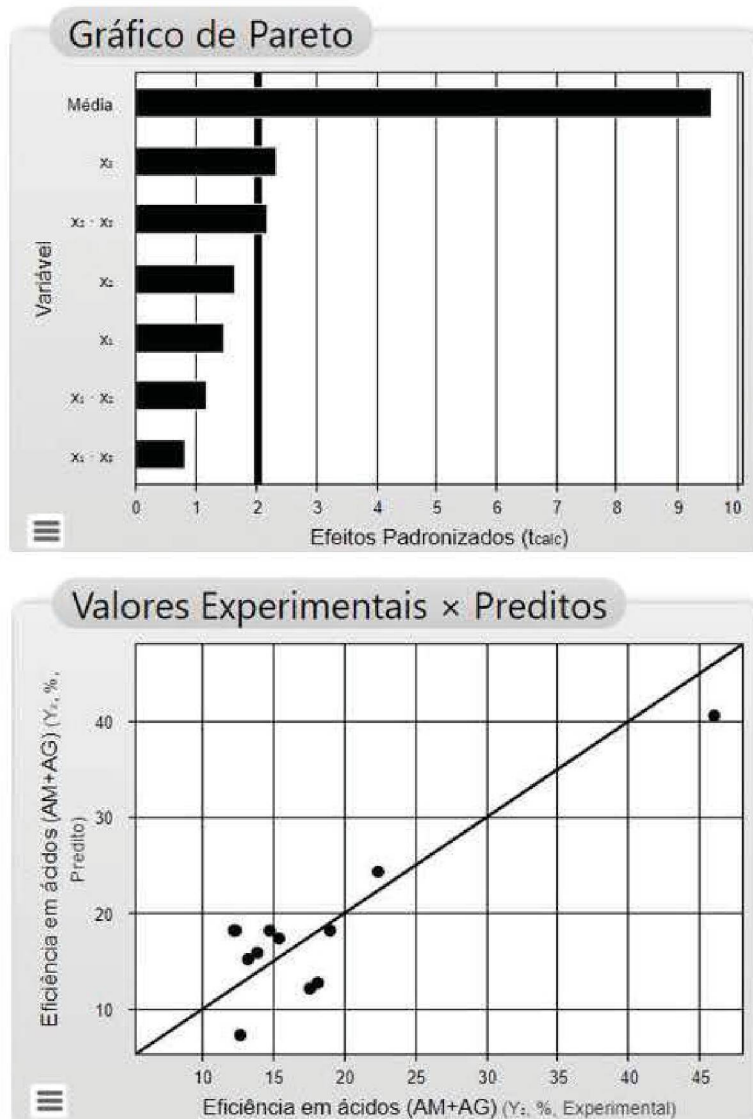
A porcentagem de hidrólise total da pectina também não foi significativamente alta (Tabela 6), o que influencia diretamente na produção de ácido múcico, visto que a porção de ácido D-galacturônico disponível para o fungo fica limitada. Apesar disso, foi possível definir, nesse experimento, a ureia como uma fonte de nitrogênio com influência positiva, considerando uma significância de 10% (Tabela 8). Os valores preditos também ficaram menos destoantes dos experimentais para os resultados de hidrólise (Figura 8) quando comparados aos de produção de ácido múcico, contudo ainda seriam necessários mais experimentos para um resultado definitivo, já que o processo ainda tem uma grande margem para melhorar.

Tabela 8: Variáveis obtidas pelo DCC para gerar o diagrama de Pareto para o resultado de hidrólise.

Nome	Coefficiente	Erro Padrão	t Calculado	p-valor
Média	18,14	1,89	9,58	0,0002
x1 (Farelo de Trigo)	-3,44	2,32	-1,48	0,1979
x2 (Sulfato de Amônia)	-3,82	2,32	-1,65	0,1603
x3 (Ureia)	-5,41	2,32	-2,33	0,067
x1-x2	2,76	2,32	1,19	0,2883
x1-x3	1,92	2,32	0,83	0,4461
x2-x3	5,01	2,32	2,16	0,0831

Fonte: A autora (2021).

Figura 8: Diagrama de Pareto e gráfico de valores preditos e experimentais para o resultado de hidrólise da pectina



Fonte: A autora (2021).

Visto que não foi possível obter uma produção significativa de ácido múcico com a cepa *AgaaA-Δ39114-udh-AgaaX*, o estudo não seguiu para o DCCR, já que a fonte de nitrogênio ideal para o processo não pode ser definida com precisão. Também seria necessário solicitar e testar uma amostra mais nova desta cepa, vindo do Instituto VIT.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do potencial demonstrado em estudos anteriores, não foi possível aumentar a produção de ácido múcico pelas cepas geneticamente modificadas de *A. niger* pela otimização do processo “one-pot”, com suplementação de fontes de nitrogênio. A produção de ácido múcico foram significativamente menores (quase duas ordens de grandeza) quando condições de trabalhos anteriores foram reproduzidas, no caso da cepa de *A. niger* $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$. No caso da cepa de *Aspergillus niger* $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh-\Delta gaaX$, a produção de ácido múcico também foi baixa, visto que se esperava que sua produção de ácido múcico fosse, no mínimo, ser tão eficiente quanto à primeira cepa (considerando os resultados de Pinter (2018)), já que compartilham três das mesmas modificações genéticas. As causas da baixa produção de ácido múcico ainda não são conhecidas. Algumas possibilidades são apontadas, como por exemplo a presença de uma rota alternativa para a conversão do ácido D-galacturônico em algum outro componente que não o ácido múcico. Entretanto, os problemas de metodologia com relação ao uso do HPLC são mais prováveis, considerando a sobreposição de picos de ácido D-galacturônico e múcico, que torna difícil quantificar corretamente o quanto de cada um realmente há na amostra. Foram notadas divergências entre os resultados de curva padrão de ambos os ácidos obtidos quando comparado aos obtidos por Pinter (2018), mesmo utilizando a mesma coluna para a corrida. Além disso, o protocolo de análise teve que ser adaptado com uma menor vazão, já que a vazão utilizada por Pinter (2018) extrapolava o limite de pressão máxima.

Outra possibilidade é a perda de qualidade do lote de polpa cítrica utilizado, a qual está armazenada seca a temperatura ambiente desde pelo menos 2018. Esse armazenamento prolongado pode causar a diminuição nutricional da polpa cítrica, influenciando o crescimento e a atividade fúngica. Seu uso foi mantido neste trabalho para que as condições de experimento fossem as mais próximas possíveis das utilizadas nos estudos de Pinter (2018), de maneira que seus resultados obtidos pelo estudo de Plackett-Burman fossem utilizados, partindo diretamente para o estudo de DCCR. No entanto, estas possibilidades são apenas hipóteses, visto que tanto um novo lote de ambas as cepas de *A. niger* precisa ser testado, assim como um novo lote de polpa cítrica (incluindo sua caracterização quanto à quantidade de ácido D-galacturônico disponível).

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas futuras, será necessário obter-se novas amostras de ambas as cepas de *A. niger*, $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh$ e $\Delta gaaA-\Delta 39114-udh-\Delta gaaX$, do Instituto VTT. Após isso, será necessário replicar o estudo de Plackett-Burman feito por Pinter (2018), para checar se os seus resultados podem ser reproduzidos. Se os resultados continuarem incompatíveis, uma nova amostra de polpa cítrica de laranja deve ser caracterizada, com a extração de óleos essenciais e

identificação da quantidade de ácido D-galacturônico disponível para ser convertido em ácido múcico e, em seguida, testado. Também devem ser replicados os experimentos de fermentação submersa de Kuivanen et al. (2016). Caso os resultados forem reprodutíveis, indicariam problemas na fermentação em estado sólido como, por exemplo, na homogeneização do meio de fermentação. Uma má homogeneização faz com que o fungo não acesse a polpa cítrica de maneira uniforme e, ao contrário da fermentação submersa, o meio não é agitado, tornando mais lenta a dispersão do fungo pelo meio.

O uso de uma nova coluna HI-PLEX H 8 μm deverá ser feito para a leitura dos padrões e das amostras, visto que foi detectado a presença de picos com calda na coluna utilizada. A presença de picos não apenas deixa a leitura das áreas dos picos imprecisas, mas também, no caso deste experimento, aumenta a sobreposição dos picos de ácido D-galacturônico e múcico, que tem apenas cerca de 1 minuto de diferença de detecção, fazendo com que um ácido seja erroneamente quantificado como o outro.

Quanto à otimização do processo “one-pot” por suplementação com fontes de nitrogênio, com a cepa nova de *A. niger* $\Delta\text{gaaA-}\Delta\text{39114-udh}$, o estudo de Plackett-Burman de Pinter (2018) deverá ser refeito. Caso os resultados sejam reprodutíveis, deverá ser feito um estudo de DCCR, conforme sugerido inicialmente na seção de materiais e métodos deste trabalho.

Quanto à otimização do processo “one-pot” por suplementação com fontes de nitrogênio, com a cepa *A. niger* $\Delta\text{gaaA-}\Delta\text{39114-udh-}\Delta\text{gaaX}$, será necessário refazer todo o processo do início, no caso, o estudo de DCC e de DCCR. O aumento do tempo de fermentação também podem ser uma possibilidade neste caso.

REFERÊNCIAS

ALAZI, E.; NIU, J.; KOWALCZYK, J. E.; et al. The transcriptional activator GaaR of *Aspergillus niger* is required for release and utilization of d-galacturonic acid from pectin. **FEBS Letters**, p. 1804–1815, 2016.

BARTH, D.; WIEBE, M. G. Enhancing fungal production of galactaric acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 10, p. 4033–4040, 2017. Applied Microbiology and Biotechnology.

BIZ, A. **PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO PARA A OBTENÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO EM BIORREFINARIAS**, 2012. Universidade Federal do Paraná.

KUIVANEN, J.; DANTAS, H.; MOJZITA, D.; et al. Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of *Aspergillus niger*. , p. 1–8, 2014.

KUIVANEN, J.; WANG, Y. M. J.; RICHARD, P. Engineering *Aspergillus niger* for galactaric acid production: Elimination of galactaric acid catabolism by using RNA sequencing and CRISPR/Cas9. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2016. BioMed Central.

LOHRASBI, M.; POURBAFRANI, M.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7382–7388, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.078>>. .

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183–225, 2002.

MOJZITA, D.; WIEBE, M.; HILDITCH, S.; et al. Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D-galacturonate to meso-Galactarate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 169–175, 2010.

PINTER, Rafaela Souza. **Produção de ácido meso-galactárico a partir da polpa cítrica por processo “one-pot”**, 2018.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 597–604, 2009.

Safra de laranja 2021/22 do cinturão citrícola de SP e MG é estimada em 294,17 milhões de caixas. **Fundecitrus**, 27 de maio de 2021. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-de-laranja-202122-do>>

cinturao-citricola-de-sp-e-mg-e-estimada-em-29417-milhoes-de-caixas/1041>

WERPY, T.; PETERSEN, G. Volume I - Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. **Top Value Added Chemicals from Biomass**, p. 76, 2004. Disponível em: <<http://www.osti.gov/scitech//servlets/purl/15008859-s6ri0N/native/>>. .

ZAPATA, B.; BALMASEDA, J.; FREGOSO-ISRAEL, E.; TORRES-GARCÍA, E. Thermo-kinetics study of orange peel in air. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 98, n. 1, p. 309–315, 2009.