



**UNICAMP**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATO SANO COELHO

**Produção de ácido kójico: estudo e otimização de  
processo e utilização de matérias-primas de baixo custo**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Renato Sano Coelho, aprovada pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ e orientado(a) pelo Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

---

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

C65p Coelho, Renato Sano, 1981-  
Produção de ácido kójico: estudo e otimização de  
processo e utilização de matérias-primas de baixo custo /  
Renato Sano Coelho. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido kójico. 2. Fermentação. 3. Aspergillus.  
4. Glicerol. 5. Água de maceração de milho. I. Monte  
Alegre, Ranulfo. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Kojic acid production: process optimization and use of low  
cost raw materials

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Kojic acid

Fermentation

Aspergillus

Glycerol

Corn steep liquor

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ranulfo Monte Alegre [Orientador]

Jonas Contiero

Marta Cristina Duarte

Data da defesa: 23/08/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**  
**(Orientador – DEA/FEA/UNICAMP)**

---

**Prof. Dr. Jonas Contiero**  
**(Membro Titular – DBM/IB/UNESP)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Cristina Teixeira Duarte**  
**(Membro Titular – CPQBA/UNICAMP)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Alves Macedo**  
**(Membro Suplente – DCA/FEA/UNICAMP)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Regina Durrant**  
**(Membro Suplente – DCA/FEA/UNICAMP)**



*Dedico este trabalho a meus pais, Irene e Renato, meus modelos de dedicação, honestidade e humildade, que com seu amor incondicional nunca deixaram de me apoiar em minhas decisões, sempre me aconselhando e me ajudando a superar meus obstáculos.*



## **Agradecimentos**

A meu orientador, exemplo e amigo professor Ranulfo Monte Alegre. Com sua paciência, boa vontade, conhecimento e inteligência e sempre disposto a ensinar e ajudar. Obrigado por ser um “pai” na minha vida acadêmica.

À Unicamp e à Faculdade de Engenharia de Alimentos, por sua contribuição à minha formação profissional e amadurecimento pessoal.

Aos membros da Banca Examinadora, por suas observações e sugestões que ajudaram a aperfeiçoar e enriquecer meu trabalho.

À Fapesp, pelo apoio financeiro e pela organização e profissionalismo em todos os seus procedimentos e ocasiões em que precisei de atendimento pessoal.

A Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura e Profa. Lucia Regina Durrant por me introduzirem ao mundo da pesquisa científica.

A meus amigos do Laboratório por sempre deixarem o ambiente de trabalho leve e proporcionarem muitos momentos alegres: Cláudia, César, Oswaldo, Sylvia, Tatiane, Giovana, Andréia, Renata, Luana, Meiri, Bruna, Gabriel e Dona Maria.

A minhas amigas Thereza e Kaliana, por sua amizade, bom humor e companheirismo. Obrigado por sempre alegrarem meu dia com suas histórias e brincadeiras.

A meus colegas da Pós Graduação da FEA: Adriana, Cristiane, Franciele, Lorena, Luciana, Maira, Paula, Susan, Suzana, Talita, Telma, Itamar e Cilene pelo companheirismo, ajuda nos estudos e brincadeiras nos momentos de descontração.

A meus amigos André, Bickel, Eiric, Deniwton, Fábio, Leandro, Marcelo, Matsuo e Sérgio, entre outros. Obrigado a todos pela forte amizade que me ajudou a concluir essa etapa de minha vida.

À Celina, meu amor, companheira e amiga, que sempre me dá apoio e carinho nos momentos de alegria e de dificuldade. Obrigado por sempre me receber com um sorriso no rosto e por sua paciência, compreensão e amor incondicional.

*“Para realizar grandes coisas devemos não somente agir, mas também sonhar; não somente planejar, mas também acreditar”*

**Anatole France**

*“A verdadeira viagem da descoberta consiste não em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”*

**Marcel Proust**

O interesse a respeito do ácido kójico tem crescido fortemente nos últimos anos desde a descoberta de suas propriedades de inibição de tirosinase, que permitem seu uso no tratamento de hiperpigmentação dermatológica, inibição de escurecimento enzimático de frutas e vegetais, produção de antiinflamatórios e analgésicos, produção de polímeros, dentre outras aplicações. Dado o potencial econômico do ácido kójico, são necessários processos mais eficazes para sua síntese reduzindo custos de produção e tornando-o mais atrativo à aplicação industrial. Este trabalho visou estudar o processo de produção fermentativa do ácido kójico, determinando parâmetros que auxiliarão no desenvolvimento de tecnologias competitivas de produção. Além disso, propõe a utilização de matérias-primas de baixo custo e grande disponibilidade no mercado brasileiro como glicerol e água de maceração de milho. A espécie selecionada para o estudo foi *Aspergillus flavus* NRRL 626, que apresentou maior velocidade de crescimento, esporulação e produção de ácido kójico. As melhores fontes de carbono foram a glicose e o glicerol e as melhores fontes de nitrogênio foram o extrato de levedura e a água de maceração de milho. A otimização por planejamentos experimentais utilizando glicose como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio possibilitou produtividade de até  $0,12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e concentração final de  $48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  após 22 dias. A otimização de meio de cultivo com glicerol como fonte de carbono e água de maceração de milho apresentou produtividade de  $0,13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e concentração final de  $48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  após 20 dias de fermentação. O glicerol bruto da produção de biodiesel causou forte inibição da produção de ácido kójico e forma obtidos até  $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  após 22 dias de fermentação. Ensaio em fermentador de bancada apresentaram problemas de formação de espuma devido às características do meio de cultura e de aderência da biomassa às paredes do fermentador. Os processos de cristalização com anti-solvente e clarificação com carvão ativado mostraram-se adequados à recuperação e purificação do ácido kójico.

## ABSTRACT

---

There has been a growing interest on kojic acid since the discovery of its tyrosinase inhibition properties, which make it useful for many different applications like dermal hyperpigmentation treatment, inhibition of fruits and vegetables enzymatic browning, antiinflammatory and analgesic drugs production, polymer productions, among others. The economical potential of kojic acid motivates researchers to develop more efficient and economical ways of producing it and therefore increase its commercial attractiveness. The present work focused on the study of the kojic acid fermentative production process in order to determine parameters that could help the development of more competitive production technologies. It also proposes the use of low cost raw materials with large availability in Brazil, since as glycerol and corn steep liquor. The selected species for the study was the *Aspergillus flavus* NRRL 626, which showed the highest growth rate, sporulation and kojic acid production. The selection of substrates pointed that glucose e glycerol were the best carbon sources and yeast extract and corn steep liquor were the best nitrogen sources for kojic acid production. Culture medium optimized through experimental designs with glucose as carbon source and corn steep liquor as nitrogen source allowed a productivity of  $0,12 \text{ g kojic acid} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  and a final concentration of  $48 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  after 22 days. The optimized medium containing glycerol as carbon source obtained maximum productivity of  $0,13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  and  $48 \text{ g kojic acid} \cdot \text{L}^{-1}$  after 20 days of fermentation. Crude glycerol from biodiesel strongly inhibited kojic acid production and its use as carbon source reached the maximum concentration of  $18 \text{ g kojic acid} \cdot \text{L}^{-1}$  after 22 days of fermentation. Cultivation in a 5 L batch fermentor using glycerol and corn steep liquor showed excessive foam formation e wall adherence. Anti-solvent crystallization and active carbon clarification were successful techniques for recovery and purification of kojic acid produced.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS .....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
3.1 Ácido Kójico .....	22
3.2 Aplicações do Ácido Kójico.....	22
3.3 Produção de Ácido Kójico.....	25
3.3.1 Meios de cultura .....	25
3.3.2 Condições de cultivo.....	29
3.3.3 Melhoramento genético para produção de ácido kójico.....	30
3.3.4 Métodos fermentativos .....	31
3.4 Glicerol como subproduto da produção de Biodiesel.....	34
3.5 Metabolismo do glicerol por <i>Aspergillus</i> .....	36
3.6 Análise do ácido kójico .....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1 Microrganismos .....	38
4.2 Meios de cultura e reagentes .....	38
4.3 Meio de manutenção .....	39
4.4 Preparo do Inóculo .....	39
4.5 Ensaio preliminares: Curvas de consumo de substrato, produção de ácido kójico e biomassa e seleção do fungo melhor produtor.....	39
4.6 Ensaio preliminares: Estudo dos substratos .....	40
4.7 Planejamento Experimental Plackett Burmann de 12 ensaios - Glicose .....	41
4.8 Planejamento Experimental Fracionado 2 <sup>4-1</sup> - Glicose .....	43
4.9 Curva de concentração de Água de Maceração de Milho .....	44
4.10 Planejamento Plackett Burmann de 12 ensaios - Glicerol .....	45
4.11 Delineamento Central Composicional Rotacional (DCCR) de 3 variáveis .....	46
4.12 Validação do meio de cultura otimizado .....	48

4.13	Curva de concentração de ácido kójico, glicerol e biomassa do meio otimizado.....	48
4.14	Ensaio com glicerol bruto do biodiesel.....	49
4.14.1	Glicerol Bruto.....	49
4.14.2	Glicerol parcialmente purificado (Glicerina Loira).....	49
4.15	Processo em fermentador de bancada.....	50
4.16	Fermentação em frascos Erlenmeyer.....	51
4.17	Recuperação e purificação.....	51
4.17.1	Concentração.....	51
4.17.2	Cristalização natural sob refrigeração.....	51
4.17.3	Cristalização com sistema anti solvente.....	52
4.17.4	Descoloração com carvão ativado.....	53
4.18	Análise dos resultados.....	53
4.18.1	Determinação de massa celular seca.....	53
4.18.2	Determinação de glicose residual.....	53
4.18.3	Determinação de ácido kójico.....	54
4.18.4	Determinação de glicerol residual.....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1	Ensaio preliminar: Seleção dos fungos produtores de ácido kójico e curvas de consumo de glicose, produção de biomassa e ácido kójico. ....	55
5.1.1	Seleção do fungo melhor produtor.....	57
5.2	Ensaio preliminar: Estudo dos Substratos.....	58
5.3	Planejamento Plackett Burmann de 12 ensaios usando glicose como fonte de carbono.....	59
5.3.1	Produção de ácido kójico em glicose:.....	59
5.3.2	Análise estatística de efeitos.....	61
5.4	Planejamento fracionado $2^{4-1}$ usando glicose como fonte de carbono.....	62
5.4.1	Resultados dos ensaios.....	62
5.4.2	Análise Estatística.....	64
5.5	Curvas de concentração de água de maceração de milho.....	66
5.5.1	Análise Estatística.....	69

5.6	Planejamento Experimental Plackett Burmann 12 variáveis com Glicerol.....	71
5.6.1	Análise estatística.....	73
5.7	Delineamento composto central rotacional de 3 variáveis.....	74
5.7.1	Análise estatística.....	76
5.8	Validação do Modelo – Glicerol .....	83
5.9	Curva de concentração de ácido kójico, glicerol e biomassa do meio otimizado.....	85
5.10	Ensaio com glicerol bruto do biodiesel.....	88
5.10.1	Glicerol bruto .....	88
5.10.2	Ensaio glicerol bruto parcialmente purificado (Glicerina Loira).....	90
5.11	Ensaio Fermentador de Bancada .....	91
5.11.1	Ensaio em fermentador a condições ótimas para glicerol .....	91
5.11.2	Ensaio a concentração reduzida de glicerol .....	93
5.12	Síntese dos resultados de produção de ácido kójico.....	94
5.13	Recuperação e purificação .....	95
5.13.1	Cristalização natural .....	95
5.13.2	Cristalização com sistema anti-solvente.....	97
5.13.3	Descoloração com carvão ativado.....	99
6.	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Estrutura do ácido kójico .....	18
Figura 5.1 Produção de ácido kójico durante processo fermentativo para as três linhagens. T: 30 °C; Agit: 150 RPM .....	55
Figura 5.2 Produção de biomassa durante processo fermentativo para as três linhagens. T: 30 °C; Agit: 150 RPM .....	56
Figura 5.3 Consumo de glicose durante processo fermentativo para os 3 fungos estudados. T: 30 °C; Agit: 150 RPM.....	56
Figura 5.4 Curvas de produção de ácido kójico dos ensaios do planejamento PB-12 Glicose por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM.....	60
Figura 5.5 Curvas dos ensaios do planejamento fracionado 2 <sup>4-1</sup> Glicose de <i>A. flavus</i> NRRL 626 . T: 30 °C; Agit: 150 RPM .....	63
Figura 5.6 Curvas dos ensaios do teste de concentrações de AMM por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM.....	67
Figura 5.7 Produtividades em ácido kójico a partir dos ensaios do teste de concentrações de AMM.....	68
Figura 5.8 Ajuste polinomial para os dados de produtividade .....	69
Figura 5.9 Curvas dos ensaios do planejamento PB12-Glicerol por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM .....	72
Figura 5.10 Resultados do planejamento DCCR 3 variáveis Glicerol para <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM.....	76
Figura 5.11 Valores preditos pelo modelo vs valores experimentais.....	80
Figura 5.12 Superfícies de resposta pH X Glicerol.....	81
Figura 5.13 Superfícies de resposta pH X AMM .....	82
Figura 5.14 Superfície de resposta AMM X Glicerol.....	83
Figura 5.15 Ensaios de validação do modelo Glicerol.....	84
Figura 5.16 Dados de produção de ácido kójico com meio otimizado com glicerol por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM.....	85

Figura 5.17 Dados de produção de biomassa com meio otimizado com glicerol por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM.....	86
Figura 5.18 Dados de produção de ácido kójico com meio otimizado com glicerol por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM.....	86
Figura 5.19 Produção de ácido kójico a partir de Glicerol Bruto por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM .....	89
Figura 5.20 Comparação Glicerol bruto (esquerda) vs Glicerol parcialmente purificado (direita).....	90
Figura 5.21 A: Fermentador com biomassa aderida às paredes. B: Fermentação com concentrações reduzidas de glicerol e AMM. T: 30 °C; Agit: 150 RPM, Aeração = 1,0 vvm .....	92
Figura 5.22 Produção de ácido kójico em fermentador de bancada por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T: 30 °C; Agit.: 150 RPM; Aeração: 1,0 vvm .....	93
Figura 5.23 Produto recuperado por cristalização natural .....	95
Figura 5.24 Resultados de cristalização com sistemas anti-solvente.....	97
Figura 5.25 Cristais de ácido kójico formados na cristalização com sistema anti-solvente .....	98
Figura 5.26 Cristais após tratamento com carvão ativado .....	100
Figura 5.27 Cristais antes do tratamento com carvão ativado (esquerda) e após (direita) .....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Meio base para produção de ácido kójico .....	40
Tabela 4.2 Meio base para teste de fontes de carbono .....	41
Tabela 4.3 Meio Base para teste de fonte de água de maceração de milho.....	41
Tabela 4.4 Matriz codificada do planejamento PB-12 com glicose .....	42
Tabela 4.5 Tabela de níveis das variáveis utilizadas no planejamento .....	43
Tabela 4.6 Matriz codificada do planejamento fracionado 2 <sup>4-1</sup> Glicose .....	43
Tabela 4.7 Tabela de níveis das variáveis utilizadas no planejamento .....	44
Tabela 4.8 Meio de cultura base para teste de concentração de água de maceração de milho .....	44
Tabela 4.9 Matriz codificada do planejamento PB-12 Glicerol .....	45
Tabela 4.10 Tabela de níveis das variáveis para o planejamento PB-12 Glicerol .	46
Tabela 4.11 Matriz codificada do planejamento DCCR de 3 variáveis.....	47
Tabela 4.12 Tabela de níveis das variáveis para o planejamento DCCR de 3 variáveis .....	47
Tabela 4.13 Composição do meio de cultura para validação.....	48
Tabela 4.14. Meio base para testes com glicerol bruto .....	49
Tabela 4.15 Composição do meio de cultura 1 para fermentador de bancada .....	50
Tabela 4.16 Composição do meio de cultura 2 para fermentador de bancada .....	50
Tabela 4.17 Descrição dos sistemas anti-solvente .....	52
Tabela 5.1. Produção de ácido kójico a partir de substratos alternativos (g ácido kójico/L) por <i>A. flavus</i> NRRL 626. T=30°C; Agit: 150 RPM. ....	58
Tabela 5.2. Resultados do planejamento PB-12 Glicose (g ácido kójico / L) .....	59
Tabela 5.3. Efeitos e p-valores das variáveis do planejamento PB-12 Glicose para <i>A. flavus</i> NRRL 626.....	61
Tabela 5.4. Resultados do planejamento fracionado 2 <sup>4-1</sup> Glicose (g ácido kójico / L) de <i>A. flavus</i> NRRL 626.....	63

Tabela 5.5 Valores de biomassa seca de <i>A. flavus</i> NRRL 626 do planejamento fracionado 2 <sup>4-1</sup> Glicose .....	64
Tabela 5.6. Efeitos e p-valores das variáveis estudadas no planejamento fracionado Glicose.....	65
Tabela 5.7 Resultados dos ensaios do teste de concentração de AMM (g ácido kójico/L).....	66
Tabela 5.8 Dados de produtividade média do 10º dia de fermentação .....	69
Tabela 5.9 Teste de significância do modelo .....	70
Tabela 5.10 Resultados dos ensaios do planejamento PB12 Glicerol .....	71
Tabela 5.11 Efeitos e p-valores do planejamento PB-12 Glicerol .....	73
Tabela 5.12 Matriz de resultados do planejamento DCCR 3 com glicerol como fonte de carbono .....	75
Tabela 5.13 Análise de efeitos do planejamento DCCR de 3 variáveis Glicerol ...	77
Tabela 5.14 Coeficientes do modelo para o planej. DCCR de 3 variáveis Glicerol .....	78
Tabela 5.15 Tabela ANOVA para avaliação da validade do modelo DCCR 3 variáveis Glicerol .....	79
Tabela 5.16. Parâmetros cinéticos para fermentação com glicerol .....	87
Tabela 5.17 Biomassa dos ensaios Glicerol Bruto .....	90
Tabela 5.18. Síntese dos estudos de produção de ácido kójico.....	94
Tabela 5.19. Dados dos ensaios de cristalização natural .....	96
Tabela 5.20 Resultados da purificação por adsorção em carvão ativado .....	99

## 1. INTRODUÇÃO

---

Desde o século VII a tradicional produção japonesa de alimentos fermentados como o missô (pasta de soja e arroz), o shoyu (molho de soja) e o saquê (bebida fermentada de arroz) baseia-se no cozimento das matérias-primas arroz e soja e a fermentação da massa cozida. Para dar início à fermentação o arroz cozido é inicialmente inoculado com um fungo, geralmente do gênero *Aspergillus*, que produz enzimas amilolíticas durante seu crescimento. Essa massa de arroz cozida e fermentada por fungos é chamada koji e atua como fonte de enzimas para a hidrólise do amido em açúcares fermentáveis e de algumas proteínas para permitir o crescimento de outros microrganismos, tais como leveduras e bactérias lácticas. Em 1907, a partir do estudo da fermentação do koji, SAITO (1907), citado por BENTLEY (2006), registrou a formação de um ácido orgânico que, em contato com  $\text{FeCl}_3$ , adquiria coloração vermelho-púrpura. Apesar de isolar o ácido através de cristalização e verificar que não se tratava de um ácido conhecido, Saito (1907) não nomeou o produto encontrado nem determinou o peso molecular ou temperaturas de fusão e ebulição.

Durante estudo da fermentação do koji por *Aspergillus oryzae*, YABUTA (1916), citado por BIRKINSHAW *et al.* (1931), identificou a estrutura do ácido isolado por SAITO (2007) e o nomeou ácido kójico. Inicialmente a fórmula foi descrita como  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_8$ , mas foi corrigida pelo próprio SAITO em 1916 para  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ . O próprio YABUTA sugeriu a estrutura 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona e comprovou essa hipótese em 1924, como citado por BIRKINSHAW *et al.* (1931).

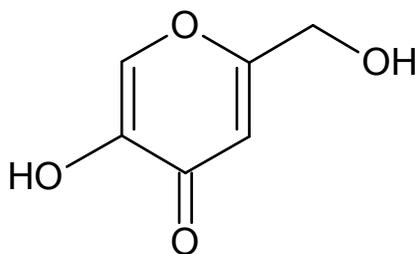


Figura 1.1. Estrutura do ácido kójico

Inicialmente tido como um subproduto na produção de alimentos, o ácido kójico possui atualmente aplicações nas áreas cosmética, farmacêutica, alimentícia e química. O ácido kójico é atualmente amplamente utilizado em formulações cosméticas para clareamento de pele e tratamento de doenças de pigmentação. Outra característica bastante estudada é a sua capacidade de inibir a ação da enzima polifenoxidase responsável pelo escurecimento de frutas, vegetais e tubérculos. Substâncias derivadas do ácido kójico denominadas piridonas são utilizadas como drogas com ação analgésica e antiinflamatória, com efeitos colaterais gastrointestinais menores do que outros antiinflamatórios não esteroidais.

Muitos estudos tem sido feitos com o intuito de otimizar a produção de ácido kójico através da seleção de linhagens mais eficientes, otimização de métodos fermentativos, utilização de matérias-primas mais adequadas e acessíveis e desenvolvimento de métodos mais eficientes para sua recuperação. A utilização comercial do ácido kójico em larga escala depende do desenvolvimento de tecnologias que possibilitem menores custos de produção.

O ácido kójico é uma substância com aplicações potenciais em diversas áreas do conhecimento, tais como farmacêutica, cosmética e alimentícia. Apesar de ter sido descoberto há mais de 100 anos, muitas propriedades do ácido kójico ainda não são devidamente exploradas, porém diversos estudos apontam para aplicações promissoras.

O processo de síntese do ácido kójico já é conhecido e aplicado industrialmente, porém as condições ideais de produção e o know-how necessário para a otimização do processo ainda estão concentrados em alguns pólos econômicos como Japão, Estados Unidos e China.

Pesquisa no site do Departamento Europeu de Patentes (EPA, 2011) revela a publicação de mais de 600 patentes no mundo relacionadas à utilização ou produção do ácido kójico, sendo 210 apenas nos últimos 10 anos. Segundo a base de dados,

somente do Japão originaram-se 350 patentes, porém nenhuma de autoria brasileira foi encontrada.

No Brasil, a grande disponibilidade de matérias-primas agrícolas e seus subprodutos fornece uma ampla gama de substratos de baixo custo para a fabricação de produtos biotecnológicos. A produção de cana-de-açúcar fornece a sacarose e o melaço de cana-de-açúcar, tradicionalmente utilizados com sucesso em processos biotecnológicos. Além disso a crescente produção de biodiesel no país oferece mais uma potencial matéria-prima de baixo custo: o glicerol formado como resíduo durante a síntese do biocombustível. Caso sejam desenvolvidas tecnologias para a produção eficiente do ácido kójico, o baixo custo das matérias-primas oferecidas torna o país um potencial produtor competitivo no contexto internacional.

## 2. OBJETIVOS

---

- Avaliar o desempenho as linhagens *Aspergillus flavus* NRRL 626, *Aspergillus flavus var. oryzae* NRRL 484 e *Penicillium lanosum/kojigenum* NRRL 3442 ;
- Avaliar o efeito dos substratos glicose, sacarose e glicerol e água de maceração de milho;
- Otimizar formulações de meios de cultura para a produção de ácido kójico a partir de substratos de baixo custo;
- Avaliar o consumo de substrato, produção de biomassa e produção de ácido kójico nas condições otimizadas;
- Avaliar o processo de fermentação em frascos agitados e fermentador de bancada;
- Avaliar o processo de recuperação e purificação do ácido kójico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1 Ácido Kójico

O ácido kójico ou 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona é uma hidroxi- $\gamma$ -pirona produzida por fungos filamentosos e está entre um dos primeiros metabólitos secundários fúngicos identificados. Foi observado pela primeira vez em 1907 por Saito durante o estudo do koji, arroz fermentado tradicionalmente no Japão para produção de alimentos. Saito observou a produção de um ácido orgânico durante a fermentação do arroz por *Aspergillus oryzae*, que apresentava coloração vermelho púrpura em contato com  $\text{FeCl}_3$ . Porém, o produto não foi nomeado nem identificado na ocasião.

Em 1912 YABUTA isolou o ácido kójico de arroz cozido inoculado com *A. oryzae*. Após secagem das amostras e extração em Soxhlet com éter, um ácido orgânico foi isolado. YABUTA determinou a fórmula  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$  e nomeou o ácido como ácido *koji*.

Segundo BENTLEY (2006), a rota metabólica mais provável para a síntese do ácido kójico é a conversão direta de uma molécula de glicose, sem quebra do ciclo pirânico (Figura 1.1). As enzimas envolvidas nessa reação ainda não foram desvendadas. Essa teoria foi reforçada por evidências encontradas em estudos que se utilizaram da técnica de rastreamento de isótopos radioativos (KITADA e FUKIMBAR.T, 1971).

#### 3.2 Aplicações do Ácido Kójico

A utilização do ácido kójico em formulações cosméticas para o clareamento da pele parece ser sua aplicação mais bem sucedida comercialmente. De fato, diversas formulações comerciais estão disponíveis para comercialização no mundo inteiro.

Desde 1988 seu uso cosmético foi aprovado pelas autoridades japonesas e a aprovação para uso na Europa e nos EUA segue sendo avaliada (BENTLEY, 2006).

A capacidade de clareamento de pele de formulações contendo ácido kójico deve-se à inibição da produção de melanina. Essa característica foi percebida inicialmente quando peixes de coloração preta foram alimentados com ácido kójico adquirindo coloração marrom amarelada após 49 dias de tratamento. (MISHIMA *et al.*, 1994).

O ácido kójico age sobre a produção de melanina através da inibição da enzima tirosinase, responsável pela conversão de L-tirosina a Dopaquinona, precursora das melaninas. Assim, impede a produção natural de melanina no organismo. A inibição das tirosinases pelo ácido kójico deve-se a sua capacidade quelante de cobre, componente estrutural das tirosinases. A utilização de inibidores de melanina é favorável em distúrbios de hiperpigmentação tais como o Melasma. Porém, o ácido kójico vem sendo utilizado principalmente em cosméticos para evitar o escurecimento natural da pele (BENTLEY, 2006).

Para potencializar a inibição da enzima tirosinase e aumentar sua estabilidade derivados do ácido kójico conjugados a aminoácidos foram sintetizados. Um dos derivados, ácido kójico – fenilalanina amida apresentou aumento de 90 % da capacidade inibição de tirosinase em relação ao ácido kójico livre e manteve-se estável por 3 meses mantido a 50 °C. Além disso a nova substância apresentou maior capacidade de redução de dopacromo (NOH *et al.*, 2009).

Em estudo de 2004 derivados de ácido kójico conjugados a tripeptídeos foram sintetizados através de síntese por fase sólida e apresentaram resultados expressivos. O composto ácido kójico apresentou atividade de inibição da enzima tirosinase 100 vezes maior do que a apresentada pelo ácido kójico livre. Além disso sua estabilidade de armazenamento foi 15 vezes superior e sua toxicidade também foi reduzida em comparação ao ácido kójico (KIM *et al.*, 2004).

Outra propriedade de interesse dermatológico foi observada em estudo que avaliava os danos causados por exposição à radiação ultravioleta na derme dorsal de ratos. Após 20 semanas de exposição à radiação UV a aplicação de ácido kójico reduziu significativamente os danos observados no grupo controle: enrugamento, hiperplasia da epiderme, fibrose da derme inferior e aumento de componentes na matriz extracelular da derme superior. A ação preventiva do ácido kójico parece ter sido causada por suas características de quelante de ferro, que possui papel importante no processo de oxidação da derme, e de inibição de radicais livres (MITANI *et al.*, 2001).

Devido às suas características de inibição da tirosinase o ácido kójico possui também excelente atividade de inibição da enzima polifenoloxidase, responsável pelo escurecimento de vegetais, cogumelos e crustáceos (CHEN *et al.*, 1991). Sua capacidade de preservar a cor natural dos alimentos o levou a ser estudado como possível substituto ao sulfito, agente anti-escurecimento mais utilizado atualmente. O desenvolvimento de um produto anti-escurecimento seguro e eficaz é de grande interesse, já que o sulfito tem sido responsável por reações alérgicas asmáticas e até por reações anafiláticas fatais (DAVIDSON *et al.*, 2002). SON *et al.* (2001) avaliaram em estudo comparativo a atividade de inibição do escurecimento de maçãs e classificaram o ácido kójico como um dos melhores agentes fenólicos com esse fim.

Além de suas aplicações nas áreas de cosméticos e alimentos, o ácido kójico vem sendo sondado para a utilização em medicamentos. ÖZTÜRK *et al.* (2002) sintetizaram compostos de estrutura 4(1H)-Piridona a partir de moléculas de ácido kójico, que se revelaram potenciais substitutos aos antiinflamatórios não esteroidais utilizados atualmente. As substâncias apresentaram maior atividade antiinflamatória do que a indometacina e maior atividade analgésica do que o ácido acetilsalicílico. Alguns dos compostos ainda apresentaram menor potencial ulcerogênico do que o composto de referência indometacina.

Uma nova e promissora aplicação do ácido kójico foi descoberta por BRTKO *et al.* (2004). Os autores observaram atividades antineoplásicas e citotóxicas de derivados do ácido kójico. Ao pesquisar novos compostos com atividade antitumoral,

avaliaram-se os efeitos de derivados halogenados de ácido kójico sobre células de leucemia L 1210 e de células tumorais pituitárias GH4C1 de ratos. Foi observada atividade antileucêmica de derivados halogenados de 5-hidroxi-2-hidroximetil-4-piran-4-ona, o que indica a possibilidade de uso como drogas auxiliares no tratamento de tumores.

Outra característica do ácido kójico e seus derivados é a sua atividade antibiótica. Foram identificadas atividades contra microrganismos Gram (+) e Gram (-) (COOK e LACEY, 1945) e contra fungos (KAYAHARA *et al.*, 1990).

### **3.3 Produção de Ácido Kójico**

#### **3.3.1 Meios de cultura**

A aparente relação estrutural entre o ácido kójico e a glicose chamou a atenção dos pesquisadores. Para a conversão direta da glicose em ácido kójico são necessárias uma oxidação e duas desidratações. Apesar disso foi observada produção de ácido kójico a partir de substâncias que possuíam de dois a sete carbonos em sua estrutura, o que evidenciava que o ácido kójico podia ser sintetizado por outra via além da conversão direta. Provavelmente através da síntese de uma substância precursora contendo seis carbonos em sua estrutura seguida da conversão em ácido kójico (BENTLEY, 2006).

ROSFARIZAN *et al.* (1998) estudaram a produção de ácido kójico de *Aspergillus flavus* utilizando como substratos diferentes fontes de carbono (glicose, xilose, sacarose, amido, maltose, lactose e frutose) e obtiveram o melhor resultado (39,9 g/L) utilizando glicose.

A influência das fontes de carbono também foi estudada por WAN *et al.* (2005) a partir da cultura da linhagem mutante *Aspergillus oryzae* M3B9. Foram utilizados glicose, frutose, sorbitol, maltose, sacarose, lactose e amido como fontes de

carbono. As maiores concentrações de ácido kójico (em torno de 40 g/L) foram obtidas utilizando-se frutose, sorbitol, maltose e sacarose. As fermentações utilizando glicose e amido produziram em torno de 35 g/L e 30 g/L de produto, respectivamente. A lactose suprimiu fortemente a síntese do ácido kójico, gerando a concentração de 10 g/L, aproximadamente (WAN *et al.*, 2005).

A produção de ácido kójico a partir da fermentação de glicerol como fonte de carbono foi detectada por TRAETTA-MOSCA (1921), citado por BIRKINSHAW *et al.* (1931). O glicerol tem se tornado um substrato economicamente interessante por ser um subproduto da produção de biodiesel (RIVALDI *et al.*, 2007).

Aparentemente polissacarídeos não são uma boa fonte de carbono para a produção de ácido kójico (ROSFARIZAN *et al.*, 2002). Não foi produzido ácido kójico de *A. oryzae* ao se utilizar amido como fonte de carbono (KITADA e FUKIMBAR.T, 1971) e muito pouco quando se utilizou maltose (BASAPPA *et al.*, 1970). Altas concentrações foram produzidas quando utilizado amido de sagu gelatinizado como substrato na fermentação de *A. flavus*, que possui a capacidade de secretar enzimas amilolíticas durante seu crescimento (ROSFARIZAN *et al.*, 2002).

De modo a reduzir os custos de produção de ácido kójico, pesquisadores vêm estudando a utilização de matérias-primas brutas mais baratas. FUTAMURA *et al.* (2001) estudaram a fermentação do fungo *A. oryzae* utilizando como substrato amido de milho parcialmente hidrolisado e água de maceração de milho, obtendo concentrações de até 40 g/L de ácido kójico.

Fontes de nitrogênio também parecem influenciar direta ou indiretamente a produtividade da obtenção de ácido kójico. WAN *et al.* (2005) observaram que a utilização de extrato de levedura como fonte de nitrogênio favorecia a agregação das células de *Aspergillus oryzae* em pellets durante a fermentação, em comparação a outras fontes de nitrogênio como triptona, proteína de soja, farelo de arroz e água de maceração de milho (corn steep liquor). A formação de pellets auxilia os processos

fermentativos à medida que evita o excessivo aumento de viscosidade causado pelo crescimento celular prejudicial à agitação e aeração do meio.

EL-AASAR (2006) estudou a otimização das condições de cultivo para produção de ácido kójico de uma linhagem de *A. parasiticus*. Foram estudados pH, temperatura de incubação, concentração de fonte de carbono (glicose, sacarose, melão de beterraba), concentração de fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, sulfato de amônia, nitrato de amônia e combinações) e o uso ou não de agitação durante a incubação. A maior concentração atingida foi de 34,38 g/L utilizando 6% de glicose, 1% de extrato de levedura com pH inicial 5 incubando a 28 °C por 10 dias com agitação de 220 rpm .

ROSFARIZAN E ARIFF (2000) estudaram a cinética e condições de cultivo ideais para a produção de ácido kójico de *Aspergillus flavus*. Os autores encontraram como relação C/N ideal o valor de 93,3. Glicose na concentração de 100 g/L e extrato de levedura a 5 g/L foram selecionados como melhor fonte de carbono e de nitrogênio, respectivamente.

A influência do pH sobre a produção de ácido kójico em fermentação submersa e com células ressuspendidas de *Aspergillus flavus* Link 44-1 foi estudada por ROSFARIZAN *et al.* (2002). O pH inicial do meio de cultura ajustado a 3,0 foi determinado como a condição ótima para a produção de ácido kójico. Entretanto o maior crescimento do microrganismo produtor foi atingido com pH inicial entre 6,0 e 7,0. Para pH inicial ajustado a 2,0 o crescimento foi fortemente inibido e não foi produzido ácido kójico. A produção em fermentador de 50L com pH inicial 3,0, sem controle de pH durante a fase de crescimento e com pH mantido a 3,0 durante a fase de produção foi 20% maior comparado a fermentação sem controle de pH. A concentração máxima alcançada através dessa estratégia de controle foi 62 g/L.

ROSFARIZAN E ARIFF (2006) utilizaram a sacarose como fonte de carbono para a produção de ácido kójico. Em ensaios em frascos de 250 mL agitados os autores verificaram a produção de 23,6 g/L de ácido kójico utilizando sacarose como

fonte de carbono. Para fins de comparação, utilizando glicose e frutose os autores obtiveram como resultados 25,8 e 6,4 g/L, respectivamente. Em ensaios em fermentador de bancada de 2L, o melhor resultado foi obtido utilizando-se a concentração de 150 g/L de sacarose alcançando a concentração máxima de 40,2 g/L.

Em trabalho mais recente ROSFARIZAN E ARIFF (2007) estudaram o comportamento de um sistema de ressuspensão de micélio de *Aspergillus flavus* Link 44-1. Foram testadas diferentes fontes de carbono e a que resultou em maior rendimento (g ácido kójico/ g fonte de carbono) foi a glicose (0,365 g/g) seguida de sacarose (0,279 g/g), amido hidrolisado (0,212 g/g) e frutose (0,195 g/g). As maiores produções foram obtidas utilizando-se 100 g/L de glicose e 100 g/L de sacarose, resultando em 45,3 e 33,4 g/L de ácido kójico, respectivamente.

A influência da adição de metanol no meio de cultura para produção de ácido kójico foi estudada por SALLEH *et al.* (1996). Os autores observaram que a adição de até 4% (v/v) de metanol ao meio de cultura promovia uma inibição discreta do crescimento de *A. flavus*. Porém, a produção de ácido kójico sofreu grande aumento até a concentração de 5% (v/v), a partir da qual tanto o crescimento como a produção de ácido kójico eram inibidos. Foram alcançados 40,7-41,7 g/L utilizando-se meio de cultura com 3-4 % (v/v) de metanol. Em comparação ao meio de cultura sem adição de metanol, a concentração máxima, rendimento sobre glicose consumida e produtividade total foram 2, 4,6 e 1,7 vezes maiores, respectivamente. Os autores observaram também uma relação inversamente proporcional entre o tamanho dos pellets formados pelo fungo e a produção de ácido kójico.

YOSHINARI *et al.* (2007) verificaram que a adição de Dioclatina A, um metabólito de bactérias do gênero *Streptomyces*, a culturas de *Aspergillus parasiticus* inibiu fortemente a produção de aflatoxinas ao mesmo tempo em que potencializou a produção de ácido kójico. A adição do metabólito também não afetou o crescimento do fungo. Segundo os autores o metabólito inibiu a produção de ácido norsolorínico, precursor de aflatoxinas, mas não foi desvendado o motivo do aumento na produção de ácido kójico.

A patente CN1417341 descreve a utilização de amido como fonte de carbono para a produção de ácido kójico. O processo descrito inclui uma etapa de sacarificação do amido, seguida da inoculação do líquido sacarificado com um organismo produtor. Ao final da fermentação o produto é refinado através de concentração, descoloração e cristalização obtendo ao final um produto de pureza maior do que 98% (WANG *et al.*, 2003).

A patente JP3905160 descreve a produção de ácido kójico utilizando meio de cultivo contendo fontes inorgânicas de nitrogênio (nitrato de amônio e sulfato de amônio) em conjunto com aminoácidos(KAWASHIMA *et al.*, 1998).

### 3.3.2 Condições de cultivo

O ácido kójico é diretamente sintetizado a partir da glicose através da ação de enzimas em reações seqüenciais. Uma alta taxa de aeração é essencial durante os primeiros estágios da fermentação para a síntese das enzimas necessárias para o consumo da glicose durante a fase de crescimento celular, porém durante a produção de ácido kójico não é necessário que haja oferta excessiva de oxigênio (ARIFF *et al.*, 1996).

KITADA *et al.* (1971) descobriram que o coeficiente ótimo da taxa de absorção de oxigênio é de  $11.2 \times 10^{-6}$  g mole O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> e que taxas de aeração acima desse valor resultavam em menor produção de ácido kójico e de crescimento celular.

ARIFF *et al.* (1996) estudaram o efeito da aeração sobre a produção de ácido kójico de *Aspergillus flavus* através do controle da tensão de oxigênio dissolvido (DOT). Com a agitação do meio fixada em 600 RPM variou-se a DOT em três níveis: 30, 50 e 80%. Verificou-se que para valores de DOT abaixo de 80% a produção de ácido kójico decrescia, enquanto o crescimento celular aumentava. A maior produção de ácido kójico (28,9 g l<sup>-1</sup>) foi obtida quando a DOT foi fixado em 80% durante a fase de crescimento e reduzido a 30% durante a fase de produção.

O uso da elevação da pressão interna do reator durante a fermentação para o aumento da produção de ácido kójico é descrito na patente JP 9220095. O processo descrito consiste em inocular esporos de um organismo produtor de ácido kójico, tal como *Aspergillus oryzae* (IAM 2142), em um meio líquido contido em um fermentador aerado e agitado e cultivar tal organismo a 250 rpm e 30 °C com pressão interna de 1,0 – 3,0 kgf/cm<sup>2</sup> por 10 dias.

Outro fator importante para a síntese do ácido kójico é o pH do meio de cultura. ROSFARIZAN *et al.* (2002) estudaram a relação do pH com a produção de ácido kójico por *Aspergillus flavus*, utilizando amido de sagu como substrato através e controle do pH durante as etapas da fermentação. A manutenção do pH da cultura em 3 durante todo o processo fermentativo reduziu significativamente a produção de ácido kójico (7,26 g/L) em relação ao grupo controle sem ajustes de pH (31,7 g/L). A menor concentração de ácido kójico (0,98 g/L) foi obtida com controle do pH em 4 durante a fase de crescimento e em 3 durante a fase de produção. A ausência de controle durante a fase de crescimento e a manutenção do pH durante a fase de produção produziu quantidades equivalentes às encontradas no grupo controle (31,07). Segundo os autores isso indica forte dependência do pH durante a fase de crescimento de *A. flavus* para a produção de ácido kójico.

O uso da elevação da pressão interna do reator durante a fermentação para o aumento da produção de ácido kójico é descrito na patente JP9220095. O processo descrito consiste em inocular esporos de um organismo produtor de ácido kójico, tal como *Aspergillus oryzae* (IAM 2142), em um meio líquido contido em um fermentador aerado e agitado e cultivar tal organismo a 250 rpm e 30 °C com pressão interna de 1,0 – 3,0 kgf/cm<sup>2</sup> por 10 dias (SATO e SAKAIDA, 1997).

### **3.3.3 Melhoramento genético para produção de ácido kójico**

Através de mutação induzida e fusão protoplasmática a partir da linhagem *Aspergillus flavus* ATCC 22788, WAN *et al.* (2004) obtiveram uma linhagem

hiperprodutora. A fermentação em frascos agitados com a nova linhagem permitiu o acúmulo de até 41,0 g/L de ácido kójico.

Por mutações induzidas utilizando N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina, FUTAMURA *et al.* (2001) obtiveram uma linhagem de *Aspergillus oryzae* chamada de MK107-39. Através de fermentação em frascos agitados, a linhagem produziu até 28 g/L de ácido kójico de 100 g/L de glicose. Em fermentador de 3 L foi produzido até 110 g/L de ácido kójico utilizando meio de cultura e condições de processo otimizados.

### 3.3.4 Métodos fermentativos

Diversos processos fermentativos foram estudados para otimizar a produção de ácido kójico de forma controlada. Se algumas das potenciais aplicações do ácido kójico se concretizarem, sua demanda comercial aumentará consideravelmente. Para que a produção do ácido kójico se torne mais econômica, os custos da operação e das matérias-primas devem ser reduzidos.

FUTAMURA *et al.* (2001) estudou a produção de ácido kójico em reator do tipo “airlift”. A utilização desse tipo de reator possibilita menor gasto de energia para agitação e aeração e menor custo de construção do que fermentadores convencionais. O resultado final obtido no reator airlift foi pouco inferior ao obtido no reator convencional (40 g/L no airlift contra 43 g/L no convencional), porém o gasto de energia no reator airlift foi inferior a 25% do gasto observado no reator convencional. Segundo os autores, caso fossem contabilizados os custos de construção dos reatores, o custo de produção do ácido kójico em reatores airlift seria ainda mais baixo em relação ao processo em fermentador convencional.

ARIFF *et al.* (1997) estudaram um sistema de produção de ácido kójico através da ressuspensão do micélio de *Aspergillus flavus* em fermentação de batelada. A fermentação foi avaliada em relação a diferentes concentrações celulares. O material celular foi inicialmente cultivado em fermentador agitado e frascos Erlenmeyer e, após

atingir a fase estacionária, foi separado por centrifugação a 6000 x g por 20 min. As células foram lavadas com água deionizada estéril e centrifugadas mais uma vez. O material celular foi então ressuscitado em frascos Erlenmeyer contendo 150 mL de glicose estéril (100 g/L) em tampão citrato a pH 3,5. Os frascos foram incubados a 30 °C e agitados a 250 RPM. O material ressuscitado manteve-se ativo produzindo ácido kójico mesmo após 600 horas de incubação. A taxa de produção de ácido kójico ( $n$ , g ácido kójico/ g células · h) manteve-se praticamente constante em relação às concentrações celulares até o valor de 19,2 g/L de material celular, acima do qual observou-se redução drástica do valor de  $n$ . Segundo os autores, a alta concentração celular aumentou a viscosidade do sistema e, conseqüentemente, reduziu a eficiência de agitação e limitou a ação de enzimas. A concentração máxima de ácido kójico produzida foi similar para os sistemas contendo a 7,39 g/L, 9,2 g/L e 26,1 g/L de material celular e variou entre 0,453 e 0,480 g / g glicose.

De modo a evitar a redução da agitação e aeração resultante do crescimento celular e aumento da viscosidade, KWAK E RHEE (1992) utilizaram células imobilizadas de *Aspergillus oryzae* com alginato de sódio. Esporos do fungo foram recolhidos em solução de Triton X-100 a 0,01% e adicionados em solução de alginato de sódio pré-esterilizada para formar uma suspensão de esporos-gel a 3% com concentração de  $5,0 \times 10^4$  esporos por mL de solução de gel. Essa mistura foi gotejada em solução de CaCl 2% para formar esferas de 1,2 mm, aproximadamente. As esferas contendo esporos imobilizados foram adicionadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL na relação de 1:3 (vol/vol) de esferas sobre meio de cultura e as fermentações ocorreram a 30 °C a 200 rpm. A concentração máxima de ácido kójico obtida foi de 84 g/L, sendo adicionado meio novo sobre as esferas para evitar a cristalização do produto. Em paralelo foi realizada uma fermentação utilizando micélio livre para efeito de comparação. A produtividade obtida nos dois ciclos consecutivos com células imobilizadas superou a obtida na fermentação com micélio livre. A partir do 12º dia a produção de ácido kójico foi reduzida bruscamente com o surgimento de cavidades nas esferas de gel.

WAN *et al.* (2005) descreveram um método para minimizar os custos de processo utilizando um fermentador com retenção de células de *Aspergillus oryzae* M3B9. O equipamento proposto permitia a realização de bateladas consecutivas fazendo, ao final de cada ciclo de fermentação, a substituição do meio de cultura fermentado por meio novo. Uma placa de filtração de 60 mesh (0,65 mm) acoplada ao fundo do fermentador mantinha as células retidas em seu interior durante a retirada de meio fermentado através de uma saída inferior. O meio de cultura foi otimizado para estimular o crescimento do fungo na forma de pellets e assim evitar a problemas de aumento de viscosidade causados pelo crescimento celular. O melhor resultado foi obtido com duas substituições de 75 % do meio fermentado após 7 e 11,5 dias de fermentação, alcançando produtividade média de  $5,3 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  contra  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  obtidos por fermentação convencional.

WAKISAKA *et al.* (1998) desenvolveram um reator de cultura por membrana para a produção de ácido kójico. Esporos de *Aspergillus oryzae* foram inoculados no exterior de uma membrana porosa cilíndrica em contato com o ar e meio de cultura estéril foi circulado pelo seu interior. O sistema foi disposto em caixa estéril com filtração de ar para evitar contaminação. Foi utilizada uma membrana de polissulfona com diâmetro nominal de poro de  $0,20 \mu\text{m}$ . Segundo os autores, a membrana permitiu a utilização do substrato pelo fungo e impediu a passagem de células para o meio de cultura. As maiores concentrações obtidas foram de 14, 45 e 60 mg/mL para concentrações de glicose no meio de 5, 10 e 20 %, respectivamente. Foi possível manter o sistema funcionando por até 70 dias sem contaminação ou autólise da cultura. Para efeito de comparação os resultados obtidos pelos autores por fermentação em frascos alcançaram 24 e 22 mg/mL para concentrações de 10 e 20 % de glicose, respectivamente.

A patente JP2000032995 descreve um processo de produção de ácido kójico que utiliza amido de milho como fonte de carbono em conjunto com ácido nítrico como fonte de nitrogênio em um fermentador de coluna de bolhas equipado com um gerador de microbolhas, que consiste de um filtro metálico sinterizado ou um filtro

cerâmico. A fermentação é realizada por um organismo produtor como, por exemplo, *Aspergillus oryzae* MK107-39 (OKABE *et al.*, 2000).

### **3.4 Glicerol como subproduto da produção de Biodiesel**

A preocupação com os problemas relacionados à emissão de carbono e aquecimento global e a possibilidade de uma crise energética resultante do esgotamento dos combustíveis fósseis têm estimulado a busca por alternativas energéticas renováveis e menos poluentes. Nesse contexto o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais se apresenta como uma alternativa renovável, menos poluente e economicamente viável.

A mistura de 5% de biodiesel ao óleo diesel convencional se tornou obrigatória a partir de 1º de janeiro no Brasil de 2010. Já o parlamento europeu determinou que a partir de 2010, 5,75% dos combustíveis consumidos deveriam prover de fontes renováveis (ICTSD, 2008). Esse movimento busca estimular a produção do biodiesel e substituir gradualmente os combustíveis fósseis. Contudo, o custo de produção do biodiesel ainda se encontra próximo ao preço de mercado (YAZDANI e GONZALEZ, 2007) e suscetível a flutuações no custo das matérias-primas, na maioria commodities de origem vegetal (ICTSD, 2008). Um meio de tornar mais atrativa a exploração comercial do biodiesel é a utilização de subprodutos gerados na produção do biodiesel, dentre os quais se destaca o glicerol. O glicerol é gerado a taxa de 1 kg a cada 10 kg de biodiesel produzidos. Atualmente o glicerol possui aplicações na área médica e cosmética, porém essa demanda não é suficiente para absorver o excedente de glicerol que será gerado na produção de biodiesel. Com a perspectiva de crescimento da produção de biodiesel o escoamento do glicerol se tornou um desafio econômico e ambiental. Estima-se que com o incremento do volume de biodiesel, o glicerol co-produzido aumentará de 83 para 330 milhões L/ano até o ano 2010 (MME, 2007). Isso favorece os processos que se utilizam do glicerol como matéria-prima, já que o excedente manterá seu preço de mercado a níveis muito baixos. Estimativas

apontam que o preço do glicerol na forma bruta se estabilizará em torno de US\$ 0,05/lb (CHI *et al.*, 2007).

Uma alternativa para o consumo do glicerol é o seu uso na biotecnologia como substrato para a síntese de produtos de alto valor agregado (RIVALDI *et al.*, 2007).

Muitos estudos foram encontrados a respeito da produção de 1,3-propanodiol através de glicerol resíduo do biodiesel. Utilizado na síntese de poliésteres, o 1,3-propanodiol permite a obtenção de polímeros com melhores características mecânicas em comparação com PET e PTFE (BARBIRATO *et al.*, 1998). A sua produção por fermentação utilizando diversas linhagens tem sido alcançada com boa produtividade (VILLEGAS, (2007); CHENG *et al.*,(2004); PAPANIKOLAU *et al.*, 2004; HIMMI *et al.*, (1999); MENZEL *et al.*, 1997).

Ácidos orgânicos como ácido cítrico também tem sido produzidos por fermentação do glicerol bruto do biodiesel. IMANDI *et al.* (2007) alcançou até 77,4 g/L utilizando planejamentos experimentais Doehlert para a otimização do processo. CHI *et al.* (2007) produziram ácido docosahexanóico (DHA) por fermentação de microalgas utilizando glicerol bruto resultante da produção de biodiesel. Os autores alcançaram valores de concentração de até 4,91 g/L com 22,1 g/L de biomassa.

A produção de ácido kójico a partir da fermentação de glicerol como fonte de carbono foi detectada por TRAIETTA-MOSCA & PRETI em 1921, citado por BIRKINSHAW *et al.* (1931). Não foram encontrados trabalhos que abordassem a otimização da produção de ácido kójico utilizando glicerol como fonte de carbono.

Diversas patentes tem sido depositadas no campo da fermentação a partir do glicerol. Aminoácidos podem ser produzidos utilizando como principal substrato o glicerol na forma de subproduto da produção de biodiesel. O glicerol pode ser utilizado como única fonte de carbono ou em conjunto com outros substratos (US2010129884 e US2009325243). A produção de 1,3-propanodiol por fermentação utilizando o glicerol resíduo do biodiesel já foi documentada. Utilizado na síntese de poliésteres, o 1,3-

propanodiol permite a obtenção de polímeros com melhores características mecânicas em comparação com PET e PTFE. A sua produção por fermentação utilizando diversas linhagens tem sido alcançada com boa produtividade e descrita em grande número de patentes (LIU *et al*, 2010; LIU, SOONG, ZHU, 2009; ZHILONG *et al*, 2010).

### **3.5 Metabolismo do glicerol por *Aspergillus***

. A conversão bioquímica do glicerol por *Aspergillus* inicia provavelmente na fosforilação do glicerol pela enzima glicerol-quinase a glicerol-3-fosfato, que é reduzido dihidroxiacetona fosfato pela enzima glicerol fosfo-ubiquinona oxidoreductase. A molécula dihidroxiacetona fosfato é uma intermediária da rota da gliconeogênese, onde por ação das enzimas frutose 1,6-bifosfatase e glicose 6-fosfatase ela pode ser convertida a glicose (RIVALDI *et al.*, 2007).

A síntese do ácido kójico utilizando o glicerol como única fonte de carbono pode ser explicada através da conversão de moléculas de glicerol em glicose ou então outro intermediário contendo 6 carbonos, que é então convertida em ácido kójico. Ainda não é clara a rota de conversão dos substratos em ácido kójico.

### **3.6 Análise do ácido kójico**

Desde sua descoberta por SAITO *et al.* (1907) é conhecida a reação do ácido kójico com cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). Devido a sua capacidade quelante de metais, a reação com o cloreto produz coloração roxo-avermelhada, observável até em diluições de até 1:200.000 (BARHAM e SMITS, 1934). A partir dessa reação, BENTLEY (1957) desenvolveu a metodologia de análise colorimétrica que consistia no tratamento da amostra de meio fermentado através da adição de 4 mL de solução de  $\text{FeCl}_3$  1% e posterior medição em colorímetro equipado com filtro de 540 m $\mu$ . A absorção máxima do complexo foi medida a 500 m $\mu$ . O branco para comparação foi preparado com uma

alíquota de meio não-inoculado adicionado de 4 mL de  $\text{FeCl}_3$  1%. A calibração foi realizada com alíquotas de ácido kójico padrão em diferentes concentrações. Segundo o autor o método não é específico para o ácido kójico, porém o risco de falsos positivos é baixo, visto que raramente foram encontrados metabólitos de *Aspergillus* que apresentavam o mesmo comportamento em contato com o cloreto férrico.

A aplicação de cromatografia gasosa para análise de ácido kójico produzido por *Aspergillus flavus* foi estudada por OWENS *et al* (1970), conseguindo resultados iguais ou melhores comparados aos métodos utilizados para determinação de micotoxinas. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso Varian-Aerograph modelo 2100 equipado com um detector de ionização de chama. Foram avaliadas três combinações de colunas e fase líquidas: 1) coluna de cobre de 6 ft x 4 mm (diâmetro interno) empacotada com SE-30 3% em Varipak, 100-120 mesh; 2) coluna de vidro de 2 ft x 4 mm com Gas ChromQ, 100-120 mesh como suporte e OV-17 3% como fase estacionária e 3) coluna de vidro de 2 ft x 4 mm com Gas ChromQ, 100-120 mesh como suporte e OV-101 como fase estacionária. As temperaturas do detector e injetor foram mantidas em 200 °C e a temperatura do forno foi mantida em 150 °C. Segundo os autores, o método mostrou-se bem sucedido em separar o ácido kójico do extrato cru do fungo e pode ser utilizado para determinação de ácido kójico em valores próximos a 0,1 µg.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 Microrganismos

Os fungos estudados no presente trabalho foram cedidos pelo Agricultural Research Service – ARS –Culture Collection, conhecido como NRRL. As linhagens escolhidas apresentavam registros de produção de ácido kójico no histórico fornecido pela ARS-NRRL. As linhagens fornecidas foram:

- *Aspergillus flavus* NRRL 626
- *Aspergillus flavus var. oryzae* NRRL 484
- *Penicillium lanosum/kojigenum* NRRL 3442

### 4.2 Meios de cultura e reagentes

- A água de maceração de milho utilizada no presente trabalho foi gentilmente cedida pela Corn Products Brasil.

- O glicerol bruto de biodiesel foi gentilmente cedido pela SPBIO – Indústria e Comércio de Biodiesel. Segundo o fornecedor, a amostra continha cerca de 44 % de biodiesel, sendo o restante composto de sabão, ácidos graxos, metanol e outras substâncias em menores concentrações

- Meio de cultura PDA e extrato de levedura Oxoid.
- Glicose Chemco.
- Glicerol p.a. Ecibra.
- Padrão de ácido kójico Sigma.

### **4.3 Meio de manutenção**

As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio PDA (Potato Dextrose Agar) previamente esterilizados a 121°C por 15 min.

### **4.4 Preparo do Inóculo**

Garrafas de Roux contendo meio PDA estéril foram inoculadas com esporos da cultura em manutenção e incubados a 30°C por 5 a 7 dias. Após esse período esporos foram coletados das garrafas através da adição de água estéril com Tween 80 a 0,1% e raspagem dos esporos da superfície do meio.

A contagem de esporos da suspensão foi medida e padronizada por contagem direta em câmara de Neubauer. A suspensão padronizada a  $10^7$  esporos/mL foi adicionada ao meio de cultura no valor de 10% do volume total.

### **4.5 Ensaios preliminares: Curvas de consumo de substrato, produção de ácido kójico e biomassa e seleção do fungo melhor produtor.**

Foram feitos ensaios para o estudo inicial do metabolismo dos microrganismos e seleção do melhor produtor.

Foi utilizado para o estudo o meio base descrito na Tabela 4.1 (ROSFARIZAN e ARIFF, 2000).

**Tabela 4.1** Meio base para produção de ácido kójico

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Glicose (g/L)	100
Extrato de Levedura (g/L)	5
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	2
pH	4

O meio de cultura foi fermentado a 30 °C com agitação de 150 rpm por 10 dias. As análises de concentração de substrato, ácido kójico e biomassa foram realizadas a cada 48 horas.

#### **4.6 Ensaios preliminares: Estudo dos substratos**

Para o estudo de substratos alternativos aos tradicionalmente utilizados em literatura foram realizados testes prévios de viabilidade. Estes testes visavam realizar análise preliminar da performance de cada substrato sugerido em relação à produção de ácido kójico.

Como fontes de carbono alternativas à glicose foram selecionados sacarose, melação de cana-de-açúcar e glicerol. Como fonte de nitrogênio alternativa ao extrato de levedura foi selecionado água de maceração de milho.

Para os testes das fontes de carbono Glicose, Sacarose, Melação de cana-de-açúcar e glicerol foi utilizado o meio base descrito na Tabela 4.2 abaixo:

**Tabela 4.2** Meio base para teste de fontes de carbono

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Fonte de Carbono (g/L)	100
Extrato de Levedura (g/L)	5
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	2
pH	4

Para os testes com água de maceração de milho foi utilizado meio base com composição descrita na Tabela 4.3:

**Tabela 4.3** Meio Base para teste de fonte de água de maceração de milho

<b>Componentes</b>	<b>Concentração</b>
Glicose (g/L)	100
Água de maceração de milho	5
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	2
pH	4

#### **4.7 Planejamento Experimental Plackett Burmann de 12 ensaios - Glicose**

O primeiro planejamento experimental abordou seis variáveis relacionadas à composição do meio de cultura: Glicose, água de maceração de milho, extrato de levedura, sais MgSO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e pH. A utilização de extrato de levedura e água de maceração de milho visou encontrar um ponto ótimo de utilização das duas fontes de nitrogênio. Dessa forma seria possível identificar efeitos sinérgicos que não ficariam evidentes caso as duas fontes não fossem utilizadas simultaneamente.

A matriz do planejamento experimental Plackett-Burmann de 12 ensaios mostrada na Tabela 4.4 foi criada utilizando o software Statistica 7.0.

**Tabela 4.4** Matriz codificada do planejamento PB-12 com glicose

Ensaio	Glicose	Ext Lev	AMM	MgSO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH
1	1	-1	1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	1	1	1	-1	1	1
7	-1	1	1	1	-1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13 C	0	0	0	0	0	0
14 C	0	0	0	0	0	0
15 C	0	0	0	0	0	0
16 C	0	0	0	0	0	0

As faixas de estudo das variáveis estudadas no planejamento experimental estão descritas na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** Tabela de níveis das variáveis utilizadas no planejamento

<b>.Variáveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Glicose (g/L)	50	100	150
Ext Lev (g/L)	0	3	6
AMM (g/L)	5	10	15
pH	3	4	5
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	0	0,5	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0	1	2

#### **4.8 Planejamento Experimental Fracionado 2<sup>4-1</sup> - Glicose**

A matriz do planejamento fracionado 2<sup>4-1</sup> (Tabela 4.6) foi criada utilizando o software Statistica 7.0. Foram escolhidas as variáveis glicose, água de maceração de milho, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e pH.

**Tabela 4.6** Matriz codificada do planejamento fracionado 2<sup>4-1</sup> Glicose

<b>Ensaio</b>	<b>Glicose</b>	<b>AMM</b>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>pH</b>
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9 C	0	0	0	0
10 C	0	0	0	0
11 C	0	0	0	0
12 C	0	0	0	0

Os níveis das variáveis para o planejamento experimental foram definidos de acordo com os resultados obtidos no planejamento experimental Plackett-Burmann de 12 ensaios e estão descritos na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** Tabela de níveis das variáveis utilizadas no planejamento

<b>Variáveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Glicose (g/L)	100	150	200
AMM (g/L)	2	6	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	1	2	3
pH	4	5	6

#### **4.9 Curva de concentração de Água de Maceração de Milho**

Baseado nos resultados obtidos no planejamento fracionado foram fixados os valores de concentração de glicose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e pH.

A concentração de água de maceração de milho foi avaliada na faixa de 2 a 6 g/L. O meio base utilizado para os ensaios está descrito na Tabela 4.8 abaixo.

**Tabela 4.8** Meio de cultura base para teste de concentração de água de maceração de milho

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Glicose (g/L)	150
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	2
pH	5

#### 4.10 Planejamento Plackett Burmann de 12 ensaios - Glicerol

Para a avaliação dos efeitos de 5 variáveis em meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono foi utilizado planejamento experimental do tipo Plackett-Burmann de 12 variáveis.

A matriz do planejamento Plackett-Burmann de 12 ensaios foi criada utilizando o software Statistica 7.0. Foram escolhidas as variáveis concentração de glicerol, de água de maceração de milho, de sais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$  e pH.

Os resultados obtidos com os ensaios utilizando glicose como fonte de carbono serviram de base para a determinação das faixas de estudo das variáveis. A matriz do planejamento Plackett Burmann de 12 ensaios encontra-se na Tabela 4.9.

**Tabela 4.9** Matriz codificada do planejamento PB-12 Glicerol

Ensaio	Glicerol	AMM	$\text{MgSO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	pH
1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13 C	0	0	0	0	0
14 C	0	0	0	0	0
15 C	0	0	0	0	0
16 C	0	0	0	0	0

Os níveis das variáveis do planejamento experimental Plackett-Burmann de 12 ensaios utilizando glicerol foram definidas levando-se em conta os resultados obtidos com os estudos prévios com glicose como fonte de carbono. Ou seja, utilizando as faixas ótimas de produção para a glicose como estimativa inicial para os estudos utilizando glicerol. As faixas de estudo das variáveis encontram-se na Tab. 4.10

**Tabela 4.10** Tabela de níveis das variáveis para o planejamento PB-12 Glicerol

<b>Variáveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Glicerol (g/L)	100	150	200
AMM (g/L)	2	4	6
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	0	0,5	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0	1	2
pH	4	5	6

#### 4.11 Delineamento Central Composicional Rotacional (DCCR) de 3 variáveis

Para análise de superfícies de resposta e obtenção de um modelo que descrevesse a performance da produção de ácido kójico em relação à concentração das variáveis foi utilizado planejamento do tipo DCCR de 3 variáveis com 4 pontos centrais e 6 pontos axiais. Foram analisadas as variáveis concentração de glicerol, concentração de água de maceração de milho e pH inicial. A matriz dos ensaios do planejamento encontra-se na Tabela 4.11.

**Tabela 4.11** Matriz codificada do planejamento DCCR de 3 variáveis

<b>Ensaio</b>	<b>Glicerol</b>	<b>AMM</b>	<b>pH</b>
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15 C	0	0	0
16 C	0	0	0
17 C	0	0	0
18 C	0	0	0

As faixas de estudo das variáveis foram definidas após análise dos experimentos anteriores e encontram-se na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12** Tabela de níveis das variáveis para o planejamento DCCR de 3 variáveis

<b>Variáveis</b>	<b>-1,68</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1,68</b>
Glicerol (g/L)	80	108	150	192	220
AMM (g/L)	1	2,2	4	5,8	7
pH	3	3,8	5	6,2	7

#### 4.12 Validação do meio de cultura otimizado

Para a validação do resultado do planejamento DCCR de 3 variáveis testou-se a composição indicada quanto à produção de ácido kójico para cinco replicatas. A composição do meio utilizada segue na Tabela 4.13.

**Tabela 4.13** Composição do meio de cultura para validação

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Glicerol (g/L)	220
AMM (g/L)	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	1
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	1
pH	5,0

#### 4.13 Curva de concentração de ácido kójico, glicerol e biomassa do meio otimizado

Para estudar os perfis de crescimento celular e consumo de substrato em relação à produção de ácido kójico, foi feito um estudo de amostragem ao longo do tempo de fermentação em frascos Erlenmeyer. Devido ao caráter filamentosos do microrganismo estudado, não foi possível a retirada de amostras homogêneas para a quantificação de biomassa de um único frasco. Para contornar essa dificuldade foram preparados frascos Erlenmeyers para cada tempo de fermentação. Para cada intervalo de tempo foi retirado um frasco inteiro, a partir do qual foram quantificados a concentração de ácido kójico, concentração de glicerol e de biomassa. O meio de cultura utilizado para esse estudo foi o meio previamente otimizado descrito na Tabela 4.15.

## 4.14 Ensaios com glicerol bruto do biodiesel

### 4.14.1 Glicerol Bruto

Para ser adicionado ao meio de cultura, o glicerol bruto foi neutralizado a pH=7,0 através da adição de ácido clorídrico.

Para os ensaios de fermentação foi utilizado o meio de cultura base descrito na Tabela 4.14. A essa formulação foram adicionados 100, 150 e 250 g/L de glicerol de biodiesel:

**Tabela 4.14.** Meio base para testes com glicerol bruto

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
AMM (g/L)	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	1
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	1
pH	5,0

### 4.14.2 Glicerol parcialmente purificado (Glicerina Loira)

Para diminuir a concentração de impurezas e aumentar a concentração do glicerol foi feita purificação parcial por precipitação conforme descrito por RIVALDI *et al* (2007). O glicerol foi acidificado com a adição de ácido clorídrico até pH entre 1 e 2. Em seguida o glicerol foi homogeneizado por agitação e deixado a decantar em funil de separação. A fase inferior contendo o glicerol foi removida e neutralizada com a adição de NaOH e a fase superior contendo sabões e ácidos graxos foi descartada. Os ensaios foram realizados de maneira análoga ao realizado com o glicerol bruto.

#### 4.15 Processo em fermentador de bancada

O processo de batelada simples em fermentador de bancada de 5 litros utilizando o glicerol como única fonte de carbono foi avaliado. O processo foi conduzido com agitação por turbina de 150 rpm e aeração de 1,0 vvm. Duas composições de meio de cultura foram testadas, conforme Tabelas 4.15 e 4.16:

**Tabela 4.15** Composição do meio de cultura 1 para fermentador de bancada

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Glicerol (g/L)	220
AMM (g/L)	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	1
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	1
pH	5,0

**Tabela 4.16** Composição do meio de cultura 2 para fermentador de bancada

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Glicerol (g/L)	150
AMM (g/L)	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	1
MgSO <sub>4</sub> (g/L)	1
pH	5,0

Foram retiradas amostras de 10 mL, aproximadamente, a cada 48 horas. As amostras foram analisadas quanto à concentração de ácido kójico e concentração de glicerol. Não foi possível a determinação de biomassa devido ao caráter filamentososo do

fungo, o que impedia a retirada de amostras homogêneas. O processo foi mantido durante 480 horas.

#### **4.16 Fermentação em frascos Erlenmeyer**

Para todos os ensaios de fermentação em frascos Erlenmeyer foram preparados frascos de 250 mL contendo 100 mL do meio da Tabela 2 previamente esterilizados a 121°C por 15 min. Os frascos foram inoculados com 10% (v/v) de inóculo e incubados a 30°C e 150 rpm.

#### **4.17 Recuperação e purificação**

##### **4.17.1 Concentração**

Para os estudos de cristalização e purificação do ácido kójico, os extratos filtrados dos meios de cultura fermentados foram submetidos à concentração em evaporador rotativo. As amostras foram mantidas em banho-maria a 70 °C e evaporadas sob vácuo por 30 min.

##### **4.17.2 Cristalização natural sob refrigeração**

A primeira etapa do processo de cristalização foi realizada através do resfriamento dos extratos concentrados até, aproximadamente, 5°C e deixados em repouso em resfriamento por 12 horas. Os cristais formados foram filtrados em papel de filtro e secos em estufa à vácuo a 50 °C por 24 horas. A massa dos cristais resultantes foi obtida por pesagem em balança analítica. A pureza dos cristais foi obtida

através da análise da concentração de ácido kójico pelo método de BENTLEY (1957) de uma massa conhecida dos cristais brutos.

#### 4.17.3 Cristalização com sistema anti solvente

O sistema anti solvente foi composto de etanol-éter de petróleo. O ácido kójico é solúvel em etanol (solvente) e praticamente insolúvel em éter (anti-solvente) (KŘIVÁNKOVÁ *et al.*, 1992). Os cristais obtidos da cristalização natural foram diluídos em etanol 99 % na concentração de 20 g/L. Para avaliação do sistema anti-solvente o éter de petróleo foi adicionado em diferentes proporções à solução de etanol. As soluções foram mantidas sob refrigeração a 5°C por 12 horas para consolidação da cristalização. Para a recuperação dos cristais formados as soluções foram filtradas ainda resfriadas em papel de filtro e os cristais foram secos em estufa à vácuo a 50 °C por 24 horas. A massa dos cristais resultantes foi determinada por pesagem em balança analítica. A pureza dos cristais foi obtida através da análise da concentração de ácido kójico pelo método de BENTLEY (1957) de massa conhecida dos cristais brutos.

**Tabela 4.17** Descrição dos sistemas anti-solvente

<b>Ensaio</b>	<b>Solução Etanol (mL)</b>	<b>Éter de Petróleo (mL)</b>
1	20	0
2	20	10
3	20	20
4	20	30
5	20	40

#### **4.17.4 Descoloração com carvão ativado**

Para o estudo da descoloração com carvão ativado, soluções de cristais obtidos por cristalização natural foram diluídos em etanol 99 % até a concentração de 20 g/L. A essas soluções foi adicionado carvão ativado nas concentrações de 1, 5 e 10 g/l. As soluções contendo o carvão foram mantidas sob agitação de 200 rpm a 40 °C por 1 h e então filtradas em papel de filtro para separação do carvão. As soluções foram então submetidas à cristalização com sistema anti-solvente. Os cristais resultantes foram secos secos em estufa à vácuo a 50 °C por 24 horas e a massa de cristais resultantes determinada por pesagem em balança analítica. A pureza dos cristais foi obtida através da análise da concentração de ácido kójico pelo método de BENTLEY (1957).

#### **4.18 Análise dos resultados**

##### **4.18.1 Determinação de massa celular seca**

Amostras de meio fermentado foram centrifugadas a 5000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi separado e a massa celular decantada foi lavada com água destilada e seca em estufa a vácuo a 65°C até estabilização do seu peso, medido em balança analítica.

##### **4.18.2 Determinação de glicose residual.**

Uma alíquota do sobrenadante foi analisada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase utilizando kit de análise comercial (Biodiagnóstica – Laborclin).

#### **4.18.3 Determinação de ácido kójico**

A determinação de ácido kójico foi feita através do método colorimétrico de BENTLEY (1957).

#### **4.18.4 Determinação de glicerol residual.**

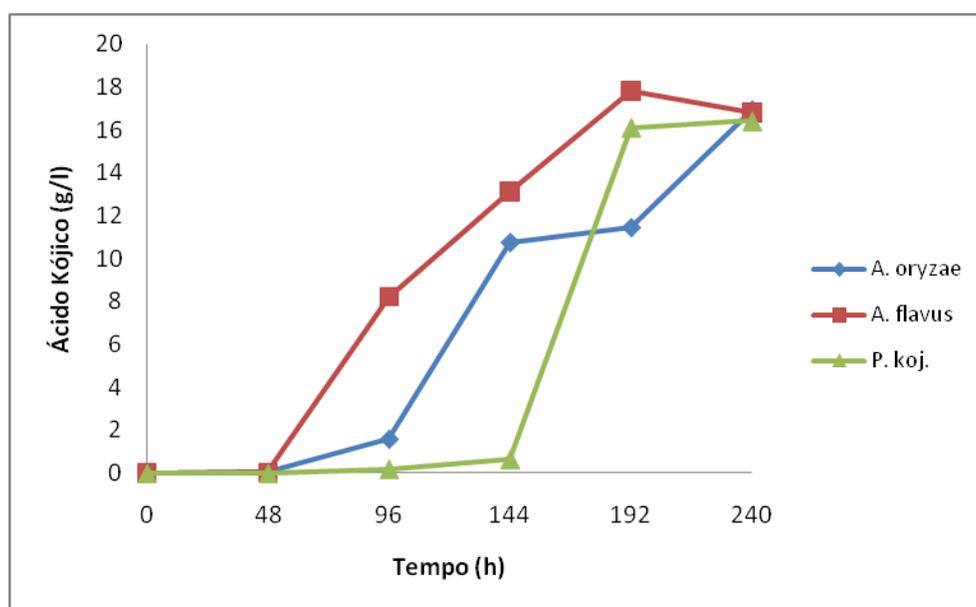
Para a análise do glicerol residual uma alíquota do sobrenadante foi analisada pelo método enzimático colorimétrico da glicerol fostato-oxidase utilizando kit comercial de análise de triacilgliceróis (Laborlab). Deve-se ressaltar que esse método apresentou grandes desvios durante sua utilização, portanto não foi utilizado com freqüência ao longo do projeto.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

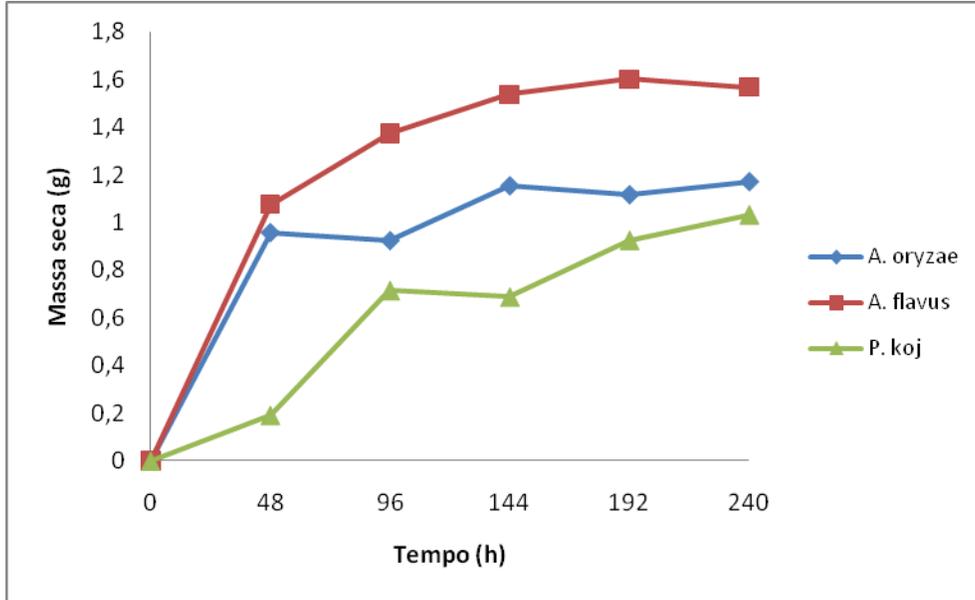
---

### 5.1 Ensaio preliminares: Seleção dos fungos produtores de ácido kójico e curvas de consumo de glicose, produção de biomassa e ácido kójico.

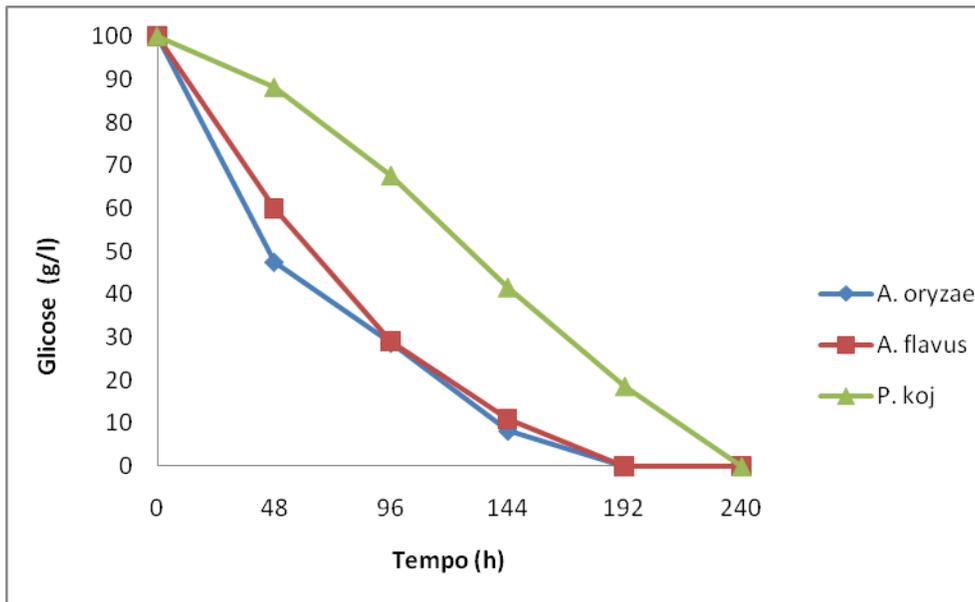
Os resultados dos testes preliminares de produção de ácido kójico, consumo de glicose e produção de biomassa são mostrados a seguir nas Figuras de 5.1 a 5.3.



**Figura 5.1** Produção de ácido kójico durante processo fermentativo para as três linhagens. T: 30 °C; Agit: 150 RPM



**Figura 5.2** Produção de biomassa durante processo fermentativo para as três linhagens. T: 30 °C; Agit: 150 RPM



**Figura 5.3** Consumo de glicose durante processo fermentativo para os 3 fungos estudados. T: 30 °C; Agit: 150 RPM

Através das figuras observa-se que a produção de ácido kójico coincide com o início da fase estacionária.

A linhagem *A. flavus* NRRL 626 apresentou taxas de crescimento celular, consumo de glicose e produção de ácido kójico mais elevadas dentre as três linhagens testadas, chegando à concentração máxima de 17,8 g/L de ácido kójico e 1,60 g/L de biomassa. A concentração de ácido kójico caiu após 192 horas de fermentação.

Após 240 horas os três microrganismos alcançaram valores próximos de concentração de ácido kójico (16,9 g/L *A. oryzae*, 16,8 g/L *A. flavus*, 16,4 g/L *P. kojigenum*). Porém, como já citado, para a linhagem de *A. flavus* o valor máximo foi alcançado após 192 h.

A linhagem *A. flavus var. oryzae* NRRL 484 apresentou taxa de consumo de glicose próxima à de *A. flavus* NRRL 626. Porém a produção de biomassa e ácido kójico foram mais lentas.

A linhagem de *P. kojigenum* apresentou produção de biomassa e consumo de glicose mais lentos e a produção de ácido kójico mais tardia ( a partir de 144h) do que as linhagens de *Aspergillus*. Porém, uma vez iniciada, a produção de ácido kójico foi superior entre 144h e 192h de fermentação (aproximadamente 8 g/L·dia). A concentração de ácido kójico, porém, não apresentou grande variação no período entre 192h e 240h de fermentação (aproximadamente 0,3 g/L) e estabilizou-se próximo ao valor alcançado pelas outras duas linhagens testadas.

### **5.1.1 Seleção do fungo melhor produtor**

Das três linhagens testadas a *A. flavus* NRRL 626 foi escolhida para o estudo de otimização da produção do ácido kójico. A linhagem apresentou taxas de produção de ácido kójico e biomassa mais elevadas e, além disso, apresentou esporulação intensa quando cultivada em meio PDA semi-sólido, característica deficiente nas outras duas linhagens. Essa capacidade de esporulação possibilita a produção de inóculos com maior densidade de esporos e facilita sua padronização.

## 5.2 Ensaio preliminares: Estudo dos Substratos

Os resultados dos estudos preliminares dos substratos sugeridos como alternativos à glicose (fonte de carbono) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio) são mostrados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1.** Produção de ácido kójico a partir de substratos alternativos (g ácido kójico/L) por *A. flavus* NRRL 626. T=30°C; Agit: 150 RPM.

Fontes de C / Fonte N	Tempo (dias)		
	8	16	22
Sacarose / Ext Lev	1,65	14,05	11,6
Melaço de cana-de-açúcar / Ext Lev	-	-	-
Glicerol / Ext Lev	2,81	16,6	18,8
Glicose / AMM	2,3	19,76	20,81

O ensaio contendo melaço de cana-de-açúcar não apresentou produção de ácido kójico detectável pelo método de BENTLEY, mesmo sendo observada grande geração de biomassa. Uma hipótese para esse efeito é que a composição variada do melaço pode apresentar inibidores metabólicos da biossíntese de ácido kójico.

O uso do glicerol proporcionou produção de ácido kójico superior à encontrada quando foi utilizada sacarose. Isso o aponta como um candidato economicamente atrativo, devido à crescente disponibilidade do glicerol no mercado e sua conseqüente desvalorização.

### 5.3 Planejamento Plackett Burmann de 12 ensaios usando glicose como fonte de carbono

#### 5.3.1 Produção de ácido fóico em glicose:

O primeiro planejamento experimental utilizando glicose foi feito com faixas estimadas para suas variáveis e, com exceção de um ensaio, não apresentou resultados expressivos de produção de ácido fóico, porém forneceu informações importantes para o ajuste das variáveis e direcionamento dos estudos.

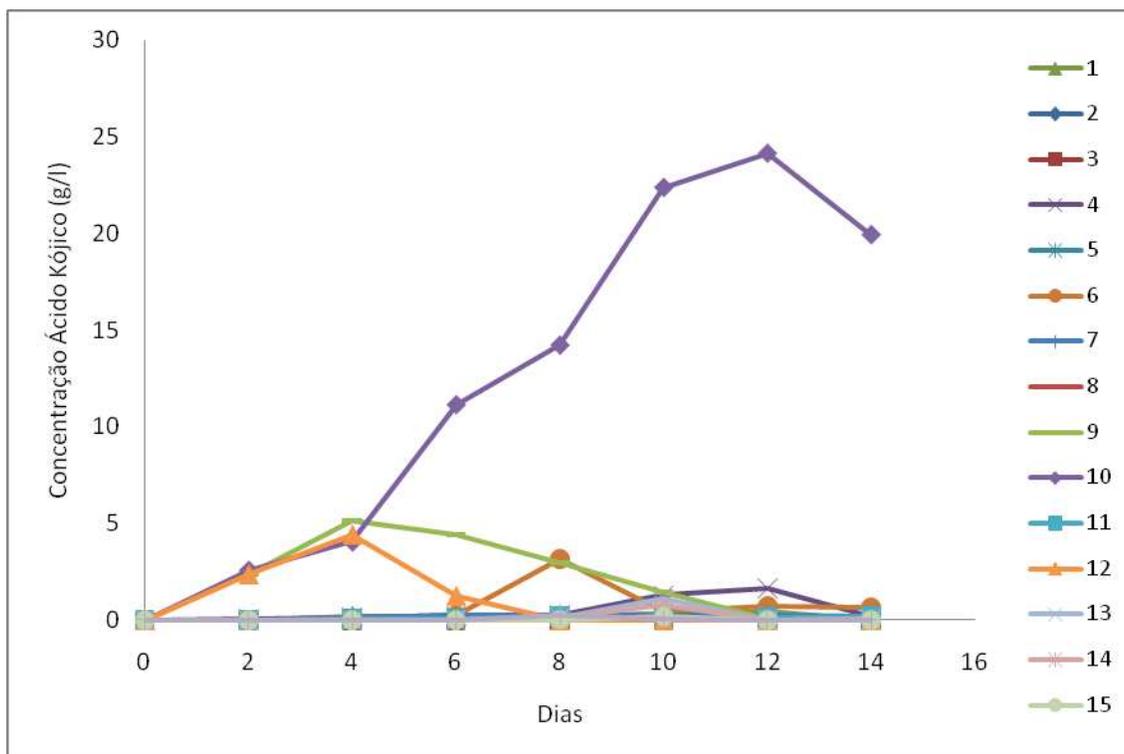
Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.2 e Figura 5.4.

**Tabela 5.2.** Resultados do planejamento PB-12 Glicose (g ácido fóico / L)

Ensaio	Tempo (h)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
1	0	0	0,20	0,22	0,26	0,33	0,44	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0,09
3	0	0	0	0	0,08	0,13	0,14	0,09
4	0	0,09	0,14	0,24	0,24	1,29	1,63	0,22
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0,25	3,18	0,46	0,72	0,64
7	0	0	0,11	0,26	0,29	0,24	0,25	0,21
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	2,37	5,15	4,44	2,97	1,46	0,04	0,03
10	0	2,60	4,06	11,16	14,24	22,39	24,16	19,95
11	0	0	0,06	0,08	0,20	0,07	0,14	0,19
12	0	2,38	4,44	1,27	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0,15	1,10	0	0,07
14	0	0	0	0	0,15	0,82	0	0,04
15	0	0	0	0	0,03	0,21	0	0
16	0	0	0	0	0,23	0,04	0	0

As fermentações foram interrompidas a partir de 14 dias devido à queda na concentração de ácido kójico observada a partir de tal ponto.

Para visualização gráfica, os dados foram organizados em curvas como pode ser observado na Figura 5.4.



**Figura 5.4** Curvas de produção de ácido kójico dos ensaios do planejamento PB-12 Glicose por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM

Observa-se que o ensaio 10 destacou-se dos demais, permitindo alcançar até 19,95 g/L de ácido kójico. Até 96 horas de fermentação os ensaios 9 e 12 apresentaram produção de ácido kójico a taxas semelhantes à apresentada pelo ensaio 10, que alcançou a maior concentração entre todos os ensaios. Porém, para os dois ensaios observou-se um rápido decréscimo da concentração a partir de então. Isso pode estar relacionado ao fato do ensaio 10 conter 3 vezes mais glicose (150 g/L) do que os ensaios 9 e 12 (50 g/L). Após o esgotamento da fonte de carbono é possível que o ácido kójico previamente produzido tenha sido consumido pelo organismo como

fonte de carbono alternativa, o que não teria ocorrido no ensaio 10 até o 12º dia, pois continha glicose em maior quantidade. Apesar da glicose não ter apresentado efeito estatisticamente significativo, este fato aponta para a necessidade de mais estudos de faixas de concentração de glicose mais elevadas, de modo a evitar a escassez de fontes de carbono e impedir que o produto seja utilizado como tal.

### 5.3.2 Análise estatística de efeitos

Para o estudo das variáveis foram calculados os valores dos efeitos e os p-valores correspondentes para avaliar a significância estatística dos resultados. Os valores encontrados se encontram na Tabela 5.3. Para a seleção de variáveis foi utilizado o critério de 10 % de significância (p-valor < 0,1).

**Tabela 5.3.** Efeitos e p-valores das variáveis do planejamento PB-12 Glicose para *A. flavus* NRRL 626.

Tempo	48h		96h		144h		192h		240		288		336	
	Efeit o	p-val												
Glicose	-0,34	0,368	-0,89	0,228	0,97	0,439	2,40	0,138	3,76	0,194	4,40	0,178	4,40	0,178
Ext Lev	-1,24	0,008	-2,30	0,009	-2,79	0,045	-2,33	0,148	-4,10	0,161	-4,17	0,200	-4,17	0,200
AMM	-1,21	0,009	-2,21	0,011	-2,66	0,053	-2,23	0,164	-3,58	0,215	-3,52	0,272	-3,52	0,272
MgSO <sub>4</sub>	-0,42	0,280	-0,56	0,438	-1,34	0,292	-2,41	0,136	-3,40	0,237	-3,94	0,223	-3,94	0,223
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42	0,283	0,71	0,331	2,30	0,087	3,25	0,055	3,75	0,196	3,77	0,243	3,77	0,243
pH	0,45	0,251	0,81	0,268	2,49	0,067	3,47	0,043	4,24	0,149	4,39	0,179	4,39	0,179

Da análise estatística dos efeitos, verifica-se que a 48, 96 e 144 horas o extrato de levedura e a água de maceração de milho apresentaram efeitos negativos estatisticamente significativos a 10% de significância. Segundo KWAK & RHEE (1992) a produção de ácido kójico se inicia a partir do esgotamento do nitrogênio no meio, portanto um excesso de fontes de nitrogênio pode ter impedido ou retardado a sua produção. A observação da planilha de resultados também mostra que o ensaio com a melhor produção (10) continha apenas 5 g/L de água de maceração de milho, ou seja,

a menor concentração de fontes de nitrogênio estudada. Isso indicou que para os próximos experimentos a faixa de concentração do nitrogênio deveria ser reduzida de modo a estimular a biossíntese do ácido kójico. Além disso, considerando a redução da concentração de nitrogênio foi mais indicado utilizar somente uma fonte de nitrogênio. Como a água de maceração de milho e o extrato de levedura apresentaram efeitos semelhantes, a fonte escolhida para os ensaios seguintes foi a água de maceração de milho, por seu custo menor em relação ao extrato de levedura.

Após 144 horas e 192h observaram-se efeitos positivos estatisticamente significativos ao nível de significância de 10% para o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e o pH. Pela análise da matriz de resultados observa-se que os ensaios a pH 3,0 não incorreram em boa produção de ácido kójico, mostrando que o baixo valor de pH deve ter inibido a sua produção. O efeito positivo do  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pode indicar que o sal desempenha importante papel na produção de ácido kójico ou tem efeito positivo sobre o crescimento do fungo. Para os experimentos seguintes os valores de pH e concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram avaliados em faixas mais elevadas.

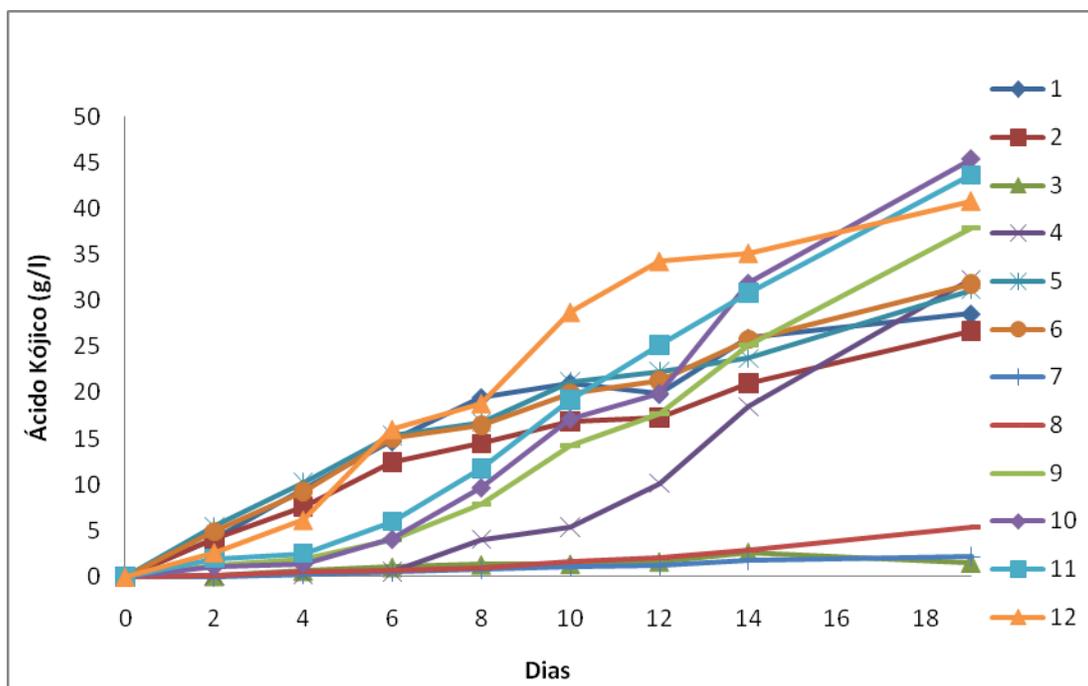
## **5.4 Planejamento fracionado $2^{4-1}$ usando glicose como fonte de carbono**

### **5.4.1 Resultados dos ensaios**

O planejamento fracionado de 4 variáveis apresentou resultados bastante elevados de produção de ácido kójico (Tabela 5.4), o que indica um correto ajuste das faixas estudadas para as variáveis em relação ao planejamento anterior. Para visualização gráfica os dados estão também expressos na Figura 5.5.

**Tabela 5.4.** Resultados do planejamento fracionado  $2^{4-1}$  Glicose (g ácido kójico / L) de *A. flavus* NRRL 626

Ensaio	Tempo (horas)									
	0	48	96	144	192	240	288	336	456	
1	0	4,17	9,58	14,73	19,50	21,08	19,87	25,96	28,59	
2	0	4,10	7,59	12,44	14,46	16,87	17,24	21,00	26,71	
3	0	0,09	0,65	1,04	1,31	1,38	1,63	2,66	1,55	
4	0	0,10	0,27	0,53	4,05	5,38	10,15	18,48	32,31	
5	0	5,45	10,18	15,37	16,79	21,15	22,31	23,74	31,18	
6	0	4,89	9,28	15,07	16,46	19,91	21,30	25,77	31,86	
7	0	0	0,23	0,47	0,74	1,11	1,15	1,71	2,17	
8	0	0,06	0,56	0,73	0,97	1,62	2,01	2,88	5,38	
9	0	1,27	1,90	4,02	7,82	14,20	17,69	25,13	37,94	
10	0	1,11	1,40	4,10	9,69	17,17	19,95	31,89	45,41	
11	0	1,95	2,53	5,98	11,76	19,23	25,21	30,88	43,69	
12	0	2,65	6,16	16,00	18,86	28,74	34,26	35,16	40,83	



**Figura 5.5** Curvas dos ensaios do planejamento fracionado  $2^{4-1}$  Glicose de *A. flavus* NRRL 626 . T: 30 °C; Agit: 150 RPM

Após a análise dos resultados do 1º planejamento experimental e as adequações das faixas de cada variável, o planejamento fatorial fracionado de 4 variáveis apresentou resultados muito mais expressivos com ensaios alcançando até 45 g/L de ácido kójico após 19 dias de fermentação.

Como pode ser observado na Tabela 5.5 os valores de biomassa foram proporcionais à concentração de água de maceração de milho utilizada na composição do meio.

**Tabela 5.5** Valores de biomassa seca de *A. flavus* NRRL 626 do planejamento fracionado 2<sup>4-1</sup> Glicose

Ensaio	AMM (g/L)	Massa Seca
1	2	0,5215
2	2	0,5537
3	6	1,6191
4	6	2,3202
5	2	0,9315
6	2	0,8662
7	6	1,3454
8	6	2,2208
9	4	1,2974
10	4	1,27430
11	4	1,28900
12	4	1,26120

#### 5.4.2 Análise Estatística

A análise dos efeitos foi realizada para os resultados dos tempos de fermentação de 48h a 336h. A análise de efeitos do tempo de fermentação de 456h não indicou nenhuma variável como estatisticamente significativa ao nível de significância de 10%. O longo tempo de fermentação pode ter reduzido as diferenças entre os ensaios, já que à medida que os ensaios que apresentaram taxas de produção

mais elevadas se estabilizavam, os que apresentaram produção mais lenta alcançavam valores de concentração mais altos, conforme pode ser observado na Tabela 5.6.

**Tabela 5.6.** Efeitos e p-valores das variáveis estudadas no planejamento fracionado Glicose

Tempo	48h		96h		144h		192h		240		288		336	
	Efeito	p-val												
Glicose	-0,14	0,773	-0,73	0,620	-0,71	0,628	-0,60	0,647	-0,24	0,939	1,43	0,836	3,52	0,625
AMM	-4,59	0,000	-8,73	0,000	-13,71	0,000	-15,03	0,000	-17,38	0,001	-16,45	0,043	-17,69	0,041
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,48	0,343	0,54	0,715	0,73	0,622	-1,09	0,415	-0,23	0,942	-0,53	0,939	-3,50	0,626
pH	0,14	0,782	-0,10	0,948	-0,31	0,833	-1,80	0,199	-1,61	0,605	-2,32	0,738	-5,41	0,458

Para as faixas estudadas em todos os tempos de fermentação avaliados, somente a concentração de água de maceração de milho foi estatisticamente significativa ao nível de significância de 10%. O efeito negativo observado demonstra que menores concentrações de água de maceração de milho são mais adequadas à produção de ácido kójico. Porém, o que se observou é que os pontos centrais (9, 10, 11 e 12 com concentração de 6 g/L de AMM) apresentaram produção final maior do que os ensaios 1, 2, 5 e 6, que continham 2 g/L, ainda que menos acelerada. Ou seja, os ensaios com menor concentração de água de maceração de milho produziram o ácido kójico mais rapidamente, mas não atingiram a concentração final alcançada pelos pontos centrais (em torno de 40 g/L).

A concentração final de ácido kójico está relacionada com a quantidade de biomassa, que foi proporcional à concentração da fonte de nitrogênio. Porém, a partir de certa concentração o excesso de nitrogênio é prejudicial à produção de ácido kójico, pois, como já citado anteriormente, essa biossíntese está relacionada ao esgotamento do nitrogênio no meio.

Para os próximos ensaios concluiu-se que testes deveriam ser feitos entre 2 e 6 g/L de água de maceração de milho de modo a determinar um ponto de equilíbrio da concentração da fonte de nitrogênio que fosse esgotada em curto intervalo de

tempo, para não retardar a produção de ácido kójico e que possibilitasse a produção de biomassa suficiente para gerar altas concentrações de ácido kójico ao final da fermentação.

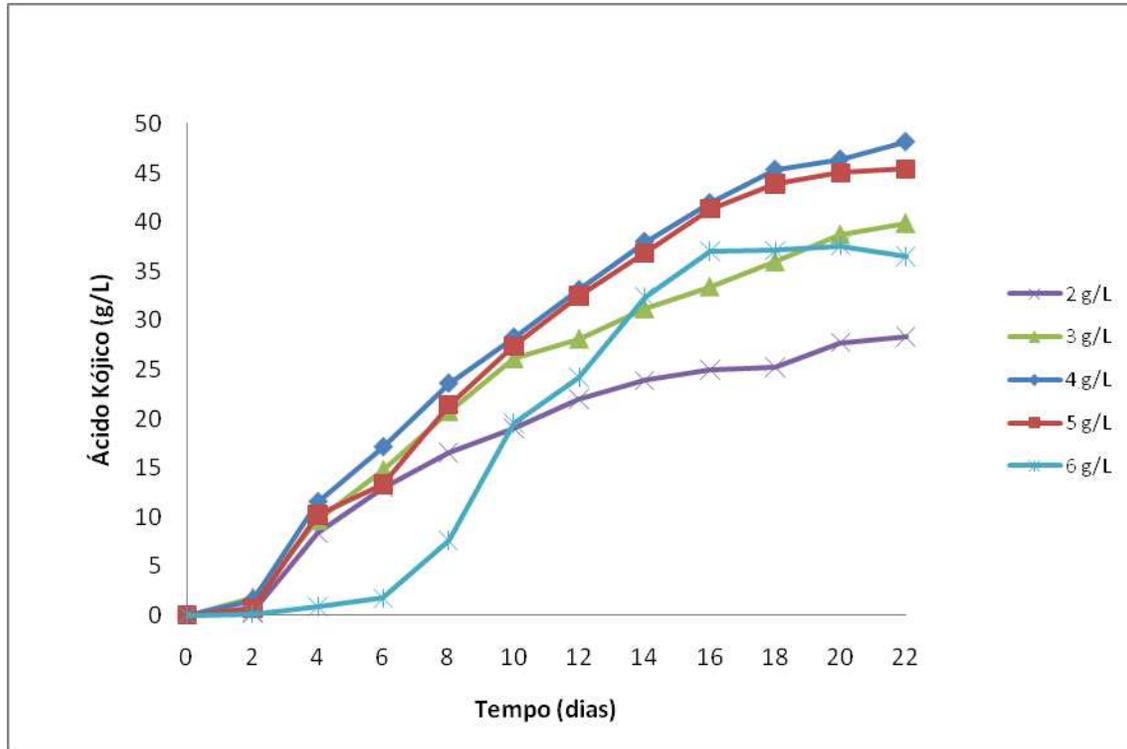
## 5.5 Curvas de concentração de água de maceração de milho

Os resultados dos ensaios com a variação da concentração da água de maceração de milho alcançaram valores de até 48 g/L de ácido kójico com produtividade de até 0,117 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 10 dias de fermentação e 0,091 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 22 dias de fermentação. A variação dos dados indica que a faixa estudada contém um ponto de máxima produção, como pode ser observado na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7** Resultados dos ensaios do teste de concentração de AMM (g ácido kójico/L)

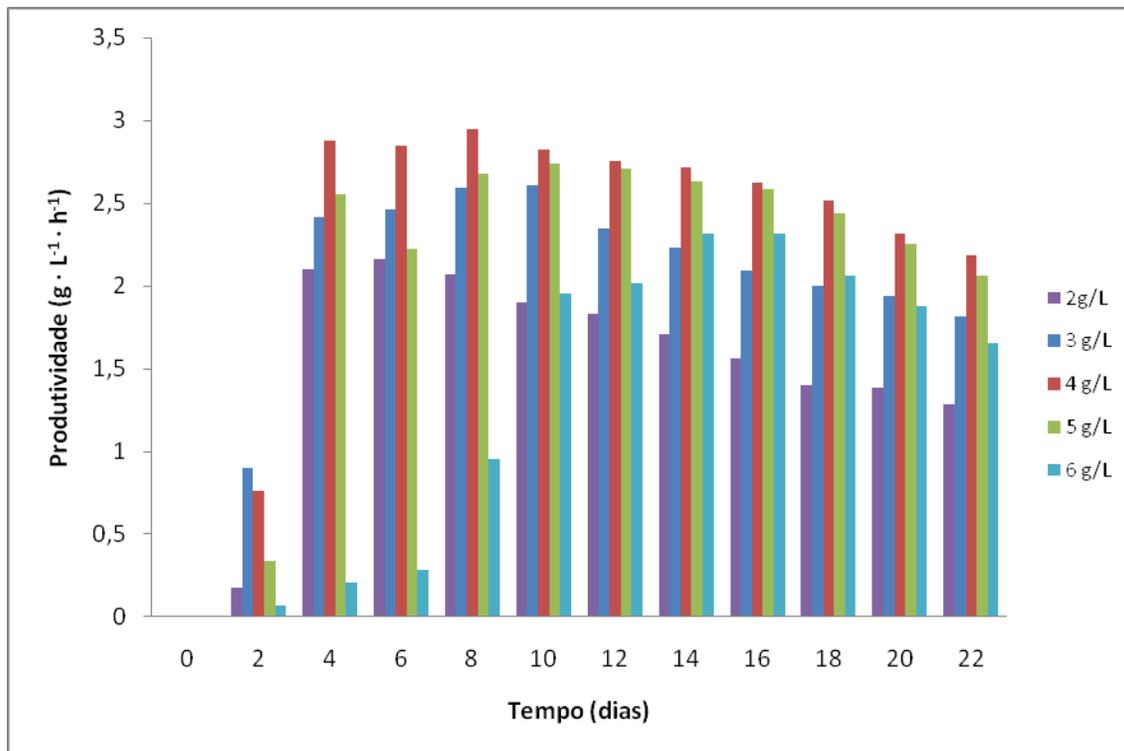
[ ] AMM (g/L)	Tempo de fermentação (dias)											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
2	0	0,35	8,41	12,97	16,58	19,03	21,96	23,88	24,97	25,27	27,74	28,35
3	0	1,79	9,67	14,77	20,72	26,11	28,14	31,22	33,45	36,01	38,78	39,93
4	0	1,52	11,51	17,09	23,57	28,26	33,09	37,98	41,92	45,31	46,37	48,14
5	0	0,67	10,22	13,33	21,40	27,39	32,51	36,85	41,37	43,92	45,03	45,40
6	0	0,14	0,83	1,72	7,63	19,54	24,19	32,42	37,04	37,11	37,60	36,47

A fermentação foi mantida até 22 dias, pois a partir de então a concentração de ácido kójico começou a decair. Os perfis de produção podem ser visualizados na Figura 5.6.



**Figura 5.6** Curvas dos ensaios do teste de concentrações de AMM por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM

Para se realizar o ajuste de um modelo que relacione a produção e a concentração de água de maceração de milho foi necessário escolher um tempo de fermentação adequado. O critério foi a produtividade média calculada como a média da produtividade total (g ácido kójico / L / dia) de todos os ensaios. Os dados podem ser visualizados na Figura 5.7.



**Figura 5.7** Produtividades em ácido kójico a partir dos ensaios do teste de concentrações de AMM

Observa-se através da Tabela 5.7 e Figuras 5.6 e 5.7 que tanto a produção total quanto a produtividade ao longo de quase todo o tempo de fermentação do ensaio contendo 4 g/L de concentração de água de maceração de milho foi superior. Observa-se que a produção do ensaio contendo 6 g/L foi tardia em relação aos outros ensaios ocorrendo aumento de produtividade dos dias 6 a 10.

A produtividade média total foi calculada como a média da produtividade dos 6 ensaios. Sob esse critério o tempo de fermentação de 10 dias foi escolhido para a criação do modelo.

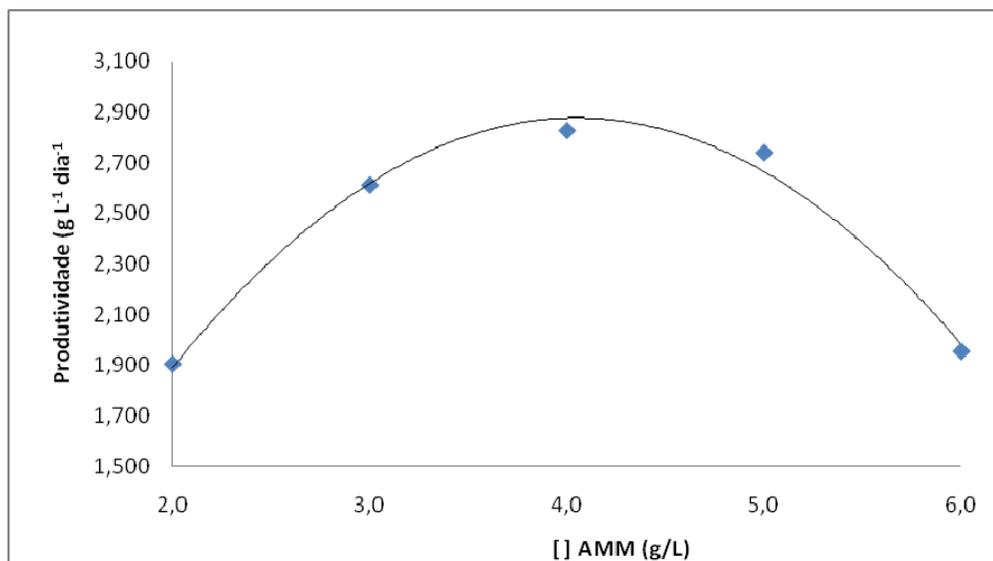
### 5.5.1 Análise Estatística

Para avaliação da melhor condição para a produção de ácido kójico foi ajustada uma equação de 2º grau para relacionar a concentração de água de maceração de milho e a produtividade média. Os dados utilizados seguem na Tabela 5.8.

**Tabela 5.8** Dados de produtividade média do 10º dia de fermentação

AMM (g/L)	Produtividade média (g L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )
2,0	1,903
3,0	2,611
4,0	2,826
5,0	2,739
6,0	1,954

O ajuste da curva experimental foi obtido com o software Statistica 7.0 e pode ser visualizado na Figura 5.8.



**Figura 5.8** Ajuste polinomial para os dados de produtividade

A equação definida pelo ajuste dos dados foi:

$$\text{Produtividade} = -0,2348 \times C^2 + 1,9015 \times C - 0,9724$$

Vale ressaltar que esta equação é somente válida para as faixas estudadas das variáveis.

A validade da equação pôde ser verificada pelo valor do coeficiente de determinação  $R^2$  e pelo teste de significância do modelo.

$$R^2 = 0,9885$$

**Tabela 5.9** Teste de significância do modelo

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F	p-valor
Regressão	0,777286	2	0,388643	85,61631	0,011545
Resíduo	0,009079	2	0,004539		

O teste de significância mostra que o modelo criado é válido a nível de significância de 5% (p-valor < 0,05).

Derivando a equação e igualando-se a 0 para encontrar o ponto de máxima produtividade chegou-se ao resultado de 4,05 g/L de água de maceração de milho, com valor predito de 2,88 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de produtividade máxima ou 0,12 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Esse resultado é coerente com valores máximos encontrados em literatura tais como 0,125 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para *Aspergillus flavus* utilizando glicose e extrato de levedura (ROSFARIZAN e ARIFF, 2000), 0,143 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para *Aspergillus parasiticus* utilizando glicose e extrato de levedura.

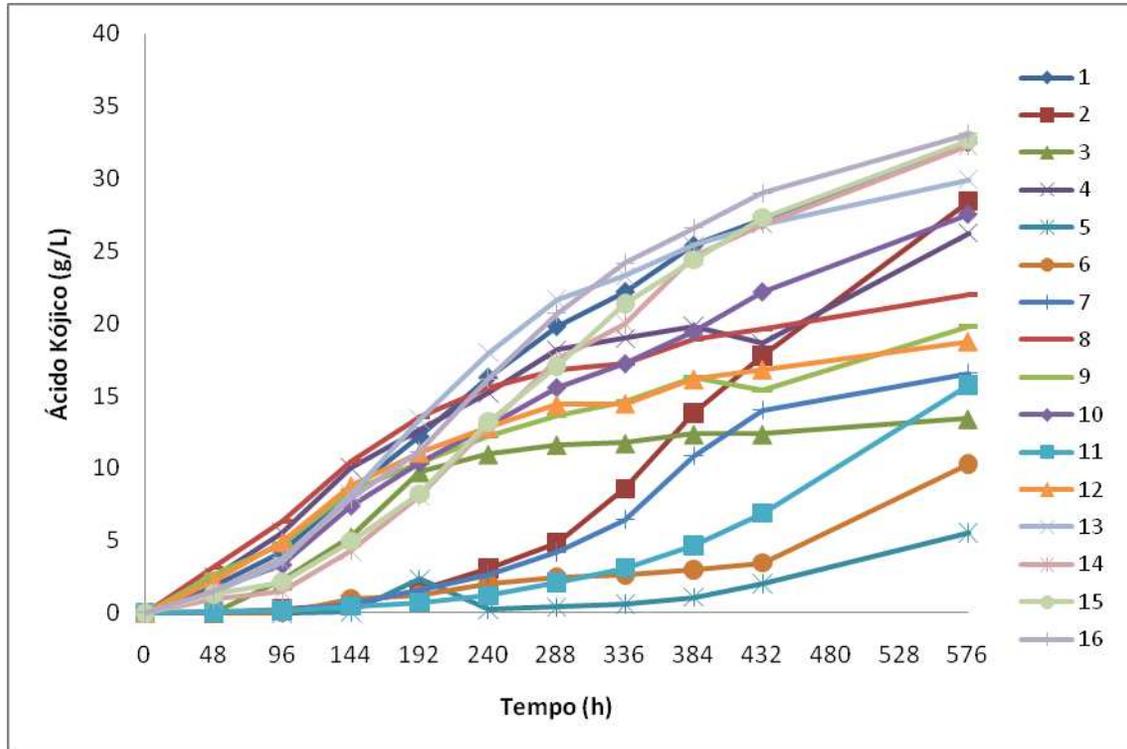
## 5.6 Planejamento Experimental Plackett Burmann 12 variáveis com Glicerol

Os dados relativos ao planejamento experimental utilizando o glicerol como fonte de carbono seguem abaixo na Tabela 5.10 e Figura 5.9.

**Tabela 5.10** Resultados dos ensaios do planejamento PB12 Glicerol

Ensaio	Tempo fermentação (dias)									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
1	0	1,886	4,211	8,399	12,211	16,287	19,810	22,194	25,387	27,148
2	0	0	0,252	0,576	1,570	3,052	4,872	8,583	13,792	17,755
3	0	0	2,254	5,261	9,732	10,967	11,628	11,738	12,362	12,362
4	0	2,434	5,525	10,013	12,624	15,187	18,159	18,966	19,773	18,599
5	0	0	0	0,080	2,333	0,249	0,392	0,631	1,086	2,007
6	0	0	0,030	0,994	1,255	2,036	2,487	2,601	2,975	3,456
7	0	0,068	0,203	0,638	1,544	2,678	4,201	6,454	10,857	14,013
8	0	3,122	6,314	10,490	13,526	15,554	16,801	17,241	18,892	19,626
9	0	2,663	4,774	8,399	10,333	12,252	13,609	14,563	16,287	15,370
10	0	1,615	3,347	7,408	10,371	12,949	15,554	17,205	19,406	22,158
11	0	0,079	0,166	0,462	0,729	1,188	2,128	3,118	4,667	6,895
12	0	2,220	4,887	8,766	11,047	12,802	14,380	14,453	16,141	16,801
13	0	1,424	3,497	8,179	13,375	17,975	21,607	23,259	25,387	26,854
14	0	0,932	1,507	4,326	8,080	12,912	17,461	19,956	24,653	26,854
15	0	1,311	2,145	4,950	8,230	13,205	17,058	21,387	24,396	27,294
16	0	1,507	3,798	7,885	11,159	16,177	20,690	24,139	26,597	28,982

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que o *A. flavus* NRRL 626 conseguiu utilizar o glicerol como única fonte de carbono para o metabolismo basal e para a produção de ácido kójico de forma semelhante ao observado com a glicose.



**Figura 5.9** Curvas dos ensaios do planejamento PB12-Glicerol por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM

De forma análoga ao observado para os ensaios com glicose, o aumento da concentração de água de maceração de milho retardou o início da produção do ácido kójico. A maior produção final após 18 dias foi observada no ponto central 16. Os pontos centrais apresentaram média de 27,5 g/L ao final de 18 dias de fermentação, resultado superior ao apresentado por todos os outros ensaios. A menor concentração final de ácido kójico foi observada no ensaio 5 com 2,0 g/L.

### 5.6.1 Análise estatística

**Tabela 5.11** Efeitos e p-valores do planejamento PB-12 Glicerol

Tempo (d)	2		4		6		8		10		12		14	
Variável	Efeito	p-val												
Glicerol	-0,40	0,02	-0,87	0,11	0,22	0,88	-1,09	0,53	-0,95	0,71	-0,25	0,94	0,44	0,91
AMM	-2,37	0,00	-4,36	0,00	-6,26	0,00	-8,82	0,00	-10,81	0,00	-12,10	0,00	-11,92	0,01
MgSO <sub>4</sub>	0,16	0,33	0,85	0,12	3,00	0,06	2,42	0,18	3,37	0,20	3,69	0,28	3,44	0,39
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,41	0,02	0,36	0,49	1,13	0,44	-0,57	0,74	-1,21	0,64	-1,33	0,69	-0,81	0,84
pH	0,09	0,58	0,25	0,64	1,94	0,20	1,30	0,46	0,47	0,85	-0,51	0,88	-1,63	0,68

Da análise de efeitos apresentada na Tabela 5.11 verifica-se que a única variável estatisticamente significativa a nível de significância de 10% foi a água de maceração de milho com efeito fortemente negativo. Os sais MgSO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> apresentaram efeitos significativos a 48 e 144 horas. A exemplo do observado para a fermentação utilizando glicose como fonte de carbono, o KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pode ter efeito direto sobre a produção de ácido kójico ou indireto, favorecendo o desenvolvimento celular do fungo. Já o efeito positivo do MgSO<sub>4</sub> não foi observado para a fermentação utilizando glicose e pode estar relacionado com alguma via metabólica específica para o aproveitamento do glicerol pelo microrganismo. Porém, a adição desses sais não parece ser essencial para o crescimento do organismo e a produção de ácido kójico, pois ensaios sem adição de sal, como o ensaio 10, também alcançaram concentrações elevadas de ácido kójico.

## 5.7 Delineamento composto central rotacional de 3 variáveis

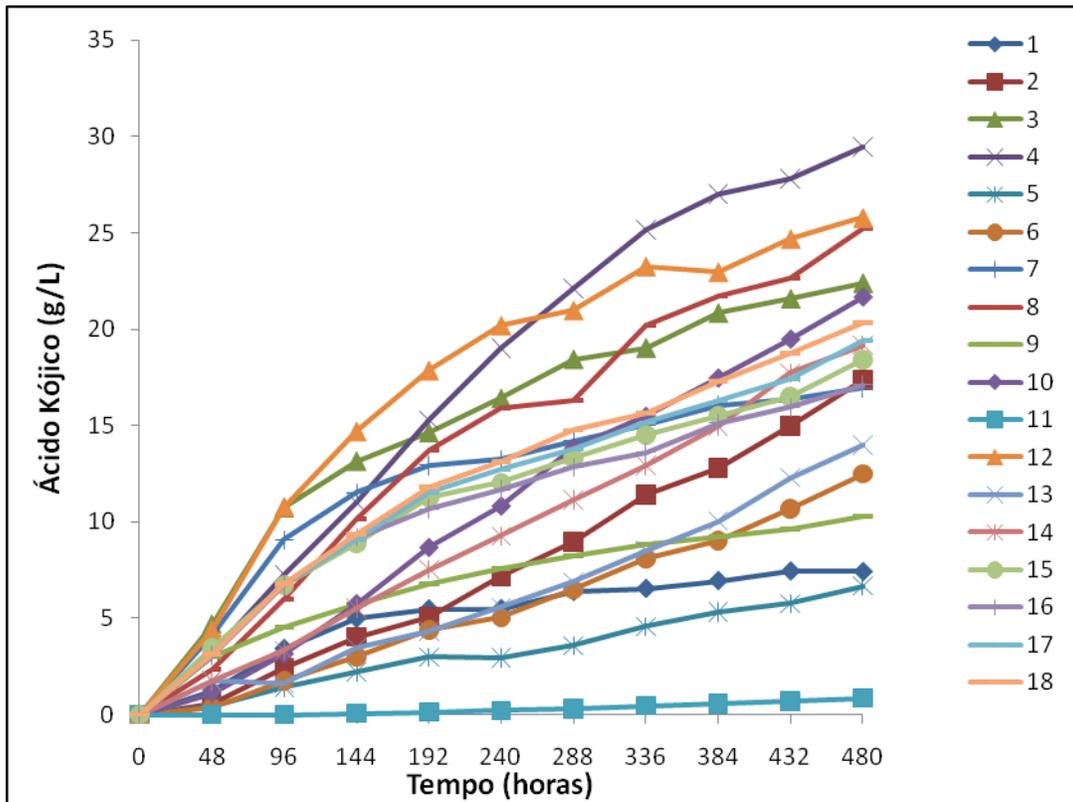
Após os resultados do planejamento Plackett Burmann para o glicerol procedeu-se um planejamento do tipo DCCR para 3 variáveis. A água de maceração de milho foi escolhida devido ao forte efeito observado sobre a produção de ácido kójico durante os ensaios anteriores. A variável glicerol foi escolhida apesar de não ter apresentado efeito estatístico significativo na etapa anterior pois é o substrato principal para a síntese do ácido kójico. O fato de não ter apresentado efeito estatisticamente significativo pode estar relacionado com as faixas de concentração estudadas. Assim, para o planejamento DCCR, as faixas de estudo foram alargadas (80 a 220 g/L) para possibilitar a observação do comportamento em condições extremas, desde a escassez até o excesso da fonte de carbono. O pH também foi selecionado para planejamento DCCR, pois a variação das concentrações dos substratos podem afetar significativamente o pH do meio e a absorção dos nutrientes. Os sais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$  apresentaram efeitos significativos durante os primeiros dias de fermentação para o planejamento PB 12. Porém, a ausência desses sais não impediu a produção de altas concentrações de ácido kójico em alguns dos ensaios, o que indica um papel relevante mas não limitante na produção de ácido kójico. Para o planejamento DCCR esses sais foram adicionados na concentração de 1 g/L a todos os ensaios e não foram selecionados como variável de estudo.

Os resultados dos ensaios do DCCR podem ser visualizados na Tabela 5.12.

**Tabela 5.12** Matriz de resultados do planejamento DCCR 3 com glicerol como fonte de carbono

Ens	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1	0	1,253	3,420	4,976	5,475	5,490	6,370	6,528	6,939	7,434	7,408
2	0	0,569	2,442	4,034	5,090	7,177	8,979	11,397	12,784	14,981	17,351
3	0	4,685	10,729	13,147	14,629	16,408	18,441	19,028	20,837	21,582	22,400
4	0	3,218	7,258	11,015	15,282	19,021	22,114	25,170	27,019	27,801	29,444
5	0	0,463	1,429	2,218	2,980	2,954	3,585	4,576	5,343	5,768	6,678
6	0	0,378	1,748	3,026	4,396	5,038	6,484	8,106	9,037	10,681	12,497
7	0	4,129	9,074	11,510	12,945	13,227	14,207	15,025	16,027	16,342	16,937
8	0	2,343	5,970	10,149	13,734	15,880	16,284	20,184	21,751	22,627	25,210
9	0	3,020	4,539	5,713	6,803	7,588	8,219	8,861	9,206	9,628	10,281
10	0	1,119	3,141	5,750	8,667	10,821	13,848	15,484	17,476	19,501	21,688
11	0	0,000	0,000	0,059	0,133	0,213	0,310	0,457	0,554	0,692	0,854
12	0	4,381	10,773	14,695	17,861	20,188	20,980	23,273	22,969	24,697	25,794
13	0	1,787	1,593	3,465	4,319	5,567	6,887	8,524	10,046	12,292	13,969
14	0	1,755	3,314	5,526	7,529	9,261	11,132	12,938	14,974	17,729	19,168
15	0	3,463	6,730	8,913	11,261	12,046	13,319	14,512	15,535	16,486	18,419
16	0	3,091	6,722	9,188	10,681	11,661	12,835	13,609	15,124	15,939	17,117
17	0	3,150	6,766	9,103	11,514	12,750	13,814	15,154	16,284	17,450	19,388
18	0	3,143	6,770	9,353	11,782	13,099	14,750	15,638	17,267	18,727	20,360

Da Figura 5.10 abaixo observa-se que o ensaio 4 atingiu a maior concentração de ácido kójico após 20 dias de fermentação. Porém, o ensaio 12 apresentou taxa de produção maior até o 10º dia de fermentação, a partir do qual apresentou decaimento. Essa queda na taxa de produção provavelmente se deve ao esgotamento da fonte de carbono, que se encontrava em menor concentração no ensaio 12 (150 g/L) do que no ensaio 4 (192 g/L). É interessante notar que o ensaio 12 foi o que continha maior concentração da fonte de nitrogênio, AMM, indicando efeito positivo dessa variável.



**Figura 5.10** Resultados do planejamento DCCR 3 variáveis Glicerol para *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM

Pode-se observar também que os ensaios com menor produção de ácido kójico foram o ensaio 11, que continha a menor concentração de AMM (1 g/L), e os ensaios 1 e 5 que continham baixas concentrações de glicerol e AMM (glicerol: 80 g/L e AMM: 2,2 g/L).

### 5.7.1 Análise estatística

Foi feita a análise dos efeitos das variáveis utilizando o teste t de Student para determinar a significância estatística dos mesmos. Para o Delineamento Central Composicional Rotacional foram analisados os fatores lineares e quadráticos (<sup>2</sup>) para cada variável assim como a interação entre elas (V1 X V2). A análise foi realizada para

todos os tempos de fermentação. Abaixo, na Tabela 5.13, está descrita a análise dos efeitos até o 14º dia de fermentação.

**Tabela 5.13** Análise de efeitos do planejamento DCCR de 3 variáveis Glicerol

Tempo (d)	2		4		6		8		10		12		14	
Variável	Efeito	p-val												
Glicerol	-1,06	0,00	-1,40	0,08	-0,52	0,55	0,82	0,41	2,12	0,09	3,03	0,06	4,52	0,01
Glicerol <sup>2</sup>	-0,72	0,00	-1,39	0,09	-1,61	0,10	-1,66	0,13	-1,42	0,26	-0,99	0,50	-0,79	0,60
AMM	2,79	0,00	6,17	0,00	8,23	0,00	10,03	0,00	11,35	0,00	11,77	0,00	12,77	0,00
AMM <sup>2</sup>	-0,64	0,00	-0,30	0,70	-0,45	0,62	-0,77	0,46	-0,72	0,55	-1,26	0,40	-1,01	0,51
pH	-0,36	0,05	-0,40	0,58	-0,41	0,63	-0,15	0,88	-0,70	0,55	-1,20	0,40	-1,00	0,50
pH <sup>2</sup>	-0,94	0,00	-2,37	0,01	-2,49	0,02	-2,95	0,02	-2,69	0,05	-2,42	0,12	-1,81	0,25
Glic x AMM	-0,62	0,02	-1,48	0,15	-0,84	0,46	0,10	0,94	0,37	0,80	0,06	0,97	0,73	0,70
Glic x pH	0,07	0,74	0,42	0,66	0,63	0,58	0,48	0,71	0,11	0,94	-0,33	0,86	-0,58	0,76
AMM x pH	-0,11	0,60	-0,06	0,95	0,32	0,78	-0,01	0,99	-0,41	0,78	-1,20	0,52	-0,94	0,62

Na Tabela 5.13 pode ser observado que após 48 horas as 3 variáveis foram estatisticamente significativas a 5% de significância tanto para os fatores lineares quanto para os quadráticos. Até 48 horas a produção de ácido kójico ainda é bastante reduzida e associada ao crescimento do organismo, fato este que pode explicar a significância apresentada pelas 3 variáveis. A medida que a taxa de produção acelera, os fatores que afetam primordialmente o crescimento do organismo e não a produção do ácido kójico passam a não apresentar a mesma significância observada nas horas iniciais. Pode se observar ainda que após 48 horas o efeito do componente linear do glicerol apresenta efeito negativo estatisticamente significativo. A partir de 96h de fermentação o efeito do glicerol passa a aumentar até apresentar significância estatística a partir do 8º dia de produção. Uma possível explicação para esse fenômeno seria que os ensaios contendo as maiores concentrações de glicerol tais como os ensaios 2, 6, 8 e 10 (+1, +1, +1 e +1,68, respectivamente) apresentaram menor produção de ácido kójico nos 4 primeiros dias, possivelmente devido a um efeito inibitório da alta concentração da fonte de carbono. Além disso ocorreu queda na taxa

de produção nos ensaios contendo menor concentração de glicerol entre o 6º e o 8º dia de produção. Essa queda é observada com clareza na Figura 5.10 para os ensaios 1, 3, 7 e 9, que possuíam respectivamente os níveis -1, -1, -1 e -1,68 de concentração de glicerol. Isso indica que o esgotamento das reservas de carbono afetou negativamente a produção do ácido kójico. Da Tabela 5.13 observa-se também que o fator linear da AMM apresentou efeito positivo estatisticamente significativo durante todo o tempo de fermentação mostrando que concentrações mais altas de AMM são benéficas à produção de ácido kójico. Para o pH apenas o fator quadrático apresentou efeito estatisticamente significativo até o 10º dia de fermentação, o que indica efeito não linear sobre a produção de ácido kójico.

Para a análise das superfícies de resposta foram utilizados os resultados obtidos para o 10º dia de fermentação. O parâmetro linear do glicerol apresentou significância estatística até o 8º dia e do 14º ao 20º dia de fermentação, o que mostra que possui papel importante sobre a produção de ácido kójico. Por isso, ainda que a análise de efeitos do 10º dia de fermentação não tenha apontado significância estatística a 5% de significância para o glicerol, esse parâmetro foi considerado para o cálculo dos coeficientes do modelo. Também foram considerados os parâmetros linear da AMM e quadrático do pH inicial, cujos efeitos apresentaram significância estatística a 5% no 10º dia de fermentação. Os coeficientes calculados para o modelo seguem na Tabela 5.14.

**Tabela 5.14** Coeficientes do modelo para o planej. DCCR de 3 variáveis Glicerol

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t</b>	<b>p-valor</b>
Média	11,3450	0,5503	20,6144	0,0000
Glicerol (L)	1,0598	0,4763	2,2250	0,0430
AMM (L)	5,6726	0,4763	11,9101	0,0000
pH (Q)	-1,1584	0,4766	-2,4305	0,0291

O modelo considerando os coeficientes calculados pode ser descrito como:

$$\text{Ácido Kójico}(240\text{horas}) = 11,3450 + 1,0598 \times \text{Glic} + 5,6726 \times \text{AMM} - 1,1584 \times \text{pH}^2$$

Para determinar a validade do modelo calculado foram calculados a Tabela ANOVA (Tabela 5.15) e o coeficiente de determinação  $R^2$  considerando os dados avaliados.

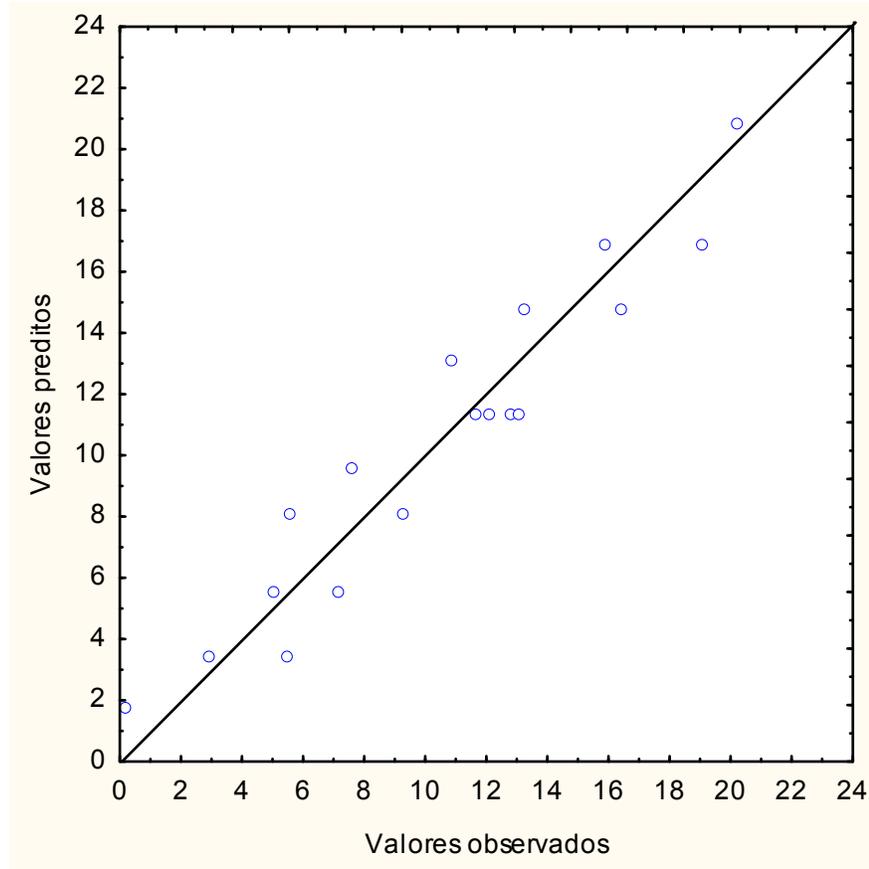
**Tabela 5.15** Tabela ANOVA para avaliação da validade do modelo DCCR 3 variáveis Glicerol

Fonte de variação	SQ	gl	QM	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab	p-valor
Regressão	454,7985	2	227,3992	55,3074	3,6823	15,0197	1,2E-07
Resíduo	61,6733	15	4,1116				
Total	516,4718	17					

$$R^2 = 0,8806$$

Da Tabela ANOVA observa-se que o teste de t de Student para a regressão foi estatisticamente significativo ao nível de significância de 5%, o que demonstra a validade do modelo. Além disso o coeficiente de determinação  $R^2$  de, aproximadamente 0,88 também corrobora a validade do modelo.

Na Figura 5.11 pode-se observar os valores preditos pelo modelo contra os valores experimentais para melhor visualização da adequação do modelo.



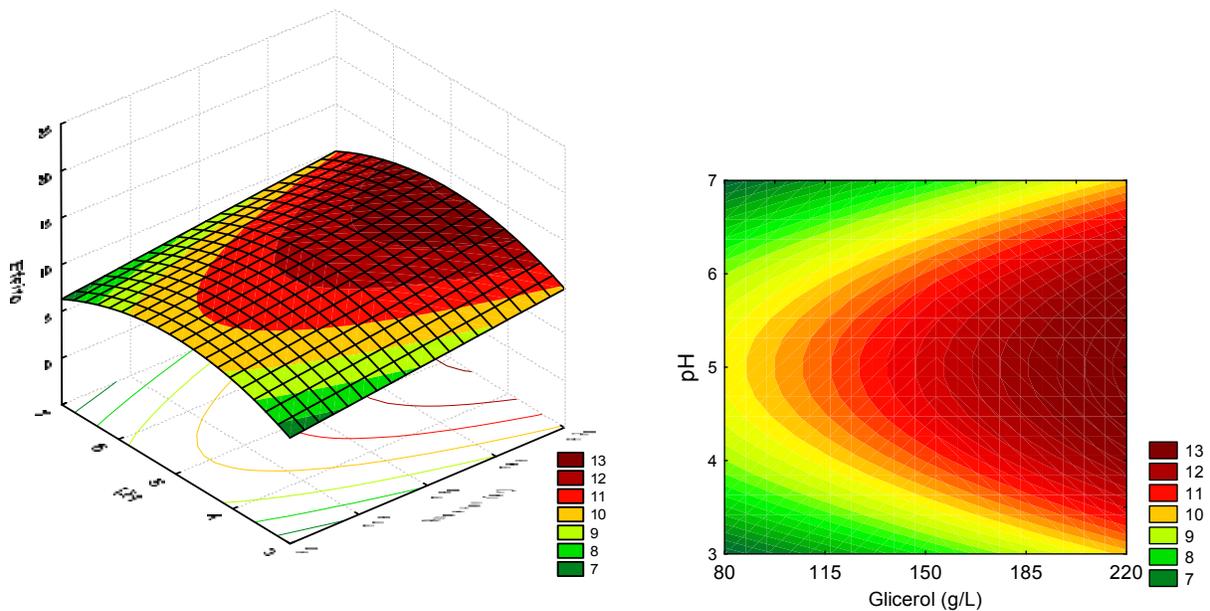
**Figura 5.11** Valores preditos pelo modelo vs valores experimentais

É possível observar que o modelo gerou respostas próximas aos valores experimentais correspondentes, pois os pontos se situam próximos à reta de coeficiente angular 1.

Para observar o comportamento da produção de ácido kójico em relação às variáveis do modelo procedeu-se a análise das superfícies de resposta.

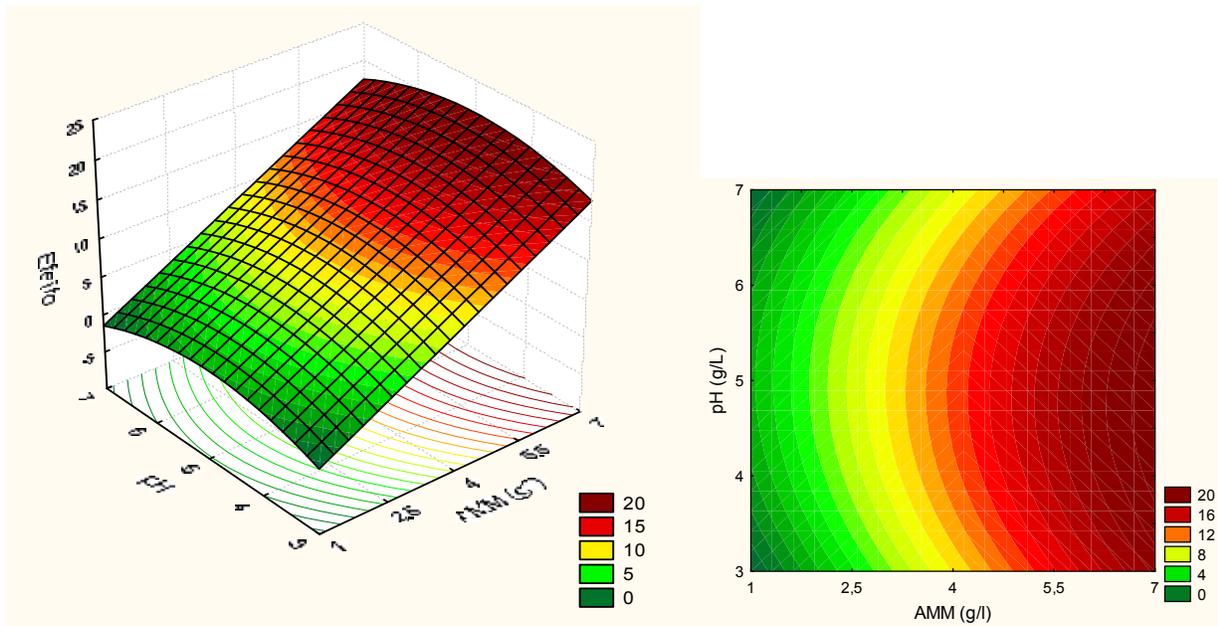
Pela Figura 5.12 observa-se que a produção de glicerol foi máxima em valores próximos às maiores concentrações de glicerol testado, entre 205 e 220 g/L aproximadamente. Em relação ao pH o máximo foi atingido na faixa de 4,5 a 5,5, aproximadamente, o que pode ser observado pela curvatura da superfície. Como o glicerol apresentou efeito significativo apenas para o parâmetro linear, não é possível a

determinação de um ponto de máximo tal como ocorre para o pH. Portanto o modelo aponta para o ponto extremo da faixa de concentração testada para o glicerol, em torno de 200 g/L. O valor de pH ótimo inicial para a produção de ácido kójico em torno de 5,0 é coerente com valores encontrados na literatura. El-Aasar obteve máxima produção de ácido kójico por *Aspergillus parasiticus* em meios de cultura ajustados a pH inicial 5,0.



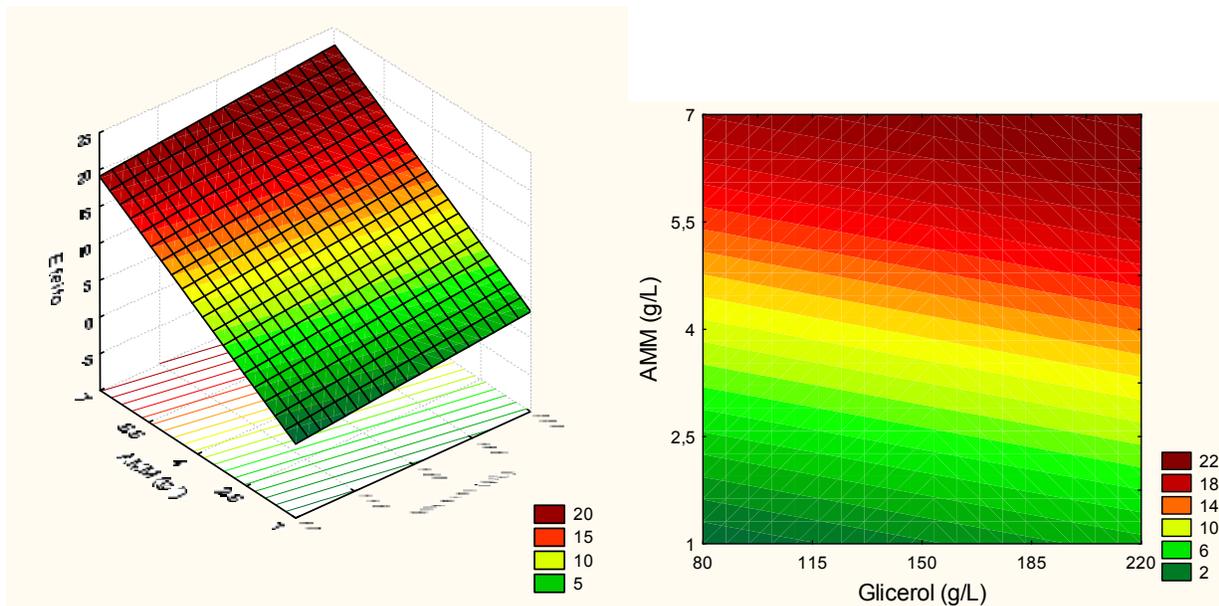
**Figura 5.12** Superfícies de resposta pH X Glicerol

Pela Figura 5.13 observa-se que, segundo o modelo, a produção de ácido kójico foi proporcional à concentração de água de maceração de milho no meio de cultura, atingindo seu máximo quando utilizada a concentração de 7 g/L, para as faixas estudadas. Porém, observa-se que o modelo descreve uma tendência para valores mais elevados.



**Figura 5.13** Superfícies de resposta pH X AMM

Pela Figura 5.14 observamos que, de acordo com o modelo, ambas as variáveis Glicerol e AMM apresentaram como pontos ótimos para produção de ácido kójico os valores máximos testados (220 g/L e 7 g/L, respectivamente) no planejamento experimental. Isso era esperado já que o modelo apontou somente coeficientes lineares para as duas variáveis e efeitos de valor positivo. Porém, isso não esclarece se o ponto ótimo para a produção de ácido kójico está realmente no limite superior testado para as variáveis ou se está em um valor acima. Para esse esclarecimento é necessário realizar estudos em faixas maiores às testadas para determinar se existe um ponto de máximo acima destes valores.

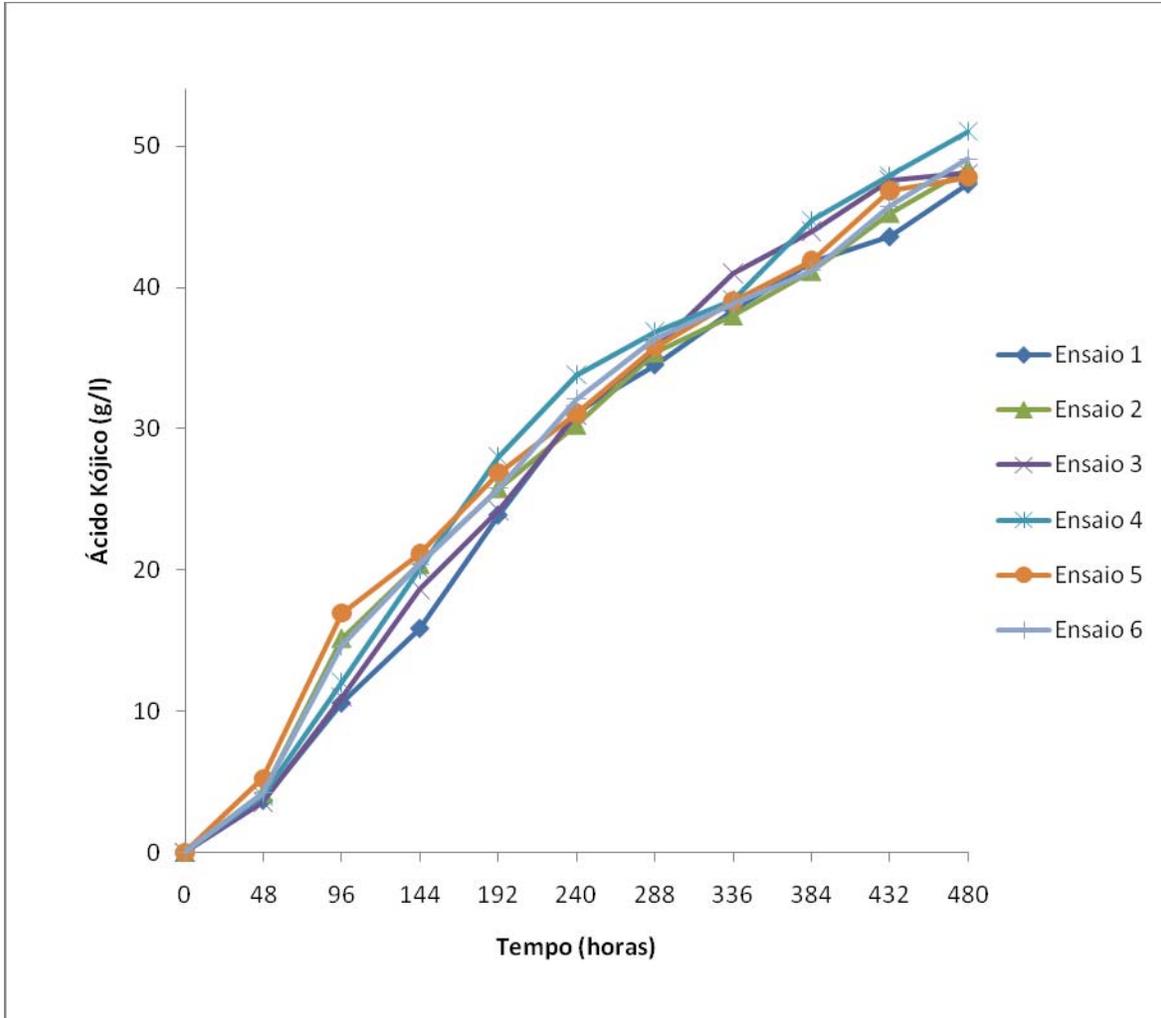


**Figura 5.14** Superfície de resposta AMM X Glicerol

Utilizando esses valores como ponto de máximo (220 g/L de glicerol, 7 g/L de AMM e pH 5,0) podemos obter a previsão do modelo para a máxima produção de ácido kójico após 10 dias de fermentação. Substituindo os valores na equação encontramos o valor de 22,65 g/L de ácido kójico e produtividade de média de 0,0943 g/L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>.

## 5.8 Validação do Modelo – Glicerol

Para validação do modelo encontrado no planejamento DCCR de 3 variáveis para o glicerol, foram feitos 6 ensaios representando as condições ótimas apontadas pelo modelo encontrado para validar esses valores como ótimos. Os resultados podem ser verificados na Figura 5.15.



**Figura 5.15** Ensaios de validação do modelo Glicerol

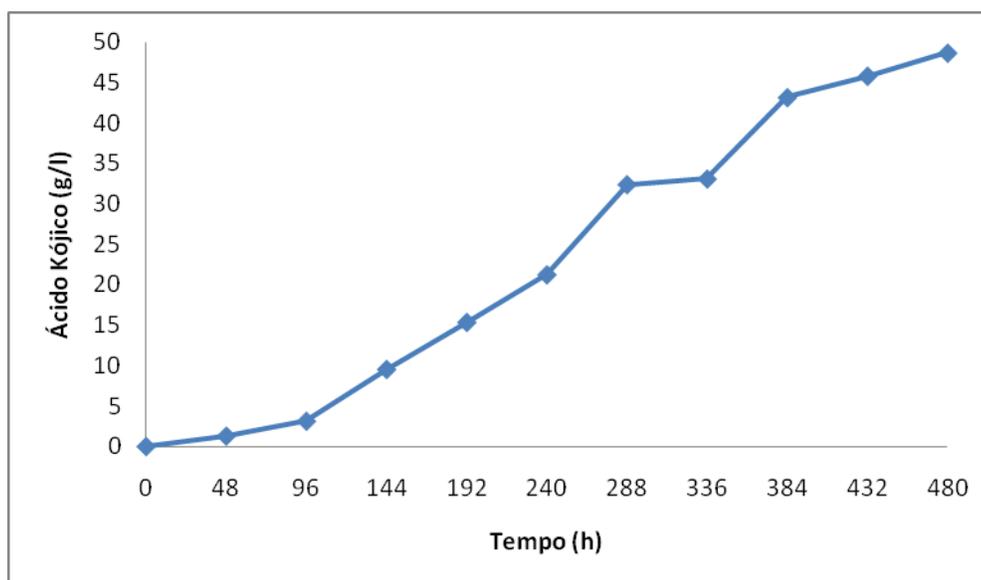
Os resultados surpreenderam pelo desempenho acima do previsto pelo modelo. Pode-se observar da Figura 5.16 que foram produzidos até 51 g/L (ensaio 4) após 480 horas de fermentação (ensaio 4), com uma média de  $48,6 \pm 1,3$ g/L. A concentração média de ácido kójico após 10 dias de fermentação foi de  $31 \pm 1$  g/L com produtividade global de  $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Esse valor foi 37 % maior do que a previsão do modelo. Além disso, foi superior à máxima produtividade obtida com o uso de glicose como fonte de carbono e comparável a estudos encontrados em literatura utilizando

glicose como fonte de carbono. Esses resultados corroboram o uso do glicerol como matéria-prima potencial para a produção de ácido kójico.

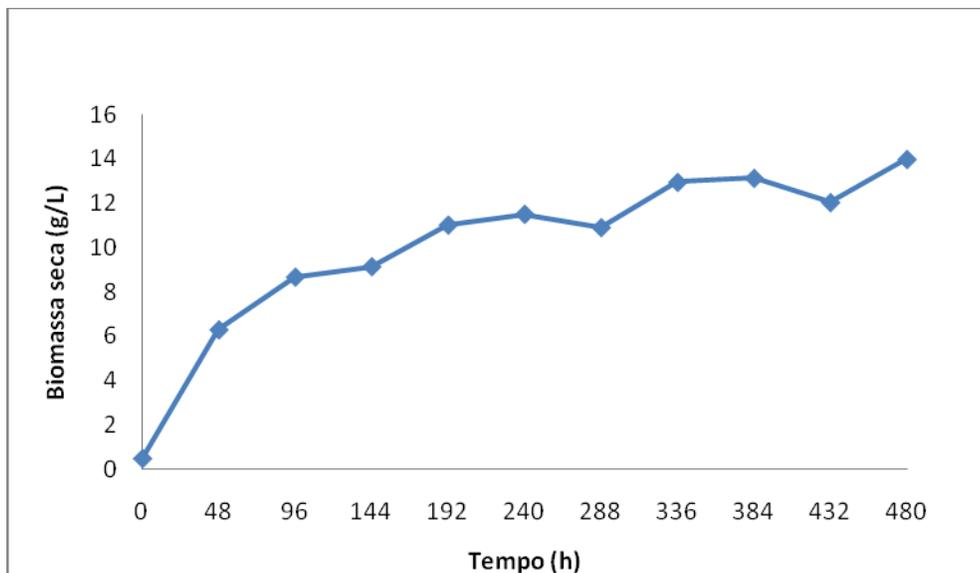
### 5.9 Curva de concentração de ácido kójico, glicerol e biomassa do meio otimizado

Após otimização do meio de cultura foi feito um ensaio para determinar o perfil de crescimento de biomassa e consumo de substrato sob as condições otimizadas. Deve-se ressaltar que o método de análise do glicerol residual apresentou grandes desvios, da ordem de até 35%. Decidiu-se, no entanto, apresentar os resultados de consumo de substrato apenas com o intuito de ilustrar o comportamento do processo. Mas deve-se ressaltar que a metodologia não apresentou precisão nas replicatas de análise.

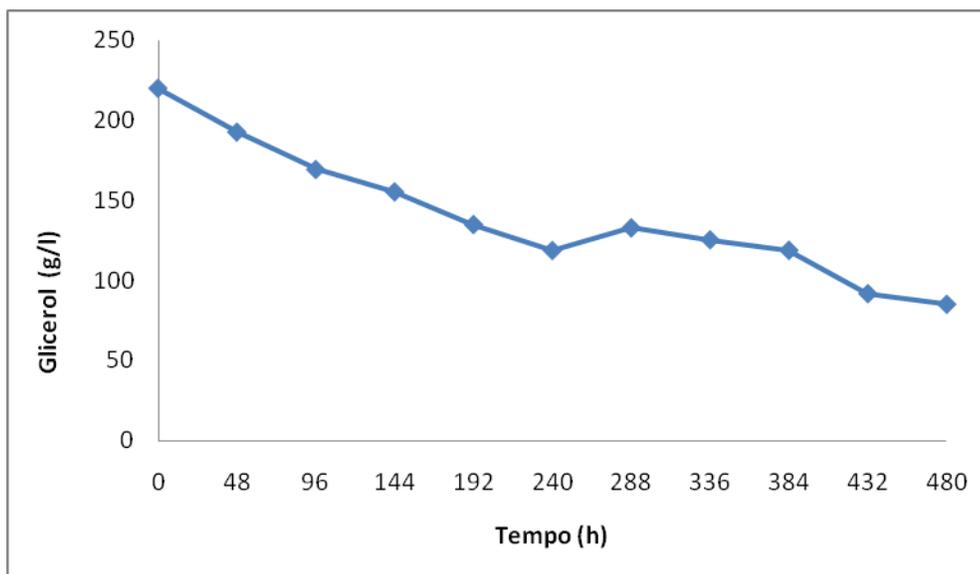
Os resultados de produção de ácido kójico, produção de biomassa e consumo de substrato podem ser visualizados nas Figuras 5.16, 5.17 e 5.18, respectivamente.



**Figura 5.16** Dados de produção de ácido kójico com meio otimizado com glicerol por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM



**Figura 5.17** Dados de produção de biomassa com meio otimizado com glicerol por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM



**Figura 5.18** Dados de produção de ácido kójico com meio otimizado com glicerol por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM

Através das Figuras 5.17 e 5.18 observa-se que a produção de ácido kójico adquire maior velocidade a partir de 96~144 horas, o que coincide com o início da estabilização da produção de biomassa. Provavelmente, após o consumo do nitrogênio para a formação de biomassa iniciou-se a fase de produção de ácido kójico. Já o consumo de glicerol apresentou perfil aparentemente estável. Aparentemente tanto a produção de ácido kójico como o consumo de substrato apresentam perfil linear, que deve ser modificado com o esgotamento das fontes de carbono, tal qual foi observado nos planejamentos experimentais quando utilizadas concentrações reduzidas de fonte de carbono.

Na Tabela 5.16 são apresentados os parâmetros cinéticos calculados para a fermentação utilizando glicerol.

**Tabela 5.16.** Parâmetros cinéticos para fermentação com glicerol

$t_{\text{máx}}$ (h)	$P_{\text{máx}}$ (g ác. kójico · L <sup>-1</sup> )	$X_{\text{máx}}$ (g biomassa · L <sup>-1</sup> )	$Pr_p$ (g ác kój · L <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	$Y_{p/s}$	$Y_{x/s}$
480	48,69	13,9	0,101	0,36	0,103

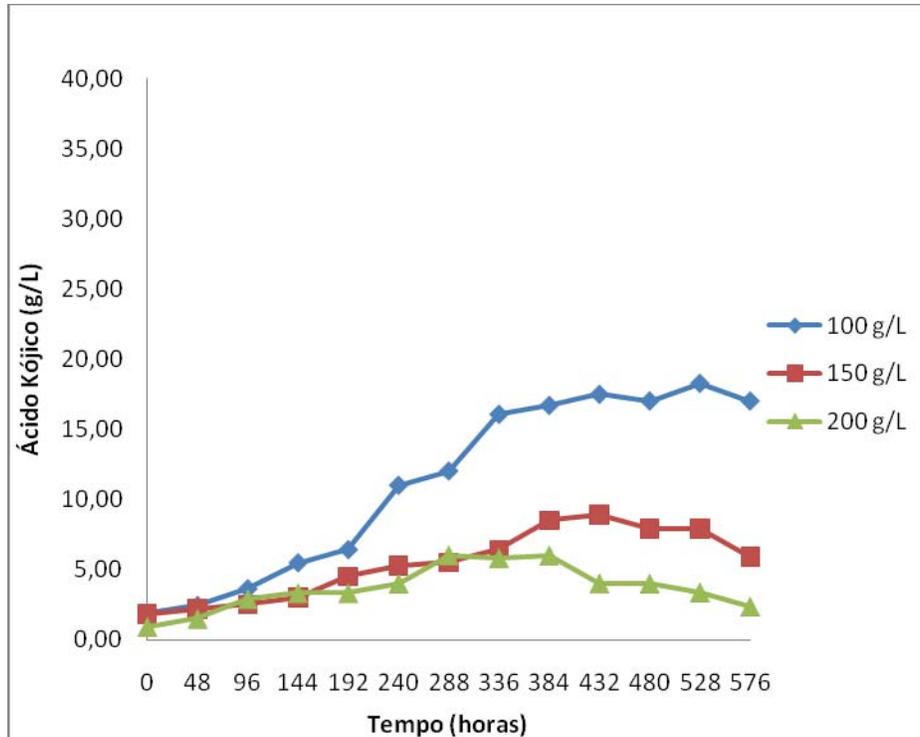
$t_{\text{máx}}$ : tempo total de fermentação;  $P_{\text{máx}}$ : máxima concentração de ácido kójico;  $X_{\text{máx}}$ : máxima concentração de biomassa;  $Pr_p$ : produtividade em ácido kójic ( $P_{\text{máx}}/t_{\text{máx}}$ );  $Y_{p/s}$ : parâmetro de conversão de substrato em produto ( $\Delta P/\Delta S$ );  $Y_{x/s}$ : parâmetro de conversão de substrato em biomassa ( $\Delta P/\Delta S$ )

O valor final do parâmetro de conversão de substrato em produto  $Y_{p/s}$  foi de 0,36, porém este atingiu um valor máximo de 0,43 a 384 horas de fermentação. O máximo valor de produtividade foi de 0,112 e foi obtido a 288 horas de fermentação.

## **5.10 Ensaios com glicerol bruto do biodiesel**

### **5.10.1 Glicerol bruto**

O glicerol bruto direto da produção de biodiesel apresentava cor marrom escuro a preto e viscosidade elevada. Segundo o fornecedor, a amostra continha cerca de 44 % de glicerol puro e o restante conteria sabões, ácidos graxos, metanol e outras substâncias em menores concentrações. Como o ensaio visava determinar se o processo de produção de ácido kójico por fermentação seria robusto o suficiente para o resíduo da produção de biodiesel, não foram realizados procedimentos de purificação do material além da neutralização do pH. Devido à baixa concentração de glicerol na amostra, as concentrações testadas nos ensaios continham menor quantidade de glicerol do que o testado para o glicerol puro nos experimentos anteriores. Porém, devido às características do material como a viscosidade e concentração de impurezas, não seria possível a utilização do glicerol bruto para obter a concentração ótima testada anteriormente. Para se atingir 220 g/L de glicerol puro seria necessário utilizar 500 g/L do glicerol bruto. Além disso, outras fontes de carbono existentes no glicerol bruto poderiam ser utilizadas como substrato para o crescimento do fungo e/ou a produção do ácido kójico. Portanto, foram fixadas as concentrações de 100, 150 e 220 g/L. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.19.



**Figura 5.19** Produção de ácido kójico a partir de Glicerol Bruto por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit: 150 RPM

Podemos observar que a máxima produção de ácido kójico atingida foi de 18,30 g/L a 528 horas de fermentação para a concentração de 100 g/L. Para as concentrações de 150 e 200 g/L as concentrações máximas atingidas foram de 8,92 e 4,05 g/L, respectivamente. O aumento da concentração de glicerol bruto teve efeito negativo sobre a produção de ácido kójico, o que pode indicar a inibição da síntese de ácido kójico por alguma impureza contida no resíduo. Também se observou que a produção foi significativamente mais lenta do que quando utilizado glicerol puro como fonte de carbono.

A produção de biomassa (Tabela 5.17) não pareceu ter sido afetada. O crescimento foi aparentemente rápido e a biomassa seca final foi próxima ao encontrado para os ensaios de glicerol puro. Devido à alta viscosidade do meio, pode

haver uma imprecisão das medidas pois não foi possível a lavagem completa da biomassa antes da secagem.

**Tabela 5.17** Biomassa dos ensaios Glicerol Bruto

Concentração glicerol bruto	Biomassa final (g/L)
100	1,542
150	1,621
200	1,645

### 5.10.2 Ensaios glicerol bruto parcialmente purificado (Glicerina Loira)

O glicerol parcialmente purificado por precipitação possuía aspecto clarificado com coloração âmbar e com menor viscosidade do que o glicerol bruto. A comparação do aspecto dos dois materiais pode ser visualizada na Figura 5.20.



Figura 5.20 Comparação Glicerol bruto (esquerda) vs Glicerol parcialmente purificado (direita)

A análise da concentração do glicerol parcialmente purificado apontou, aproximadamente, 55 % de glicerol.

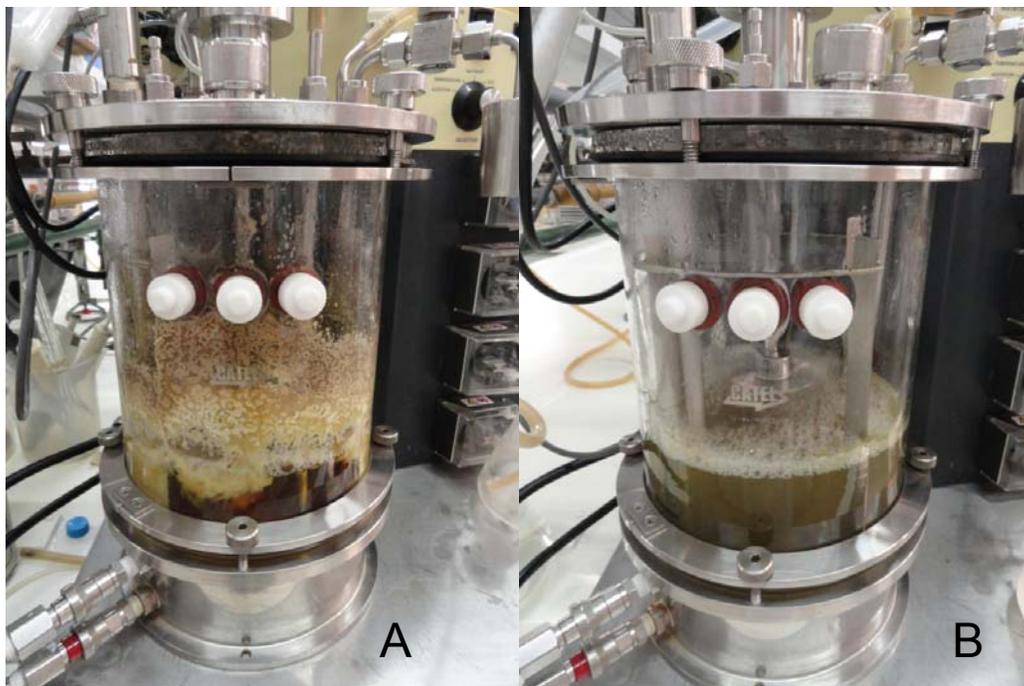
Apesar de conter menor concentração de impurezas e maior concentração de glicerol, os ensaios de fermentação com a glicerina loira não resultaram em produção de ácido kójico. Aparentemente, o mecanismo de síntese do ácido kójico foi inibido por algum componente presente no resíduo. Após a acidificação e neutralização do glicerol bruto são formados sais que podem alcançar até a concentração de 7 % (HÁJEK e SKOPAL, 2010). Acredita-se que os sais formados podem ter inibido o metabolismo do fungo, já que esse efeito de inibição foi menos intenso com o uso do glicerol sem tratamento. Nesse caso, para a utilização da glicerina loira, métodos de extração do sal devem ser utilizados antes do seu uso para a produção do ácido kójico. Métodos para remoção do sal tem sido desenvolvidos, mas etapas de purificação aumentam sensivelmente o custo do material (KONGJAO *et al.*, 2010).

## **5.11 Ensaios Fermentador de Bancada**

### **5.11.1 Ensaio em fermentador a condições ótimas para glicerol**

O ensaio contendo a composição ótima encontrada nos experimentos em frascos Erlenmeyer foi iniciado nas condições de aeração e agitação dentro das faixas normalmente citadas em literatura para a fermentação submersa. Porém, observou-se volume anormal de espuma formada durante a fermentação. Foi adicionado anti-espumante comercial a base de silicone FG10 (Dow Corning) com adição ativada através de sistema detector de espuma por condutividade. Apesar de controlar o problema momentaneamente, esse sistema não conseguiu manter a espuma a níveis baixos por intervalos de tempo longos, resultando em adição excessiva de anti-espumante devido à ativação freqüente do sistema. O que se observou é que a adição de 220 g/L de glicerol propiciou ao meio de cultura viscosidade e tensão superficial aparente bastante distintas da água. Acredita-se que essas características favoreceram a formação de espuma excessiva quando utilizada a ação mecânica de agitação por turbina somado à aeração por injeção de ar à vazão de 1 vvm. Isso explicaria por que

não foi observada essa formação de espuma para os frascos Erlenmeyer. A adição de grandes quantidades de anti-espumante (até 10 g/L) pode ter interferido no metabolismo do organismo produtor, já que após 3 dias de fermentação não foi detectada produção de ácido kójico. Apesar disso, o excesso de anti-espumante não parece ter afetado o crescimento do fungo. Grande produção de biomassa foi observada. Porém, o excesso de espuma contribuiu para a adesão de grande parte da biomassa nas paredes do fermentador até a altura de 10 cm acima do nível de líquido (Figura 5.21 A) Decidiu-se então abortar o processo e tentar modificar as concentrações de substrato para tentar minimizar o problema encontrado.



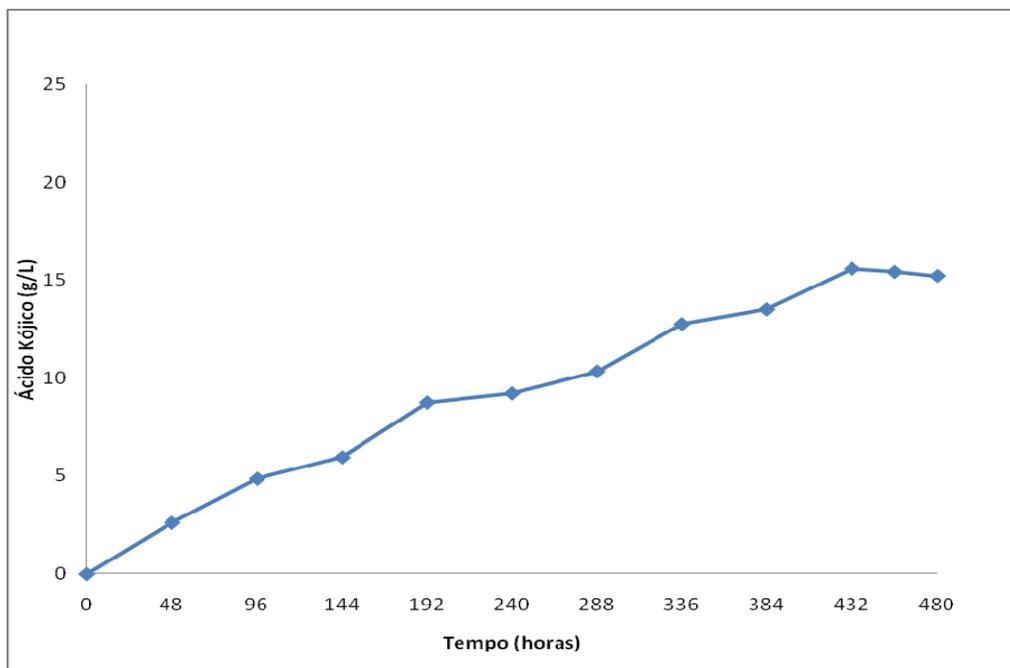
**Figura 5.21 A: Fermentador com biomassa aderida às paredes. B: Fermentação com concentrações reduzidas de glicerol e AMM. T: 30 °C; Agit: 150 RPM, Aeração = 1,0 vvm**

### 5.11.2 Ensaio a concentração reduzida de glicerol

Para evitar os problemas observados na fermentação utilizando a composição otimizada do meio de cultura, as concentrações de glicerol e água de maceração de milho foram reduzidas. O critério para o cálculo da formulação com concentração reduzida foi a manutenção da relação Carbono/Nitrogênio. Determinou-se que a a concentração de glicerol testada seria de 150 g/L. Para manter a relação C/N foi utilizada água de maceração de milho a 4,8 g/L.

Com a nova formulação o processo de fermentação apresentou significativa redução na formação de espuma, ainda que tenha sido necessário o uso da adição de anti-espumante. Porém, também observou-se ao longo da fermentação a adesão da biomassa às paredes do fermentador, porém em volume menor ao observado no ensaio anterior (Figura 5.21 B).

A produção de ácido kójico pôde ser detectada a 48 horas de fermentação. Os resultados podem ser observados na Figura 5.23.



**Figura 5.22** Produção de ácido kójico em fermentador de bancada por por *A. flavus* NRRL 626. T: 30 °C; Agit.: 150 RPM; Aeração: 1,0 vvm

A concentração máxima de ácido kójico alcançada foi de 15,58 g/L a 432 horas de fermentação. Após 240 horas de fermentação foram detectados 9,21 g/L de ácido kójico. Esses resultados foram significativamente menores do que os observados nos ensaios em frascos. Muitos fatores podem ter influenciado esses resultados. Além das diferenças de agitação e aeração, grande parte da biomassa ficou aderida às paredes do fermentador sem contato com o meio líquido durante a fermentação, ou seja, perdeu sua efetividade. Mais ensaios seriam necessários para esclarecer e quantificar a influência desses fatores.

## 5.12 Síntese dos resultados de produção de ácido kójico

Na Tabela 5.18 é apresentada uma síntese das concentrações máximas e produtividades (240 e 480 horas) entre as duas composições otimizadas (Glicose+AMM e Glicerol+AMM), os ensaios com o glicerol bruto e ensaio com glicerol e AMM em fermentador.

**Tabela 5.18.** Síntese dos estudos de produção de ácido kójico

Condições	$P_{m\acute{a}x}$ (g ác. kójico · L <sup>-1</sup> )	$t_{P_{m\acute{a}x}}$ (h)	Pr 240h (g ác kój· L <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	Pr 480h (g ác kój· L <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )
Glicose + AMM	48,1	480	0,117	0,096
Glicerol + AMM	48,6	480	0,130	0,101
Glicerol bruto + AMM	18,3	528	0,046	0,035
Fermentador (glicerol + AMM)	15,6	432	0,038	0,032

$t_{P_{m\acute{a}x}}$ : tempo para obtenção de máxima concentração;  $P_{m\acute{a}x}$ : máxima concentração de ácido kójico;  $Pr_{240h}$ : produtividade em ácido kójico após 240 h ( $P_{m\acute{a}x}/240$ );  $Pr_{480h}$ : produtividade em ácido kójico após 480 h ( $P_{m\acute{a}x}/480$ )

## 5.13 Recuperação e purificação

### 5.13.1 Cristalização natural

Após a concentração dos extratos de fermentação, estes se apresentavam viscosos e com coloração âmbar escura, provavelmente devido à concentração de pigmentos formados durante a fermentação. O aumento da viscosidade pode ser devido ao aumento da concentração de glicerol residual, que não foi completamente consumido durante a fermentação. Na Figura 5.24 pode-se observar o aspecto dos cristais formados.



**Figura 5.23 Produto recuperado por cristalização natural**

Os cristais formados apresentaram coloração amarelo escura e possuíam, mesmo após secagem por 48 horas, uma camada viscosa, formada provavelmente pelo glicerol residual. Além disso, possuíam característica amorfa, sem possibilitar a

descrição de um formato específico. Os processos de cristalização sem controle rígido da temperatura e das fases de nucleação podem induzir polimorfismos dos cristais formados (PESSOA JR. e KILIKIAN, 2005).

Os dados da cristalização natural a partir do extrato bruto concentrado encontram-se na Tabela 5.19:

**Tabela 5.19. Dados dos ensaios de cristalização natural**

Vol. Amostra (mL)	Conc. Extrato Bruto (g/L)	Massa filtrada (g)	Pureza (%)	% Recuperação
212	55,251	9,3325	83,54	67
165	57,545	7,5623	82,45	66
184	50,998	6,5422	85,67	61

Os ensaios de cristalização natural não visavam a otimização do processo ou o estudo como metodologia, e os resultados foram apresentados apenas para ilustrar a recuperação dos cristais utilizados para os processos de purificação. Porém, a recuperação média de, aproximadamente, 65 % aponta a cristalização natural por refrigeração como método viável de recuperação do ácido kójico.

Os cristais recuperados pela cristalização natural foram utilizados para os ensaios de sistema anti-solvente.

### 5.13.2 Cristalização com sistema anti-solvente

Os resultados dos ensaios para estudo do sistema anti-solvente encontram-se na Figura 5.25.

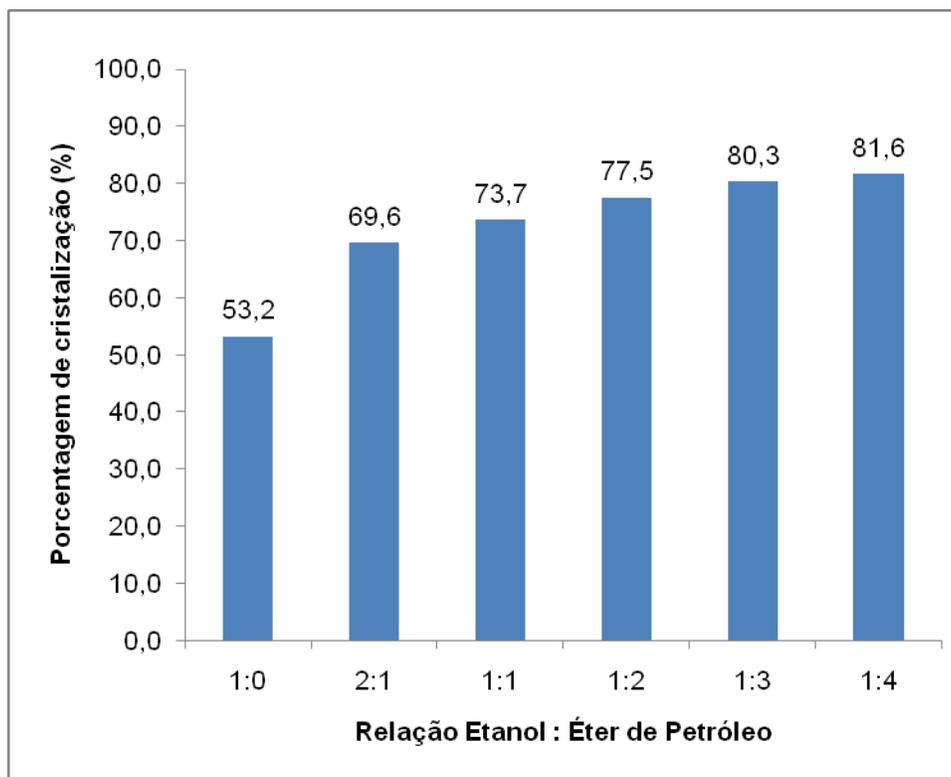


Figura 5.24 Resultados de cristalização com sistemas anti-solvente

Pode-se observar que houve grande diferença (53 e 70 %) na recuperação dos cristais entre os sistemas 1:0 (sem adição de éter) e 2:1, o que indica a efetividade do sistema etanol/éter de petróleo para estimular a cristalização do ácido kójico. Observa-se que a diferença na porcentagem de cristalização não foi linear em relação à relação anti-solvente/solvente. A diferença entre o sistema 1:3 e 1:4 foi de apenas 1,3 %, enquanto entre o sistema 2:1 e 1:1 foi de 4,1 %. O aumento de 100 % no volume de éter de petróleo (do sistema 1:2 para o sistema 1:4) ocasionou aumento de apenas 4 % na porcentagem de cristalização

Isso indica que deve haver um ponto econômico da relação solvente/anti-solvente que alcance porcentagem significativa de cristalização com o mínimo volume possível de solvente.

A pureza dos cristais formados encontrou-se entre 99 e 100 % para todos os sistemas testados, o que mostra que a técnica pode ser usada com sucesso para a purificação do ácido kójico cristalizado, sem a necessidade de técnicas mais sofisticadas. Porém, os cristais apresentaram coloração amarelo clara o que pode indicar a presença de traços de algum pigmento formado comprometendo a qualidade final do produto. Porém, pode-se observar que os cristais estão mais claros em relação aos cristais obtidos na cristalização natural e bem definidos em forma de agulha, conforme descrito na literatura (LIN *et al.*, 1976). O aspecto dos cristais formados pode ser observado na Figura 5.26.



**Figura 5.25 Cristais de ácido kójico formados na cristalização com sistema anti-solvente**

### 5.13.3 Descoloração com carvão ativado

A descoloração com carvão ativado foi avaliada através da análise visual dos cristais resultantes para verificação da cor e aspecto, e quanto à concentração de ácido kójico na solução base, para avaliar a quantidade de produto que ficou adsorvida ao carvão. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.18.

**Tabela 5.20 Resultados da purificação por adsorção em carvão ativado**

<b>Concentração carvão (g/L)</b>	<b>Ácido kójico antes purif (g/L)</b>	<b>Ácido kójico após purif (g/L)</b>	<b>% adsorção</b>
<b>1</b>	19,625	18,25	7
<b>5</b>	19,625	16,515	16
<b>10</b>	19,625	15,214	22

Podemos observar que as concentrações de carvão ativado de 5 e 10 g/L adsorveram grande fração do ácido kójico da solução. A diferença na coloração entre as 3 concentrações testadas não foi quantificada, mas apenas analisada visualmente. Deve-se ressaltar que o produto, mesmo sem tratamento com carvão ativado, possui cerca de 99% de pureza. Portanto, a importância do tratamento para descoloração é a de melhorar o aspecto visual de um produto explorado comercialmente. Visualmente não houve grande diferença de resultados entre as 3 concentrações testadas.

Após a cristalização com sistema anti-solvente os cristais foram avaliados visualmente (Figura 5.27).



**Figura 5.26 Cristais após tratamento com carvão ativado**

Observou-se que os cristais após o tratamento com carvão ativado apresentaram coloração mais clara e cristais mais definidos. A comparação da coloração pode ser feita observando-se a Fig 5.28.



**Figura 5.27 Cristais antes do tratamento com carvão ativado (esquerda) e após (direita)**

Pode-se observar que há uma diferença de coloração entre os cristais antes e após tratamento com carvão. Portanto, podemos afirmar que o tratamento com carvão ativado, mesmo a concentrações de 1 g/L, foi bem sucedido em melhorar o aspecto visual do ácido kójico.

## 6. CONCLUSÃO

---

Os ensaios realizados nesta primeira etapa do projeto de pesquisa possibilitaram melhor entendimento do processo de produção de ácido kójico por fermentação da linhagem selecionada.

Através da estratégia utilizada de planejamentos experimentais, com número reduzido de ensaios (31 ensaios considerando as 3 etapas de otimização) foi possível otimizar as concentrações dos componentes de meio de cultura de modo a atingir valores elevados de produção, quando comparados aos encontrados em literatura para fermentação em frascos (até 48 g/L).

O glicerol foi identificado como substrato adequado à produção de ácido kójico, o que torna o processo atrativo devido ao excesso de glicerol atualmente produzido durante a produção de biodiesel.

A água de maceração de milho foi utilizada com grande sucesso como fonte de nitrogênio para a produção de ácido kójico. Concentrações relativamente reduzidas (5-7 g/L) foram suficientes para produção de biomassa e de ácido kójico significativas.

Os planejamentos experimentais para a otimização do meio de cultura contendo glicerol como única fonte de carbono e água de maceração de milho como única fonte de nitrogênio possibilitaram alcançar altas concentrações de ácido kójico comparadas aos processos descritos em literatura. O baixo custo dessas matérias-primas aumenta a atratividade do processo de produção de ácido kójico.

Os ensaios com glicerol bruto mostraram forte inibição sobre a produção de ácido kójico, provavelmente devido à alta concentração de impurezas. O glicerol parcialmente purificado por precipitação por acidificação inibiu totalmente a produção de ácido kójico, apesar da menor concentração de impurezas e maior concentração de glicerol. É provável que a inibição tenha sido causada pela presença de sais formados na neutralização.

A recuperação do ácido kójico por cristalização natural após concentração do extrato da fermentação mostrou-se uma opção viável, com recuperação de, aproximadamente, 65 % do ácido kójico nos experimentos avaliados.

A cristalização com sistema anti-solvente apresentou ótimo desempenho para a purificação do ácido kójico com rendimento de até 80% resultando em produto com até 99% de pureza.

A descoloração com 1% de carvão ativado mostrou-se eficiente para a melhoria do aspecto do produto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ARIFF, A. B.; ROSFARIZAN, M.; HERNG, L. S.; MADIIHAH, S.; KARIM, M. I. A. Kinetics and modelling of kojic acid production by *Aspergillus flavus* link in batch fermentation and resuspended mycelial system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 13, n. 2, p. 195-201, Mar 1997.

ARIFF, A. B.; SALLEH, M. S.; GHANI, B.; HASSAN, M. A.; RUSUL, G.; KARIM, M. I. A. Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* link. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, n. 7, p. 545-550, 1996.

BARBIRATO, F.; HIMMI, E. H.; CONTE, T.; BORIES, A. 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Industrial Crops and Products*, v. 7, n. 2-3, p. 281-289, Jan 1998.

BARHAM, H. N.; SMITS, B. L. Kojic Acid: A Review. *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-)*, v. 37, n. ArticleType: research-article / Full publication date: Apr. 26-28, 1934 / Copyright © 1934 Kansas Academy of Science, p. 91-113, 1934.

BASAPPA, S. C.; SREENIVA.V; PARPIA, H. A. B. AFLATOXIN AND KOJIC ACID PRODUCTION BY RESTING CELLS OF ASPERGILLUS-FLAVUS LINK. *Journal of General Microbiology*, v. 61, p. 81-&, 1970.

BENTLEY, R. [41] Preparation and analysis of Kojic acid. In: (Ed.). *Methods in Enzymology*: Academic Press, v. Volume 3, 1957. p.238-241. ISBN 0076-6879.

BENTLEY, R. From miso, saké and shoyu to cosmetics: A century of science for kojic acid. *Natural Product Reports*, v. 23, n. 6, p. 1046-1062, 2006.

BIRKINSHAW, J. H.; CHARLES, J. H. V.; LILLY, C. H.; RAISTRICK, H. Kojic Acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl- $\gamma$ -pyrone). Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character, v. 220, n. ArticleType: research-article / Issue Title: Studies in the Biochemistry of Micro-Organisms / Full publication date: 1931 / Copyright © 1931 The Royal Society, p. 127-367, 1931.

BRTKO, J.; RONDAHL, L.; FICKOVÁ, M.; HUDECOVÁ, D.; EYBL, V.; UHER, M. Kojic acid and its derivatives: History and present state of art. Central European Journal of Public Health, v. 12, n. SUPPL., p. S16-S18, 2004.

CHEN, J. S.; WEI, C. I.; MARSHALL, M. R. INHIBITION-MECHANISM OF KOJIC ACID ON POLYPHENOL OXIDASE. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 39, n. 11, p. 1897-1901, Nov 1991.

CHENG, K. K.; LIU, D. H.; SUN, Y.; LIU, W. B. 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. Biotechnology Letters, v. 26, n. 11, p. 911-915, Jun 2004.

CHI, Z. Y.; PYLE, D.; WEN, Z. Y.; FREAR, C.; CHEN, S. L. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. Process Biochemistry, v. 42, n. 11, p. 1537-1545, Nov 2007.

COOK, A. H.; LACEY, M. S. KOJIC ACID AND THE ANTIBIOTIC ACTION OF SPECIES OF *ASPERGILLUS*. Nature, v. 155, n. 3948, p. 790-791, 1945.

DAVIDSON, P. M.; JUNEJA, V. K.; BRANEN, J. K. Food additives. Antimicrobial Agents, p. 563-620, 2002.

EL-AASAR, S. A. Cultural Conditions Studies on Kojic Acid Production by *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Agriculture & Biology, v. 8, n. 4, p. 468-473, May 15 2006 2006.

EPA. Europe's Network of Patent Databases. European Patent Office. Worldwide Patent. [www.espacenet.com](http://www.espacenet.com), 2011.

FUTAMURA, T.; ISHIHARA, H.; TAMURA, T.; YASUTAKE, T.; HUANG, G.; KOJIMA, M.; OKABE, M. Kojic acid production in an airlift bioreactor using partially hydrolyzed raw corn starch. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 4, p. 360-365, 2001.

FUTAMURA, T.; OKABE, M.; TAMURA, T.; TODA, K.; MATSUNOBU, T.; PARK, Y. S. Improvement of production of Kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae*, MK107-39. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 3, p. 272-276, 2001.

HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 9, p. 3242-3245, 2010.

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology*, v. 67, n. 2, p. 123-128, Feb 1999.

ICTSD. Biodiesel no Brasil: situação e perspectivas para o combustível do futuro. . Pontes - International Centre for Trade and Sustainable Development. , v. 4, n. 1, 2008.

IMANDI, S. B.; BANDARU, V. R.; SOMALANKA, S. R.; GARAPATI, H. R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 5, p. 1367-1372, Apr 2007.

KAWASHIMA, J.; NANISHI, Y.; TAKADERA, T. SYNTHETIC MEDIUM FOR PRODUCTION OF KOJIC ACID 1998.

KAYAHARA, H.; SHIBATA, N.; TADASA, K.; MAEDA, H.; KOTANI, T.; ICHIMOTO, I. AMINO-ACID AND PEPTIDE DERIVATIVES OF KOJIC ACID AND THEIR

ANTIFUNGAL PROPERTIES. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, n. 9, p. 2441-2442, Sep 1990.

KIM, H.; CHOI, J.; CHO, J. K.; KIM, S. Y.; LEE, Y.-S. Solid-phase synthesis of kojic acid-tripeptides and their tyrosinase inhibitory activity, storage stability, and toxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 11, p. 2843-2846, 2004.

KITADA, M.; FUKIMBAR.T. STUDIES ON KOJIC ACID FERMENTATION .7. MECHANISM OF CONVERSION OF GLUCOSE TO KOJIC ACID. *Journal of Fermentation Technology*, v. 49, n. 10, p. 847-&, 1971.

KONGJAO, S.; DAMRONGLERD, S.; HUNSOM, M. Purification of crude glycerol derived from waste used-oil methyl ester plant. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 27, n. 3, p. 944-949, 2010.

KŘIVÁNKOVÁ, I.; MARČIŠNOVÁ, M.; SÖHNEL, O. Solubility of itaconic and kojic acids. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 37, n. 1, p. 23-24, 1992.

KWAK, M. Y.; RHEE, J. S. CULTIVATION CHARACTERISTICS OF IMMOBILIZED ASPERGILLUS-ORYZAE FOR KOJIC ACID PRODUCTION. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, n. 9, p. 903-906, Apr 1992.

LIN, M. T.; MAHAJAN, J. R.; DIANESE, J. C.; TAKATSU, A. HIGH PRODUCTION OF KOJIC ACID CRYSTALS BY ASPERGILLUS-PARASITICUS UNBF A12 IN LIQUID-MEDIUM. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 298-299, 1976.

MISHIMA, Y.; OHYAMA, Y.; SHIBATA, T.; SETO, H.; HATAE, S. Inhibitory action of Kojic Acid on melanogenesis and its therapeutic effect for various human hyper-pigmentation disorders. *Skin Research*, v. 36, n. 2, p. 134-150, 1994.

MITANI, H.; KOSHIISHI, I.; SUMITA, T.; IMANARI, T. Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator. *European Journal of Pharmacology*, v. 411, n. 1-2, p. 169-174, 2001.

MME. Ministério de Minas e Energia. Brasil, 2007. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/>>.

MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Biotransformation of various carbon sources to kojic acid by cell-bound enzyme system of *A. flavus* Link 44-1. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, n. 2, p. 203-209, 2007.

NOH, J.-M.; KWAK, S.-Y.; SEO, H.-S.; SEO, J.-H.; KIM, B.-G.; LEE, Y.-S. Kojic acid-amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, n. 19, p. 5586-5589, 2009.

OKABE, M.; YASUTAKE, T.; TAMURA, T.; FUTAMURA, T.; HINO, K.; IINUMA, K. **PRODUCTION OF KOJIC ACID** 2000.

OWENS, R. G.; WELTY, R. E.; LUCAS, G. B. Gas chromatographic analysis of the mycotoxins kojic acid, terreic acid, and terrein. *Analytical Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 249-258, 1970.

ÖZTÜRK, G.; EROL, D. D.; AYTEMIR, M. D.; UZBAY, T. New analgesic and antiinflammatory agents 4(1H)-pyridinone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 10, p. 829-834, 2002.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. 1. Editora Manole, 2005.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FLORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de Biodiesel. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 37, p. 44-51, 2007.

ROSFARIZAN, M.; ARBAKARIYA, A.; MOHD ALI, H.; MOHAMED ISMAIL ABDUL, K.; HIROSHI, S.; SUTEAKI, S. Importance of carbon source feeding and pH control strategies for maximum kojic acid production from sago starch by *Aspergillus flavus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 2, p. 99-105, 2002.

ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A. B. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 25, n. 1, p. 20-24, Jul 2000.

ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A. B. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* link S44-1 using sucrose as a carbon source under different pH conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 11, n. 1, p. 72-79, Jan-Feb 2006.

ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A. B.; HASSAN, M. A.; KARIM, M. I. A. Kojic acid production by *Aspergillus flavus* using gelatinized and hydrolyzed sago starch as carbon sources. *Folia Microbiologica*, v. 43, n. 5, p. 459-464, 1998.

SAITO, K. Über die Säurebindung von *Aspergillus oryzae*. *Bot. Mag.*, v. 21, p. 7-11, 1907.

SALLEH, M. S. A., A.; HASSAN, M. A.; RUSUL, G.; KARIM, M. I. A. Enhanced kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link in growth medium containing methanol. *Asean Food Journal*, v. 11, n. 4, p. 158-162, 1996.

SATO, K.; SAKAIDA, A. CULTIVATION OF KOJIC ACID-PRODUCING BACTERIUM 1997.

SON, S. M.; MOON, K. D.; LEE, C. Y. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*, v. 73, n. 1, p. 23-30, 2001.

VILLEGAS, C. G.; SANTOS, V. E.; ZAZO, M.; GARCIA, J. L.; GARCIA-OCHOA, F. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of product inhibition. *Journal of Biotechnology*, v. 131, n. 2, p. S102-S102, Sep 2007.

WAKISAKA, Y.; SEGAWA, T.; IMAMURA, K.; SAKIYAMA, T.; NAKANISHI, K. Development of a cylindrical apparatus for membrane-surface liquid culture and production of kojic acid using *Aspergillus oryzae* NRRL484. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 85, n. 5, p. 488-494, 1998.

WAN, H. M.; CHEN, C. C.; CHANG, T. S.; GIRIDHAR, R. N.; WU, W. T. Combining induced mutation and protoplasting for strain improvement of *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 14, p. 1163-1166, Jul 2004.

WAN, H. M.; CHEN, C. C.; GIRIDHAR, R.; CHANG, T. S.; WU, W. T. Repeated-batch production of kojic acid in a cell-retention fermenter using *Aspergillus oryzae* M3B9. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 32, n. 6, p. 227-233, Jun 2005.

WANG, T.; LI, D.; TAN, L. *Kojic Acid Producing Process* 2003.

YABUTA, T. A new organic acid (kojic acid) formed by *Aspergillus oryzae*. *J. Chem. Soc. Japan*, v. 37, p. 1185-1233, 1916.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 213-219, Jun 2007.

YOSHINARI, T.; AKIYAMA, T.; NAKAMURA, K.; KONDO, T.; TAKAHASHI, Y.; MURAOKA, Y.; NONOMURA, Y.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S. Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology-Sgm*, v. 153, p. 2774-2780, Aug 2007.