

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO  
POR FERMENTAÇÃO COM  
GIBBERELLA FUJIKUROI

Estudo dos efeitos do meio e as condições de cultura sobre a fermentação.

*Carlos Eduardo Vaz Rossell*

Engenheiro Químico

Orientador:

*Dr. Ricardo Sadir*

Engenheiro Químico

Livre Docente da Universidade Estadual de Campinas

Professor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências de Tecnologia de Alimentos.

-1972-

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## Conteúdo

- I - Resumo e Summary
- II - Introdução
- III - Revisão Teórica da Fermentação da Gibberella fujikuroi
  - 1.0 - Processo de Fermentação
  - 2.0 - Sequência de Etapas da Fermentação
  - 3.0 - Aspectos Cinéticos das Etapas da Fermentação
  - 4.0 - Metabolismo dos Fungos
  - 5.0 - Propriedades Físicas e químicas das Giberelinas
  - 6.0 - Revisão Bibliográfica
- IV - Materiais e Métodos
  - 1.0 - Microrganismo
  - 2.0 - Meios de Cultura e Reativos Microbiológicos
  - 3.0 - Equipamentos para o Desenvolvimento da Fermentação em Frascos.
  - 4.0 - Estudos em Fermentador em Escala de Laboratório
  - 5.0 - Técnicas de Análises
  - 6.0 - Programação das Experiências
- V - Resultados e Discussão
  - 1.0 - Análises Parciais das Experiências
  - 2.0 - Discussão Geral dos Resultados Obtidos
- VI - Comparação dos Resultados Obtidos com Relação aos outros Autores
- VII - Conclusões
- VIII - Apêndice
- IX - Nomenclatura
- X - Bibliografia

## I - RESUMO

Estudaram-se as condições de cultura da Gibberella fujikuroi, para a obtenção de Ácido Giberélico.

Entre as espécies ensaiadas, do gênero Gibberella, selecionou-se a linhagem Gibberella fujikuroi IOC 3326, como a única produtora.

Foram provados vários meios de cultura, estudando-se principalmente os efeitos da fonte de carbono adicionada (carboidratos), a natureza da mesma e a concentração mantida durante o curso da fermentação.

A interação entre a Taxa de Transferência de Oxigênio máxima do sistema (TTO<sub>máx</sub>), e a Taxa de Demanda de Oxigênio (TDO), causada pela massa celular presente, foi estudada em diferentes condições de aeração, agitação e concentração da massa celular.

A diferença TTO<sub>máx</sub> - TDO<sub>máx</sub> relacionou-se com parâmetros, tais como: acumulação de reservas, características do micélio, evolução do pH, utilização de carboidratos, rendimento específico e produtividade de ácido giberélico.

Efetuararam-se experiências em agitadores de frascos e em fermentador de laboratório. Os melhores resultados obtiveram-se neste último, com um rendimento de 5.4 mg/mMNo de GA3, e uma produtividade de 0.031 mg/mM Noh.

Estes resultados foram obtidos com o fermentador, operando-se em condições tais, que o fornecimento de oxigênio estava limitado; e restringiu-se a disponibilidade de carboidratos empregando uma fonte de utilização lenta.

## I - SUMMARY

The cultural conditions for obtaining Gibberellic Acid, from Gibberella fujikuroi, were studied. The strain Gibberella fujikuroi IOC 3326 was selected as the only producer, amongst the species of the genus Gibberella assayed.

Various culture media were tested, primarily studying the effects of the carbon source added (carbohydrates), with respect to its nature and the concentration maintained during the course of fermentation.

Interaction between the maximum Oxygen Transfer Rate (OTR<sub>max</sub>) of the system, and the Oxygen Uptake Rate, (OUR) caused by the cell mass, was studied under different conditions of aeration, agitation and cell mass concentration.

The difference  $OTR_{max} - OUR_{max}$  was related to parameters such as, storage of reserves, mycelial characteristics, pH curve, carbohydrate utilization, gibberellic acid specific yield and productivity.

Experiments were done in shakers and in a laboratory fermenter. The best results were obtained in the latter, yielding 5.4 mg/mMNo of GA3 and a productivity of 0.031 mg/mMNoh

These optimum results were obtained with the fermenter operating at a limited oxygen supply and restricting carbohydrate availability with a slowly utilized source.

## II - INTRODUÇÃO

O Ácido Giberélico pertence ao grupo das giberelinas, compostos químicos isolados do metabolismo da Gibberella fujikuroi (forma imperfeita: Fusarium moniliforme). Este fungo foi diagnosticado como o causador da enfermidade "bakanae", - que ataca as culturas de arroz, provocando um desenvolvimento excessivo, que causa a morte das plantas afetadas.

Kurosawa, fitopatologista japonês (1926), estabeleceu que os compostos originados no metabolismo do fungo, eram os causadores da enfermidade.

As investigações realizadas posteriormente, levaram a estabelecer a existência de uma série de compostos químicos, que constituem o grupo das giberelinas (32, 36).

A partir de então, se projetaram como compostos úteis para aplicação na Agricultura, como reguladores do crescimento dos vegetais, e em especial o ácido giberélico, por ser de todos, o que possui maior atividade biológica.

As investigações posteriores incluíram o estudo das estruturas químicas dos membros da série, propriedades físicas e químicas, estabelecimento da biosíntese dos mesmos, e estudos de fisiologia vegetal relacionados com as giberelinas (18, 31).

O emprego do ácido giberélico como fito-hormônio, levou ao desenvolvimento de técnicas de obtenção deste composto, por fermentação a partir do microrganismo produtor. As primeiras tentativas foram realizadas por cultivo em superfície, pa

sando-se em seguida, a desenvolver a fermentação submersa, que é utilizada atualmente na produção industrial.

As aplicações do ácido giberélico estão estreitamente vinculadas à Indústria Alimentar.

Deve-se fazer aqui, uma distinção entre as aplicações que o relacionam indiretamente a esta indústria, pelo efeito benéfico que se obtém de sua aplicação nas culturas de Matérias Primas Agrárias, e aquelas em que é usado diretamente na Indústria Alimentar.

A respeito do primeiro grupo dá-se como exemplos:

- a) Seu emprego para aumentar a produtividade nas culturas de: ameixa, aipo, alcachofra, alface, batata, berinjela, café, cana de açúcar, cereja, espinafre, lúpulo, milho, morango, pepino, salsa, uva.
- b) Seu efeito retardador de maturação dos cítricos, inclusive na melhora da cor destes.

Como exemplo de seu uso direto na Indústria da Alimentação temos a sua incorporação no processo de malteação nas Indústrias do Malte e da Cerveja, nas quais se obtém as seguintes vantagens: a) redução do tempo de germinação da cevada, b) aumento do conteúdo em extrato das cevadas, c) redução das perdas de malteação de 1 a 2%, d) aumento do poder diastásico, que para  $\alpha$  - amilase chega a valores de 50%.

### III - REVISÃO TEÓRICA DA FERMENTAÇÃO DA GIBBERELLA FUJIKUROI

#### 1.0 Processo de Fermentação

As giberelinas são produzidas durante a fermentação - aeróbica de fungos da espécie Gibberella fujikuroi. A fermentação inicialmente se desenvolveu em superfície, técnica que se deixou de lado para dar lugar à fermentação submersa, mais eficiente no que diz respeito a rendimentos e condições de trabalho.

Na fermentação submersa, o meio de cultura inoculado com o microrganismo, é mantido em condições de aeração e agitação, que favorecem o desenvolvimento e o metabolismo em todas as suas etapas. O microrganismo requer para o seu desenvolvimento, fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio (8). A fonte de carbono é exigida para a formação de biomassa, metabólitos e para a produção de energia requerida no metabolismo. Esta pode ser suprida pelos seguintes substratos:

- a) carboidratos: glicose, sacarose, lactose, amido.
- b) alcoois: glicerol
- c) Óleos vegetais: girassol e linho

A necessidade de nitrogênio pode ser satisfeita com substratos de origem orgânico ou inorgânico, ou uma combinação de ambos.

Empregam-se com êxito os seguintes:

procedência inorgânica: nitrato de amônio, cloreto de amônio, sulfato de amônio.

procedência orgânica: glicocola, tartarato de amônio, uréia, sub-produtos de Agro-indústrias tais como: água de maceração de milho, tortas de prensagem de sementes oleaginosas, farinha de soja e hidrolizados de proteínas de soja.

Os demais elementos, podem ser fornecidos como fosfato monopotássico e sulfato de magnésio.

Recomenda-se também, a presença de microquantidades dos seguintes cátions metálicos:  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Mo^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  (40).

A fermentação para a produção de ácido giberélico procede com o nitrogênio como substrato limitante, mantendo-se o carbono em excesso através de todo o ciclo. Os períodos de duração do processo variam entre 170 a 500 horas, dependendo da linhagem, meio de cultura e condições de cultura. Indicaram-se temperaturas de cultivo na faixa de 24-33° C (10), encontrando-se entre 29 e 31° C os valores ótimos relativos ao rendimento do metabolito.

A fermentação está caracterizada por uma série de etapas bem definidas, que correspondem a mudanças no metabolismo do fungo. As mesmas foram exaustivamente estudadas por Borrow, A e outros (9), os quais estabeleceram a sequência de etapas, a composição celular e sua cinética.



## 2.0 - Sequência de Etapas da Fermentação

Durante o transcurso da fermentação e obtenção de giberelinas, foram identificadas as seguintes etapas:

2.1 - Crescimento balanceado

2.2 - Produção de reservas

2.3 - Manutenção

2.4 - Terminal

### 2.1 - Crescimento balanceado

Imediatamente após o retardamento inicial (fase de latência), correspondente à adaptação do microrganismo ao meio de cultura, inicia-se um período de proliferação de células que caracteriza esta fase. Os nutrientes são assimilados do meio, produzindo-se biomassa celular, a partir dos mesmos. A assimilação destes obedece a proporções definidas e constantes. Cada aumento unitário da massa celular, vai acompanhado da assimilação de uma determinada quantidade de nutrientes.

Os coeficientes econômicos  $\frac{\Delta S}{\Delta M}$  (onde S = substrato M = massa micelial), estão determinados pelo modelo cinético de crescimento; o qual, por sua vez, está determinado pelas condições de transferência de oxigênio ao meio.

A composição celular permanece constante, estabelecendo-se valores de aproximadamente 6% de matérias gordurosas e 16% de carboidratos. A etapa finaliza quando o microrganismo assimila a totalidade de nitrogênio, contido no meio de cultura. Portanto, este determina a quantidade de massa celular a formar-se.

Durante esta etapa não há produção de ácido giberélico.

## 2.2 - Produção de reservas

Esta etapa se caracteriza pelo término da proliferação do microrganismo e pelas mudanças no seu metabolismo. A partir deste momento começam a acumular-se substâncias de reserva, no início rapidamente, seguindo-se taxas de formação decrescentes, até alcançar um máximo de massa micelial.

As substâncias de reserva sintetizadas são carboidratos polímeros de hexose e triglicerídeos saturados. No fim desta fase chega-se a uma composição celular de aproximadamente 32% de carboidratos e 45% de gorduras. Paralelamente à formação de reservas, inicia a produção de ácido giberélico. A respeito dos nutrientes que restam no meio de cultura, o carbono continua sendo utilizado; o fósforo e o magnésio, estando ainda presentes, são assimilados.

## 2.3 - Manutenção

Durante esta etapa o único nutriente assimilado é o carbono. A formação de reservas de gorduras e carboidratos cessa, continuando a produção de ácido giberélico.

O microrganismo metaboliza a fonte de carbono para obter a energia necessária à continuação das funções vitais e para a produção de metabólitos.

## 2.4 - Terminal

Durante esta fase o microrganismo não utiliza mais carbono, nem produz ácido giberélico. O micélio começa a degenerar-se, produzindo vacuolação e fragmentação das hifas. Os constituintes do citoplasma são liberados no meio da cultura.

3.0 - Aspectos Cinéticos das Etapas de Fermentação Gibberelínica.

3.1 - Etapa de Crescimento balanceado

A multiplicação celular se inicia segundo um modelo cinético exponencial. O aumento da biomassa fica determinado pela equação:  $\ln X = \ln X_0 + \mu t$  onde : X concentração de biomassa ao tempo t (mg de micélio seco por 100 ml de meio de cultura)

$$X_0 = \text{concentração de inóculo} \left[ \frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \right]$$

t = tempo (h)

$$\mu = \text{taxa específica de crescimento} \left[ \text{h}^{-1} \right]$$

A taxa específica de crescimento é independente: da taxa de transferência de oxigênio ao meio de cultura, da intensidade de agitação, e da taxa de aeração. Ademais, é independente das concentrações iniciais de nitrogênio e inóculo no meio de cultura, e do pH no intervalo  $3.5 \leq \text{pH} \leq 6.0$ . Por outro lado, a taxa específica de crescimento depende da linhagem empregada e de uma série de fatores envolvidos na composição do meio de cultura, tais como:

- a - A natureza da fonte de nitrogênio; para o nitrogênio de procedência orgânica  $\mu$  é maior que para nitrogênio inorgânico.
- b - A concentração inicial de carboidrato ( $G_0$ ); quando a mesma é elevada,  $\mu$  diminui com aumentos de  $G_0$ .
- c - Para valores de pH fora do intervalo  $3.5 \leq \text{pH} \leq 6.0$ ,  $\mu$  diminui.

O modelo de crescimento exponencial estabelecido, requer que a tensão de oxigênio no meio de cultura, alcance valores maiores ou iguais a um determinado valor crítico (11,34). A manutenção deste valor da tensão de oxigênio, depende por sua vez da diferença  $TTO_{max} - TDO$ , onde:

$TTO_{max}$  = Taxa de transferência de oxigênio ao cultivo em condições máximas de aeração e agitação

$$\left[ \frac{m M \text{ de } O_2}{l.h} \right]$$

$TDO$  = Taxa de demanda de oxigênio do microrganismo no meio de cultura  $\left[ \frac{mM \text{ de } O_2}{l.h} \right]$

O primeiro destes parâmetros, está determinado pela taxa de aeração e pela intensidade de agitação, sendo fortemente influenciado pelo comportamento reológico do sistema microrganismo-meio de cultura. Os aumentos na viscosidade reduzem a intensidade da turbulência no sistema. Isto traz consigo efeitos negativos sobre a dispersão do ar no meio, e por conseguinte na Taxa de Transferência de Oxigênio máxima.

No caso particular desta fermentação, o microrganismo se desenvolve em filamentos. O comportamento reológico do sistema é não-newtoniano e a viscosidade aparente aumenta com o aumento da biomassa. De acordo com isto, o aumento da biomassa provoca uma diminuição na  $TTO_{m\acute{a}x}$  do sistema. Sobre o modelo reológico da cultura submersa de Gibberella fujikuroi, não há informação, porém, para a cultura de outro fungo filamentoso Streptomyces aureofaciens, foi determinado um comportamento pseudoplástico (45).

Na fermentação penicilínica (37), foi correlacionado o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_1a$ ) com a viscosidade aparente, obtendo-se uma relação do tipo  $K_1a = C1 (\mu_{app})^{-\omega}$  onde:

$K_1a$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.  $\left[ h^{-1} \right]$

$C1$  = constante  $\left[ (\text{pseudo-c.p})^w \cdot h^{-1} \right]$

$\eta_{app}$  = viscosidade aparente pseudoplástica (pseudo-Cp)

$K_1a$  depende ademais, da intensidade de aeração e agitação no sistema. Estes parâmetros na fermentação submersa podem vincular-se por uma equação do tipo  $K_1a = (P/V)^\alpha, (u_s)^\beta, \dots$

(1,4)

(P/V) = potencia aplicada por unidade de volume

( $U_s$ ) = velocidade do ar referida à secção transversal do fermentador.

A relação entre a taxa de transferência de oxigênio e  $K_1a$ , fica determinada pela equação  $TTO = K_1a (C^*-C)$

$C^*$  = concentração de saturação do oxigênio no meio de cultura, sob condições determinadas de temperatura e pressão

$$\left[ \frac{\text{mM de } O_2}{1 \text{ h}} \right]$$

$C$  = concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura

$$\left[ \frac{\text{mM de } O_2}{1 \text{ h}} \right]$$

A taxa de demanda de oxigênio é função da concentração

da biomassa no meio de cultura, ficando definida por uma equação do tipo  $TDO = Q_0 X'$ , onde:

$Q_0$  = taxa específica de demanda de oxigênio

$$\left[ \frac{\text{m M de } O_2}{\text{mg de micelio seco h}} \right]$$

$X'$  = concentração de biomassa

$$\left[ \frac{\text{mg de micelio seco}}{l} \right]$$

Durante o transcurso da etapa de crescimento balanceado com cinética exponencial, o parâmetro  $Q_0$  se compõe da soma de parâmetros  $Q_{om} + Q_{ob}$ , onde:

$Q_{om}$  - taxa específica de demanda do oxigênio requerida para a manutenção das funções vitais das células existentes

$$\left[ \frac{\text{m M de } O_2}{\text{mg de micelio seco h}} \right]$$

$Q_{ob}$  - taxa específica de demanda de oxigênio requerida para a síntese de novas células

$$\left[ \frac{\text{m M de } O_2}{\text{mg de micelio seco h}} \right]$$

Além disso, a TDO aumenta proporcionalmente com o aumento da massa celular.

A redução da diferença  $TTO_{max} - TDO$  a medida que transcorre a proliferação celular pode levar a valores de tensão do oxigênio dissolvido inferiores ao valor crítico requerido para manter um modelo de crescimento exponencial.

Nesse caso, o modelo cinético muda para crescimento segundo uma cinética linear, representada por uma equação do tipo  $\frac{dx}{dt} = C_2$ .

Se a concentração de nitrogênio inicial for elevada, ob-

tendo-se portanto, uma concentração de biomassa muito grande, as limitações na tensão do oxigênio levam a um terceiro modelo cinético, no qual o micélio se acumula com uma velocidade que diminui com o tempo. A transição do modelo de crescimento exponencial a linear, provoca mudanças nas contribuições dos nutrientes. Estas que durante o modelo exponencial atingem valores de: glicose, 8,1; nitrogênio (orgânico) 6,7; fósforo, 0,87, passam agora a: glicose, 15,9; nitrogênio, 5,7; fósforo, 0,44; expressos em mg, de nutriente, por mg de micélio seco, por g de meio de cultura.

O aumento significativo na contribuição da fonte de carbono, está indicando que a resposta às deficiências no fornecimento de oxigênio, se reflete no maior consumo de carboidrato, resultante de uma degradação anaeróbica parcial deste.

A taxa de crescimento durante o período linear, é independente da concentração inicial de nitrogênio, e diminui a medida que aumenta a concentração de carboidratos no meio de cultura.

### 3.2. Produção de reservas

Não existe informação publicada, no que diz respeito a modelos que descrevam a cinética de acumulação de reservas e a utilização do carboidrato durante a fase.

A acumulação da biomassa é rápida no início, e procede com velocidade de formação decrescente até atingir-se um máximo de biomassa. Borrow (9) analisa as mudanças durante esta etapa, utilizando os parâmetros,  $\frac{g(n+50) - g_n}{N_0}$  e  $\frac{X'(n+50) - X'_n}{N_0}$

onde:

$g_n$  = glicose consumida desde o início até o esgotamento do nitrogênio (g/l)

$g(n + 50)$  = glicose consumida desde o início, até 50 horas depois do esgotamento do nitrogênio (g/l)

$X'_n$  e  $X'(n + 50)$  = concentração da biomassa ao tempo  $t_n$  e  $t_n + 50$  respectivamente  $\left[ \frac{\text{mg de micélio seco}}{l} \right]$

$t_n$  = tempo até o esgotamento do nitrogênio (h)

$t(n + 50)$  = tempo até 50 horas após o esgotamento de nitrogênio (h)

$N_0$  = concentração inicial de nitrogênio  $\left[ \frac{\text{mM}}{l} \right]$

Borrow no sistema de fermentação por ele estudado, estabeleceu que  $\frac{X'(n + 50) - X'_n}{N_0}$  é independente da massa celular no intervalo,  $\left[ 0, \sim 60 \frac{\text{mM}}{l} \right]$  de nitrogênio inicial. Para uma concentração maior de células ( $N_0 > 60$ ), este parâmetro diminui com o aumento de  $N_0$ . Acontece o mesmo com  $\frac{g(n + 50) - g_n}{N_0}$ , definindo o valor de  $N_0$ ; para o qual se produz a mudança ( $N_0 \sim 75$ )

Disto resulta a existência de um intervalo no qual os atributos específicos de cada célula são independentes da concentração celular. A mudança produzida é provocada por restrições no fornecimento de oxigênio ao meio de cultura.

O intervalo no qual  $\frac{X'(n + 50) - X'_n}{N_0}$  é independente da massa celular, coincide com o intervalo no qual a fase de crescimento balanceada, transcorre segundo um modelo de crescimento exponencial. Os valores destes dois parâmetros, são independentes do pH no intervalo 4-8.



### 3.3. Manutenção

Neste período, a assimilação de carboidrato, transcorre segundo uma cinética linear.

A velocidade de utilização -  $\frac{dG}{dt}$  é independente da concentração celular no mesmo intervalo no qual  $\frac{dG}{dt}$  é  $\frac{g}{No} (n+50) - gn$ , para valores maiores, a cinética continua linear, sendo  $-\frac{dg}{dt}$  menor.

### 3.4. Produção de Ácido Giberélico

Borrow (9) estabeleceu para o sistema de fermentação, no qual desenvolveu as experiências, que a cinética de produção era linear, e que a taxa de produção  $\frac{dGA_3}{dt}$   $\left[ \frac{mg}{lh} \right]$  ( $GA_3$  = abreviatura de ácido giberélico), aumenta com o aumento da concentração de células no intervalo  $0 < No < 100$ ; diminuindo para valores de  $No > 100$ . Segundo o autor, a produtividade  $\frac{dGA_3}{No dt}$  cresce no intervalo  $0 < No < 60$ , diminuindo para  $No > 60$ .

A diminuição de  $\frac{dGA_3}{dt}$  e  $\frac{dGA_3}{No dt}$  para concentrações elevadas de massa celular, é uma resposta às restrições existentes no fornecimento de oxigênio.

A produção de  $GA_3$  não começa, enquanto não transcorrer grande parte da fase de reserva. Este retardamento é maior, a medida que  $No$  aumenta.

A quantidade máxima produzida, é proporcional à concentração do nitrogênio inicial no intervalo (0,100). A taxa de produção é independente do pH, na faixa de 3 a 5,5, decrescendo fora do intervalo; diminui ademais quando persistir uma

elevada concentração de glicose no meio.

Por outro lado, Ryu, D. e Humphrey, A (37) estabeleceram critérios para a otimização da produção de antibióticos (metabólitos secundários). Relacionaram a taxa de produção  $\frac{dp}{dt}$ , por uma equação do tipo  $\frac{dp}{dt} = Q_p X'$  onde:

$p$  = concentração de antibiótico (g/l)

$Q_p$  = taxa específica de produção de antibióticos

$$\left[ \frac{\text{g antibiótico}}{\text{mg de micélio seco h}} \right]$$

$X'$  = concentração de células  $\left[ \text{mg de micélio seco/l} \right]$

A taxa específica  $Q_p$ , é uma função complexa, de variáveis de natureza biológica e físico-química.  $Q_p$  é influenciada fundamentalmente pela composição genética da linhagem empregada.

Escolhida esta,  $Q_p$  pode-se vincular com o meio e as condições de cultura, segundo uma função:

$Q_p = \Psi(\mu, Q_o, Q_c)$  onde:

$Q_o$  = taxa específica de demanda de oxigênio

$$\left[ \frac{\text{mM de } O_2}{\text{mg micélio seco.h}} \right]$$

$Q_c$  = taxa específica de demanda de carboidrato

$$\left[ \frac{\text{mM de } O_2}{\text{mg micélio seco.h}} \right]$$

A otimização de  $Q_p$  se consegue quando  $\mu$  está acima de um valor crítico  $\mu_c$ , e  $Q_o$  e  $Q_c$  são de tal magnitude que não limitam o metabolismo do microrganismo. No valor ótimo,  $Q_p$  é independente da concentração celular e a velocidade de produção é linear.

#### 4.0 Metabolismo dos Fungos

Como foi descrito anteriormente, os fungos apresentam mudanças no metabolismo, durante o transcurso da fermentação.

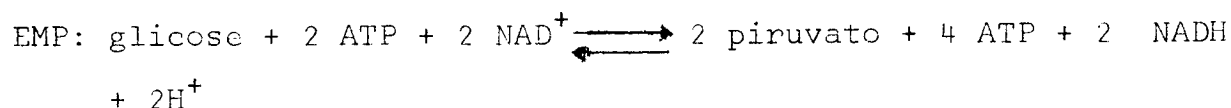
Pode-se fazer uma distinção entre o metabolismo primário e o secundário. O primeiro compreende o conjunto de reações químicas catalizadas pelas enzimas que dão lugar à formação de nova massa celular fornecendo ademais, a energia necessária para a formação desta. O metabolismo secundário compreende a produção de energia e síntese, cujos produtos finais não desempenham nenhum papel na economia do sistema.

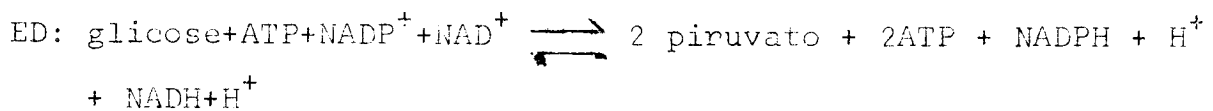
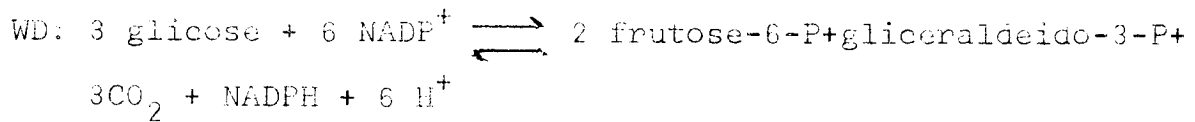
Os fungos em geral (com exceção das leveduras e os Ficomicetos inferiores), apresentam necessidade de oxigênio para levarem adiante o metabolismo (5). As necessidades de oxigênio e sua relação com a massa celular formada, variam de uma espécie a outra.

Muitos fungos podem utilizar os carboidratos por uma via anaeróbica, dando produtos de fermentação típicos (27). Apesar disto, os mesmos não podem desenvolver-se exclusivamente por essa via, requerendo a presença parcial de oxigênio.

A degradação das hexoses pelos fungos, é realizada por duas vias preponderantes: Embden-Meyerhof-Parnas e Warburg-Dickens (pentose-fosfato). Menos comum é o emprego da via Entner-Doudoroff.

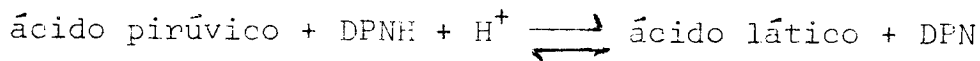
As mudanças químicas e termodinâmicas produzidas nestes mecanismos, se resumem a seguir:





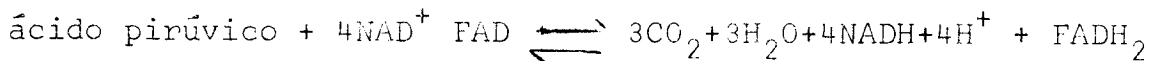
Até este momento, o metabolismo não requer a presença do oxigênio. A glicólise fornece energia e compostos químicos, que atuam como precursores ou componentes em sínteses e reações de oxi-redução.

Na ausência de oxigênio (ou limitação), o ácido pirúvico é reduzido para ácido lático por alguns fungos (27).

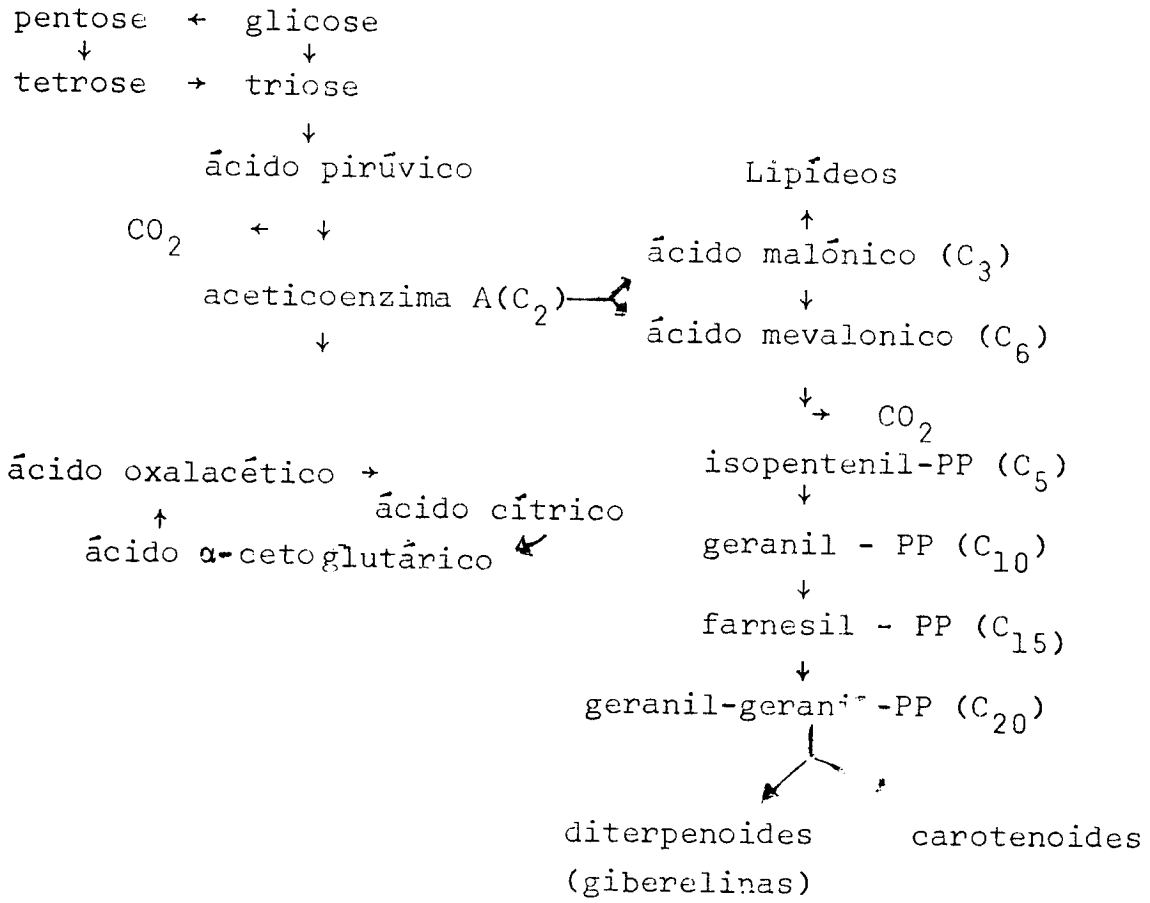


O ácido pirúvico formado na glicólise, é convertido em  $\text{CO}_2$  pela via do ciclo de Krebs, na presença de oxigênio como receptor final de elétrons.

O resultado da degradação desta molécula é a liberação de elevada quantidade de energia, que a célula armazena como ligações de ATP.



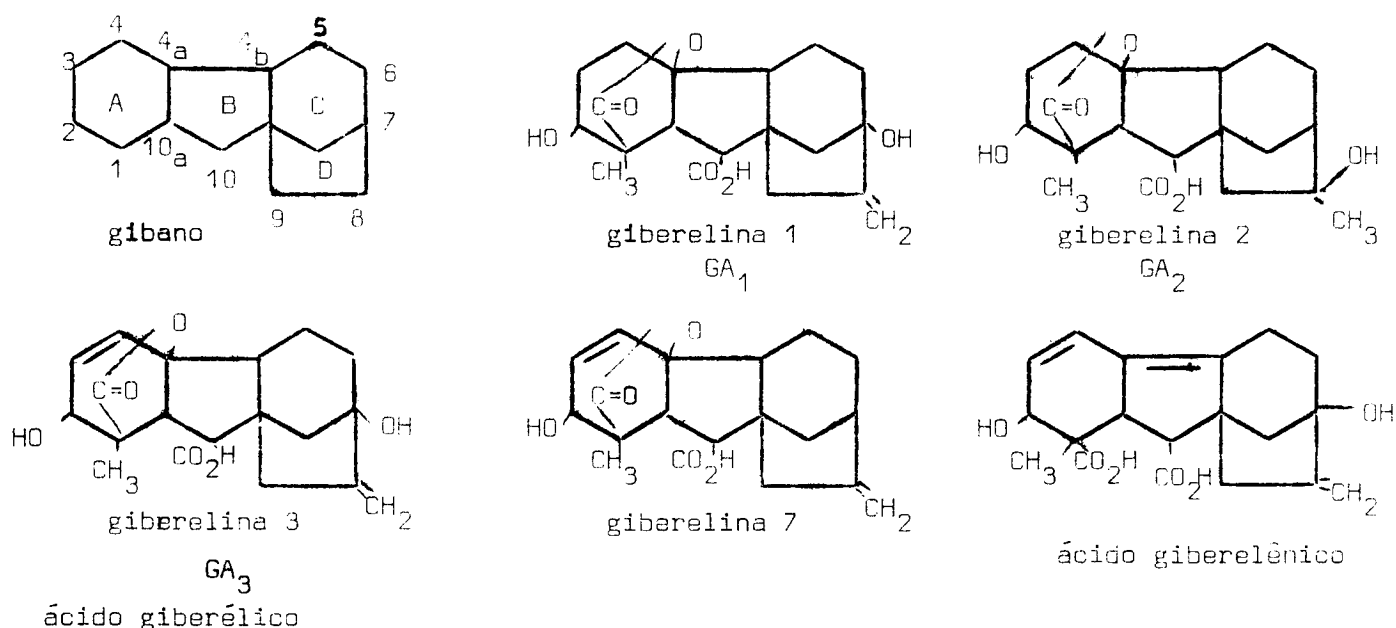
Simultaneamente, os compostos intermediários envolvidos no ciclo, são subtraídos deste, para a síntese de material celular e metabólitos secundários. A acetilcoenzima A formada na decarboxilação do ácido pirúvico dá origem à formação de lipídeos e de metabólitos tais como o ácido giberélico. (18,46). Por transaminação e aminação redutiva dos  $\alpha$ -cetoácidos do ciclo, sintetizam-se os aminoácidos. As reações discutidas estão esquematizadas na figura seguinte.



## 5.0 - Ácido giberélico - Propriedades Físicas e Químicas

As giberelinas são compostos químicos de natureza ácida. Caracterizam-se por ser diterpenoides com 5 anéis, que contém o grupo gibano.

Os membros da série das giberelinas conhecidos até agora, tem sido isolados do metabolismo da Gibberella Fujikuroi ou aparecem como compostos naturais sintetizados pelas plantas. Costuma-se designar os membros da série, com a sigla GA, e um número de identificação.



O ácido giberélico é o membro mais importante do grupo, ele é designado como GA<sub>3</sub>. Seu nome químico correto é lactona 1,4 do ácido 2,4 a, 7 - trihidróxi-1-metil-8-metileno-3-gibeno-1,10 dicarboxílico. Pode ser obtido como um sólido cristalino, que se funde a 233-235°C com decomposição, sendo a rotação específica  $[\alpha]_D^{19} = + 86$

É pouco solúvel na água ( ~ 5g/l) e no éter sulfúrico, moderadamente solúvel no acetato de etila, e apresenta boa

solubilidade em soluções de bicarbonato de sódio e acetato de sódio.

O sal de potássio, que pode ser obtido na forma cristalina, é mais solúvel na água, e apresenta a mesma atividade biológica.

O ácido giberélico apresenta problemas de estabilidade, devendo ser conservado, sob a forma cristalina, na ausência de umidade, e da luz; ou em soluções anidras de solventes orgânicos. As soluções aquosas não são estáveis. Nas soluções alcalinas o GA<sub>3</sub> sofre um reagrupamento para um isômero que é biologicamente inativo. Nas soluções ácidas é produzido o ácido giberelênico.

Ambos não apresentam atividade biológica.

Vários métodos tem sido propostos, para a identificação e determinação quantitativa deste composto. Phinney, B (1957) (42) desenvolveu um ensaio biológico, empregando mutantes anões da planta do milho (d-1). Neste ensaio a concentração de GA<sub>3</sub> é correlacionada com o crescimento da planta.

O composto pode ser identificado a partir do máximo de emissão de fluorescência a 463 m  $\mu$ , quando é tratado com ácido sulfúrico 85% e excitado com um comprimento de onda de 418 m  $\mu$ . Esta propriedade deu lugar ao método de determinação analítica, publicado por Kavanagh, F e Kuzel, N (1958) (24). O ácido giberelênico interfere, dando a mesma reação.

As restantes giberelinas são também interferentes, mas emitem com menor intensidade. A giberelina 1, a temperaturas próximas a 0° C, não emite praticamente fluorescência nessas condições. Este último serviu a Theriault, RJ (1961) (44), pa

ra estabelecer uma técnica de análise de  $GA_3$  em presença de  $GA_1$ .

A função lactona presente nas giberelinas, permitiu a Washburn, WH (1959) (44) estabelecer quantitativamente a porcentagem de  $GA_3$  e  $GA_1$  em misturas, baseando-se na absorção no infravermelho provocada por esta união. A identificação das giberelinas procedeu com êxito em cromatografia sobre papel, e em camada delgada (3, 18, 29, 51).

A identificação, e a determinação quantitativa foi feita por cromatografia de gases. Foram obtidos bons resultados por marcação (51, 26) com diazometano  $C^{14}$  e tritio, e identificação por técnicas de radio-química. (2)

A obtenção de  $GA_3$  em forma cristalina ou em soluções em solventes não aquosos, requer uma sucessão de etapas bastante complicadas.

A separação das giberelinas do caldo de cultura, foi efetuada por adsorventes, tais como carvão ativo ou celite. A adsorção efetua-se a baixos pH (2 a 4), praticando-se a desorção com solventes orgânicos, tais como acetona ou butanol (12).

Alternativamente foram descritos processos nos quais separaram-se as giberelinas por intercâmbio iônico. Isto foi feito empregando resinas aniônicas, fracas, médias ou fortes praticando-se a eluição com soluções aquosas de eletrolitos ou em solventes orgânicos em meio aquoso.

A técnica de eluição por eletrolitos dissolvidos em solventes orgânicos em meio aquoso deu resultados favoráveis,



apresentando a vantagem de que combinada com trocadores de basicidade elevada, requer um volume de eluente relativamente baixo.

O solvente geralmente se compõe de água e um álcool, que pode ser metanol, etanol, propanol ou butanol.

O processo se baseia no fato de que no solvente misto, a constante dielétrica diminui, reduzindo a dissociação em ions, do eletrólito de eluição (10,50). Simultaneamente, facilita-se a solubilidade das partes hidrófobas das moléculas orgânicas.

Ambos fatos trazem um deslocamento da constante de equilíbrio da reação entre os ions adsorvidos e os ions em solução. O anion orgânico giberelina, fortemente aderido ao trocador, é facilmente eluido com este solvente.

O solvente orgânico é eliminado por evaporação em ambos processos, e a purificação continua por sucessivas extrações solvente-solvente, no sistema acetato de etila-água.

O ácido giberélico finalmente é cristalizado e re-cristalizado de soluções em acetato de etila.

## 6.0 - Revisão Bibliográfica

Borrow, A. e colaboradores (1955) (6) trabalharam com Fusarium monilliforme ACC 917. Operando com fermentadores e em meios de cultura contendo glicose 4%, tartarato de amônio 0,95%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2%,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,06%,  $\text{Mg SO}_4$  0,02%, obtiveram rendimentos de 180 mg/l de ácido giberélico.

Borrow, A e colaboradores (1958) (7) com a mesma linhagem e empregando nitrato de amônio desenvolveram um processo em duas etapas. O mesmo envolve uma etapa de crescimento com nitrogênio como substrato limitante em concentrações de 0,2 a 0,5% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , e glicose, sacarose ou glicerina como fonte de carbono. O micélio formado é transferido a outro meio com uma relação C:N de 30 a 55:1, obtido a partir de 0,11-0,5% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 3,3 a 26% de glicose. Obtiveram 413 mg/l em 400 horas. Com uma modificação deste processo, no qual posteriormente ao crescimento, se efetuou uma adição contínua de glicose ao meio, chegaram a obter 1000 mg/l em 450-500 horas. A quantidade de carboidratos requerida foi de 35% ( $\frac{\text{peso}}{\text{volume}}$ ) e o meio continha aproximadamente 100  $\frac{\text{mM}}{\text{l}}$  de nitrogênio.

Darken, M e colaboradores (1959) (13) empregaram F. moniliforme Kew 917 e um meio de cultura baseado em: água de maceração de milho 2,5%, sulfato de amônio 0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05%. Obtiveram rendimentos de 880 mg/l em agitadores de movimento excêntrico (r=2,5 cm; 240 r.p.m.), cultivando em Erlenmeyer de 250 ml 20% de volume de meio de cultura; e 650 mg/l em fermentadores de 4000 l. Os autores estudaram o emprego de fontes de carbono de utilização lenta, e a adição

contínua de glicose, mantendo níveis de concentração de glicose menores ou iguais a 1 mg/l, posteriormente ao desenvolvimento do cultivo. Em frascos obtiveram os melhores resultados com uma fonte de carbono composta de: glicose 1% glicerina 2% e lactosa 2%; em fermentadores com amido 2%, glicerina 3%, ou por adição inicial de 2% de glicose e 3% em forma contínua. O tempo de fermentação foi de 168 horas, e o ácido giberélico foi determinado por fluorimetria, segundo Theriault (44).

Serzedello, A e Whitaker, N(1960) (39) com F. moniliforme 1135 e trabalhando com agitadores de movimento excêntrico, Erlenmeyer de 500 ml, 20% de meio de cultura, obtiveram rendimentos de 400 mg/l em 576 horas. Desenvolveram a fermentação no meio de Borrow (6), com adição gradativa de sacarose, e tartarato de amônio numa concentração equivalente a  $103 \frac{\text{mM}}{1}$  de nitrogênio.

Sánchez-Marroquín A. (1963) (38) estudou a atividade de 43 linhagens de Gibberella fujikuroi, provenientes do Instituto de Micologia da Universidade de Recife e do Instituto Oswaldo Cruz, encontrando que somente duas delas F. moniliforme Scheldon IMUR 1148 e F. moniliforme IOC 3326, produziam o metabolito com bons rendimentos. Investigou a incidência de um conjunto de substâncias que supostamente promoveriam a produção do ácido, encontrando que nenhuma delas melhorava significativamente os rendimentos. O autor desenvolveu um meio de cultura com a seguinte composição: glicose 2%, água de maceração de milho 2,5%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,26%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05%,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,02%.

Empregando-o, obteve, com a linhagem IOC 3326, rendimentos de 1196 mg/l com agitadores de movimento excêntrico ( $r = 2,5$  cm, 200 r.p.m.), usando Erlenmeyer de 250 ml, 20% de volume. Em fermentadores de 60 l, a 0,5 v.v.m.de aeração e 230 r.p.m. atingiu um rendimento de 997 mg/l.

Os tempos de fermentação foram de 168 horas e o ácido giberélico foi determinado por fluorimetria, segundo Kavanagh e Kuzel (24).

Podojil, M e Ricicova, A (1964) (35) estudaram a influência das fontes de nitrogênio sobre a produção de ácido giberélico. Encontraram que nos meios que continham água de maceração de milho, obtém-se unicamente  $GA_3$ . Com o nitrogênio proveniente da farinha de soja, obtém-se misturas de giberelinas e empregando a fração II da hidrólise da farinha de soja (Thornberry e Shanahan, (1951)), aumenta-se o rendimento em giberelinas, em 25% relativo ao da farinha de soja. Estimula-se a produção de  $GA_3$  e obtém-se uma relação  $GA_3 : GA_1$  de 4: 1. Com o meio base de Fuska e colaboradores e a fração de hidrólise II, se obtém 380 mg/l de  $GA_3$  operando em agitador de movimento excêntrico ( $r = 5,5$  cm, 200 r.p.m.), com Erlenmeyer de 500 ml, 16% do volume. Os autores indicam que o estímulo da produção de  $GA_3$  no meio contendo a fração II, é provocado pelo alto teor de carboidratos e celulose da mesma.

Holme, T e Zacharias, B (1965) (21) estudaram a produção de ácido giberélico, em agitadores de movimento excêntrico ( $r = 2,5$  cm; 220 r.p.m.), empregando Erlenmeyer de 1000ml, 30% de volume; e sob processo contínuo, com fermentadores de

3 e 20 litros, com uma aeração de 0,17 e 0,25 v.v.m. respectivamente, sendo a TTO de 85 mM de O<sub>2</sub>/lh (determinada pela técnica de oxidação do sulfito). Empregaram o meio base de Borrow (8), composto de: glicose 16%; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,24%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5%; Mg SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,1%.

Com F. monoliforme ACC917, obtiveram rendimentos de 216 mg/l em 360 horas cultivando em frascos, e 564 mg/l em fermentação contínua com um tempo de detenção de 200 horas.

#### IV - MATERIAIS E MÉTODOS

##### 1.0 Microrganismo

Neste trabalho utilizaram-se culturas puras de Gibberella fujikuroi IZ 1399, Gibberella moniliforme IZ 1413 e Gibberella saubineti IZ 1400, fornecidas pelo Instituto Zimotécnico "Prof. Jaime Rocha de Almeida" da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP, Piracicaba.

Do Instituto "Oswaldo Cruz" Ministério de Saúde, Rio de Janeiro, GB, obteve-se a cultura da Gibberella fujikuroi IOC 3326.

Todas as culturas foram recebidas em tubos de agar inclinado. Foram mantidas na geladeira; efetuando-se sucessivos repasses cada dois meses, em tubos de agar-batata-dextrose inclinados.

Das culturas padrão se inocularam tubos de agar-batata-dextrose, as quais foram por sua vez mantidas por sucessivos períodos de uma semana sob a temperatura de 27° C. A partir destes últimos, retirou-se o material de semeadura para as experiências.

## 2.0 Meios de cultura e Reativos Microbiológicos

Para manutenção das linhagens empregou-se Agar-batata-dextrose-Difco. A composição do meio é (14):

infusão de 200 g de batata  
dextrose 20 g  
agar 15 g  
35 g desta fórmula são reidratados em  
1000 ml de água  
pH final 5,6

Tubos de ensaio (18x180 mm) contendo 12 ml de meio, foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Antes da sua utilização, foram aquecidos em banho de água até fusão do agar e inclinados.

Os meios de cultura empregados no estudo da fermentação foram preparados a partir de:

D(+) glicose (monohidratada) para bacteriologia, fosfato monopotássico P.A., nitrato de amônio P.A., sulfato de magnésio heptahidratado P.A., todos da linha Merck; amido solúvel P.A., Reagen; lactose RP, Carlo Erba.

A água de maceração de milho foi fornecida por Refinações de Milho Brasil Ltda. A mesma é comercializada como "Milhocina 50%". A análise desta deu os seguintes resultados:

resíduo seco ( 100 - 110° C )	50.6%
nitrogênio total	3,45%

Foi empregada água destilada, em todas as formulações de meios de cultura. Quando foi adicionado antiespumante, uti

lizou-se óleo de girassol, previamente esterilizado em tubos de ensaio, durante 20 minutos a 121° C.

Os meios de cultura, para a fermentação em frascos Erlenmeyer de 500 ml (volume do meio de cultura igual a 10 ou 20% de capacidade nominal), se esterilizaram durante 15 minutos a 121° C. Para experiências no fermentador se duplicou o tempo de esterilização.

Quando foi necessária a adição de glicose durante o transcurso da fermentação, prepararam-se soluções de concentração a 50% (w/v), esterilizados em frascos Erlenmeyer de 250 ml (20% de solução), durante 30 minutos a 105° C. O material de vidro utilizado na transferência de culturas e outras operações, foi esterilizado no calor seco, durante 2 horas a 160° C.



### 3.3 Equipamentos para o desenvolvimento da Fermentação em Frascos

Para o estudo da fermentação em frascos empregaram-se os seguintes equipamentos:

Agitador de movimento recíproco, marca New Brunswick Scientific Co. Inc. modelo R. 8.

Características: deslocamento (1) ajustável entre 0 e 10 cm, em intervalos de 0,6 cm, velocidade de deslocamento variável entre 50 e 200 c.p.m.

Agitador de movimento excêntrico, marca New Brunswick Scientific Co. Inc., modelo G 53.

Características: raio de giro:  $r = 2,54$  cm, velocidade: variável entre 30 e 300 r.p.m.

Agitador de movimento excêntrico, marca New Brunswick Scientific Co. Inc, modelo G 27.

Características. raio de giro:  $r = 2,54$  cm, velocidade: variável entre 40 e 400 r.p.m.

Controle de temperatura da câmara entre  $0-600^{\circ}C \pm 0,5$ .

Todas as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 ml (capacidade nominal), empregando-se volumes do meio de cultura com 10 a 20% desta. Como tampão para manutenção da assépsia colocou-se algodão recoberto com gaze. Em algumas experiências, os frascos Erlenmeyer usados, foram

modificados para aumentar a TTO e a intensidade de agitação (16, 41, 43, 47).

As modificações foram:

a) Colocação de um defletor horizontal (segundo desenho anexado no apêndice pag. 105 ), para a operação no agitador recíproco.

b) Construção de defletores laterais dispostos em forma triangular (segundo desenho anexado no apêndice pág 106 ), para emprego nos agitadores de movimento excêntrico. A preparação destes últimos foi realizada na "secção Vidraria", do Instituto de Física, "Cleb Watachin" UNICAMP.

#### 4.0 Estudos em Fermentador, na Escala de Laboratório

Empregou-se um fermentador, marca Fermentation Design Inc, modelo Mini-Ferm M - 1000.

Características: dimensões do vaso: altura 180 mm, diâmetro 83 mm, capacidade 57 ml/cm de altura.

Agitador: bastão cilíndrico, comprimento 5 cm; diâmetro 1 cm, propulsão magnética

Controle de temperatura: por aquecimento como resistência e refrigeração com água, precisão  $\pm 0,5^{\circ} \text{C}$

Aeração: bomba de diafragma marca Metaframe - Corporation, modelo Comet 90, capacidade máxima 1 l/min (ar); rotâmetro Fast & Tite, 0-1,5 l min de ar a 1 atm e  $21,1^{\circ} \text{C}$ ; filtro de esterilização de ar; material filtrante de lã de vidro.

A determinação de oxigênio dissolvido durante o transcurso da fermentação, foi efetuada com um eletrodo de oxigênio, marca Fermentation Design Inc. modelo E 100, de desenho galvânico e um analisador de oxigênio de igual procedência, modelo DOAR.

O analisador de oxigênio possui um registrador com as seguintes características: velocidade de avanço do papel gráfico: 2,54 cm/h. Características do pa

em.  
pel gráfico: largura 6,36, √ gradua-  
ção = 0 - 100%. 1 div. = 2% do va-  
lor da saturação de oxigênio na so-  
lução. Velocidade de impressão: 30  
impressões/min.

A esterilização do fermentador, filtro de 15 de vi-  
dro e condutores de ar se efetuaram em auto-clave, com o  
meio de cultura já introduzido no fermentador. O eletrodo de  
oxigênio foi autoclavado duas vezes antes de ser usado,  
afim de estabilizá-lo.

O ajuste correspondente ao ponto 0% (ausência de  
oxigênio dissolvido), foi efetuado com o fermentador sem  
aeração e agitação, imediatamente depois de autoclavado e  
ajustado na temperatura de operação ( $\pm 2^{\circ}$  C).

O ajuste correspondente ao ponto 100% (saturação de  
oxigênio na solução), é efetuado, mantendo-se o fermenta-  
dor por 10 minutos, nas condições de agitação e aeração, cor-  
respondentes à experiência. A temperatura se ajustou com u-  
na precisão de  $\pm 0.5^{\circ}$  C (33).

## 5.0 Técnicas de Análises

O pH foi determinado com um aparelho marca Titriskop Metrohm Herisan e posteriormente com um medidor marca Heriba, modelo H5. Alternativamente quando a quantidade do meio da cultura estava limitada, foi empregado papel indicador Merck. As determinações se efetuaram no meio de cultura com o micélio, e depois de separar este último por filtração. Não se encontraram diferenças entre os valores obtidos segundo os dois procedimentos.

Os carboidratos redutores foram estimados espectrofotometricamente com o reativo "Antrone", segundo uma modificação (17) do método original de Morris (25). As leituras de absorbância se efetuaram em um espectrofotômetro marca Coleman, modelo 295 B, sobre cubetas de 19 mm de diâmetro. Os reativos empregados foram:

Anthrone para síntese, Merck e ácido sulfúrico P.A., J. T. Baker (Brasil).

A curva padrão se determinou com soluções de glicose, preparadas a partir de D (+) glicose (monohidratada) para bacteriologia, Merck. Para um comprimento de onda de 630 m $\mu$ , obtém-se uma reta que passa pela origem. A tangente inversa tem um valor de 62,5  $\frac{\text{g/ml}}{\text{U.A}}$ , no intervalo 0,08-0,24 unidades de absorbância (U.A.)

As determinações nos caldos de cultura, foram feitas depois de separar o micélio por filtração. Sobre uma determinação feita em quintuplicata, obteve-se um valor médio de

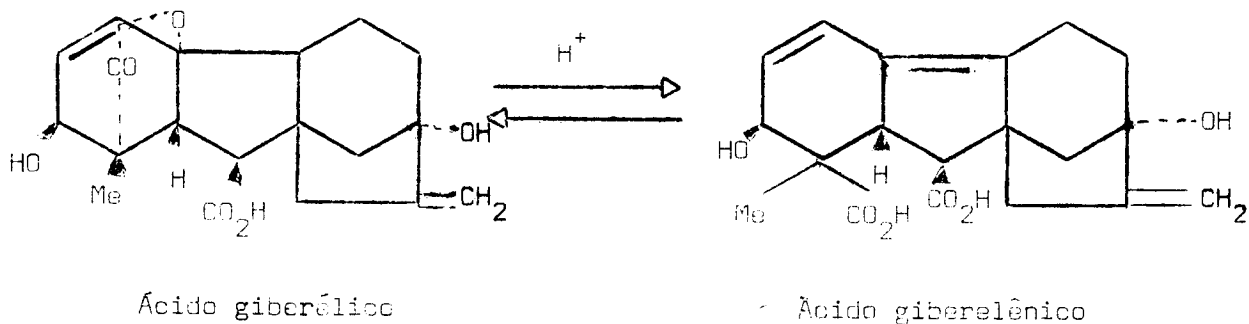
51,39g/l com um desvio padrão de  $\pm 2.46$ . A determinação efetuou-se diluindo o caldo a 2:10000.

Para a determinação da massa celular, separou-se o micélio por filtração a vácuo.

O micélio retido sobre o papel de filtro Whatman Nº. 52 (massa determinada na temperatura de secagem), foi lavado duas vezes com água destilada e secado em balança Mettler, modelo P160 N, com lâmpada de infravermelho de igual procedência, modelo LP 11. A temperatura da câmara de secagem foi de 75º C. Os resultados se expressam como peso de micélio seco, por 100 ml de meio de cultura inicial.

A determinação em quintuplicata deu um desvio padrão de  $\pm 43$ , para um valor médio de 920 mg/100 ml.

O ácido giberélico foi determinado segundo a técnica de Holbrook, A e colaboradores (22), a determinação se baseia na decomposição lenta do ácido para o ácido giberelênico, em presença de ácidos minerais diluídos.



As duplas ligações conjugadas do ácido giberelênico, lhe conferem um máximo de absorção na faixa ultravioleta, com um comprimento de onda de 254 m $\mu$ . A reação se efetua em condições controladas de temperatura e de tempo, empregando-

-se ácido clorídrico diluído e adicionando-se álcool absoluto para retardar a decomposição do ácido giberelênico formado, para ácido alogibérico e posteriormente ácido gibérico.

Estes dois compostos apresentam absorção fraca no ultravioleta.

Os meios de cultura podem conter ácido giberelênico, assim como ácido de Sumiki (ácido 5-hidroximetilfurano-2-carboxílico). O método indica correções pela influência dos mesmos na determinação.

Com exceção da giberelina 7, que dá a mesma reação que o ácido giberélico, o resto das giberelinas não interferem na determinação.

O procedimento seguido consistiu em tratar o meio de cultura já liberado do micélio por filtração ou centrifugação. Este é clarificado por adição sucessiva de acetato de zinco e ferrocianeto de potássio. Por filtração separa-se o meio de cultura clarificado dos flocos; ajusta-se a diluição e se efetua o tratamento de decomposição da amostra.

As leituras se efetuaram num espectrofotômetro Carl Zeiss, modelo PMQ II, empregando cubetas de quartzo de 1 cm. de espessura (15). Nas determinações, empregou-se: ácido clorídrico e ácido acético P.A., J. T. Baker (Brasil); álcool absoluto P.A., Analpur Kikion (Brasil); acetato de zinco P.A., QUEEL (Brasil); ferrocianeto de potássio P.A., Merck.

A quantidade de ácido giberélico das amostras calculou-se na base de uma curva padrão, preparada com a mesma técnica de decomposição do ácido giberélico (apêndice pag.102).

As leituras efetuaram-se a 254 m $\mu$  com uma largura de banda de 1,5 m $\mu$ .

Foi empregado como padrão ácido giberélico grau III, pureza mínima 90%, procedência: Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Não foi necessário introduzir na curva padrão, correções pela presença de interferentes (apêndice pág.102). Nas determinações efetuadas com os caldos de cultura, não se controlou a presença de interferentes.

Para as observações microscópicas das culturas, empregou-se um microscópio Carl Zeiss. Os caldos de cultura foram observados em gota pendente com um aumento de 40 x 12,5 = 500 vezes.

As mudanças na morfologia do micélio durante o transcurso da fermentação foram fotografadas. As microfotografias foram tomadas no Instituto de Biologia, UNICAMP, sendo reveladas e copiadas na Seção "Documentação Científica"; UNICAMP.

Foi empregado filme FujiNeopan SSJ135, 24 x 36 mm e papel fotográfico Kodakbromide F3. Parte das preparações foram montadas em gota pendente, suspendendo o micélio em lactofenol e incorporando "Cotton blue" ou Sudan preto para sua coloração.

Alternadamente tomaram-se fotografias com a objetiva de imersão. Para ela, o micélio se fixou na lâmina com formol, efetuando-se colorações com azul de toluidina, safranina ou Sudan preto. As cópias correspondem a aumento de 900 vezes para as suspensões em lactofenol e 1300 para as tomadas por imersão.



## 6.0 Programação das Experiências

Os conjuntos de experiências programadas tiveram como base estudar:

- a) O comportamento das linhagens com respeito a produção de ácido giberélico.
- b) A determinação do meio de cultura ótimo baseado, no balanço de materiais dos nutrientes, e no efeito da natureza dos mesmos, sobre o metabolismo do microrganismo.
- c) A influência das condições da cultura, principalmente os efeitos da aeração e agitação.

O estudo das variáveis mencionadas realizou-se:

- a) estudando comparativamente as linhagens.
- b) Empregando meios de cultura nos quais se modificaram os nutrientes e a concentração destes.
- c) Com agitadores de frascos de movimento recíproco e excêntrico, os quais se ensaiaram em diferentes condições de operação.
- d) Fazendo uso de frascos com defletores, para aumentar o grau de turbulência do fluido ensaiado.
- e) Num fermentador de laboratório com analisador de oxigênio dissolvido.

O conjunto de experiências realizadas se detalha no apêndice pag.71 a 76.0 quadro 1 nele apresentado, faz referência às condições, de cultura experimentadas, principalmente aeração e agitação e as linhagens ensaiadas. O quadro 2 apresenta os meios de cultura estudados.

1.0 - Análises Parciais das Experiências

1.1. Experiência I

A experiência foi projetada para observar a reação das linhagens, no meio de cultura desenvolvido por Sánchez - Marroquín (38), e a resposta das mesmas a nossas condições de cultura.

Com exceção da Gibberella Saubinette IZ1400 que forma "pellets", todas se desenvolveram de preferência em filamentos. Nas 48 horas, registrou-se um aumento de pH a valores de 8,7, 8,9. A observação microscópica das culturas mostrou fragmentação e alargamento das hifas, formação de um grande vacúolo central (ou dois), ficando o resto do citoplasma contornando a parede celular. O crescimento se deteve, caindo logo a concentração de biomassa, por causa da autólise observada.

Adicionando glicose conseguiu-se a recuperação do micélio. Formaram-se hifas de comprimento médio, septadas e pouco ramificadas, sem formações de reserva visíveis. O pH caiu novamente para os valores 3,8-4,2 (5 para IZ 1400), em seguida elevou-se aproximadamente para 7,0, onde se manteve até às 170 horas.

A partir deste instante, repetiu-se o fenômeno de degeneração celular, acompanhada das mesmas mudanças. A IOC 3326 não apresentou a última etapa, o pH elevou-se lentamente de 4,0 até 7,0; o micélio manteve as características já estabelecidas.

Os pesos de micélio obtidos com as diferentes espécies do microrganismo, situaram-se na faixa 1090-1220 mg/100 ml (mi-

célio seco). O meio de cultura continha 63,0 mM/l de nitrogênio.

Baseando-se nos dados obtidos, pode-se estabelecer que:

- a) As culturas nas condições ensaiadas não podem manter-se com a concentração de carboidratos estabelecida por Sánchez-Marroquín, sem sofrer degeneração.
- b) A concentração de glicose exigida foi maior que 40 g/l.
- c) Os pesos dos micélios obtidos, são da mesma ordem, para todas as variedades.

## 1.2. Experiência II

Foi ensaiado um meio de cultura baseado no meio I, no qual se reduziu o nitrogênio a uma concentração de 35,5 mM/l. Isto leva a uma diminuição de 43,6% na quantidade de células a formar-se e uma redução do consumo de carboidratos.

O comportamento reológico do sistema muda, diminui a viscosidade aparente e melhora a taxa de transferência de oxigênio (TTO). O nitrogênio de natureza orgânica representa 9,5% do total.

### Curso da fermentação

		III	II2	II3	II4
Tempo		IZ1399	IZ1413	IZ1400	IOC3326
36,5	glicose assimilada %	25	42	47	87,5
	peso de micélio seco mg/100 ml	100	320	400	770
61 h	glicose assimilada %	97	98	98,5	98,5
	peso de micélio seco mg/100 ml	860	870	910	1170

Analisando o quadro de valores, pode-se estabelecer que a linhagem IOC 3326 se desenvolveu mais rapidamente, apresentando uma taxa específica de crescimento maior que as demais. A etapa de crescimento foi acompanhada de uma queda de pH, até alcançar valores de: II 1 = 2,6; II2 = 3,5; II3 = 4,1; II4 = 2,8.

Nesta fase o micélio é septado, as hifas são compridas, delgadas e pouco ramificadas. Inicialmente observaram-se as macroconídias características deste gênero (em forma de fusco)(40)

O fim da fase, se caracterizou por uma elevação do pH, chegando a valores de: III1 = 7,0; III2 = 7,8; III3 = 6,4; III4 = 5,4. A resposta ao esgotamento da glicose (próximo das 60 horas), foi uma elevação gradual do pH ao intervalo 8,5 - 9,0.

A linhagem IZ 1413 sofreu degeneração similar à encontrada na experiência I. As restantes esporularam-se dando macroconídias, o citoplasma, perdeu sua granulação.

Sobre uma parte dos frascos, efetuou-se adição de glicose, evitando-se o esgotamento do carboidrato. Desta forma se conseguiu entrar na fase de reserva, dando lugar ao aparecimento de uma fileira de glóbulos de gordura no citoplasma. O pH passou ao intervalo 4-5, mantendo-se nessa faixa enquanto a cultura não esgotou a glicose. A linhagem IOC3326 reagiu à adição de glicose com uma mudança na pigmentação do caldo de cultura que passou do rosado ao amarelo.

Nestas condições de fermentação não se chegou a obter o ácido giberélico.

### 1.3. Experiência III

Neste conjunto de experiências, procurou-se obter informação sob o efeito da concentração de glicose, no metabolismo do micélio.

Empregando a linhagem IOC 3326 foram estudadas:

- a) A adição de uma elevada concentração inicial de glicose (Exp. III1)
- b) A adição em etapas mantendo níveis de concentração superiores a 10 g/l (Exp. III3) e 5 g/l (Exp. III4).
- c) A influência das condições de cultura (aeração e agitação) sobre a quantidade de biomassa obtida, mediante a variação da concentração do substrato limitante.

#### Curso da fermentação

		III 1	III 2	III 3	III 4
	tempo total(h)	238	238	196.5	196.5
	nitrogenio mM/l	28,3	63,0	35,5	35,5
	n. orgânico (%)	4,7	48,4	8,6	8,6
FASE DE CRESC. BA- BALANCEADO	duração aprox.	~ 24	~ 24	~ 46	~ 46
	peso m. seco mg/mM de ni- trogenio	-	-	170	151
	glicose consu- mida g/m MNo	-	-	0,582	0,418
FASE DE RESERVA	duração aprox. (h)	termina às 142	termina às 119,5	f. de re- serva in- completa	f. de re- serva in- completa
	max. peso de mic. seco mg/ mMNo	584	261	394	270

A fase de crescimento balanceado foi de menor duração para III 1 e 2. Atribui-se isto ao fato de haver inoculado III 3 e 4, com micélio cultivado por um período de 56 horas. Este

último além de aumentar o período de latência, reduz a velocidade de avanço da fermentação, não chegando a completar-se a fase de reserva às 196,5 horas.

#### Evolução do pH

Com o meio contendo alta concentração inicial de carboidrato, o pH se situou dentro do intervalo 3-4, mantendo-se o pH 4,0 durante as fases de reserva e manutenção. A fermentação III 2, termina a sua fase de crescimento, alcançando o valor 6,0, enquanto que III 3 e 4 ao finalizar esta fase, se situam no intervalo 4-5 e 3,5-4,5 respectivamente.

#### Morfologia do micélio

Na fase de crescimento foi similar à observada na experiência II; Na fase de reserva III 1, apresentou hifas de comprimento médio, pouco ramificadas, e com uma ou mais fileiras de glóbulos de gordura visíveis.

O III 2 apresenta hifas compridas, pouco ramificadas e extremamente delgadas, nunca apresentando mais de uma fileira de glóbulos. Geralmente para este último, os extremos da hifa são muito mais delgados que a terça parte do centro da mesma.

III 1 e 2 apresentaram pigmentação amarela, no caldo de cultura, os restantes tomam cor púrpura marron.

Dos dados obtidos pode-se estabelecer que a adição do nitrogênio orgânico não tem efeito significativo sobre a cinética de crescimento. Comparando III 1 e 2, pode-se estabelecer que os pesos máximos do micélio obtido, não estão em relação direta com a concentração do nitrogênio.

A fase de reserva em III 2 foi detida antes. Isto pode explicar-se se a  $TTO_{m\acute{a}x}$  do sistema, é insuficiente para a TDO correspondente a concentração de nitrogênio no meio III 2.

Em III 1 observou-se uma utilização de glicose muito alta. Comparando III 3 e 4 observou-se que na fermentação em que se manteve um nível de glicose mais elevado, a utilização da glicose também foi maior. Não se obteve ácido giberélico em III 1 e em III 2.

#### 1.4. Experiência IV

Baseado na informação obtida nas experiências anteriores, variaram-se as condições de cultura para aumentar a  $TTO_{m\acute{a}x}$  no sistema. Este parâmetro diminui a medida que aumenta a concentração da massa celular, devido às propriedades reológicas do sistema microrganismo-meio de cultura.

Baseado nisto, reduziu-se o deslocamento do agitador recíproco em 25%, com isto permitiu-se elevar o número de oscilações por minuto ao máximo. Desta forma a intensidade de agitação em presença do micélio desenvolvido, aumenta. Este aumento incide favoravelmente sobre a  $TTO_{m\acute{a}x}$  no sistema. Para aumentar mais a turbulência, no fundo dos frascos colocaram-se defletores.

Os fatores estudados foram:

- a) Efeito da glicose a uma concentração inicial elevada, contra a adição controlada (IV 1 e 2)
- b) Efeito da concentração da biomassa no sistema (IV 2 e 3)

c) Atividade das linhagens (IV 2 = IOC 3326

IV 4 = IZ 1399)

d) Efeito da colocação de defletores horizontais (IV 4 e 5)

Curso de fermentação

		IV 1	IV 2	IV 3	IV 4	IV 5
conc. de nitrogênio mM/l		40,0	40,0	63,0	40,0	40,0
tempo total (h)		240	140,5	140,5	165	191
consumo total de glicose g/m MNo		4,60	1,85	1,10	1,90	2,02
Fase de crescimento balanceado	duração apx. (h)	22	22	22	46,5	72,5
	glicose con- sumida g/mMNo	2,33	0,233	0,247	0,309	0,434
	micélio seco mg/mMNo	205	224	212	185	173
Fase de reserva	duração apx. (h)	75,5	70,5	70,5	118,5	118,5
	glicose con- sumida g/mMNo	1,78	1,01	0,630	1,59	1,59
	micélio seco mg/mMNo	470	463	340	484	495
Fase de manutenção	duração apx. (h)	148,5	48	48	-	-
	glicose con- sumida g/m MNo	0,503	0,561	0,156	-	-
	$-\Delta G/\Delta t N_0$ g/m MNo h	0,00352	0,0118	0,00325	-	-

Evolução do pH

Em IV 1 repetiram-se as mesmas mudanças observadas em III 1. Os restantes apresentaram pico mínimo característico do fim da fase de crescimento, elevando-se novamente e mantendo-se em 7,0-7,5 durante a fase de reserva.

Em IV 2 o pH caiu a 6, durante a fase estacionária enquanto que em IV 3 permaneceu em 7,0-7,5.



A fase de crescimento teve uma duração aproximada de 22 horas para a IOC 3326. As concentrações de biomassa proporcionais ao nitrogênio inicial em IV 1, 2, 3 indicaram que a fase transcorreu em todos sob o mesmo modelo cinético. A mesma contribuição de glicose a dois níveis de concentração de nitrogênio em IV 2 e 3 demonstrou que não houve deficiências de aeração nesta fase.

Comparando IV 2 e 4 fica estabelecido que a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) é maior para a IOC 3326. Da análise de IV 4 e 5 observa-se que a duração da fase de crescimento balanceado é maior para IV 5, sendo a contribuição da glicose também maior e aparecendo "pellets" na cultura. De acordo com isso ambos não transcorreram segundo o mesmo modelo cinético de crescimento. A maior contribuição da glicose em IV 5, indica limitações de aeração e agitação (ausência de defletores).

Em IV 1 a degradação de carboidrato efetuou-se por uma via diferente de IV 2.

As limitações na aeração e agitação ficam estabelecidas comparando IV 2 e 3. A concentração de biomassa obtida (mg/mMNo) no final da fase de reserva, foi menor em IV 3 de que em IV 2. A taxa de utilização da glicose foi menor em IV 3, durante a fase estacionária.

Ambos fatos comprovaram que nestas condições de cultura, 63 m M/1 de nitrogênio são excessivos.

A presença favorável do defletor sobre a agitação e aeração pode ser vista novamente em IV 4 e 5; na última fase de

reserva foi de maior duração.

### Morfologia do Micélio

IV 1 apresentou na fase de reserva, hifas compridas e pouco ramificadas, com uma ou mais fileiras de glóbulos de reserva. Em IV 2 pelo contrário, predominou um tipo de hifas, muito curtas, e sem ramificações.

A produção de ácido giberélico não começa, enquanto não houver transcorrido praticamente toda a fase de reserva.

Para determinar a eficiência da fermentação no que diz respeito a produção de ácido, esta foi apresentada como rendimento específico e produtividade. O primeiro destes parâmetros, corresponde à quantidade de GA3 produzida numa fermentação e referida ao conteúdo inicial de nitrogênio, no meio de cultura. A produtividade corresponde ao valor anterior dividido pelo tempo de duração da fermentação.

A produção foi baixa obtendo-se os seguintes valores destes parâmetros:

	Rendimento específico mg/mMNo	Produtividade mg/mMNo.h
IV 1	2,38	0,0099
IV 2	2,12	0,0182
IV 3	1,85	0,0159

A linhagem IZ 1399 não produz ácido giberélico.

### 1.5. Experiência V

Foram estudadas as condições de cultura correspondentes ao agitador de movimento excêntrico, empregando frascos com de-

fletores laterais.

Curso de fermentação

		V1	V2
	conc. de nitrogênio m M/l	37,8	63,0
	tempo total (h)	259	259
	consumo glicose (g/mMNo)	6,20	3,80
crescimento balanceado	ao tempo (h)	41,5	41,5
	micelio seco (mg/mMNo)	250	212
	glicose consumida (g/mMNo)	1,02	0,825
Reserva	finaliza (h)	162,5	162,5
	max. peso micelio (mg/mMNo)	468	370
	glicose consumida (g/mMNo)	3,70	2,40
Manutenção	$-\frac{\Delta G}{\Delta t} N_0 t$ (g/mMNo.h)	0,0098	-

O desenvolvimento da fermentação não foi uniforme. Uma parte dos frascos correspondentes ao conjunto V2 não entraram na fase de reserva, permanecendo em uma concentração máxima de biomassa de 129 mg/mMNo. Estes frascos consomem uma quantidade de glicose muito inferior aos demais. Observou-se nos dois conjuntos IV 1 e 2, um aumento na duração da fase de crescimento. O micélio inicialmente desenvolve-se em "pellets".

A contribuição da glicose nesta fase foi muito elevada, o que vem indicar deficiências no fornecimento de oxigênio na cultura.

A agitação intensa que provoca este tipo de defletores dá lugar à formação de uma camada de espuma densa, de grande espessura. Atribui-se esta formação a uma resistência na transferência de oxigênio na cultura.

O pH manteve-se no intervalo de 4-5 tomando o meio de

cultura uma pigmentação amarelo. Durante a fase de reserva as hifas se apresentaram com comprimento médio e pouco ramificadas com apenas uma fileira de glóbulos de reserva.

O consumo de glicose na fermentação foi muito elevado para ambos os conjuntos. De acordo com isso a glicose nas condições estudadas não é degenerada por uma via exclusivamente aeróbica.

#### Experiência VI

Foram experimentadas as linhagens IZ 1399, IZ 1413 e IZ 1400, cultivando-as em agitador de movimento excêntrico e empregando frascos com defletores laterais.

A etapa de multiplicação celular efetuou-se no agitador recíproco, para evitar a extensão da fase, observada na experiência V.

#### Curso de Fermentação

Concentração inicial de nitrogênio: 37,8 mM/l.

Tempo de fermentação: 400 horas.

Consumo de glicose: 8,22 g/mMNo (adição gradativa).

Peso máximo de micélio seco mg/mMNo	IZ 1399	IZ 1413	IZ 1400
	560	610	805

A eliminação da prefermentação provocou um período de latência de aproximadamente 24 horas.

O início do crescimento caracterizou-se pela presença de "pellets" passando posteriormente a desenvolver micélio filamentosos para todas as linhagens.

A fase de crescimento durou aproximadamente 48 horas (sem contar o atraso inicial), a fase de reserva todavia se manteve em 400 horas.

O pH após a multiplicação celular situou-se na faixa de 5,4-6,7. A linhagem IZ 1413 caracterizou-se por apresentar maior atividade, e acumular maior quantidade de substâncias de reserva.

A quantidade de glicose adicionada a partir das 140 horas foi da ordem de 5g/l dia (equivalente a 0,0055-g/mM. No. h). A extensão da fase de reserva é uma resposta à disponibilidade limitada de carboidrato.

Nenhuma das linhagens ensaiadas produziu ácido giberálico.

#### Experiência VII

A multiplicação celular realizou-se no agitador recíproco, e imediatamente a fermentação continuou no agitador de movimento excêntrico. Empregaram-se frascos com defletores laterais.

O meio de cultura formou-se com duas fontes de carbono, uma de rápida assimilação (glicose) e outra de utilização mais difícil (amido). Posteriormente, a fermentação continuou com a adição gradativa de glicose, fornecendo-se 0,131 g/mMNo. dia.

#### Curso da Fermentação

Concentração de nitrogênio inicial: 37,8 mM

1

Tempo de fermentação:	374 horas
Consumo de carboidrato:	2,75 g/ <sub>mMNo</sub>
Pêso máximo de micélio seco:	785 mg/ <sub>mMNo</sub>

A fase de multiplicação celular completou-se em aproximadamente 24 horas. Predominou a formação de unidades curtas e sem ramificações, aparecendo posteriormente as formações de reserva.

O pH, durante a fase de reserva, manteve-se dentro do intervalo 6,5-7,5. A fase de reserva transcorreu até considerar-se finalizada a fermentação.

Os 67% do peso máximo do micélio foram obtidos em 110 horas (528 mg/<sub>mMNo</sub>). Durante este período utilizou-se o amido.

De acordo com o peso do micélio obtido e o tempo transcorrido, este substrato foi utilizado sem dificuldade pelo microrganismo. Além disso, não apresentou o problema de ser degradado de forma ineficiente, como sucede com a glicose em elevadas concentrações.

A continuação lenta da fase de reserva, atribui-se às adições relativamente baixas de glicose, que limitaram a velocidade de formação de reservas, ampliando a duração da fase. A quantidade dosada de glicose foi de 0,131 g/dia <sub>mMNo</sub>.

A produção de GA<sub>3</sub> (0,450 mg/<sub>mMNo</sub>) foi muito baixa, e resultou da limitação de carboidrato.

A permanência do pH próximo à neutralidade correspondeu também à mesma causa.

### Experiência VIII

Projeteu-se para obter condições nas quais a TTC max do sistema, viesse a superar a TDO max do micélio.

Simultaneamente efetuou-se uma experiência nas condições especificadas por outros autores (38); isto é frascos Erlenmeyer com um volume de meio de cultura de 20% da capacidade nominal. Ambas as condições foram estudadas, empregando frascos com ou sem defletores laterais, o meio de cultura foi semelhante ao da experiência VII.

### Curso da Fermentação

	VIII1	VIII2	VIII3	VIII4
Concentração inicial de nitrogênio mM/l	25,2	25,2	49,9	49,9
Tempo total (h)	263,5	263,5	120	120
Glicose consumida g/mMNo	3,38	3,63	-	-
Fase de reserva				
ao tempo (h)	167,5	167,5	120	120
max peso de micélio mg/mMNo	1100	1150	465	325
Fase de manutenção				
duração (h)	96	96	-	-
$-\Delta G / N_0 \Delta t$ g/mMNo.h	-	$5.8 \times 10^{-3}$	-	-

Em VIII 1 e 2 a fase de crescimento dura 24 horas enquanto que em VIII 4 nas 24 horas ainda se mantém tal fase. Nas 120 horas VIII 4 alcança um peso de micélio de aproximadamente 70% do VIII3. Por outro lado VIII3 neste intervalo de tempo representa somente 64% de VIII 1 e 2.

A análise anterior demonstra a importância da aeração e agitação sobre o desenvolvimento do micélio.

VIII 1 e 2 registraram as mesmas variações a respeito do

aumento do peso do micélio, consumo de carboidratos e evolução do pH.

Estes resultados permitem estabelecer que, nas condições de cultura de VIII 1 e 2, não há limitações na agitação e na aeração. A TTD max do sistema é maior que a TDO max do microrganismo.

#### Evolução do pH

No final da fase de reserva VIII 1 e 2 situam-se no intervalo 5,4-6,5, enquanto que VIII 3 e 4 mantêm-se entre 7,0-7,5.

#### Morfologia celular

VIII 1 e 2 apresentam grande predomínio de unidades muito curtas, e sem ramificações e também grande quantidade de substâncias de reserva. Em VIII 3 e 4 as hifas são compridas e pouco ramificadas, sendo para VIII 4 mais delgadas e com a terça parte central com maior espessura; VIII 4 sempre apresenta uma única fileira de glóbulos.

VIII 1 e 2 produzem ácido giberélico. A produção começa nas 72 horas, aumentando gradativamente até obter-se um valor máximo de 52 mg/l nas 240 horas.

Este valor corresponde a um rendimento específico de 1,94 mg/ $mMNO$  e uma produtividade de 0,0081 mg/ $mMNO$ . Verifica-se que o metabolito começa a produzir-se a uma velocidade considerável, quando termina a fase de reserva.

#### 1.9 Experiência IX

Tendo-se determinado condições de operação nas quais



a T<sub>10</sub> max não é um fator limitante na fermentação, estudou - se o efeito de uma fonte de carboidrato de mais difícil as similação.

Preparou-se um meio de cultura, contendo glicose ne cessária à fase de crescimento e parte da requerida durante a fase de reserva.

O meio de cultura continha, também, lactose em uma concentração tal que o carboidrato total, fosse idêntico ao consumido na experiência VIII. Realizou-se a experiência em frascos com e sem defletores.

Curso da Fermentação

	IX 1	IX 2
Conc. de nitrogênio (mM/l)	25,2	25,2
Tempo total (h)	327,5	327,5
Consumo de carboidrato (g/mMNo)	1,30	1,30
Fase de reserva		
max peso de m. se		
co (mg/mMNo)	600	583
Término (h)	159	159

O micélio desenvolveu-se sob a forma de hifas compridas, delgadas e pouco ramificadas. Durante a fase de reserva, as mesmas formaram uma só fileira de glóbulos. A fase de reserva não começou enquanto não se adicionaram as 25g/l de glicose nas 63 horas, cessando com o esgotamento desta.

A resposta ao esgotamento da glicose foi a elevação do pH. Posteriormente, este caiu novamente até valores de 5-6. No final da fermentação o peso do micélio diminuiu en

quanto que o carboidrato manteve-se a 50 g/l.

De acordo com isso pode estabelecer-se que a lactose nessas condições não é assimilada, mantendo-se o micélio na base de suas próprias reservas.

Nas 260 horas chegou-se a uma produção de ácido gibbérico de 4,62 mg/mMNo correspondente a uma produtividade de 0,0178 mg/mMNo.h. No final da experiência ensaiou-se novamente a presença de metabolito, não se encontrando aumentos na produção.

#### 1.10 Experiência X

Procurou-se comprovar resultados obtidos em experiências anteriores e estabelecer condições de cultura nas quais a T<sub>0</sub> max seja maior que a T<sub>D</sub> max. Variando a concentração inicial de nitrogênio, estudou-se o efeito destes parâmetros, sobre o peso do micélio obtido, utilização de carboidrato e produção de metabolito.

Operou-se no agitador de movimento excêntrico. Nas experiências, em que se utilizaram uma concentração elevada de nitrogênio, empregaram-se frascos com defletores laterais. O meio de cultura foi formulado com uma concentração de glicose inicial baixa. Baseando-se na informação anteriormente obtida, sobre a utilização de fonte de carbono, efetuou-se um programa de adição gradativa de glicose.

Nos frascos com defletores laterais adicionou-se óleo de girassol a 6% como antiespumante.

### Curso da Fermentação

	XI	X2	X3	X4
Conc. de nitrogênio (mM/l)	19,1	19,1	37,8	63,0
Tempo total (h)	327,5	327,5	231,5	135,5
Consumo de glicose (g/mMNo)	3,26	3,58	3,15	3,28
Fase de max. peso de m. reserva seco (mg/mMNo)	1090	630	1080	1030
finalização (h)	135,5	231,5	135,5	135,5
F.Manutenção - $\Delta G/N_o \Delta t$ (g/mMNo.h)	0,0109	0,0115	-	-

A adição de antiespumante permitiu desenvolver a fase de crescimento, com o mesmo modelo cinético em todos os conjuntos.

Confirmou-se, que a camada de espuma provoca uma resistência muito grande na transferência de oxigênio.

A fermentação transcorreu de forma similar para todos os níveis de concentração do substrato limitante. Em todas as concentrações de nitrogênio ensaiadas obtiveram-se pesos de micélio e consumos de glicose, proporcionais à concentração deste.

Não existem portanto, limitações de aeração e agitação, nas condições experimentais. A T<sub>0</sub> max é maior ou igual a T<sub>D</sub> max em todos os casos.

A maior concentração de biomassa conduz a fermentação a valores de pH mais baixos.

A linhagem IZ 1399 (Exp X2) produz menor quantidade de substâncias de reserva que a IOC 3326 (XI).

Em todos os conjuntos correspondentes à linhagem IOC 3326 (X 1, 3 e 4), predomina a formação de hifas curtas e não ramificadas, com abundância de formações de reserva. Pelo contrário a IZ 1399 forma sempre hifas de comprimento médio, com algumas ramificações.

O rendimento máximo de ácido giberélico obtém-se em 230 horas, com um valor de 4,19 mg/mMNo (media de 2 determinações) esta corresponde a uma produtividade de 0,0181 mg/mMNoh.

A produção de ácido giberélico é proporcional à concentração de nitrogênio no meio de cultura.

Depois das 230 horas cessa a utilização de glicose - pela linhagem IOC 3326.

#### 1.11 Experiência XI

A experiência realizou-se em fermentador de laboratório. Estudou-se a variação de tensão do oxigênio dissolvido, durante as fases do metabolismo do fungo. Este parâmetro fornece informação, a respeito do valor da diferença de parâmetros  $TTC_{m\acute{a}x} - TDO_{m\acute{a}x}$ .

Simultaneamente estudou-se o comportamento deste sistema, para operar com culturas de microrganismos filamentosos, de propriedades reológicas não - newtonianas.

A fermentação foi efetuada com uma aeração de 1 v.v. m. e a máxima intensidade de agitação. Foi adicionado antiespumante, sendo a semente inicial de 6% da capacidade útil do fermentador. O meio de cultura formulou-se com glicose, amido e lactose.

## Curso da Fermentação

A fermentação transcorreu durante 174 horas, obtendo-se um peso máximo de micélio de 600 mg/mMNo e requerendo-se 1,57 g/mMNo de carboidrato. Obtiveram-se 5,4 mg/mMNo de ácido giberélico correspondente a uma produtividade de 0,031 mg/mMNo.h A fase de crescimento durou aproximadamente 48 horas. A fermentação conduziu-se através de valores de pH baixos, isto é, entre 4-4,5. O micélio formado caracteriza-se por apresentar hifas de comprimento médio, e pouco ramificadas, com uma única fileira de glóbulos de reserva.

Inicialmente o fermentador apresenta um bom modelo de agitação e dispersão do ar, o qual é uniforme através de todo o volume útil. Quando o micélio aumenta de uma forma considerável, essas propriedades caem. O fermentador divide-se em duas zonas, a inferior que mantém as características já expostas e a superior, na qual a intensidade de agitação se reduz de forma considerável. A medida que a multiplicação celular progride, a zona de turbulência vai-se reduzindo, e alcança nas 30 horas somente 65% do volume.

A concentração de oxigênio dissolvido cai rapidamente a medida que o micélio começa a multiplicar-se, alcançando valores mínimos uma vez avançada a fase de crescimento.

Durante a fase de reserva mantém-se a queda de tensão do oxigênio, indicando, a elevação desta, o final deste período. É necessário, portanto, um fornecimento de oxigênio relativamente grande para a síntese de reservas.

A curva de tensão de oxigênio expressa que durante -

parte da fase de crescimento e na fase de reserva, se equilibram a TFO max do fermentador com a TDO do micélio. Este último parâmetro é menor que a TDO max do micélio, para estas condições de operação.

Nestas condições, a duplicação da taxa de aeração, não aumenta a tensão do oxigênio, ou seja, a intensidade de agitação vem controlar a TFO.

A fase de reserva deteve-se nas 120 horas ficando sem utilizar parte do amido e da lactose. As restrições na TFO max impediram alcançar o máximo de massa micelial.

## 2.0 Discussão Geral Dos Resultados Obtidos

De todas as linhagens experimentadas, somente a IOC 3326, produz ácido giberélico. Por outro lado, é a que apresenta maior taxa específica de crescimento, e capacidade de acumulação de reservas.

### 2.1 Utilização do Carboidrato

A linhagem IOC 3326 consumiu durante algumas fermentações (III 1, IV 1, V 1 e 2), quantidades excessivas de carboidratos. Simultaneamente ao metabolismo aeróbico, existem vias de degradação da glicose, que não requerem a intervenção do oxigênio. Estas são responsáveis pela utilização ineficiente do carboidrato.

Observou-se o aparecimento deste mecanismo, nos meios com elevada relação inicial G: N (III 1 e IV 1). Quando a tensão de oxigênio dissolvido, cai abaixo de um valor crítico, na fase de crescimento balanceado, o microrganismo dá entrada a esse mecanismo de utilização de glicose (III 1, V 1 e 2 vs. IV 2 e 3). A glicose é metabolizada de uma maneira mais eficiente, quando as condições de operação permitem altos valores de TTO, e a glicose se mantém em baixas concentrações durante o processo. O amido que permite manter concentrações muito baixas de glicose dissolvida, restringe o emprego ineficiente do carboidrato. Na experiência XI, onde a tensão do oxigênio dissolvido caiu ao mínimo, o emprego deste substrato restringiu a utilização do carboidrato por esse mecanismo. A duração da fase de crescimento estendeu-se, e obteve-se maior peso final do micélio, do que em outras fermentações.

Quando o microrganismo faz uso desta via, produz-se uma mudança de pigmentação no meio de cultura, que passa para a coloração amarela.

## 2.2. Evolução do pH

A evolução do pH para a *Gibberella fujikuroi* IOC 3326, depende de fatores como a T<sub>90</sub> max e a concentração de glicose. Ambos estão estreitamente vinculados entre si. Nas fermentações, em que parte da glicose se degradou sem intervenção do oxigênio (III 1, IV 1, V 1 e 2), o pH se mantém no intervalo 4-5. Este metabolismo da glicose, vai acompanhado da formação de compostos orgânicos ácidos, responsáveis pelo baixo pH.

O metabolismo anaeróbico dos fungos, pode produzir ácido lático, como produto final. Verificou-se a formação deste composto nos Ficomycetes inferiores e em espécies do gênero *Rhizopus* (27), quando se submetem a condições anaeróbicas. Provavelmente, nesta fermentação, este ácido seja o responsável pelo baixo pH.

Quando o microrganismo desenvolve um metabolismo de preferência aeróbico, o pH baixa para valores da ordem de 3,5 no fim da fase de crescimento. Durante a fase de reserva, novamente sobe, dependendo os valores alcançados, da concentração inicial do nitrogênio. Quanto maior fôr esta, mais baixo será o pH, através do qual transcorre a fase de reserva (X 1,3 e 4).

A causa desta pode atribuir-se à acumulação de produtos formados no metabolismo. A reação a um baixo nível de gli



cese, manifesta-se pelo aumento do pH entre 7 e 7,5 (IV 2,3 e 4, VI e VII).

O esgotamento da glicose, vai acompanhado do aumento do pH, a valores maiores que 8.

Durante o fim da fase de reserva, e a fase de manutenção, o pH baixa novamente.

### 2.3. Características do micélio

A tendência do micélio é de desenvolver-se em filamentos. A maioria das experiências realizadas, apresentam exclusivamente este tipo de formação. O aparecimento de "pellets" é uma resposta às condições desfavoráveis de cultura. Estes foram observados nas fermentações e na experiência VI (na qual não se efetuou a préfermentação). A formação resulta da falta de adaptação do microrganismo, originalmente cultivado em um meio semi-sólido, com outros nutrientes. Na experiência V, as deficiências no fornecimento de oxigênio, acompanhadas de uma agitação violenta, provocaram a formação de "pellets".

A morfologia do micélio parece depender da T<sub>90</sub> máx, da intensidade da agitação, e da concentração de carboidratos dissolvidos no meio. A observação microscópica do micélio, mostra para a fase de crescimento balanceado, septação das hifas (apêndice pag 108-109) e granulação do citoplasma. A septação e a parede celular, foram identificadas em colorações com safranina. A granulação do citoplasma foi observada, colorindo-a com azul de metileno e azul de toluidina.

O último dos corantes, possibilitou estabelecer a presença de grânulos contendo fosfolipídeos. Durante a fase de

reserva, aparecem glóbulos que correspondem aos lipídeos sintetizados pelo microrganismo. A coloração com Sudan, confirmou a natureza dos mesmos (8).

Nas experiências, nas quais se operou com uma T<sub>0</sub> máx elevada, agitação intensa e uma relação G: N inicialmente baixa, (VIII 1 e 2, X), o micélio apresentou-se com hifas muito curtas e sem ramificações.

Nas mesmas condições de cultura, porém, com uma relação G:N inicial alta, apareceram hifas longas e ramificadas (IX).

Em IV 1 e 2, a elevada relação G:N inicial do primeiro, provocou a formação de hifas longas.

Em III 1 e 2, a T<sub>0</sub> elevada do último, provocou a formação de hifas longas, nas quais as extremidades são muito mais delgadas que a terça parte central. O mesmo fenômeno sucedeu em VIII 3 e 4, embora o mesmo tenha sido causado pela menor T<sub>0</sub> máx de VIII 4. De acordo com isto, a formação de hifas curtas é favorecida por uma elevada T<sub>0</sub> máx e uma agitação intensa. Os meios, com elevada concentração inicial de carboidrato dissolvido, tendem a provocar a formação de cadeias longas e ramificadas.

#### 2.4. Acumulação de Substâncias de Reserva

A acumulação de substâncias de reserva, é função da diferença de parâmetros T<sub>0</sub> máx - T<sub>0</sub> min. Quando esta diferença permite que a tensão de oxigênio dissolvido seja maior ou igual a um determinado valor crítico, consegue-se alcançar o máximo de acumulação de reservas (experiências VIII 1

e 2, X 1, 2, 3 e 4). Operando com agitador de movimento excêntrico, e frascos com defletores laterais, não há limitações no fornecimento de oxigênio, para TDO correspondentes a 20-63 mM/l de nitrogênio. O peso máximo de micélio é obtido, quando a disponibilidade de carboidratos, satisfaz a demanda correspondente à manutenção das funções vitais do micélio e as necessidades de carbono para a formação de substâncias de reserva e metabolitos.

Nas experiências VII e IX 1 e 2, não foi alcançado o máximo, por deficiências deste substrato. Em VII, as doses adicionadas, não foram suficientes para atender ambas demandas.

Em IX, ao esgotar-se a glicose, a fonte de carbono restante (lactose), é de difícil assimilação, provocando o fim da acumulação. Nas experiências IV, V e X nas quais a TTO max não foi suficiente para satisfazer a TDO max, a acumulação de reservas deteve-se em valores menores. Em IV a agitação não foi suficientemente intensa para alcançar a TTO max requerida.

Comparando V 1 e 2 vs. X 3 e 4, a agitação foi da mesma grandeza. As deficiências no fornecimento de oxigênio durante a etapa de multiplicação celular, impediram de chegar ao peso máximo no conjunto V.

De acordo com isto comprova-se que não é a intensidade de agitação, mas a diferença  $TTO_{m\acute{a}x} - TDO_{m\acute{a}x}$  que controla o processo de acumulação de reservas. O mecanismo de degradação anaeróbica da glicose, não tem influência sobre a acumulação de reservas. Nas experiências IV 1 e 2 obteve-se o mesmo peso de micélio independentemente das vias de metabolismo da

fonte de carbono. V 1 e 2 não alcançam os pesos de micélio correspondentes a X 3 e 4, apesar de haver degradação anaeróbica da glicose na experiência V.

Na experiência X, na qual foi verificada a queda de tensão do oxigênio dissolvido não se conseguiu alcançar o máximo de reservas. Em IV 4 e 5, a velocidade de acumulação de reservas, foi menor para o sistema menos agitado, parecendo que a agitação atua favoravelmente sobre a velocidade de acumulação de reservas.

## 2.5 Produção de ácido giberélico

Nas condições estudadas, a produção de ácido giberélico da linhagem IOC 3326, foi baixa. A produção não começa enquanto não transcorrer a maior parte da fase de reserva. Naquelas experiências (IV 2, 3, XI) nas quais a diferença  $T_{T0\text{máx}} - T_{D0\text{máx}}$  limitou a acumulação de reservas, a produção iniciou-se antes. A produtividade dos mesmos alcançou valores da mesma ordem das experiências X 1 e 3 (sem limitações na formação de reservas). O composto químico inicial para a biossíntese do ácido giberélico e a formação de lipídeos, é a acetilcoenzima. Portanto, a formação de ambos é competitiva. A relação de produção de reservas:  $GA_3$  é função dos parâmetros cinéticos de ambos os processos.

A acumulação de reservas transcorre no início da fase, rapidamente, e logo em seguida, com velocidade decrescente, até cessar a acumulação. A cinética de produção de metabolitos é linear. A competição de ambas as reações, limita a produção de  $GA_3$  durante a parte inicial da fase. Na experiência IV 1, na

qual verificaram-se dois mecanismos de utilização do carboidrato, a produtividade diminui com relação à IV 2.

O rendimento foi da mesma ordem em ambos. A redução da diferença TTO max - TDO max para valores limitantes no fornecimento de oxigênio, diminui a produção de GA<sub>3</sub> (IV2' e 3 3<sub>v</sub> X). A agitação excessiva, não favorece a produção do ácido giberélico (IX vs XI).

Os melhores resultados foram obtidos nas condições correspondentes ao fermentador, tanto no que diz respeito a rendimentos bem como à produtividade.

TROS AUTORES

Os melhores resultados que dizem respeito a rendimentos de ácido giberélico, foram os publicados por Borrow (6), Darken (13), Sánchez-Marroquín (38). Os resultados destes autores foram comparados aos resultados obtidos no presente trabalho, o quadro anexo analisa os mesmos.

	Borrow (1958)	Darken (1959)	Sánchez- -Marroquín (1963)	Nossos resul- tados
linhagem	ACC 917	ACC 917	IOC 3326	IOC 3326
nitrogênio inicial (mM/l)	100	41,9*	66,8*	19,1
carboidrato utiliza- do (g/m MNo)	-	1,194	0,295	1,57
Rendimento(mg/l)	1000	880	1,196	103
Rendimento específi- co (mg/m MNo)	10	21	17,9	5,4
Produtividade (mg/m MNo)	0,020	0,113	0,105	0,031

\* A porcentagem de nitrogênio proveniente da água de maceração do milho foi estabelecida de acordo com (43)

Os rendimentos obtidos são inferiores aos citados. Atribuímos a causa disto à baixa capacidade de produção do metabólito, que apresentou a linhagem recebida. Os melhores resultados obtidos em produção de ácido giberélico, geralmente fazem referência à utilização da linhagem ACC 917, catalogada como linhagem de grande atividade.

Os rendimentos de Sánchez-Marroquín (38) com Gibberella fujikuroi IOC 3326, diferem significativamente dos nossos. Atribuímos isto a diferenças no metabolismo da linhagem recebida por ele. Este autor realiza o processo fermentativo requerendo unicamente 0,295 g de glicose por mM de nitrogênio no meio de cultura. Em nenhuma das experiências realizadas por nós, pudemos controlar a fermentação com essa quantidade de carboidrato. A quantidade deste foi de 5 a 10 vezes maior.

Mantendo a cultura de IOC 3326 com a quantidade de carboidrato formulada por Sánchez-Marroquín, o micélio degenerava por esgotamento da fonte de carbono e não se obtinha o ácido giberélico.

## VII - CONCLUSÕES

1. Das linhagens ensaiadas, somente a Gibberella Fujiku roi IOC 3326, produz ácido giberélico.
2. O rendimento específico e a produtividade são inferiores aos resultados publicados por outros autores.
3. O rendimento específico e a produtividade são funções de parâmetros tais como a diferença  $TTO_{m\acute{a}x} - TD0_{m\acute{a}x}$ ; a intensidade de agitação e a relação G: N no meio de cultura.
4. Valores maiores que zero do parâmetro  $TTO_{m\acute{a}x} - TD0_{m\acute{a}x}$  melhoram os rendimentos.
5. Intensidade de agitação elevadas, reduzem a produtividade de ácido giberélico.
6. Relações G:N inicialmente grandes e em condições que possibilitem o emprego ineficiente da glicose, retardam a produção de  $GA_3$ , sem alterar os rendimentos obtidos.
7. Valores do parâmetro  $TTO_{m\acute{a}x} - TD0_{m\acute{a}x}$ , que levam a uma tensão crítica de oxigênio dissolvido, reduzem a acumulação de reservas ativando a produção de  $GA_3$ .
8. As condições ótimas de fermentação para a produção de  $GA_3$ , implicam operar com intensidades de agitação moderadas e em condições de tensão de oxigênio dissolvido que limitem a posterior acumulação de reservas. A glicose deve ser mantida numa concentração muito reduzida durante a operação, a fim de restringir a utilização ineficiente da mesma.



VIII APÊNDICE

Quadro I - Resumo das Experiências Realizadas

	Experiência			
	I 1,2,3 e 4	II1,2,3 e 4	III1,2,3 e 4	IV1,2,3,4 e 5
linhagem estudada	I1: IZ 1399 I2: IZ 1413 I3: IZ 1400 I4: IOC 3326	II1: IZ 1399 II2: IZ 1413 II3: IZ 1400 II4: IOC 3326	IOC 3326	IV 1,2 e 3 IOC 3326 IV4 e 5: IZ 1399
Temperatura	22-25°C	20-26°C	25-29°C	22-24°C
CONDIÇÕES DE CULTURA	agitador recíproco l=10cm, 140cpm *EM500ml, 10%	agitador recíproco l=10cm, 140cpm EM500ml, 10%	agitador recíproco l=10cm, 140cpm EM500ml, 10%	agitador recíproco l=7,6cm, 200cpm EM500ml, 10% c/defletor horizontal
PREFERÊNCIA	Idem fermentação	Idem fermentação	m.de cultura II Cond. de cultura: idem fermentação III 3 e 4 preferência 56h	m.de cultura IV 2 Cond. de cultura: agitador recíproco l=7,6 cm, 132 cpm EM500ml, 10%

\* EM: Abreviatura de Erlenmeyer

Quadro I - Continuação

					Experiência			
		VI e 2	VI 1,2 e 3, VII	VIII 1 e 2	VIII 3 e 4			
linhagem estudada		IOC 3326	VI1: IZ 1399 VI2: IZ 1413 VI3: IZ 1400 VII: IOC 3326	IOC 3326	IOC 3326			
Temperatura		29,5°C	24-28°C	24-28°C	24-28°C			
CONDIÇÕES DE CULTURA		agitador mov. excêntrico r= 2,5cm, 230 rpm  EM 500 ml, 10%  c/defletores laterais	agitador mov. excêntrico r= 2,5 cm, 210 rpm EM 500 ml, 10%, c/ defletores laterais, frascos inclinados 30°  Etapa de crescimento em agitador recíproco l= 7.6 cm, 200 c.p.m.	agitador mov. excêntrico r= 2,5 cm, 210 rpm EM 500 ml, 10% c/defletores laterais, frascos inclinados 15°  Etapa de crescimento em agitador recíproco l= 7,6 cm, 200 c.p.m.	agitador mov. excêntrico r= 2,5 cm, 210 rpm EM 500 ml, 10% c/ defletores laterais, frascos inclinados 15°  Etapa de crescimento em agitador recíproco l= 7,6 cm, 200 c.p.m.			
PREFERMENTAÇÃO		m. de cultura IV 2  condições de cultura: fermentação  2 preferências sucessivas 24h c/u	m. de cultura VI  condições de cultura: agitador mov. excêntrico  r= 2,5 cm, 210 rpm  EM 500 ml, 10%	m. de cultura VIII3  Idem VI	m. de cultura VIII3  Idem VI			

Quadro 1 - Continuação

	Experiência		
	IX 1 e 2	X 1, 2, 3 e 4	XI
linhagem estudada	IOC 3326	X 1, 3 e 4: IOC 3326 X2: IZ 1399	IOC 3326
Temperatura	24-27°C	23-27°C	28,5°C
CONDIÇÕES DE CULTURA	agitador mov. excêntrico r= 2,5 cm, 210 rpm, EM 500 ml, 10%, incl. 15°. IX1: c/defletores IX2: s/defletores Etapa de crescimento em agitador recíproco l= 7,6 cm, 200 cpm	agitador mov. excêntrico r= 2,5 cm, 210 rpm X. 1 e 2 EM 500 ml, 10%.  X3 e 4 EM 500 ml, 10%, c/defletores, inclinação 30°	fermentador vol. de meio de cultura: 500 ml  aeração: l/vvm agitação: máxima  Inóculo 6%
PREFERÊNCIA	m. de cultura VIII  condições de cultura Idem VI	m. de cultura XI  agitador de mov. excêntrico r= 2,5 cm, 210 rpm  EM 500 ml, 10%	m. de cultura XI  agitador de mov. excêntrico r= 2,5 cm, 210 rpm  EM 500 ml, 10%

Quadro 2 - Meios de Cultura Empregados

Componentes*	Experiência						
	II 2,3,4	III 1,2,3,4	III1	III2	III3	III4	IV1
glicose inicial	20,00	20,00	160,0	40,00	20,00	20,00	175,0
glicose adicionada	-	-	-	38,7	40,0	20,0	-
amido	-	-	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-	-	-
a. de maceração de milho	25,00	2,50	1,10	25,00	2,50	2,50	15,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,60	2,60	2,16	2,60	2,60	2,60	1,55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	0,50	5,00	5,00	2,00	2,00	2,00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	-	1,00	1,00	1,00	1,00	0,20
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,20	0,20	-	-	-	-	-
pH	5,6	5,0	4,5	5,0	5,0	5,0	4,4

(\*) expressos em g; todos os meios de cultura foram preparados adicionando os componentes a 1000 ml de água destilada.

Quadro 2 - Continuação

Componentes	IV2,4	IV2,4,5	IV 3	VI	V2	VII,2,3	VII	VIII
glicose inicial	12,00	12,00	20,00	24,00	40,00	24,00	15,00	7,50
glicose adicionada	60,0	65,0	60,0	210,0	220,0	98,0	50,0	65,0
amido	-	-	-	-	-	-	40,00	30,00
lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
a. de maceração de milho	15,00	15,00	25,00	15,00	25,00	15,00	15,00	12,50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,55	1,55	2,60	1,55	2,60	1,55	1,55	0,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,20	0,20	0,30	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
pH	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,4	4,5	4,5

Quadro 2 - Continuação

Componentes	VIII 2	VIII3,4	IX1,2	X1,2	X3	X4	XI
glicose inicial	7,50	15,00	7,50	15,00	30,00	55,00	7,50
glicose adicionada	60,0	-	25,0	55,0	110,0	155,0	-
amido	30,00	60,00	-	-	-	-	30,00
lactose	-	-	50,00	-	-	-	45,00
a. de mace- ração de milho	12,50	25,00	12,50	7,50	15,00	25,00	7,50
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,78	1,55	0,78	0,78	1,55	2,60	0,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00	2,00	1,00	1,00	2,00	3,33	1,00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20	0,20	0,10	0,10	0,20	0,33	0,10
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-
pH	4,5	4,5	6,0	4,5	4,5	4,5	5,0

Experiência I1

Tempo (h)	pH	conc.de glicose(g/l)	glicose adicio- nada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)
0	5,6	-	20*	-
24	4,8	-	-	-
48	8,8	0,0	20	380
72	8,8	-	-	160
95	3,3	-	-	1.090
118	6,7	-	-	-
141	7,0	-	-	-
170,5	8,8	0,42	30	920
192,5	5,4	-	-	-
213,5	6,2	-	-	-
237,5	6,7	-	-	-

(\*) contida no meio de cultura

Experiência I2

Tempo (h)	pH	conc.de glicose(g/l)	glicose adicio- nada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)
0	5,6	-	20*	-
24	6,2	-	-	60
48	9,0	0,0	20	490
72	8,8	-	-	270
95	4,4	-	-	1.100
118	7,2	-	-	-
141	6,7	-	-	-
170,5	8,8	0,18	30	1.080
192,5	5,4	-	-	-
213,5	6,4	-	-	-
237,5	6,4	-	-	-

(\*) contida no meio de cultura

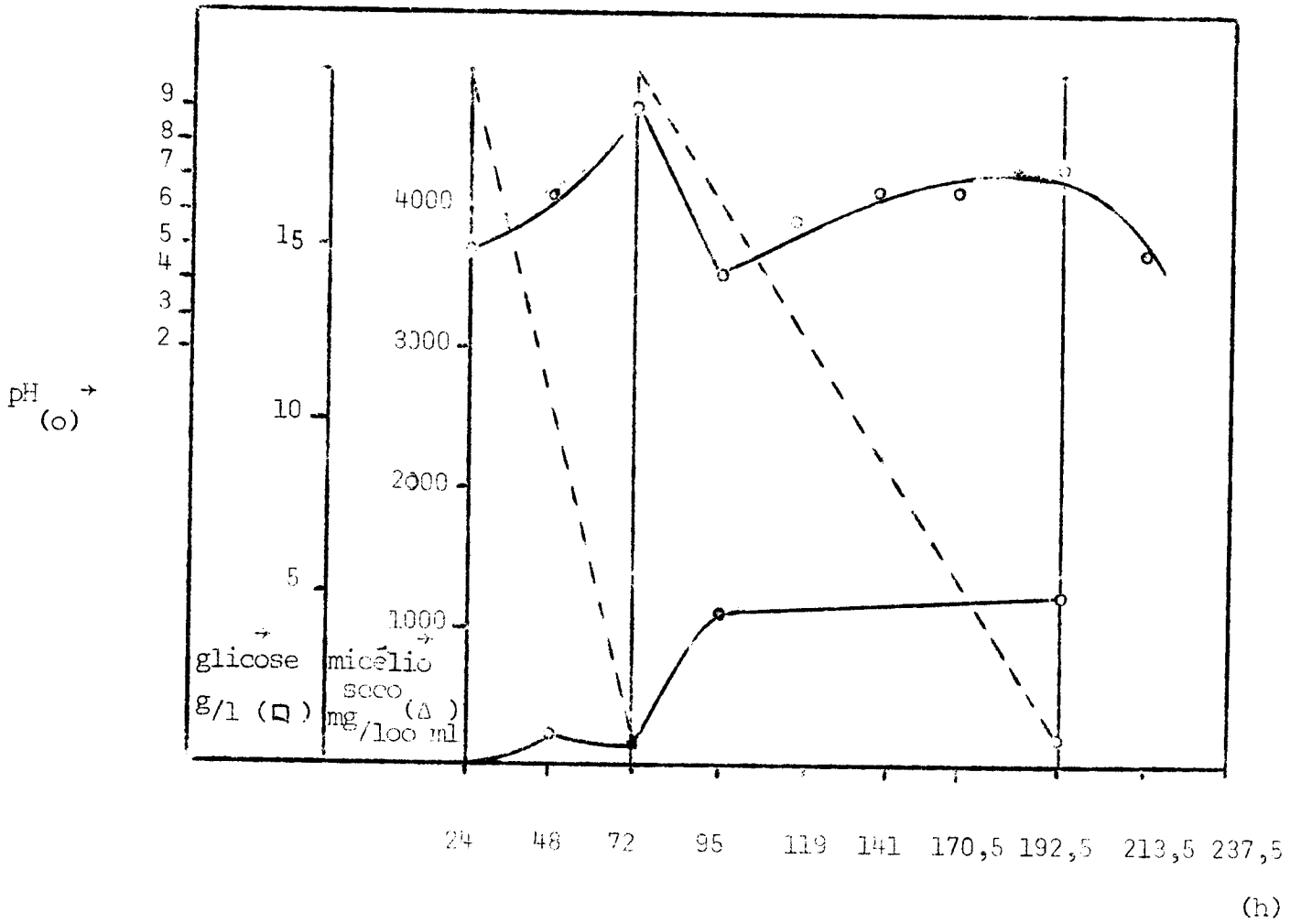
Experiência 13

Tempo (h)	pH	Concentração de glicose (g/l)	Glicose adicionada (g/l)	Peso de micélio seco (mg/100 ml)
0	5,6	-	20*	-
24	6,7	-	-	430
48	8,7	0,0	20	590
72	8,7	-	-	220
95	6,7	-	-	1.170
118	5,1	-	-	-
141	6,4	-	-	-
170,5	8,2	0,13	30	1.220
192,5	5,4	-	-	-
213,5	5,8	-	-	-
237,5	5,8	-	-	-

(\*) contida no meio de cultura



Experiência I 4



Experiência II 1

Tempo (h)	pH		concentração de glicose(g/l)		glicose adicionada	peso de micélio seco (mg/100 ml)
	II 1	III a	II 1	III a	(g/l) III a	
0	5,0		-		20*	-
36,5	4,2		16,1		-	100
61,0	2,6		0,62		-	860
88,5	7,0				-	-
111,0	7,0				22,5	740
132,5	8,5	4,8			-	-
156,5	8,8	7,1		0,54	22,5	-
181,5	8,5	3,8		-	-	-
209,5	8,5	3,8			-	-
230,5	8,8	3,4			-	-

a - frascos nos quais se adiciona glicose

(\*)- contida no meio de cultura

Experiência II2

Tempo (h)	pH		concentração de glicose (g/l)		glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)
	III	IIIa	III	IIIa	IIIa	
0	5,0		-		20*	-
36,5	3,5		11,60		-	320
61,0	7,8		0,35		-	870
88,5	8,2		-		-	-
111,0	8,8		-		22,5	520
132,5	9,0	5,1			-	-
156,5	8,8	5,4		4,30	22,5	-
181,5	8,8	5,1			-	-
209,5	8,5	4,1			-	-
230,5	8,8	4,8			-	-

a - frascos nos quais se adiciona glicose

(\*) contida no meio de cultura

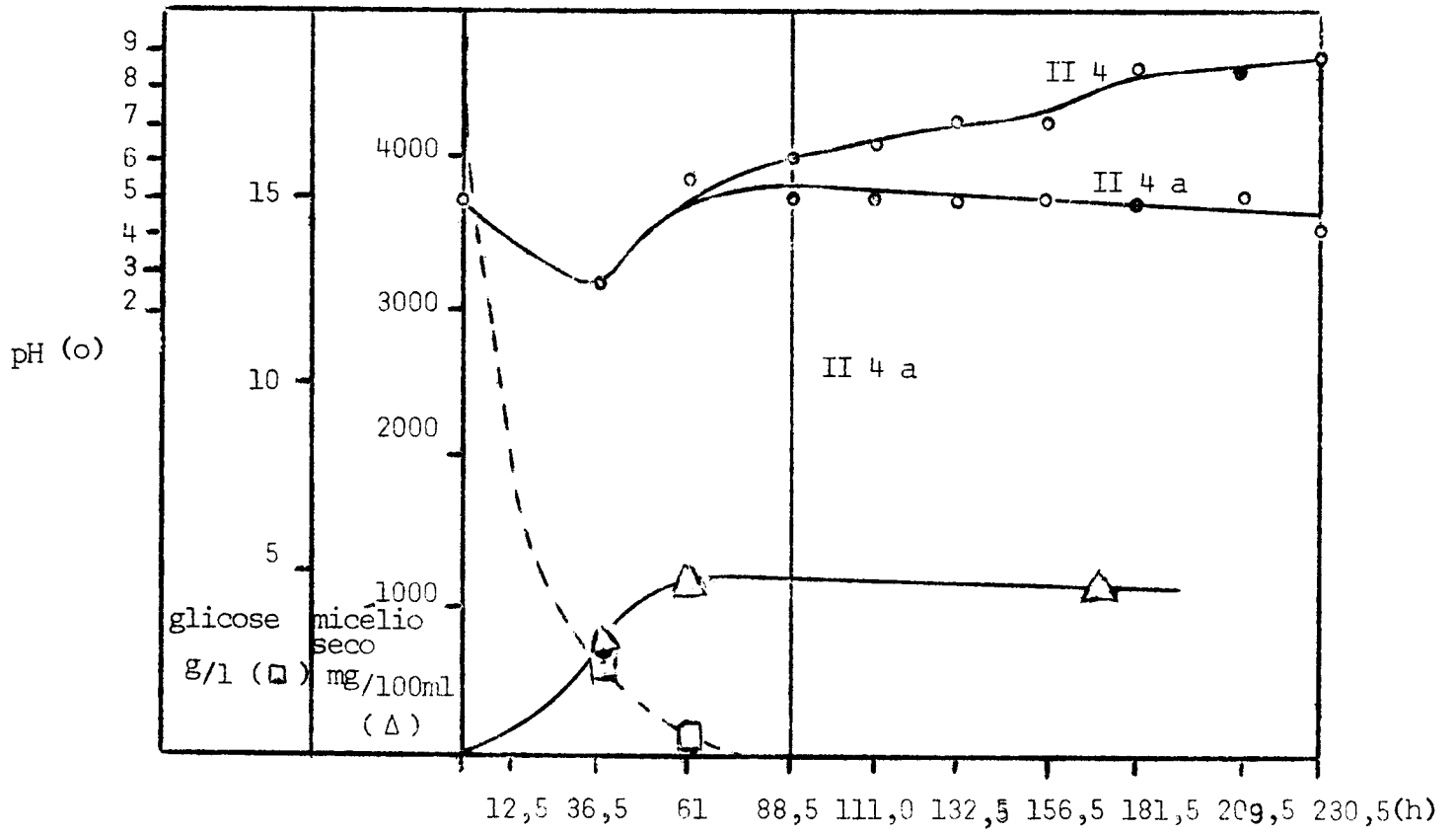
Experiência II3

Tempo (h)	pH		concentração de glicose (g/l)		glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)
	III	IIIa	III	IIIa	IIIa	
0	5,0		-		20*	-
36,5	3,8		10,6		-	400
61,0	4,1		0,13		-	910
88,5	6,4		-		-	-
111,0	6,4		-	6,2	22,5	520
132,5	7,2	5,1			-	-
156,5	7,5	5,1			-	-
181,5	7,5	4,6			-	-
209,5	7,6	5,1			-	-
230,5	8,6	5,2			-	-

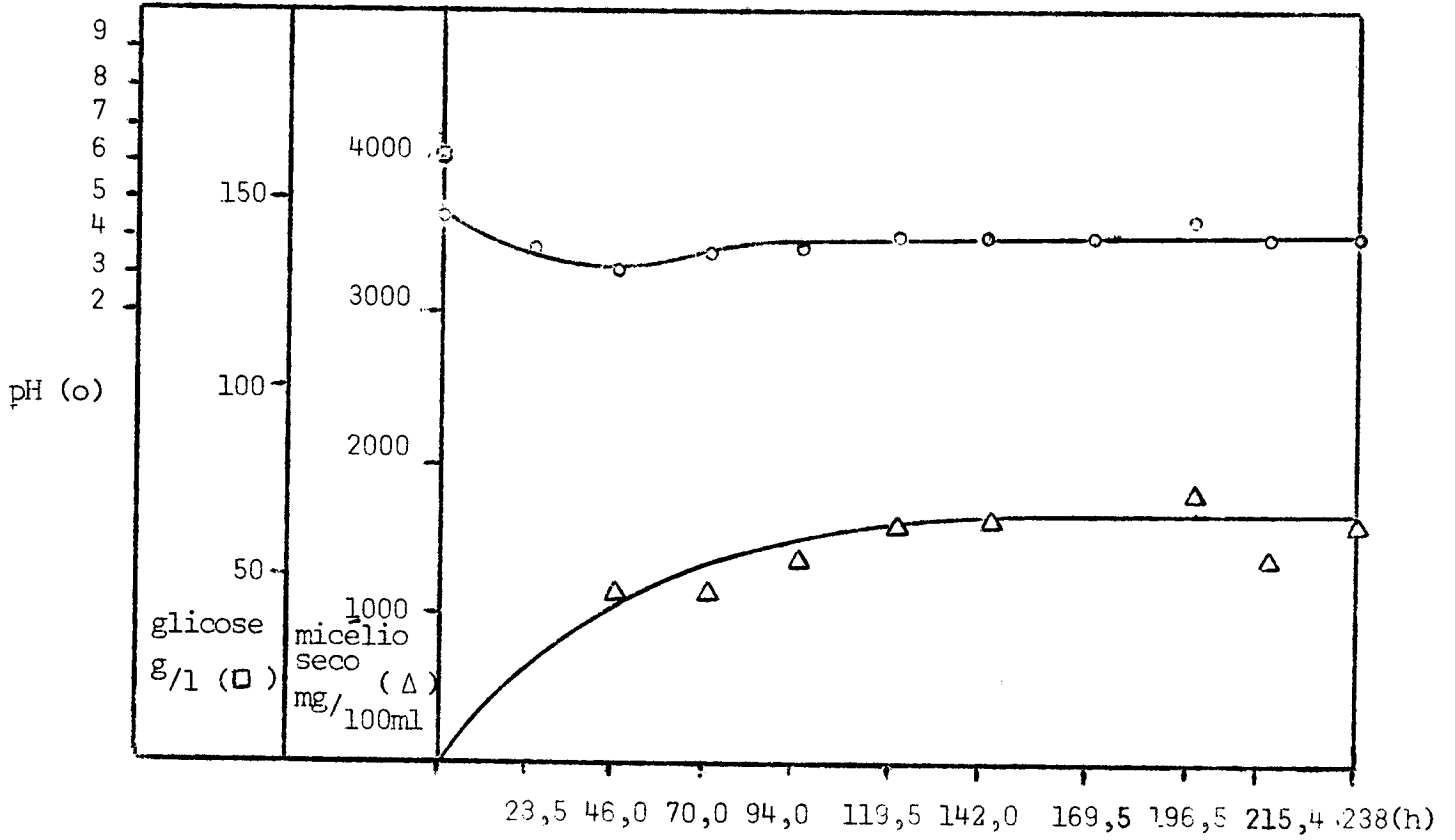
a - frascos nos quais se adiciona: glicose

(\*) contida no meio de cultura

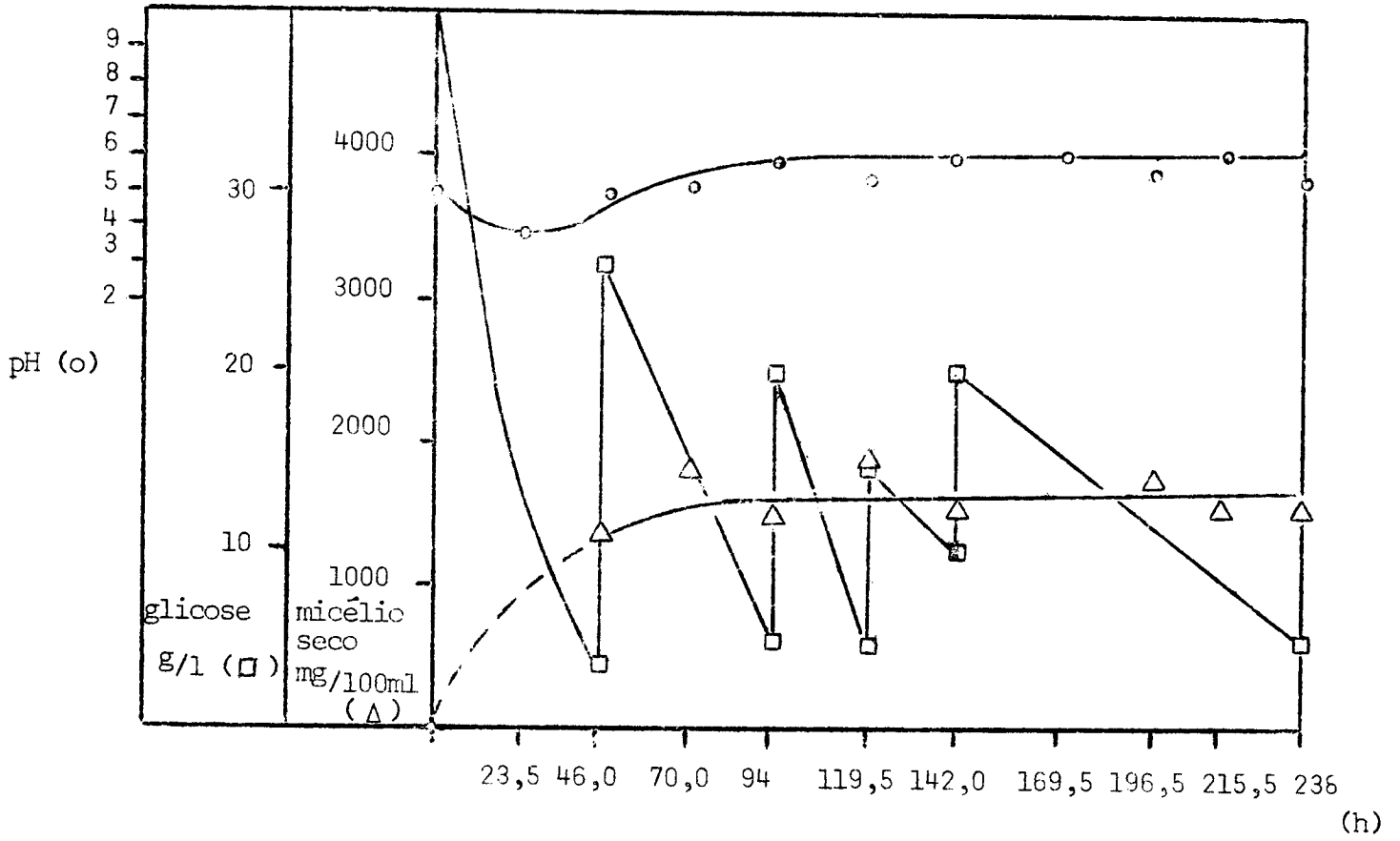
Experiência II 4



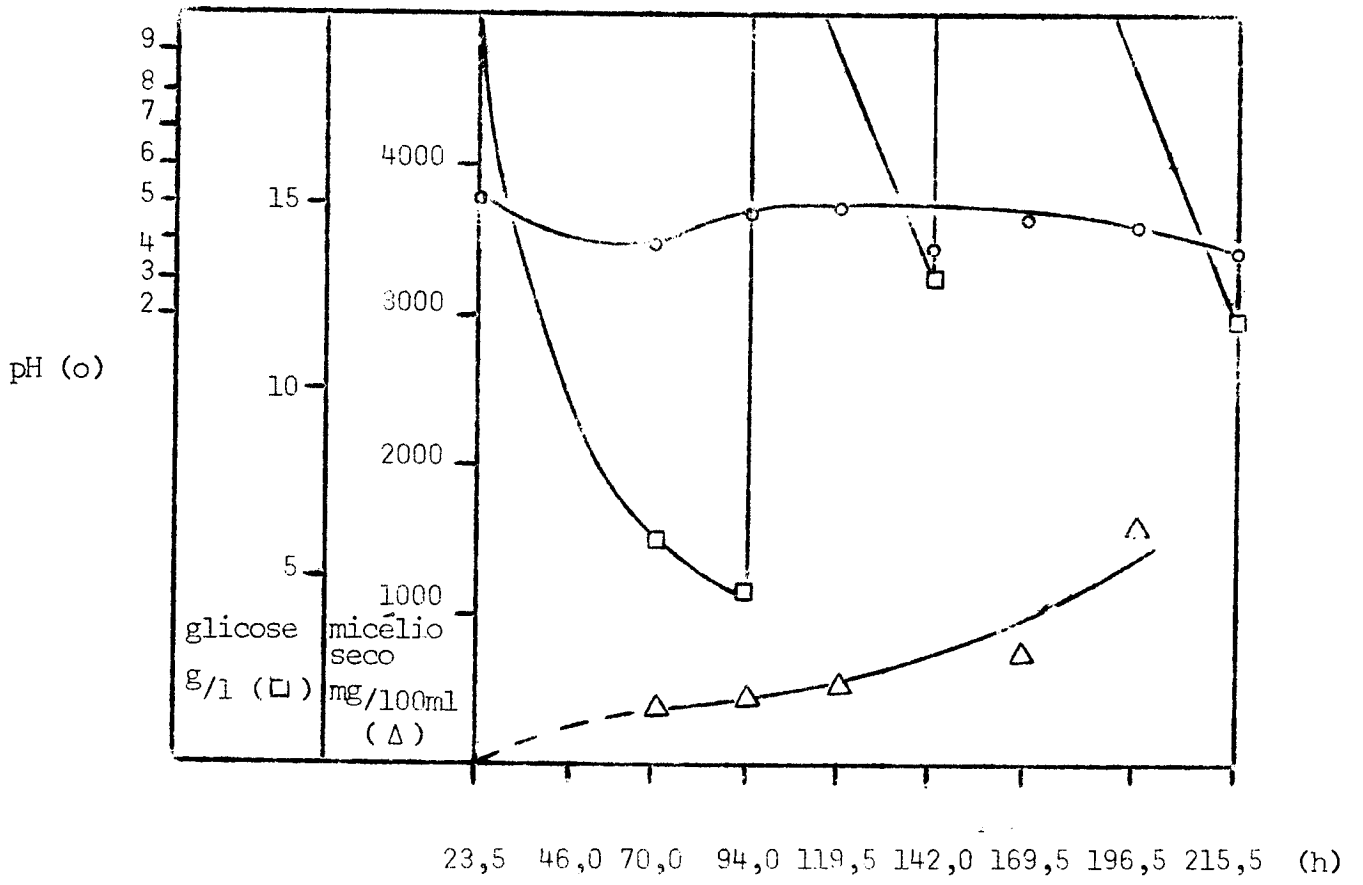
Experiência III 1



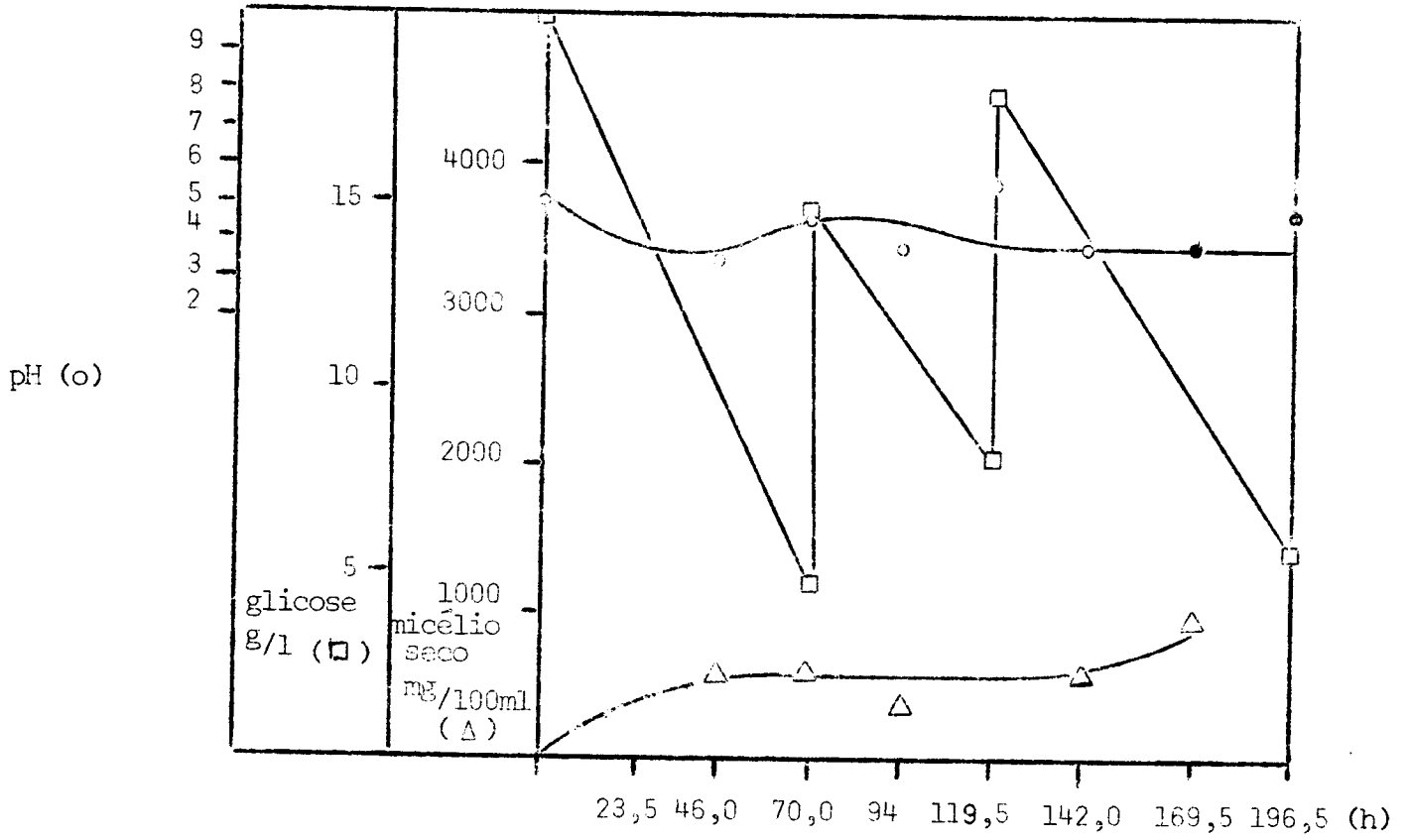
Experiência III 2



Experiência III 3

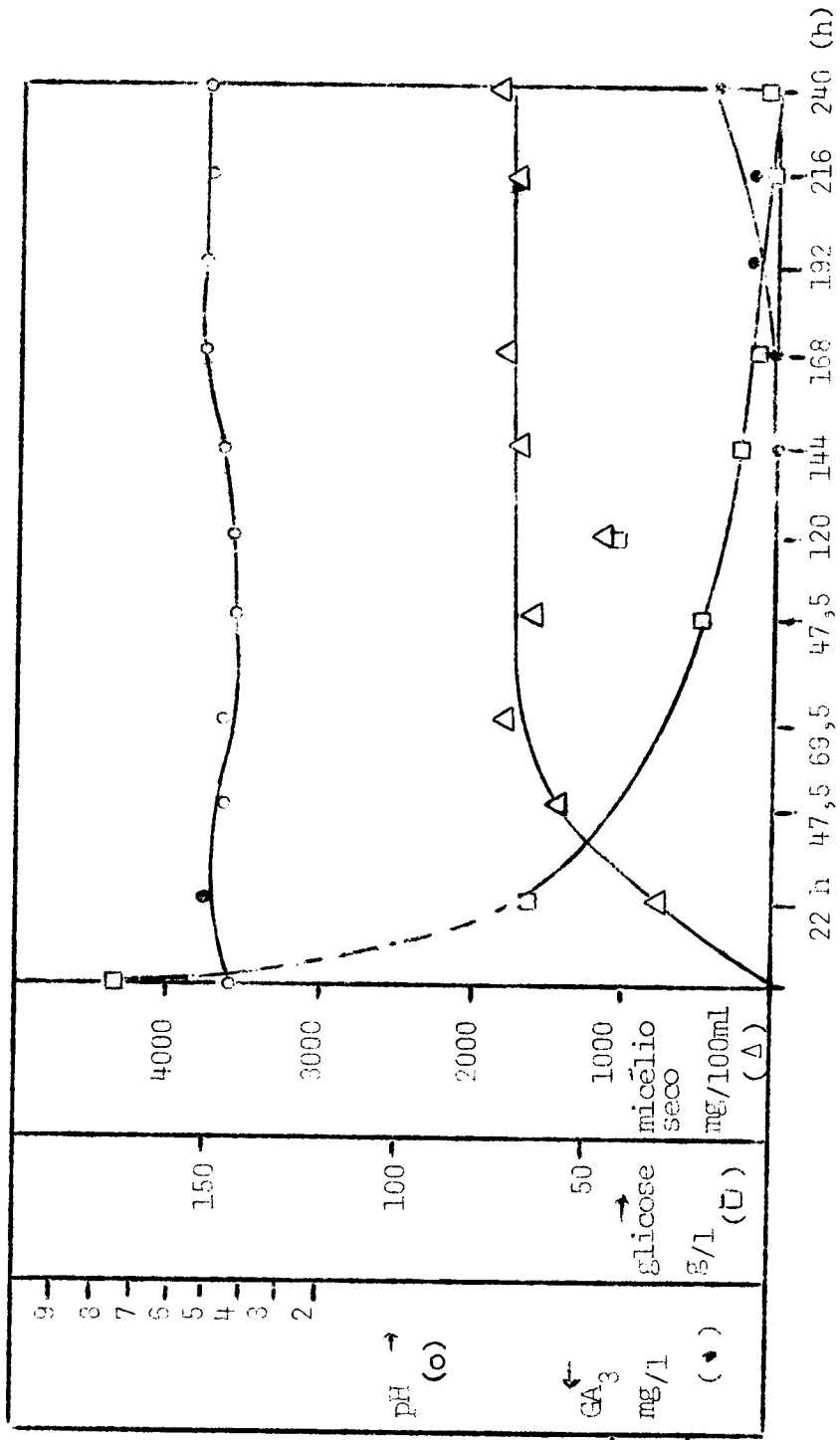


Experiência III 4

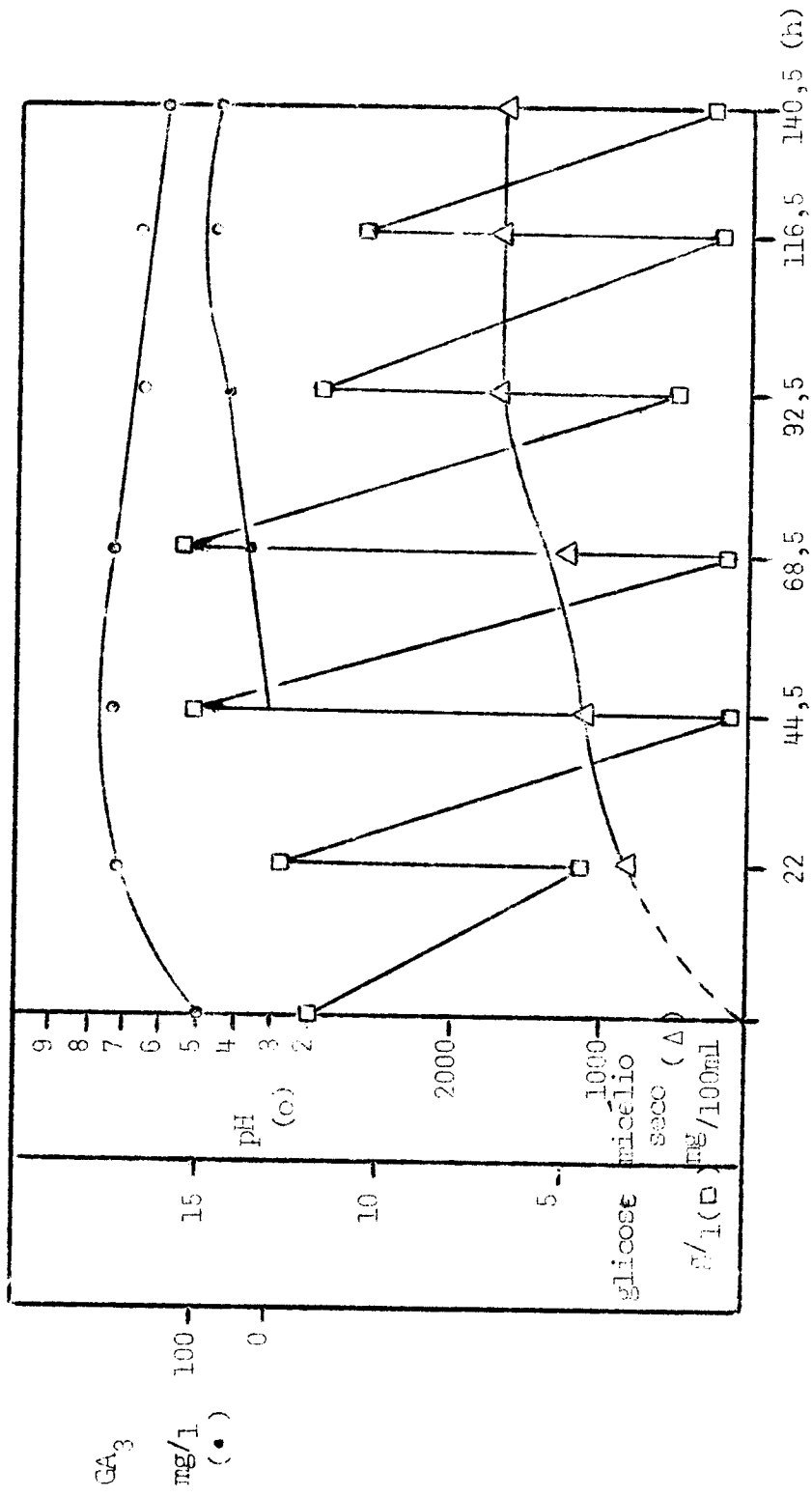




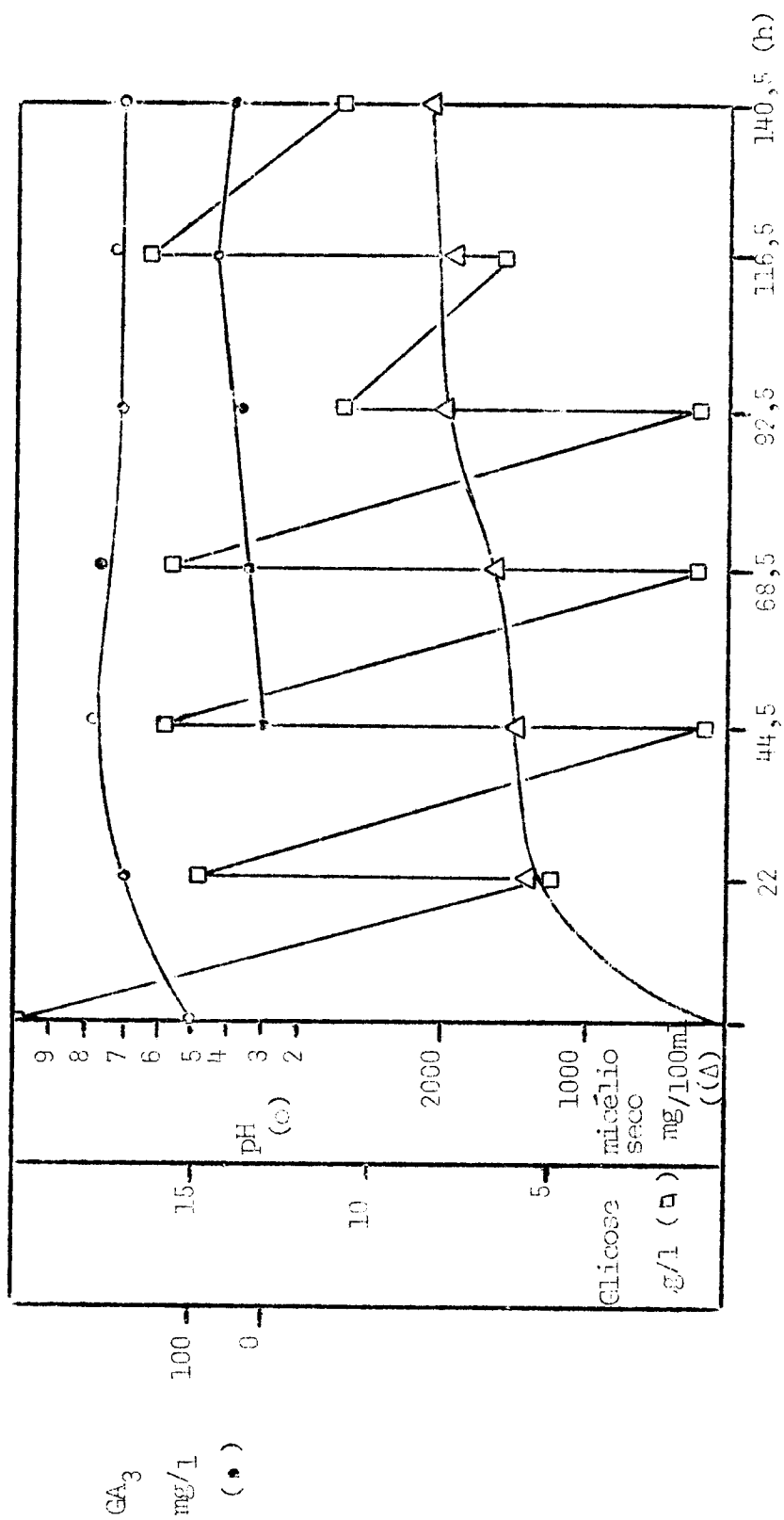
Experiência IV 1

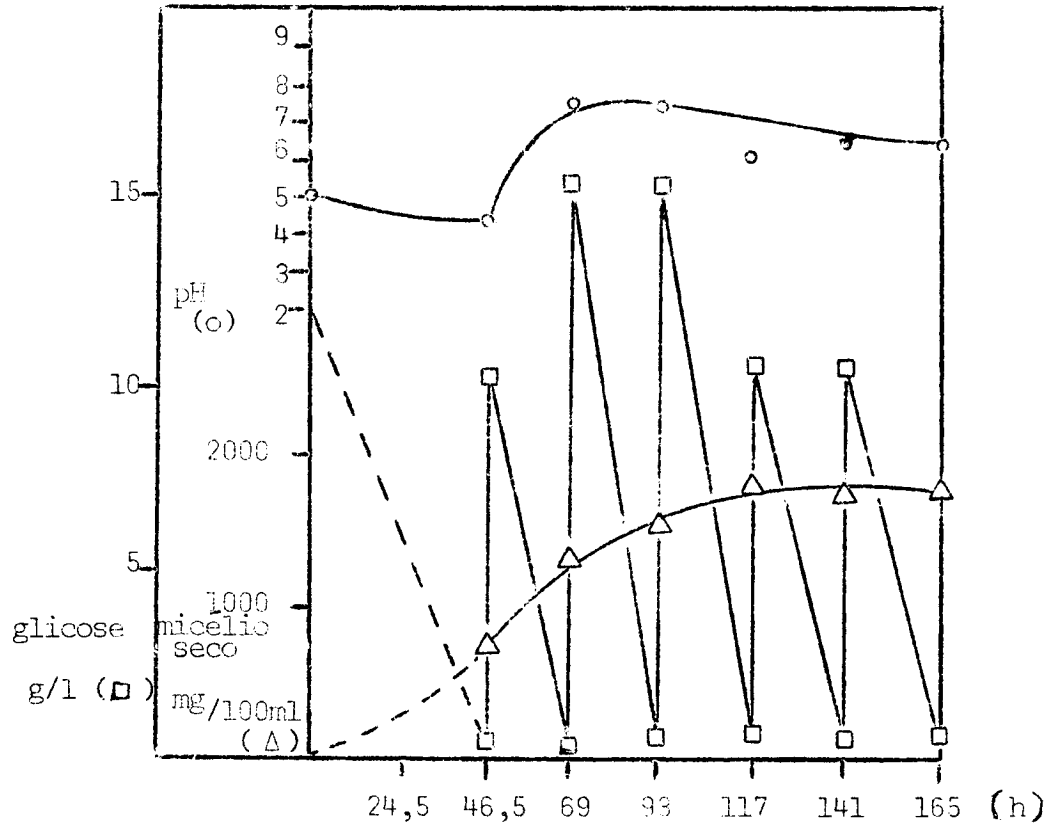


Experiência IV 2

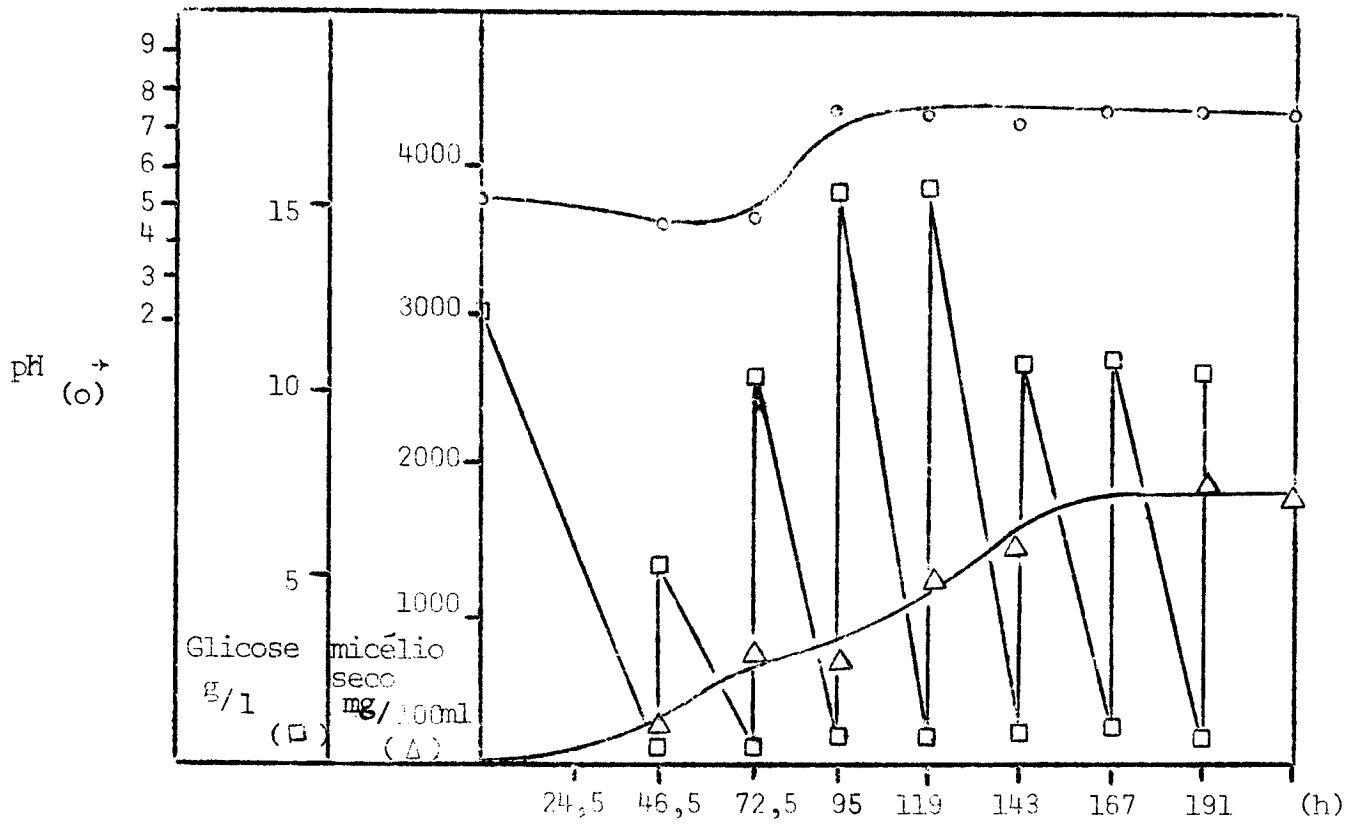


Experiência IV 3





Experiência IV 5



Experiência VI

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)
0	5,0	-	24*	-
19,0	4,1	9,4	30	310
41,5	4,8	0,82	40	950
65,5	5,0	31,3	-	-
91,0	5,8	0,57	40	1.390
114,0	4,4	34,4	20	1.560
138,5	4,4	-	20	-
162,0	4,1	0,37	20	1.650
190,5	4,1	-	20	1.770
210,5	-	4,71	20	-
259,0	5,4	0,46	-	1.740

(\*) contida no meio de cultura

Experiência VII

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)
0	5,0	-	40 *	-
19,0	4,7	28,8	30	250
41,5	4,1	1,26	40	800
65,5	5,7	1,14	40	1.940
91,0	4,0	13,6	20	1.050
114,0	5,3	1,22	30	1.700
138,5	4,1	-	20	-
162,0	4,6	0,45	20	2.330
190,5	-	-	20	2.250
210,5	4,4	62,5	-	910
259,0	4,4	61,0 50.0	-	730, 790

\* contida no meio de cultura

### Experiência VII

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)
0	5,4	-	24*	-
114	5,8	-	20x2, 3**	-
138,5	5,4	0,37	5x1	1.260
162,5	6,2	1,06	5x2	1.620
282,5	6,0	0,95	5x5	1.950
402	6,7	1,28	5x3	2.160

\* contida no meio de cultura

\*\* significa 2 adições de 20 g/l e uma de 3 g/l durante o período 114,5 - 138,5 horas

### Experiência VI2

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)
0	5,4	-	24*	-
114	5,8	-	20x2, 3**	-
138,5	6,2	0,50	5x1	1.080
162,5	3,8	0,82	5x2	1.650
282,5	3,4	1,06	5x5	1.025
402	5,4	1,41	5x3	2.300

\* contida no meio de cultura

\*\* significa 2 adições de 20 g/l e uma de 3 g/l durante o período 114,5 - 138,5 horas

Experiência VI 3

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)
0	5,4	-	24*	-
114	5,8	-	20x2,3 **	-
138,5	6,7	0,82	5x1	1520
162,5	6,8	0,74	5x2	2366
282,5	6,7	1,25	5x5	2910
402	5,4	1,00	5x3	3146

\* contida no meio de cultura

\*\* significa 2 adições de 20 g/l e uma de 3 g/l.

durante o período 114,5 - 138,5 horas

Experiência VII

Tempo (h)	pH	Concentração de carboidrato (g/l)	carboidrato adicionado (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	5,0	-	15G,40A*	-	-
110,5	8,2	0,79	-	1980	-
158	3,0	4,06	5 x 2 **	1720	-
206	6,7	-	5 x 2	-	-
278,5	7,5	0,71	5 x 3	2750	17
374	7,3	0,94	5 x 3	2970	-

\* contidos no meio de cultura, G = glicose, A = amido

\*\* significa 2 adições de 5 g/l durante o período 110,5 -

- 158 h.



Experiência VIII 1

Tempo (h)	pH	concentração de carboidrato (g/l)	carboidrato adicionado (g/l)	peso de micélio seco (mg/l)	ácido giberélico (mg/l)
0	4,5	-	7,5G, 30A*	-	-
71,5	7,9	0,91	10x2**	1560	15
119,5	6,7	1,31	20x2	1860	22
167,5	6,2	18,5	5	2770	42
239,5	5,2	14,8	-	2620	-

\* contidos no meio de cultura; G = glicose, A = amido

\*\* significa 2 adições de 10 g/l no período 71,5 - 119,5 h

Experiência VIII 2

Tempo (h)	pH	concentração de carboidrato (g/l)	carboidrato adicionado (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	4,5	-	7,5G, 30A*	-	-
71,5	7,9	0,75	5, 10**	1490	12
119,5	7,7	0,85	20 x 2	1860	32
167,5	6,0	12,5	5	2790	40
239,5	5,4	0,69	-	2990	52
263,5	4,4	0,44	-	2610	48

\* contidos no meio de cultura; G = glicose A = amido

\*\* significa uma adição de 5 g/l e outro de 10 g/l durante o período 71,5 - 119,5 h

Experiência VIII 3 e 4

Tempo (h)	pH	concentração de carboidrato (g/l)	carboidrato adicionado (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)	
0	4,5	-	15G, 60A		
144	7,7	1,44	-	2370	VIII 3
288	7,7	0	-	2150	
0	4,5	-	15G, 60A*		
144	7,1	1,82	-	1640	VIII 4
288	7,1	0	-	1860	

\* centilos no meio de cultura

Experiência IX 1

Tempo (h)	pH	concentração de carboidrato (g/l)	carboidrato adicionado (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	6,0	-	7,5G,50L*	-	-
72	6,7	-	25 G	-	-
111	5,6	-	-	-	-
159	8,8	65,9	-	1500	0
255	5,0	52,7	-	1480	96
327	6,7	50,8	-	1340	91

\* contidos no meio de cultura

Experiência IX 2

Tempo (h)	pH	concentração de carboidrato (g/l)	carboidrato adicionado (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	6,0	-	7,5G,50L*	-	-
72	7,0	-	25 G	-	-
135	6,7	-	-	-	-
159	8,2	51,5	-	1580	27
231	7,2	53,2	-	1430	102
327	6,7	49,8	-	836	93

Experiência XI

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	5,0	-	15*	-	
39,5	6,5	-	15	-	
63,5	5,8	-	30	-	
87,5	7,2	38,1	-	1480	
136,5	7,5	7,76	10	2040	30
183,5**	5,4	7,89	-	2000	51
231,5**	5,9	7,82	-	2110	75
327,5	5,6	-	-	2180	

\* contida no meio da cultura

\*\* valores médios de duas determinações

Experiência X2

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	5,0	-	15*	-	
39,5	6,5	-	15	-	
63,5	5,1	-	30	-	
87,5	4,4	51,2	-	990	
135,5	4,4	-	10	1060	não
183,5	4,6	2,10	-	1180	forma
231,5	4,8	1,52	-	-	
327,5	5,6	-	-	1210	

\* contida no meio da cultura

Experiência X3

Tempo (h)	pH	concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	5,0	-	30*	-	-
39,5	-	-	30	-	-
63,5	-	-	60	-	-
87,5	6,5	75,0	-	2760	-
135,5	6,6	-	20	4300	-
183,5**	5,9	19,6	-	3980	98
231,5**	5,7	21,2	-	4080	160

\* contida no meio de cultura

\*\* valores médios de duas determinações

Experiência X4

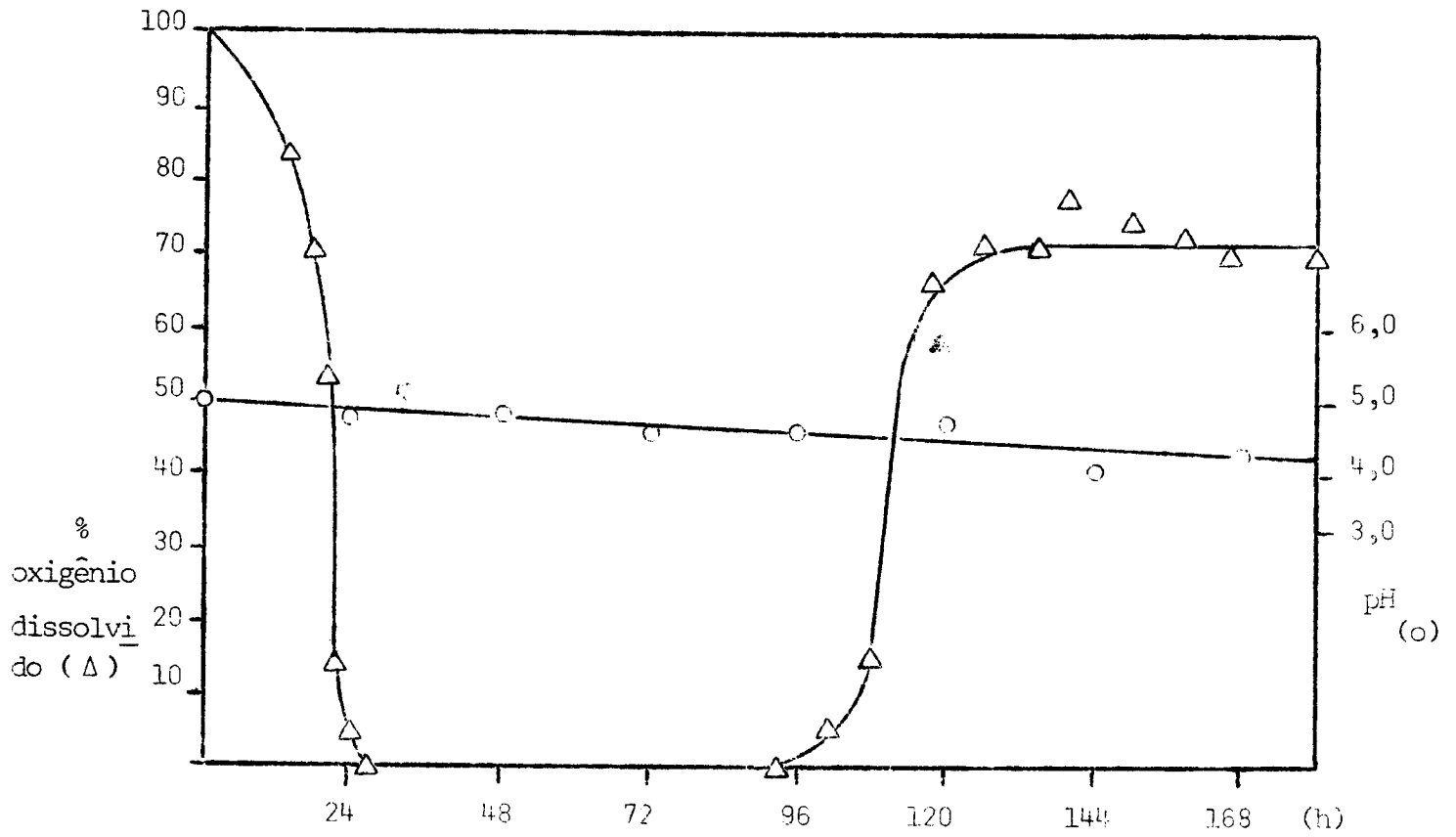
Tempo (h)	pH	Concentração de glicose (g/l)	glicose adicionada (g/l)	peso de micélio seco (mg/100 ml)	ácido giberélico (mg/l)
0	5,0	-	55*	-	-
39,5	4,4	-	55	-	-
63,5	4,1	-	100	-	não se de
87,5	5,7	140,5	-	4460	terminou
135,5**	6,7	-	-	6900	-

\* contida no meio de cultura

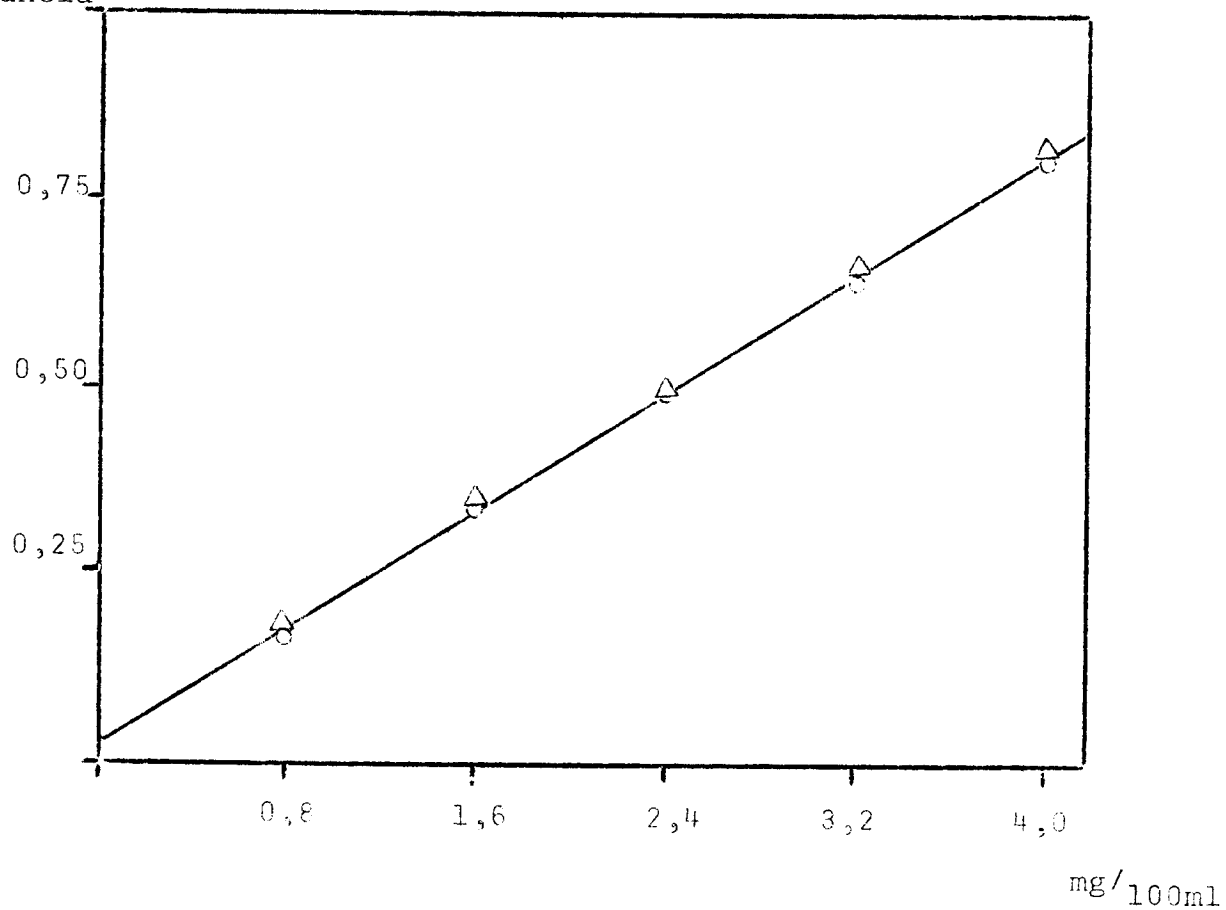
\*\* valores médios de duas determinações

Experiência XI - Fermentador

máximo peso  
de micélio seco 1130 mg/100 ml



absorvancia



Comprimento de onda 254 m $\mu$  . Largura de banda: 1,6 m/ $\mu$   
Ácido Giberélico Grade III

90% pureza minima

SIGMA CHEMICAL COMPANY

Correções na determinação do ácido giberélico por espectrofotometria.

1. Determinação da percentagem de ácido de Sumiki nas amostras de ácido giberélico:

$$\% \text{ de ácido de Sumiki} = (y - x) \times \frac{100}{25} \times \frac{1}{w} \times \frac{100}{(443)}, \text{ onde:}$$

y = absorbancia da solução alcoólica ácida a 268 m $\mu$

x = " " " " neutra a 268 m $\mu$

w = peso da amostra de GA<sub>3</sub> (g)

(443) = diferença das absorbancias específicas ( E<sup>1%</sup> ) do ácido de Sumiki em soluções alcoólicas neutras e ácidas, determinadas a 268 m $\mu$ , para uma concentração de 1% e uma espessura de 1 cm.

2. Correção das leituras pela presença do ácido de Sumiki:

Leitura corrigida a 242 m $\mu$  = leitura observada -

$$\left( \frac{\% \text{ de Sumiki} \times (510)w}{100 \times 4} \right)$$

Leitura corrigida a 254 m $\mu$  = leitura observada -

$$\left( \frac{\% \text{ ac. Sumiki} \times (893)w}{100 \times 4} \right)$$

Leitura corrigida a 266 m $\mu$  = leitura observada -

$$\left( \frac{\% \text{ ác. Sumiki} \times (841)w}{100 \times 4} \right)$$

Onde: (510), (893) e (841), são absorbancias específicas ( E<sup>1%</sup> ), para o ácido de Sumiki a 242, 254 e 266 m $\mu$ , respectivamente.



3. Determinação da percentagem de ácido giberelênico nas amostras de ácido giberélico, baseado nas leituras corrigidas pela presença de ácido de Sumiki.

% de ác. giberelênico =

$$= \frac{\left[ \text{leit. corr. a } 254 \text{ m}\mu - \left( \frac{\text{leit. corr. a } 242 + \text{leit. corr. a } 266 \text{ m}\mu}{2} \right) \right] \times 400}{(156) \times W}$$

onde: (156) =  $E_{1\text{cm}}^{1\%} 254 \text{ m}\mu - \frac{E_{1\text{cm}}^{1\%} 242 \text{ m}\mu + E_{1\text{cm}}^{1\%} 266 \text{ m}\mu}{2}$ , para o

ácido giberelênico.

4. Correção a aplicar sob o branco:

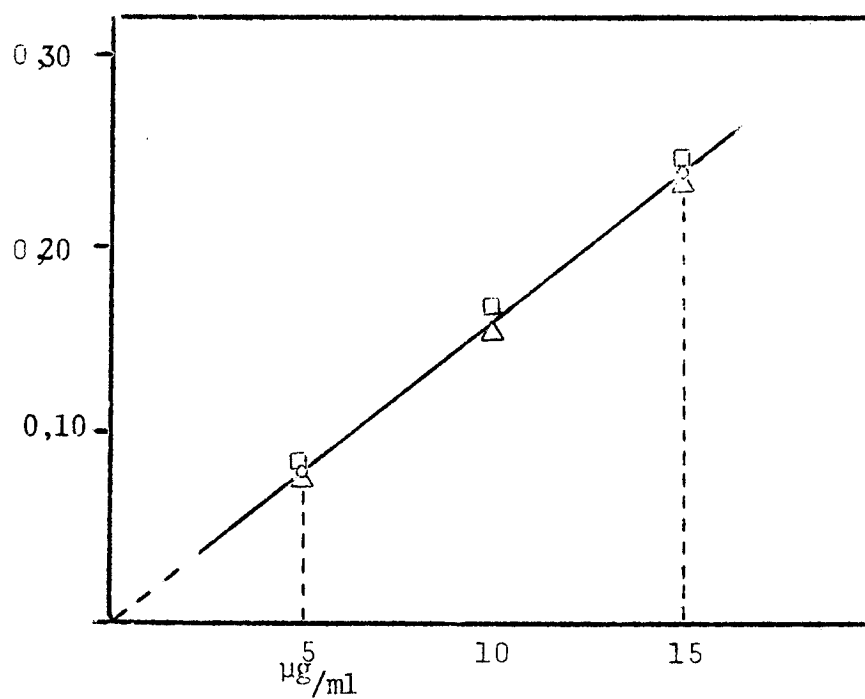
$$\text{Branco corr} = \text{branco observado} + \left( \% \text{ ac. giberelênico} \times \frac{W}{2000} \times (226) \right)$$

Onde: (226) =  $E_{1\text{cm}}^{1\%} 254 \text{ m}\mu$ , para o ácido giberelênico. diminuição durante o tempo da determinação.

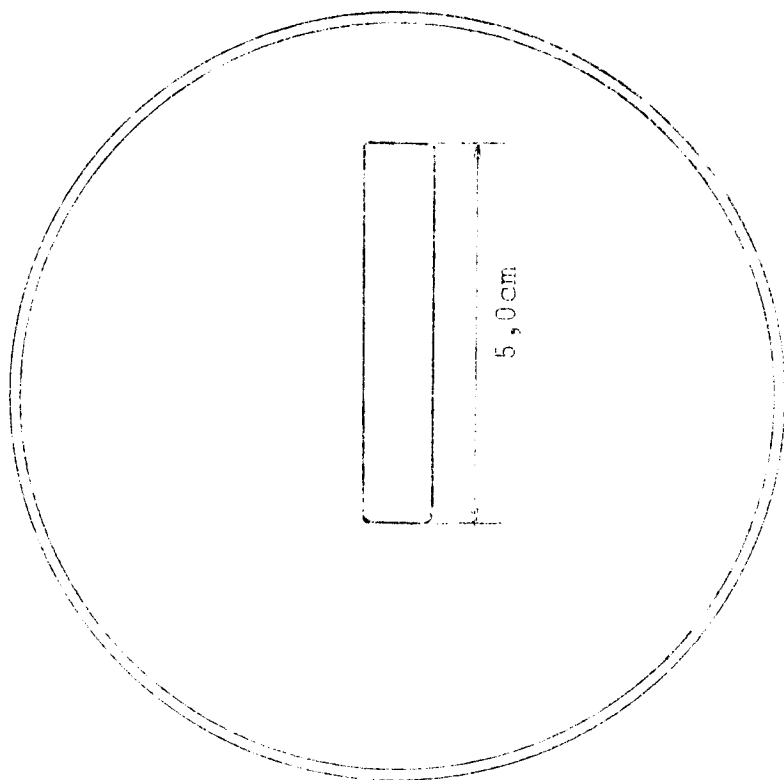
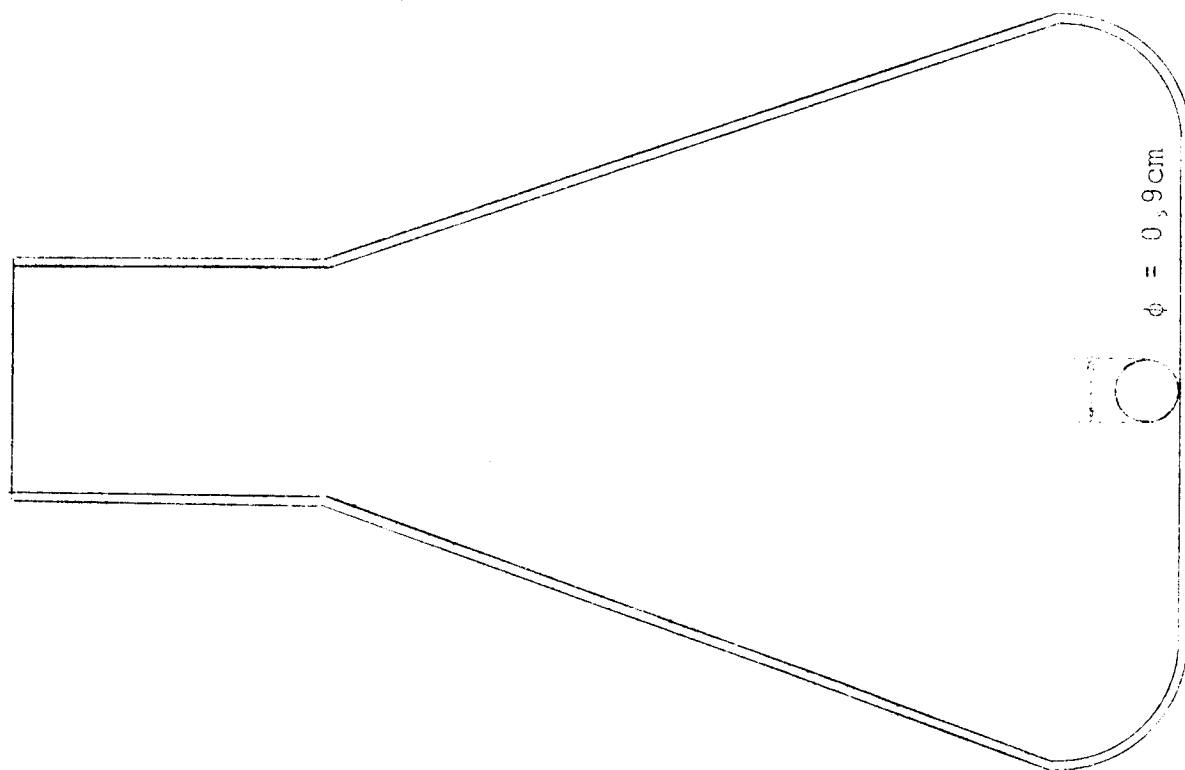
5. Nessa curva padrão a correção a aplicar sob o branco (U.A. = 0,058), oscilou entre 0,0006 U.A., para 0,3 mg/l de  $\text{GA}_3$  e 0,003 U. A., para 4,0 mg/l de  $\text{GA}_3$ . Não foi necessário introduzir correções na curva padrão.

Curva padrão de Glicose, comprimento de onda 630 mμ

$$\frac{1}{m} = \frac{15 \mu\text{g/ml}}{0,24 \text{ UA}} = 62,5 \mu\text{g/ml} / \text{U.A.} \quad \{ 0,08 - 0,24 \text{ UA} \}$$



E. Meyer 500ml com deflector horizontal  
Escala 1:1



E. Meyer 500 ml com defletores laterais  
Escala 1:1

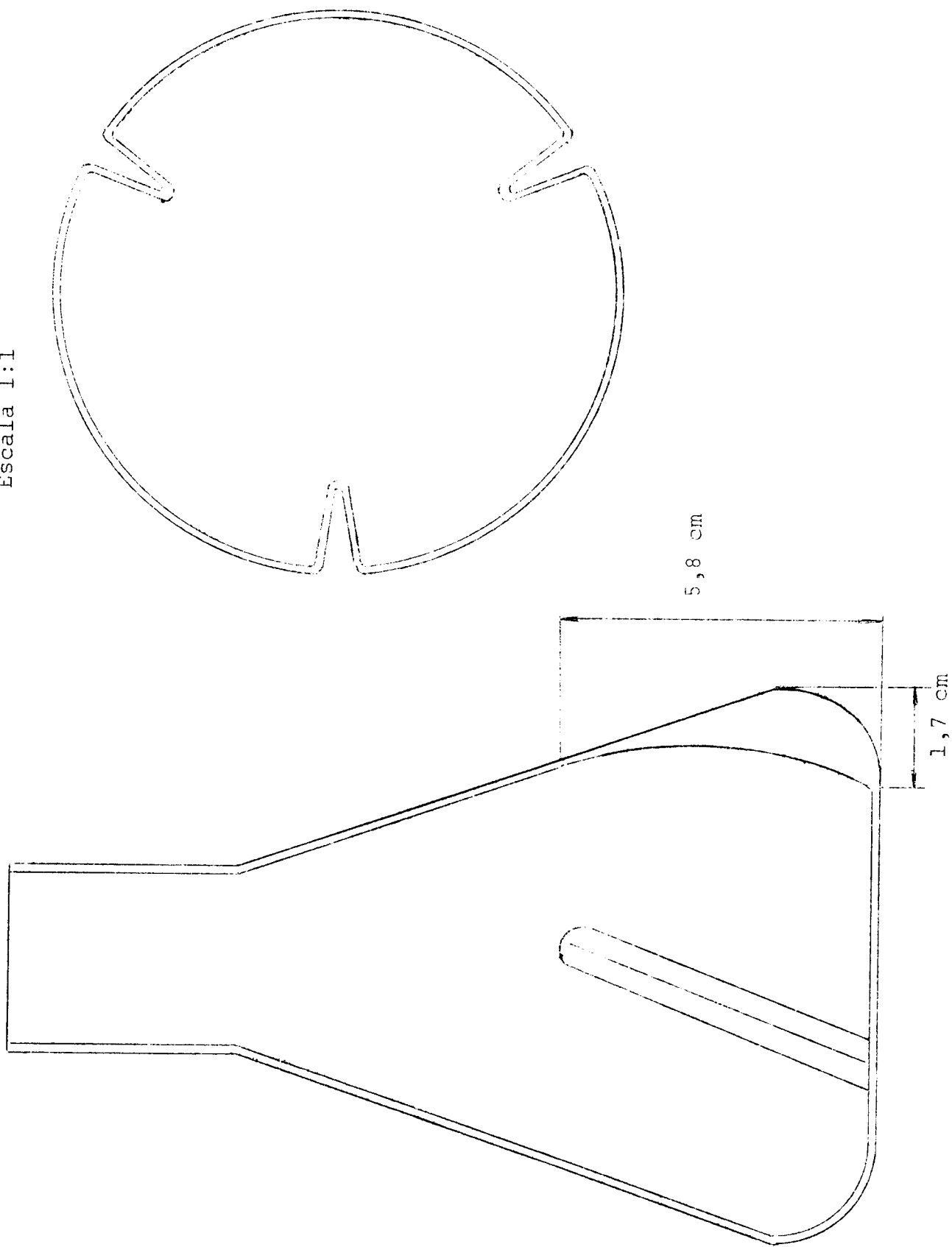


FOTO 1



*Início da fase de crescimento, hifas e macroconídias; fotografado com objetiva de imersão (aumento: 1300 vezes); coloração com azul de metileno.*

FOTO 2



*Micélio na fase de crescimento balanceado; fotografado com objetiva de imersão (aumento: 1300 vezes); coloração com azul de metileno.*

FOTO 3



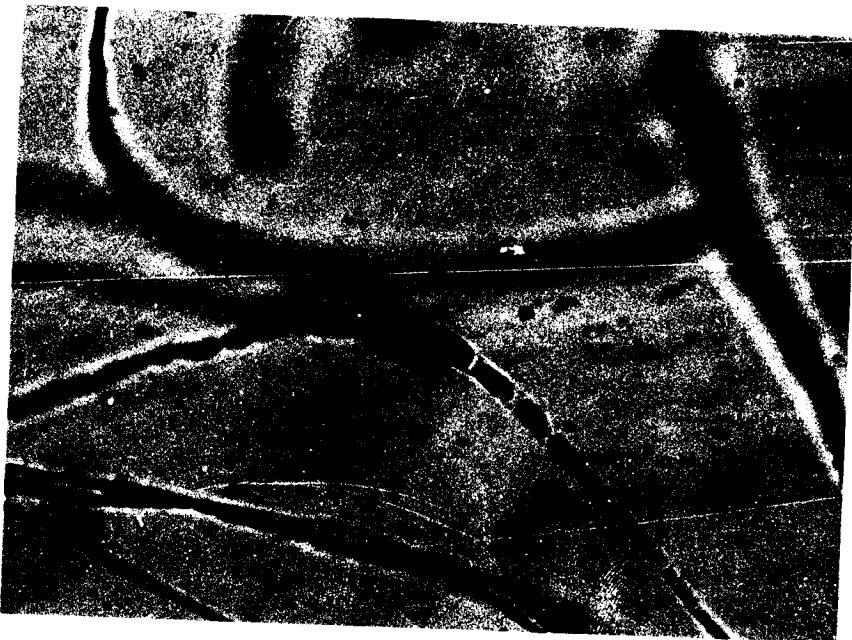
*Parede celular e micélio septado, no término da fase de crescimento; fotografado com objetiva de imersão (aumento: 1300 vezes); coloração com safranina.*

FOTO 4



*Granulação do citoplasma, presença de fosfolipídeos; fotografado com objetiva de imersão (aumento: 1300 vezes); coloração com azul de toluidina.*

FOTO 5



*Hiça mostrando fileiras de glôbulos correspondentes à formação de reservas de lipídeos ; fotografado em gota pendente (aumento: 900 vezes); coloração com sudam preto.*

FOTO 6



*Hifas curtas sem ramificações, cultivadas a elevadas T<sub>70</sub>, fase de reserva, presença de glôbulos de gordura ; fotografado com objetiva de imersão (aumento: 1300 vezes); coloração com sudam preto.*

FOTO 7



*Hifas na fase de reserva, cultivadas a elevadas relações G:N, e com aeração deficiente; fotografado com objetiva de imersão ( aumento: 1300 vezes ) coloração com sudan preto.*

FOTO 8



*Micélio cultivado em meio de cultura com deficiência de glicose, degeneração do micélio; fotografado com objetiva de imersão ( aumento; 1300 vezes ); coloração com azul de metileno.*



## IX NOMENCLATURA

- A = concentração de amido (g/l)
- C = concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura  $\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{l} \right]$
- C<sup>0</sup> = concentração de saturação de oxigênio no meio de cultura sob condições determinadas de temperatura e pressão  $\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{l} \right]$
- C<sub>1</sub> = constante (pseudoc.p.) h<sup>-1</sup>
- C<sub>2</sub> = constante  $\left[ \frac{\text{mg de micélio seco}}{100 \text{ ml} \cdot \text{h}} \right]$
- c.p.m = ciclos por minuto
- $-\frac{dg}{dt}$  = taxa de utilização de glicose (g/l.h)
- $\frac{dGA_3}{dt}$  = taxa de produção de GA<sub>3</sub>  $\left[ \frac{\text{mg}}{\text{lh}} \right]$
- $\frac{dGA_3}{\text{Modt}}$  = produtividade de GA<sub>3</sub>  $\left[ \frac{\text{mg}}{\text{ml No.h}} \right]$
- $\frac{dr}{dt}$  = taxa de produção de um antibiótico (g/l h)
- $\frac{dx}{dt}$  = taxa de crescimento do micélio  $\left[ \frac{\text{mg de micélio seco}}{100 \text{ ml}} \right]$
- G = concentração de glicose (g/l)

$G_0$  = concentração inicial de glicose (g/l)

$GA_1$  = gibberelina 1

$GA_3$  = ácido giberélico, concentração (mg/l)

$g_n$  = glicose consumida desde o início até o esgotamento de nitrogênio (g/l)

$g(n+50)$  = glicose consumida desde o início até 50 horas depois do esgotamento de nitrogênio (g/l)

$K_L a$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )

$L$  = concentração de lactose (g/l)

$\ln$  = logaritmo neperiano

$l$  = deslocamento (cm)

$M$  = massa micelial  $\left[ \frac{\text{mg de micélio seco}}{\text{g de m de cultura}} \right]$

$m$  = tangente

$mM_{N_0}$  = milimoles iniciais de nitrogênio

$N$  = concentração de nitrogênio (mM/l)

$N_0$  = concentração inicial de nitrogênio (mM/l)

$\gamma$  = concentração de um antibiótico (g/l)

$\frac{P}{V}$  = potência aplicada por unidade de volume

$Q_{O_2}$  = taxa específica de demanda de oxigênio  $\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{\text{mg de micélio} \cdot \text{seg} \cdot h} \right]$

$Q_{O_2}^{\text{ob}}$  = taxa específica de demanda de oxigênio requerida para a síntese de novas células  $\left[ \frac{\text{ml } O_2}{\text{mg de micélio seco} \cdot h} \right]$

$Q_{om}$  = taxa específica de demanda de oxigênio requerida para a manutenção das funções vitais das células existentes

$$\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{\text{mg/de micelio seco. h}} \right]$$

$Q_c$  = taxa específica de demanda de carboidrato

$$\left[ \frac{\text{ml}}{\text{mg de micelio seco. h}} \right]$$

$Q_p$  = taxa específica de produção de um antibiótico

$$\left[ \frac{\text{g}}{\text{mg. de micelio seco. h.}} \right]$$

$r$  = raio do furo (cm)

$r.p.m.$  = revoluções por minuto

$S$  = substrato mg

$t$  = tempo (h)

$t_n$  = tempo até o esgotamento do nitrogênio (h)

$t_{(n+50)}$  = tempo até 50 horas após o esgotamento do nitrogênio (h)

$TDO$  = taxa de demanda de oxigênio do microrganismo no meio de cultura

$$\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{1 \text{ h}} \right]$$

$TDO_{max}$  = taxa de demanda de oxigênio máxima

$$\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{1. \text{ h}} \right]$$

$TTO$  = taxa de transferência de oxigênio ao cultivo

$$\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{1 \text{ h}} \right]$$

$TTO_{max}$  = taxa de transferência de oxigênio ao cultivo, em condições máximas de aeração e agitação

$$\left[ \frac{\text{ml de } O_2}{1 \text{ h}} \right]$$

$U_a$  = unidades de absorvância  
 $U_s$  = velocidade de ar referida na seção transversal do fermentador

v.v.l. = volumes de ar por volume de meio por minuto

w/v = peso/volume

X = concentração de biomassa  $\left[ \frac{\text{mg de micélio seco}}{100 \text{ ml}} \right]$

$X_0$  = concentração inicial de biomassa  $\left[ \frac{\text{mg de micélio seco}}{100 \text{ ml}} \right]$

$X^i$  = concentração de biomassa (mg de micélio seco/l)

$X^{in}$  = concentração de biomassa ao tempo  $t_n$   
(mg de micélio seco/l)

$X^i (n+50)$  = concentraçã. de biomassa ao tempo  $t(n+50)$   
(mg de micélio seco/l)

Letras gregas:

$\alpha$  = exponente

$\beta$  = exponente

$\frac{\Delta S}{\Delta R}$  = coeficiente econômico mg/mg de micélio seco/ de m.  
de cultura.

$\frac{\Delta G}{N_0 \Delta t}$  = consumo de glicose g/m<sup>3</sup>h

$\eta_{ap}$  = viscosidade aparente pseudo plástica pseudo-c.p.

$\gamma$  = função

$\mu$  = taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

$\mu_c$  = valor crítico da taxa específica de crescimento  $h^{-1}$

$\omega$  = expoente

X - BIBLIOGRAFIA

1. AIBA, S., HUMPHREY, A. E. and MILLIS, N.F. Biochemical engineering. New York, Academic Press, 1965. 333p.
2. BAUMGARTNER, W. E. et al . Determination of gibberellins by derivative labeling with diazomethane - C<sup>14</sup> and by isotopic dilution analysis with tritium - labeled gibberellins. J. Agr. Food Chem. 7, 422, 1959.
3. BIRD, H.L. and PUGH, C.T. A paper chromatographic - separation of gibberellic acid and gibberellin A. Plant Physiology 33, 45, 1958.
4. BLAKEBROUGH, N. Biochemical and biological engineering science. New York, Academic Press, 1967. v. 1 e 2.
5. BLUMENTHAL, H. J. Carbohydrate metabolism. Glycolisis In: AINSWORTH, G. C. and SUSSMAN, A. The fungi. An advanced treatise. London, Academic Press, 1965. v. 1, cap. 10.
6. BORROW, A. et al. Gibberellic acid, a metabolic product of the fungus Gibberella fujikuroi: some observation of its production and isolation. J. Sci. Food Agric. 6, 340, 1955.
7. \_\_\_\_\_, JEFFERYS, E. G. and NIXON. I. S. Gibberellic acid production. (U.S. Patent 2.906.670, Sept. 29, 1959).

8. \_\_\_\_\_ et al. The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* 7, 227, 1961.
9. \_\_\_\_\_ et al. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* 10, 407, 1964.
10. \_\_\_\_\_ et al. The effect of varied temperatures on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* 10, 445, 1964.
11. CARILLI, A. et al. Aeration studies. 3. Continuous measurement of dissolved oxygen during fermentation in large fermenters. *Sci. Repts. Ist. Super. Sanità* 1, 177, 1961.
12. CURTISS, P. J. and CROSS, B. E. Gibberellic acid. A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chemistry and Industry*, 1954, August 1954.
13. DARKEN, M. A., JENSEN, A. L. and SHU, P. Production of gibberellic acid by fermentation. *Appl. Microbiol.* 7, 301, 1961.
14. DIFCO MANUAL Detroit, Difco Lab, 1972. p. 64.
15. EWING, G. W. Instrumental methods of chemical analysis, 3rd Ed. New York, Mc Graw-Hill, 1969. cap.3
16. FREEDMAN, D. The shaker in bioengineering. *Proc. Biochem.* 3 (3): 29, 1969.

17. GORDON, J. and PANKRATZ, R. Fluorometric determination of gibberellic acid. *J. Agr. Food Chem.* 16, 525, 1968.
18. GROVE, J. F. Gibberellins. In: RAINBOW, C. and ROSE, A. H. *Biochemistry of industrial microorganisms*, London, Academic Press, 1963. cap. 9.
19. HART, F. L. and FISHER, H. J. *Modern food analysis*. New York, Springer Verlag, 1971. p.417.
20. HELFFERICH, D. *Ion exchange*. New York, Mc Graw-Hill, 1962. cap. 19.
21. HOLME, T. and ZACHARIAS, B. Gibberellic acid formation in continuous culture. *Liotech and bioeng.* 7, 435, 1965.
22. HOLBROOK, A. A., EGDE, W.J.W. and BAILLEY, F. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Avan. Chem. Ser. N<sup>o</sup> 28*, 159, 1961.
23. HOSTALEK, Z et al. Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. 1. Biosynthesis of chlorte-tracyline and tricarboxylic acid cycle activity. *Biotech. and Bioeng.* 11, 539, 1969.
24. KAVANAGH, F. and KUZEL, N. R. Fluorometric determination of gibberellic acid and gibberellenic acid in fermentation products, commercial formulations and purified materials. *J. Agr. Food Chem.* 6, 459, 1958.

25. LINDEMAYER, A. Carbohydrate metabolism. 3. Terminal oxidation and electron transport. In: AINSWORTH, G. C. and SUSSMAN, A. The fungi. An advanced treatise. London, Academic Press, 1965. v1, cap. 12.
26. MAC MILLAN, J. Direct identification of gibberellins in plant extracts by gas chromatography - mass spectrometry. In: WHIGTMAN, D. Biochemistry and physiology of plant growth substances. Ottawa Runge Press, 1968 p.101.
27. MARTIN, S.M. Production of organic acids by moulds. In: RAINBOW, C. and ROSE, A. H. Biochemistry of industrial microorganisms. London, Academic Press, 1963. cap. 12.
28. MORRIS, D. L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science 107, 254, 1949.
29. MUSGRAVE, A. Twin film chromatography of gibberellins. J. Chromatography 36, 388, 1968.
30. NIEDERPRUEM, D.J. Carbohydrate metabolism. 3. Tricarboxylic acid cycle. In: AINSWORTH, G. C. and SUSMAN, A. The fungi. An advanced treatise. London. Academic Press, 1965. v. 1, cap. 11.
31. ORTEGA, A. Evaluación técnico-económica de una planta productora de ácido giberélico en México. Escuela Nacional de Ciencias Químicas, 1970. 111p. Tesis (Ing.Qco.) Univ. Nac. Aut. México.



32. PEPPLER, H. J. Microbial technology. New York, Reinhold Publishing, 1967. pag.249.
33. PHILLIPS, D.E. and JOHNSON, M.J. Measurement of dissolved oxygen in fermentations. Biotech. and Bioeng. 3 (3): 261, 1961.
34. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Aeration in fermentations. Biotech. and Bioeng. 3 (3): 277, 1961.
35. PODOJIL, M and RIGICOVA, A. Influence of the soya meal fractions on gibberellic acid and gibberellin A production in submersive cultivation of *Gibberella fuji kuroi*. Fed. microbiol. 10, 55, 1965.
36. PRESCOTT, S. C. and DUNN, C.G. Industrial microbiology New York, Mc Graw-Hill, 1959. cap. 32.
37. RYU, D. and HUMPHREY, A. E. A reassessment of oxygen transfer rates in antibiotic fermentations. J. Ferment. Technol. 50, (6): 424, 1972.
38. SANCHEZ-MARROQUIN, A. Microbiological production of gibberellic acid in glucose media. Appl. Microbiol 11, 523, 1963.
39. SERZEDELLO, A. and WHITAKER, N. Fermentação giberelínica. Influência da concentração de sacarose do substrato sobre a biosíntese do ácido giberélico. São Paulo, Rev. Agric. 35, 15, 1969.
40. SKINNER, C. E., EMMONS, C.W. and TSUCHIYA, H. M. Henrici's molds, yeasts and actinomycetes. 2 nd Ed. New York, Willey, 1940.

41. SUMINO, Y., AKIYAMA, S. and FUKUDA, H. Performance of the shaking flask. I. Power consumption. J. Ferment. Technol. 50, (30): 203, 1972.
42. TEPE, J. B. and HOLZER, F. J. Gibberellic acid. In: ZWEIF, G. Pesticides, plant growth regulators and food additives. New York, Academic Press, 1967, v.5, cap. 26.
43. TAKEBE, H., TAKAHASHI, J. and UEDA, K. Enlargement of the culture scale from flask to jar fermenter in the production of ribonuclease N1 by Neurospora crassa: effect of agitation intensity on enzyme production. J. Ferment. Technol. 49, (1): 21, 1961.
44. THERIAULT, R. J. et al. Fluorometric assay for gibberellic acid. J. Agr. Food Chem. 9 (1): 21, 1961.
45. TUFFILE, C. M. and PINHO, F. Determination of oxygen transfer coefficients in viscous streptomycete fermentations. Biotech. and Bioeng. 12, 849, 1970.
46. TURNER, W. B. Fungal metabolites. London, Academic, Press, 1971. 446p.
47. UEDA, K. et al. Enlargement of the culture scale from flask to jar fermenter in the production of ribonuclease N1 by Neurospora crassa: combined effect of dissolved oxygen and agitation on enzyme production. J. Ferment Technol. 49, (12): 961. 1971
48. UNDERKOFER, L. A. and HICKEY, R. J. Industrial fermentations. New York, Chemical Publishing, 1954. v. 2, pag. 232.

49. WASHBURN, W. H., SCHEKKE, F. A. and SCHENK, J. R.  
Infrared determination of gibberellins. J. Agr.  
Food Chem. 7, 420, 1959.
50. WOLFF, F. J. et al. Ion exchange process for the  
recovery of ionic organic substances. (U.S. Pa-  
tent 3.221.008, Nov. 30, 1965).
51. IKEKAWA, N., KAGWA, T. and SUMIKI, Y. Biochemis-  
try of bakanae fungus (*Gibberella fujikuroi*).67.  
Determination of nine gibberellins by gas and  
thin layer chromatography. Proc. Japan Acad.39  
(7): 507, 1963. (CA: 60, 12347 d, 1964).

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ricardo Sadir, pela sua orientação durante a realização desse trabalho.

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelas facilidades outorgadas.

Ao Professor Doutor Osmar José B. H. de Lucca, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo assessoramento na preparação das microfotografias.

À Eng<sup>a</sup>. Tecnóloga de Alimentos Iracema de Oliveira Moraes, pela sua valiosa colaboração na preparação desse trabalho.

Ao Químico Industrial Antonio José Quirino Simões, pela assistência nas determinações analíticas.

Aos funcionários da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, que direta ou indiretamente colaboraram durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Organização dos Estados Americanos, pela oportunidade e ajuda econômica dispensadas, que tornaram possível a execução - dessa tese.

À Universidade Estadual de Campinas e à Faculdade de Tecnologia de Alimentos, pela concessão de laboratórios, equipamentos e assessoria técnica.

\*

*Este trabalho foi datilografado e impresso na*  
*FUNDAÇÃO CENTRO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS*  
*Rua Dr. Pelágio Lobo nº 63 - Tels: 37322 e 26325*  
*CAMPINAS - SÃO PAULO - BRASIL -*