JULIANO COSTA BUBA

Produção de protease com atividade fibrinolítica por
cultivo submerso de *Mucor subtilissimus* em biorreator

São Paulo

2018

JULIANO COSTA BUBA

Produção de protease com atividade fibrinolítica por
cultivo submerso de *Mucor subtilissimus* em biorreator

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2018

JULIANO COSTA BUBA

Produção de protease com atividade fibrinolítica por
cultivo submerso de *Mucor subtilissimus* em biorreator

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

São Paulo

2018

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Buba, Juliano Costa

Produção de protease com atividade fibrinolítica por cultivo submerso de *Mucor subtilissimus* em biorreator / J. C. Buba -- versão corr. -- São Paulo, 2018.

103 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Biorreator 2. Cultivo submerso 3. *Mucor subtilissimus* 4. Protease fibrinolítica I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II. t.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao Aldo, por acreditar em mim (até mesmo quando nem eu acreditei), pela disposição em me ajudar sempre que precisei e pela valiosa amizade.

Agradeço à prof. Ana Lúcia Figueiredo Porto da UFRPE, pela grande generosidade de me incluir no projeto e emprestar sua estrutura de laboratório, indispensável para a viabilização deste trabalho.

Agradeço à minha amada esposa Adriellen, incentivadora, companheira de laboratório em vários momentos (mesmo sendo da área do Direito) e sem a qual esse trabalho não teria se concluído.

Agradeço aos meus pais pelo apoio e incentivo.

Agradeço às técnicas de laboratório Orlinda e Andrea, pela assistência, essencial em diversos momentos.

Agradeço aos colegas de laboratório da UFRPE, Thiago, pela imensa ajuda com as metodologias e pela disponibilidade em ajudar, Amanda, pelo compartilhamento de experiências e informações, Pablo e Priscila pela companhia.

Agradeço aos colegas do B20 da EPUSP, Carla, Dani, Luan, Fabri, Letícia, Davi, Júlia, Gabriela, que contribuíram muito para a jornada ser mais feliz.

Agradeço à Lígia da FCF por permitir a colaboração e aos técnicos Elias e Rosinha pela indispensável ajuda.

Agradeço à Deus por ter me ajudado a passar as madrugadas no laboratório sem perder a fé.

RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são um grupo de desordens do coração e dos vasos sanguíneos capazes de causar ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais, eventos geralmente agudos oriundos principalmente de bloqueios que impedem o sangue de fluir para o coração ou o cérebro. Proteases fibrinolíticas são agentes que degradam a fibrina, principal componente de trombo sanguíneo, capazes de evitar e tratar DCVs. Fungos filamentosos têm se mostrado uma boa alternativa para a produção de enzimas fibrinolíticas, dentre esses os fungos da divisão dos zigomicetos. A cepa UCP 1262 do zigomiceto *Mucor subtilissimus* foi estudada com o objetivo geral de produzir protease com atividade fibrinolítica com base em trabalhos publicados em fermentação em estado sólido (FES) e cultivo submerso com a mesma cepa. Foram realizados cultivos submersos desta cepa em frascos agitados e em 2 diferentes biorreatores, com determinação da cinética de crescimento, consumo de glicose e produção de enzima. O meio utilizado foi o MS-2, com farelo de trigo como fonte de nitrogênio e glicose como fonte preferencial de carbono. A FES com a mesma fonte de nitrogênio e o cultivo submerso em diferentes condições de taxa de inóculo, pH e agitação deste estudo foram comparados, assim como duas metodologias diferentes para dosagem de concentração de biomassa, gravimetria e ergosterol. As maiores concentrações de atividade fibrinolítica e produtividade volumétrica obtidas foram de, respectivamente, 12,0 U/mL e 0,22 U/(mL.h), 92% e 89% menores, respectivamente, do que o valor reportado em FES. O valor de $\mu_{x_{max}}$ foi calculado com base no perfil de biomassa, glicose e produção de CO₂ e não apresentou correlação com a produção da enzima. A maior simplicidade operacional e os dados de rendimento obtidos indicam que a FES é uma alternativa melhor para a produção dessa enzima com esta cepa. O zigomiceto *Mucor subtilissimus* demonstrou ser muito difícil de ser cultivado em sistemas submersos com o meio MS-2, em especial pela sua morfologia e aderência ao biorreator.

Palavras-chave: Zigomicetos. *Mucor subtilissimus*. Cultivo submerso. Biorreator. Atividade fibrinolítica.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are a group of heart and blood vessels disorders capable of causing heart attacks and strokes, usually acute events caused mainly by blockages that prevent blood from flowing to the heart and brain. Fibrinolytic proteases are agents that degrade fibrin, the major component of blood thrombus. Filamentous fungi were shown to be a good alternative for the production of fibrinolytic enzymes, among them fungi of the zygomycetes division. The UCP 1262 strain of the zygomycete *Mucor subtilissimus* was studied with the general objective of producing protease with fibrinolytic activity based on published works on solid state fermentation (SSF) and submerged culture with the same strain. Submerged cultures of this strain were carried out in shaken flasks and in 2 different bioreactors, with determination of growth kinetics, glucose consumption and enzyme production. The medium used was MS-2, with wheat bran as the nitrogen source and glucose as the preferred carbon source. The SSF with the same nitrogen source and the submerged culture under different inoculum ratios, pH and agitation conditions of this study were compared, as well as two different methodologies for biomass, gravimetry and ergosterol dosage. The highest concentration of fibrinolytic activity and volumetric productivity obtained were, respectively, 12.0 U/mL and 0.22 U/(mL.h), 92% and 89% lower, respectively, than the value reported in SSF. The value of $\mu_{X_{max}}$ was calculated based on the biomass concentration, glucose and CO₂ production profile and showed no correlation with the enzyme production. The greater operational simplicity and yield data obtained indicate that SSF is a better alternative for the production of this enzyme with this strain. The zygomycete *Mucor subtilissimus* showed to be very difficult to cultivate in submerged culture with the MS-2 medium, especially for its morphology and adherence to the bioreactor.

Keywords: Zygomycetes. *Mucor subtilissimus*. Submerged culture. Bioreactor. Fibrinolytic activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES	3
3.2 ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS	3
3.3 PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS COM ZIGOMICETOS	4
3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMA FIBRINOLÍTICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	7
3.5 PRODUÇÃO POR CULTIVO SUBMERSO	8
3.6 COMPARAÇÃO CULTIVO SÓLIDO X SUBMERSO	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 CEPA	13
4.2 MEIOS DE CULTURA	13
4.3 MANUTENÇÃO DA CEPA	15
4.4 OBTENÇÃO DE PRÉ-INÓCULO.....	15
4.5 EXPERIMENTOS.....	16
4.6 ANÁLISES	20
4.6.1. Determinação da concentração de biomassa	21
4.6.2. Observação da morfologia	22
4.6.3. Determinação da concentração de glicose	22
4.6.4. Determinação da concentração de proteínas.....	23
4.6.5. Determinação da atividade fibrinolítica	23
4.6.6. Cálculo da taxa específica de crescimento	24

4.6.7. Cálculo do k_La	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Etapa 1 - Cultivos em frascos agitados.....	29
5.1.1. Cultivo 1	29
5.1.2. Cultivo 2.....	31
5.1.3. Discussão da etapa 1.....	34
5.2 Etapa 2 - Cultivos em biorreator Tecnal Biotec 7,5 L.....	35
5.2.1. Cultivo 3.....	36
5.2.2. Cultivo 4.....	40
5.2.3. Cultivo 5.....	45
5.2.4. Cultivo 6.....	48
5.2.5. Discussão da etapa 2.....	51
5.3 Teste de k_La	51
5.4 Etapa 3 - Cultivos em biorreator NBS Bioflo III 4,0 L	53
5.4.1. Cultivo 7.....	54
5.4.2. Cultivos 8 a 13 – Efeito das combinações de pH e agitação.....	57
5.4.3. Cultivo 14.....	60
5.4.4. Discussão da etapa 3.....	65
5.5 Discussão geral.....	65
6. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE A - Gráficos	74
1. Tempo de resposta dos sensores de OD.....	74
2. Gráficos da determinação de k_La	75
3. Gráficos com os perfis dos cultivos 8 a 13 e cálculo de μ_{xmax}	79
4. Curva padrão e identidade de ergosterol.....	91

APÊNDICE B - Fotos92

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são um grupo de desordens do coração e dos vasos sanguíneos capazes de causar ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais, eventos geralmente agudos oriundos principalmente de bloqueios (trombos) que impedem o sangue de fluir para o coração ou o cérebro (OMS, 2016). Proteases fibrinolíticas são agentes que degradam a fibrina, principal componente de trombo sanguíneo. A fibrina é formada pela conversão do fibrinogênio solúvel molecular em monômeros de fibrina que polimerizam espontaneamente e criam uma rede de gel de fibrina. O acúmulo de fibrina nos vasos sanguíneos pode acarretar trombose, levando ao infarto do miocárdio e outras DCVs (SILVA et al., 2013; PENG; YANG; ZHANG, 2005).

Fungos filamentosos têm se mostrado uma boa alternativa para a produção de enzimas fibrinolíticas (GERMANO et al., 2003), dentre esses os fungos da divisão dos zigomicetos. Considerando as propriedades estruturais e fisiológicas, os zigomicetos estão recebendo crescente atenção dentro da biotecnologia. Eles já são conhecidos devido ao extenso uso em países asiáticos para a produção de alimentos fermentados como o tempê e o tofu. Considerando os requerimentos mínimos de crescimento e diversidade de co-produtos, a biomassa de zigomicetos possui capacidade de ser explorada em processos industriais com aumento de lucros (FERREIRA; LENNARTSSON; EDEBO, 2013).

ALVES et al. (2002) isolaram a cepa UCP 1262 de *Mucor subtilissimus*, um zigomiceto da ordem *Mucorales*, capaz de produzir enzima com atividade fibrinolítica. Desde então esta cepa e enzima tem sido investigadas pelo grupo da Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Universidade Federal Rural de Pernambuco) com o intuito de obter um processo produtivo eficiente e economicamente viável e uma enzima adequada para uso terapêutico. O objetivo geral deste trabalho foi produzir protease com atividade fibrinolítica com base em trabalhos em FES e cultivo submerso do grupo. Foram realizados cultivos submersos do fungo *M. subtilissimus* em 2 diferentes biorreatores com determinação da cinética de crescimento, consumo de substratos e produção de enzima. A FES e o cultivo submerso foram comparados, assim como 2 metodologias diferentes de dosagem de biomassa.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral produzir protease com atividade fibrinolítica através do cultivo submerso do fungo *Mucor subtilissimus* UCP1262 em biorreator.

Objetivos específicos:

- Obter perfis de consumo de substratos, crescimento e produção de enzima em cultivos em Erlenmeyers de 250 mL;
- Avaliar o cultivo em biorreatores de 7,5 L e 4,0 L em modo batelada com controle da concentração de O₂ dissolvido no meio e registro da produção de CO₂, em diferentes valores de pH e frequência de agitação, com determinação da cinética de consumo de substratos, crescimento e produção de enzima;
- Comparar as 2 dornas com diferentes volumes utilizadas através da descrição da influência da frequência de agitação e vazão de ar no k_La dos biorreatores.
- Estudar a morfologia do microrganismo e otimizar a produção da enzima nos cultivos em biorreator de 4,0 L através da manipulação das variáveis operacionais pH e agitação.
- Comparar as metodologias de gravimetria (massa seca) e dosagem de ergosterol para a determinação da biomassa do microrganismo.
- Comparar o cultivo submerso produtor da maior atividade fibrinolítica com os dados da fermentação em estado sólido realizada previamente com a mesma cepa do microrganismo e fonte de nitrogênio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

DCVs são um grupo de desordens do coração e dos vasos sanguíneos, incluindo ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais, geralmente eventos agudos e são causados principalmente por um bloqueio que impede o sangue de fluir para o coração ou o cérebro (OMS, 2016). As DCVs são a maior causa para mortalidade global. Uma estimativa de 17,7 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2015. De acordo com a Organização mundial da saúde, vai haver 23,3 milhões de mortes dessas doenças em 2030. Os anticoagulantes, agentes antiplaquetários e agentes trombolíticos são usados para o tratamento e prevenção destas desordens (CHOI; LEE; KIM, 2016).

3.2 ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

A fibrina é formada pela conversão do fibrinogênio solúvel molecular em monômeros de fibrina que polimerizam espontaneamente e criam uma rede de gel de fibrina. Fibrina não só fornece força e estrutura ao coágulo, mas regula a taxa de sua própria formação e destruição. A acumulação de fibrina nos vasos sanguíneos geralmente causa trombose, levando ao infarto do miocárdio e outras doenças cardiovasculares (MINE; KWAN WONG; JIANG, 2005).

Proteases fibrinolíticas são agentes que hidrolisam fibrina, um importante componente de trombo. São encontradas em diversas fontes, no entanto, fontes microbianas têm atraído um alto interesse médico durante as últimas décadas. Os agentes trombolíticos típicos para fins terapêuticos incluem uroquinase e ativador do plasminogênio tecidual (tPA), amplamente utilizados. No entanto, estes agentes têm algumas desvantagens, como alto custo e possibilidade de causar hemorragia interna dentro do trato intestinal quando administrado por via oral (SILVA et al., 2013). Portanto, a obtenção de agentes fibrinolíticos de outras fontes em processos mais baratos é necessária. Atualmente potentes agentes fibrinolíticos estão sendo isolados de fontes alimentícias ou não, produzidos por diversos microrganismos (ARBIND; MANISHA, 2011). Fontes microbianas emergem como uma alternativa

para a terapia trombolítica e são importantes fontes de agentes fibrinolíticos (PENG; YANG; ZHANG, 2005; SALES et al., 2013).

Os agentes fibrinolíticos são diferenciados em três tipos com base nos modos de ação. Alguns agentes convertem o plasminogênio em plasmina e, portanto, são chamados de ativadores de plasminogênio, e alguns agentes são proteases com ação de plasmina, que degradam diretamente o coágulo de fibrina. Outros agentes exibem ambas as ações (KUMAR; KAUR, 2011). A Figura 1 mostra uma representação esquemática da formação do coágulo de fibrina (acima) e da sua degradação por ativadores de plasminogênio (abaixo), reações que acontecem após uma complexa cascata de coagulação onde uma série de reações enzimáticas são ativadas.

Figura 1. Formação da malha de fibrina ao final da cascata de coagulação (acima) e sua dissolução pela ação da plasmina (abaixo), adaptado de MINE; KWAN WONG; JIANG (2005) e de Murray et al. apud. PENG; YANG; ZHANG (2005) e SALES (2015) respectivamente.

3.3 PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS COM ZIGOMICETOS

O *Mucor subtilissimus* é um fungo filamentoso classificado como da divisão dos zigomicetos, subdivisão mucormicotina, ordem mucorales, família mucoraceae e

gênero *Mucor*, gênero esse que possui 576 outras espécies registradas no CBS Fungal Biodiversity Centre, um banco de linhagens situado na Holanda.

O gênero *Mucor* sp. pode ser diferenciado dos outros gêneros da divisão por reunir as características de colônias com crescimento rápido, aspecto de algodão branco/amarelado que se torna cinza escuro com o desenvolvimento dos esporângios (Figura 2), esporângios esféricos de diâmetro entre 60 e 300 µm com esporangióforos bem desenvolvidos. Após a dispersão dos esporos um colarete formado pela parede remanescente do esporângio costuma ser visível ao microscópio. Os esporos são acinzentados e com formato de esférico a elipsoidal.

Figura 2. À esquerda ilustração do esporângio de fungos do gênero *Mucor*. Ao meio antes e à direita depois da dispersão dos esporos. A seta indica o colarete visível após o rompimento do esporângio. (ELLIS, D. et. al. 2007; BENSON, 2001).

A divisão dos zigomicetos é composta por fungos filamentosos saprofíticos naturalmente encontrados no solo, onde há matéria orgânica em apodrecimento. Zigomicetos são capazes de crescer em uma ampla variedade de fontes de carbono em diferentes temperaturas, concentrações de oxigênio e níveis de pH. Eles são amilolíticos e capazes de consumir pentoses como fonte de carbono. Eles são capazes de realizar sacarificação e fermentação em estado sólido de materiais com amido (FERREIRA; LENNARTSSON; EDEBO, 2013). Apresentam hifas cenocíticas (aseptadas) com muitos núcleos haplóides. Esporos assexuais são produzidos por mitose em esporângios encontrados na ponta de hifas aéreas e quando liberados são espalhados pelo vento. A reprodução sexual produz estruturas chamadas de zigósporos, formadas a partir de projeções das hifas de linhagens opostas

(designadas positiva e negativa) que se fundem para ocorrer fusão de núcleos e formação de zigoto diplóide. Os zigósporos são estruturas rígidas, que podem permanecer dormentes no ambiente em caso de condições não propícias ao crescimento. Em condições favoráveis o zigoto passa por meiose e produz um esporângio, que por sua vez libera grande quantidade de novos esporos. Cada esporo liberado, produzido sexualmente ou não, pode germinar para a formação de novo micélio e reiniciar o ciclo reprodutivo (WILLEY, SHERWOOD, WOOLVERTON, 2008). A Figura 3 ilustra o ciclo reprodutivo dos zigomicetos com um representante do gênero *Rhizopus sp.*, que possui morfologia bastante similar ao gênero *Mucor sp.*

Figura 3. Ciclo reprodutivo dos zigomicetos. À esquerda ilustração da reprodução sexuada, menos comum e que requer 2 linhagens opostas de cruzamento (designadas + e -) e à direita ilustração da reprodução assexuada, mais comum (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Fungos da divisão dos zigomicetos tem sido investigados na utilização de diversos tipos de substratos, principalmente biomassas vegetais, muitas delas subprodutos de baixo valor agregado, para a produção de diversos produtos, incluindo metabólitos, biomassa fúngica (para uso direto ou extração de componentes) e enzimas, entre as quais as proteases com atividade fibrinolítica, objeto desse estudo, conforme Figura 4.

Figura 4. Esquema geral do uso de fungos da divisão dos zigomicetos, ilustrando alternativas de biomassa vegetal para uso como substrato e produtos em potencial, entre eles metabólitos, biomassa e enzimas (FERREIRA; LENNARTSSON; EDEBO, 2013).

3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMA FIBRINOLÍTICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como processos com cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte) onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está num nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação com a matriz sólida (BIANCHI, MORAES e CAPALBO, 2001), a partir do que seria uma fermentação semi-sólida ou ainda submersa.

NASCIMENTO; SALES (2015) realizaram fermentação em estado sólido de *M. subtilissimus* SIS42 (UCP 1262) isolado do solo da caatinga do estado de Pernambuco com o objetivo de produzir protease com atividade fibrinolítica. Os cultivos em estado sólido foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL em estufa, sem agitação e por 72 horas. Foram utilizados diversos substratos com

variação na quantidade de substrato, temperatura e umidade, em um planejamento experimental fatorial completo 2³. Após os cultivos houve a extração das enzimas com a adição de tampão fosfato e agitação em incubador rotativo. A maior concentração de atividade fibrinolítica (144,58 U/mL) foi obtida com 3 g de farelo de trigo, umidade de 50% e temperatura de 25°C. A enzima foi identificada como uma serina-protease.

3.5 PRODUÇÃO POR CULTIVO SUBMERSO

Cultivo submerso é um processo em que o crescimento de microrganismos ocorre em meio de cultura líquido (DORIYA et al., 2016). Normalmente existem sistemas de agitação, controle de O₂ dissolvido (OD), controle de temperatura e pH e registro das variáveis. Cultivo submerso é o sistema empregado industrialmente para a produção de uma variedade de metabólitos de enorme importância social e econômica produzida por fungos filamentosos (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000).

A espécie dimórfica *Mucor circinelloides* foi investigada por LÜBBEHÜSEN; NIELSEN; MCINTYRE (2004) como potencial hospedeiro para a produção de proteína heteróloga com o objetivo de minimizar ou eliminar o sub-produto etanol. Os cultivos foram realizados em erlenmeyers em incubador agitado, com meio Vogel com diferentes fontes de carbono, com inóculo em concentração de 5×10^5 esporos/mL, a 25°C e 200 rpm; e em biorreator com volume útil de 1,5 L, com pH controlado em 5,0 pela adição de NaOH, a 28°C, agitação 300 rpm com aumento gradual para 700 rpm e vazão de ar de 0 vvm (vazão volumétrica de gás, ou seja, volume de gás/(volume de meio x minuto)) com aumento gradual para 1,0 vvm. Os perfis de biomassa, fontes de carbono e etanol para a condição de fonte de carbono composta por 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose estão na Figura 5. Foram atingidas concentrações de 14 g/L de biomassa e com 30 horas as fontes de carbono já haviam sido esgotadas.

Figura 5. Cultivo de *M. circinelloides* em cultivo submerso aeróbico em biorreator de 1,5 L com meio Vogel com glicose e xilose como fontes de carbono. BM: biomassa (LÜBBEHÜSEN; NIELSEN; MCINTYRE, 2004).

YEGIN et al. (2013) investigaram as condições de cultivo submerso de *Mucor mucedo* DSM 809 para explorar a produção de enzimas coaguladoras de leite e obter melhor entendimento da biologia do microrganismo. Os cultivos foram realizados inicialmente em frascos erlenmeyer de 250 mL com 30 mL de meio agitados a 220 rpm, em temperatura de 24°C, com concentração inicial de esporos de 2×10^4 esporos/mL, por um tempo de 5 dias, em meio contendo 1% de glicose e 0,5% de caseína. Foram testados os efeitos de diferentes condições de cultivo sobre a concentração de atividade coaguladora de leite (MCA, na sigla em inglês) produzida, expressa em Unidades Soxhlet (SU, na sigla em inglês). A combinação que trouxe maior produção de MCA (130 SU, *soxhlet units*, para todos os casos) foi a de pH 4,50, concentração de inóculo de 2×10^4 esporos/mL, frequência de agitação de 220 rpm, glicose como fonte de carbono e caseína a 0,5% como fonte de nitrogênio. A produção de MCA diminuiu 50% com o aumento da agitação de 220 para 350 rpm e foi levantada a hipótese de o estresse de cisalhamento ter danificando a integridade da biomassa.

AYHAN; ÇELEBI; TANYOLAC (2001) estudaram o efeito de 5 parâmetros independentes na produção de proteases com atividade coagulante de leite (MCA) por cultivo de *Mucor milhei* ATCC 3420. Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL com 75 mL de meio, com agitação em incubador rotativo, por um tempo de aproximadamente 7,5 dias, em modo de operação batelada e em meio

com glicose como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Cada um de 5 parâmetros teve 5 níveis especificados, de modo que uma combinação de pontos fatoriais, centrais e axiais foram contemplados. Os parâmetros e seus intervalos testados foram concentração inicial de glicose (5,0 a 40 g/L), pH inicial (4,0 a 8,0), temperatura (20 a 45°C), frequência de agitação (60 a 130 rpm) e concentração inicial de esporos (1,0 a 15%), determinados de acordo com um planejamento experimental Box-Wilson. A atividade de coagulação de leite (MCA) média mais alta obtida foi de 2.286 SU/mL com concentração de glicose inicial de 29,6 g/L, pH inicial de 6,8, temperatura de 37,6°C, frequência de agitação de 81 rpm e concentração de inóculo de 5,2%, condições consideradas ótimas. Uma amostra não concentrada do cultivo otimizado retirada no momento de maior MCA foi analisada e comparada ao preparado enzimático (renina) comercial utilizado na produção industrial de queijos. Os resultados mostram que, apesar de a atividade coaguladora de leite obtida (2.284 SU/mL) ser cerca de 5 vezes menor do que a comercial (11.576 SU/mL), a atividade específica obtida (3.062 SU/mg) é maior do que a comercial (2.816 SU/mg) e, após concentração, pode ser uma boa alternativa para o uso industrial.

NADIA et al. (2010) investigaram as condições de cultivo submerso de *Mucor racemosus* com o objetivo de determinar parâmetros ótimos para a produção de lipase extracelular. Foram realizados cultivos em frascos erlenmeyers de 250 mL com volume de meio de 50 mL, temperatura de 30°C, pH inicial de 6,6 e agitados em 200 rpm para a seleção de 1 dentre 5 composições de meios de cultura diferentes. A maior produção (337,6 U/mL e 7,3 U/mg de proteína) foi obtida com meio de cultura com a seguinte composição: peptona (3,0%), KH_2PO_4 (0,2%), KCl (0,05%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), mistura de glicose e azeite de oliva 1:1 (1%). Foram testados, com o meio selecionado, diferentes níveis para os parâmetros do cultivo em incubador rotativo. As melhores condições foram concentração inicial de esporos de $8,75 \times 10^7$ esporos/mL, temperatura de 35°C, pH inicial em 7,0 com uso do tampão fosfato 0,2 M, mistura 1:1 de glicose com azeite de oliva a 2% no meio de cultura, peptona como melhor fonte de nitrogênio. Foi realizado cultivo de 3,5 L em biorreator reproduzindo as melhores condições encontradas em erlenmeyers. A frequência de agitação foi mantida constante durante o cultivo em 300 rpm e a vazão de aeração em 3,5 L/min (1 vvm). Os dados obtidos estão plotados no gráfico da Figura 6. Embora a glicose tenha atingido rapidamente níveis baixos (0,37 g/L em 12 horas),

houve um aumento inicial da biomassa, que atingiu aproximadamente 23 g/L em 24 horas, e uma alta produção de enzima, que atingiu a concentração de atividade de 1.211 U/mL e a atividade específica de 28,0 U/mg de proteína em 48 horas. Essa concentração de atividade é 90% maior do que a maior obtida com os cultivos em frascos agitados (635,7 U/mL), o que pode ser explicado pelo controle de variáveis importantes, como a aeração e pH, permitido pelo biorreator.

Figura 6. Produção de lipase por *M. recemosus* em biorreator de 5 L do tipo tanque agitado (NADIA et al., 2010).

SALES et al. (2013) realizaram cultivos submersos do fungo *M. subtilissimus* SIS 42 (UCP1262) com o objetivo de produzir enzima com atividade fibrinolítica. A manutenção da cepa foi feita por subcultivo a cada 7 dias em meio sólido Czapek Dox Agar (Himedia), utilizado para o cultivo de fungos em geral, e mantidos em temperatura de 30°C. Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio, pH inicial de 7,0, frequência de agitação de 120 rpm e por um tempo de 96 horas. Foram testados como fonte de nitrogênio farelo de trigo e farinha de soja em diferentes concentrações iniciais (10 a 30 g/L) no meio e também foram testadas diferentes concentrações de cloreto de cálcio (0 a 10 g/L), em um planejamento fatorial 2³. A melhor condição para produção de enzima encontrada foi das concentrações de 10 g/L de farelo de trigo e 10 g/L de CaCl₂.

3.6 COMPARAÇÃO CULTIVO SÓLIDO X SUBMERSO

O cultivo submerso continua sendo o principal sistema de geração de bioprodutos obtidos por cultivo de células, sendo pouco significativo o número de empresas que empregam a FES para estes fins (BIANCHI, MORAES, CAPALBO, 2001). Aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por cultivo submerso, frequentemente usando microrganismos otimizados e geneticamente manipulados (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

Em comparação com a FES, o cultivo submerso conta com as vantagens de maior variedade e disponibilidade de equipamentos usados para desenvolvimento do processo e produção do produto em escala industrial, mão-de-obra já treinada em processos similares, escalonamento para a escala de produção com referencial teórico mais consolidado e trabalhos experimentais publicados em maior quantidade entre outras vantagens, o que faz com que uma possível transferência para a indústria possa ser mais bem sucedida e com que o processo possa ser mais econômico globalmente. O Quadro 1 apresenta vantagens e desvantagens dos dois tipos de cultivo.

Quadro 1. Comparação entre a FES e o cultivo submerso para a produção de enzimas adaptado de DORIYA et al. (2016).

Vantagens do Cultivo Submerso	Desvantagens do Cultivo Submerso
Melhor monitoramento e controle do ambiente do microrganismo	Requer meio de cultura mais processado/caro
Melhor transferência de massa e calor	Pode gerar agregação excessiva em microrganismos que se diferenciam
Disponibilidade de equipamentos comerciais	Pode gerar enzima com menor estabilidade
Mais facilmente escalonável	Operação mais complexa

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados 2 cultivos submersos em frascos agitados e 12 em biorreator. A Figura 7 apresenta um esquema geral dos procedimentos experimentais.

Figura 7. Esquema geral dos procedimentos experimentais.

4.1 CEPA

Foi utilizada a cepa UCP1262 do fungo filamentoso *Mucor subtilissimus* estocada no banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco. Esta cepa foi isolada do solo da Caatinga do estado de Pernambuco, no município de Serra Talhada, e gentilmente cedida pela Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto da UFRPE/UFPE.

4.2 MEIOS DE CULTURA

A manutenção da cepa é feita com o uso do meio sólido Czapek Dox Agar, do fabricante Himedia, utilizado para o cultivo de fungos em geral. Sua composição está no Quadro 2. O meio foi esterilizado por autoclavação a 121°C por 20 minutos e tem pH de 7,3 a 25°C.

Quadro 2. Composição do meio sólido Czapek Dox Agar utilizado na manutenção da cepa (Himedia, 2011).

Função	Componente	Concentração (g/L)
Fonte de carbono	Sacarose	30,0
Fonte de nitrogênio	NaNO ₃	2,00
Sais	MgSO ₄	0,50
	K ₂ HPO ₄	1,00
	KCl	0,50
	FeSO ₄	0,010
Gel	Agar	15,0

Para os cultivos submersos realizados em frascos erlenmeyer e em biorreator, foi utilizado o meio MS-2 desenvolvido por PORTO; CAMPOS-TAKAKI; LIMA FILHO (1996) e modificado por SALES et al. (2013). A composição se encontra no Quadro 3.

Quadro 3. Composição e soluções da preparação do meio MS-2 modificado por Sales (2013) utilizado nos cultivos submersos.

Função	Componente	Concentração final (g/L)	Solução
Fonte de carbono	Glicose	10,0	IV
Fonte de nitrogênio	Proteína de cozido de farelo de trigo	0,8	I
Sais	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,60	III
	NH ₄ Cl	1,00	
	K ₂ HPO ₄	4,35	II
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,001	
	ZnSO ₄ .H ₂ O	0,001	
	CaCl ₂	10,0	V

O farelo de trigo foi adquirido no Mercado de São José, Recife-PE, peneirado em peneiras com abertura de 2,0 e 0,6 mm sucessivamente (sendo então descartadas as partículas maiores de 0,6 mm) e armazenado congelado até o uso. Os componentes do meio MS-2 foram diluídos separadamente nas partes I a V em água e esterilizados por autoclavação a 121°C por 20 minutos. No caso de uma das condições testadas no cultivo 1 os componentes foram diluídos em tampão PBS 245 mM (pH 7,0). A solução I (farelo de trigo) passou pelo procedimento adicional de decantação, filtração a vácuo em papel Prolab de 65 g/m² (cód. 3034-8) cortado em discos de 12,5 cm de diâmetro e funil de Buchner e o filtrado foi novamente autoclavado nas mesmas condições. As partes foram então misturadas com esterilidade em cabine de fluxo unidirecional e o pH foi ajustado para 7,0 com o uso de soluções NaOH de 1,0 a 6,0 M.

4.3 MANUTENÇÃO DA CEPA

A cepa de *M. subtilissimus* foi retirada de um banco de cepas armazenadas em óleo mineral e/ou liofilizadas e mantida através de subcultivos em superfície no meio sólido (item 4.2) colocado em volume de 50 mL por frasco Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram mantidos em estufa a 30°C por 7 dias, tempo em que micélio e esporos se formaram. Parte da biomassa foi então retirada com o auxílio de uma alça de platina e transferida para frascos estéreis com meio novo, reiniciando o ciclo.

4.4 OBTENÇÃO DE PRÉ-INÓCULO

Os esporos, obtidos nas mesmas condições da manutenção da cepa, foram suspensos através do jateamento do micélio com aproximadamente 10 mL da solução para suspensão de esporos e com o auxílio de micropipeta. Foram então contados em câmara de Neubauer para determinação da concentração.

A composição da solução para suspensão de esporos está no Quadro 4. Esta solução foi esterilizada por autoclavação a 121°C e 1 atm por 20 minutos antes da utilização.

Quadro 4. Composição da solução para a suspensão de esporos.

Função	Componente	Concentração (g/L)
Detergente	Tween 80	0,10
Sal	NaCl	8,77

4.5 EXPERIMENTOS

Os experimentos (Quadro 5) foram divididos em 3 etapas de acordo com o equipamento utilizado para os cultivos:

- Etapa 1 (cultivos 1 e 2): frascos erlenmeyer de 250 mL com volume de trabalho de 100 mL e sob agitação em agitador orbital;
- Etapa 2 (cultivos 3 a 6): biorreator do fabricante Tecnal, modelo Biotec, com dorna de 7,5 L, volume de meio de 5,0 L, impelidor com 2 turbinas de Rushton; 4 chicanas, controles de pH, temperatura e O_2 dissolvido e operado em modo batelada (Figura 8);
- Etapa 3 (cultivos 7 a 14): Biorreator do fabricante New Brunswick Scientific, modelo Bioflo III, com dorna de 4,0 L, volume de meio de 2,5 L, impelidor com 2 turbinas de Rushton, 4 chicanas, controles de pH, temperatura e O_2 dissolvido, dosagem de CO_2 no gás de exaustão (cultivo 14) e operado em modo batelada (Figura 9). Os cultivos 7, 8, 10 e 12 contaram com o software controlador Flostat e fluxômetros, que alteraram automaticamente a proporção ar/O_2 no gás de entrada para a manutenção do oxigênio dissolvido (OD) no valor ajustado.

O cultivo 2 foi realizado em erlenmeyers com parede interna siliconizada através da aplicação de diclorodimetilsilano seguida de escorrimento/secagem em estufa a 60°C por 5 horas e enxágue com água, com o intuito de minimizar a adesão de biomassa na parede interna do frasco. A dorna utilizada no cultivo 4 passou pelo mesmo procedimento antes do cultivo, com siliconização da metade direita da dorna e das 2 chicanas desse lado.

Os frascos e a dorna do biorreator foram esterilizados por autoclavação a 121°C e 1 atm por 40 minutos. No caso do biorreator, o sensor de pH foi ajustado antes da autoclavação da dorna. Após a autoclavação, o sensor de O_2 dissolvido

(OD) foi polarizado por no mínimo 6 horas pelo controlador, o meio de cultura foi adicionado, estabilizado na temperatura de 30 °C e saturado com O₂ através do borbulhamento com ar sob agitação para calibração do 100% do sensor de oxigênio dissolvido (OD).

Cultivos	Etapa	1		2				3							
	N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Inóculo	Volume do erlenmeyer e do meio (mL)	250 e 100		–	250 e 100		250 e 100								
	Frequência de agitação (rpm)	120			120		120								
	Concentração inicial de esporos (esporos/mL)	1,0E+04			1,0E+04		1,0E+04								
	Temperatura (°C)	30			30		30							37	
	Tempo de cultivo (h)	72,0	111,4		49,3	49,7	51,6	55,5	55,5	50,4	50,4	49,0	49,0	50,3	
Biorreator	Fabricante e volumes da dorna e de meio (L)	–	Tecnal 7,5 L - 5,0 L				NBS 4,0 L - 2,5 L								
	1,0E+04		–		–										
	–		200 (4)	400 (8)	100 (4)	200 (8)									
	30				30							37			
	7,0		5,5	6,5	4,5	5,5	5,5	4,5	6,5	4,5	6,5	6,5			
	50 a 350		200 a 250	175	250	175	350	350	175	525	525	175	250		
	30		70			70									
	0 a 6,0 (0 a 1,2)		0 a 10 (0 a 2)	0 a 6,8 (0 a 1,4)	0 a 4,8 (0 a 0,96)	1,25 (0,5)	1,0 (0,4)								
	Proporção O2/ar (%)		0		Variável (controlador)		Variável (controlador)		Variável (manual)						

Quadro 5. Características dos cultivos e condições experimentais utilizadas. Na etapa 2 foram realizados cultivos em biorreator Tecnal Biotec de 7,5 L e na etapa 2 em biorreator NBS Bioflo III de 4,0 L. Em negrito destaque para o planejamento experimental 3² fracionado combinando 3 níveis de agitação e 3 níveis de pH realizado dentro da etapa 3.

Figura 8. Biorreator Tecnal Biotec com dorna de 7,5 L. À esquerda controlador com interface homem-máquina (IHM) e balança analítica para monitoramento do consumo de solução básica. À direita banho termostatzado e bomba de vácuo usada na filtração das amostras para gravimetria.

Figura 9. Biorreator NBS Bioflo III com dorna de 4,0 L. Na parte superior fluxômetro utilizado para as misturas O_2 /ar e à direita balança para monitoramento do consumo de NaOH 1,0 M e HCl 1,0 M.

Frascos erlenmeyer estéreis, meio estéril e suspensão de esporos foram colocados em cabine de fluxo unidirecional estéril. O meio foi inoculado com volume da suspensão de esporos calculado para que a concentração inicial fosse de $1,0 \times 10^4$ esporos/mL. O meio inoculado foi homogeneizado e então distribuído nos frascos. Os frascos foram tampados com tampão de algodão e gaze para que trocas gasosas com o ambiente pudessem ocorrer e foram colocados em agitador orbital em temperatura e frequência de agitação de acordo com o planejamento experimental (item 4.8).

Uma vez preparado como descrito no item 4.4, o biorreator teve suas condições operacionais verificadas, recebeu o inóculo (esporos nos cultivos 3 e 4 e forma vegetativa nos demais cultivos) através de uma conexão asséptica feita com o uso de chama e o registro dos valores das variáveis monitoradas foi iniciado, com registros a cada 20 segundos (biorreator Tecnal) e a cada 1 minuto (biorreator NBS).

4.6 ANÁLISES

O processamento das amostras e as análises pelas quais elas passaram estão esquematizadas na Figura 10.

Figura 10. Processamento das amostras dos cultivos com volumes a serem utilizados nas análises. A centrifugação foi eliminada durante os cultivos ao se perceber a não formação de pellet repetidas vezes.

O volume de amostra foi de 100 mL em ambos os casos de cultivo em Incubador rotativo e em biorreator. Excepcionalmente foram retiradas amostras em volume menor para dosagens que não incluíram a determinação de massa seca. O sobrenadante da centrifugação foi congelado em tubos Eppendorf para armazenamento e posterior realização das determinações dele provenientes.

4.6.1. Determinação da concentração de biomassa

Foi realizada pela metodologia de gravimetria (massa seca) nas amostras dos cultivos 1 a 6. Considerando as possíveis variações morfológicas dos fungos filamentosos (grumos e pellets), foi escolhido o volume de 100 mL para que as amostras fossem representativas o suficiente. A amostra foi filtrada a vácuo em papel filtro qualitativo Unifil de 12,5 cm de diâmetro e 80 g/m² (cód. 501.012) em funil de Buchner. Os filtros foram previamente secos em forno micro-ondas a 320 W por 10 min, esfriados em dessecador e pesados. Após a filtração, o filtrado foi retirado para separação em alíquotas e congelamento para posterior determinação de metabólitos. Os sólidos retidos (biomassa) foram lavados com água destilada para retirada dos sais (somente cultivos 3 e 4), secos em forno micro-ondas em potências de 320 a 960 W por tempos de 15 a 40 min até massa constante (variação menor do que 2% entre as secagens), esfriados em dessecador e pesados. A metodologia de secagem em forno micro-ondas foi adaptada de BUONO; ERICKSON (1985) A diferença entre as massas foi dividida pelo volume da amostra para a obtenção da concentração.

Nas amostras dos cultivos 7 a 14 a concentração de biomassa foi estimada pela metodologia de dosagem de ergosterol (Carvalho et al., 2006) em colaboração com Lúcia de Almeida Muardian e Elias da Silva Araújo do Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. A 2 mL de amostra foram adicionados 4 mL de etanol e 2 mL de NaOH 2,0 M. A suspensão foi incubada a 70°C por 30 min com agitação a cada 10 min. Foram adicionados 4 mL de HCl 1,0 M e o frasco foi agitado. Foram adicionados 2 mL de KHCO₃ 1,0 M e 4 mL de n-hexano e o frasco foi agitado. A suspensão foi centrifugada a 3.000 g por 10 minutos para separação das fases pesada e leve, essa última coletada em tubo de ensaio de vidro. Foram realizadas mais 2 lavagens

com 4 mL de n-hexano. A fase leve foi evaporada com o uso de gás N₂ comprimido (Evaporador Reacti-Vap TS-18826, Thermo Scientific) até secagem completa. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de metanol e o tubo de ensaio foi agitado para suspensão. Nas amostras do cultivo 14 esta suspensão foi feita submergindo parte dos tubos em sonicator Ciencor USC-2500 de 5,7 L com frequência ultrasônica de 40 kHz e em temperatura ambiente. A quantificação foi realizada em HPLC com coluna C18 (Merck LiChroCART 250-4) em detector UV com comprimento de onda de 282 nm e fluxo de 1,0 mL/min da mistura acetonitrila/metanol (80:20) como fase móvel.

4.6.2. Observação da morfologia

Uma pequena parte da amostra, antes de seguir para a filtração descrita no item anterior, foi retirada e colocada em câmara de Neubauer para visualização, na etapa 1 em microscópio ótico Nikon Eclipse E200 e na etapa 2 em microscópio Olympus BH-2, ambos em aumento de 400x. Fotos e vídeos foram feitos com câmera de celular para monitoramento do aspecto microscópico do cultivo e detecção de possíveis contaminações.

4.6.3. Determinação da concentração de glicose

Foi realizada em triplicata com o uso do kit de determinação Glicose Liquiform (ref. 133) do fabricante Labtest, que utiliza o método colorimétrico das enzimas glucose oxidase (GOD)/peroxidase (POD), de acordo com as reações a seguir:

A enzima glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose produzindo ácido glucônico + H₂O₂. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra e em um padrão. Após 10 min de reação a 37°C as soluções têm suas absorbâncias em comprimento de onda de 505

nm determinadas. A razão entre a absorbância da amostra e do padrão é igual à razão da concentração de glicose na amostra e no padrão (em g/L). Foram utilizados os espectrofotômetros Bel Photonics SP 2000 UV e Quimis Q898U2M5.

4.6.4. Determinação da concentração de proteínas

Foi realizada em triplicata com a utilização em microplacas de 96 poços do kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit, (MINE; KWAN WONG; JIANG, 2005; THERMO SCIENTIFIC, 2013), baseado no método do ácido bicinconínico (BCA) de KUMAR; KAUR (2011) e SMITH et al. (1985) para detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais. Esse método combina a redução de Cu^{+2} para Cu^+ por proteína em meio alcalino (reação de Biuret) com a detecção colorimétrica dos cátions Cu^+ com o uso de reagente com BCA. Duas moléculas de BCA são queladas por cada íon Cu^+ , o que gera um composto de cor roxa solúvel em água e com forte absorbância a 562 nm, em uma reação que ocorre por 30 min a 37°C. Essa absorbância é aproximadamente linear com a concentração de proteína dentro da faixa de 20 a 2.000 mg/L. A curva padrão é feita com proteína sérica bovina (BSA, na sigla em inglês) em diluições seriadas conhecidas determinadas juntamente com as amostras. As leituras de absorbância foram feitas nos leitores de microplaca Biorad iMark™ e BioTek Synergy H1.

4.6.5. Determinação da atividade fibrinolítica

Foi determinada em triplicata pelo método de GERMANO et al., 2003 e WANG; WU; LIANG (2011). Nesse método, 0,5 mL de uma solução de fibrinogênio a 0,576% em uma mistura em proporção 4:1 de tampão Tris-HCl-NaCl 150 mM (pH 7,75) e tampão PBS 245 mM (pH 7,0) é colocada em um tubo Eppendorf. 100 µL de solução de trombina a 20 U/mL são adicionados e a mistura é incubada a 37°C por 10 minutos, após o que ocorre a solidificação. Então 0,1 mL do sobrenadante de amostra do cultivo após centrifugação é adicionado e a incubação é continuada a 37°C. A solução é novamente misturada após 20 e 40 minutos. Em 60 minutos, 0,7 mL de ácido tricloroacético a 0,2 M é adicionado e misturado, o que diminui o pH e para a reação. A mistura é centrifugada a 15.000 g por 15 minutos. Então 1 mL do sobrenadante é coletado e a absorbância em comprimento de onda de 275 nm

medida. Uma unidade (unidade de degradação de fibrina, UF) de atividade enzimática é definida como um aumento da 0,01 unidade de absorbância da mistura de por minuto. Foram utilizados os espectrofotômetros GE Ultrospec 7000 e Quimis Q898U2M5.

4.6.6. Cálculo da taxa específica de crescimento

O cálculo da taxa máxima específica de crescimento (μ_{Xmax}) foi realizado a partir dos dados de biomassa, glicose e CO_2 produzido.

A) A partir da Concentração de biomassa (somente cultivo 14)

A equação 1 é a equação geral do balanço de massa para o crescimento celular em cultivos descontínuos (modo de operação batelada), onde X é a concentração de células, t é o tempo e μ_X é a taxa específica de crescimento. Nela o termo à esquerda representa o acúmulo de células dentro da dorna do biorreator e o à direita representa o crescimento. A equação 1 quando integrada (considerando μ_X constante) gera a equação 2

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X X \quad \rightarrow \quad \int_{X_i}^X \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^t \mu_X dt \quad (1)$$

$$\ln \frac{X}{X_i} = \mu_X (t - t_i) \quad (2)$$

A equação 2 evidencia que o coeficiente angular da reta ajustada aos dados de $\ln$ da concentração de biomassa pelo tempo (durante a fase exponencial) é o valor de μ_{Xmax} .

B) A partir do consumo de glicose

Considerando que na fase exponencial de crescimento (a) o μ_X é aproximadamente constante e em seu valor máximo (podendo então ser denominado μ_{Xmax}) devido às condições não limitantes e que (b) o rendimento de biomassa/glicose é aproximadamente constante devido ao fato de que a quase totalidade da glicose está sendo usada para o crescimento, ele foi obtido através do ajuste de uma reta ao gráfico de $\ln$ da concentração de glicose consumida pelo

tempo. Na equação 3 $Y_{X/S}$ é o rendimento de biomassa por substrato e X_0 e S_0 a concentração de respectivamente biomassa e substrato no início da fase exponencial. Podemos rearranjar a equação e aplicar o Ln para obter a equação 4.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

$$\ln (S_0 - S) = \ln (X - X_0) - \ln Y_{X/S} \quad (4)$$

Derivando com relação ao tempo obtemos a equação 5. Considerando que $Y_{X/S}$ é constante na fase exponencial e utilizando a regra da cadeia, obtemos a equação 6. Considerando que $X \gg X_0$ podemos considerar a diferença $X - X_0$ como sendo igual a X e obter a equação 7.

$$\frac{d \ln (S_0 - S)}{dt} = \frac{d \ln (X - X_0)}{dt} - \frac{d \ln (Y_{X/S})}{dt} \quad (5)$$

$$\frac{d \ln (S_0 - S)}{dt} = \frac{1}{X - X_0} \frac{d (X - X_0)}{dt} \quad (6)$$

$$\frac{d \ln (S_0 - S)}{dt} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{Xmax} \quad (7)$$

Desse modo o valor de μ_{Xmax} será o coeficiente angular de uma reta ajusta aos dados de $\ln (S_0 - S)$ com o tempo durante a fase exponencial. Esta estimativa de μ_{Xmax} a partir do consumo do substrato é apenas uma aproximação do valor verdadeiro de μ_{Xmax} , com restrições quando X é próximo a X_0 e aumento da precisão a medida que X se torna bem maior que X_0 . É um recurso em meio à ausência de medidas confiáveis de concentração celular.

C) A partir da produção de CO_2

No cultivo 14 o μ_{Xmax} foi calculado também através da produção de CO_2 , quantificada pelo analisador de gases Yieldmaster (BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Alemanha), acoplado à linha de gás de exaustão do biorreator. A equação 8 é proveniente do balanço de massa de CO_2 entre o gás de entrada e o gás de saída

e define a taxa de produção de CO₂ (CER, da sigla em inglês para taxa de evolução de carbono), onde ϕ_s e ϕ_e são as vazões molares de entrada e saída de gases respectivamente e y_{CO_2s} e y_{CO_2e} são as frações molares de gás CO₂ na saída e entrada de gases respectivamente.

$$CER = \frac{\phi_s y_{CO_2s} - \phi_e y_{CO_2e}}{V} \quad (8)$$

A equação 9 define o quociente respiratório (RQ, na sigla em inglês para quociente respiratório), onde OUR é a sigla em inglês para taxa de consumo de oxigênio.

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (9)$$

Considerando que na fase log de crescimento RQ é aproximadamente constante e com valor próximo à unidade, as vazões molares de entrada e saída de gases tornam-se quase idênticas e a equação 8 pode ser simplificada para a equação 10, que evidencia que o CER é proporcional (segundo a constante arbitrária k) à variação da fração molar de CO₂ entre os gases de entrada e exaustão.

$$CER = k (\Delta y_{CO_2}) \quad (10)$$

O CER pode ser calculado também pela equação 11, onde q_{CO_2} é a velocidade específica de produção de CO₂

$$CER = q_{CO_2} X \quad (11)$$

Considerando que q_{CO_2} é aproximadamente constante na fase log e igualando as equações podemos obter as equações 12 e 13, que evidenciam que a concentração celular X é proporcional à variação da fração mássica de CO₂ entre os gases de entrada e exaustão, usando uma outra constante arbitrária k'.

$$CER = k (\Delta y_{CO_2}) = q_{CO_2} X \quad (12)$$

$$X = k' \Delta y_{CO_2} \quad (13)$$

Aplicando-se o logarítmo na equação 13 podemos obter a equação 14, que ao ser derivada em relação do tempo (e considerando que a derivada de uma constante é zero) gera a equação 15.

$$\ln X = \ln k' + \ln (\Delta y_{CO_2}) \quad (14)$$

$$\frac{d \ln X}{dt} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{Xmax} = \frac{\ln (\Delta y_{CO_2})}{dt} \quad (15)$$

Desse modo o valor de μ_{Xmax} será o coeficiente angular de uma reta ajusta aos dados de $\ln (\Delta y_{CO_2})$ com o tempo durante a fase exponencial.

4.6.7. Cálculo do $k_L a$

A equação 16 representa a transferência de oxigênio do ar de uma bolha para o líquido em uma dorna aerada livre de células, onde C é a concentração de O_2 dissolvida no meio líquido, C^* é a concentração de saturação de O_2 , t é o tempo, k_L é o coeficiente de transferência de massa na fase líquida e a é a área da interface gás/líquido por volume. O termo $k_L a$ é o coeficiente volumétrico de transferência de O_2 , com unidade de tempo⁻¹.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (16)$$

O $k_L a$ é dependente da geometria e de condições operacionais de uma dorna e é usado como medida da capacidade de oxigenação, sendo determinado experimentalmente. Para determinação do $k_L a$ nas dornas utilizadas foi empregado o método estático de Wise (1951) apud STANBURY; WHITAKER; HALL (1999). Nele o O_2 dissolvido (OD) é removido por borbulhamento com gás nitrogênio, a dorna é colocada de maneira repentina nas condições de aeração e agitação do ponto experimental e o aumento no OD é registrado pelo sensor de O_2 . Através da integração da equação 16 obtemos a equação 17, que demonstra que ao se plotar um gráfico de $\ln (C^* - C)$ com relação ao tempo e ajustar uma reta, o coeficiente angular será $-k_L a$. O OD é monitorado pelo sensor em percentual da concentração de saturação de O_2 com ar no meio, suficiente para a obtenção das taxas de transferência.

$$\ln (C^* - C) = -k_L a t \quad (17)$$

Para a determinação do k_{La} , o tempo de resposta do sensor de OD, $t_{(63)}$, definido como o tempo necessário para registro de 63% de uma mudança repentina, deve ser muito menor do que o tempo entre o início do decaimento do OD até o $t_{(63)}$ (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1999). O tempo de resposta dos sensores de O_2 foi determinado com a mudança do sensor de uma condição estável de água saturada com O_2 para o gel de zeragem 341001032 (Mettler-Toledo International Inc., Columbus, EUA), que garantiu a mudança repentina para uma condição de ausência total de O_2 . O t_{63} foi calculado então através da obtenção do coeficiente angular de uma reta ajustada aos dados plotados de $\ln OD$ pelo tempo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1 - Cultivos em frascos agitados

Nos cultivos da etapa 1 a melhor condição encontrada por SALES et al. (2013) foi reproduzida. Foram utilizadas a mesma cepa e o mesmo meio MS-2 desenvolvido por PORTO; CAMPOS-TAKAKI; LIMA FILHO (1996) com modificações nas fontes de nitrogênio e concentrações de CaCl_2 que os autores utilizaram. O objetivo destes ensaios em erlenmeyers foi o de descrever a cinética de consumo de substratos e produção de biomassa e enzima ao longo do tempo do cultivo através de amostragens regulares ao longo do cultivo, dados não disponíveis. No cultivo 1 foram preparados de maneira idêntica 17 frascos erlenmeyers. No cultivo 2 foram preparados 11 frascos sendo 3 deles previamente siliconizados. Em cada amostragem 1 frasco foi tomado como amostra, com o uso de todo o seu conteúdo para que houvesse amostra suficiente para dosagem da biomassa pela metodologia de gravimetria. Algumas amostras foram tomadas em duplicata para verificação da hipótese de que em todos os frascos o mesmo cultivo foi reproduzido. A concentração inicial de esporos foi de $1,0 \times 10^4$ por mL, sendo o meio inoculado e misturado antes da distribuição nos frascos, de modo a garantir a homogeneidade de concentração entre os frascos.

5.1.1. Cultivo 1

O cultivo 1 foi realizado com erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio inoculados com $1,0 \times 10^4$ esporos/mL, sob agitação de 250 rpm e temperatura de 30°C. As variáveis determinadas a partir das amostras estão no gráfico da Figura 11. As barras de erro plotadas neste e nos demais gráficos correspondem a um intervalo de dois desvios padrões calculados a partir dos valores das réplicas (duplicatas ou triplicatas) das dosagens para uma mesma amostra.

Figura 11. Perfis de glicose, proteína total, biomassa, atividade e pH do cultivo 1 (30°C, 120 rpm e concentração inicial de esporos $1,0 \times 10^4$). O valor de glicose obtido em 28 horas foi considerado aberrante e foi, portanto, retirado da curva que liga os pontos experimentais. A amostra do tempo 44,3 h foi tomada em duplicada e os valores plotados são as médias dos valores obtidos para cada variável.

Diferentemente do planejado, o pH inicial não ficou em 7,0. Mesmo com o ajuste de pH feito na solução I do meio de cultura logo após a primeira autoclavação, resfriamento e filtração, a segunda autoclavação desta parte e a mistura com as outras 4 soluções fez o pH inicial do meio final mudar para 5,13. Observa-se uma queda gradual do pH até 52 h, quando o valor mínimo foi atingido, após o que o pH voltou a subir, terminando em 4,21.

Mesmo com essa mudança no pH inicial do cultivo, houve visível crescimento de biomassa, como mostrado na Figura 12. Equivocadamente não foi tomada a amostra 0 para dosagem das diferentes variáveis. Diferentemente do esperado, não foi obtida curva de crescimento composta pelas fases lag, exponencial e estacionária. Houve queda gradual de 4,8 a 3,1 g/L do tempo 12,8 ao tempo 36,2 h, seguida de aumento para 4,7 g/L até o tempo 52,0 h o que evidencia que houve problema na metodologia de gravimetria utilizada. Em praticamente todos os cultivos em que a metodologia da gravimetria foi utilizada (1 a 6), a medida de biomassa por gravimetria mostrou-se inadequada, provavelmente pela retenção de constituintes do meio de cultura na membrana filtrante.

Figura 12. Aspecto do cultivo 1 ao seu final, com 72,0 h, evidenciando o crescimento e adesão de biomassa à parede do frasco.

Houve um aumento da concentração de atividade fibrinolítica de valores próximos a 0,4 U/mL do início do cultivo até 2,1 U/mL. A glicose diminuiu dos 10 g/L iniciais presentes no meio para 2,9 g/L na última amostra às 52,0 h, o que mostra que nessas condições um cultivo mais longo levaria ao melhor aproveitamento da glicose disponível e possivelmente a concentrações maiores de atividade fibrinolítica. A concentração de proteína total variou em torno de 800 mg/L sem apresentar tendência definida, provavelmente devido a falhas nas dosagens.

5.1.2. Cultivo 2

O cultivo 2 foi realizado com erlenmeyers normais e siliconizados de 250 mL com 100 mL de meio inoculados com $1,0 \times 10^4$ esporos/mL, sob agitação de 250 rpm e temperatura de 30°C. As variáveis determinadas a partir das amostras estão nos gráficos das Figuras 13 e 14.

Figura 13. Perfis de glicose, proteína total, biomassa, atividade e pH dos frascos normais (não siliconizados) do cultivo 2 (30°C, 120 rpm e concentração inicial de esporos $1,0 \times 10^4$). As amostras dos tempos 39,4 e 111,4 h foram tomadas em duplicata e os valores plotados são as médias dos valores obtidos para cada variável.

Figura 14. Perfis de glicose, proteína total, biomassa, atividade e pH dos frascos siliconizados do cultivo 2 (30°C, 120 rpm e concentração inicial de esporos $1,0 \times 10^4$). A amostra do tempo 111,4 h foi tomada em duplicata e o valor plotado é a média dos valores obtidos para cada variável.

Considerando que no cultivo 1 o pH inicial não ficou em 7,0 como planejado, que não foi tomada amostra no tempo 0 h e que houve adesão excessiva de biomassa na parede interna dos frascos, o cultivo 2 foi realizado como nova tentativa de reprodução do experimento de AYHAN; ÇELEBI; TANYOLAC (2001) e SALES et al. (2013) com descrição das cinéticas de crescimento, de consumo de substratos e de produção de enzima com atividade fibrinolítica e com teste do efeito da siliconização interna do frasco na adesão de biomassa.

O pH inicial foi ajustado em 7,0 com manutenção da esterilidade logo antes da inoculação do meio com esporos e distribuição nos frascos. A amostra do tempo 0 h foi então retirada. O pH inicial nas 2 condições foi de 7,0 e o perfil foi decrescente até aproximadamente o tempo 55,0 h, quando houve uma inflexão na curva em torno do valor 4,5 e ele voltou a subir, atingindo valores próximos a 6,0 ao final do cultivo. AYHAN; ÇELEBI; TANYOLAC (2001) e SILVEIRA et al. (2005) reportaram o intervalo de 4,6 a 5,2 como ideal para produção de protease por *M. miehei*, intervalo esse de 0,6 unidades. Intervalos maiores limitaram o crescimento e consequentemente a produção da enzima, e além disso ela permaneceu mais tempo em condições de menor estabilidade. O intervalo de aproximadamente 2,5 unidades no nível de pH observado no cultivo 2 pode ter um efeito negativo na produção de enzima com atividade fibrinolítica.

A biomassa dos frascos siliconizados foi determinada somente no final do cultivo e foi obtido o valor médio de 9,6 g/L, bastante próximo aos 9,0 g/L obtidos em frascos normais. Isso permite que a comparação da adesão de biomassa entre os frascos normais e siliconizados seja feita frente a uma mesma concentração final de biomassa. A siliconização não foi capaz de evitar a adesão de biomassa, como fica evidente na Figura 15. A adesão de biomassa tem efeito negativo na transferência de massa dentro do meio reacional e na viabilidade celular, podendo afetar a produção de enzima com atividade fibrinolítica.

Figura 15. À esquerda frasco siliconizado e à direita frasco normal do cultivo 2, ambos com biomassa aderente.

5.1.3. Discussão da etapa 1

Houve um aumento da concentração de atividade fibrinolítica durante o cultivo em ambos os tipos de frascos até um máximo de aproximadamente 4,0 U/ml perto do tempo 75,0 h seguido de uma diminuição, possivelmente devida a uma instabilidade na atividade enzimática nas condições de cultivo. A glicose foi esgotada em ambos os frascos antes de 87,4 h e consumida mais rapidamente nos frascos normais, mas provavelmente não devido ao acabamento interno do frasco. A concentração de proteínas totais teve comportamento similar, atingindo o valor mínimo de 200 mg/L para ambos os frascos também em 87,4 h. A concentração inicial de proteína total de 800 mg/L significa que de cada 10 g/L de farelo de trigo suspenso, autoclavado, decantado, retirado por filtração para nova autoclavação (solução I do meio), 800 mg/L de proteína são solubilizados e permanecem no meio de cultura.

Ambos os cultivos 1 e 2 tiveram amostras tomadas em duplicada. Os valores obtidos com essas amostras estão no Quadro 6, juntamente com os desvios padrão entre os valores para uma mesma variável e amostra. Os valores baixos de desvio padrão, com algumas exceções devidas provavelmente a imperfeições na execução das metodologias analíticas, então ainda em treino, permitem supor que a hipótese de que em todos os frascos o mesmo cultivo foi reproduzido é verdadeira. Isso

significa que a variação entre os frascos não afetou substancialmente a obtenção dos perfis mostrados.

Quadro 6. Valores de pH, glicose, proteína total, biomassa e atividade fibrinolítica obtidos nas amostras duplicadas dos cultivos 1 e 2 e seus respectivos desvios padrões.

Cultivo	Amostra	Tempo (h)	pH	Desvio padrão	Glicose (g/L)	Desvio padrão	Proteína total (mg/L)	Desvio padrão	Biomassa (g/L)	Desvio padrão	Atividade fibrinolítica (U/mL)	Desvio padrão
1	5A	44,3	3,7	0,0	4,6	0,7	908	242	4,1	0,1	0,48	1,0
	5B		3,8		3,6		566		4,0		1,8	
2	2A	39,4	4,5	0,1	5,1	0,5	603	6,2	12	4,4	2,6	0,1
	2B		4,6		5,9		611		6,2		2,7	
	5A	111,4	5,9	0,0	0,0	0,0	241	2,4	9,0	0,0	2,5	0,4
	5B		5,9		0,0		244		9,0		3,0	

O experimento reportado por SALES et al. (2013) foi reproduzido e os perfis cinéticos de consumo de glicose e proteína total, pH e produção de atividade, não reportados no referido trabalho, foram obtidos. No entanto o valor máximo de atividade obtido foi de 4,4 U/mL, muito abaixo do valor de 1.075 U/mL reportado no trabalho de referência.

5.2 Etapa 2 - Cultivos em biorreator Tecnal Biotec 7,5 L

Na segunda etapa foram realizados cultivos em biorreator com dorna de 7,5 L e volume de meio de 5,0 L, em modo de operação batelada, para avaliar o efeito do controle de pH e de O₂ dissolvido (OD) e da mudança de volume de cultivo e do modo de agitação (com turbinas e chicanas) na produção de enzima com atividade fibrinolítica e na morfologia do microrganismo. Mais especificamente, os cultivos 3 e 4 tiveram como objetivo avaliar o efeito de 2 diferentes níveis de OD (30 e 70% respectivamente), mantidos pela variação automática na vazão de ar. Esses 2 cultivos foram inoculados com esporos com 7 dias. Considerando que foram necessárias mudanças na agitação durante esses 2 cultivos, eles foram em parte exploratórios. Nos cultivos 5 e 6 os esporos foram pré-inoculados em erlenmeyers de maneira idêntica aos cultivos da etapa 1. O inóculo formado foi então transferido com aproximadamente 50 horas (ainda em fase exponencial de crescimento, detectada pelo consumo de glicose) para o biorreator em 2 diferentes taxas, 4% e 8% (volume de inóculo por volume de cultivo final).

5.2.1. Cultivo 3

No cultivo 3 os esporos foram inoculados na concentração de $1,0 \times 10^4$ esporos/mL e o OD foi mantido em 30% através de vazão de ar variável entre 0 e 6,0 L/min (0 a 1,2 vvm) controlada pelo controlador. As variáveis registradas pela IHM (interface homem-máquina) estão nos gráficos das Figuras 16 e 17 e as variáveis determinadas a partir das amostras estão no gráfico da Figura 18.

Figura 16. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação e pressão controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 3 (pH 7,0, OD em 30% controlado com ar puro). Os picos de pressão observados coincidem com a tomada de amostra, feita através da pressurização da dorna.

Figura 17. Perfis das variáveis vazão de ar e oxigênio dissolvido (OD) controladas pelo biorreator durante o cultivo 3.

Figura 18. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 3.

A estratégia inicial planejada para este cultivo foi a de manter uma agitação constante em 350 rpm e manter o OD controlado em 30%, valor perto da

concentração crítica (abaixo da qual a velocidade específica de respiração é afetada) reportada para diversos fungos filamentosos (PAPAGIANNI, 2004) através do borbulhamento de ar em vazão variável e dentro do intervalo de 0,5 a 7,0 L/min. Considerando que a fase lag parecia estar se estendendo muito devido ao não consumo da glicose e ao aparente não crescimento celular, suspeitou-se que a agitação poderia estar em nível inibitório ao crescimento, com cisalhamento acima do tolerável pelo microrganismo, e a agitação foi alterada para 50 rpm no tempo 55 h e depois para 100 rpm no tempo 106 h. Após essa alteração, devido à ela ou não, o OD começou a baixar dos 100% iniciais para o valor ajustado e o crescimento celular passou a ficar visualmente evidente. A partir do tempo 125 h a vazão de ar necessária para manter o OD em 30%, determinada automaticamente pelo controlador, passou a oscilar bastante entre os níveis máximo e mínimo (Figura 17), o que fez com que o OD oscilasse também. Para melhorar a dissolução do O₂ do meio de cultivo sem a necessidade de altas vazões de ar, a agitação foi, a partir desse momento, aumentada gradualmente até o valor final de 200 rpm, o que diminuiu as oscilações no OD.

Enquanto as dosagens de glicose, proteína total e atividade fibrinolítica são feitas na parte líquida do cultivo (sobrenadante da amostra) e portanto homogênea, a biomassa é dosada na amostra integral. Devido à aderência da biomassa nas paredes, chicanas e turbinas da dorna e à formação de pellets e grumos, a amostra tomada nunca é representativa do estado do cultivo quanto à essa variável. Esse problema, somado ao já citado problema com a metodologia de gravimetria, fez com que novamente o perfil de biomassa ficasse diferentemente do esperado. A Figura 19 mostra o aspecto da biomassa ao final do cultivo 3 (conforme Figura 3), formando uma biomassa composta por hifas emaranhada, em conformidade com o aspecto macroscópico de biomassa aderente observado a olho nu.

Figura 19. Aspecto das hifas e esporângio de *M. subtilissimus* ao final (tempo de 179 h) cultivo 3. Imagem feita com câmara de Neubauer em microscópio ótico com aumento de 400 x.

A glicose permaneceu no nível inicial até aproximadamente 110 h, quando passou a ser consumida até o esgotamento no tempo 164 h. Como o perfil de biomassa obtido por gravimetria ficou comprometido, não foi possível calcular diretamente μ_x e seu valor máximo $\mu_{x_{\max}}$. Sendo assim foi feita uma estimativa desse parâmetro com base na glicose consumida através do gráfico da Figura 20. O valor obtido foi de $\mu_{x_{\max}} = 1,4 \text{ dia}^{-1}$.

Figura 20. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 3, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{x_{\max}}$ de $1,4 \text{ dia}^{-1}$.

A proteína passou a ser consumida ao mesmo tempo que a glicose e ao final do cultivo, no tempo 179 h, ainda restavam 362 mg/L no meio. O perfil de atividade fibrinolítica contém mudanças repentinas nos tempos 81 h e 164 h, o que indica que nesse momento a metodologia de dosagem não estava com execução totalmente aperfeiçoada.

5.2.2. Cultivo 4

No cultivo 4 os esporos foram inoculados na concentração de $1,0 \times 10^4$ esporos/mL e o OD foi mantido em 70% através de vazão de ar variável entre 0 e 10 L/min (0 a 2 vvm) controlada pelo controlador. As variáveis registradas pela IHM durante o cultivo 4 estão nos gráficos das Figuras 21 e 22 e as variáveis determinadas a partir das amostras estão no gráfico da Figura 23.

Figura 21. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M e pressão controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 4 (pH 7,0, OD em 70% controlado com ar puro). Os picos de pressão observados coincidem com a tomada de amostra, feita através da pressurização da dorna.

Figura 22. Perfis das variáveis vazão de ar e oxigênio dissolvido (OD) controladas pelo biorreator durante o cultivo 4.

Figura 23. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 4.

Neste cultivo 4 a frequência de agitação inicial foi configurada em 200 rpm, com o intuito de mantê-la constante durante todo o cultivo. Esta frequência de

agitação foi escolhida por ser em hipótese baixa o suficiente para permitir a germinação dos esporos após a inoculação e o crescimento inicial da biomassa e também por ser em hipótese alta o suficiente para que o OD, neste cultivo configurado para ser controlado em 70%, pudesse ser controlado através apenas da vazão de aeração. Como é possível observar no gráfico da Figura 22, houve diminuição do OD partir do tempo 50 h, atingindo os 70% do *set point* configurado no tempo 61 h, quando e a aeração passou a ser aumentada gradativamente pelo controlador para a manutenção desse nível. No tempo 73 h, mesmo tendo o limite superior da vazão de aeração (8,0 L/min) sido atingido já por 1,5 h, o OD continuou a diminuir, momento no qual este limite foi aumentado para 9 L/min, permanecendo assim por 1 h, período em que o OD novamente continuou a cair. No tempo 74 h, prevendo a continuação do crescimento da biomassa e do consumo de OD, o limite superior da vazão de aeração foi então aumentado para 10 L/min e a agitação foi aumentada para 250 rpm, de modo que o controlador pudesse ter ainda uma margem para atuar no sentido de fornecer mais OD. Esta vazão de aeração (2 vvm) é a máxima possível com esse volume de cultivo nessa dorna utilizada, considerando o intenso borbulhamento o risco aumentado de parte do líquido sair pela saída de gás.

A Figura 24 mostra o aspecto da biomassa nos tempos 77 h e 99 h com aumento de 400x.

Figura 24. Aspecto das hifas de *M. subtilissimus* no tempo 77 h (foto à esquerda) e 99 h (foto à direita) do cultivo 4. Imagem feita com câmara de Neubauer em microscópio ótico com aumento de 400 x.

A Figura 25 mostra a biomassa como vista através da dorna de vidro no tempo 83 h, evidenciando que, assim como ocorreu com os erlenmeyers no cultivo 2, a siliconização interna não diminuiu a aderência de biomassa.

Figura 25. Biomassa aderida em ambos os lados não siliconizado (esquerdo) e siliconizado (direito) da dorna no tempo 83 h do cultivo 4.

Durante os cultivos 1 a 4 o tempo necessário para secar a biomassa úmida retida no filtro da metodologia da dosagem de biomassa foi otimizado. Enquanto no início aplicava-se 10 min de aquecimento em forno micro-ondas em potência de 10% seguido de novos períodos de 5 min na mesma potência até a variação de massa ficar menor do que 2% ao final, após o teste de diferentes combinações de tempo e de potência, chegou-se a conclusão de que uma combinação da potencia de 60% para o forno micro-ondas e de tempo de 25 min garante a secagem completa da biomassa úmida retida no filtro sem carbonizá-la, o que afetaria a precisão da medida. A Figura 26 mostra as massas úmida e seca da amostra 0 do cultivo 4. Considerando que nesse momento a biomassa é composta somente por esporos não germinados, provavelmente indetectáveis por esta metodologia nesta diluição, fica evidente que a diferença de gramatura entre o papel filtro usado na filtração da solução I do meio (qualitativo, 65 g/m²) e o papel filtro usado na filtração das amostras (qualitativo, 80 g/m²) fez com que já no tempo zero existissem partículas retidas, nesse caso de farelo de trigo.

Figura 26. Massa úmida (foto à esquerda) e seca em forno micro-ondas (foto à direita) retida no filtro na dosagem de biomassa da amostra 0 do cultivo 4. Fica evidente a retenção de partículas que não são compostas por biomassa.

A glicose permaneceu no nível inicial até aproximadamente 60 h, quando passou a ser consumida até o esgotamento no tempo 90 h. Foi feita uma estimativa de $\mu_{X_{max}}$ com base na glicose consumida através do gráfico da Figura 27. O valor obtido foi de $\mu_{X_{max}} = 4,32 \text{ dia}^{-1}$.

Figura 27. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 4, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{X_{max}}$ de $4,3 \text{ dia}^{-1}$.

O valor de $\mu_{X_{max}}$ obtido no cultivo 4 é de $4,3 \text{ dia}^{-1}$, 3 vezes maior do que o valor de $1,4 \text{ dia}^{-1}$ obtido no cultivo 3. Além disso a fase lag do cultivo 4 foi de 61 horas, 42% menor em relação à fase lag de 106 horas do cultivo 3. Essa melhoria no crescimento pode ser atribuída principalmente ao nível de OD de 70%, nível escolhido nos demais experimentos por ser mais promissor para a produção de enzima fibrinolítica.

Do mesmo modo que o cultivo 3, a proteína foi consumida junto com a glicose e o perfil atividade fibrinolítica não apresentou um aumento gradual, contém mudanças repentinas.

5.2.3. Cultivo 5

No cultivo 5 os esporos foram pré-inoculados na concentração de $1,0 \times 10^4$ esporos/mL nas mesmas condições da etapa 1, ou seja, em erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio MS-2 sob agitação e incubador rotativo. Após 49,3 h, 200 mL (4%) do inóculo (com hifas características da fase vegetativa de crescimento) foi transferido para a dorna, onde o OD foi mantido em 70% através de do enriquecimento de uma vazão constante de ar com O_2 controlado pelo controlador. O pH foi mantido em 5,5, a temperatura em 30°C e a agitação em 175 rpm. As variáveis registradas pela IHM durante o cultivo 5 estão nos gráficos das Figuras 28 e 29 e as variáveis determinadas a partir das amostras estão no gráfico da Figura 30.

Figura 28. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) e pressão controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 5 (pH 5,5, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura 29. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas pelo biorreator durante o cultivo 5.

Figura 30. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 5.

Nos cultivos 3 e 4 o biorreator foi inoculado com esporos e foram observadas longas fases lag (106 h e 61 h, respectivamente) até o início da fase exponencial de crescimento. Como objetivo de diminuir a fase lag em biorreator, a partir do cultivo 5 os esporos foram pré-inoculados em frascos erlenmeyers nas mesmas condições do cultivo 2 (frasco normal), que após aproximadamente 51 h (ainda em fase exponencial de crescimento) inocularam o biorreator. No cultivo 5 a fração de inóculo foi de 4% do volume total de meio (Quadro 5), a fase lag durou 110 h e a diminuição na fase lag esperada não ocorreu, como é possível observar no gráfico da Figura 30. O pH foi mantido em 5,5.

Nos cultivos 3 e 4 foram atingidas vazões altas de ar, de até 2 vvm. A partir do cultivo 5 o gás de entrada foi enriquecido com O_2 comprimido e vazões totais menores de gás foram utilizadas, ficando abaixo de 0,7 vvm durante a maior parte do cultivo 5, por exemplo, o que possibilitou que a agitação fosse mantida no valor de 175 rpm configurado como *set point*.

No cultivo 5 a filtração da solução I do meio de cultura e a filtração da biomassa das amostras foi feita com o mesmo papel filtro quantitativo com poro de 8 μm , na tentativa de corrigir a metodologia e obter valores iniciais baixos, referentes à biomassa do inóculo somente. Mesmo assim o perfil de biomassa ficou novamente

diferente do esperado. Foi feita uma estimativa de $\mu_{X_{max}}$ com base na glicose consumida através do gráfico da Figura 31. O valor obtido foi de $\mu_{X_{max}} = 5,0 \text{ dia}^{-1}$.

Figura 31. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 5, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{X_{max}}$ de $5,0 \text{ dia}^{-1}$.

5.2.4. Cultivo 6

No cultivo 6 os esporos foram pré-inoculados na concentração de $1,0 \times 10^4$ esporos/mL nas mesmas condições da etapa 1. Após 49,7 h, 400 mL (8%) do inóculo foi transferido para a dorna, onde o OD foi mantido em 70% através de do enriquecimento de uma vazão constante de ar com O_2 controlado pelo controlador. O pH foi mantido em 6,5, a temperatura em 30°C e a agitação em 250 rpm. As variáveis registradas pela IHM durante o cultivo 6 estão nos gráficos das Figuras 32 e 33 e as variáveis determinadas a partir das amostras estão no gráfico da Figura 34.

Figura 32. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) e pressão controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 6 (pH 6,5, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura 33. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas pelo biorreator durante o cultivo 6.

Figura 34. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 6.

No cultivo 6 a fração de inóculo foi aumentada para 8% também com o intuito de diminuir a fase lag, a agitação foi mantida em 250 rpm e o pH em 6,5, condições definidas por um planejamento experimental cuja execução foi abortada em face a um novo planejamento experimental executado na fase 3. A fase lag diminuiu bastante, sendo detectado consumo de glicose já no tempo 12,8 h, fato que pode ser atribuído ao aumento na fração de inóculo. Ao final do cultivo 6 a atividade fibrinolítica atingiu o valor de 12 U/mL, o maior até o momento. A glicose passou a ser consumida antes do tempo 12 h e foi esgotada no tempo 34 h, substancial diminuição da fase lag em relação aos cultivos anteriores. Mesmo com o esgotamento da glicose a atividade fibrinolítica continuou a aumentar, o que indica que o microrganismo pode ter utilizado outras fontes de carbono menos disponíveis, como a glicose proveniente da degradação do amido, por sua vez proveniente do farelo de trigo. Foi feita uma estimativa de $\mu_{x_{max}}$ com base na glicose consumida através do gráfico da Figura 35. O valor obtido foi de $\mu_{x_{max}} = 3,8 \text{ dia}^{-1}$.

Figura 35. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 6, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{x_{max}}$ de $3,8 \text{ dia}^{-1}$.

5.2.5. Discussão da etapa 2

Nesta etapa ficou evidente que para diminuir a fase lag de crescimento para tempos aceitáveis é necessário pré-inocular os esporos em frascos agitados por 2 dias para posterior inoculação em biorreator do microrganismo em forma vegetativa. Além disso, a fração de inóculo de 4% não foi suficiente (fase lag de 5 dias), sendo a de 8% satisfatória, com fase lag menor que 12 h, sendo o OD consumido desde o momento da inoculação.

5.3 Teste de k_La

Com o término da fase 2 de cultivos na UFRPE com o biorreator Tecnal Biotec e início da fase 3 com cultivos em biorreator NBS Bioflo III, foi necessário realizar teste para verificar se as condições de transferência de O_2 eram próximas entre as 2 dornas, de modo que os dados de cultivo já obtidos pudessem ser comparáveis aos novos. Foi então realizado teste de k_La pelo método estático nas 2 dornas com volume de água igual ao usado nos cultivos e em diferentes combinações de agitação e vazão de ar. Os tempos de resposta $t_{(63)}$ obtidos para os sensores de OD das dornas Tecnal Biotec e NBS Bioflo III foram de 27,2 s e 35,3 s respectivamente, considerados pouco relevantes para os valores de k_La obtidos. Os gráficos obtidos para a determinação desses 2 valores estão no Apêndice A. A

Figura 36 mostra, a título de exemplo, o perfil de OD durante o teste de determinação de k_La no biorreator NBS Bioflo III com vazão de ar de 1,0 L/min (0,4 vvm) e agitação de 350 rpm. Os demais gráficos obtidos com as diferentes combinações de agitação, vazão de ar e biorreator estão no apêndice A.

Figura 36. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de k_La no biorreator NBS Bioflo III 4,0 L com 2,5 L de água, vazão de ar de 0,4 vvm e agitação de 350 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Os resultados de k_La para ambas as dornas estão no Quadro 7. A Figura 37 mostra a superfície de resposta obtida com o biorreator Tecnal Biotec 7,5 L e a Figura 38 mostra a comparação entre as 2 dornas com a mesma vazão de ar (0,4 vvm) e com volumes de água utilizados nos cultivos. O intervalo de agitação de 250 a 350 rpm apresentou valores de k_La bastante similares para as 2 dornas, o que é esperado para outras agitações dada a similaridade geométrica e a pequena diferença de volume entre as 2 dornas.

Quadro 7. Dados de k_La obtidos com diferentes combinações de agitação e de vazão de ar para as dornas Tecnal Biotec 7,5 L e NBS Bioflo III 4,0 L.

Tecnal Biotec – kLa (h^{-1})		Agitação (rpm)		
		250	300	350
Vazão de ar (vvm)	0,4	17,2	21,0	22,6
	0,8	28,0	33,8	38,1

NBS Bioflo III – kLa (h^{-1})		Agitação (rpm)		
		175	350	525
Vazão de ar (vvm)	0,4	7,6	25,2	62,4

Figura 37. Superfície de resposta com valores de k_La para diferentes combinações de agitação e vazão de ar para a dorna Tecnal Biotec 7,0 L.

Figura 38. Gráfico com os dados de k_La x agitação com vazão de ar de 0,4 vvm para as dornas Tecnal Biotec 7,5 L e NBS Bioflo III 4,0 L com 5,0 e 2,5 L de água respectivamente.

5.4 Etapa 3 - Cultivos em biorreator NBS Bioflo III 4,0 L

Na terceira etapa foram realizados cultivos em biorreator NBS Bioflo III com dorna de 4,0 L e volume de meio de 2,5 L, também em modo de operação batelada e em dorna com geometria proporcionalmente menor em relação ao biorreator Tecnal Biotec e com a diferença da redução de 50% no volume de cultivo.

5.4.1. Cultivo 7

No cultivo 7 os esporos foram pré-inoculados na concentração de $1,0 \times 10^4$ esporos/mL nas mesmas condições da etapa 1. Após 51,6 h, 100 mL (4%) do inóculo foi transferido para a dorna, onde o OD foi mantido em 70% através da mudança na proporção O_2 /ar no gás de entrada pelo controlador. O pH foi mantido em 4,5, a temperatura em 30°C e a agitação em 175 rpm. As variáveis registradas pela IHM durante o cultivo 7 estão nos gráficos das Figuras 39 e 40 e as variáveis determinadas a partir das amostras estão no gráfico da Figura 41. Nesse cultivo houve problemas na inoculação devido a um entupimento no duto de inoculação e em vez dos 200 mL planejados (8%) foi possível inocular somente 100 mL, uma fração de 4%.

Figura 39. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 7 (pH 4,5, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura 40. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas pelo biorreator durante o cultivo 7. O sensor de O_2 parou de funcionar no tempo 30 h.

Figura 41. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 7.

Foi testado o software Flostat para controle automático da proporção de O_2 /ar no gás de entrada para a manutenção do OD em 70%. Problemas no sensor de OD

devido à adesão de biomassa em sua ponta e no software fizeram com que o OD não fosse devidamente controlado no nível desejado. A partir do tempo 30 h o dado de OD passou a não mais ser registrado e as vazões de ar e O_2 foram fixadas em 1.000 mL/min e 250 mL/min respectivamente, o que deve ter levado a excesso ou insuficiência no OD. O crescimento celular foi por isso afetado e o valor de $\mu_{x_{max}}$ obtido foi de $1,1 \text{ dia}^{-1}$, o menor valor dentre os cultivos realizados (Figura 42).

A dosagem de biomassa a partir desse cultivo passou a ser feita de maneira indireta através da dosagem de ergosterol nas amostras. Mesmo assim, por problemas de representatividade de amostra, os dados obtidos não compuseram uma curva de crescimento.

Figura 42. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 7, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{x_{max}}$ de $1,1 \text{ dia}^{-1}$.

O cultivo 7 pode ser mais diretamente comparável com o cultivo 5, considerando que ambos tiveram fração de inóculo de 4% e agitação de 175 rpm, que é similar em termos de transferência de O_2 entre as 2 dornas. Desse modo a principal diferença entre eles foi o nível de pH. Em pH 5,5 (cultivo 5) a atividade fibrinolítica permaneceu em torno de 4,0 U/mL durante todo o cultivo e o $\mu_{x_{max}}$ foi de $4,9 \text{ dia}^{-1}$ após fase lag de 112 horas. Em pH 4,5 (cultivo 7) a atividade fibrinolítica atingiu 8,11 U/mL ao final (89% a mais) e o $\mu_{x_{max}}$ foi de $1,1 \text{ dia}^{-1}$ (4,5 vezes menor) após fase lag de 30 horas. Ou seja, em baixas agitações (175 rpm) o pH mais baixo promoveu crescimento celular mais lento, porém maior produção da enzima.

5.4.2. Cultivos 8 a 13 – Efeito das combinações de pH e agitação

Em cultivos submersos, a agitação é importante para a boa mistura e para as transferências de massa e calor. Em processos aeróbicos, a agitação é requerida especialmente para garantir a transferência de oxigênio suficiente por todo o vaso. A agitação aplicada em bioprocessos cria forças de cisalhamento que podem afetar microrganismos em diversas maneiras, por exemplo causar danos à estrutura celular, mudanças morfológicas, assim como variações em taxa de crescimento e formação de produto (PAPAGIANNI, 2004). Considerando a importância da agitação e do pH no cultivo de fungos filamentosos, foram realizados cultivos de acordo com planejamento experimental com combinações desses 2 fatores em 3 níveis cada, num total de 6 cultivos (8 a 13). O Quadro 8 apresenta as diferentes combinações em formato matricial. Os cultivos 8 e 9 são réplicas do ponto central. Todas as demais variáveis foram mantidas, na medida do possível, idênticas ou dentro de intervalos relativamente pequenos. Os esporos foram pré-inoculados na concentração de $1,0 \times 10^4$ esporos/mL, a fração de inóculo foi de 8%, a temperatura foi mantida em 30°C e o OD foi mantido em 70% com mudança manual na proporção O_2 /ar do gás de entrada, que permaneceu com vazão total de 1,0 L/min (0,4 vvm) durante os cultivos. Os 6 cultivos foram realizados em dois biorreatores iguais, simultaneamente, com meio preparado numa mesma mistura e dividido durante a transferência para os 2 biorreatores do par, mesmo procedimento para o inóculo.

Quadro 8. Níveis de pH e agitação referentes ao planejamento experimental dos cultivos 8 a 13 apresentados em formato matricial.

Planejamento experimental		pH		
		4,5	5,5	6,5
Agitação (rpm)	525	12	–	11
	350	–	8 e 9	–
	175	10	–	13

As variáveis dos cultivos 8 a 13 registradas pela IHM durante os cultivos e determinadas a partir das amostras, assim como os gráficos utilizados para cálculo de $\mu_{X_{max}}$ estão nos gráficos das Figuras A11 a A34 do apêndice A. Temperatura e agitação permaneceram estáveis para todos os 6 cultivos. Quanto ao pH, o cultivo

10 sofreu um desvio no sentido de um pH mais ácido antes do tempo 15 h e o cultivo 11 após o tempo 35 h no sentido de um pH mais básico, o que não parece ter afetado os perfis de consumo de glicose e proteínas totais desses cultivos, mas pode ter afetado os valores de atividade fibrinolítica finais. Os demais cultivos não sofreram desvios de pH relevantes quanto à duração ou magnitude. A vazão total de gás na entrada da dorna foi de 1,0 L/min (0,4 vvm), com variação na proporção ar/O₂ para manutenção do OD no valor ajustado de 70%, seja através do software Flostat ou através de alterações manuais nas vazões. O OD ficou relativamente bem controlado em 70% nos cultivos 8 e 10, no cultivo 9 sofreu desvios para valores perto de 100% durante intervalo de 10 horas no final da fase exponencial, nos cultivos 11 e 12 ficou na maior parte do tempo dentro do intervalo de 70 a 100% e no cultivo 13 ficou bem controlado até o tempo 30 h, depois do que o sensor teve seu funcionamento comprometido. A biomassa continuou a ser dosada de maneira indireta pela dosagem de ergosterol. No cultivo 13 todas as amostras tiveram o valor zero para biomassa pois ela ficou totalmente aderida, conforme Figura B5 do apêndice B. Esse fenômeno ocorreu nos outros cultivos em maior ou menor grau.

O cultivo 6, pelas mesmas razões consideradas na comparação entre os cultivos 5 e 7 (fração de inóculo de 8% e $k_L a$ similar entre as dornas), pode ser mais apropriadamente comparado com os cultivos 8 a 13. Os valores de $\mu_{x_{max}}$ (na unidade de dia⁻¹) obtidos para cada um dos experimentos 6 e 8 a 13 estão representados no gráfico da Figura 43 por esferas de diâmetro proporcional aos valores. A posição das esferas reflete a posição dos experimentos no Quadro 8 e os níveis de pH e agitação utilizados. O valor do ponto central é a média dos valores obtidos para os cultivos 8 (4,4 dia⁻¹) e 9 (3,5 dia⁻¹). O maior valor obtido foi de 5,6 dia⁻¹ para o cultivo 13 (pH 6,5 e agitação 175), 40% maior do que o valor do ponto central.

Figura 43. Gráfico com os valores de $\mu_{x_{max}}$ (em dia^{-1}) obtidos nos cultivos 6 e 8 a 13 representados por esferas cujos tamanhos são proporcionais aos valores. As posições no plano agitação x pH refletem as condições usadas nos cultivos.

De maneira análoga, os valores de atividade fibrinolítica máximos obtidos para cada um dos experimentos 6 e 8 a 13 estão representados no gráfico da Figura 44. O valor do ponto central é a média dos valores obtidos para os cultivos 8 (5,7 U/mL) e 9 (3,9 U/mL). O maior valor de obtido foi de 12,0 U/mL para o cultivo 6 (pH 6,5 e agitação 250), 2,5 x maior do que o valor do ponto central.

Figura 44. Gráfico com os valores de atividade fibrinolítica máxima (em U/mL) obtidos nos cultivos 6 (12,0 U/mL) e 8 a 13 representados por esferas cujos tamanhos são proporcionais aos valores. As posições no plano agitação x pH refletem as condições usadas nos cultivos.

A Figura 45 apresenta as atividades fibrinolíticas máximas plotadas em relação aos valores de $\mu_{X_{max}}$ e permite observar que não houve uma relação clara entre as 2 variáveis, o que significa que a produção da enzima não está necessariamente associada ao crescimento do microrganismo.

Figura 45. Gráfico da atividade fibrinolítica máxima em relação à $\mu_{X_{max}}$ (dia⁻¹) para os cultivos 8 a 13.

Os cultivos 8 e 9 foram conduzidos em pH 5,5 e agitação de 350 rpm com as demais condições iguais, portanto foram réplicas. Ambos os cultivos tiveram consumo de glicose claramente detectado já na amostra do tempo 9,3 h com esgotamento perto do tempo 25 h, quando a atividade fibrinolítica atingiu valores próximos a 3,5 U/mL. Os valores de $\mu_{X_{max}}$ dos 2 cultivos ficaram próximos. Em geral os perfis de atividade fibrinolítica, consumo de glicose e de proteína total foram bastante similares entre os 2 cultivos.

5.4.3. Cultivo 14

No cultivo 14 foram repetidas as condições do cultivo 6 (pH em 6,5 e agitação em 250 rpm), que produziu a maior atividade fibrinolítica até então (12,0 U/mL). No entanto, por um equívoco, a temperatura na qual foi conduzido foi de 37°C, não os 30°C planejados. Esse cultivo contou com analisador da fração mássica de CO₂ no gás de exaustão. As variáveis registradas pela IHM durante o cultivo 14 estão nos

gráficos das Figuras 46 e 47 e as variáveis determinadas a partir das amostras estão no gráfico da Figura 48.

Figura 46. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) e pressão controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 14 (pH 6,5, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2 , temperatura de $37^\circ C$).

Figura 47. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 , oxigênio dissolvido (OD) e CO_2 no gás de exaustão controladas pelo biorreator durante o cultivo 14.

Figura 48. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 14.

Foi obtido o segundo maior valor de atividade máxima (9,3 U/mL) e o maior valor de $\mu_{X_{max}}$ (4,9 dia^{-1}), como pode ser observado na Figura 49. A variação na proporção O_2/ar foi alterada manualmente para a manutenção do OD e, no final da fase exponencial (quando há a diminuição no consumo), a não diminuição dessa proporção fez com que o OD atingisse valores bastante altos, acima de 200% da saturação com ar.

Figura 49. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 14, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). O valor de glicose do tempo 16,8 h (indicado no gráfico) não foi considerado para o cálculo de $\mu_{X_{max}}$ por estar destoando da curva. Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{X_{max}}$ de 4,9 dia^{-1} .

O CO₂ produzido foi registrado por analisador no gás de exaustão e, a partir do perfil gerado, o $\mu_{X_{max}}$ foi calculado, conforme Figura 50. O valor obtido foi de 4,3 dia⁻¹, 13,4 % menor do que o valor de $\mu_{X_{max}}$ calculado a partir do perfil de glicose (4,9 dia⁻¹).

Figura 50. Perfil do CO₂ produzido (descontado o CO₂ do gás de entrada, em laranja) no período exponencial do cultivo 14. O Ln do CO₂ produzido está em verde e em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{X_{max}}$ de 4,3 dia⁻¹.

Nesse cultivo foi adicionada a etapa de sonicação na suspensão do ergosterol após a secagem do hexano que o extraiu. A suspensão estava sendo feita até então com banho a 70°C e agitação, conforme o procedimento descrito no item 4.6.1. A sonicação foi muito eficiente e retirou qualquer dúvida quanto à retenção de ergosterol no tubo de ensaio ou na filtração da amostra no momento da preparação para análise no HPLC. Além disso, coincidentemente a morfologia do microrganismo no cultivo 14 foi a de grumos pequenos e relativamente homogêneos em tamanho, o que fez com que o perfil de biomassa ficasse muito melhor.

No perfil de biomassa é possível observar que do tempo 7,9 h ao tempo 20,0 h há um crescimento exponencial que foi modificado com o esgotamento da glicose. A partir desse trecho da curva foi calculado $\mu_{X_{max}}$ de maneira direta, conforme consta na Figura 51. O valor encontrado foi de 4,7 dia⁻¹. O Quadro 9 mostra os 3 diferentes valores de $\mu_{X_{max}}$ obtidos para o cultivo 14, com desvio padrão de 0,31 dia⁻¹ portanto coerentes entre si.

Figura 51. Perfil da concentração de biomassa (em roxo) no período exponencial do cultivo 14, com o Ln da concentração de biomassa (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{X_{max}}$ de 4,7 dia⁻¹.

Quadro 9. Valores de $\mu_{X_{max}}$ do cultivo 14 obtidos de 3 diferentes maneiras.

Fonte	Glicose	CO ₂	Biomassa	Desvio padrão
$\mu_{X_{max}}$ (dia ⁻¹)	4,9	4,3	4,7	0,31

A partir do tempo 29,8 h a biomassa voltou a crescer, mesmo com o esgotamento da glicose. Possivelmente houve consumo preferencial da glicose em relação a outras fontes de carbono provenientes do farelo de trigo. Quando a glicose foi esgotada, o microrganismo alterou seu metabolismo e passou a consumir fonte alternativa, possivelmente amido residual proveniente do processamento do grão de trigo para obtenção do farelo, apresentando assim crescimento. A solução I possui apenas 16,7 mg/L de glicose livre após a primeira autoclavação.

Os valores de atividade fibrinolítica nas amostras do tempo 0 nesse e na maioria dos cultivos anteriores ficaram relativamente altos (entre 0 e 7,0 U/mL), injustificáveis por uma eventual produção de enzima no inóculo. Sendo assim, foi dosada uma amostra do meio de cultura e o valor encontrado foi de 3,6 U/mL. É possível que no meio de cultura exista algum componente que interfira na análise, cuja permanência durante o cultivo é desconhecida.

5.4.4. Discussão da etapa 3

Nesta etapa foi utilizado o biorreator NBS Bioflo III com volume de cultivo de 2,5 L, que permitiu a continuidade dos experimentos e foi capaz de produzir níveis de atividade comparáveis (máximo de 9,27 U/mL) com as obtidas na etapa anterior com o biorreator Tecnal Biotec com volume de cultivo de 5,0 L (máximo de 12,0 U/mL). Os resultados obtidos com as diferentes combinações de pH e agitação do planejamento experimental mostram que não houve relação clara entre as variáveis testadas e a produção de atividade fibrinolítica.

Os valores de $\mu_{x_{max}}$ estimados através dos perfis de glicose, biomassa e produção de CO₂ do cultivo 14 foram coerentes entre si, com desvio padrão de 0,31 (dia⁻¹).

A metodologia de dosagem de biomassa pela medida indireta de ergosterol foi otimizada ao longo dos 8 cultivos, com a introdução da sonicação na etapa de suspensão da metodologia.

5.5 Discussão geral

Os cultivos 6, 7 e 14 foram aqueles que apresentaram um perfil de claro aumento na atividade fibrinolítica, diferente dos demais. Nesses 3 cultivos foram usados os 2 níveis de fração de inóculo, os valores de pH máximo e mínimo e 2 temperaturas de cultivo. Em comum existe a agitação nos 2 níveis mais baixos (175 e 250 rpm), que parece ter um efeito positivo na produção da enzima.

Os dados de biomassa ficaram bastante comprometidos devido principalmente à representatividade da amostra com relação a essa variável, que depende muito da homogeneidade e morfologia do microrganismo e que por sua vez depende das condições de cultivo. Isso faz com que o dado de fração de CO₂ dosado no gás de exaustão seja uma boa alternativa para estimativas do crescimento celular.

O Quadro 10 apresenta dados de concentração máxima, rendimento e produtividade de atividade fibrinolítica obtidos nos cultivos 1 a 14. A produtividade foi calculada sobre o tempo de cultivo do valor máximo de atividade obtido, nem sempre coincidente com o final do cultivo, já que em alguns casos houve diminuição da atividade.

Quadro 10. Concentração, rendimento e produtividade de atividade fibrinolítica obtidos nos cultivos 1 a 14. Destaque em negrito para os maiores valores.

Cultivos	Etapa	1		2				3
	N°	1	2	3	4	5	6	7
Atividade fibrinolítica	Concentração máxima (U/mL)	2,1	4,8	3,1	3,4	4,3	12,0	8,11
	Rendimento sobre o farelo de trigo seco inicial (U/g)	208	477	312	344	431	1.199	811
	Rendimento sobre a glicose $Y_{P/S}$ (U/g)	208	477	312	344	431	1.199	811
	Tempo de cultivo do valor máximo (h)	52,0	87,4	81,4	52,4	59,4	55,5	63,7
	Produtividade (U/(mL.h))	0,04	0,05	0,04	0,07	0,07	0,22	0,13

Cultivos	Etapa	3						
	N°	8	9	10	11	12	13	14
Atividade fibrinolítica	Concentração máxima (U/mL)	5,74	3,93	7,04	6,72	4,87	3,75	9,27
	Rendimento sobre o farelo de trigo seco inicial (U/g)	574	393	704	672	487	375	927
	Rendimento sobre a glicose $Y_{P/S}$ (U/g)	574	393	704	672	487	375	927
	Tempo de cultivo do valor máximo (h)	14,4	42,8	0,0	0,0	23,8	0,0	83,5
	Produtividade (U/(mL.h))	0,40	0,09	–	–	0,20	–	0,11

O cultivo 6 produziu a maior concentração máxima (12,0 U/mL) e o maior rendimento sobre o farelo de trigo seco inicial, sendo portanto escolhido para comparação com a fermentação em estado sólido realizada por NASCIMENTO; SALES (2015). O cultivo 6 teve agitação de 250 rpm, perto do nível mínimo empregado no conjunto de experimentos. Similarmente, AYHAN; ÇELEBI; TANYOLAC (2001) também reportaram maiores produções de MCA com agitação perto do nível mínimo estudado, o que pode estar relacionado ao menor cisalhamento que ocorre em agitações mais baixas. No Quadro 11 os procedimentos básicos análogos entre os 2 tipos de cultivo foram resumidos e mostrados (parte superior). Na parte inferior estão comparados os parâmetros de produção de enzima fibrinolítica. O cultivo submerso apresentou um rendimento sobre o farelo de trigo seco inicial 11% maior e uma produtividade sobre o farelo 43% maior. No entanto, a concentração máxima de atividade foi 92% menor, o rendimento de atividade pela glicose ($Y_{P/S}$) foi 90 vezes menor e a produtividade volumétrica 89% menor. Isso significa que o cultivo submerso foi mais capaz de aproveitar os substratos fornecidos pelo farelo trigo, no entanto o produto gerado ficou mais diluído, o que é indesejável já que isso diminui rendimentos em processos de purificação, talvez necessitando até da adição de uma etapa adicional de concentração. Para o cálculo do rendimento de atividade por glicose ($Y_{P/S}$) no caso da FES, a quantidade total de

glicose adicionada ao erlenmeyer (passo 2 do procedimento) foi dividida pelo volume de tampão utilizado para extrair a enzima (passo 5) ao final das 72 horas de cultivo.

Quadro 11. Procedimentos análogos entre as melhores condições da fermentação em estado sólido de NASCIMENTO; SALES (2015) e o cultivo 6 (parte superior), com comparação dos parâmetros de produção de enzima com atividade fibrinolítica (parte inferior, em negrito)

		Fermentação em estado sólido Melhor condição encontrada por Nascimento et. al (2015)	Cultivo submerso Melhor condição encontrada neste estudo (cultivo 6)
Procedimentos análogos	1	Cultivo em meio sólido (Czapek Dox Agar) por 7 dias a 30°C.	Cultivo em meio sólido (Czapek Dox Agar) por 7 dias a 30°C.
	2	Suspensão em solução nutriente (0,5% extrato de levedura, 1% glicose e 0,01% Tween 80 em tampão fosfato pH 7) e contagem dos esporos.	Suspensão em solução para suspensão (0,01% Tween 80 e 0,9% NaCl) e contagem dos esporos.
	3	Inoculação em 3 g farelo de trigo peneirado em volume e concentração de esporos suficiente para 1×10^7 esporos/mL e umidade final de 50%.	Pré-inoculação no meio MS-2, com farelo de trigo peneirado e 1% de glicose, em concentração de 1×10^4 esporos/mL, cultivo por 50 horas e inoculação em biorreator na taxa de 8%.
	4	Cultivo em 25°C por 72 horas.	Cultivo em biorreator em 30°C, pH 6,5, agitação de 250 rpm por 55 horas com amostragens no decorrer.
	5	Adição de 7,5 mL de tampão fosfato pH 7 por grama de substrato e agitação em shaker a 150 rpm por 90 minutos em temperatura ambiente para extração da enzima.	Sem procedimento análogo.
	6	Centrifugação a 3.500 rpm por 10 min.	Separação da amostra parte para dosagem de biomassa e parte para centrifugação a 10.000 g por 10 minutos e dosagem de substratos e atividade.
Produção de atividade fibrinolítica	Concentração máxima (U/mL)	144 U/mL (mL de sobrenadante da extração)	12,0 U/mL (mL de cultivo) – 92% menor
	Rendimento sobre o farelo seco inicial (U/g)	1.084	1.199 – 11% maior
	Rendimento sobre a glicose $Y_{P/S}$ (U/g)	108.000 (valor aproximado, comunicação pessoal)	1.199 – 90 vezes menor
	Produtividade (U/(mL.h))	2,0	0,22 – 89% menor
	Produtividade (U/(g.h))	15,1	21,6 – 43% maior

A fermentação em estado sólido aparenta possuir diversas vantagens biotecnológicas, embora atualmente presentes apenas em escala laboratorial, como alta produtividade, alta concentração final de produtos, estabilidade mais alta dos produtos, menor repressão catabólica e o cultivo de microrganismos especializados por substratos insolúveis em água (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004). Os dados obtidos nesse estudo confirmam as maiores concentrações finais e a maior produtividade volumétrica da FES para a produção de enzima fibrinolítica por *M. subtilissimus*.

As vantagens observadas com relação ao rendimento e produtividade específica sobre o farelo seco inicial indicam que o cultivo submerso aproveita

melhor e mais rapidamente esse substrato, porém a um custo de obter ao final um produto mais diluído.

Além da alta capacidade dos Zigomicetos de assimilar uma grande variedade de substratos, está a capacidade de produzir diferentes enzimas hidrolíticas, como aquelas necessárias para a degradação de carboidratos de plantas, incluindo amilases, celulasas e xilanases, bem como proteases e lipases (FERREIRA; LENNARTSSON; EDEBO, 2013). SAHA (2004) demonstrou a presença de um sistema celulolítico completo em *Mucor circinelloides*, com endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase. Esse sistema possivelmente está presente também em *M. subtilissimus* e permite justificar o crescimento diáuxico observado no cultivo 14 após o esgotamento da glicose. Novas moléculas de glicose produzidas por enzimas extracelulares seriam então rapidamente consumidas, sem acumular a ponto de aparecerem nas dosagens de glicose nas amostras. O fato do rendimento sobre a glicose ter sido aproximadamente 90 vezes maior no caso da FES pode ser explicado pelo mesmo mecanismo, que fez com que outras fontes de carbono fornecessem glicose, fontes estas não computadas no cálculo de rendimento, que foi baseado na glicose inicialmente adicionada à solução nutriente. Possivelmente o sistema enzimático celulolítico extracelular seja mais eficiente em FES do que em cultivo submerso.

6. CONCLUSÕES

Foram obtidos os perfis de consumo de substratos, crescimento e produção de enzima fibrinolítica em cultivos em Erlenmeyers de 250 mL e em biorreator com dornas de 7,5 e 4,0 L, em diferentes combinações de pH e agitação e em modo de operação batelada.

O uso de fina camada de silicone na parede interna dos frascos Erlenmeyers e na parede interna e chicanas da dorna do biorreator não foi capaz de conter a adesão de biomassa e a consequente formação de áreas com baixa transferência de massa. A adesão de biomassa foi observada em maior ou menor grau em todos os cultivos, o que certamente diminui o consumo de substratos (dentre eles o O_2), consequentemente a viabilidade do fungo e a produção de enzima fibrinolítica.

Foi utilizado o critério do coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (k_La) para comparação entre as duas diferentes dornas. A obtenção de valores próximos para as duas dornas nas faixas de agitação utilizadas no planejamento experimental e a similaridade geométrica entre elas permite afirmar que os dados de cultivo obtidos com ambas podem ser comparados e a interferência da diferença de volume entre as dornas pode ser desprezada.

O maior valor de velocidade específica de crescimento (μ_{Xmax}) obtido foi de $5,6 \text{ dia}^{-1}$ para o cultivo em pH 6,5 e agitação 175 rpm, 40% maior do que o valor do ponto central (pH 5,5 e agitação 350 rpm). O maior valor de atividade fibrinolítica obtido foi de 12,0 U/mL com o cultivo em pH 6,5 e agitação 250 rpm. No entanto não houve correlação entre o valor de μ_{Xmax} e o valor de atividade fibrinolítica obtidos nos cultivos do planejamento experimental.

A metodologia massa seca (gravimetria) para a determinação da concentração de biomassa foi bastante afetada pelo fato de os filtros da solução de farelo de trigo cozido que compõe o meio e os filtros usados nas determinações das amostras serem de especificações diferentes nos quatro primeiros cultivos. Mesmo com o uso do mesmo filtro nos três cultivos seguintes esse problema não foi corrigido, o que evidencia que essa metodologia é inapropriada para esse microrganismo. A metodologia de dosagem de ergosterol com o uso do sonificador para ressuspensão do ergosterol extraído produziu resultados muito mais confiáveis no caso de cultivos mais homogêneos, com menos adesão de biomassa. Para condições de pH e agitação que produziram mais adesão ou formação de pellets e

grumos, essa metodologia está sujeita ao mesmo problema de representatividade da amostra.

O valor de $\mu_{x_{max}}$ calculado através da curva de produção de CO_2 no cultivo em pH 6,5, agitação 250 rpm e temperatura 37°C ficou 8,5 % menor do que o valor obtido através da curva de crescimento obtida pela metodologia de dosagem de ergosterol. São necessários novos cultivos comparando as 2 metodologias para determinar essa diferença com maior precisão. O uso dos dados de produção de CO_2 para esse fim é vantajoso devido à simplicidade e possibilidade de obter o resultado mais rapidamente.

O cultivo submerso trouxe maiores rendimentos e produtividade de atividade fibrinolítica em relação ao farelo de trigo quando comparado com os dados reportados na literatura obtidos através de fermentação em estado sólido (FES) com a mesma cepa do microrganismo e fonte de nitrogênio. No entanto o preparado enzimático obtido ao final do cultivo submerso é mais diluído, sendo, portanto, menos vantajoso para os processos de purificação da enzima. O cultivo submerso se mostrou mais trabalhoso do que a FES em termos de preparação e condução dos experimentos no laboratório, com a esterilização de equipamentos mais pesados, problemas de entupimento na inoculação da dorna, adesão de biomassa no interior da dorna (incluindo sensores), uso de diversos equipamentos e utilidades auxiliares. As vantagens que o cultivo submerso traz, como o uso de biorreatores já bastante estudados e utilizados em laboratório e indústria, a possibilidade de mais fácil regulamentação perante agências regulatórias e o escalonamento relativamente mais simples nesse caso não se aplicam, principalmente porque as condições de heterogeneidade encontradas em fermentações em estado sólido permaneceram ainda presentes nos cultivos submersos realizados. Portanto a FES é mais adequada para essa combinação de microrganismo e fonte de nitrogênio estudados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325–330, 2002.
- ARBIND, K.; MANISHA, K. J. Fibrinolytic Agents in Reference to Fungi: An Overview. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n.11, p. 4225-4229, 2011.
- AYHAN, F.; ÇELEBI, S. S.; TANYOLAC, A. The effect of fermentation parameters on the production of *Mucor miehei* acid protease in a chemically defined medium. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 153–160, 2001.
- BUONO, M. A.; ERICKSON, L. E. Rapid Measurement of *Candida utilis* Dry Weight with Microwave Drying. **Journal of Food Protection**, v. 48, p. 958–960, 1 nov. 1985.
- CARVALHO, J.C.; PANDEY, A.; OISHI, B.O.; BRAND D.; JOSE RODRIGUEZ-LEON, A.; SOCCOL, C.R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 262–269, 2006.
- CHOI, J. H.; LEE, H. J.; KIM, S. Purification and antithrombotic activity of wulfase, a fibrinolytic enzyme from the fruit bodies of the edible and medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf. ex. Fr. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 608–614, 2016.
- DE SOUZA, F. A. S. D. et al. Optimization of production, biochemical characterization and in vitro evaluation of the therapeutic potential of fibrinolytic enzymes from a new *Bacillus amyloliquefaciens*. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 7, p. 587–595, 2016.
- DORIYA, K. et al. Chapter Six-Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 115-135, 2016.
- FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; EDEBO, L. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.
- GERMANO, S. et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and microbial technology**, v. 32, n. 2, p. 246–251, 2003.
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 2000.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112–123, 2013.

KUMAR, A.; KAUR, J. Fibrinolytic Agents in Reference to Fungi: An Overview. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n.11, p. 4225-4229, 2011.

LÜBBEHÜSEN, T. L.; NIELSEN, J.; MCINTYRE, M. Aerobic and anaerobic ethanol production by *Mucor circinelloides* during submerged growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 543–548, 2004.

MCINTYRE J BREUM J ARNAU J NI, M. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn . *racemosus*) during submerged batch cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 495–502, 2002.

MINE, Y.; KWAN WONG, A. H.; JIANG, B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. **Food Research International**, v. 38, n. 3, p. 243–250, 2005.

NADIA, N. et al. Optimization of lipase synthesis by *Mucor racemosus*-Production in a triple impeller bioreactor. **Malaysian J. Microbiol**, v. 6, p. 7–15, 2010.

NASCIMENTO, T. P. et al. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1–11, 2017.

NASCIMENTO, T. P.; SALES, A. E. Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v.3, n. 3, p. 81-91, 2015.

OLIVEIRA, C. C. Agentes trombolíticos - Artigo de Revisão. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio de Janeiro**, v. XIV, p. 1–6, 2001.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1271–1278, 2002.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 126–132, 2005.

PORTO, A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 115–122, 1996.

- SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1871–1876, 2004.
- SALES, A. E. Protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262: produção, purificação, caracterização bioquímica e estrutural. **Tese de doutorado**. UFRPE, Biociência Animal, 2015, disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/4455>, acesso em: 01/03/2017.
- SALES, A. E. et al. Production process of fibrinolytic protease by *Mucor subtilissimus* SIS 42 isolated of the Caatinga soil. **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Foz do Iguaçu, Anais, p. 1–4, 2013.
- SILVA, G. E. et al. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 339, p. 52–57, 2013.
- SILVEIRA, G. G. et al. Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 931–937, 2005.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. Tradução. 2. ed. [s.l.] Butterworth-Heinemann, 1999.
- THERMO SCIENTIFIC, T. Pierce BCA Protein Assay Kit Instructions. p. 1–7, 29 abr. 2013, disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf, acesso em: 01/03/2017.
- TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. Tradução. 10. ed. [s.l.] Armed, 2012.
- WANG, S.-L.; WU, Y.-Y.; LIANG, T.-W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. **New BIOTECHNOLOGY**, v. 28, n. 2, p. 196–202, 2011.
- YEGIN, S. et al. Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6380–6386, 2013.

APÊNDICE A - Gráficos

1. Tempo de resposta dos sensores de OD

Figura A1. Tempo de resposta (necessário para registro de 63% de uma mudança repentina) do valor de OD (em azul) do biorreator NBS Bioflo III. Após o ajuste de uma reta aos dados de LnOD (em vermelho), foi obtido o valor de 35,3 segundos.

Figura A2. Tempo de resposta (necessário para registro de 63% de uma mudança repentina) do valor de OD (em azul) do biorreator Tecnal Biotec. Após o ajuste de uma reta aos dados de LnOD (em vermelho), foi obtido o valor de 27,2 segundos.

2. Gráficos da determinação de k_La

Figura A3. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de k_La no biorreator NBS Bioflo III 4,0 L com 2,5 L de água, vazão de ar de 0,4 vvm e agitação de 525 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Figura A4. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de k_La no biorreator NBS Bioflo III 4,0 L com 2,5 L de água, vazão de ar de 0,4 vvm e agitação de 175 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Figura A5. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de $k_L a$ no biorreator Tecnal Bioflo III 7,5 L com 5,0 L de água, vazão de ar de 0,4 vvm e agitação de 250 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Figura A6. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de $k_L a$ no biorreator Tecnal Bioflo III 7,5 L com 5,0 L de água, vazão de ar de 0,4 vvm e agitação de 350 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Figura A7. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de k_La no biorreator Tecnal Bioflo III 7,5 L com 5,0 L de água, vazão de ar de 0,8 vvm e agitação de 300 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Figura A8. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de k_La no biorreator Tecnal Bioflo III 7,5 L com 5,0 L de água, vazão de ar de 0,4 vvm e agitação de 300 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Figura A9. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de k_La no biorreator Tecnal Bioflo III 7,5 L com 5,0 L de água, vazão de ar de 0,8 vvm e agitação de 350 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

Figura A10. Gráfico do perfil de OD (em azul) durante o teste de k_La no biorreator Tecnal Bioflo III 7,5 L com 5,0 L de água, vazão de ar de 0,8 vvm e agitação de 250 rpm. Em vermelho os valores de $\ln(C^* - C_L)$, com trecho utilizado para ajuste de reta em verde.

3. Gráficos com os perfis dos cultivos 8 a 13 e cálculo de μ_{Xmax}

Figura A11. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 8 (pH 5,5, agitação em 350 rpm, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura A12. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas manualmente durante o cultivo 8.

Figura A13. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 8.

Figura A14. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 8, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{x_{max}}$ de $4,4 \text{ dia}^{-1}$.

Figura A15. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 9 (pH 5,5, agitação em 350 rpm, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura A16. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas manualmente durante o cultivo 9.

Figura A17. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 9.

Figura A18. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 9, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{x_{max}} 3,5 \text{ dia}^{-1}$.

Figura A19. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 10 (pH 4,5, agitação em 175 rpm, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura A20. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas pelo software Flostat durante o cultivo 10.

Figura A21. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 10.

Figura A22. Perfil da concentração de proteína total consumida (em verde) no período exponencial do cultivo 10, com o Ln da concentração de proteína total consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{X_{max}}$ de $1,2 \text{ dia}^{-1}$.

Figura A23. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 11 (pH 6,5, agitação em 525 rpm, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura A24. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas manualmente durante o cultivo 11.

Figura A25. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 11.

Figura A26. Perfil da concentração de proteína total consumida (em verde) no período exponencial do cultivo 11, com o Ln da concentração de proteína total consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{X_{max}}$ de $1,3 \text{ dia}^{-1}$.

Figura A27. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 12 (pH 4,5, agitação em 525 rpm, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura A28. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas pelo software Flostat durante o cultivo 12.

Figura A29. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 12.

Figura A30. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 12, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{x_{max}}$ de $4,5 \text{ dia}^{-1}$.

Figura A31. Perfis das variáveis pH, temperatura, agitação, consumo acumulado de solução NaOH 1,0 M (bola cheia) e HCl 1,0 M (bola vazada) controladas e/ou registradas pelo biorreator durante o cultivo 13 (pH 6,5, agitação em 175 rpm, OD em 70% controlado com ar enriquecido com O_2).

Figura A32. Perfis das variáveis vazão de ar, vazão de O_2 e oxigênio dissolvido (OD) controladas manualmente durante o cultivo 13. A partir do tempo 32 h o perfil de OD não respondeu à um aumento na proporção de O_2 devido à um problema no sensor.

Figura A33. Perfis de glicose, proteína total, biomassa e atividade do cultivo 13.

Figura A34. Perfil da concentração de glicose consumida (em azul) no período exponencial do cultivo 13, com o Ln da concentração de glicose consumida (em laranja). Em preto está a reta ajustada, que gerou valor de $\mu_{x_{max}}$ de $5,6 \text{ dia}^{-1}$.

4. Curva padrão e identidade de ergosterol

Figura A35. Curva padrão de ergosterol relacionando concentrações crescentes da molécula às áreas dos picos.

Figura A36. Espectro de absorção da molécula do ergosterol nos intervalos de comprimento de onda de 220 a 320 nm. Em preto a curva da base de dados do software do HPLC e em rosa a curva obtida experimentalmente. A ótima sobreposição das curvas garante a identidade da molécula detectada pelo cromatógrafo nas amostras.

APÊNDICE B - Fotos

Figura B1. Biomassa aderida nas chicanas, serpentina e parede interna da dorna no tempo 107 h (foto à esquerda) e 181 h (foto à direita) do cultivo 3. É possível observar a clarificação do meio que ocorreu no intervalo.

Figura B2. Foto tirada no tempo 154 h do cultivo 3 mostrando biomassa aderida à ponta do sensor de O_2 .

Figura B3. À esquerda frascos erlenmeyer após suspensão e coleta de esporos para a obtenção do inóculo do cultivo 4. À direita imagem feita com câmara de Neubauer em microscópio ótico com aumento de 400 x mostrando os esporos durante a contagem.

Figura B4. Cultivo 7 no tempo 44 h. A biomassa ao mesmo tempo aderiu às paredes e chicanas da dorna e formou pellets aproximadamente esféricos.

Figura B5. Cultivo 13 no tempo 18 h. É possível observar que a biomassa está em sua maior parte aderida à parede interna, chicanas e impelidor da dorna.