

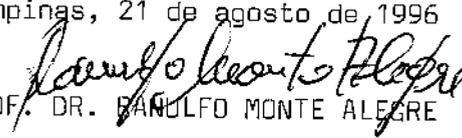
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE POR  
*Aspergillus niger* NRRL 3122 EM FERMENTAÇÃO SEMI-  
SÓLIDA DE FARELO DE ARROZ**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA e aprovada pela Comissão Julgadora em 21.08.96.

Campinas, 21 de agosto de 1996

  
PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

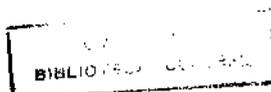
Presidente da Banca

**JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA**  
Universidade do Rio Grande

**PROF.DR. RANULFO MONTE ALEGRE**  
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

CAMPINAS - SP  
MAIO DE 1996



UNIDADE	73C
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	C823e
V.	de 01
PREÇO D.V.	28570
PREÇO	667196
	C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	9811,00
DATA	13/09/96
N.º CPU	

CM-00091643-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C823e

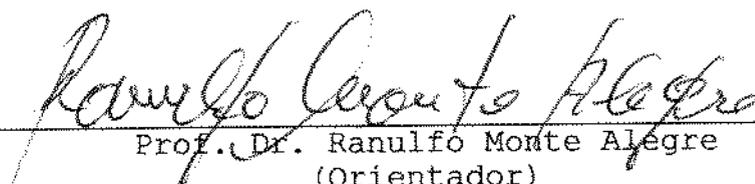
Costa, Jorge Alberto Vieira

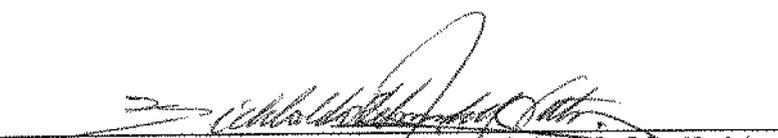
Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz / Jorge Alberto Vieira Costa.-- Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre  
Tese (doutorado)-Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Amiloglicosidade. 2.Fermentação. 3.Aspergillus niger.  
4.Farelo de arroz. 5.Glicoamilase. I.Alegre, Ranulfo Monte.  
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**

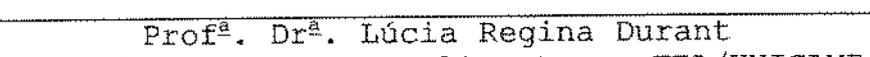
  
Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
(Orientador)

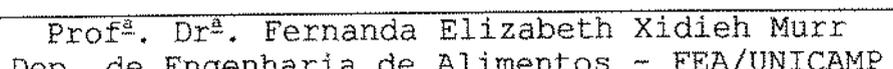
  
Prof. Dr. Willibaudo Schimidell Netto  
Dep. de Engenharia Química - USP

  
Dr. Alfredo Eduardo Maiorano  
Agrupamento de Biotecnologia - IPT

  
Prof. Dr. Yong Kun Park  
Dep. de Ciências dos Alimentos - FEA/UNICAMP

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Andrade Santana  
Dep. de Processos Químicos - FEQ/UNICAMP

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Regina Durant  
Dep. de Ciências dos Alimentos - FEA/UNICAMP

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Elizabeth Xidieh Murr  
Dep. de Engenharia de Alimentos - FEA/UNICAMP

*"Quero fazer com que o meu trabalho surja como o canto de um pássaro ou a música de Mozart, sem esforço aparente."* Miró

Aos meus pais, Jorge e  
Jodi, por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Ao Ranulfo, pela dedicação, amizade e, acima de tudo, humildade demonstradas ao longo deste trabalho.

Aos técnicos, funcionários e professores do DEA que, sem exceção e às vezes sem saberem, colaboraram de alguma maneira para a execução deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários da Padaria e dos Laboratórios de Frutas, Tecnologia Geral, Bioquímica e Análise de Alimentos da FEA, pela ajuda durante a fase de experimentos.

Ao Colegiado do Departamento de Química da URG, por facilitar o meu afastamento.

À Telma, pelo companheirismo e apoio, com certeza, fundamentais nesta fase de mudanças.

Aos meus AMIGOS, dispensáveis de serem nomeados, que souberam segurar muitas barras durante estes 54 meses (ou parte deles). Acreditem, vocês foram e sempre serão indispensáveis. Do fundo do coração, obrigado!

Aos colegas de trabalho e/ou diversão, pela possibilidade de convivência e aprendizado.

A todos que colaboraram, em algum momento, para a realização deste trabalho.

Ao povo brasileiro, que pagou o meu salário, a minha bolsa e uma parte deste trabalho.

À DEUS.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	i
LISTA DE QUADROS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
NOMENCLATURA .....	xiv
RESUMO .....	xvii
SUMMARY .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
2.1. Fermentação em Estado Sólido .....	5
2.2. Biorreatores para SSF .....	10
2.2.1. Fermentador de bandejas .....	11
2.2.2. Fermentador de tambor .....	11
2.2.3. Fermentador de coluna .....	12
2.3. Amiloglicosidase .....	15
2.4. Microrganismo .....	18
2.5. Inóculo .....	21
2.6. Substrato .....	22
2.7. Planejamento Experimental .....	27
2.7.1. Planejamento Fatorial .....	27
2.7.2. Planejamento Fatorial Fracionário .....	27
2.7.3. Análise por Superfície de Resposta .....	28
2.7.4. Caminho de Ascendência Máxima .....	32
2.8. Condutividade Térmica .....	34

<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
3.1.Microrganismo.....	38
3.2.Contagem de esporos.....	38
3.3.Composição do meio.....	39
3.4.Fermentação semi-sólida.....	39
3.4.1.Fermentação semi-sólida em embalagem de polipropileno.....	40
3.4.2.Fermentação semi-sólida em fermentador de coluna.....	41
3.5.Teor de umidade.....	44
3.6.Extração da enzima.....	44
3.7.Determinação da atividade da amiloglicosidase.....	44
3.8.Determinação de açúcares redutores pelo método do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS).....	45
3.9.pH.....	45
3.10.Dosagem dos açúcares redutores (AR) ao longo das fermentações.....	46
3.11.Determinação da concentração celular nas fermentações em estado sólido .....	46
3.12.CO <sub>2</sub> produzido .....	49
3.13.Fermentação submersa.....	50
3.14.Determinação da concentração celular na fermentação submersa.....	53
3.15.Dosagem de açúcares redutores (ART).....	53
3.16.Medidas de temperatura.....	54
3.17.Condutividade térmica do meio semi-sólido.....	55
3.18.Caracterização cinética da amiloglicosidase.....	58
3.18.1.Influência da concentração de substrato na atividade do farelo fermentado.....	58
3.18.2.Influência do pH na atividade enzimática..	59

3.18.3. Influência da temperatura na atividade enzimática.....	59
3.18.4. Estabilidade térmica da enzima.....	60
3.18.5. Estabilidade da enzima com o pH.....	60
3.19. Planejamento experimental.....	60
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
4.1. Fermentação semi-sólida em embalagem de polipropileno.....	63
4.1.1. Planejamento Fatorial Fracionário.....	63
4.1.2. Primeiro Planejamento Composto Central.....	68
4.1.2.1. Modelos para Atividade Enzimática...72	
4.1.2.2. Modelos para Produtividade.....77	
4.1.3. Caminho de Ascendência Máxima.....	81
4.1.4. Segundo Planejamento Composto Central.....	86
4.1.4.1. Modelos para Atividade Enzimática...88	
4.1.4.2. Modelos para Produtividade.....93	
4.2. Fermentação semi-sólida em fermentador de coluna..	98
4.2.1. Efeito da aeração.....	100
4.2.1.1. Fermentação submersa.....	14
4.2.2. Influência da densidade aparente do meio...145	
4.2.3. Variações na temperatura do leito semi-sólido.....	154
4.3. Caracterização cinética da amiloglicosidase .....	165
4.3.1. Influência da concentração de substrato na atividade enzimática do farelo fermentado..	165
4.3.2. Influência do pH na atividade enzimática...168	
4.3.3. Influência da temperatura na atividade enzimática.....	170
4.3.4. Estabilidade térmica da enzima.....	172
4.3.5. Estabilidade da enzima com o pH.....	178
4.4. Condutividade térmica do meio.....	180

5. CONCLUSÕES .....	185
6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....	188
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	189

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Desenvolvimento da fermentação semi-sólida .....	7
<b>Tabela 2.2.</b> Concentração inicial de esporos usadas em SSF ...	23
<b>Tabela 3.1.</b> Resumo dos valores usados para as variáveis independentes durante o planejamento experimental .....	62
<b>Tabela 4.1.</b> Codificação das variáveis usadas no Planejamento Fatorial Fracionário .....	64
<b>Tabela 4.2.</b> Planejamento Fatorial Fracionário $2^{6-2}$ em valores reais .....	64
<b>Tabela 4.3.</b> Variáveis codificadas e valores para a atividade enzimática e produtividade durante o Planejamento Fatorial Fracionário $2^{6-2}$ .....	65
<b>Tabela 4.4.</b> Planejamento Fatorial Fracionário $2^{6-2}$ : efeitos principais e de interação entre as variáveis, e seus erros padrões .....	66
<b>Tabela 4.5.</b> Codificação das variáveis usadas no 1º Planejamento Composto Central .....	69
<b>Tabela 4.6.</b> Primeiro Planejamento Composto Central em valores reais .....	70
<b>Tabela 4.7.</b> Variáveis codificadas e valores para a atividade enzimática e produtividade durante o primeiro Planejamento Composto Central .....	71
<b>Tabela 4.8.</b> Pontos ao longo do Caminho de Ascendência Máxima em valores reais .....	82
<b>Tabela 4.9.</b> Variáveis codificadas e valores obtidos para a atividade enzimática ao longo do Caminho de Ascendência Máxima .....	84
<b>Tabela 4.10.</b> Codificação das variáveis usadas no 2º Planejamento Composto Central .....	87
<b>Tabela 4.11.</b> Planejamento Composto Central em valores reais ..	87
<b>Tabela 4.12.</b> Variáveis codificadas e valores obtidos para a atividade enzimática e produtividade durante o Segundo Planejamento Composto Central .....	88

**Tabela 4.13.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C1 .....101

**Tabela 4.14.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C2 .....102

**Tabela 4.15.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C3 .....103

**Tabela 4.16.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C4 .....104

**Tabela 4.17.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C5 .....105

**Tabela 4.18.**Valores para a concentração celular medida durante o experimento C6 .....106

**Tabela 4.19.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C7 .....107

**Tabela 4.20.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C8 .....108

**Tabela 4.21.**Valores para a concentração celular medida durante o experimento C9 .....109

**Tabela 4.22.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C10 .....110

**Tabela 4.23.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C11 .....111

**Tabela 4.24.**Valores para a concentração celular medida durante o experimento C12 .....112

**Tabela 4.25.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C13 .....113

<b>Tabela 4.26.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C14 .....	114
<b>Tabela 4.27.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C15 .....	115
<b>Tabela 4.28.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C16 .....	116
<b>Tabela 4.29.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C17 .....	117
<b>Tabela 4.30.</b> Valores para a concentração celular medida durante o experimento C18 .....	118
<b>Tabela 4.31.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C19 .....	119
<b>Tabela 4.32.</b> Valores para a concentração celular medida durante o experimento C20 .....	120
<b>Tabela 4.33.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C21 .....	121
<b>Tabela 4.34.</b> Valores para a concentração celular medida durante o experimento C22 .....	122
<b>Tabela 4.35.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C23 .....	123
<b>Tabela 4.36.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C24 .....	124
<b>Tabela 4.37.</b> Valores para a concentração celular medida durante o experimento C25 .....	125
<b>Tabela 4.38.</b> Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C26 .....	126
<b>Tabela 4.39.</b> Valores para a concentração celular medida durante o experimento C27 .....	127

**Tabela 4.40.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C28 .....128

**Tabela 4.41.**Valores para a variação de umidade ( $U_f-U_i$ ) e variação média de umidade do processo  $(U_f-U_i)/t_f$  observados durante as fermentações semi-sólidas em reatores de coluna .....137

**Tabela 4.42.**Valores para a concentração celular ( $X$ ), condutividade elétrica ( $\lambda$ ) da solução de NaOH, massa de  $CO_2$  liberado ( $M_{CO_2}$ ), velocidade de respiração ( $Q_{CO_2}.X$ ), pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) medidos durante a fermentação submersa .....141

**Tabela 4.43.**Valores para a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e velocidade específica de respiração ( $Q_{CO_2}$ ) calculados a partir dos dados experimentais e usados para determeinar  $Y_{X/CO_2}$  e  $m_{CO_2}$  .....144

**Tabela 4.44.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C29 .....147

**Tabela 4.45.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C30 .....148

**Tabela 4.46.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C31 .....149

**Tabela 4.47.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C32 .....150

**Tabela 4.48.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C33 .....151

**Tabela 4.49.**Valores da temperatura para as diversas alturas (h) do leito semi-sólido, do banho termostatizado e do ambiente, medidos durante o ensaio C34 .....156

**Tabela 4.50.**Valores da temperatura para as diversas alturas (h) do leito semi-sólido, do banho termostaticado e do ambiente, medidos durante o ensaio C35 .....156

**Tabela 4.51.**Valores da temperatura para as diversas alturas (h) do leito semi-sólido, do banho termostaticado e do ambiente, medidos durante o ensaio C36 .....157

**Tabela 4.52.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C37 .....162

**Tabela 4.53.**Valores para os gradientes axial ( $G_{ax}$ ) e radial ( $G_{rd}$ ) médios de temperatura dos experimentos C34, C35 e C36 .....164

**Tabela 4.54.**Valores para a velocidade inicial (V) da reação enzimática em função da concentração de substrato (amido) para os três ensaios realizados. ....165

**Tabela 4.55.**Valores para a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) obtidos em cada ensaio .....167

**Tabela 4.56.**Valores para a atividade enzimática relativa (A) em função do pH para os cinco ensaios realizados .....169

**Tabela 4.57.**Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_i$ ) em função da temperatura para os três ensaios realizados .....171

**Tabela 4.58.**Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 40°C.....172

**Tabela 4.59.**Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 50°C para os três ensaios realizados .....173

**Tabela 4.60.**Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 60°C para os três ensaios realizados .....173

**Tabela 4.61.**Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 70°C para os dois ensaios realizados .....173

**Tabela 4.62.**Valores para a constante de desativação térmica ( $K_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima; e do coeficiente de correlação ( $r$ ) da regressão exponencial ( $r$ ) para cada temperatura de pré-incubação .....177

**Tabela 4.63.**Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do pH de pré-incubação para os dois ensaios realizados .....178

**Tabela 4.64.**Valores medidos para a condutividade térmica ( $k$ ), densidade aparente ( $d_{ap}$ ), umidade do meio e tempo de fermentação ( $t_f$ ) .....180

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 4.1.</b> Análise de variância para o modelo de 1ª ordem obtido para a atividade enzimática .....	72
<b>Quadro 4.2.</b> Análise de variância para o modelo de 2ª ordem obtido para a atividade enzimática .....	73
<b>Quadro 4.3.</b> Análise de variância do modelo de 1ª ordem obtido para a produtividade .....	77
<b>Quadro 4.4.</b> Análise de variância do modelo de 2ª ordem obtido para a produtividade .....	78
<b>Quadro 4.5.</b> Análise de variância do modelo de 1ª ordem obtido para a atividade enzimática .....	89
<b>Quadro 4.6.</b> Análise de variância do modelo de 2ª ordem obtido para a atividade enzimática .....	90
<b>Quadro 4.7.</b> Análise de variância do modelo de 1ª ordem obtido para a produtividade .....	94
<b>Quadro 4.8.</b> Análise de variância do modelo de 2ª ordem obtido para a produtividade .....	94
<b>Quadro 4.9.</b> Condições de operação utilizadas durante as fermentações semi-sólidas em reatores de coluna ..	99
<b>Quadro 4.10.</b> Análise de variância do modelo obtido para a condutividade térmica.....	183

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Fluxograma de produção de enzimas extracelulares por SS .....	6
<b>Figura 2.2.</b> Enzimas amilolíticas .....	17
<b>Figura 2.3.</b> Fluxograma do processo de beneficiamento do arroz .....	24
<b>Figura 2.4.</b> Representação do caminho de ascendência máxima ao longo das linhas de contorno de um planejamento fictício. ....	33
<b>Figura 3.1.</b> Esquema utilizado para cada fermentador de coluna com leito fixo .....	42
<b>Figura 3.2.</b> Montagem experimental dos reatores de coluna em funcionamento .....	43
<b>Figura 3.3.</b> Esquema utilizado a fermentação submersa .....	52
<b>Figura 3.4.</b> Pontos de medições de temperatura do leito semi-sólido .....	54
<b>Figura 3.5.</b> Reator de coluna instrumentado para a medição da temperatura do leito .....	55
<b>Figura 3.6.</b> Esquema do equipamento utilizado para a determinação da condutividade térmica dos meios semi-sólidos .....	56
<b>Figura 3.7.</b> Equipamento utilizado para a determinação da condutividade térmica dos meios semi-sólidos .....	56
<b>Figura 3.8.</b> Corte esquemático da sonda utilizada para determinar a condutividade térmica dos meios semi-sólidos .....	58
<b>Figura 4.1.</b> Variação da atividade com $t_f$ e $t_e$ para $C=15\%$ e $X=1,5 \times 10^6$ esporos/gmeio .....	76
<b>Figura 4.2.</b> Variação da atividade com $C$ e $X$ para $t_f=132$ h e $t_e=37,5$ min .....	76
<b>Figura 4.3.</b> Variação da produtividade com $t_f$ e $t_e$ para $C=15\%$ e $X=1,5 \times 10^6$ esporos/gmeio .....	80
<b>Figura 4.4.</b> Variação da produtividade com $C$ e $X$ para $t_f=132$ h e $t_e=37,5$ min .....	80

**Figura 4.5.**Ensaio realizado durante o Caminho de Ascendência Máxima ( ● ); pontos centrais (P.C.) e configuração estrela ( ○ ) e linhas de contorno para atividade enzimática do primeiro planejamento composto central, em função de: **(a)**  $t_f$  e  $t_e$ ; **(b)**  $t_f$  e X; e **(c)**  $t_e$  e X ..... 83

**Figura 4.6.**Valores apresentados pela atividade enzimática (IU/g<sub>farelo</sub>) ao longo do Caminho De Ascendência Máxima, em função de  $t_f$  e  $t_e$  ..... 85

**Figura 4.7.**Variação da atividade com X e  $t_e$  para  $t_f= 160$  horas ..... 92

**Figura 4.8.**Variação da atividade com  $t_f$  e  $t_e$  para X =  $2,7 \times 10^6$  esporos/g<sub>meio</sub> ..... 92

**Figura 4.9.**Variação da atividade com  $t_f$  e X para  $t_e= 40$  minutos ..... 93

**Figura 4.10.**Variação da produtividade com X e  $t_e$  para  $t_f=90$  horas ..... 96

**Figura 4.11.**Variação da produtividade com  $t_f$  e  $t_e$  para X =  $6,6 \times 10^6$  esporos/g<sub>meio</sub> ..... 96

**Figura 4.12.**Variação da produtividade com  $t_f$  e X para  $t_e= 40$  minutos ..... 97

**Figura 4.13.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C1 ..... 101

**Figura 4.14.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento ..... 102

**Figura 4.15.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C3 ..... 103

**Figura 4.16.**Atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C4 ..... 104

**Figura 4.17.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C5 ..... 105

**Figura 4.18.**Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C6 .....106

**Figura 4.19.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C7 .....107

**Figura 4.20.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C8 .....108

**Figura 4.21.**Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C9 .....109

**Figura 4.22.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C10 .....110

**Figura 4.23.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C11 .....111

**Figura 4.24.**Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C12 .....112

**Figura 4.25.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C13 .....113

**Figura 4.26.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C14 .....114

**Figura 4.27.**Atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C15 .....115

**Figura 4.28.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C16 .....116

**Figura 4.29.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C17 .....117

**Figura 4.30.**Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C18 .....118

**Figura 4.31.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C19 .....119

<b>Figura 4.32.</b>	Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C20 .....	120
<b>Figura 4.33.</b>	Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C21 .....	121
<b>Figura 4.34.</b>	Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C22 .....	122
<b>Figura 4.35.</b>	Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C23 .....	123
<b>Figura 4.36.</b>	Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C24 .....	124
<b>Figura 4.37.</b>	Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C25 .....	125
<b>Figura 4.38.</b>	Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C26 .....	126
<b>Figura 4.39.</b>	Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C27 .....	127
<b>Figura 4.40.</b>	Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C28 .....	128
<b>Figura 4.41.</b>	Atividade enzimática medida no tempo de 96 horas de fermentação em função da vazão de ar por massa de meio (VMM) .....	133
<b>Figura 4.42.</b>	Produtividade obtida no tempo de 60 horas de fermentação em função da vazão de ar por massa de meio (VMM). .....	135
<b>Figura 4.43.</b>	Concentração celular máxima em função da vazão de ar por massa de meio (VMM). .....	139
<b>Figura 4.44.</b>	Concentração celular (X), massa de CO <sub>2</sub> liberado (M <sub>CO2</sub> ), velocidade de respiração (Q <sub>CO2</sub> .X), pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), em função do tempo, para a fermentação submersa .....	142
<b>Figura 4.45.</b>	Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) em função do tempo de fermentação durante a fermentação submersa .....	143

**Figura 4.46.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C29 .....147

**Figura 4.47.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C30 .....148

**Figura 4.48.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C31 .....149

**Figura 4.49.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C32 .....150

**Figura 4.50.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C33 .....151

**Figura 4.51.**Efeito da densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ) sobre a atividade enzimática, ao longo do processo fermentativo .....153

**Figura 4.52.**Variação da produtividade máxima em função da densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ) .....154

**Figura 4.53.**Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido, em função do tempo de fermentação, para o ensaio C34. ....158

**Figura 4.54.**Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido e do ambiente, em função do tempo de fermentação, para o ensaio C35. ....160

**Figura 4.55.**Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido e do ambiente, em função do tempo de fermentação, para o ensaio C36. ....161

**Figura 4.56.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C37 .....164

**Figura 4.57.**Velocidade inicial da reação enzimática (V) em função da concentração de substrato para os três ensaios realizados .....166

**Figura 4.58.**Atividade enzimática relativa em função do pH para os cinco ensaios realizados .....169

**Figura 4.59.**Atividade enzimática relativa em função da temperatura para os três ensaios realizados ....171

**Figura 4.60.**Atividade enzimática relativa média em função do tempo de pré-incubação nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C.....174

**Figura 4.61.**Atividade enzimática relativa média em função do tempo de pré-incubação nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C, em escala semi-logarítmica...176

**Figura 4.62.**Atividade enzimática relativa média em função do pH de pré-incubação .....179

**Figura 4.63.**Variação da condutividade térmica (k) com a densidade aparente ( $d_{ap}$ ) e a umidade (U) do meio.....183

## NOMENCLATURA

- A = atividade enzimática do farelo seco (IU/g<sub>farelo</sub>);
- A<sub>0</sub> = atividade enzimática do farelo seco no instante inicial (IU/g<sub>farelo</sub>);
- A<sub>max</sub> = atividade máxima do ensaio (IU/g<sub>farelo</sub>);
- A<sub>r</sub> = atividade relativa (%);
- AR = açúcares redutores (g<sub>glicose</sub>/l ou mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>);
- ART = açúcares redutores totais (g<sub>glicose</sub>/l);
- a<sub>1</sub> = m<sub>CO<sub>2</sub></sub> · Y<sub>X/CO<sub>2</sub></sub> · T<sub>1</sub>;
- a<sub>k</sub> = m<sub>CO<sub>2</sub></sub> · Y<sub>X/CO<sub>2</sub></sub> · T<sub>k</sub>;
- a<sub>k-1</sub> = m<sub>CO<sub>2</sub></sub> · Y<sub>X/CO<sub>2</sub></sub> · T<sub>k-1</sub>;
- a<sub>w</sub> = atividade de água;
- b<sub>i</sub> = coeficientes dos termos de 1º grau a serem estimados para as variáveis independentes na forma codificada;
- b<sub>ii</sub> = coeficientes dos termos de 2º grau a serem estimados para as variáveis independentes na forma codificada;
- C = concentração de casca (%);
- d<sub>ap</sub> = densidade aparente do meio (g/l);
- E<sub>d</sub> = energia de desativação térmica (Kcal/gmol);
- f = fator de diluição da amostra;
- G<sub>ax</sub> = gradientes axial de temperatura (°C/mm);
- G<sub>rd</sub> = gradientes radial de temperatura (°C/mm);
- h = altura do leito (mm);
- I = função geradora do fatorial fracionário;
- I = intensidade de corrente na sonda (A);
- IU = "International Unit";
- K = fator de frequência ou de proporcionalidade;
- k = condutividade térmica (W/m/K ou cal/cm/s/K);
- k = número de variáveis de um planejamento experimental;
- k = número de intervalos de integração;
- K<sub>d</sub> = constante de desnaturação (ou desativação) térmica da enzima (h<sup>-1</sup>);
- K<sub>M</sub> = Constante de Michaelis-Menten (g/l);
- M = massa de meio (g);
- M<sub>CO<sub>2</sub></sub> = massa de gás carbônico liberada durante a fermentação (g<sub>CO<sub>2</sub></sub>);

- $m_{CO_2}$  = coeficiente de manutenção para  $CO_2$  ou velocidade específica de produção de  $CO_2$  para manutenção ( $g_{CO_2}/h/g_{cel}$ );  
 $N$  = normalidade da solução de NaOH no tempo de amostragem;  
 $N$  = número total de esporos contados;  
 $N$  = número de ensaios de um planejamento - 1;  
 $N_i$  = normalidade inicial da solução de NaOH;  
 $P$  = produtividade do processo fermentativo ( $IU/g_{farelo}/h$ );  
 $p$  = número de parâmetros do modelo completo;  
 P.C. = ponto central do planejamento composto central;  
 $Q$  = fluxo de calor (W);  
 $Q_{CO_2}$  = velocidade específica de formação de  $CO_2$  ( $g_{CO_2}/h/g_{cel}$ );  
 $R$  = constante dos gases ideais (1,98 cal/gmol.K);  
 $R$  = resistência da sonda ( $\Omega$ );  
 $R$  = raio do reator (mm);  
 $r$  = diferença entre  $p$  e o número de termos do modelo reduzido;  
 $r_{CO_2}$  = velocidade de liberação de  $CO_2$  ( $g_{CO_2}/g_{meio}/h$ );  
 $S$  = concentração de substrato (g/l);  
 SmF = fermentação em submerso;  
 SSE = soma dos quadrados dos desvios do modelo;  
 SSF = fermentação em estado sólido;  
 $T$  = temperatura de fermentação ( $^{\circ}C$ ) ou de pré-incubação da enzima (K);  
 $T_1$  = primeiro intervalo de integração (h);  
 $T_k$  = k-ésimo intervalo de integração (h);  
 $T_{210}$  = temperatura do meio para a altura de 210mm ( $^{\circ}C$ );  
 $T_0$  = temperatura na base do leito ( $^{\circ}C$ );  
 $T_p$  = temperatura do meio para a altura de 140mm e posição radial  $R$  ( $^{\circ}C$ );  
 $T_c$  = temperatura do meio para a altura de 140mm e posição radial zero ( $^{\circ}C$ );  
 $t$  = tempo de medida da atividade (h);  
 $t_e$  = tempo de esterilização (minutos);  
 $t_f$  = tempo de fermentação (h);  
 $U$  = umidade do meio (%);  
 $U_i$  = umidade inicial do meio (%);  
 $U_f$  = umidade final do meio (%);

- $V$  = velocidade da reação enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{farelo}}$ );  
 $V_{\text{NaOH}}$  = volume de hidróxido de sódio usado para coletar o  $\text{CO}_2$  liberado na fermentação (l);  
 $V_{\text{max}}$  = velocidade máxima da reação enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{farelo}}$ );  
 $V_u$  = volume do reator ocupado pela massa de meio (l);  
 $X$  = concentração de inóculo ou concentração celular (esporos/ $\text{g}_{\text{meio}}$ ;  $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$  ou  $\text{g}_{\text{cel}}/\text{l}$ );  
 $X_i$  = valor codificado da variável  $Z_i$ ;  
 $X_1$  = variável codificada para  $t_f$ ;  
 $X_2$  = variável codificada para  $C$ ;  
 $X_3$  = variável codificada para  $X$ ;  
 $X_4$  = variável codificada para  $t_e$ ;  
 $x$  = massa celular no reator ( $\text{g}_{\text{cel}}$ );  
 $x_k$  = massa celular para o  $k$ -ésimo intervalo de integração ( $\text{g}_{\text{cel}}$ );  
 $x_{t_f}$  = massa celular no instante  $t_f$  ( $\text{g}_{\text{cel}}$ );  
 $x_0$  = massa celular em  $t_f=0$  ( $\text{g}_{\text{cel}}$ );  
 $x_1$  = massa celular para o primeiro intervalo de integração ( $\text{g}_{\text{cel}}$ );  
 $Y_{x/\text{co}_2}$  = fator de conversão para  $X\text{-CO}_2$  ( $\text{g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{co}_2}$ );  
 $Y_1$  = variável codificada para  $t_f$ ;  
 $Y_2$  = variável codificada para  $X$ ;  
 $Y_3$  = variável codificada para  $t_e$ ;  
 $\bar{Z}$  = valor da variável no ponto central;  
 $Z_i$  = valor real da variável independente;  
 $\alpha$  = nível de confiança;  
 $\beta_i$  = coeficientes a ser estimados para as variáveis independentes em valores reais;  
 $\Delta_i$  = troca incremental =  $X_i * (\Delta Z_i / 2)$ ;  
 $\Delta Z_i$  = intervalo de variação de  $Z_i$ ;  
 $\lambda$  = condutividade elétrica da solução de NaOH no tempo de amostragem (mS);  
 $\mu$  = velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ );  
 $v$  = multiplicador de Lagrange.

## RESUMO

Estudou-se a Fermentação Semi-Sólida (SSF) do farelo de arroz para a produção de amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3) por *Aspergillus niger* NRRL 3122. O trabalho foi dividido em 4 fases: otimização dos parâmetros físico-químicos; SSF em reatores de coluna; caracterização cinética da enzima; determinação da condutividade térmica do farelo fermentado.

Na primeira etapa utilizou-se a estratégia de Planejamento Experimental para a otimização e modelagem das 6 variáveis escolhidas: temperatura e tempo de fermentação, umidade do meio, concentração de inerte no meio, concentração de esporos e tempo de esterilização. Os experimentos foram desenvolvidos em embalagens flexíveis de polipropileno, e a metodologia consistiu em realizar um Planejamento Fatorial Fracionário, um Caminho de Ascendência Máxima e dois Planejamentos Compostos Centrais. Os tempos de fermentação e esterilização foram as variáveis mais importantes, e os modelos matemáticos obtidos apresentam um nível de confiança acima de 95%. Os melhores valores encontrados para a atividade enzimática do farelo fúngico não purificado estão acima de 800 IU/g<sub>farelo</sub>.

Para os fermentadores de coluna com leito fixo determinou-se o efeito da aeração sobre a produção da enzima, utilizando-se vazões de 0 a 150 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>. Os valores máximos para a atividade do farelo foram de 1700 IU/g<sub>farelo</sub>, sendo o valor de 60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub> adotado como suficiente para uma boa oxigenação do meio e ótimo para a produção da enzima. Variações na densidade aparente do meio entre 586 e 858 g/l não mostraram influência sobre a atividade enzimática e a produtividade. Os perfis e gradientes de temperatura levantados para estes reatores mostraram o mecanismo de condução radial como o maior responsável pela remoção do calor metabólico gerado. A condutividade térmica do meio semi-sólido fermentado foi descrita pelo seguinte modelo:  $k = 47,5080 + 0,0115 \cdot d_{ap} + 0,1295 \cdot U - 6,0737 \cdot \ln(d_{ap}) - 5,5555 \cdot \ln(U)$

Os ensaios cinéticos indicaram o valor  $2,30 \pm 0,39$  g/l para a Constante de Michaelis-Menten e máxima atividade enzimática a 55°C e pH 4,6. Nos testes de estabilidade o pH 4,4 se mostrou o mais indicado. O valor calculado para a energia de desativação enzimática foi de 31,98 Kcal/gmol, e a expressão encontrada para a constante de desativação térmica, a seguinte:  $K_d (h^{-1}) = 8,0478 \times 10^{20} \cdot e^{-16153/T}$ .

## SUMMARY

This is an experimental study of solid-state fermentation (SSF) of rice bran to produce amyloglucosidase (E.C. 3.2.1.3.) by *Aspergillus niger* NRRL 3122. The research was conducted in 4 phases: optimization of physico-chemical parameters; SSF in fixed-bed column reactors; characterization of enzyme kinetics; determination of thermal conductivity.

An experimental design strategy was employed for optimization and modelling of 6 variables: fermentation time, fermentation temperature, moisture, inert concentration, spore concentration and sterilization time. Experiments were conducted in flexible packs of polypropylene. The methodology involved the development of a Fractional Factorial Design, a Steepest Ascent Path and two Central Composite Designs. The most significant parameters were found to be the fermentation and sterilization times. The mathematical models presented a significance level of over 95%. The greatest values for the enzyme activity of non-purified mouldy bran were above 800 IU/g<sub>bran</sub>.

The influence of aeration on enzyme production was determined for the packed-bed column fermenter, using flow rates of 0 to 150 ml<sub>air</sub>/h/g<sub>medium</sub>. Highest values of enzyme activity were 1700IU/g<sub>bran</sub> and 60 ml<sub>air</sub>/h/g<sub>medium</sub>. Fixed beds packed with 586 and 858 g/l did not influence on enzymatic activity or productivity. Temperature measurements within the bed showed a radial conduction mechanism as mainly responsible for dissipation of the metabolic heat generated. The thermal conductivity of the mouldy bran was represented by the model:  $k = 47,5080 + 0,0115*d_{ap} + 0,1295*U - 6,0737*\ln(d_{ap}) - 5,5555*\ln(U)$ .

Kinetics experiments revealed a Michaelis-Menten constant of  $2,30 \pm 0,39$  g/l, and maximum enzyme activity at 55 °C and pH 4,6. Better stability was attained with pH 4,4. The deactivation energy was calculated to be 31,98 Kcal/gmol, and an equation was established for the thermal deactivation constant :  $K_d(h^{-1}) = 8,0478 \times 10^{20} e^{-16153/T}$ .

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas amilolíticas teve início no começo deste século, em decorrência do interesse industrial da produção de glicose a partir de materiais amiláceos. Coube a Takamine o mérito de ter desenvolvido, no início deste século, o primeiro método de produção microbiológica de enzima em grande escala - a  $\alpha$ -amilase fúngica "Takadiastase". Desde então, as técnicas e os processos utilizados para este fim foram aprimorados. Também, foram isolados ou desenvolvidos microrganismos capazes de produzir enzimas em altas concentrações.

Atualmente, o mercado mundial de enzimas industriais tem o valor comercial estimado em torno de US\$ 1,5 bilhão ao ano, enquanto que o brasileiro, de acordo com a Carteira de Comércio Exterior do Banco do Brasil, gira ao redor de US\$ 35 milhões, ou seja, algo em torno de 2% do total (BON,1995). À amiloglicosidase, uma das mais produzidas e comercializadas, corresponde a fatia de, aproximadamente, 10% do mercado mundial.

A produção comercial de uma enzima envolve as etapas de produção, separação, recuperação e purificação da enzima. De acordo com RODRIGUES (1993), os equipamentos para os processos de separação e purificação podem representar até 90% do custo final de um produto obtido por fermentação. A possibilidade da obtenção de um produto enzimático, com alta concentração de amiloglicosidase, e que dispense estas etapas (ou parte delas), pode vir a ser uma técnica economicamente vantajosa, podendo ser utilizada pela agroindústria, que, diferentemente do campo farmacêutico, nem sempre necessita de produtos altamente puros.

A fermentação semi-sólida (SSF) usando substratos facilmente disponíveis e de baixo custo vem sendo empregada, predominantemente, em países orientais, na obtenção de produtos de importância comercial. Estudos comparativos dos processos submerso e semi-sólido mostram vantagens e limitações de ambos

os lados. No entanto, conforme GUTIERREZ-ROJAS & TORRES (1992), para os países subdesenvolvidos, ou em fase de desenvolvimento, onde a crise atual e a globalização da economia mundial não permitem acompanhar, nem de longe, a crescente revolução biotecnológica, os processos SSF apresentam uma oportunidade ímpar a ser considerada. Os conhecimentos atuais dos processos fermentativos indicam que a decisão histórica tomada por alguns países de ignorar o sistema SSF não foi apropriada, pois o desenvolvimento, concomitante, dos dois métodos os teria colocado em um estágio bem mais elevado que o atual.

Neste ponto cabe ressaltar a importância da cultura do arroz na agroindústria brasileira. O beneficiamento deste cereal gera de 7 a 12% de farelo e de 17 a 22% de casca, dependendo do tipo de processo, tipo de arroz e tipo de cultivo. Parte da casca é usada como combustível pelos próprios engenhos e o restante, aproveitado para rações, acondicionamento de solo e adubo. O farelo é utilizado para extração de óleo comestível e como forragem para alimentação de suínos e gado leiteiro.

Os processos fermentativos envolvem uma série de variáveis. De acordo com SAUCEDO-CASTANEDA (1992b), mesmo em laboratório, o sistema SSF é afetado por diversos fatores, que incluem: (a) pré-tratamento do sólido; (b) composição do meio; (c) pH inicial do meio; (d) condições de autoclavagem; (e) forma, idade e quantidade do inóculo; (f) agitação; (g) aeração; (h) temperatura; (i) umidade do meio; (j) umidade no fermentador. A interação das variáveis tem merecido atenção especial em estudos de processos submersos; estes, porém, são ainda escassos para os semi-sólidos.

BOX et alii (1978) afirmam que a decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis permite a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta. O método também permite a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas.

O calor gerado em fermentações sólidas para a produção de enzimas, biomassa e ácidos é da ordem de 3200 kcal/h/kg<sub>matéria seca</sub> (GHILDYAL et alii, 1993). Fica claro que tal calor leva a uma rápida elevação da temperatura do sólido fermentado. Logo, torna-se fundamental sua remoção. SAUCEDO-CASTANEDA et alii (1990) citam a importância de conhecer a contribuição da condução e da convecção para este mecanismo global de transferência de calor. Com relação à remoção do calor gerado em fermentadores de coluna, GHILDYAL et alii (1994) lembram que embora os leitos fixos usados em SSF não sejam novidades, estudos experimentais que quantifiquem os gradientes de temperatura do substrato sólido utilizado e sua interação na produção da enzima são escassos.

De acordo com LOSANO et alii (1979), a condutividade térmica de materiais biológicos é uma das principais propriedades de transporte necessárias à modelagem de processos nos quais massa e energia são trocadas. Seguindo a mesma linha, HALLIDAY et alii (1995) afirmam ser a falta de valores para as propriedades termofísicas o passo limitante no uso de modelagem matemática de processos. GOWTHAMAN et alii (1993) citam como variáveis diretamente envolvidas na transferência de calor e massa a natureza do substrato e do microrganismo, a condutividade térmica, a difusividade, a porosidade e o conteúdo de umidade, afirmando serem tais informações escassas.

Assim, para um possível aumento de escala das fermentações semi-sólidas, é fundamental estimar o impacto que a condução poderá ter no sistema de controle de temperatura do reator. No entanto, nenhum artigo que apresentasse dados relativos à condutividade térmica destes meios foi encontrado durante a elaboração da pesquisa bibliográfica, embora diversos autores (SARGANTANIS et alii, 1993; GHILDYAL et alii, 1994; SAUCEDO-CASTANEDA et alii, 1992b; LONSANE et alii, 1992) citem a baixa condutividade dos substratos usados nos processos SSF como a maior limitação deste tipo de fermentação.

Considerando-se o anteriormente exposto, ao que se adicionou a importância industrial das enzimas amilolíticas, o

crescente interesse mundial pela fermentação em estado sólido contrastando com a pequena produção científica nesta área em nosso país, e a possibilidade da utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais abundantes, optou-se pelo desenvolvimento do presente trabalho, cujos principais objetivos foram:

- avaliar, modelar e otimizar o efeito exercido sobre a atividade enzimática e a produtividade por 6 variáveis do processo semi-sólido de obtenção de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*: temperatura de fermentação, tempo de fermentação, umidade do meio, quantidade de casca de arroz adicionada ao meio, concentração inicial de esporos e tempo de esterilização, usando farelo desengordurado de arroz como substrato;
- determinar a influência da aeração e da densidade aparente do meio sobre a produção da enzima em fermentador do tipo coluna com leito fixo;
- obter os perfis e gradiente de temperatura do meio semi-sólido durante o processo fermentativo em coluna com leito fixo;
- determinar a condutividade térmica do meio fermentado e correlacioná-la com o tempo de fermentação, a umidade e a densidade aparente do meio;
- determinar as características cinéticas da enzima não purificada, de maneira a possibilitar sua utilização em bruto.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fermentação em Estado Sólido

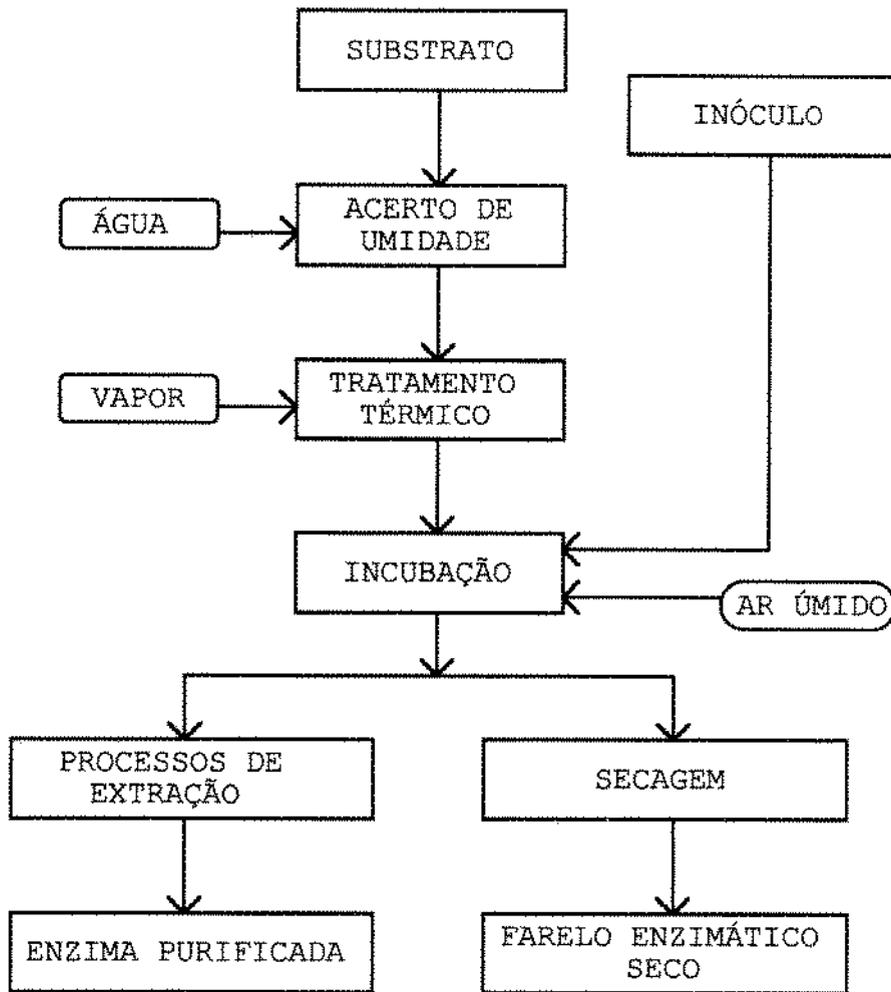
Para a produção de enzimas microbianas são utilizados, basicamente, dois tipos de processos, classificados conforme a quantidade de água do meio (SARGANTIS *et alii*, 1993; BEROVIC & DERENCIN, 1993; GUTIERREZ-ROJAS & TORRES, 1992; DEL BIANCHI, 1990; MAIORANO, 1990):

a. Fermentação em Submerso (SmF);

b. Fermentação em Estado Sólido (SSF), também denominada Fermentação Semi-Sólida, ou ainda, Fermentação em Substrato Sólido.

O processo SSF é, geralmente, definido como o crescimento de microrganismo em materiais sólidos umedecidos na ausência ou perto da ausência de água livre (PANDEY, 1992b; LONSANE *et alii*, 1992; CANNEL & MOO-YOUNG, 1980b). Entende-se por ausência de água livre a não separação ou escorrimento ("dripping") de água da matriz sólida, que deve conter umidade suficiente, na forma absorvida ou complexada, para permitir o crescimento do microrganismo. Para a maioria dos substratos, a água torna-se aparente antes do nível de 80% de umidade, sendo que, abaixo dos 12% de umidade, praticamente, toda a atividade biológica cessa.

Segundo GUTIERREZ-ROJAS & TORRES (1992), os processos SSF, cujo esquema genérico de produção de enzimas é mostrado na Figura 2.1, não devem ser confundidos com o cultivo superficial em Placas de Petri (ou material semelhante). Neste último, a distribuição dos nutrientes e de água no meio é homogênea, enquanto que a distribuição heterogênea dos componentes é uma marca dos sistemas SSF. Esta diferença é marcante quando se comparam os padrões de difusão dos nutrientes, água e oxigênio.



**Figura 2.1.** Fluxograma de produção de enzimas extracelulares porSSF (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES,1992)

A fermentação em estado sólido é tida como o mais antigo processo fermentativo usado pelo homem. O uso do molho fermentado de soja "koji" remonta a mais de 1000 anos no Japão, e, provavelmente, a 3000 a.C. na China (PANDEY,1992b; HESSELTINE,1977a). O processo SSF chegou ao Ocidente em 1914 quando Takamine fez crescer *Aspergillus oryzae* em farelo umedecido. O produto foi usado na tentativa de substituir o malte nas destilarias (CANNEL & MOO-YOUNG,1980). Com o advento da indústria da penicilina, o sistema SSF foi negligenciado e, a partir de 1940, com a Segunda Guerra Mundial, esforços foram direcionados para o desenvolvimento do processo submerso. O Oriente não fez a mesma opção, e esforços foram concentrados no

sentido de desenvolver o processo SSF, inclusive com a criação de plantas automatizadas, a fim de se obterem vantagens econômicas significativas sobre o sistema SmF (LONSANE et alii, 1992). A história e os avanços do processo SSF têm sido abordados por diversos outros autores. A Tabela 2.1 resume o desenvolvimento histórico desta fermentação.

**Tabela 2.1.**Desenvolvimento da fermentação semi-sólida

Período	Desenvolvimento
2600 a.C.	produção de pão pelos egípcios produção de queijo por <i>P. roqueforti</i>
2500 a.C.	fermentação de peixe produção de "koji"
Século VII	produção de "koji" no Japão
Século XVIII	produção de vinagre de polpas produção de ácido gálico
1860-1900	tratamento de efluentes
1900-1920	enzimas fúngicas
1920-1940	enzimas fúngicas, ác. glucônico e cítrico
1940-1950	produção de penicilina por SSF e SmF
1950-1960	produção de esteróis por fungos
1960-1980	micotoxinas e alimentos enriquecidos
1980-	vários outros produtos, enzimas, álcool

Fonte: PANDEY, 1992b

Diversos artigos têm discutido as vantagens e desvantagens do SSF quando comparado com o processo SmF; porém, uma generalização das conclusões é bastante difícil (MAIORANO, 1990). As vantagens do SSF citadas com maior frequência, e que

tentam justificar o interesse crescente pelo SSF, são apresentadas a seguir (LONSANE *et alii*,1992; PANDEY,1991; GUTIERREZ-ROJAS & TORRES,1992; CANNEL & MOO-YOUNG,1980a):

- a.menor espaço ocupado pela planta e fermentadores para uma mesma produção;
- b.pequena quantidade de efluentes para tratamento;
- c.obtenção de produtos concentrados, ou seja, menor quantidade de solvente para extração;
- d.possibilidade da exclusão das etapas de concentração e/ou extração;
- e.redução dos problemas de contaminação;
- f.substratos simples e de baixo custo;
- g.a esterilização do meio é muitas vezes desnecessária;
- h.ausência de espuma;
- i.eliminação da necessidade de solubilização do substrato;
- j.eliminação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação.

Por sua vez, as desvantagens mais significativas enumeradas na literatura para o processo SSF são (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES,1992; CANNEL & MOO-YOUNG,1980):

- a.os microrganismos utilizados são limitados àqueles que crescem em baixos níveis de umidade;
- b.dificuldades para remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo;
- c.dificuldade na medida e controle dos níveis de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados;
- d.escassez de dados de engenharia e de projeto para fermentadores;

e.necessidade de grandes quantidades de inóculo;

f.necessidade de pré-tratamento do substrato.

SHAH *et alii* (1991) fizeram um estudo comparativo da produção de alfa-amilase de *Aspergillus oryzae* SCM por fermentação submersa e semi-sólida. Chegaram à conclusão de que esta última é a mais econômica. Na obtenção da enzima em grau farmacêutico, a maior perda registrada foi durante a etapa de precipitação, com valores de 35 a 45% de perda para o processo submerso e 20 a 30% de perda para o processo de fermentação de superfície. Os custos de produção alcançados foram de US\$ 65,20 por milhão de Unidades Internacionais para a enzima obtida em submerso contra US\$ 0,14 da semi-sólida.

RAMESH & LONSANE (1991), estudando a regulação da produção de alfa-amilase pelo produto formado, observaram que em fermentações submersas ocorria uma redução de 16 vezes na atividade enzimática, quando a concentração de amido era aumentada de 0,2 para 1,0%; ao contrário da fermentação em estado sólido, onde mesmo um aumento de 42 vezes na concentração de amido provocava um acréscimo de 29 na produção da enzima. Esta habilidade da SSF em minimizar, significativamente, a repressão catabólica pelo produto também pode indicar uma vantagem econômica prática para o uso do processo.

Trabalhando com a produção e purificação de protease fúngica, pelos processos SSF e SmF, RAMAMURTHY & KOTHARI (1993) concluíram que mesmo com o processo de superfície apresentando baixo investimento inicial e meio de cultivo de menor valor, os custos de fabricação pelo processo submerso chegaram quase à metade dos anteriores, dando a idéia de que a tecnologia semi-sólida seria benéfica somente nos casos de indisponibilidade do capital necessário para a maior infra-estrutura requerida pela tecnologia de cultivo em submerso.

HERNANDEZ *et alii* (1992) compararam a produção de alcalóides por *Claviceps fusiformis* pelo método

tradicionalmente usado de fermentação em submerso com a fermentação semi-sólida, tendo como resultado do processo SSF um aumento na produção de 3,9 vezes.

## **2.2.Biorreatores para SSF**

Embora existam numerosas propostas para fermentadores industriais em submerso, tem sido obtido, na mesma área, pequeno desenvolvimento para o sistema SSF. No presente estágio do conhecimento, a literatura não indica um tipo ideal de biorreator para este processo.

Para o estudo dos processos SSF, LONSANE *et alii* (1992) indicam quatro possíveis níveis (ou estágios):

- a.nível de frasco: com capacidade de trabalho de 50 a 1000 g, facilita a seleção de cultura e a otimização das variáveis e do processo;
- b.nível de fermentador de laboratório: trabalhando com 5 a 20 Kg de substrato, é usualmente utilizado para desenvolvimento de inóculo, seleção de estratégias de controle e instrumentação e estratégias dos Processos de Separação de Produtos ("Downstream Processing");
- c.nível de fermentador piloto: usado para a confirmação de dados obtidos nas fases de menor escala e na determinação da viabilidade do processo. Utiliza de 50 a 5000 Kg de substrato;
- d.nível de fermentador de produção: ordem de grandeza de 25 a 1000 toneladas.

PANDEY (1991) apresenta os principais tipos de biorreatores usados em SSF, citando uma série de estudos realizados em nível laboratorial em frascos erlenmeyer, béqueres e Garrafas de Roux. O autor enfatiza os fermentadores usados em escala maior (de bandejas e de tambor) e o

fermentador do tipo coluna; este, com emprego crescente, tanto em nível de laboratório, como em uma escala intermediária.

**2.2.1. Fermentador de bandejas:** Usado, provavelmente, há mais de 3000 anos. É o equipamento mais simples utilizado nos processos SSF. A matéria-prima é umedecida, esterilizada, resfriada, inoculada e distribuída em bandejas. Estas são arranjadas umas sobre as outras, de maneira que fique um espaço apropriado entre elas para aeração. A fermentação ocorre em uma estufa, que é aquecida até o processo entrar na fase exotérmica, a partir do que o ar insuflado trata de manter a temperatura e a umidade nos níveis desejados. O processo requer grande área operacional, e sua operação quase impede uma automação (MOO-YOUNG & CANNEL,1980; PANDEY,1991).

**2.2.2. Fermentador de tambor ("drum fermenter"):** Consiste de um reator horizontal, de forma cilíndrica, com dispositivo de rotação e com entrada e saída de ar. Neste equipamento, o crescimento do microrganismo é considerado melhor e mais uniforme que nos fermentadores de bandeja (PANDEY,1991). Trabalhos recentes a respeito deste tipo de biorreator são escassos, principalmente, em função do crescente avanço nos estudos com fermentadores de coluna.

BEROVIC & LOGAR-DERENCIN (1993) cresceram *Aspergillus niger* P26 em um fermentador horizontal, do tipo tambor, para a produção de pectinase tendo como substrato, pectina de maçã. A esterilização do substrato foi realizada no próprio fermentador; porém, houve problemas de peletização e aglomeração das partículas.

SARGANTANIS *et alii* (1993) usaram um fermentador de tambor rotativo de acrílico para estudar o efeito das condições de operação em SSF. Os dados obtidos do consumo de substrato (farelo de milho) e do crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 foram comparados com resultados de

simulações. Trabalhando com variações na vazão de ar, na temperatura e na umidade relativa do ar na entrada do fermentador e no coeficiente global de transferência de calor, observaram a grande eficiência do resfriamento evaporativo ("evaporative cooling") no controle da temperatura e do conteúdo de umidade do meio.

**2.2.3. Fermentador de coluna:** Consiste de um tubo plástico ou de vidro, colocado na vertical, com um leito fixo de substrato, com tampa de ambos os lados, podendo ter um encamisamento externo para controle de temperatura através da circulação de água. Alternativamente, o controle de temperatura pode ser feito pela manutenção do conjunto todo em uma atmosfera controlada. De acordo com SAUCEDO-CASTANEDA *et alii* (1992b), entre os vários tipos de fermentadores disponíveis para SSF, este é o que mais se adapta ao aumento de escala ("scale-up") e ao controle de processos.

Foi desenvolvido por RAIMBAULT & ALAZARD (1980) o trabalho considerado como o primeiro grande impulso nesta linha de pesquisa. Tais autores descreveram o crescimento de *Aspergillus niger* em farinha de mandioca. O fermentador utilizado possuía 210 mm de altura e 22 mm de diâmetro, com capacidade para 20 g de material sólido, e era aerado com 4-6 l/h de ar saturado. A velocidade de crescimento e a produção de células obtidas foram similares àsquelas descritas, na literatura, para o cultivo em submerso sob condições ótimas.

AURIA *et alii* (1993) propõem o uso da perda de carga ( $\Delta P/L$ ) ao longo do leito fixo como alternativa para medidas "on-line" qualitativas, e sobre certas condições quantitativas, da produção de biomassa (*Aspergillus niger*) em fermentadores de coluna. O fermentador utilizado tinha 20 mm de diâmetro interno e 65 mm de altura do leito, tendo como substratos distintos farelo de trigo, bagaço de cana e uma resina sintética (Amberlite IRA-900), que foi embebida em meio nutritivo composto basicamente de sacarose.

ANTIER *et alii* (1993) utilizaram um biorreator com leito de 150 mm de altura e diâmetro interno de 20 mm, carregado com 20 g de polpa de café com 60% de umidade. O controle de temperatura foi realizado pela manutenção do fermentador em um banho termostaticado. A finalidade dos autores foi a de produzir pectinase usando *Aspergillus niger* CH4 e mutantes destes fungos. Apresentaram ao final do trabalho um protocolo de isolamento seletivo de cepas de fungos mutantes que melhor se adaptam às técnicas de SSF.

AURIA *et alii* (1992), usando um leito homogêneo e inerte (Amberlite IRA-900), conseguiram medir as variações nos coeficientes de difusão efetiva para gás carbônico e oxigênio durante uma fermentação semi-sólida em reator de coluna. O crescimento de *Aspergillus niger* foi realizado em um reator com 74 mm de altura de leito e 20 mm de diâmetro, onde foi possível empacotar 5 g de suporte seco, sendo a aeração realizada pela parte superior do fermentador a uma taxa de 10 l/h. Foi verificada uma redução nos coeficientes e na porosidade do suporte com o aumento da biomassa. Entretanto, nenhuma relação foi apresentada, devido, segundo os autores, à complexidade do crescimento de fungos filamentosos.

SAUCEDO-CASTANEDA *et alii* (1992a) verificaram que o gradiente de biomassa formado a diferentes alturas do leito de um biorreator de coluna poderia ser eliminado através do controle da taxa de aeração do sistema. A estratégia de controle utilizada foi manter a concentração de gás carbônico na saída da coluna em torno de 2%. Os resultados para o crescimento de *Schwanniomyces castellii* CBS2863, em um fermentador com leito de 900 mm de altura, mostraram a grande eficiência do controle proposto.

SAUCEDO-CASTANEDA *et alii* (1992b) desenvolveram, segundo eles próprios, o primeiro "protocolo realmente científico" para "scale-up" de fermentadores de coluna usados em processos SSF. O critério adotado foi a manutenção dos balanços de calor e água do meio constantes. Os reatores utilizados possuíam capacidades de 10, 60, 370 e 4100 g de meio sintético,

composto, basicamente, de amido como substrato para o crescimento de *Schwanniomyces castellii* CBS2863, levedura produtora de enzimas amilolíticas e etanol. A produtividade em etanol foi semelhante nos quatro fermentadores, bem como, o consumo de oxigênio, produção de gás carbônico e taxas de crescimento.

GUMBIRA-SA'ID *et alii* (1992) construíram um fermentador de coluna diferenciado. Tal equipamento, além de permitir o crescimento de *Rhizopus oligosporus* UQM145F, sob um substrato amiláceo para enriquecimento protéico, também permitia a secagem do produto fermentado no próprio biorreator. O cultivo foi realizado com um fluxo de ar de 12,5 l/min a 37-40°C, enquanto que na secagem, o ar era alimentado a 55°C, a uma vazão de 125 l/min durante 180 min.

Um modelo matemático para simular a geração e transferência de calor em biorreatores de coluna para SSF foi proposto por SAUCEDO-CASTANEDA *et alii* (1990). Os estudos experimentais foram realizados em um fermentador vertical com volume útil de 1000 ml, empacotado com 450 g de farinha de mandioca e inoculado com *Aspergillus niger*. A transferência de calor foi avaliada através da estimativa dos números adimensionais de Biot e Peclet. Segundo os autores, a condução através do leito fixo foi a principal resistência à transferência de calor.

LÓPEZ-ULIBARRI *et alii* (1989), trabalhando com o enriquecimento protéico de farinha de mandioca com *Aspergillus niger*, mostraram a importância da gelatinização para posterior fermentação semi-sólida em coluna empacotada. Variando tempo e temperatura de gelatinização, os autores obtiveram aumento de até 4 vezes na proteína produzida.

BARRIOS-GONZÁLEZ *et alii* (1988) mostraram que é possível produzir penicilina através do processo SSF, em reator de coluna, usando bagaço embebido em meio de cultura como substrato. Em estudo comparativo, com o processo em submerso, a penicilina obtida por SSF apresentou maior produção, menor

tempo de fermentação e maior produtividade volumétrica. A grande vantagem apresentada pelo processo SSF foi o fato de ter sido conduzido sob condições não estéreis, sem problemas de contaminação e degradação do produto, comuns ao processo submerso.

LARROCHE *et alii* (1986) descrevem os resultados de crescimento e esporulação de *Penicillium roqueforti*, em um fermentador de coluna de leito fixo (50 mm de diâmetro interno e 350 g de substrato) operando na forma de batelada alimentada ("fed-batch"). A alimentação, tanto de meio, como de ar (livre de gás carbônico), era realizada pelo topo da coluna.

RODRIGUEZ *et alii* (1985) descrevem a fermentação semi-sólida de casca de cítricos por *Aspergillus niger* QH2 em um reator de leito fixo. O sistema consistia de uma coluna de 70 mm de diâmetro e 200 mm de altura. O ar saturado passava por uma coluna de absorção para remoção do gás carbônico, sendo injetado na base do biorreator a uma vazão de 0,1 l/h/g substrato úmido.

### 2.3. Amiloglicosidase

A amiloglicosidase, ou glicoamilase, [(1→4)(1→6)- $\alpha$ -D-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3, conforme a "Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry"] é uma enzima extracelular que cinde as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glicose (LIN *et alii*, 1993).

Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisadas pela enzima, que atua também sobre as ligações  $\alpha$ -1,3. A amiloglicosidase é uma enzima de indução, sendo importante a presença de maltose ou amido no meio para sua alta produção. Entretanto, como a enzima é chamada de indução não típica, o microrganismo a sintetiza, mesmo se crescer em glicose como fonte de carbono (REGULY, 1991).

A enzima é encontrada no sangue, em meios de crescimento de bactérias e no malte de cevada; porém, comercialmente, é produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, assumindo importância industrial devido à habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida (PARK & SANTI,1977), bem como à sua alta taxa de conversão do polissacarídeo em glicose. Assim, a amiloglicosidase é usada em amidos liquefeitos com alfa-amilase ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1.) para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas. NIGAM & SINGH (1995) apresentam um esquema (Figura 2.2) capaz de localizar a glicamilase entre as enzimas degradadoras do amido.

Da mesma forma como acontece com outras enzimas fúngicas (celulases e pectinases, por exemplo), SCHMIDELL (1986) afirma que, quando se produz amiloglicosidase, não se obtém um só tipo de molécula. O autor cita uma série de referências a respeito da existência de duas isoenzimas, amiloglicosidase I (com peso molecular de 99.000 Da) e amiloglicosidase II (112.000 Da), resultantes da produção por *Aspergillus niger*. Para o cultivo de *Aspergillus awamori* é mencionada a presença das amiloglicosidasas I, I' e II.

Outros autores também referem-se à presença de diversas formas destas isoenzimas (FUTATSUGI et alii,1993; FOGARTY & KELLY,1990; HAYASHIDA et alii, citado por MATSUMURA et alii,1988; FOGARTY & BENSON,1983). RAMASESH et alii (1982) trabalharam com amiloglicosidase de *Aspergillus niger* e isolaram duas isoenzimas, com pesos moleculares de 69.810 e 89.130 Da. As duas formas eram diferentes em todas as características testadas: conteúdo de carboidratos, pH e temperatura ótima, Km e energia de ativação. Os autores também citam artigos onde foram identificadas e caracterizadas de 2 a 4 isoenzimas de amiloglicosidase produzida por *Aspergillus niger*.

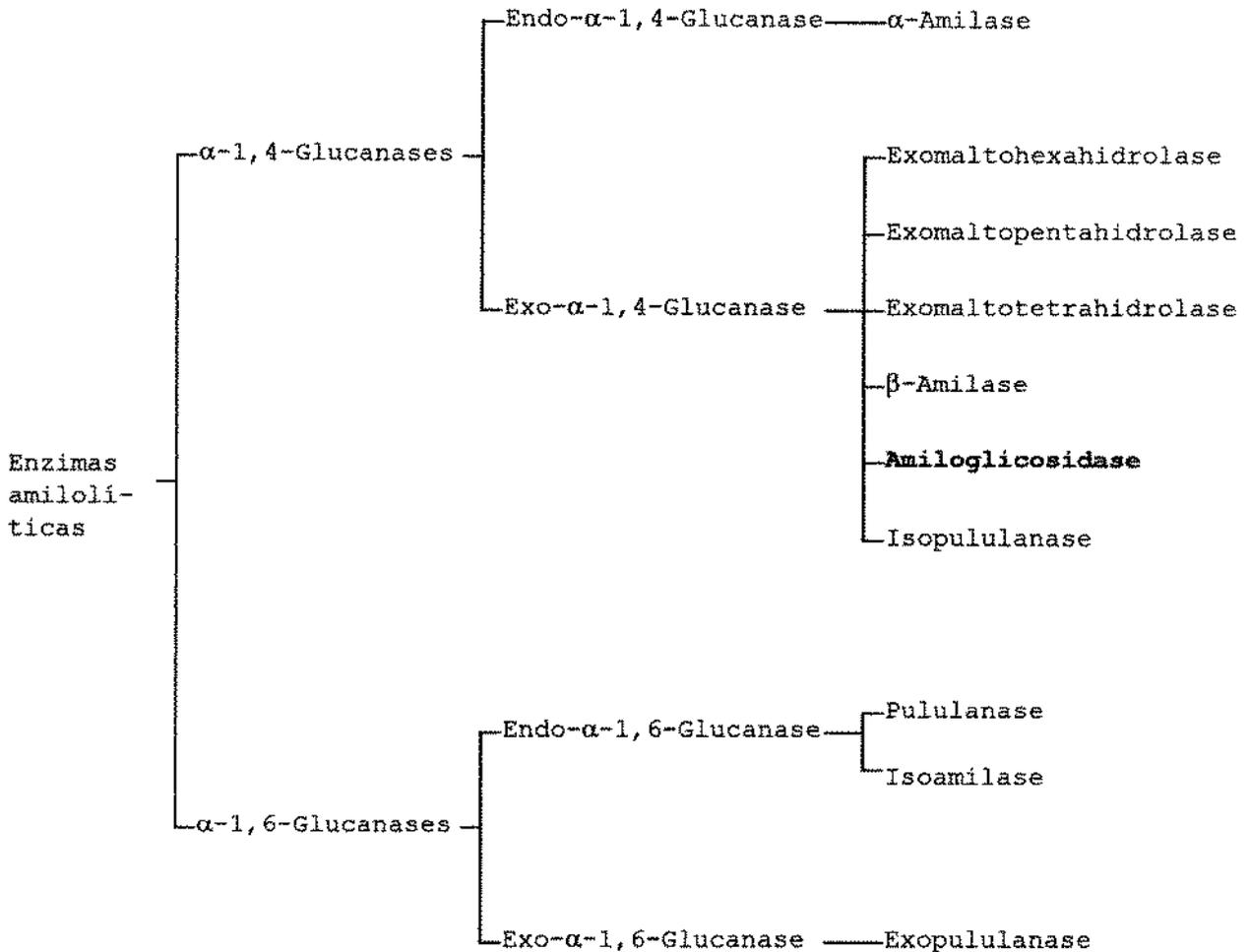


Figura 2.2. Enzimas amilolíticas

As amiloglicosidases atuam na faixa de pH entre 3,0 e 5,0; estando o pH de maior estabilidade da enzima no intervalo de 4,0 a 5,0 (FUTATSUGI *et alii*, 1993; SCHAFHAUSER & STORY, 1993; ZANIN, 1989). A temperatura ótima da enzima se encontra, na maioria das vezes, entre 50 e 60°C (YAMASAKI & KONNO, 1991; RAMASESH *et alii*, 1982). FOGARTY & BENSON (1983) isolaram uma amiloglicosidase de *Aspergillus niger* IMDC1203, com peso molecular de 63.000 Da e temperatura ótima de 70°C. O mesmo valor para a temperatura ótima foi encontrado por FAGERSTRÖM & KALKKINEN (1995) para glicoamilase de *Trichoderma reesei*.

## 2.4 Microrganismo

Os fungos filamentosos são, sem dúvida, os microrganismos mais utilizados nos processos semi-sólidos, devido, principalmente, aos seguintes fatores:

- a.grande capacidade de crescer na ausência de água livre;
- b.versatilidade de aplicações;
- c.facilidade de adaptação e manipulação.

Com o aumento de interesse pela SSF, leveduras (SAUCEDO-CASTANEDA et alii,1992a; SAUCEDO-CASTANEDA et alii,1992b; SAUCEDO-CASTANEDA et alii,1992c; SATO et alii,1988; PANDEY et alii,1988) e bactérias (PADMANABHAN et alii,1992; OHNO et alii,1992; AMIM & ALLAH,1992; RAMESH & LONSANE,1990) começam a ter aplicações mais amplas. No entanto, a simples utilização de microrganismos já adaptados a processos em submerso pode não ser muito simples. Estudos comparativos entre os dois tipos de cultivos para uma mesma cepa mostram claras diferenças entre os tipos de metabólitos produzidos (SHAH et alii,1991; RAMESH & LONSANE,1991).

Segundo PANDEY (1992b) a seleção adequada do microrganismo é um dos mais importantes critérios em se tratando de SSF, sendo que a grande maioria das cepas selvagens ("wild type") são incapazes de uma produção comercial aceitável. O autor apresenta como exemplo da importância da escolha do microrganismo o fato de que uma cultura de *Aspergillus niger* pode produzir cerca de 20 tipos diferentes de enzimas; ao mesmo tempo que a enzima alfa-amilase pode ser obtida a partir do cultivo de mais de 28 cepas distintas.

Diversos são os microrganismos produtores de amiloglicosidase; no entanto, conforme SCHMIDELL (1986), apenas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Endomyces* têm sido empregadas em processos industriais, destacando-se o *Aspergillus niger* e o *Aspergillus awamori*. De acordo com o mesmo autor, a preferência pela amiloglicosidase de *Aspergillus*

se deve a sua maior termoestabilidade e baixa atividade de transglicosidase. NIGAM & SINGH (1995) em trabalho recente confirmam a afirmação anterior quanto ao tipo de cepa usada industrialmente.

PANDEY (1992a) utilizou uma cepa de *Aspergillus niger* isolada anteriormente em seu laboratório para estudar, separadamente, o efeito da umidade inicial do meio e do tempo de fermentação, na produção de amiloglicosidase, por fermentação semi-sólida. O substrato utilizado foi farelo de trigo e os fermentadores do tipo bandeja. Foram estabelecidos como condições ótimas de cultivo a umidade inicial de 50% e tempo de fermentação de 96 horas.

PANDEY & RADHAKRISHNAN (1992), estudando o efeito da compactação do meio e da aeração em um fermentador horizontal de leito fixo, na produção de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*, concluíram, como ideal, a vazão de 6 l/h de ar saturado. Observaram também, a existência de um comportamento semelhante entre as duas variáveis; entretanto nenhum estudo sobre esta relação ou sobre a interação delas foi realizado.

Estudando a influência de fontes de nitrogênio na produção em submerso de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL3112, CHIQUETTO et alii (1992) indicam um aumento significativo (40% na atividade enzimática máxima) na produção da enzima quando uma fonte de nitrogênio orgânico, como a uréia, foi empregada.

MITCHELL et alii (1991) trabalhando com glicoamilase de *Rhizopus oligosporus* UQM145F desenvolveram modelos matemáticos para a liberação e difusão da enzima, hidrólise do amido do substrato e geração e difusão da glicose. Entretanto, os modelos falham pela simplicidade apresentada, em comparação com o caráter complexo do sistema real.

ABRAHAM et alii (1989) utilizaram farelo de trigo para produzir amiloglicosidase usando uma cepa de *Aspergillus niger* que fora isolado pelos próprios autores. A enzima obtida foi

utilizada para hidrolisar farinha de mandioca, cujo resultado apontou eficiência de 92-94% de hidrólise após 16 horas.

Devido ao enorme crescimento da Biologia Molecular na última década, microrganismos engenheirados geneticamente, começaram a ser utilizados para a produção de amiloglicosidase. JOUTSJOKI *et alii* (1993) reportam a construção de uma cepa de *Trichoderma reesei* chamada ALKO2743 que teve o clone da amiloglicosidase fúngica de *Horamoconis resiniae* introduzido em seu DNA, com o objetivo de aumentar a degradação das ligações  $\alpha$ -1,6 do amido em processos de fermentação alcoólica. O aumento no rendimento de etanol foi da ordem de 3%; porém, nenhum relato é feito a respeito da estabilidade da cepa engenheirada e às características da enzima obtida.

Baseados no fato de o *Saccharomyces cerevisiae* não metabolizar cadeias de maltodextrina, WITTRUP *et alii* (1993) implementaram um método de encapsulação para isolar uma cepa de *Saccharomyces*, denominada MS52, que foi modificado com a introdução do gene da amiloglicosidase de *Aspergillus awamori*. Com os mesmos microrganismos, trabalharam CHEN *et alii* (1994), com o objetivo de obter uma enzima com maior termoestabilidade. O resultado alcançado foi uma enzima com coeficiente de termodesativação 2,5 vezes menor que a enzima original ("wild-type enzyme"). LIN *et alii* (1993) conseguiram clonar o *Aspergillus nidulans* FGSC4 e transformá-lo na cepa EGSC4 capaz de produzir glicoamilase e que, segundo os autores, demonstrou melhor nível de expressão que a clonagem de *Saccharomyces cerevisiae*. A primeira clonagem do gene da amiloglicosidase em bactérias foi realizada por OHNISHI *et alii* (1992) que purificaram o gene a partir do *Clostridium* sp. G0005 e o expressaram em *Escherichia coli*.

Uma dificuldade comum nos processos SSF é a dificuldade de determinação do crescimento celular, uma vez que o microrganismo não pode ser separado do meio sólido e quantificado diretamente. Em função do exposto, DESGRANGES *et alii* (1991) citam que, para processos SSF, os métodos

indiretos de determinação de biomassa podem ser divididos em três categorias:

- 1.métodos que medem um certo constituinte celular, como glicosamina, quitina, ácidos nucleicos ou proteínas;
- 2.métodos que medem uma atividade biológica, como velocidade de respiração, ATP ou atividade imunológica;
- 3.métodos que medem o consumo de um nutriente.

Somam-se a estas três divisões o trabalho, anteriormente comentado (2.2.3), de AURIA *et alii* (1993) que correlacionaram o crescimento celular com a perda de pressão em fermentadores de coluna. Com referência ao segundo item, estimativas do crescimento têm sido realizadas através da correlação com a taxa de consumo de oxigênio (MAIORANO *et alii*,1992; SATO *et alii*,1983; OKAZAKI *et alii*,1980) e/ou a de produção de gás carbônico (SAUCEDO-CASTANEDA *et alii*,1994; SAUCEDO-CASTANEDA *et alii*,1992; WENG & HOTCHKISS,1991; RODRIGUES *et alii*,1985; NARAHARA *et alii*,1984; NARAHARA *et alii*,1982; CARRIZALEZ *et alii*,1981) ao longo do processo. Estas medidas são de respostas rápidas, porém os coeficientes de relacionamento são particulares para cada substrato, microrganismo e condição de cultivo (AURIA *et alii*, 1993).

## 2.5.Inóculo

De acordo com GUTIERREZ-ROJAS & TORRES (1992), a preferência pela utilização de esporos como inóculo nos processos semi-sólido é devida às seguintes razões:

- a.idade fisiológica sempre homogênea;
- b.os esporos são rígidos e fáceis de manejar, ao contrário da enorme fragilidade do micélio;
- c.a raspagem do micélio pode trazer junto metabólitos secundários indesejáveis.

Segundo os mesmos autores, o uso de esporos como inóculo apresenta como principal desvantagem o tempo de espera para germinação, que ocupa cerca de 30% do tempo total da fermentação, diminuindo a produtividade total do processo.

A maioria dos processos SSF envolvem o uso de uma alta concentração inicial de esporos, a fim de prevenir contaminação durante o desenvolvimento da fermentação (LONSANE,1992). De acordo com a literatura, esta concentração de esporos usada como inóculo pode variar de uma maneira bem acentuada (Tabela 2.2), sendo raro qualquer estudo, entre os trabalhos consultados, relativo à otimização deste valor com relação à formação de produto, bem como à sua interação com outras variáveis. No único estudo encontrado que diz respeito à relação entre concentração de inóculo e formação de produto, SOCCOL (1992) mediu a influência da taxa de inoculação sobre a produção de esporos de *Rhizopus oryzae* MUCL28168 após 8 dias de incubação. Concluiu que  $4 \times 10^5$  a  $4 \times 10^6$  esporos por erlenmeyer contendo 50 ml de PDA são suficientes para obter uma boa produção de esporos. O mesmo autor ao estudar a influência da taxa de inoculação sobre a produção de alfa-amilase e amiloglicosidase de *Rhizopus arrhizus* ATCC34612 sobre mandioca crua, conclui que a concentração de  $2 \times 10^6$  a  $2 \times 10^7$  esporos/g<sub>meio</sub> era a melhor para as condições do processo.

## **2.6.Substrato**

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. Para o caso do processo SSF, os substratos sólidos são constituídos, basicamente, de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem a adição de nutrientes suplementares. Os resíduos de origem agroindustrial são os substratos mais utilizados neste processo, tais como: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais,

mandioca, entre outros (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES,1992). A Figura 2.3 apresenta o fluxograma de beneficiamento do arroz, cujo farelo originado durante a etapa de polimento pode ser utilizado para fermentações em estado sólido.

**Tabela 2.2.**Concentração inicial de esporos usadas em SSF

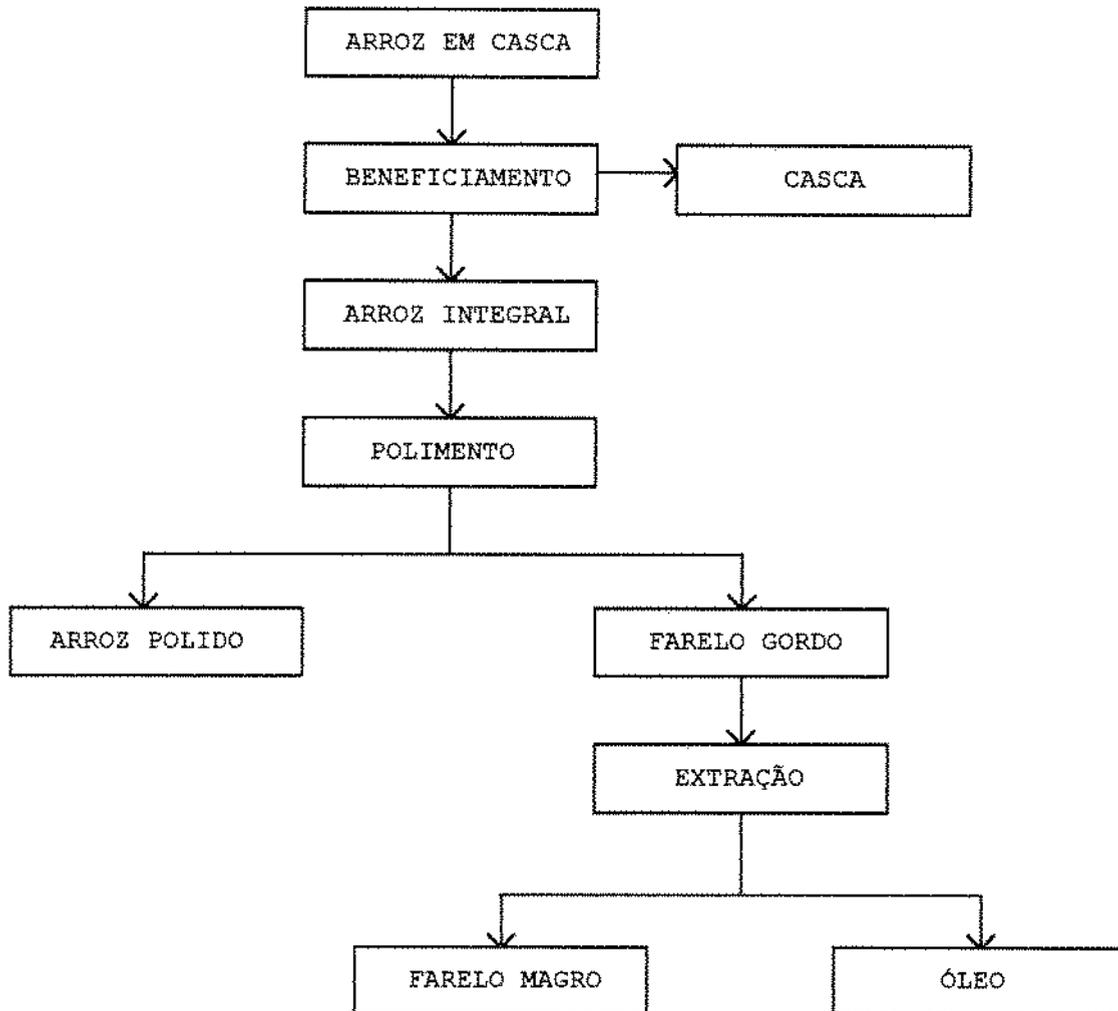
Microorganismo	nº esporos/g meio	Referência
<i>Rhizopus oligosporus</i>	$3 \times 10^4$	GUMBIRA-SA'ID et alii,1992
<i>Aspergillus orizae</i>	$1,5 \times 10^5$	SAHA et alii,1991
<i>Aspergillus phoenicis</i>	$1 \times 10^7$	DESCHAMPS & HUET,1984
<i>Rhizopus SMC</i>	$1,6 \times 10^6$	RAMAMURTHY & KOTHARI,1993
<i>Aspergillus niger</i>	$2 \times 10^7$	ORIOLO et alii,1988; RODRIGUEZ et alii,1985; RAIMBAULT & ALAZARD,1980 SAUCEDO-CASTANEDA et alii, 1990
<i>Aspergillus niger</i>	$1 \times 10^8$	AURIA et alii,1993; AURIA et alii,1992
<i>Aspergillus kawachii</i>	$1 \times 10^5$	SUDO et alii,1994
<i>Aspergillus oryzae</i>	$5 \times 10^5$	BAJRACHARYA & MUDGETT,1980
<i>Aspergillus oryzae</i>	$1,8 \times 10^5$ e $3 \times 10^4$	OKAZAKI et alii,1980
<i>Trichoderma viride</i>	$6 \times 10^6$	GRAJEK & GERVAIS,1987

O uso destes materiais agroindustriais é devido a os mesmos apresentarem as seguintes características (GUTIERREZ-ROJAS & TORRES,1992):

a.são recursos naturais renováveis;

b.sua produção depende de outra atividade produtiva;

c.são produzidos em grande quantidade e normalmente constituem um problema localizado.



**Figura 2.3.** Fluxograma do processo de beneficiamento do arroz

Outra característica comum aos substratos utilizados em sistemas semi-sólidos é sua necessidade de sofrer um tratamento físico e/ou químico prévio à fermentação, a fim de fornecer-lhes novas características físicas, principalmente o aumento da porosidade e da capacidade de retenção de água. Dentre estes pré-tratamentos, a redução de tamanho é a operação mais utilizada (ABRAHAM *et alii*,1989; ABRAHAM *et alii*,1987; LOPEZ-ULIBARRI *et alii*,1989; SANI *et alii*,1992; AMIN & ALLAH,1992;

AURIA *et alii*,1993; SAUCEDO-CASTANEDA *et alii*,1992b). Para o caso de materiais amiláceos, um pré-tratamento térmico é comum (ABRAHAM *et alii*,1989; ABRAHAM *et alii*,1987; LOPEZ-ULIBARRI *et alii*,1989; SARGANTINIS *et alii*,1993; SAHA *et alii*,1991; SAUCEDO-CASTANEDA *et alii*,1992b). O equilíbrio entre o aumento da porosidade (com o conseqüente aumento desejado da área de contato) e a possibilidade negativa da perda de textura é um dos grandes problemas a ser resolvido como conseqüência destes pré-tratamentos.

Em decorrência das características do processo, o conteúdo de água dos substratos para SSF é limitado a pequenas quantidades. De acordo com LONSANE *et alii* (1992), a existência de um valor ótimo para umidade deve ser bem estabelecido, uma vez que valores acima ou abaixo do ótimo podem afetar, significativamente, a produtividade do processo.

PANDEY (1992) cita a importância do conteúdo adequado de umidade para cada processo, uma vez que a alta umidade resulta na diminuição da porosidade do substrato, dificultando a penetração de oxigênio e facilitando a contaminação por bactérias. Ao contrário, baixos níveis de umidade levam a um crescimento pobre e pequena acessibilidade ao nutriente. Com relação ao crescimento de fungos filamentosos, o mesmo autor cita que altos valores para atividade de água ( $a_w$ ) do meio favorecem a esporulação, enquanto que valores baixos de  $a_w$  estimulam a germinação de esporos ou o crescimento miscelial.

BEROVIC & LOGAR-DERENCIN (1993) observaram que conteúdos de umidade acima de 50% resultavam em menor produção de pectinase a partir de *Aspergillus niger* em meio sólido e que, a conteúdos abaixo de 38%, o tempo de fermentação era demasiadamente longo.

Como a perda de água do meio, decorrente da aeração forçada em reatores de coluna, constitui um sério problema nos sistemas SSF, SAUCEDO-CASTANEDA *et alii* (1992b) alertam para a importância do controle de umidade durante o curso da fermentação, citando o uso de um sistema integrado de controle

de temperatura-umidade, no qual a vazão de aeração e um sistema de "spray" de água para repor umidade ao meio seriam controlados via computador. Os mesmos autores apontam a umidificação do ar, antes de sua alimentação no fermentador como o método mais prático, eficiente e seguro de manter o valor da umidade dentro dos valores estipulados.

Segundo LONSANE *et alii* (1985), a manutenção dos níveis requeridos de umidade do meio pode ser conseguida mantendo o fermentador em atmosferas com umidade relativa do ar controlada através da passagem de ar úmido pelo fermentador e pela instalação de umidificadores nos mesmos.

SATO *et alii* (1982) trabalhando com o crescimento de *Aspergillus oryzae* para produção de amilases, conseguiram aumentar em duas vezes o consumo de oxigênio, e, em três vezes a produção de esporos e enzimas pela adição de partículas de polpa de madeira úmida. As partículas de madeira, atuando como inerte, tiveram dupla finalidade: por um lado suprir a umidade ao meio que desidratava e, por outro, reduzir a densidade do meio, resultando em melhor aeração.

Diversos autores têm tratado de sistemas de SSF, cujo substrato é absorvido em suportes inertes naturais (ORIOLE *et alii*,1988; BARRIOS-GONZÁLES *et alii*,1988; SAUCEDO-CASTANEDA *et alii*,1992a; SAUCEDO-CASTANEDA *et alii*,1992c; HERNANDEZ *et alii*,1992) ou sintéticos (LARROCHE *et alii*,1986; AURIA *et alii*,1992; AURIA *et alii*,1993), a fim de se simplificarem os pré-tratamentos.

A adição de um suporte inerte ao meio também é defendida por GUTIERREZ-ROJAS & TORRES (1992). Para eles tal adição cumpre os seguintes propósitos:

- a.proporcionar uma textura porosa ao meio;
- b.aumentar a retenção de água;
- c.oferecer uma maior firmeza ao meio, quando diminuída pelo tratamento térmico.

## **2.7.Planejamento Experimental**

### **2.7.1.Planejamento Fatorial**

É usado para descobrir como certos fatores influenciam sobre uma determinada resposta, sendo de grande importância prática. Pode ser ampliado para resultar em outro planejamento mais sofisticado. Tal técnica consiste em selecionar um número fixo de níveis e para cada uma das variáveis escolhidas e requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Assim, para  $n_1$  níveis do fator 1,  $n_2$  do fator 2, e  $n_k$  do fator k, o planejamento terá no mínimo  $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$  experimentos e será chamado de fatorial  $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ . O planejamento em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis (superior + e inferior -) é o mais simples e mais utilizado dos fatoriais. O planejamento de dois níveis, havendo k variáveis em estudo, irá requerer a realização de  $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$  ensaios diferentes. Tal planejamento é, assim, chamado de fatorial  $2^k$  (BRUNS,1992).

### **2.7.2.Planejamento Fatorial Fracionário**

O número de experimentos necessários para um planejamento fatorial completo  $2^k$  aumenta, geometricamente, com k. Se k for grande, e os experimentos realizados forem de duração considerada, sua realização prática fica inviabilizada. O fato de poderem-se estimar todos os efeitos de um fatorial completo não implica que todos eles possuam magnitudes semelhantes. Assim, interações de ordem mais elevadas tendem a tornarem-se pequenas, podendo, muitas vezes, ser negligenciáveis. Além disso, quando um número relativamente grande de variáveis é escolhido para ser estudado, é comum acontecer de algumas não possuírem efeito global significativo, e as informações poderem ser obtidas pela realização de somente uma fração do fatorial. Havendo necessidade, o fatorial será completado pela realização de experimentos complementares (BARROS-NETO *et alii*,1995).

Por definição (KHURI & CORNELL,1987), um fatorial fracionário  $2^{k-m}$  é um planejamento que consiste de uma fração correspondente a  $1/2^m$  do fatorial completo  $2^k$ , onde "m" deve ser um número inteiro não negativo tal que  $2^{k-m} \geq k+1$ .

Como o número de ensaios não é completo, existe uma perda de informações na análise dos resultados. Assim, as respostas obtidas não são valores dos efeitos isolados, mas sim mistura ("confounded") deles (KHURI & CORNELL,1987). Para analisar esta mistura de efeitos, BOX et alii (1978) apresentam o conceito de Resolução do Fracional: "um fracional de resolução R é aquele em que nenhum efeito de ordem p é misturado com qualquer outro efeito que possua ordem menor que R-p. Logo, para um fatorial de resolução IV (quatro) os efeitos principais (primeira ordem) não são confundidos com os de 2ª ordem, porém, os efeitos de 2ª ordem são confundidos com outros de segunda ordem".

### **2.7.3.Análise por Superfície de Resposta**

BOX et alii(1978) definem a metodologia por superfície de resposta como um grupo de técnicas usadas no estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas com as variáveis de entrada que deram origem às respostas.

KHURI & CORNELL (1987), por vez, apontam que este grupo de técnicas possibilita:

- a.escolher uma série de experimentos que produzam medidas confiáveis e adequadas da resposta de interesse;
- b.determinar um modelo matemático que melhor se adapte aos dados coletados; e
- c.determinar as condições ótimas para que as variáveis produzam um máximo (ou mínimo) valor na resposta.

Os estudos usando superfície de resposta são por natureza seqüenciais. Desta forma, as informações adquiridas em uma série de experimentos servem para planejar a série seguinte.

Segundo KHURI & CORNELL (1987), o processo começa com a hipótese a respeito de quais fatores influenciam uma resposta de interesse particular. Isto leva ao planejamento de experimentos que forneçam dois tipos de informações: quais fatores dentre os escolhidos são realmente importantes para ser estudados e quais podem ser eliminados por não terem uma influência significativa na resposta estudada. Os experimentos são realizados e os resultados podem levar a novas hipóteses. Um segundo grupo de experimentos é concebido e conhecimentos adicionais são adquiridos a respeito de como os fatores influenciam na resposta. Num terceiro e, em geral, definitivo estágio, a resposta ao porquê dos fatores serem importantes e um conhecimento global do sistema são geralmente obtidos. Assim, o planejamento e a análise dos dados obtidos na metodologia por superfície de resposta podem levar ao conhecimento de quais fatores são importantes, que papel cada fator exerce sobre o sistema e por que da importância desses fatores.

Uma das grandes vantagens da metodologia por superfície de resposta é o fato de ela poder ser finalizada, a qualquer tempo, sem experimentações futuras que pareçam improdutivas ou anti-econômicas (CORNELL,1990).

O primeiro passo numa estratégia de superfície de resposta é decidir pela forma do modelo que irá expressar a resposta como função das variáveis independentes do processo. Modelos de 1ª e 2ª ordem são os normalmente utilizados. Geralmente, inicia-se o processo planejando os experimentos de maneira que os resultados possam ser ajustados a um modelo de 1ª ordem, uma vez que não se conhece o formato da superfície e nem a localização dos melhores valores para as variáveis independentes (CORNELL,1990). O modelo de 1ª ordem para k variáveis é expresso da seguinte forma:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot Z_i \quad (2.1)$$

onde:

$Y$  = função resposta genérica;

$\beta_0$  = termo independente do modelo linear proposto;

$\beta_i$  = coeficientes das variáveis independentes em valores reais;

$Z_i$  = variáveis independentes em valores reais.

Para facilitar a estimativa dos coeficientes, as variáveis dos modelos são expressas na forma de variáveis codificadas. A codificação das variáveis é dada por (KHURI & CORNELL,1987):

$$X_i = \frac{Z_i - \bar{Z}}{\Delta Z / 2} \quad (2.2)$$

onde:

$X_i$  = valor codificado da variável  $Z_i$ ;

$\bar{Z}$  = valor real da variável no Ponto Central;

$\Delta Z$  = intervalo de variação da variável  $Z$ .

A Equação 2.1 na forma de variáveis codificadas torna-se:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot X_i \quad (2.3)$$

onde:

$b_0$  = termo independente do modelo linear proposto = média aritmética das respostas;

$b_i$  = coeficientes das variáveis independentes na forma codificada.

Para calcular os coeficientes da Equação 2.3 os dados são obtidos pela construção de um planejamento fatorial completo  $2^k$ , ou seja, são feitas todas as combinações possíveis das  $k$  variáveis em dois níveis pré-determinados, denominados nível

superior (+1) e nível inferior (-1). A estimativa do erro experimental pode ser obtida pela realização de experimentos em replicatas no ponto central (nível 0).

Quando o modelo de 1ª ordem não apresentar boa correlação com os dados em função da existência de uma superfície curva, é necessária a adição de termos de ordem superior, geralmente de 2ª ordem. O modelo de 2ª ordem para k variáveis codificadas é expresso da seguinte forma:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j \quad (2.4)$$

onde:

$b_0$  = termo independente do modelo de 2ª ordem proposto;

$b_{ii}; b_{ij}$  = coeficientes dos termos quadráticos das variáveis independentes na forma codificada.

Diversos são os planejamentos que podem ser usados para montar a série de experimentos adicionais que possibilite o cálculo dos coeficientes da Equação 2.4. BOX & WILSON (citados por KHURI & CORNELL, 1987) criaram o chamado Planejamento Composto Central, também denominado de configuração "estrela". Tal planejamento consiste de um fatorial completo  $2^k$ ; replicatas no ponto central e dois pontos sobre o eixo de cada variável a uma distância  $\pm\alpha$  do ponto central.

ZANGIROLAMI (1992), citando BOX *et alii*, indica que a avaliação estatística, a respeito de os modelos empíricos obtidos apresentarem ou não um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, pode ser feita utilizando-se o coeficiente de correlação e o teste F. Quanto mais próximo o coeficiente de correlação estiver de 1,0 (correlação perfeita), melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais.

O teste F de significância consiste em verificar se os modelos propostos explicam uma quantidade significativa da

variação dos dados experimentais, realizada através da comparação do valor F estimado a partir dos resultados pela Equação 2.5 com o tabelado para uma distribuição de referência  $F_{\alpha, p-1, N-p}$ . Para o modelo ser considerado válido, o valor de F calculado deve ser superior ao tabelado (RODRIGUES, 1993).

$$F = \frac{SQR / (p - 1)}{SQE / (N - p)} \quad (2.5)$$

onde:

SQR=soma dos quadrados devido à regressão;

SQE=soma dos quadrados devido ao erro;

p-1=graus de liberdade associado a SQR;

N-p=graus de liberdade associado a SQE.

Os tratamentos estatísticos dos dados citados, anteriormente, em conjunto recebem o nome de análise de variância (ANOVA).

#### 2.7.4.Caminho de Ascendência Máxima

Segundo KHURI & CORNELL (1987) o procedimento denominado Caminho de Ascendência Máxima consiste em projetar uma seqüência de experimentos ao longo do caminho de máximo aumento na resposta, conforme esquematizado na Figura 2.4. A direção desta seqüência depende da escala adotada para as variáveis codificadas, sendo perpendicular às linhas de contorno (BOX et alii, 1978). Uma análise das respostas obtidas neste deslocamento irá fornecer um novo ponto central para estudo.

Os autores descrevem minuciosamente uma metodologia matemática para o método. Assumem, inicialmente, como verdadeira, a hipótese de que a superfície de resposta pode ser aproximada, localmente, da equação de um hiperplano, dada por:

$$\eta = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot X_i \quad (2.6)$$

Tal aproximação é feita usando-se o modelo de 1ª ordem, obtido a partir dos dados práticos, conforme a Equação 2.1, já descrita anteriormente.

CORNELL (1990) e KHURI & CORNELL (1987) apontam que os experimentos adicionais a serem realizados ao longo do Caminho de Ascendência Máxima deverão corresponder a incrementos de  $1,0.\Delta_i$ ,  $1,5.\Delta_i$ ,  $2,0.\Delta_i$ ,  $2,5.\Delta_i$ ...nos valores do ponto central das variáveis dependentes, sendo:

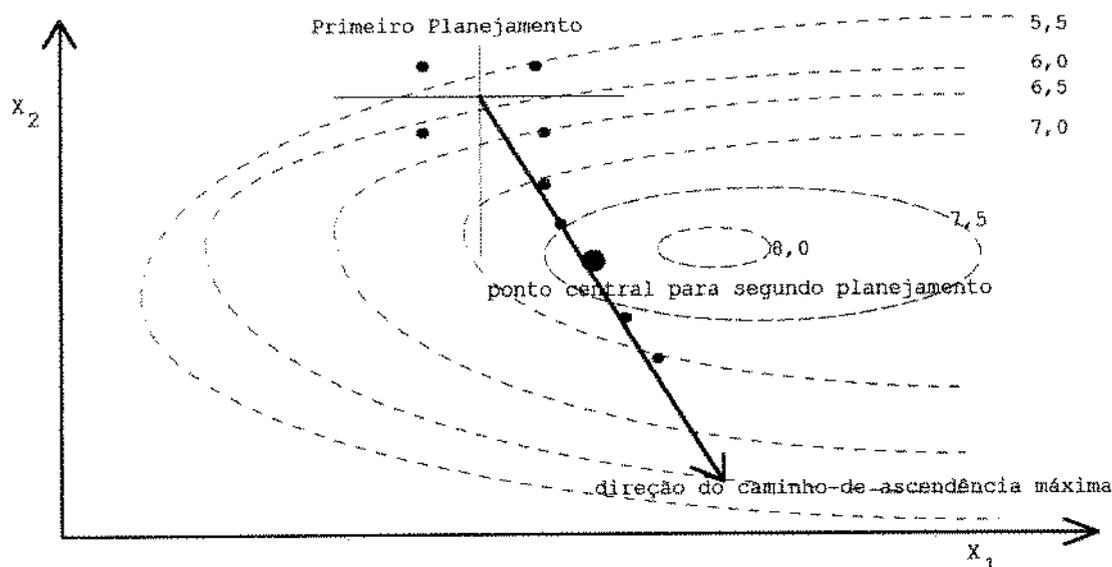
$$\Delta_i = X_i \cdot (\Delta Z_i/2) \quad e \quad (2.7)$$

$$X_i = \frac{b_i}{2 \cdot v} \quad (2.8)$$

onde:

$\Delta_i$ =troca incremental;

$v$ =multiplicador de Lagrange.



**Figura 2.4.** Representação do caminho de ascensão máxima ao longo das linhas de contorno de um planejamento fictício.

## 2.8. Condutividade Térmica

A condutividade térmica de um material é a medida de sua capacidade de conduzir calor (SWEAT,1986) e é, segundo HALLIDAY et alii (1995), definida pelo British Standards Institution como:

$$q = \frac{k \cdot A \cdot (T_1 - T_2)}{L} \quad (2.9)$$

onde: q=fluxo de calor (W);

k=condutividade térmica (W/m.K);

A=área de troca térmica(m<sup>2</sup>);

T=temperatura (K);

L=espessura do material(m).

De acordo com os mesmos autores, k varia com a composição química, estado, estrutura física e temperatura do corpo em questão.

A literatura apresenta diversas referências a respeito de vários métodos e equipamentos utilizados para medir a condutividade térmica de diversas substâncias biológicas, que, de acordo com NIX et alii (1969) podem ser classificados em métodos de regime estacionário ou métodos de regime transiente. Segundo CANEDO et alii (1975), embora os primeiros utilizem um tratamento matemático mais simples, necessitam de longos períodos de tempo para alcançar o estado estacionário, o que pode levar a uma modificação na composição do material.

MOHSENIN (1980) apresenta uma série de determinações da condutividade térmica de alimentos e produtos agrícolas utilizando este método do regime permanente, no qual equipamentos são construídos com a configuração de cilindros ou esferas concêntricas e de placas paralelas.

Segundo MURR (1992), o método do regime transiente baseia-se no fato de a taxa de aumento da temperatura, em qualquer

ponto de um corpo sólido infinito, aquecido por uma fonte de calor linear, depender da difusividade térmica do corpo. CANEDO *et alii* (1975) citam que, entre os métodos transientes encontrados na literatura, o da sonda se apresenta como o mais vantajoso.

SWEAT (1986) aponta a sonda com fonte linear de calor como recomendada para a maioria das determinações em alimentos, principalmente por ser simples, rápida, usar pequenas amostras, e requerer um sistema de aquisição de dados pouco sofisticado.

Diversas configurações de montagem para o método da sonda estão presentes na literatura.

Com o objetivo de determinar a condutividade térmica de materiais amiláceos que simulassem os usados nos processos de extrusão, HALLIDAY *et alii* (1995) construíram uma sonda com fonte linear de calor dentro de uma célula de compactação, onde a amostra era comprimida a uma pressão de 2000 psi. A temperatura era mantida constante através da circulação de óleo pelo encamisamento da célula, sendo a sonda formada por uma agulha hipodérmica de 2 mm de diâmetro, com quatro fios de aquecimento e um termopar do tipo K (chromel-alumel) no seu interior.

LOZANO *et alii* (1979) usaram uma sonda que era o próprio fio de aquecimento com isolamento de epóxi e um termopar de cobre-constantan acoplado. Para determinar a correlação entre a condutividade térmica de maçãs e seu conteúdo de umidade, os autores construíram e testaram vários tipos desta sonda, obtendo os melhores resultados com aquelas que possuíam dois ou quatro fios de aquecimento.

HOOPER & LEPPER (1950), em trabalho pioneiro, construíram uma série de sondas com tubos de alumínio para determinação da condutividade de diversos materiais. Em tal artigo, que serviu de base matemática para os trabalhos a seguir, os autores modelaram o sistema sonda-amostra, como sendo uma fonte de calor linear de valor constante em um corpo homogêneo infinito

a uma temperatura constante. Para tal modelo, é válida a equação de Fourier:

$$\frac{1}{a} \cdot \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial T}{\partial r} \quad (2.10)$$

onde:

a=difusividade térmica =  $k/\rho \cdot C_p$ ;

T=temperatura;

$\rho$ =massa específica;

$C_p$ =calor específico;

t=tempo;

r=distância radial da fonte de calor.

A solução da equação foi apresentada na forma de série, que para o caso particular de pontos próximos à fonte de calor é dada por:

$$T_2 - T_1 = \frac{Q}{4 \cdot \pi \cdot k} \cdot \ln \left( \frac{t_2}{t_1} \right) \quad (2.11)$$

onde:  $T_1$  e  $T_2$ =temperaturas no tempo  $t_1$  e  $t_2$ .

Graficando  $\Delta T$  contra o  $\ln t$ , obtém-se uma reta, cuja inclinação "b" é dada por:

$$b = \frac{Q}{4 \cdot \pi \cdot k} \quad (2.12)$$

Várias fontes de erro, com relação às equações e considerações anteriores, são discutidas na literatura. As mais comumente destacadas se referem à fuga da idealidade do modelo proposto, em função de: 1. a amostra real não ser infinita; e 2. a sonda também não ser infinita no comprimento e nem nula no diâmetro.

Com relação ao tamanho da amostra, HALLIDAY *et alii* (1995) afirmam que a mesma deve ser grande o suficiente para que o aumento de temperatura na superfície externa seja desprezível, sem, no entanto, citarem qualquer critério para alcançar tal condição. MURR (1992) relata que amostras cilíndricas com a relação comprimento/diâmetro maior ou igual a 4 mostram-se ideais.

Para minimizar o erro devido à geometria da sonda, diversos valores para a razão comprimento/diâmetro são sugeridos. PEREIRA (citado por LOPES FILHO & FORTES, 1988) afirma que o uso desta relação acima de 20 ocasiona erros inferiores aos erros sistemáticos experimentais. SWEAT (1986) recomenda um valor acima de 25, enquanto que HOOPER & LEPPER (1950) indicam um valor mínimo de 100. Ainda sobre a mesma relação, HALLIDAY *et alii* (1995) apontam para uma faixa de valores entre 25 e 100.

Outras fontes de erros, citadas por CANEDO *et alii* (1975): a corrente não ser perfeitamente constante; a sonda não estar exatamente centrada na amostra; o tempo de medição não ser suficientemente grande; a temperatura inicial não estar estável e/ou uniforme; e a provável falta de homogeneidade do material.

Em função destas e outras possibilidades de erro, vários autores (HALLIDAY *et alii*,1995; SWEAT,1986; CANEDO *et alii*,1975) utilizaram-se de um fator de calibração, característico para cada sonda. A calibração é feita com um material de condutividade conhecida, normalmente água adicionada de ágar ou glicerina.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Microrganismo

Utilizou-se o *Aspergillus niger* NRRL 3122, obtido junto ao Northern Regional Research Center (U.S.A.) e recebido na forma liofilizada. Após reidratada, a cultura foi mantida a 4°C em ágar batata-dextrose (PDA) inclinado (ANTIER *et alii*, 1993; GHILDYAL *et alii*, 1991), adicionado de 1% de ágar bacteriológico. Os repiques foram realizados em intervalos de 3 a 4 meses.

Parte da cultura original foi depositada na Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, tendo sido liofilizada e recebido a nomenclatura de *Aspergillus niger* CCT 3312. Por 2 outras vezes foi necessária a reativação das células, uma vez que, após transferências consecutivas, percebeu-se a diminuição da capacidade de produção de amiloglicosidase pelo microrganismo.

Para o preparo do inóculo, a cultura era propagada a 30°C em Frascos de Roux contendo PDA por um período de 7 dias até completa esporulação (AURIA *et alii*, 1993; SHAH *et alii*, 1991). Os esporos eram então suspensos em água destilada estéril contendo 0,2% de Tween 80 (AURIA *et alii*, 1993; RAMASESH *et alii*, 1982) e raspados, assepticamente, com bastão de vidro.

### 3.2. Contagem de esporos

A concentração de esporos na suspensão foi estimada pela contagem em microscópio usando uma Câmara de Neubauer (RAIMBAULT & ALAZARD, 1980). A amostra a ser analisada, já diluída, era introduzida na Câmara com o auxílio de uma Pipeta de Pasteur. Foram contados 8 campos com 16 repetições, sendo adotada a média aritmética destas repetições.

### 3.3. Composição do meio

O substrato utilizado foi farelo de arroz desengordurado e estabilizado termicamente, subproduto do processo industrial de extração do óleo deste cereal. A granulometria do farelo usado nos experimentos foi mantida entre 0,351 e 0,589 mm. Casca de arroz moída e peneirada, com tamanho compreendido entre 0,833 e 1,651 mm, foi misturada ao farelo em concentrações variáveis, a fim de diminuir o problema de compactação do meio. Nutrientes foram adicionados nas seguintes concentrações, expressas em g/100g<sub>farelo</sub>:

carbonato de cálcio.....0,5  
 sulfato de potássio.....4,0  
 fosfato ácido de amônio.....7,0  
 uréia.....3,2

A uréia foi acrescentada como fonte de nitrogênio e, principalmente, como controladora de pH (RAIMBAULT & ALAZARD, 1980). HCl 0,4N foi acrescentado ao meio até o acerto do conteúdo de umidade requerido para cada experimento (ABRAHAM *et alii*, 1989; GHILDYAL *et alii*, 1991).

### 3.4. Fermentação semi-sólida

Planejou-se que as fermentações semi-sólidas seriam realizadas em dois tipos diferentes de biorreatores. Para a primeira série de ensaios, escolheram-se embalagens flexíveis de polipropileno, no lugar dos frascos erlenmeyer tradicionalmente empregados. Os motivos para a escolha são os seguintes:

- a. as embalagens, além de suportar as temperaturas de esterilização utilizadas, são permeáveis ao oxigênio e ao gás carbônico;
- b. as embalagens descritas são de baixo custo e de fácil manuseio, permitindo uma boa homogeneização do material e

reduzindo as perdas de amostras (principalmente por quebra de frascos).

Nesta etapa examinou-se o efeito de 6 variáveis sobre a atividade enzimática e produtividade do processo fermentativo. As variáveis estudadas foram: temperatura de fermentação (T), tempo de fermentação ( $t_f$ ), umidade do meio (U), quantidade de casca de arroz adicionada (como inerte) ao meio (C), concentração inicial de esporos (X) e tempo de esterilização ( $t_e$ ).

A segunda etapa do trabalho foi desenvolvida em fermentadores do tipo coluna. Com esta série de experimentos pretendeu-se verificar o comportamento deste tipo de reator na produção de amiloglicosidase e determinar a existência de uma série de relações, tais como:

- atividade (e produtividade) X vazão de ar por massa de meio (VMM);
- atividade (e produtividade) X concentração de gás carbônico na saída;
- atividade (e produtividade) X densidade aparente do meio;
- atividade (e produtividade) X temperatura do meio;
- massa de microrganismo X concentração de gás carbônico na saída;
- massa de microrganismo X vazão de ar por massa de meio (VMM).

#### **3.4.1. Fermentação semi-sólida em embalagem de polipropileno**

Os constituintes dos meios foram, uniformemente, misturados em embalagens flexíveis de polipropileno de dimensões 200 x 320 mm e espessura 0,08 mm, onde ocorreu o desenvolvimento do processo fermentativo. A massa de meio semi-sólido utilizada variou entre 50 e 150 g. As embalagens foram seladas

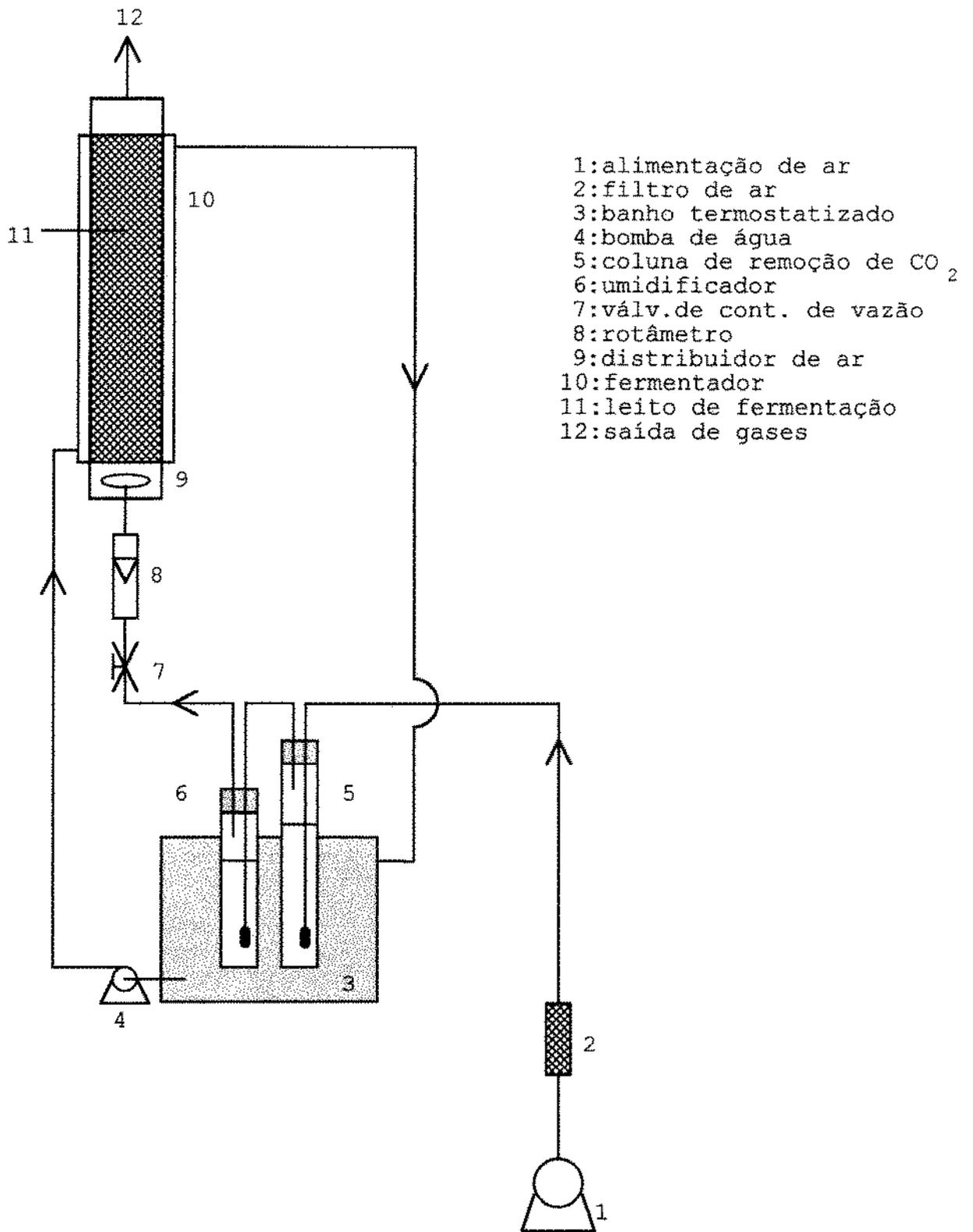
termicamente e autoclavadas a 121°C. O tempo de esterilização variou conforme o estipulado pelo planejamento experimental. Após resfriamento a 30°C o meio era inoculado com a suspensão de esporos previamente preparada, conforme item 3.1. A suspensão de esporos era diluída até uma concentração tal que os volumes adicionados a todos os experimentos fossem iguais. A inoculação se realizava em câmara de fluxo laminar e por intermédio de seringa hipodérmica ou pipeta automática. As temperaturas de fermentação utilizadas foram de 30 e 35°C, por tempos variáveis de 48 a 174 horas. Ao final da fermentação, o farelo fermentado passou por um processo de secagem durante 10 horas, à temperatura de 35-40°C, em estufa com circulação forçada de ar (ABRAHAM *et alii*, 1989; GHILDYAL *et alii*, 1991). O conteúdo de umidade do farelo foi determinado ao início e final da fermentação, e após a secagem, de acordo com o descrito em 3.5.

#### **3.4.2. Fermentação semi-sólida em fermentador de coluna**

Para esta fase do trabalho os experimentos foram realizados em fermentadores do tipo coluna com leito fixo. Tais fermentadores foram construídos em vidro Pyrex, com diâmetro interno variando entre 45 e 51 mm, e 300 mm de altura de leito. A pequena variação de valores para os diâmetros internos, oriunda da manufatura dos reatores, não apresentou qualquer efeito sobre o processo. A montagem experimental utilizada é apresentada nas Figuras 3.1 e 3.2.

As condições físico-químicas e de processo otimizadas na fase anterior e tidas como ótimas foram usadas nesta etapa.

Os constituintes dos meios foram pesados e preparados no mesmo tipo de embalagens flexíveis utilizadas na fase anterior. A autoclavagem era realizada a 121°C por 40 minutos. Após resfriamento, os meios eram inoculados com a suspensão de



**Figura 3.1.** Esquema utilizado para cada fermentador de coluna com leito fixo.



**Figura 3.2.** Montagem experimental dos reatores de coluna em funcionamento.

esporos previamente preparada, conforme item 3.1, homogeneizados e transferidos assepticamente para os fermentadores. A massa de meio semi-sólido utilizada variou de 210 a 368g por biorreator.

A coluna foi empacotada com meio que possuía partículas com granulometria na faixa de 0,351 a 0,589 mm, mantendo uma relação entre 1/140 e 1/80 do diâmetro da coluna. Dessa maneira, evitou-se a formação de caminhos preferenciais, tanto devido à não uniformidade do leito, quanto à quantidade de espaços vazios próximos à parede da coluna, conforme BACKER *et alii* (citado por SAMPAIO NETO, 1994).

O ar injetado na base da coluna era livre de gás carbônico e saturado com vapor de água. Para tanto, a corrente de ar que alimentava cada coluna era borbulhada em um frasco contendo KOH 33% p/p, seguido por outro recipiente com água estéril. A seguir, passava por um rotâmetro previamente calibrado, sendo então alimentado na parte inferior da coluna, através de um

distribuidor construído em Teflon e aço inoxidável, de maneira a minimizar a formação de caminhos preferenciais. A remoção do calor metabólico foi realizada pela circulação de água a 30°C através do encamisamento do reator.

As amostras eram retiradas pelo topo da coluna e em intervalos de tempo que variaram de 12 a 24 horas, em função da fase em que se encontrava o processo fermentativo. Nesta etapa, prescindiu-se do processo de secagem do farelo fermentado.

### **3.5. Teor de umidade**

O teor de umidade das amostras foi determinado pelo método da AACC N° 44-20. O método é gravimétrico e baseado na perda de peso após secagem em estufa, à temperatura de 105°C, por 3 horas.

### **3.6. Extração da enzima**

O farelo fúngico amostrado foi diluído com água, a uma razão de 1:10 (p/p), em frascos erlenmeyer. A extração era realizada mantendo os frascos sob agitação de 220 rev.min<sup>-1</sup> a 30°C por 3 horas (GHILDYAL et alii, 1991). Em seguida foi filtrado em papel Whatman N°40 para remover sólidos e obter um extrato claro, que se utilizava para medir a atividade enzimática, o pH e os açúcares redutores (AR).

### **3.7. Determinação da atividade da amiloglicosidase**

A atividade enzimática de amiloglicosidase no farelo foi determinada segundo uma adaptação da técnica descrita por PARK (1969) e modificada por SCHMIDELL (1986).

O substrato utilizado consistia de 25 ml de uma solução de amido p.a. a 4% dissolvido em solução tampão acetato com pH 4,2 e 1,0 ml do extrato enzimático obtido conforme o descrito em

3.6. O branco era feito com 1ml de água destilada no lugar da enzima. A mistura era incubada a 60°C por 60 minutos, após o que a reação era paralisada colocando-se o balão em banho de água fervente por 5 minutos, e a seguir, quantificados os açúcares redutores liberados pelo método do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER,1959), usando-se glicose como padrão, conforme o descrito por JOUTSJOKI *et alii* (1993).

Uma unidade de amiloglicosidase, IU (International Unit), foi definida como a quantidade de micromoles de açúcares redutores, expressos como glicose, liberados por minuto pela enzima extraída de 1 g de substrato seco, sob as condições de ensaio descritas (PANDEY *et alii*,1996; JOUTSJOKI *et alii*, 1993; PANDEY & RADHAKRISHNAN, 1992; ABRAHAM *et alii*, 1989).

### **3.8. Determinação de açúcares redutores pelo método do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)**

O método proposto por MILLER (1959) possui sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0 g/l de açúcar redutor expresso como glicose.

A análise foi realizada misturando-se 1ml da amostra convenientemente diluída, com 1 ml do reagente DNS e levando-se ao banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após o resfriamento adicionaram-se 16 ml de solução de tartarato duplo de sódio e potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) anidro a 11,25 g/l. Mediu-se, então, a absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. O branco foi realizado pela reação de 1ml de água substituindo a amostra.

### **3.9. pH**

A medição foi realizada diretamente em pHmetro Analyzer pH300, usando-se, para as fermentações semi-sólidas, o extrato obtido em 3.6. Para o processo submerso, o valor do pH era fornecido "on line" pelo próprio fermentador.

### 3.10. Dosagem dos açúcares redutores (AR) ao longo das fermentações

A quantificação dos açúcares redutores presentes nos meios foi executada pelo método do reagente DNS, descrito em 3.8. Para as fermentações semi-sólidas, utilizou-se uma alíquota do extrato descrito em 3.6, enquanto que, no processo submerso, a dosagem era realizada no filtrado obtido durante a determinação da concentração celular, conforme 3.14.

### 3.11. Determinação da concentração celular nas fermentações em estado sólido

Em função da impossibilidade, anteriormente citada, de separar quantitativamente o micélio nos cultivos semi-sólidos, resolveu-se adaptar o método apresentado por SATO *et alii* (1983) e MAIORANO *et alii* (1992) para estimar o crescimento celular. Utilizou-se, para tanto, a velocidade de formação de gás carbônico (medida conforme item 3.12), de acordo com o apresentado por NARAHARA *et alii* (1982). A correlação desta velocidade com a concentração celular foi determinada pela realização de uma fermentação submersa (item 3.13), tendo-se o cuidado de manter, neste processo, o maior número possível de variáveis iguais àquelas usadas nos experimentos em estado sólido.

De acordo com o proposto por SATO *et alii* (1983) e modificado por MAIORANO *et alii* (1992), a estimativa da concentração celular a partir da velocidade de consumo de  $O_2$  corresponde à soma de uma parcela, devido ao crescimento, mais uma parcela, devido à manutenção. A adaptação desta definição à liberação de  $CO_2$  pelo microrganismo fornece:

$$M \cdot (r_{CO_2}) = \frac{1}{Y_{X/CO_2}} \frac{dx}{dt} + m_{CO_2} \cdot x \quad (3.1)$$

onde:

$M$  = massa seca de meio no instante da amostragem (g);

$x$  = massa celular no reator ( $g_{cel}$ );

$r_{CO_2}$  = velocidade de liberação de  $CO_2$  ( $g_{CO_2}/g_{meio}/h$ );

$Y_{X/CO_2}$  = fator de conversão para X- $CO_2$  ( $g_{cel}/g_{CO_2}$ );

$m_{CO_2}$  = coeficiente de manutenção para  $CO_2$  ou velocidade específica de produção de  $CO_2$  para manutenção ( $g_{CO_2}/h/g_{cel}$ );

Integrando a Equação 3.1 entre 0 e  $t_f$ , tem-se:

$$\int_0^{t_f} M(r_{CO_2}) dt = \frac{1}{Y_{X/CO_2}} (x_{t_f} - x_0) + m_{CO_2} \cdot \int_0^{t_f} x dt \quad (3.2)$$

onde:

$x_0$  = massa celular em  $t_f=0$  ( $g_{cel}$ );

$x_{t_f}$  = massa celular no instante  $t_f$  ( $g_{cel}$ ).

A solução para a Equação 3.2, de acordo com a forma apresentada por MAIORANO *et alii* (1992), resulta em:

$$x_1 = \frac{\{Y_{X/CO_2} \cdot T_1 / 2 \cdot (M_0(r_{CO_2})_0 + M_1(r_{CO_2})_1) + (1 - a_1 / 2) \cdot x_0\}}{(1 + a_1 / 2)} \quad (3.3)$$

onde:

$x_1$  = massa celular para o primeiro intervalo de integração ( $g_{cel}$ );

$a_1 = m_{CO_2} \cdot Y_{X/CO_2} \cdot T_1$ ;

$T_1$  = primeiro intervalo de integração (h);

e para  $k \geq 2$ :

$$\begin{aligned}
 x_k = & \{ (Y_{X/CO_2} \cdot [T_1 / 2 \cdot (M_0(x_{CO_2})_0 + M_1(x_{CO_2})_1) + \dots + \\
 & + T_k / 2 \cdot (M_{k-1}(x_{CO_2})_{k-1} + M_k(x_{CO_2})_k) ] + \\
 & + (1 - a_1 / 2) \cdot x_0 - (a_1 / 2 + a_2 / 2) \cdot x_1 - \dots - \\
 & - (a_{k-1} / 2 + a_k / 2) \cdot x_{k-1} \} / (1 + a_k / 2)
 \end{aligned}
 \tag{3.4}$$

onde:

$k$  = número de intervalos de integração;

$x_k$  = massa celular para o  $k$ -ésimo intervalo de integração ( $g_{cel}$ );

$a_{k-1}$  =  $m_{CO_2} \cdot Y_{X/CO_2} \cdot T_{k-1}$ ;

$a_k$  =  $m_{CO_2} \cdot Y_{X/CO_2} \cdot T_k$ ;

$T_k$  =  $k$ -ésimo intervalo de integração (h).

Com base nas considerações anteriores estipulou-se uma seqüência de cálculos usada para estimar a concentração celular, que consistiu das seguintes etapas:

1. a partir dos valores lidos para a condutividade elétrica ( $\lambda$ ) da solução de NaOH usada para a coleta do  $CO_2$ , e usando-se uma curva de calibração de acordo com o indicado em 3.12, determinava-se o valor da normalidade desta solução para cada ponto de amostragem;

2. calculava-se a quantidade de  $CO_2$  liberado de acordo com a equação:

$$M_{CO_2} = V_{NaOH} \cdot 22 \cdot (N_1 - N) \tag{3.5}$$

onde:

$M_{CO_2}$  = massa de gás carbônico liberada durante a fermentação ( $g_{CO_2}$ );

$V_{NaOH}$  = volume de hidróxido de sódio usado para coleta do  $CO_2$  liberado na fermentação (5,8 litros);

$N_1$  = normalidade inicial da solução de NaOH;

N = normalidade da solução de NaOH no tempo de amostragem;

3. construiu-se um gráfico com os valores calculados de  $M_{CO_2}$  em função do tempo de fermentação. Como o intervalo de tempo entre uma amostra e outra era variável, e relativamente grande para uma interpolação linear, a curva obtida teve de ser "alisada" e, a partir dela, foi possível calcular as velocidades de liberação de  $CO_2$  ( $M.(r_{CO_2})$ ) para intervalos fixos de 2 horas;

4. os valores de  $M.(r_{CO_2})$  eram introduzidos em uma planilha eletrônica, construída a partir das equações 3.3 e 3.4 e do programa PECCAL<sup>1</sup>, e, a partir daí, calculavam-se os valores da massa celular no reator (x);

5. ainda na mesma planilha, a concentração celular "X" era calculada de acordo com a equação:

$$X = \frac{x \cdot 10^5}{M \cdot (100 - U)} \quad (3.6)$$

onde:

X = concentração celular ( $mg_{cel}/g_{farelo}$ );

x = massa celular no reator ( $g_{cel}$ );

M = massa de meio no instante da amostragem (g);

U = umidade do meio no instante da amostragem (%).

### 3.12. $CO_2$ produzido

A metodologia utilizada para a determinação do gás carbônico produzido durante as fermentações é descrita por CARRIZALEZ *et alii* (1981) e RODRIGUEZ *et alii* (1985).

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal feita por BONOMI, A.

O método é baseado na mudança da concentração de uma solução padrão de hidróxido de sódio, devido à absorção do gás carbônico da saída do fermentador, segundo a relação estequiométrica:  $\text{CO}_2 + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ . A medição da mudança na condutividade elétrica da solução permite determinar a concentração do hidróxido de sódio em cada instante e, então, a quantidade de gás carbônico produzido durante um dado período de crescimento, uma vez que o ar de entrada era livre de  $\text{CO}_2$ .

Utilizou-se uma solução de hidróxido de sódio, aproximadamente 1N, para receber o ar de saída de cada fermentador. A calibração era feita pela medida da condutividade de diversas soluções padrões de hidróxido de sódio, com concentrações variando entre 0 e 1N. Para cada experimento era construída uma nova curva de calibração. A compensação nas mudanças de temperatura era realizada pelo próprio condutivímetro Analizer 650.

### **3.13. Fermentação Submersa**

Para este experimento utilizou-se um fermentador Biolafite com capacidade nominal de 6 litros. Foram preparados 4 litros de meio, que, após esterilização, foi reduzido para 3,85 litros, volume este usado na fermentação.

O meio de cultura empregado para o crescimento do fungo foi um extrato de farelo de arroz como fonte de carbono. O preparo deste extrato apresentou uma série de dificuldades, uma vez que a concentração inicial desejada de ART<sup>2</sup> era de aproximadamente 10 g/l, tendo de ser o meio completamente límpido. Em função das dificuldades apresentadas, foi necessária a criação de uma metodologia própria para o preparo do meio com farelo de arroz, uma vez que a simples adaptação do preparo do meio de cultura líquido à base de farinha de mandioca (KILIKIAN, 1989;

---

<sup>2</sup> Comunicação pessoal feita por MAIORANO, A.E.

AGUERO,1987; FACCIOTTI,1986) não se mostrou adequada. O protocolo final usado consistiu das seguintes etapas:

1.misturaram-se 400 g de farelo de arroz, finamente moído a 17.000 rpm em moíno "Blender" (Waring Laboratoty Blenders), com 4 g de  $\text{CaCl}_2$ , 1 g de  $\alpha$ -amilase fúngica "Amilex F100.000" e 4 litros de água destilada;

2.acertou-se o pH para o valor de 6,5 com NaOH e aqueceu-se a mistura até 85°C, sendo mantido o processo de dextrinização nesta temperatura por 1 hora. Novamente, aqueceu-se a mistura, desta vez até ebulição por 10 minutos;

3.após esfriar, a suspensão foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos;

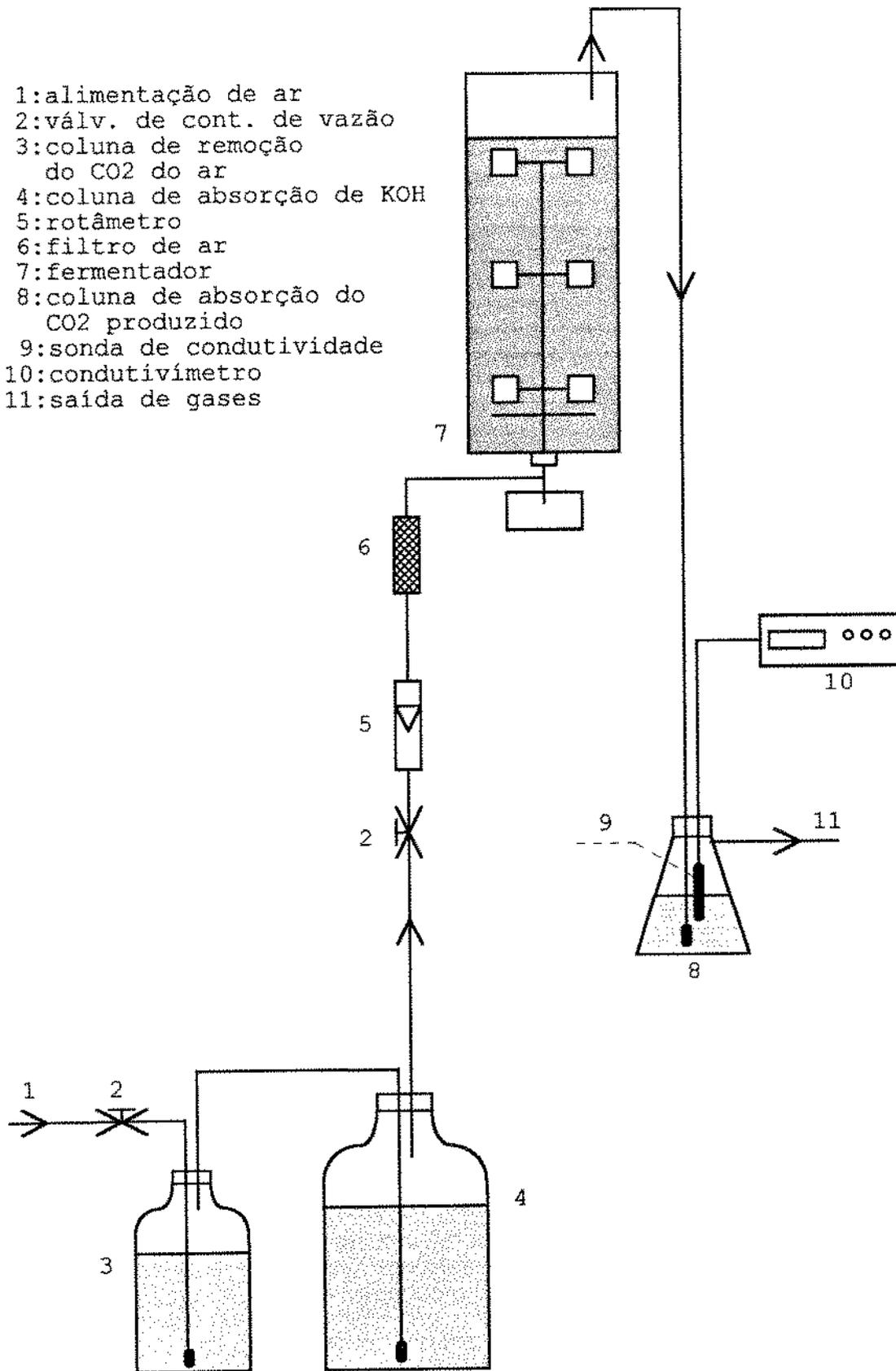
3.a eliminação completa da turbidez e de precipitados só foi alcançada com o uso de coadjuvantes de filtração. Para tanto, adicionaram-se 5% p/p de terra diatomácea "Celite" ao meio e filtrou-se a mistura em pré-capa preparada sobre papel de filtro (cada pré-capa foi preparada com 15 g de "Celite" diluída em 150 ml de água);

5.analisaram-se os ART obtidos e diluíram-se ao valor desejado, que era de aproximadamente 10 g/l;

6.nutrientes foram adicionados nas seguintes concentrações, expressas em g/l: carbonato de cálcio 0,5; sulfato de potássio 4,0; bifosfato de amônio 7,0; e uréia 3,2;

7.acertou-se o pH para em torno de 6,0 e adicionou-se antiespumante, sendo o meio a seguir transferido para o fermentador e ambos esterilizados a 121°C por 30 minutos.

Após resfriamento, o meio foi inoculado com uma suspensão de esporos previamente preparada, conforme item 3.1, de maneira que a concentração inicial de microrganismo no meio fosse de  $1 \times 10^5$  esporos/ml. O ar comprimido usado para alimentar o fermentador foi borbulhado em 12 litros de KOH 33%, a fim de



**Figura 3.3.** Esquema utilizado na fermentação submersa descrita em 3.13.

eliminar o gás carbônico e possibilitar a quantificação do produzido durante o crescimento. Procurando evitar o arraste de KOH para o rotâmetro e o filtro, o ar, livre de CO<sub>2</sub>, passava por um outro frasco contendo 15 litros de água destilada, sendo então injetado na base do fermentador. A corrente de ar na saída do fermentador era coletada em um frasco contendo 5,8 litros de uma solução de hidróxido de sódio 1 N, ao qual estava acoplada a sonda de medição de condutividade elétrica. Tal montagem experimental está representada na Figura 3.3.

A aeração utilizada foi de 0,4 a 0,6 vvm e a agitação, de 600 rpm, sendo a temperatura mantida constante a 30°C.

#### **3.14. Determinação da concentração celular na fermentação submersa**

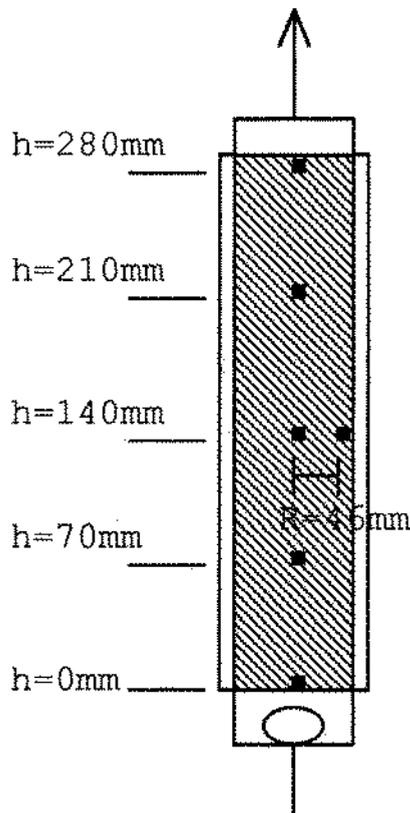
A metodologia empregada para medir a concentração celular foi a da massa celular seca. Aliquotas de 10 ou 20 g de amostra eram filtradas em membrana Millipore de 1,2 µm, previamente seca e pesada. O filtrado era reservado para as determinações de atividade enzimática, AR e ART. O sedimento celular era lavado com água destilada por duas vezes e secado em estufa a 110°C, até peso constante (MAIORANO et alii, 1992).

#### **3.15. Dosagem de açúcares redutores (ART)**

Para a medida dos açúcares redutores totais, uma alíquota de 5 ml do filtrado, descrito em 3.14, era transferida para um erlenmeyer de 100 ml e misturada a 50 ml de água destilada e 5 ml de HCl concentrado. A hidrólise era realizada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, a mistura era neutralizada com NaOH 40% e precipitavam-se as proteínas com 2,5 ml de ZnSO<sub>4</sub> 30% e K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 15%. Completado o volume para 100 ml e filtrado, a seguir, os açúcares eram quantificados pelo método do reagente DNS, descrito em 3.8.

### 3.16. Medidas de temperatura

As medidas de temperatura foram realizadas usando-se 8 termopares de cobre-constantan (Tipo J). O voltímetro usado fornecia as leituras de temperatura diretamente, com uma precisão de 0,1 °C. A Figura 3.4 apresenta, esquematicamente, os 6 pontos de medição escolhidos para o reator, sendo que, na Figura 3.5, é mostrada a coluna em funcionamento, com o meio e os termopares inseridos. Utilizaram-se os outros 2 termopares para medir as temperaturas do banho e a do ambiente.



**Figura 3.4.** Pontos de medições de temperatura do leito semi-sólido.

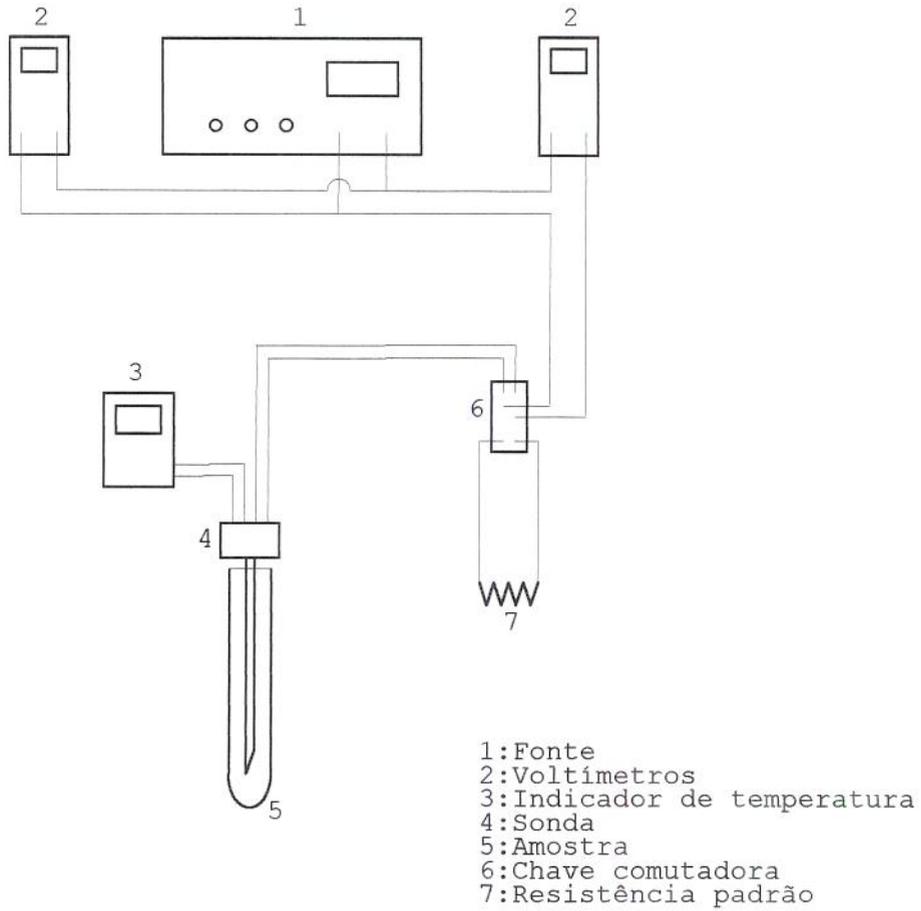


**Figura 3.5.** Reator de coluna instrumentado para a medição da temperatura do leito, conforme o descrito no item 3.16.

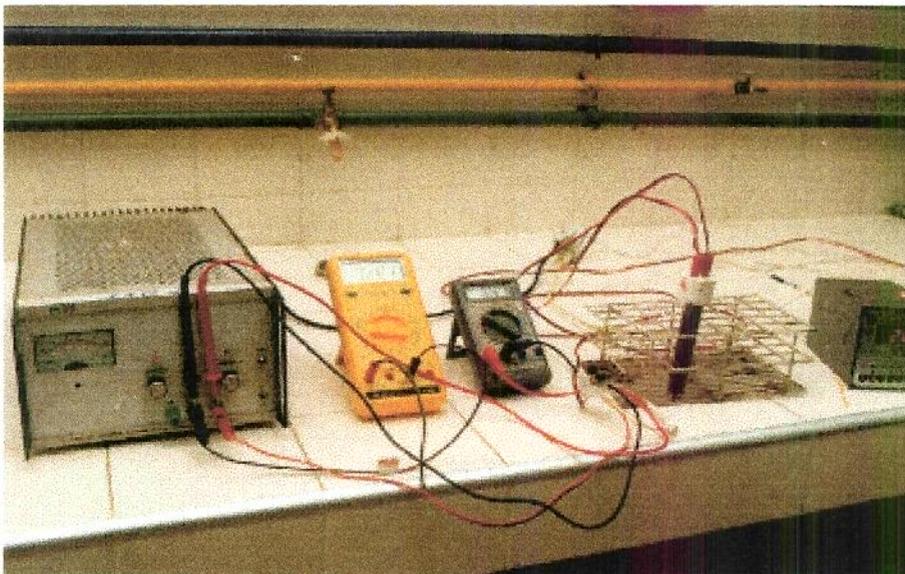
### 3.17. Condutividade Térmica do meio semi-sólido

Para medir a condutividade térmica ( $k$ ) dos meios, empregou-se o método do regime transiente com o uso de uma sonda, conforme técnica e equipamento descritos por MURR (1992).

O equipamento, mostrado nas Figuras 3.6 e 3.7, é formado por uma fonte de tensão estabilizada TECTROL TC10-08, dois milivoltímetros digitais, um indicador digital de temperatura marca IOPE, uma resistência padrão e uma sonda.



**Figura 3.6.**Esquema do equipamento utilizado para a determinação da condutividade térmica dos meios semi-sólidos.



**Figura 3.7.**Equipamento utilizado para a determinação da condutividade térmica dos meios semi-sólidos.

A sonda utilizada é formada por uma agulha hipodérmica de aço inox, com dimensões de 1,5 mm de diâmetro externo e 70,5 de comprimento (relação comprimento:diâmetro=47), em cujo interior foram introduzidos um fio de aquecimento, de uma extremidade a outra, e um termopar de cobre-constantan, com a junta na metade de seu comprimento.

Tal sonda, construída no Laboratório de Medidas Físicas do Departamento de Engenharia de Alimentos da FEA/UNICAMP, está representada na Figura 3.8.

Para medir a condutividade, foram usados tubos de ensaio com dimensões de 6 mm de diâmetro interno e 105 mm de comprimento (relação comprimento:diâmetro = 17,5). Cada amostra era colocada no tubo de maneira a tentar não alterar o valor de sua densidade aparente inicial. A seguir, a sonda era introduzida em seu centro geométrico e se aguardava um período até o equilíbrio térmico. Usando a chave comutadora para conectar a resistência padrão, ajustava-se a corrente elétrica que iria circular pela sonda para a faixa de 0,100 a 0,300 A. Conectando-se a sonda, procedia-se a leitura da temperatura da sonda a cada 10 segundos.

Correlacionaram-se os dados, pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a declividade "b" para cada experimento. Conforme LONSANO *et alii* (1979) e CANEDO *et alii* (1975), eliminaram-se, a seguir, os pontos iniciais e finais que não seguem a Equação 2.11 e procedeu-se uma nova correlação. A condutividade foi calculada a partir da equação 2.12:

$$b = \frac{Q}{4 \cdot \pi \cdot k}, \text{ onde:}$$

$$Q = I^2 \cdot R \text{ (W);}$$

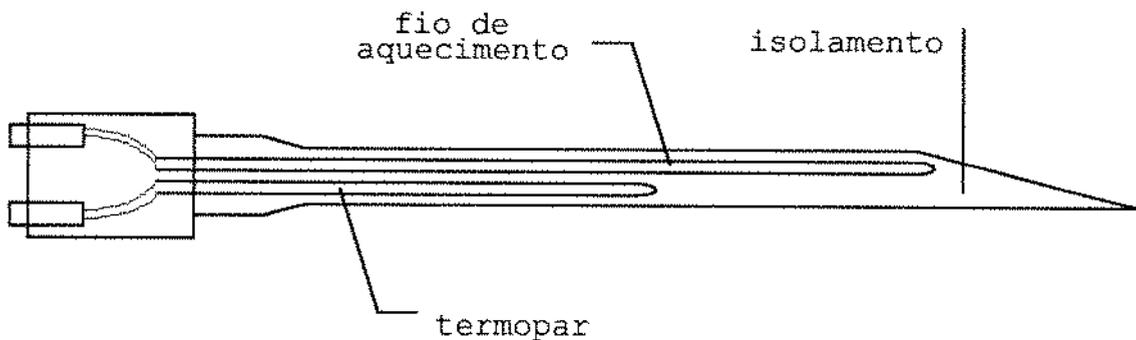
$$I = \text{intensidade de corrente na sonda (A);}$$

$$R = \text{resistência da sonda } (\Omega).$$

Assim,

$$k = \frac{I^2 \cdot R}{4 \cdot \pi \cdot b} \quad (3.7)$$

A sonda foi inicialmente calibrada medindo-se a condutividade térmica da água, acrescida de 2% de ágar para assegurar a não interferência da convecção.



**Figura 3.9.** Corte esquemático da sonda utilizada para determinar a condutividade térmica dos meios semi-sólidos

### **3.18. Caracterização cinética da amiloglicosidase (farelo fermentado)**

O farelo fúngico obtido durante o estudo em biorreatores de coluna foi utilizado para o estudo da caracterização cinética da amiloglicosidase bruta, conforme o descrito a seguir.

#### **3.18.1. Influência da concentração de substrato na atividade enzimática do farelo fermentado**

Para o estudo da influência da concentração de substrato sobre a atividade enzimática do farelo fermentado foi usada a técnica descrita por PARK (1972), com algumas alterações. O sistema era constituído de 25,0 ml da solução de substrato (amido p.a.) à concentração de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0 e 4,0 %, dissolvido em tampão acetato pH 4,2 e 1,0 ml do extrato enzimático obtido conforme o descrito em 3.6. Para cada concentração de substrato era feito um branco, com 1ml de

água destilada no lugar da enzima. O procedimento usado para a determinação das atividades enzimáticas é o mesmo descrito no item 3.7. Foram calculadas a Constante de MICHAELIS-MENTEN ( $K_m$ ) e a Velocidade Máxima ( $V_{max}$ ) segundo a equação de Lineweaver-Burk, conforme o descrito o por PRZYBYT & SUGIER (1988); NEHETE *et alii* (1987); RAMASESH *et alii* (1982).

### **3.18.2. Influência do pH na atividade enzimática**

Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática, o substrato utilizado foi amido p.a. 4% dissolvido em solução tampão. Os sistemas utilizados obedeciam a seus limites de ação tamponante: tampão acetato-ácido acético para os pH 3,6; 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 5,0 e 5,6 e tampão fosfato monobásico-bibásico de sódio para os pH 6,0, 7,0 e 8,0 (PASTORE, 1992). O sistema era constituído de 25,0 ml da solução de amido para cada pH e 1,0 ml do extrato enzimático obtido conforme o descrito em 3.6. O branco era feito no balão de pH 4,2, com 1 ml de água destilada no lugar da enzima. O procedimento usado para a determinação das atividades enzimáticas é o mesmo descrito no item 3.7, sendo usados os valores de atividade relativa para comparação entre os diferentes valores de pH (SATO, 1991).

### **3.18.3. Influência da temperatura na atividade enzimática**

Para o estudo da influência da temperatura na atividade enzimática, o substrato utilizado foi 25 ml de amido p.a. 4% dissolvido em solução tampão acetato com pH 4,2 e 1,0 ml do extrato enzimático obtido conforme o descrito em 3.6. As misturas de reação foram incubadas às temperaturas de 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C por 60 minutos. Para cada temperatura era feito um branco, com 1ml de água destilada no lugar da enzima. O procedimento usado para a determinação das atividades enzimáticas é o mesmo descrito no item 3.7, sendo usados os valores de atividade relativa para comparação entre as diferentes temperaturas (SATO, 1991).

#### **3.18.4.Estabilidade térmica da enzima**

Para o estudo da influência da temperatura na estabilidade da enzima bruta, o extrato enzimático obtido conforme o descrito em 3.6 foi pré-incubado às temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C. A cada 60 minutos, num total de 5 horas, 1 ml do extrato era retirado, determinando-se a sua atividade enzimática residual, conforme o descrito no item 3.7. Para cada amostra era feito um branco, com 1ml de água destilada no lugar da enzima.

#### **3.18.5.Estabilidade da enzima com o pH**

Para o estudo da influência do pH na estabilidade da enzima bruta, o extrato enzimático obtido em 3.6 era diluído, na proporção de 1:4, em tampões com diferentes valores de pH (3,6; 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 5,0; 6,0, 7,0 e 8,0), e incubado por 24 horas a 60°C. Após decorrido o tempo estabelecido, determinava-se a atividade enzimática residual de cada amostra, conforme o descrito no item 3.7.

#### **3.19.Planejamento Experimental**

O método escolhido para a fase de otimização do processo de produção de amiloglicosidase em embalagens de polipropileno foi o da Análise por Superfície de Resposta, composto por 88 experimentos divididos ao longo de 4 fases:

- a.Planejamento Fatorial Fracionário;
- b.Planejamento Composto Central com 4 variáveis;
- c.Caminho de Ascendência Máxima;
- d.Planejamento Composto Central com 3 variáveis.

As respostas estudadas foram a atividade enzimática (A) de amiloglicosidase do farelo, conforme 3.7, e a produtividade (P) do processo fermentativo, esta última definida como:

$$P = \frac{A_f - A_0}{t_f} \quad (3.8)$$

onde:

$A_f$ =atividade enzimática do farelo seco no instante  $t_f$   
(IU/g<sub>farelo seco</sub>);

$A_0$ =atividade enzimática do farelo seco no instante  
inicial (IU/g<sub>farelo seco</sub>);

$t_f$ =tempo de fermentação (h).

A Tabela 3.1 apresenta um resumo de todos os valores usados para as 6 variáveis dependentes durante o planejamento experimental.

Os resultados obtidos durante as duas etapas do planejamento por superfície de resposta foram submetidos à análise de variância (ANOVA), conforme o descrito no item 2.7.3.

**TABELA 3.1.** Resumo dos valores usados para as variáveis independentes durante o planejamento experimental

T (°C)	U (%)	t <sub>f</sub> (h)	C (%)	X (esporos/g meio)	t <sub>e</sub> (min)
30	40	48	15	1,0x10 <sup>4</sup>	0
35	50	84	20	1,0x10 <sup>5</sup>	7,5
		90	25	5,0x10 <sup>5</sup>	15,0
	60	96	30	7,3x10 <sup>5</sup>	22,5
		108	35	8,5x10 <sup>5</sup>	30,0
	118	50	9,6x10 <sup>5</sup>	33,0	
	120		1,0x10 <sup>6</sup>	37,5	
	123		1,1x10 <sup>6</sup>	40,0	
	128		1,2x10 <sup>6</sup>	45,0	
	132		1,3x10 <sup>6</sup>	50,0	
	134		1,5x10 <sup>6</sup>	52,5	
	139		2,7x10 <sup>6</sup>	60,0	
	144		5,0x10 <sup>6</sup>	67,0	
156		6,6x10 <sup>6</sup>	67,5		
174		1,0x10 <sup>7</sup>	75,0		

T=temperatura de fermentação

U=umidade do meio

t<sub>f</sub>=tempo de fermentação

C=concentração de casca

X=concentração de inóculo

t<sub>e</sub>=tempo de esterilização

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Fermentação semi-sólida em embalagem de polipropileno

#### 4.1.1. Planejamento Fatorial Fracionário

Para avaliar o efeito dos parâmetros envolvidos no processo de produção de amiloglicosidase e escolher dentre estes quais devem ser usados na modelagem por Superfície de Resposta, foi utilizado, nesta primeira etapa, um Planejamento Fatorial Fracionário.

Após análise da bibliografia corrente, verificou-se um grande número de variáveis estudadas na literatura. No entanto, estes estudos foram realizados, geralmente, com poucas variáveis e seus efeitos foram analisados em separado. Assim, as variáveis escolhidas para o presente trabalho foram:

- temperatura de fermentação (T);
- umidade do meio (U);
- tempo de fermentação ( $t_f$ );
- concentração de casca (C);
- concentração de inóculo (X);
- tempo de esterilização ( $t_e$ ).

O Planejamento Fatorial Fracionário montado foi do tipo  $2^{6-2}$  de resolução IV, conforme descrito por BOX et alii (1978). Com isto, os 64 experimentos necessários para o fatorial completo  $2^6$  foram reduzidos para 16 ensaios.

Os valores estudados para as variáveis nesta etapa, bem como a codificação utilizada, são apresentados na Tabela 4.1. As condições experimentais utilizadas para cada ensaio são mostradas, em seus valores reais, na Tabela 4.2. A Tabela 4.3 apresenta as variáveis em sua forma codificada e os valores

obtidos para a atividade enzimática e a produtividade. As funções geradoras do fatorial (BOX *et alii*, 1978), usadas para a construção da Tabela 4.3, foram definidas como: **5=123** e **6=234**

**TABELA 4.1.** Codificação das variáveis usadas no Planejamento Fatorial Fracionário

NÍVEIS	T	U	$t_f$	C	X	$t_e$
-	30	40	48	25	$1 \times 10^5$	0
+	35	60	96	50	$1 \times 10^7$	30

T (°C); U (%);  $t_f$  (h); C (%); X (esporos/g<sub>meio</sub>);  $t_e$  (min)

**TABELA 4.2.** Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{6-2}$  em valores reais

Experimento	T	U	$t_f$	C	X	$t_e$
1	30	40	48	25	$1 \times 10^5$	0
2	35	40	48	25	$1 \times 10^7$	0
3	30	60	48	25	$1 \times 10^7$	30
4	35	60	48	25	$1 \times 10^5$	30
5	30	40	96	25	$1 \times 10^7$	30
6	35	40	96	25	$1 \times 10^5$	30
7	30	60	96	25	$1 \times 10^5$	0
8	35	60	96	25	$1 \times 10^7$	0
9	30	40	48	50	$1 \times 10^5$	30
10	35	40	48	50	$1 \times 10^7$	30
11	30	60	48	50	$1 \times 10^7$	0
12	35	60	48	50	$1 \times 10^5$	0
13	30	40	96	50	$1 \times 10^7$	0
14	35	40	96	50	$1 \times 10^5$	0
15	30	60	96	50	$1 \times 10^5$	30
16	35	60	96	50	$1 \times 10^7$	30

T (°C); U (%);  $t_f$  (h); C (%); X (esporos/g<sub>meio</sub>);  $t_e$  (min)

**TABELA 4.3.** Variáveis codificadas e valores para a atividade enzimática e a produtividade durante o Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{6-2}$

Experimento	1	2	3	4	5	6	A	P
1	-	-	-	-	-	-	0,49	0,01
2	+	-	-	-	+	-	3,46	0,07
3	-	+	-	-	+	+	260,44	5,42
4	+	+	-	-	-	+	440,66	9,18
5	-	-	+	-	+	+	505,46	5,27
6	+	-	+	-	-	+	588,05	6,13
7	-	+	+	-	-	-	0,37	0,00
8	+	+	+	-	+	-	2,96	0,03
9	-	-	-	+	-	+	283,03	5,90
10	+	-	-	+	+	+	287,26	5,98
11	-	+	-	+	+	-	7,29	0,15
12	+	+	-	+	-	-	0,81	0,02
13	-	-	+	+	+	-	1,98	0,02
14	+	-	+	+	-	-	0,52	0,01
15	-	+	+	+	-	+	514,16	5,36
16	+	+	+	+	+	+	205,88	2,14

1=temperatura de fermentação (T);

2=umidade do meio (U);

3=tempo de fermentação ( $t_f$ );

4=concentração de casca (C);

5=concentração de inóculo (X);

6=tempo de esterilização ( $t_e$ );

A=Atividade enzimática (IU/gfarelo);

P=Produtividade (IU/gfarelo/h).

De acordo com a Tabela 4.3, os melhores valores para A e P alcançados nesta fase foram os relativos aos experimentos de números 6 e 4, respectivamente. Obtiveram-se 588,05 IU/g<sub>farelo</sub> para a atividade enzimática do farelo e 9,18 IU/g<sub>farelo</sub>/h para a produtividade do processo.

O Tabela 4.4 mostra a influência dos efeitos principais e dos efeitos de interação entre as variáveis, possíveis de

calcular para o fracionário construído, bem como os erros padrões associados aos mesmos. Os efeitos foram calculados conforme o método que emprega a Tabela dos Coeficientes de Contrastes ("Table of Contrast Coefficients"), descrito por BOX et alii (1978). Os erros foram obtidos pela estimativa das variâncias, conforme método descrito pelos mesmos autores.

**TABELA 4.4.** Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{6-2}$ : efeitos principais e de interação entre as variáveis, e seus erros padrões.

Efeito	RESPOSTA	
	A	P
Média	193,91 ± 1,33	+2,86 ± 0,02
Efeitos principais		
1	-5,43 ± 1,87	+0,18 ± 0,03
2	-29,74 ± 1,87	-0,13 ± 0,03
3	+67,02 ± 1,87	-0,97 ± 0,03
4	-62,60 ± 1,87	-0,82 ± 0,03
5	-69,20 ± 1,87	-0,94 ± 0,03
6	+383,36 ± 1,87	+5,63 ± 0,03
Efeitos de 2ª ordem		
1x2=1x2+3x5	-27,51 ± 1,87	-0,07 ± 0,03
1x3=1x3+2x5	-50,71 ± 1,87	-0,76 ± 0,03
1x4=1x4+5x6	-72,57 ± 1,87	-1,00 ± 0,03
1x5=1x5+2x3	-63,43 ± 1,87	-0,84 ± 0,03
1x6=1x6+4x5	-4,83 ± 1,87	+0,19 ± 0,03
2x4=2x4+3x6	-68,57 ± 1,87	-0,93 ± 0,03
2x6=2x6+3x4	-30,98 ± 1,87	-0,16 ± 0,03
4x6=4x6+2x3	-63,43 ± 1,87	-0,84 ± 0,03

1=temperatura de fermentação (T);

2=umidade do meio (U);

3=tempo de fermentação ( $t_f$ );

4=concentração de casca (C);

5=concentração de inóculo (X);

6=tempo de esterilização ( $t_e$ );

A=Atividade enzimática (IU/gfarelo);

P=Produtividade (IU/gfarelo/h).

Conforme BOX *et alii* (1978), através da comparação dos valores dos efeitos estimados para cada variável, com o erro padrão associado a ela, é possível predizer quais variáveis não contribuem de maneira significativa na resposta estudada. Assim, o exame da Tabela 4.4 sugere que os 6 parâmetros estudados afetam tanto a atividade quanto a produtividade. No entanto, é possível observar que as intensidades dos efeitos de algumas variáveis são bem diferenciadas. Para escolher quais destes parâmetros seriam utilizados para a Análise por Superfície de Resposta, compararam-se os valores dos efeitos principais, uma vez que a Resolução IV do fatorial torna difícil uma análise precisa dos valores de interação de 2ª ordem.

A variável que maior efeito exerce sobre a atividade e a produtividade é  $t_e$ . Um aumento de 0 para 30 minutos no valor de  $t_e$  faz com que a atividade do farelo seja aumentada em 383,36 IU/g<sub>farelo</sub>. O mesmo aumento em  $t_e$  provoca um acréscimo de 5,63 IU/g<sub>farelo</sub>/h na produtividade. A temperatura (T), ao contrário, pouco afeta a atividade enzimática, que foi reduzida em 5,43 IU/g<sub>farelo</sub> na mudança de 30 para 35°C. Para a mesma variação de T, a produtividade sofreu um acréscimo de apenas 0,17 IU/g<sub>farelo</sub>/h. Comparativamente, a alteração no conteúdo de umidade do meio (U) também pouco afetou as respostas estudadas. Cabe ressaltar a observação de que o aumento em U de 40 para 60% causou redução em A e P.

Com a análise da Tabela 4.4, pode-se observar que as variáveis que maior influência exerceram sobre a atividade foram, em ordem decrescente:  $t_e$ , X,  $t_f$  e C. Como  $t_e$  e  $t_f$  apresentaram efeito positivo, quando da passagem do nível (-) para o (+), a continuidade dos experimentos foi realizada com valores maiores para estas variáveis. Para a produtividade, as mesmas 4 variáveis atuaram de forma significativa, porém em ordem decrescente diferente:  $t_e$ ,  $t_f$ , X e C, sendo que somente  $t_e$  mostrou efeito principal positivo. Em função do exposto, os 4 parâmetros escolhidos para a otimização do presente processo fermentativo foram:  $t_f$ , C, X e  $t_e$ .

#### 4.1.2. Primeiro Planejamento Composto Central

Com o objetivo de obter modelos matemáticos empíricos de 1ª e 2ª ordem que descrevessem o comportamento da atividade e da produtividade em função de  $t_f$ ,  $C$ ,  $X$  e  $t_e$ , foi utilizado um Planejamento Composto Central ("Central Composite Designs") aplicável à Metodologia de Análise por Superfície de Resposta, proposto por BOX & WILSON (1951) e descrito por KHURI & CORNELL (1987) e BOX *et alii* (1978). O planejamento consistiu de um fatorial  $2^4$  (em duplicata), somado à chamada configuração "estrela" e com triplicata no ponto central, somando 43 ensaios. Para o ponto central, em torno do qual foi projetada esta fase, escolheram-se os seguintes valores:  $t_f = 108$  h;  $C = 25$  %;  $X = 5,05 \times 10^5$  esporos/g<sub>meio</sub> e  $t_e = 22,5$  min.

Os parâmetros do processo foram, nesta fase, estudados em 5 níveis codificados como: -2, -1, 0, +1 e +2. A aplicação da Equação 2.2 para o presente planejamento resulta na seguinte codificação para as variáveis:

$$X_1 = \frac{t_f - 108}{12} \quad (4.1)$$

$$X_2 = \frac{C - 25}{5} \quad (4.2)$$

$$X_3 = \frac{X - 5,05 \times 10^5}{4,95 \times 10^5} \quad (4.3)$$

$$X_4 = \frac{t_e - 22,5}{7,5} \quad (4.4)$$

onde:

$X_1$ =variável codificada para  $t_f$ ;

$X_2$ =variável codificada para  $C$ ;

$X_3$ =variável codificada para  $X$ ;

$X_4$ =variável codificada para  $t_e$ .

Os valores estudados para as variáveis nesta etapa, bem como a codificação utilizada, são apresentados na Tabela 4.5. A partir dessa etapa, e em função dos resultados obtidos na fase anterior, mantiveram-se constantes  $T=30^{\circ}\text{C}$  e  $U=50\%$ . As condições experimentais utilizadas para cada ensaio são mostradas, em seus valores reais, na Tabela 4.6. A Tabela 4.7 apresenta as variáveis em sua forma codificada, além dos valores obtidos para a atividade enzimática e a produtividade do processo.

**TABELA 4.5.** Codificação das variáveis usadas no 1º Planejamento Composto Central

NÍVEIS	$t_f$	C	X	$t_e$
-2	84	15	—	7,5
-1	96	20	$1,0 \times 10^4$	15,0
0	108	25	$5,0 \times 10^5$	22,5
+1	120	30	$1,0 \times 10^6$	30,0
+2	132	35	$1,5 \times 10^6$	37,5

$t_f$  (h); C (%); X (esporos/ $g_{meio}$ );  $t_e$  (min)

**TABELA 4.6.** Primeiro Planejamento Composto Central em valores reais

Experimento	$t_f$ (h)	C (%)	X (esporos/g meio)	$t_e$ (min)
17	96	20	$1,0 \times 10^4$	15
18	96	20	$1,0 \times 10^4$	15
19	120	20	$1,0 \times 10^4$	15
20	120	20	$1,0 \times 10^4$	15
21	96	30	$1,0 \times 10^4$	15
22	96	30	$1,0 \times 10^4$	15
23	120	30	$1,0 \times 10^4$	15
24	120	30	$1,0 \times 10^4$	15
25	96	20	$1,0 \times 10^6$	15
26	96	20	$1,0 \times 10^6$	15
27	120	20	$1,0 \times 10^6$	15
28	120	20	$1,0 \times 10^6$	15
29	96	30	$1,0 \times 10^6$	15
30	96	30	$1,0 \times 10^6$	15
31	120	30	$1,0 \times 10^6$	15
32	120	30	$1,0 \times 10^6$	15
33	96	20	$1,0 \times 10^4$	30
34	96	20	$1,0 \times 10^4$	30
35	120	20	$1,0 \times 10^4$	30
36	120	20	$1,0 \times 10^4$	30
37	96	30	$1,0 \times 10^4$	30
38	96	30	$1,0 \times 10^4$	30
39	120	30	$1,0 \times 10^4$	30
40	120	30	$1,0 \times 10^4$	30
41	96	20	$1,0 \times 10^6$	30
42	96	20	$1,0 \times 10^6$	30
43	120	20	$1,0 \times 10^6$	30
44	120	20	$1,0 \times 10^6$	30
45	96	30	$1,0 \times 10^6$	30
46	96	30	$1,0 \times 10^6$	30
47	120	30	$1,0 \times 10^6$	30
48	120	30	$1,0 \times 10^6$	30
49	108	25	$5,0 \times 10^5$	22,5
50	108	25	$5,0 \times 10^5$	22,5
51	108	25	$5,0 \times 10^5$	22,5
52	84	25	$5,0 \times 10^5$	22,5
53	132	25	$5,0 \times 10^5$	22,5
54	108	15	$5,0 \times 10^5$	22,5
55	108	35	$5,0 \times 10^5$	22,5
56	108	25	$1,0 \times 10^4$	22,5
57	108	25	$1,5 \times 10^6$	22,5
58	108	25	$5,0 \times 10^5$	7,5
59	108	25	$5,0 \times 10^5$	37,5

**TABELA 4.7.** Variáveis codificadas e valores para a atividade enzimática e a produtividade durante o primeiro Planejamento Composto Central

Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	A (IU/gfarelo)	P (IU/gfarelo/h)
17	-1	-1	-1	-1	75,23	0,78
18	-1	-1	-1	-1	72,41	0,75
19	+1	-1	-1	-1	93,01	0,78
20	+1	-1	-1	-1	92,04	0,77
21	-1	+1	-1	-1	234,31	2,44
22	-1	+1	-1	-1	255,98	2,67
23	+1	+1	-1	-1	200,11	1,67
24	+1	+1	-1	-1	195,52	1,63
25	-1	-1	+1	-1	144,97	1,51
26	-1	-1	+1	-1	150,15	1,56
27	+1	-1	+1	-1	258,63	2,16
28	+1	-1	+1	-1	271,51	2,26
29	-1	+1	+1	-1	168,03	1,75
30	-1	+1	+1	-1	173,37	1,81
31	+1	+1	+1	-1	187,51	1,56
32	+1	+1	+1	-1	193,33	1,61
33	-1	-1	-1	+1	135,43	1,41
34	-1	-1	-1	+1	146,52	1,53
35	+1	-1	-1	+1	345,61	2,88
36	+1	-1	-1	+1	392,40	3,27
37	-1	+1	-1	+1	344,02	3,58
38	-1	+1	-1	+1	380,18	3,96
39	+1	+1	-1	+1	525,78	4,38
40	+1	+1	-1	+1	551,62	4,60
41	-1	-1	+1	+1	231,87	2,42
42	-1	-1	+1	+1	259,98	2,71
43	+1	-1	+1	+1	647,67	5,40
44	+1	-1	+1	+1	696,31	5,80
45	-1	+1	+1	+1	474,11	4,94
46	-1	+1	+1	+1	478,91	4,99
47	+1	+1	+1	+1	345,16	2,88
48	+1	+1	+1	+1	331,91	2,77
49	0	0	0	0	123,67	1,15
50	0	0	0	0	374,74	3,47
51	0	0	0	0	150,16	1,39
52	-2	0	0	0	222,09	2,64
53	+2	0	0	0	388,64	2,94
54	0	-2	0	0	277,91	2,57
55	0	+2	0	0	208,00	1,93
56	0	0	-1*	0	270,52	2,50
57	0	0	+2	0	269,00	2,49
58	0	0	0	-2	94,87	0,88
59	0	0	0	+2	579,08	5,36

\*O valor -2 corresponderia a um valor negativo para X

#### 4.1.2.1. Modelos para Atividade Enzimática

Após regressão das respostas dos experimentos apresentadas na Tabela 4.7, utilizando o programa computacional MODREG (BARROS NETO et alii, 1995), foi possível obter o seguinte modelo de 1ª ordem que relaciona a atividade enzimática com as variáveis estudadas:

$$A = 278,75 + 48,39.X_1 + 22,16.X_2 + 26,00.X_3 + 112,24.X_4 \quad (4.5)$$

No Quadro 4.1 é encontrada a análise de variância para o modelo de 1ª ordem apresentado. A comparação do valor calculado para F, com o valor tabelado, mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade enzimática é significativo ao nível de confiança de 99% e explica 95,94% da variação das respostas encontradas.

**Quadro 4.1.** Análise de variância para o modelo de 1ª ordem obtido para a atividade enzimática

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	642.268,84	4	160.567,21	15,30
Desvios	398.737,23	38	10.493,09	—
Total	1.041.006,07	42	—	—

Coefficiente de Correlação=0,9594

Valor de F tabelado:  $F_{(0,99;4;38)}=3,87$

Utilizando o programa MODREG, ajustou-se o seguinte modelo de 2ª ordem para a atividade em função das variáveis codificadas:

$$\begin{aligned}
 A = & 232,28 + 48,39.X_1 + 22,16.X_2 + 27,08.X_3 + 112,25.X_4 + \\
 & 18,92.X_1^2 + 3,31.X_2^2 + 0,95.X_3^2 + 26,82.X_4^2 - \\
 & 48,71.X_1.X_2 + 3,08.X_1.X_3 + 36,51.X_1.X_4 - 51,36.X_2.X_3 + \\
 & 3,93.X_2.X_4 + 9,86.X_3.X_4
 \end{aligned} \tag{4.6}$$

O Quadro 4.2 apresenta a análise de variância para o modelo de 2ª ordem obtido. A análise deste quadro indica que, também para o modelo quadrático, a equação ajustada é significativa ao nível de confiança de 99%, sendo que explica 95,94% da variação das respostas encontradas para a atividade.

**Quadro 4.2.** Análise de variância para o modelo de 2ª ordem obtido para a atividade enzimática

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	871.188,78	14	62.227,77	10.26
Desvios	169.815,43	28	6.064,84	—
Total	1.041.004,21	42	—	—

Coefficiente de Correlação=0,9594

Valor de F tabelado:  $F_{(0,99;14;28)}=2,80$

Assim, os modelos linear e quadrático ajustados são estatisticamente representativos da variação da atividade enzimática nas condições experimentais utilizadas. A escolha de qual dos modelos melhor descreve esta variação não pode ser realizada pela simples comparação dos valores de F, ou dos coeficientes de correlação, uma vez que os graus de liberdade ligados a cada modelo são diferentes. A escolha foi realizada através da comparação do F calculado pela Equação 4.7 com o valor tabelado de  $F_{(\alpha;v_1;v_2)}$  para  $v_1=r$  e  $v_2=N-p$  (CORNELL,1981), cujo procedimento é denominado "Teste de Preferência entre Modelos".

$$F = \frac{(SSE_{RED} - SSE_{COM}) / r}{SSE_{COM} / (N - P)} \quad (4.7)$$

onde:

$SSE_{COM}$  = soma dos quadrados dos desvios do modelo completo;

$SSE_{RED}$  = soma dos quadrados dos desvios do modelo reduzido;

$N$  = número de ensaios - 1;

$p$  = número de parâmetros do modelo completo;

$r$  = diferença entre  $p$  e o número de termos do modelo reduzido;

$\alpha$  = nível de confiança.

Com a substituição dos valores encontrados nas Tabelas 4.8 e 4.9, na Equação 4.7, obteve-se  $F=3,64$ . Como o valor tabelado para  $F(0,99;10;27)=3,06$  é menor, conclui-se, a um nível de confiança de 99%, que o modelo quadrático é, para as condições experimentais utilizadas, aquele que melhor explica a variação das respostas encontradas para a atividade enzimática do farelo em função de  $t_f$ ,  $C$ ,  $X$  e  $t_e$ .

A substituição das variáveis codificadas, dadas pelas Equações 4.1 a 4.4 na Equação 4.6, produz a seguinte expressão para atividade como função das variáveis reais:

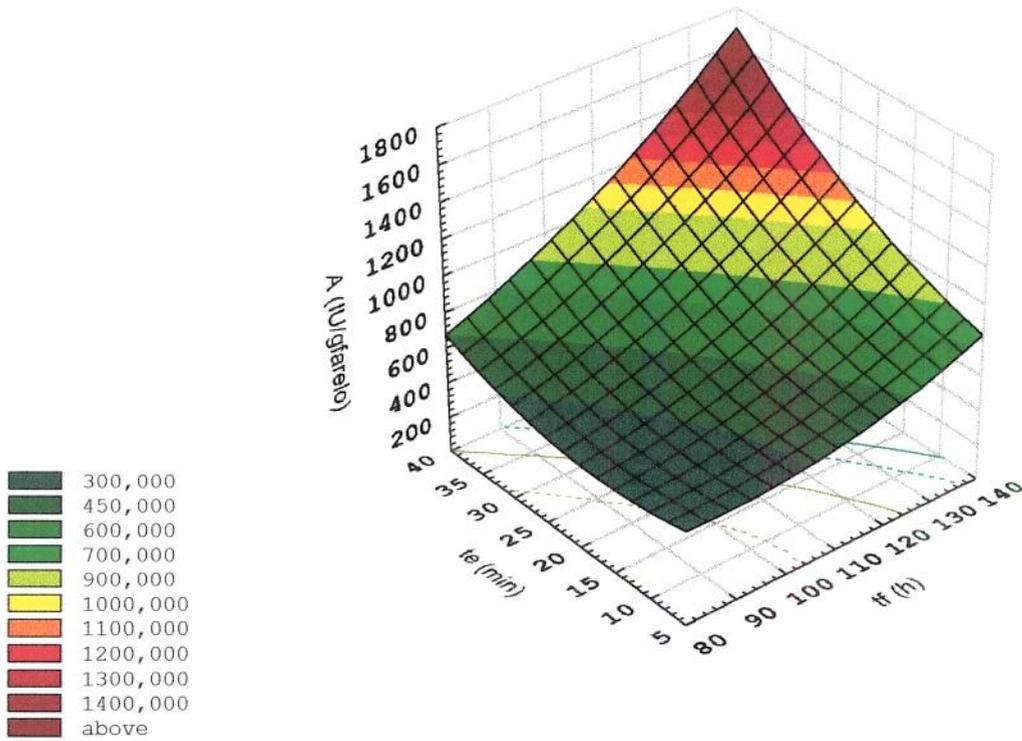
$$\begin{aligned} A = & -174,89 - 13,29.t_f + 93,66.C + 4,55 \times 10^{-4}.X - 54,75.t_e + \\ & 0,13.t_f^2 + 0,13.C^2 + 3,88 \times 10^{-12}.X^2 + 0,48.t_e^2 - \\ & 0,81.t_f.C + 5,19 \times 10^{-7}.t_f.X + 0,41.t_f.t_e - 2,08 \times 10^{-5}.C.X + \\ & 0,10.C.t_e + 2,66 \times 10^{-6}.X.t_e \end{aligned} \quad (4.8)$$

Os altos valores encontrados para os coeficientes de  $X_4$  nas Equações 4.5 e 4.6 mostram a grande influência desta variável no processo. Com o aumento do tempo de esterilização,

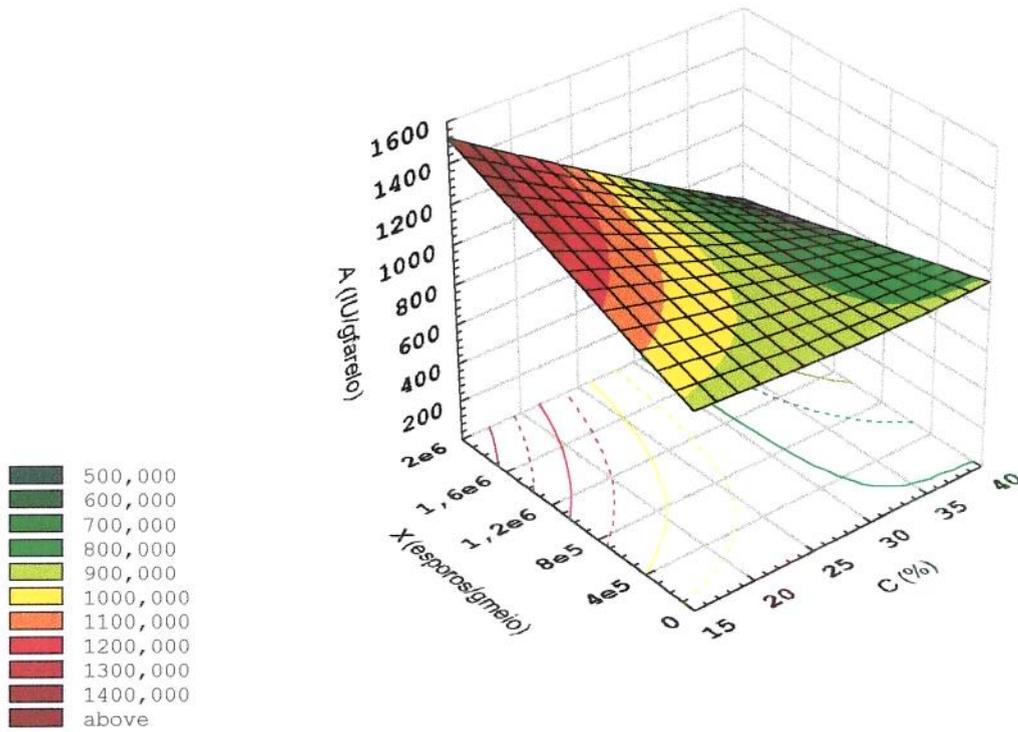
aumenta também a geleificação e/ou hidrólise parcial do amido presente no substrato, elevando a disponibilidade de glicose e dextrinas para o crescimento inicial do microrganismo. Se o aumento em A e P fosse devido somente à diminuição da carga microbiana em razão da esterilização, tanto valores intermediários como elevados de  $t_e$  produziriam os mesmos resultados; além disso, a condução de experimentos em condições não-assépticas não acarretou diminuição significativa nos valores de A e P (dados não mostrados). Os coeficientes de  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  também indicam um aumento nos valores da atividade com o aumento dos valores de  $t_f$ , C e X; no entanto, os coeficientes também indicam a existência de interações negativas (efeito antagônico) entre  $X_1$ - $X_2$  ( $t_f$ -C) e  $X_2$ - $X_3$  (C-X) nas duas equações. Para uma análise mais detalhada deste comportamento, utilizou-se a Equação 4.8 para construir gráficos tridimensionais (superfícies de resposta) que possibilitassem estudar as interações entre variáveis.

A variação da atividade com relação a  $t_f$  e  $t_e$  para condições fixas de C e X está representada na Figura 4.1. Observa-se o forte efeito do aumento de  $t_e$  na atividade. O comportamento de  $t_f$  é semelhante, com exceção feita para baixos valores de  $t_e$ , nos quais nota-se uma pequena diminuição de A com o aumento de  $t_f$ , talvez devida à contaminação microbiana inicial, que a partir de um certo tempo compete, em vantagem, com o *Aspergillus*. Também se torna impossível estabelecer limites teóricos de  $t_f$  e  $t_e$  para determinar seus valores ótimos. Para os experimentos realizados, os melhores valores obtidos são:  $t_f = 132$  horas e  $t_e = 37,5$  minutos.

A Figura 4.2 mostra o efeito de C e X na atividade, para condições restritivas de  $t_f$  e  $t_e$ . É possível notar que, para os valores analisados de  $t_f$  e  $t_e$ , duas condições de operação são possíveis para obterem-se, como resposta, altos valores de A: baixos valores de C combinados com altos valores de X; ou altos valores de C conjuntamente com baixos de X. Também nota-se uma maior influência de X em relação a C. Teoricamente, seria impossível estabelecer limites de C e X para determinar os



**Figura 4.1.** Variação da atividade com  $t_f$  e  $t_e$  para  $C=15\%$  e  $X=1,5 \times 10^6$  esporos/gmeio



**Figura 4.2.** Variação da atividade com  $C$  e  $X$  para  $t_f=132$  h e  $t_e=37,5$  min

valores ótimos destas variáveis. Assim, os limites adotados foram os valores extremos analisados praticamente:  $C=15\%$  e  $X=1,50 \times 10^6$  esporos/g<sub>meio</sub>. Valores muito baixos de  $C$ , para uma escala maior de produção, podem ser indesejados, principalmente nos biorreatores verticais de leito fixo, onde a transferência de massa (principalmente de água e oxigênio) e calor são os fatores limitantes do crescimento do fungo.

#### 4.1.2.2. Modelos para Produtividade

Utilizando-se do mesmo método aplicado no item 4.1.2.1, a regressão para os valores de produtividade, apresentados na Tabela 4.7, forneceu o seguinte modelo de 1ª ordem:

$$P = 2,57 + 0,15.X_1 + 0,25.X_2 + 0,24.X_3 + 1,02.X_4 \quad (4.9)$$

A análise de variância para este modelo de 1ª ordem é apresentada no Quadro 4.3. O modelo explica 95,57% da variação das respostas, sendo significativo ao nível de confiança de 99%.

**Quadro 4.3.** Análise de variância do modelo de 1ª ordem obtido para a produtividade

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	47,13	4	11,78	13,97
Desvios	32,05	38	0,84	—
Total	79,18	42	—	—

Coefficiente de Correlação=0,9544

Valor de F tabelado:  $F_{(0,99;4;38)}=3,87$

O modelo de 2ª ordem obtido para relacionar a produtividade prevista com as variáveis estudadas, em sua forma codificada, foi o seguinte:

$$\begin{aligned}
 P = & 2,15 + 0,15.X_1 + 0,25.X_2 + 0,25.X_3 + 1,02.X_4 + \\
 & 0,16.X_1^2 + 0,03.X_2^2 + 4,74 \times 10^{-3}.X_3^2 + 0,25.X_4^2 - \\
 & 0,49.X_1.X_2 + 3,43 \times 10^{-3}.X_1.X_3 + 0,23.X_1.X_4 - \\
 & 0,45.X_2.X_3 + 0,07.X_2.X_4 + 0,11.X_3.X_4
 \end{aligned} \tag{4.10}$$

No Quadro 4.4 é apresentada a análise de variância para o modelo de 2ª ordem, que se mostrou significativo ao nível de confiança de 99%. O modelo explica 95,57% das respostas obtidas para a produtividade.

**Quadro 4.4.** Análise de variância do modelo de 2ª ordem obtido para a produtividade

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	65,19	14	4,66	9,32
Desvios	14,00	28	0,50	—
Total	79,19	42	—	—

Coeficiente de Correlação=0,9544

Valor de F tabelado:  $F_{(0,99;14;28)}=2,80$

A escolha de qual dos modelos melhor descreve a variação da produtividade com as variáveis independentes foi realizada pela aplicação do "Teste de Preferência entre Modelos". A aplicação da Equação 4.7, com os valores apresentados nas Tabelas 4.10 e 4.11, resultou em  $F=3,48$ . Através da comparação deste valor com o tabelado para  $F_{(0,99;10;27)}=3,06$ , concluiu-se que, com um nível de confiança de 99%, o modelo de 2ª ordem é o

que melhor explica as respostas encontradas para a produtividade do processo fermentativo.

A substituição das Equações 4.1 a 4.4 na Equação 4.10 fornece a seguinte expressão para a produtividade como função das variáveis reais:

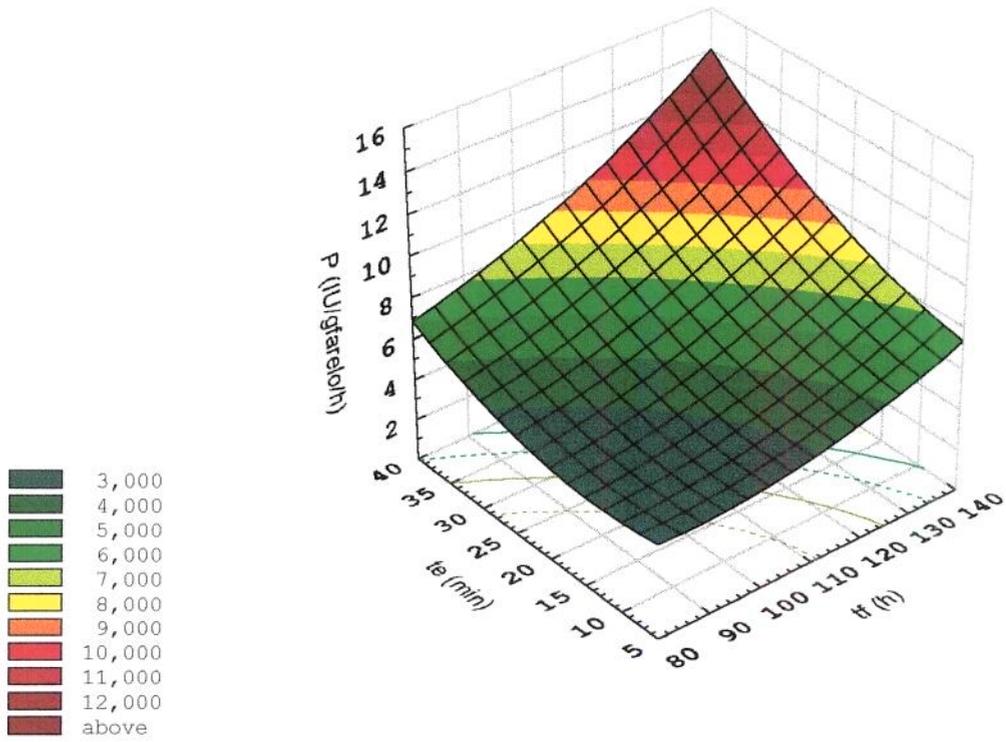
$$\begin{aligned}
 P = & -4,56 - 0,08.t_f + 0,92.C + 4,39 \times 10^{-6}.X - 0,40.t_e + \\
 & 1,11 \times 10^{-3}.t_f^2 + 1,20 \times 10^{-3}.C^2 + 4,44 \times 10^{-3}.t_e^2 - \\
 & 8,17 \times 10^{-3}.t_f.C + 2,56 \times 10^{-3}.t_f.t_e - 1,82 \times 10^{-7}.C.X + \\
 & 1,87 \times 10^{-3}.C.t_e + 2,96 \times 10^{-8}.X.t_e
 \end{aligned} \tag{4.11}$$

Da mesma forma como aconteceu para a atividade, os valores elevados para os coeficientes de  $X_4$  nas Equações 4.9 e 4.10 mostram o maior peso do tempo de esterilização ( $t_e$ ) sobre a produtividade. Contrariamente ao esperado,  $C$  e  $X$ , comparado a  $t_f$ , parecem exercer maior influência sobre  $P$ .

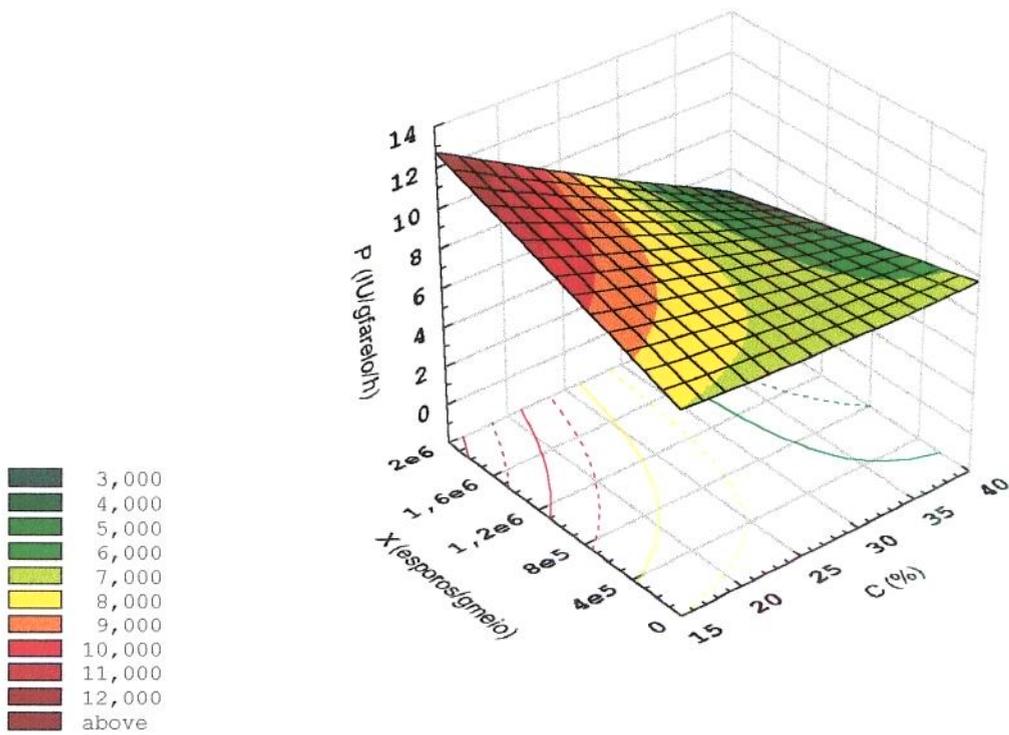
Na Figura 4.3 encontra-se graficado o efeito que  $t_f$  e  $t_e$  exercem sobre a produtividade para condições fixas de  $C$  e  $X$ . Observa-se o grande efeito que  $t_e$  exerce sobre  $P$ , principalmente para valores maiores (acima de 20 minutos) fazendo com que mesmo  $t_f$ , para as condições estudadas, tenha um efeito positivo sobre a Produtividade.

A Figura 4.4 mostra o comportamento da Produtividade com a variação de  $C$  e  $X$  para  $t_f$  e  $t_e$  constantes. Os melhores valores para  $P$  são obtidos trabalhando-se com baixos valores de  $C$  e altos valores de  $X$ , de modo semelhante ao comportamento mostrado na Atividade Enzimática.

Novos experimentos foram necessários para determinar valores mais precisos para estas variáveis, em especial para  $t_e$ , uma vez que as reações bioquímicas devidas ao aumento no tratamento térmico tendem a crescer drasticamente.



**Figura 4.3.**Variação da produtividade com  $t_f$  e  $t_e$  para  $C=15\%$  e  $X=1,5 \times 10^6$  esporos/gmeio



**Figura 4.4.**Variação da produtividade com  $C$  e  $X$  para  $t_f=132$  h e  $t_e=37,5$  min

### 4.1.3. Caminho de Ascendência Máxima

Como a região de investigação da Superfície de Resposta estava longe de um ponto de maximização, utilizou-se a metodologia descrita por CORNELL (1990) e KHURI & CORNELL (1987), denominada Caminho de Ascendência Máxima ("Steepest Ascent Path") para estabelecer um novo Ponto Central e uma nova região de estudo.

Em função da concentração de casca de arroz no meio (C) ter demonstrado, na fase anterior, ser a variável de menor influência nas respostas estudadas, manteve-se seu valor constante em 15%.

Para determinação dos valores de  $t_f$ ,  $X$  e  $t_e$  a serem examinados ao longo do Caminho de Ascendência Máxima, utilizou-se a Equação 4.5, obtida na fase anterior, que descreve o modelo de 1ª ordem para a atividade enzimática. Aplicando as Equações 2.2, 2.7 e 2.8 e arbitrando a troca incremental  $\Delta_4=15,0$  minutos, para  $t_e$ , temos:

$$X_4 = \frac{\Delta_4}{\Delta Z_4 / 2} = \frac{15}{7,5} = 2,0 \quad (4.12)$$

$$v = \frac{b_4}{2 \cdot X_4} = \frac{112,24}{2 \cdot 2} = 28,06 \quad (4.13)$$

$$X_1 = \frac{b_1}{2 \cdot v} = \frac{48,39}{2 \cdot 28,06} = 0,86 \quad (4.14)$$

$$\Delta_1 = X_1 \cdot (\Delta Z_1 / 2) = 0,86 \cdot 12 = 10,32 \text{ h} \quad (4.15)$$

$$X_3 = \frac{b_3}{2 \cdot v} = \frac{26,00}{2 \cdot 28,06} = 0,46 \quad (4.16)$$

$$\Delta_3 = X_3 \cdot (\Delta Z_3 / 2) = 0,46 \cdot 4,95 \times 10^5 = 2,28 \times 10^5 \text{ esporos/g}_{\text{meio}} \quad (4.17)$$

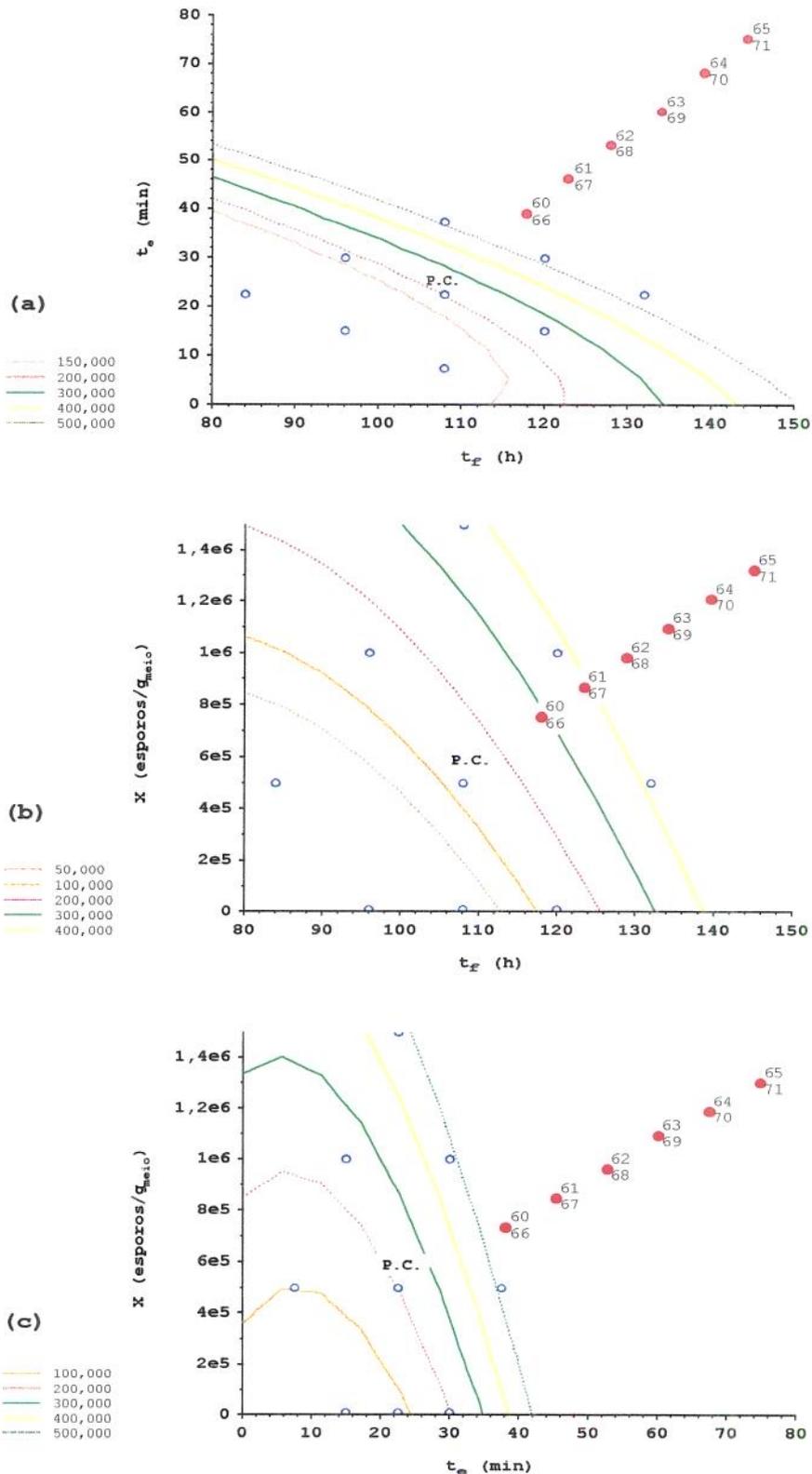
A partir dos valores acima determinados para  $X_1$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $\Delta_1$ ,  $\Delta_3$  e  $\Delta_4$ , construiu-se o planejamento para o caminho de ascendência, cujas coordenadas são apresentadas na Tabela 4.8 em sua forma real. Na Figura 4.5 é mostrada a representação geométrica destes pontos para as variáveis estudadas. Para

melhor visualização deste estudo também são reproduzidos neste gráfico os pontos centrais (P.C.), os pontos da configuração estrela e as linhas de contorno da atividade enzimática do primeiro planejamento composto central.

**TABELA 4.8.** Pontos ao longo do Caminho de Ascendência Máxima em valores reais

Experimento	Parâmetro	$t_f$	X	$t_e$
—	PC	108	$5,0 \times 10^5$	22,5
—	$\Delta_i$	10,32	$2,28 \times 10^5$	15
60	PC+1,0 $\Delta_i$	118	$7,3 \times 10^5$	37,5
61	PC+1,5 $\Delta_i$	123	$8,5 \times 10^5$	45
62	PC+2,0 $\Delta_i$	128	$9,6 \times 10^5$	52,5
63	PC+2,5 $\Delta_i$	134	$1,1 \times 10^6$	60
64	PC+3,0 $\Delta_i$	139	$1,2 \times 10^6$	67,5
65	PC+3,5 $\Delta_i$	144	$1,3 \times 10^6$	75
66	PC+1,0 $\Delta_i$	118	$7,3 \times 10^5$	37,5
67	PC+1,5 $\Delta_i$	123	$8,5 \times 10^5$	45
68	PC+2,0 $\Delta_i$	128	$9,6 \times 10^5$	52,5
69	PC+2,5 $\Delta_i$	134	$1,1 \times 10^6$	60
70	PC+3,0 $\Delta_i$	139	$1,2 \times 10^6$	67,5
71	PC+3,5 $\Delta_i$	144	$1,3 \times 10^6$	75

$t_f$  (h); C (%); X (esporos/ $g_{meio}$ );  $t_e$  (min); PC=Ponto Central

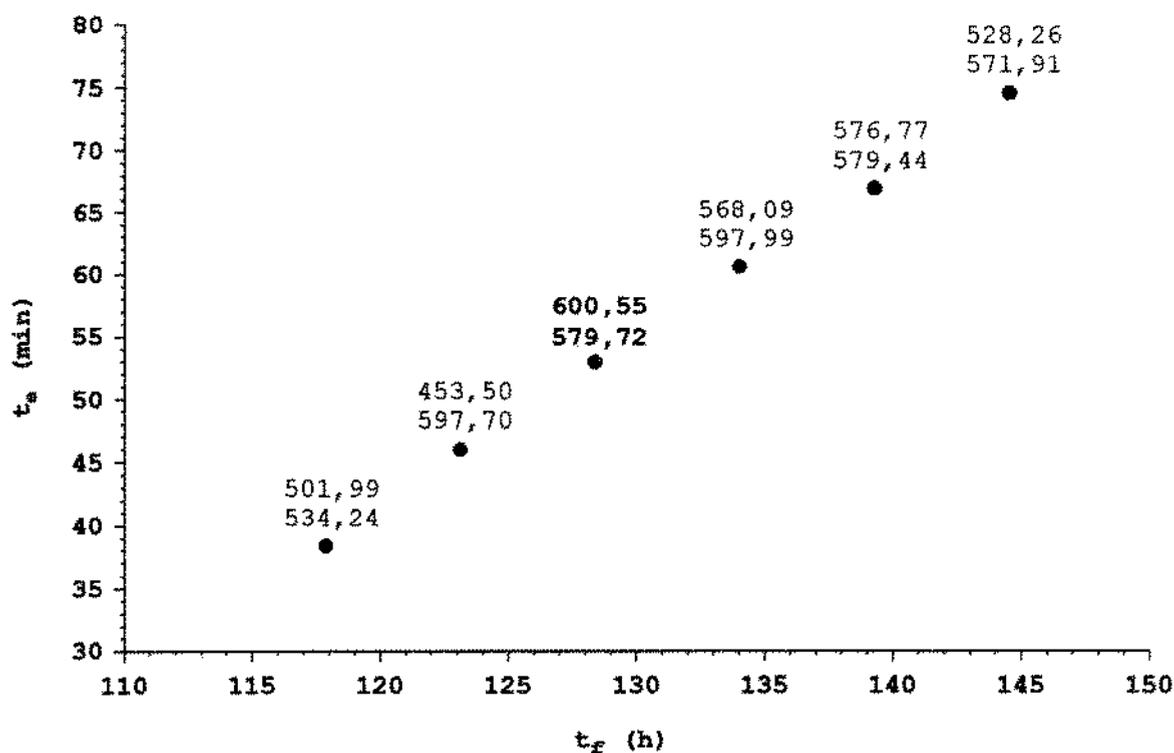


**Figura 4.5.** Ensaios realizados durante o Caminho de Ascendência Máxima (●); pontos centrais (P.C.) e configuração estrela (○) e linhas de contorno para atividade enzimática do primeiro planejamento composto central, em função de: (a)  $t_f$  e  $t_e$ ; (b)  $t_f$  e  $X$ ; e (c)  $t_e$  e  $X$ .

A Tabela 4.9 apresenta as variáveis na forma codificada, e os valores obtidos para a atividade enzimática nesta fase. Os pontos experimentais ensaiados para  $t_f$  e  $t_e$  são mostrados, com os respectivos valores da atividade, na Figura 4.6. Nota-se, nesta Figura, um aumento inicial na atividade enzimática do farelo, cujo valor médio para os ensaios 60 e 66 é de 518,12IU/g<sub>farelo</sub>. No terceiro ponto desta figura (ensaios 62 e 68), a atividade tem seu valor médio máximo para este planejamento (590,14IU/g<sub>farelo</sub>), decrescendo a partir de então até o valor médio de 550,09IU/g<sub>farelo</sub> para os experimentos 65 e 71. Assim, a região de estudo nas proximidades dos ensaios 62 e 68 acenou com a possibilidade da existência de um máximo na produção da enzima com relação a  $t_f$  e/ou  $t_e$  e/ou X.

**TABELA 4.9.** Variáveis codificadas e valores obtidos para a atividade enzimática ao longo do Caminho de Ascendência Máxima

Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	A (IU/gfarelo)
60	0,86	0,46	2,00	501,99
61	1,25	0,69	3,00	453,50
62	1,67	0,92	4,00	600,55
63	2,08	1,16	5,00	568,09
64	2,58	1,38	6,00	576,77
65	3,00	1,61	7,00	528,26
66	0,86	0,46	2,00	534,24
67	1,25	0,69	3,00	597,70
68	1,67	0,92	4,00	579,72
69	2,08	1,16	5,00	597,99
70	2,58	1,38	6,00	579,44
71	3,00	1,61	7,00	571,91



**Figura 4.6.** Valores apresentados pela atividade enzimática ( $IU/g_{\text{farelo}}$ ) ao longo do Caminho De Ascendência Máxima, em função de  $t_f$  e  $t_e$ .

Analisando os valores apresentados na Tabela 4.9 e o comportamento da Figura 4.6, bem como a impossibilidade de se usarem determinados intervalos de variação para  $X$  (possibilidade de valor negativo para a concentração inicial de esporos), decidiu-se pela escolha do seguinte ponto central para continuar os estudos por superfície de resposta:  $t_f = 132$  h;  $X = 2,7 \times 10^6$  esporos/gmeio e  $t_e = 50$  min.

#### 4.1.4. Segundo Planejamento Composto Central

Utilizou-se um novo Planejamento Composto Central para avaliar e modelar o comportamento da atividade e da produtividade, em função de  $t_f$ ,  $X$  e  $t_e$ . O Planejamento consistiu de um fatorial  $2^3$ , somado à chamada configuração "estrela" e com triplicata no ponto central, somando 17 ensaios. A concentração de casca de arroz no meio (C) foi mantida constante em 15%.

Os parâmetros do processo foram estudados em 5 níveis codificados como: -1,73; -1; 0; +1 e +1,73. Para o presente planejamento utilizou-se a seguinte codificação:

$$Y_1 = \frac{t_f - 132}{24} \quad (4.18)$$

$$Y_2 = \frac{X - 2,75 \times 10^6}{2,25 \times 10^6} \quad (4.19)$$

$$Y_3 = \frac{t_e - 50}{10} \quad (4.20)$$

onde:

$Y_1$ =variável codificada para  $t_f$ ;

$Y_2$ =variável codificada para  $X$ ;

$Y_3$ =variável codificada para  $t_e$ .

Os valores estudados para as variáveis nesta etapa, bem como a codificação utilizada, são mostrados na Tabela 4.10. As condições experimentais utilizadas para cada ensaio são apresentadas em suas formas reais na Tabela 4.11. A Tabela 4.12 apresenta as variáveis em sua forma codificada, juntamente com os valores obtidos para a atividade enzimática e a produtividade do processo.

**TABELA 4.10.** Codificação das variáveis usadas no 2º Planejamento Composto Central

NÍVEIS	$t_f$	X	$t_e$
-1,73	90	—	33
-1	108	$5,0 \times 10^5$	40
0	132	$2,7 \times 10^6$	50
+1	156	$5,0 \times 10^6$	60
+1,73	174	$6,6 \times 10^6$	67

$t_f$  (h); X (esporos/g<sub>meio</sub>);  $t_e$  (min)

**TABELA 4.11.** Planejamento Composto Central em valores reais

Experimento	$t_f$	X	$t_e$
72	108	$5,0 \times 10^5$	40
73	156	$5,0 \times 10^5$	40
74	108	$5,0 \times 10^6$	40
75	156	$5,0 \times 10^6$	40
76	108	$5,0 \times 10^5$	60
77	156	$5,0 \times 10^5$	60
78	108	$5,0 \times 10^6$	60
79	156	$5,0 \times 10^6$	60
80	132	$2,7 \times 10^6$	50
81	132	$2,7 \times 10^6$	50
82	132	$2,7 \times 10^6$	50
83	90	$2,7 \times 10^6$	50
84	174	$2,7 \times 10^6$	50
85	132	$5,0 \times 10^5$	50
86	132	$6,6 \times 10^6$	50
87	132	$2,7 \times 10^6$	33
88	132	$2,7 \times 10^6$	67

$t_f$  (h); X (esporos/g<sub>meio</sub>);  $t_e$  (min)

**TABELA 4.12.** Variáveis codificadas e valores obtidos para a atividade enzimática e a produtividade durante o Segundo Planejamento Composto Central

Experimento	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	A (IU/g <sub>farelo</sub> )	P (IU/g <sub>farelo</sub> /h)
72	-1	-1	-1	250,52	2,32
73	+1	-1	-1	533,68	3,42
74	-1	+1	-1	731,79	6,78
75	+1	+1	-1	775,66	4,97
76	-1	-1	+1	476,67	4,41
77	+1	-1	+1	718,51	4,61
78	-1	+1	+1	769,96	7,13
79	+1	+1	+1	605,52	3,88
80	0	0	0	701,03	5,31
81	0	0	0	686,90	5,20
82	0	0	0	735,04	5,57
83	-1,73	0	0	363,05	4,03
84	+1,73	0	0	786,39	4,52
85	0	-1*	0	503,97	3,82
86	0	+1,73	0	442,35	3,35
87	0	0	-1,73	713,62	5,41
88	0	0	+1,73	807,55	6,12

\*O valor -1,73 corresponderia a um valor negativo para X

#### 4.1.4.1. Modelos para Atividade Enzimática

Com a regressão das respostas dos experimentos apresentadas na Tabela 4.12 foi possível obter o seguinte modelo de 1ª ordem, que relaciona a atividade enzimática com as variáveis estudadas nesta fase:

$$A = 621,11 + 81,26.Y_1 + 59,26.Y_2 + 31,55.Y_3 \quad (4.21)$$

No Quadro 4.5 é encontrada a análise de variância para o modelo de 1ª ordem apresentado. A comparação do valor calculado para F com o valor tabelado mostra que o modelo ajustado para explicar a variação da atividade enzimática é significativo a um nível de confiança entre 75 e 90% e explica 99,72% da variação das respostas encontradas.

**Quadro 4.5.** Análise de variância do modelo de 1ª ordem obtido para a atividade enzimática

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	148410,00	3	49470,00	2,20
Desvios	292184,23	13	22475,71	—
Total	440594,23	16	—	—

Coefficiente de Correlação=0,9972

Valor de F tabelado:  $F_{(0,75;3;13)}=1,55$

$$F_{(0,90;3;13)}=2,56$$

O modelo de 2ª ordem ajustado para a atividade em função das variáveis codificadas é representado pela Equação 4.22:

$$\begin{aligned}
 A = & 710,18 + 81,26.Y_1 + 96,25.Y_2 + 31,55.Y_3 \\
 & - 34,03.Y_1^2 - 121,33.Y_2^2 + 27,93.Y_3^2 \\
 & - 80,70.Y_1.Y_2 - 31,20.Y_1.Y_3 - 67,87.Y_2.Y_3 \quad (4.22)
 \end{aligned}$$

O Quadro 4.6 apresenta a análise de variância para o modelo de 2ª ordem obtido. A análise desta tabela indica que a equação ajustada é significativa ao nível de confiança de 99%, sendo que explica 99,72% da variação das respostas encontradas para a atividade.

**Quadro 4.6.** Análise de variância do modelo de 2ª ordem obtido para a atividade enzimática

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	401009,76	9	44556,64	7,93
Desvios	39350,44	7	5621,49	—
Total	440360,20	16	—	—

Coeficiente de Correlação=0,9972

Valor de F tabelado:  $F(0,99;9;7)=6,72$

A análise das Tabelas 4.17 e 4.18 permite concluir que, para as condições experimentais testadas, o modelo de 2ª ordem é o que melhor explica a variação da atividade enzimática em função de  $t_f$ ,  $X$  e  $t_e$ .

A substituição das Equações 4.18 a 4.20 na Equação 4.22, produz a seguinte expressão para atividade como função das variáveis reais:

$$\begin{aligned}
 A = & -2354,65 + 29,83.t_f + 5,23 \times 10^{-4}.X + 0,63.t_e \\
 & - 0,06.t_f^2 - 2,40 \times 10^{-11}.X^2 + 0,28.t_e^2 \\
 & - 1,49 \times 10^{-6}.t_f.X - 0,13.t_f.t_e - 3,02 \times 10^{-6}.X.t_e \quad (4.23)
 \end{aligned}$$

Os coeficientes das Equações 4.21 e 4.22 indicam que, para a nova região de estudo, as variáveis  $t_f$  e  $X$  apresentam maior influência sobre a atividade do farelo do que  $t_e$ . As derivadas parciais da Equação 4.23, com relação a cada variável, mostram a existência dos seguintes pontos de máximo e mínimo locais:

$$\begin{aligned}
 t_f = 159,4 \text{ horas} & \Rightarrow \text{máximo local;} \\
 X = 2,76 \times 10^6 \text{ esporos/g}_{\text{meio}} & \Rightarrow \text{máximo local;} \\
 t_e = 50,7 \text{ minutos} & \Rightarrow \text{mínimo local}
 \end{aligned}$$

As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9, obtidas a partir da Equação 4.23, mostram com clareza tais pontos.

Na Figura 4.7 é apresentada a variação da atividade com relação a  $X$  e  $t_e$ , mantendo-se constante  $t_f = 160$  horas (MÁXIMO LOCAL). Verifica-se a existência de duas regiões de operação onde a atividade apresenta valores elevados: uma para baixos valores de  $X$  combinados com altos valores de  $t_e$ ; e outra para valores de  $t_e$  abaixo de 50 minutos e  $X$  da ordem de  $3,0 \times 10^6$  esporos/g<sub>meio</sub>.

Na Figura 4.8 manteve-se constante  $X = 2,7 \times 10^6$  esporos/g<sub>meio</sub> (MÁXIMO LOCAL) e observou-se a variação da atividade com  $t_f$  e  $t_e$ . Os melhores valores para  $A$  são observados em duas condições distintas de operação: valores de  $t_e$  abaixo de 50 minutos e valores para  $t_f$  em torno de 160 horas; e valores de  $t_e$  acima de 50 minutos combinados com valores para  $t_f$  de aproximadamente 110-130 horas.

A Figura 4.9 mostra o comportamento de  $A$  conforme a variação de  $t_f$  e  $X$  para  $t_e = 40$  minutos. Os maiores valores para a atividade são observados exatamente na região que engloba os valores máximos locais:  $t_f = 160$  horas e  $X = 2,7 \times 10^6$  esporos/g<sub>meio</sub>. A escolha das condições ótimas de operação tem como fator limitante a influência de  $t_f$  na produtividade do processo.

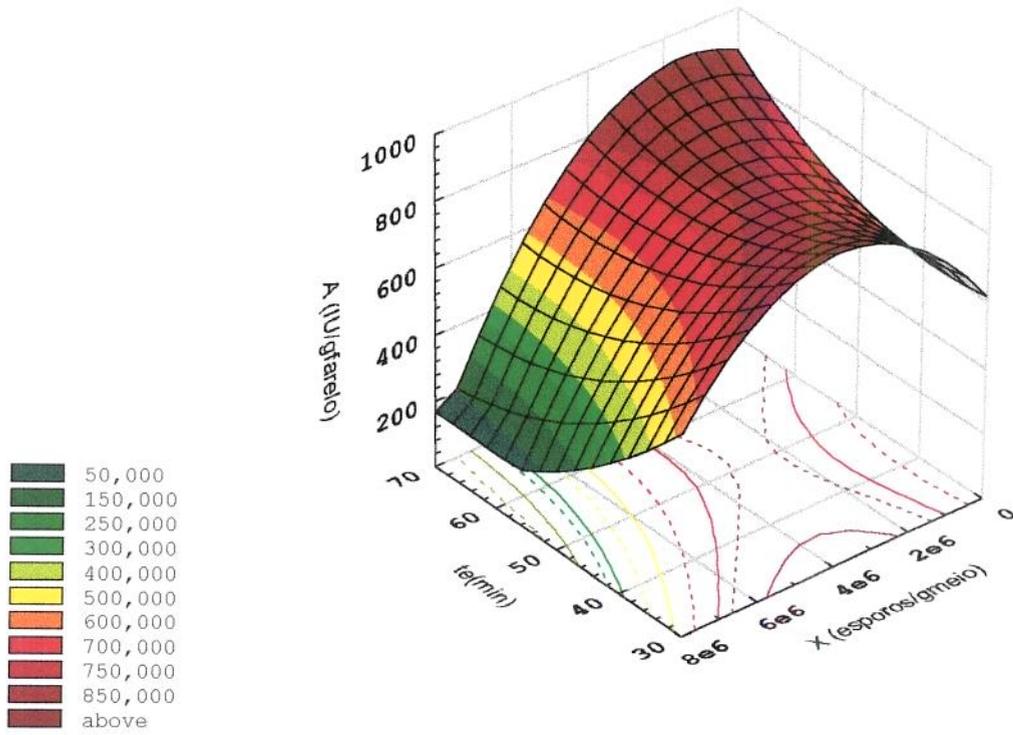


Figura 4.7. Variação da atividade com  $X$  e  $t_e$  para  $t_f = 160$  horas

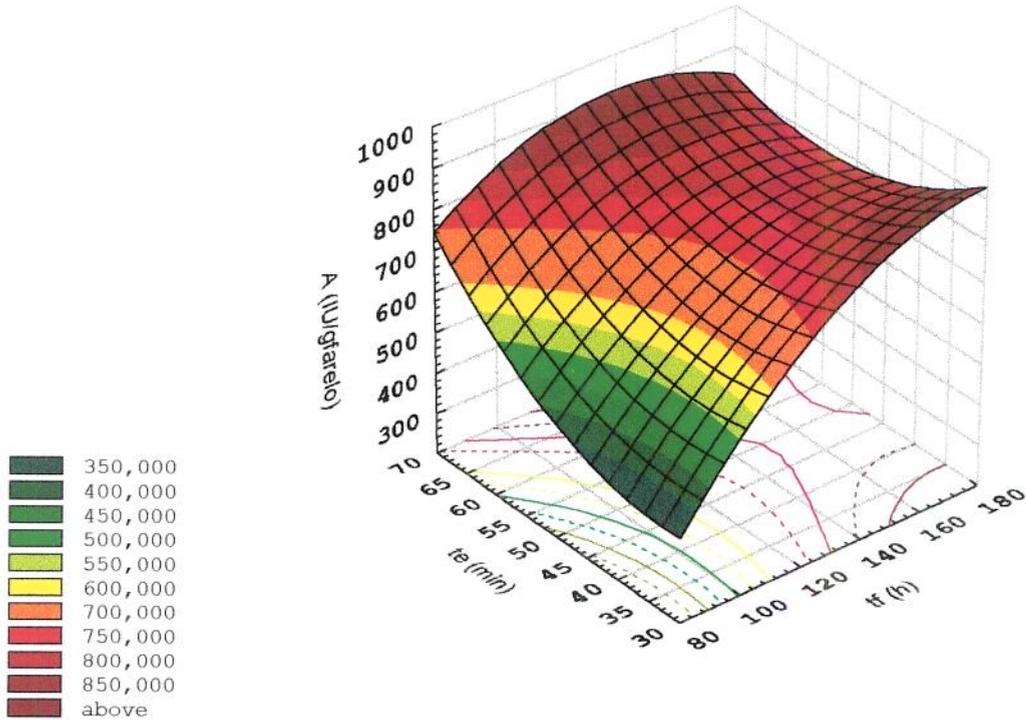
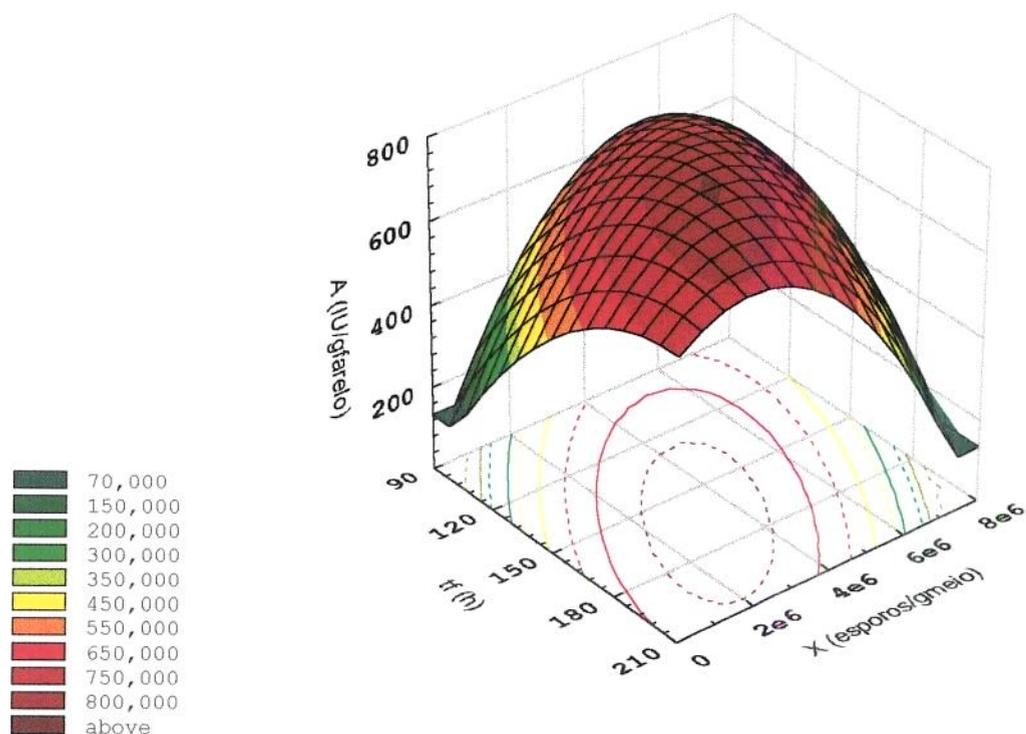


Figura 4.8. Variação da atividade com  $t_f$  e  $t_e$  para  $X = 2,7 \times 10^6$  esporos/g meio



**Figura 4.9.** Variação da atividade com  $t_f$  e  $X$  para  $t_e = 40$  minutos

#### 4.1.4.2. Modelos para Produtividade

A regressão dos valores para produtividade apresentados na Tabela 4.12 resultou no seguinte modelo de 1ª ordem que relaciona a resposta prevista com as variáveis estudadas:

$$P = 4,73 - 0,21.Y_1 + 0,54.Y_2 + 0,27.Y_3 \quad (4.24)$$

A análise de variância para este modelo de 1ª ordem é apresentada no Quadro 4.7. O modelo explica 99,72% da variação das respostas; contudo, o nível de confiança apresentado pela aplicação do Teste F ficou abaixo de 75%.

**Quadro 4.7.** Análise de variância do modelo de 1ª ordem obtido para a produtividade

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	5,16	3	1,72	1,11
Desvios	20,10	13	1,55	—
Total	25,26	16	—	—

Coefficiente de Correlação=0,9972

Valor de F tabelado:  $F_{(0,75;3;13)}=1,55$

O modelo de 2ª ordem obtido para relacionar a produtividade com as variáveis codificadas foi o seguinte:

$$\begin{aligned}
 P = & 5,40 - 0,21.Y_1 + 0,82.Y_2 + 0,27.Y_3 \\
 & - 0,26.Y_1^2 - 0,92.Y_2^2 + 0,23.Y_3^2 \\
 & - 0,73.Y_1.Y_2 - 0,29.Y_1.Y_3 - 0,50.Y_2.Y_3
 \end{aligned} \tag{4.25}$$

No Quadro 4.8 é mostrada a análise de variância para o modelo de 2ª ordem, que se mostrou significativo a um nível de confiança acima de 95%. O modelo explica 99,72% das respostas obtidas para a produtividade.

**Quadro 4.8.** Análise de variância do modelo de 2ª ordem obtido para a produtividade

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	22,13	9	2,46	5,51
Desvios	3,13	7	0,45	—
Total	25,26	16	—	—

Coefficiente de Correlação=0,9972

Valor de F tabelado:  $F_{(0,95;9;7)}=3,68$

Da mesma forma que no item anterior, a análise das Tabelas 4.19 e 4.20 permite concluir que, para as condições experimentais testadas, o modelo de 2ª ordem é o que melhor explica a variação da produtividade em função de  $t_f$ ,  $X$  e  $t_e$ .

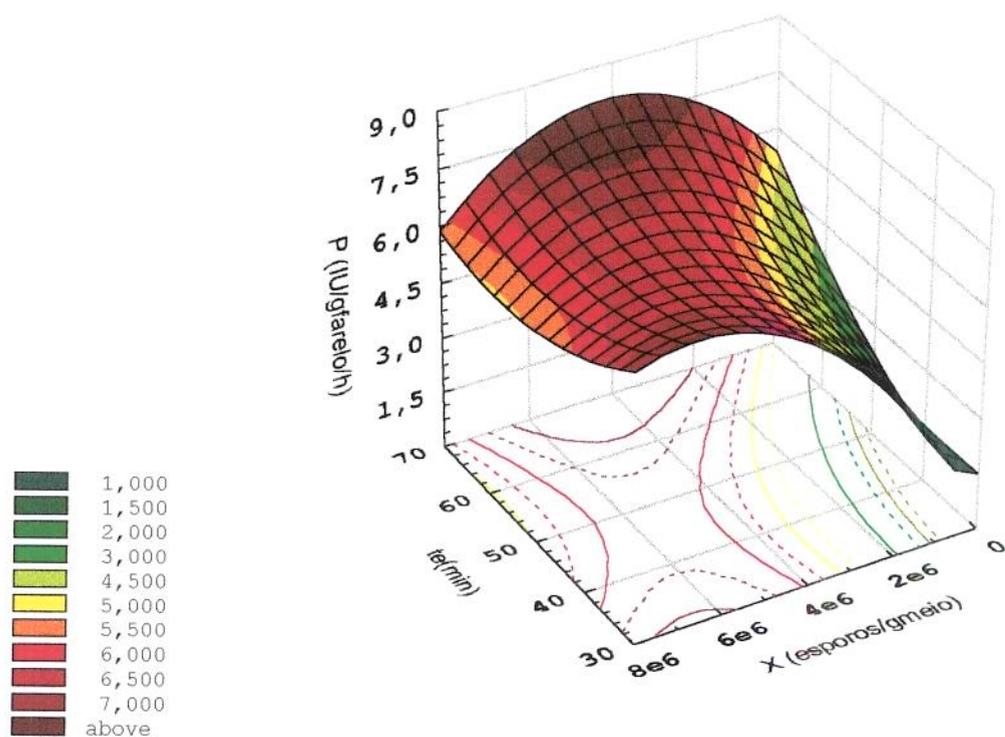
A substituição das Equações 4.18 a 4.20 na Equação 4.25 produz a seguinte expressão para a produtividade como função das variáveis reais:

$$\begin{aligned}
 P = & -15,60 + 0,21.t_f + 4,40 \times 10^{-6}.X + 0,02.t_e \\
 & - 4,51 \times 10^{-4}.t_f^2 - 1,82 \times 10^{-13}.X^2 + 2,30 \times 10^{-3}.t_e^2 \\
 & - 1,46 \times 10^{-8}.t_f.X - 1,21 \times 10^{-3}.t_f.t_e - 2,22 \times 10^{-8}.X.t_e \quad (4.26)
 \end{aligned}$$

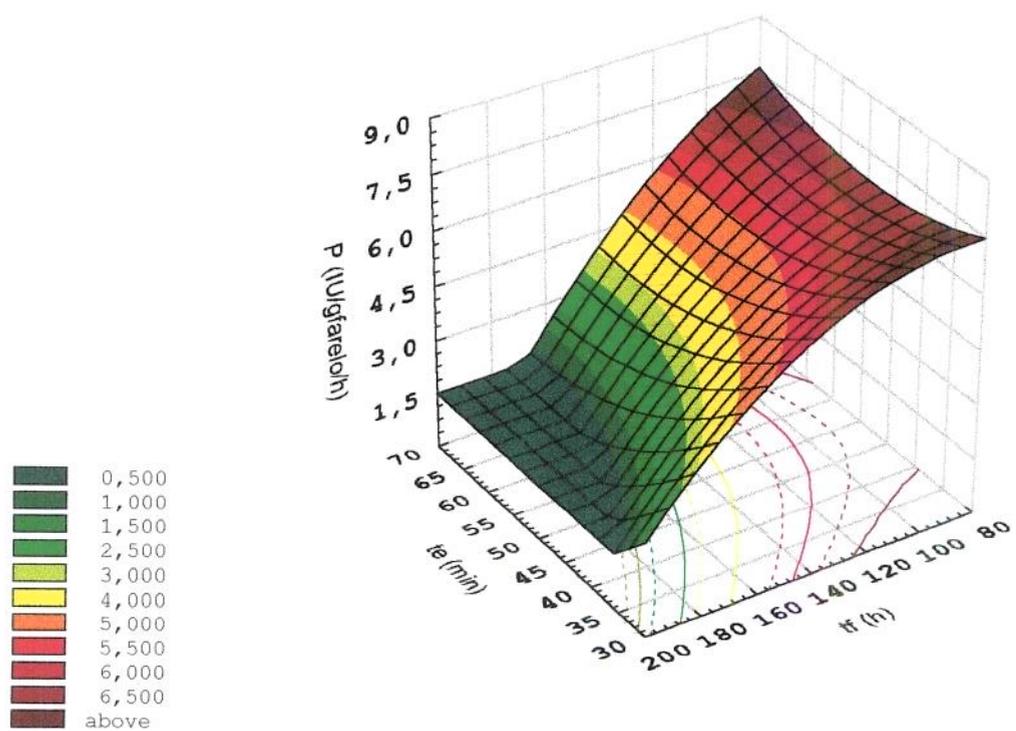
Os coeficientes de  $Y_1(t_f)$  nas Equações 4.24 e 4.25 indicam o efeito negativo que esta variável exerce sobre a produtividade do processo, na nova região de estudo. Nas mesmas equações nota-se a maior influência que  $X$  apresenta sobre a produtividade quando comparado com  $t_e$ . As derivadas parciais da Equação 4.24, com relação a cada variável, mostram a existência dos seguintes pontos de máximo e mínimo locais:

$$\begin{array}{ll}
 t_f = 60,5 \text{ horas} & \Rightarrow \text{máximo local;} \\
 X = 6,92 \times 10^6 \text{ esporos/g}_{\text{meio}} & \Rightarrow \text{máximo local;} \\
 t_e = 45,0 \text{ minutos} & \Rightarrow \text{mínimo local}
 \end{array}$$

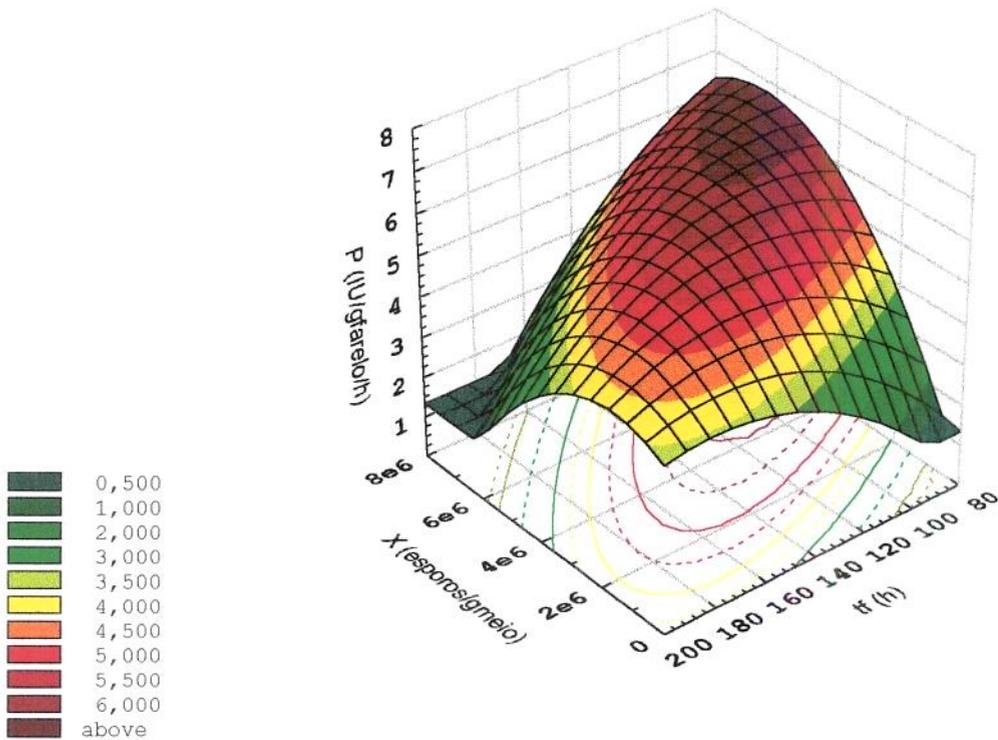
A partir da Equação 4.26 construíram-se as Figuras 4.10, 4.10 e 4.12 que mostram o comportamento da produtividade do processo com relação às duas variáveis, mantendo-se a terceira fixa.



**Figura 4.10.** Variação da produtividade com  $X$  e  $t_e$  para  $t_f=90$  horas



**Figura 4.11.** Variação da produtividade com  $t_f$  e  $t_e$  para  $X = 6,6 \times 10^6$  esporos/gmeio



**Figura 4.12.** Variação da produtividade com  $t_f$  e  $X$  para  $t_e = 40$  minutos

A Figura 4.10, que representa a variação da produtividade com  $X$  e  $t_e$  para  $t_f = 90$  horas (menor valor usado para  $t_f$  nesta fase), apresenta o ponto de máximo local para  $X$  e o mínimo para  $t_e$ . Nota-se que, para valores elevados de  $X$ , os limites inferiores e superiores para  $t_e$  apresentam a mesma influência sobre  $P$ .

Na Figura 4.11 fica evidente a ação de  $t_f$  sobre a produtividade do processo para  $X = 6,6 \times 10^6$  esporos/gmeio. A Figura 4.12 mostra o comportamento da produtividade com relação a  $t_f$  e  $X$  (para  $t_e = 40$  minutos) e complementa a observação anterior. Nesta Figura os melhores valores são alcançados para  $t_f$  pequenos e  $X$  elevados. Assim, para qualquer valor de  $t_e$  e para valores elevados de  $X$ ,  $P$  diminui drasticamente com o aumento de  $t_f$ .

#### 4.2. Fermentação semi-sólida em fermentador de coluna

Em seguida ao término da fase de otimização das condições físico-químicas de cultivo, passou-se à montagem do sistema composto por fermentadores de coluna, escolhidos para a segunda etapa deste trabalho. O ponto crítico deste estágio inicial foi a construção dos reatores, que necessitou de diversos ajustes e/ou reconstrução por parte da firma fornecedora, até se chegar a um modelo que poderia ser considerado satisfatório aos objetivos propostos.

Concluída a montagem proposta na Figura 3.1, partiu-se para os ajustes e testes do equipamento, de maneira a minimizar os problemas que poderiam surgir durante os processos fermentativos.

Após os testes de cada componente do sistema, partiu-se para o ajuste geral do equipamento, que só foi possível com a realização de ensaios fermentativos preliminares (resultados não apresentados), que também serviram para identificar que, normalmente, a fase de maior produção da enzima se encontrava entre 24 e 70 horas de fermentação. Além disso, para tal fase, a coleta de amostras a cada 6 ou 12 horas apresentou resultados semelhantes, motivo por que se optou pelo último intervalo.

No QUADRO 4.9 encontra-se listado o tempo total de fermentação para cada ensaio e o resumo das condições operacionais usadas nesta série de experimentos, no qual VMM indica a "Vazão de ar por Massa de Meio" e  $d_{ap}$ , a densidade aparente do meio no início do processo. Realizaram-se 37 ensaios neste tipo de reator, sendo que as seguintes condições, otimizadas anteriormente, foram mantidas fixas:

$$T = 30^{\circ}\text{C};$$

$$U = 50\%;$$

$$C = 15\%;$$

$$X = 4 \times 10^6 \text{ esporos/g}_{\text{meio}};$$

$$t_e = 40 \text{ minutos.}$$

**QUADRO 4.9.** Tempos de fermentação e condições de operação utilizadas durante as fermentações semi-sólidas em reatores de coluna

Experimento	VMM (ml <sub>ar</sub> /h/g <sub>meio</sub> )	Vazão de ar (l <sub>ar</sub> /h)	d <sub>ap</sub> (g/l)	t <sub>f</sub> (h)
C1	0	0	618	165
C2	5	1,25	629	168
C3	10	2,50	629	139
C4	10	3,00	594	118
C5	20	5,00	616	120
C6	20	5,00	596	184
C7	30	7,50	635	144
C8	30	7,50	615	139
C9	30	7,50	648	120
C10	40	10,00	620	144
C11	40	10,00	606	120
C12	40	10,00	629	184
C13	50	12,50	634	144
C14	50	12,50	653	139
C15	50	15,00	611	118
C16	60	15,00	617	168
C17	60	15,00	602	120
C18	60	15,00	629	120
C19	70	17,50	631	168
C20	70	17,50	603	184
C21	80	20,00	616	168
C22	80	20,00	600	184
C23	90	22,50	644	168
C24	90	22,50	610	144
C25	90	22,50	567	184
C26	100	25,00	626	139
C27	100	25,00	614	184
C28	150	37,50	575	118
C29	60	15,00	499	118
C30	60	15,00	586	120
C31	60	19,20	755	120
C32	60	22,80	858	120
C33	60	24,00	924	118
C34*	60	18,00	608	139
C35*	60	18,00	612	120
C36*	60	18,00	632	120
C37*	60	18,00	607	118

\*Experimentos usados para determinar os perfis de temperatura no reator

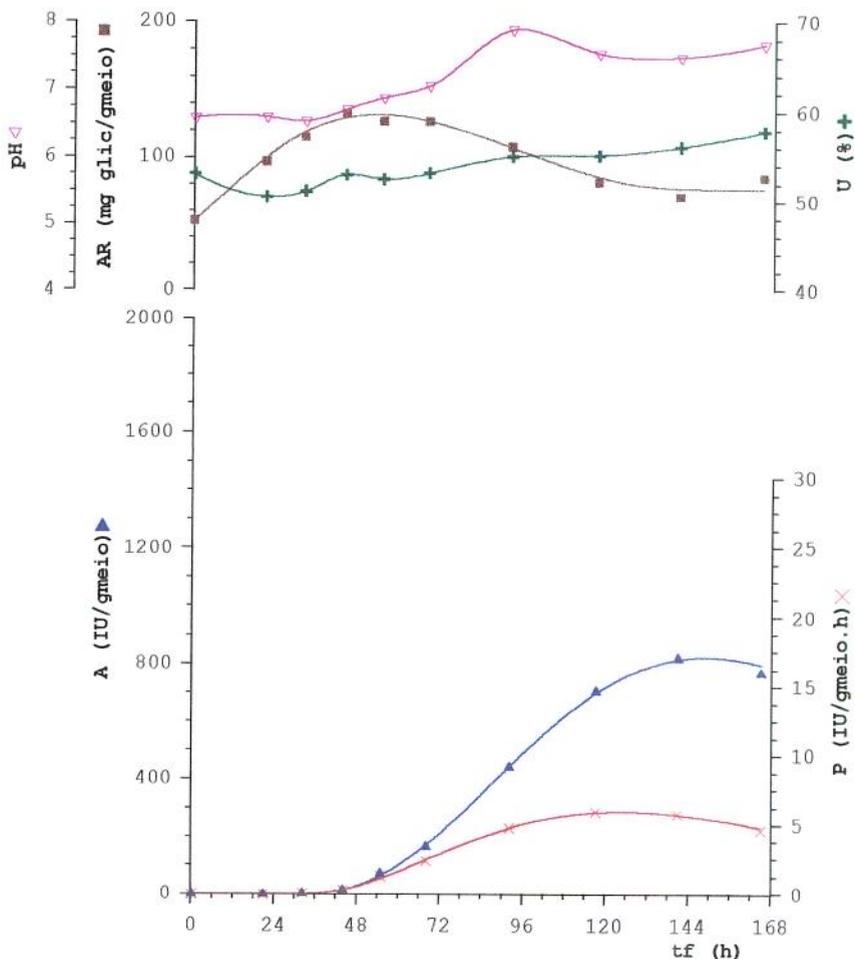
#### 4.2.1.Efeito da aeração

Nas Tabelas 4.13 a 4.40 encontram-se listados os valores experimentais obtidos para a atividade enzimática (A), a produtividade (P), a concentração celular (X), a umidade (U), o pH e os açúcares redutores (AR) ao longo dos processos fermentativos, enquanto que os comportamentos gráficos para tais variáveis são mostrados nas Figuras 4.13 a 4.40. Com exceção da concentração celular, as amostras foram analisadas, no mínimo, em duplicata; o fato de alguns valores não serem apresentados deveu-se a problemas operacionais durante a amostragem ou perda durante a extração da enzima.

**Tabela 4.13.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C1 ( $VMM=0 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A. R.
0	0,0	-	53,24	6,60	53
21	0,0	0,0	50,63	6,61	97
32	3,4	0,1	51,25	6,55	115
44	14,8	0,3	53,09	6,72	133
55	73,4	1,3	52,60	6,89	127
68	166,1	2,4	53,29	7,07	127
92	443,5	4,8	55,15	7,90	108
117	707,1	6,0	55,28	7,55	82
141	822,8	5,8	56,21	7,49	71
165	770,6	4,7	57,94	7,68	85

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A. R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

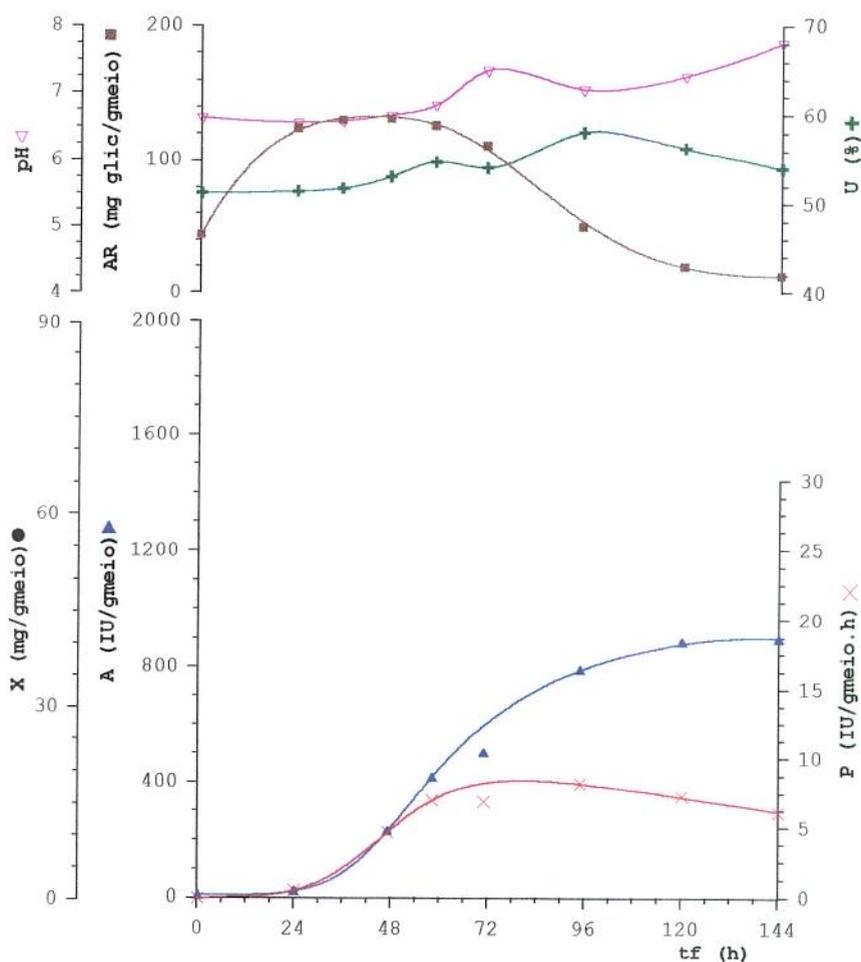


**Figura 4.13.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C1 ( $VMM=0 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

**Tabela 4.14.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C2 (VMM=5 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,37	6,65	44
24	19,3	0,6	51,55	6,57	124
35	-	-	51,89	6,59	130
47	228,2	4,7	53,23	6,68	131
58	415,7	7,0	54,87	6,83	126
71	499,1	7,0	54,24	7,35	111
95	787,7	8,2	58,17	7,06	50
120	886,8	7,3	56,38	7,26	20
144	895,8	6,2	54,13	7,76	13

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

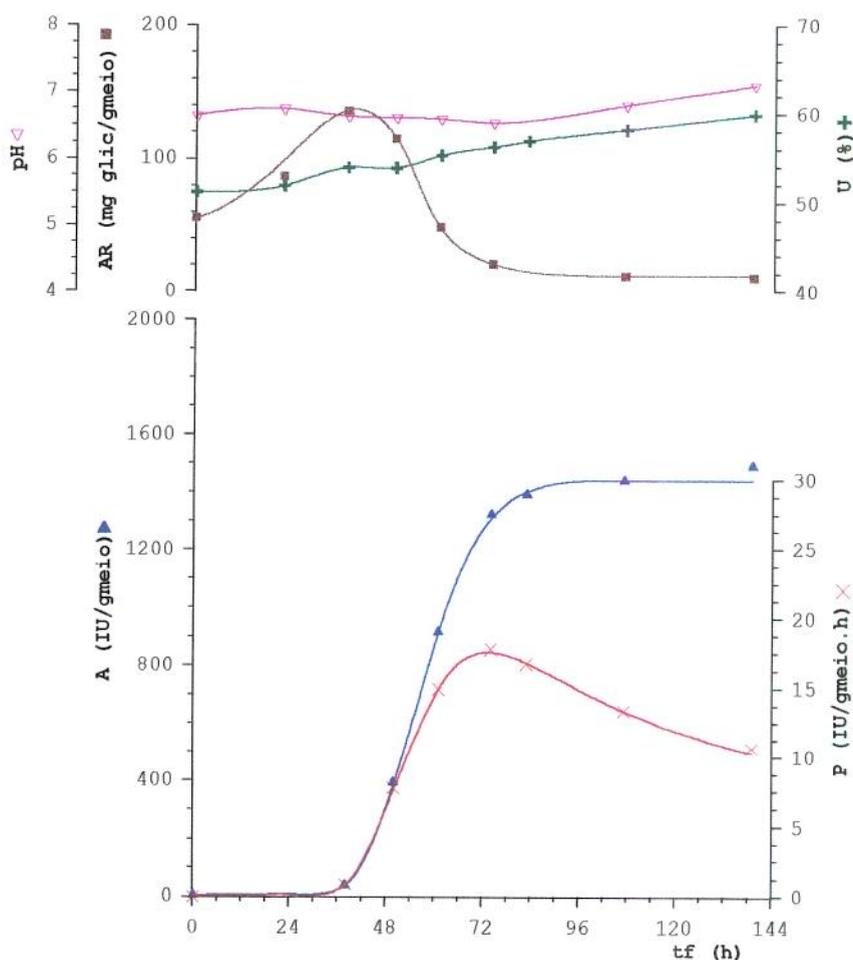


**Figura 4.14.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C2 (VMM=5 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.15.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C3 (VMM=10 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,31	6,65	56
22	-	-	52,00	6,75	87
38	40,9	0,9	54,06	6,64	136
50	395,5	7,8	54,01	6,62	115
61	919,4	15,0	55,41	6,60	49
74	1327,8	17,9	56,35	6,54	21
83	1395,8	16,8	57,05	-	-
107	1444,0	13,5	58,30	6,81	12
139	1494,3	10,8	59,97	7,11	11

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

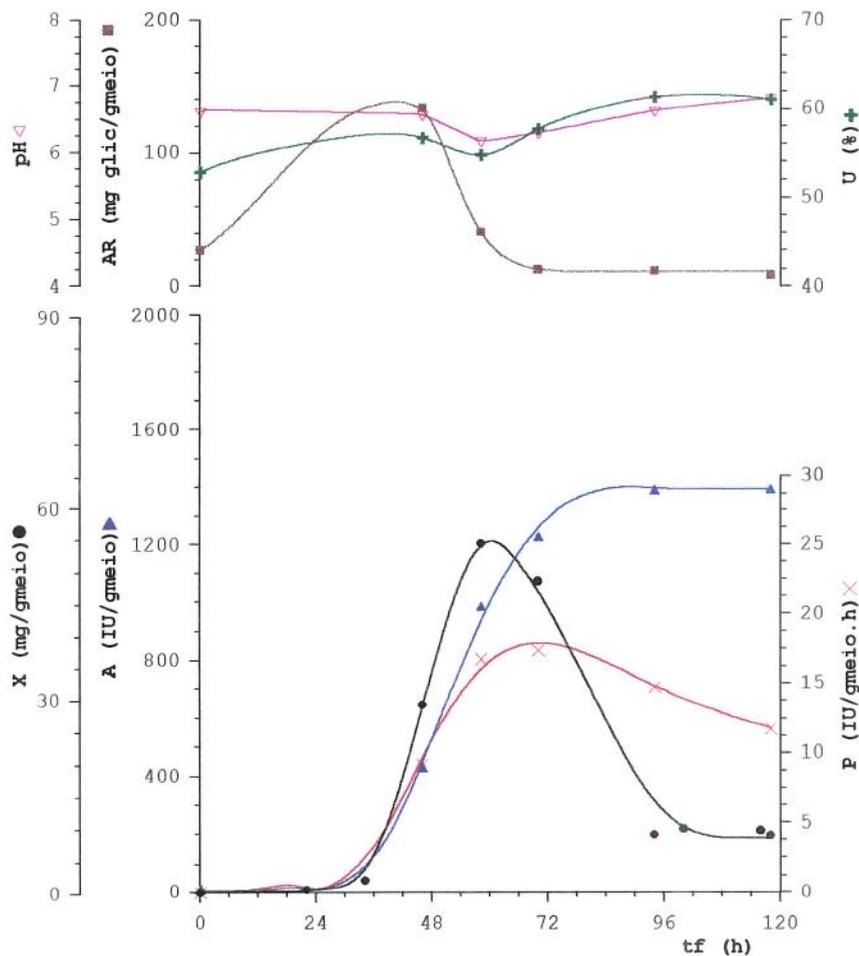


**Figura 4.15.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C3 (VMM=10 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.16.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C4 ( $VMM=10 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	A	P	X	U	pH	A.R.
0	7,3	0,0	0,32	52,86	6,64	27
22	-	-	0,82	-	-	-
34	-	-	2,31	-	-	-
46	429,4	9,2	29,52	56,74	6,58	134
58	983,7	16,8	54,71	54,79	6,19	41
70	1226,9	17,4	48,75	57,72	6,31	13
94	1391,1	14,7	9,31	61,35	6,65	12
100	-	-	10,2	-	-	-
118	1395,0	11,8	9,21	61,07	6,83	9

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); X (mg<sub>cel</sub>/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

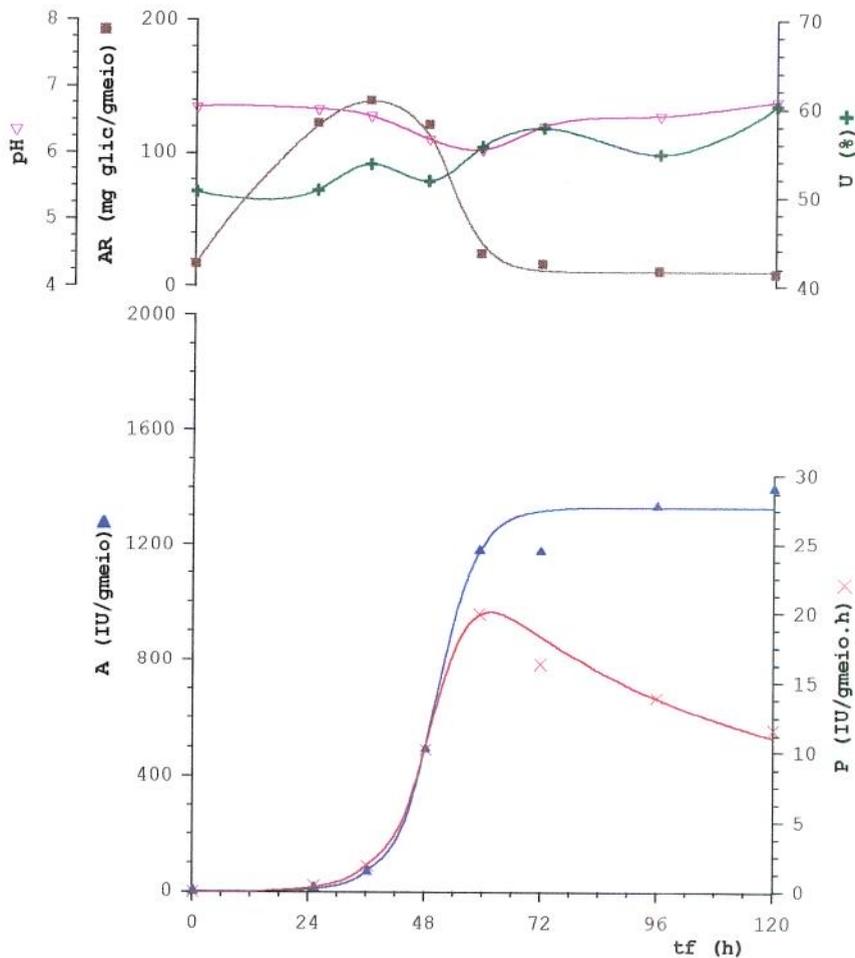


**Figura 4.16.**Atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C4 ( $VMM=10 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.17.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C5 ( $VMM=20 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	2,8	0,0	50,72	6,70	17
25	14,3	0,5	50,89	6,67	123
36	71,4	1,9	53,80	6,57	140
48	494,5	10,2	51,91	6,22	122
59	1182,7	20,0	55,76	6,06	25
72	1178,9	16,4	57,92	6,42	17
96	1339,8	14,0	54,93	6,57	12
120	1401,0	11,7	60,39	6,78	10

$t_f$  (h); A (IU/ $\text{g}_{\text{farelo}}$ ); P (IU/h/ $\text{g}_{\text{farelo}}$ ); U (%); A.R. ( $\text{mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )

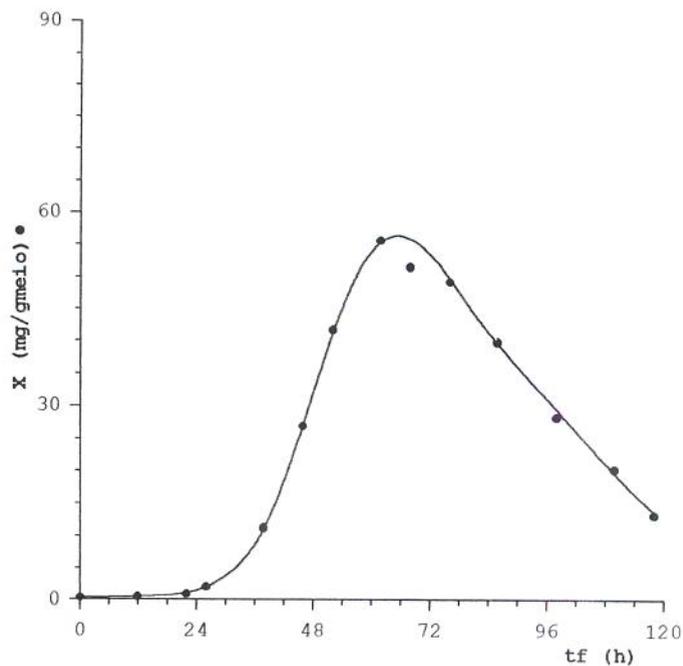


**Figura 4.17.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C5 ( $VMM=20 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.18.**Valores para a concentração celular medida durante o experimento C6 ( $VMM=20 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

$t_f$	$X$
0	0,32
12	0,46
22	0,85
26	1,99
38	11,17
46	26,89
52	41,65
62	55,61
68	51,45
76	49,15
86	39,75
98	28,20
110	20,19
118	13,15

$t_f(h)$ ;  $X$  ( $mg_{cel}/g_{farelo}$ )

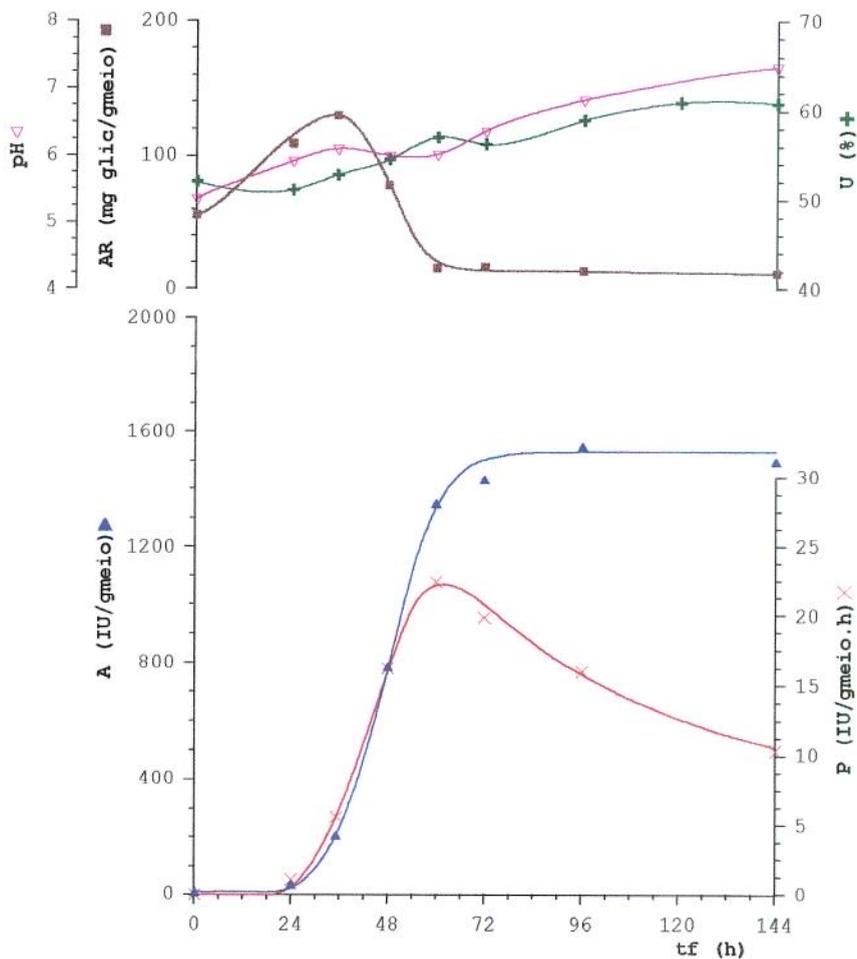


**Figura 4.18.**Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C6 ( $VMM=20 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

**Tabela 4.19.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C7 ( $VMM=30 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	4,2	0,0	52,18	5,37	56
24	30,5	1,1	51,20	5,93	109
35	201,9	5,6	52,91	6,11	130
48	783,7	16,2	54,65	6,01	78
60	1349,2	22,4	57,11	6,03	16
72	1432,8	19,8	56,34	6,38	17
96	1547,5	16,1	59,05	6,84	14
120	-	-	60,97	-	-
144	1496,6	10,4	60,85	7,33	12

$t_f$  (h); A (IU/gfarelo); P (IU/h/gfarelo); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

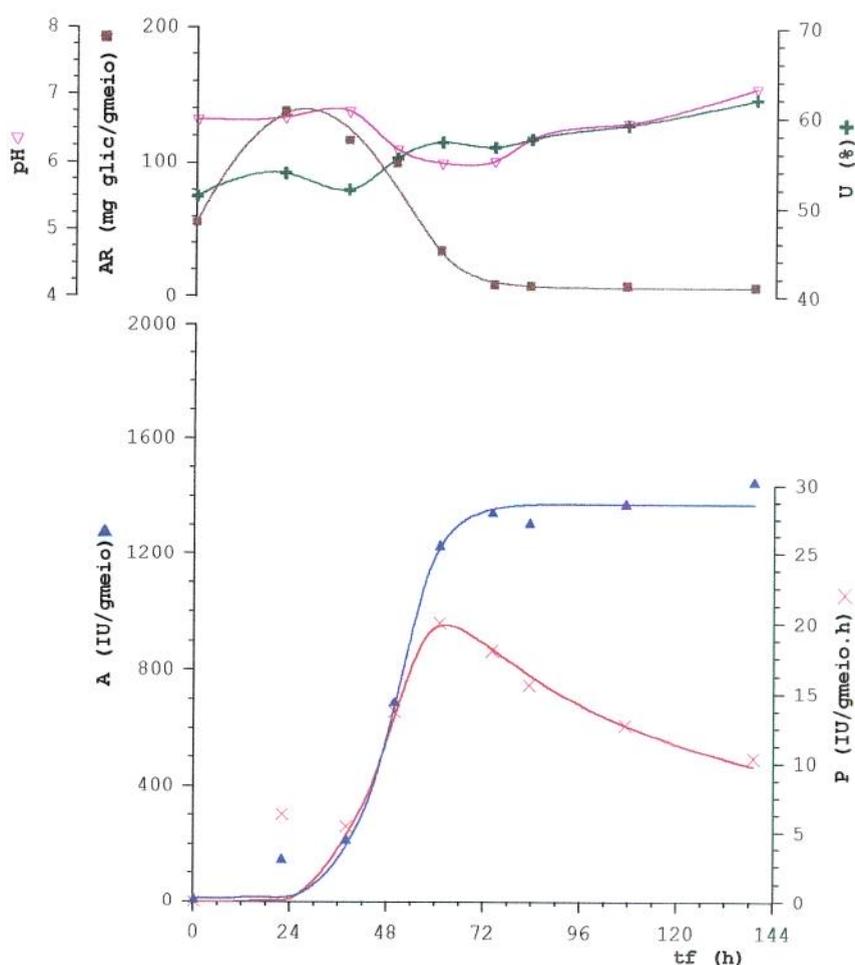


**Figura 4.19.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C7 ( $VMM=30 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

**Tabela 4.20.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C8 ( $VMM=30 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,31	6,65	56
22	144,8	6,3	53,91	6,68	138
38	213,4	5,5	52,05	6,77	117
50	689,9	13,7	55,58	6,21	100
61	1229,3	20,1	57,38	6,01	35
74	1345,4	18,1	56,82	6,04	10
83	1309,1	15,7	57,75	6,37	9
107	1375,8	12,9	59-27	6,60	9
139	1455,4	10,5	62,09	7,11	8

$t_f$ (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U(%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

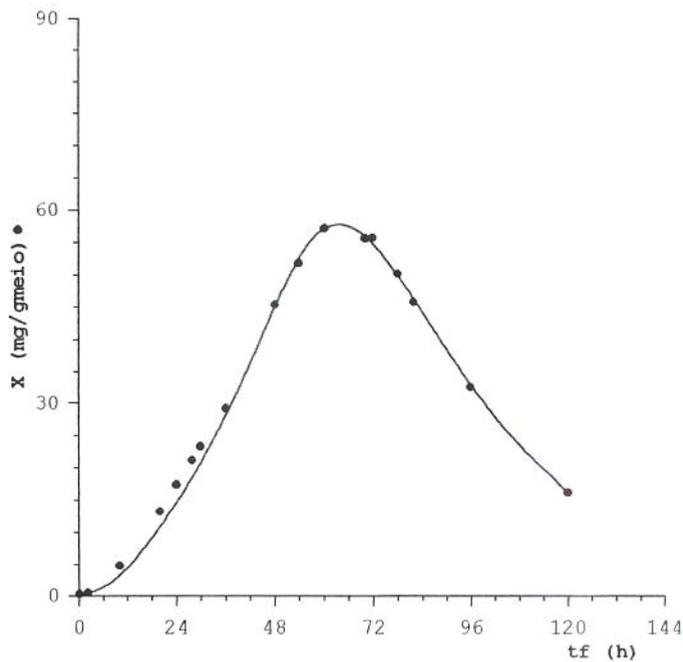


**Figura 4.20.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C8 ( $VMM=30 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.21.** Valores para a concentração celular medida durante o experimento C9 ( $VMM=30 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	$X$
0	0,30
2	0,50
10	4,80
20	13,20
24	17,40
28	21,20
30	23,30
36	29,20
48	45,40
54	51,90
60	57,20
70	55,60
72	55,70
78	50,20
82	45,80
96	32,60
120	16,20

$t_f(\text{h})$ ;  $X$  ( $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )

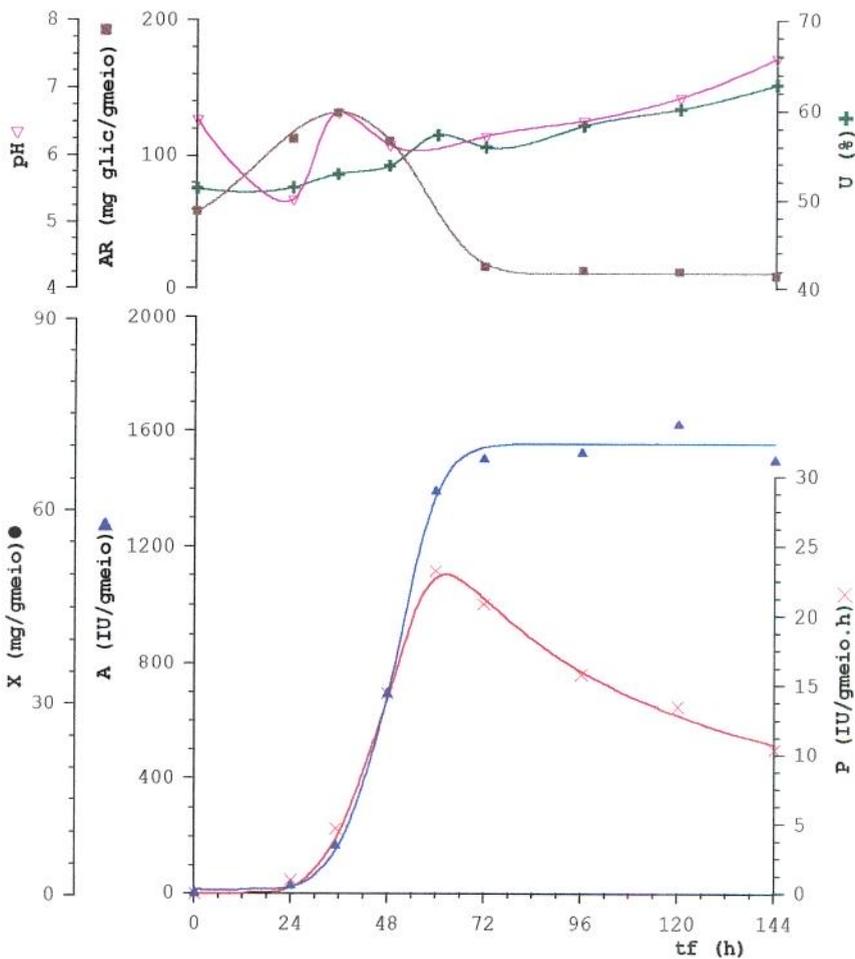


**Figura 4.21.** Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C9 ( $VMM=30 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.22.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C10 ( $VMM=40 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A. R.
0	2,3	0,0	51,38	6,55	59
24	26,5	1,0	51,49	5,36	113
35	168,3	4,7	52,98	6,65	132
48	695,9	14,4	53,93	6,17	111
60	1393,9	23,2	57,38	-	-
72	1503,9	20,8	56,01	6,30	17
96	1526,2	15,9	58,41	6,53	14
120	1623,7	13,5	60,22	6,87	13
144	1498,1	10,4	62,96	7,45	10

$t_f$  (h); A (IU/ $\text{g}_{\text{farelo}}$ ); P (IU/h/ $\text{g}_{\text{farelo}}$ ); U (%); A. R. ( $\text{mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )

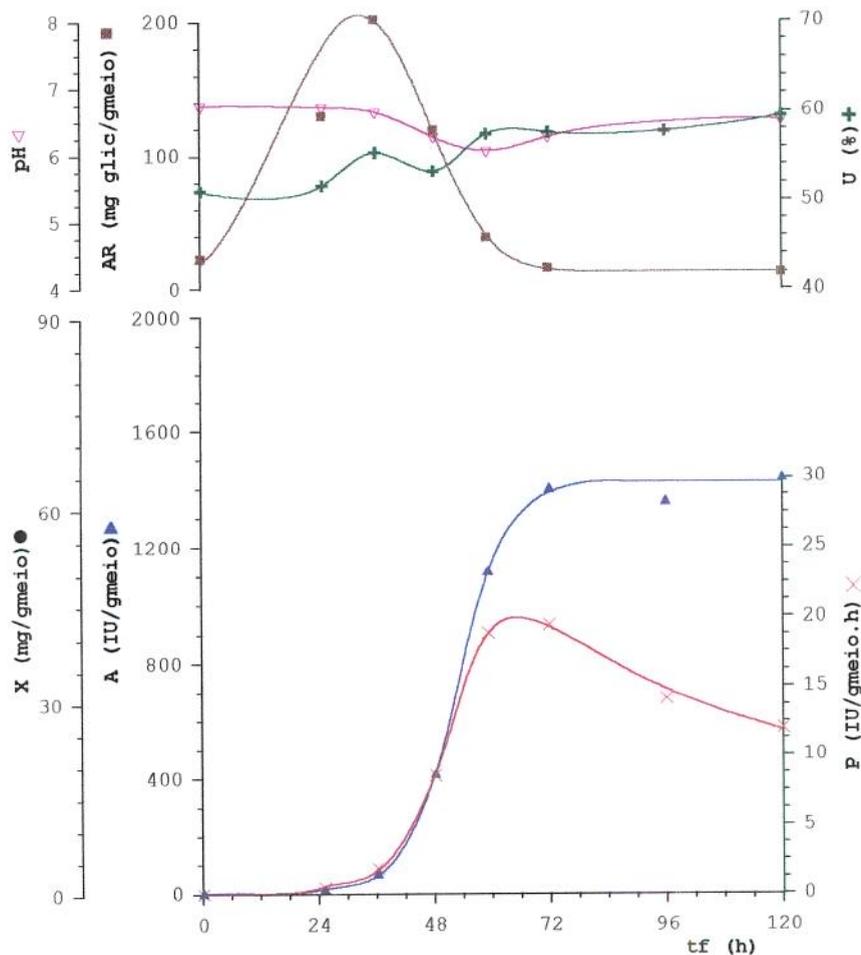


**Figura 4.22.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C10 ( $VMM=40 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.23.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C11 (VMM=40 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	0,0	0,0	51,09	6,75	23
25	11,2	0,4	51,70	6,73	130
36	67,4	1,9	55,40	6,66	202
48	414,5	8,6	53,33	6,29	119
59	1117,7	18,9	57,48	6,08	39
72	1402,3	19,5	57,65	6,29	16
96	1359,7	14,2	57,79	-	-
120	1441,8	12,0	59,50	6,54	13

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

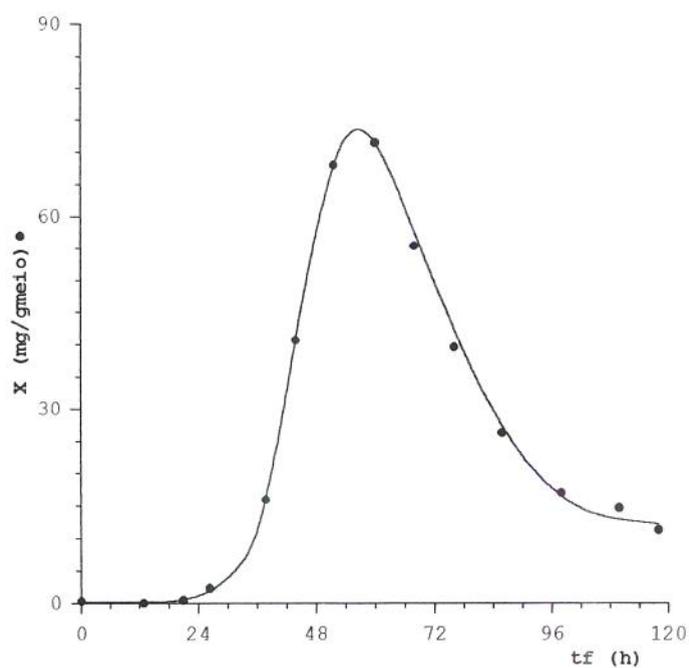


**Figura 4.23.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C11 (VMM=40 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.24.** Valores para a concentração celular medida durante o experimento C12 ( $VMM=40 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	$X$
0	0,29
13	0,00
21	0,44
27	2,26
38	15,89
44	40,63
52	67,97
60	71,35
68	55,34
76	39,63
86	26,26
98	16,90
110	14,64
118	11,28

$t_f(\text{h}) ; X (\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}})$

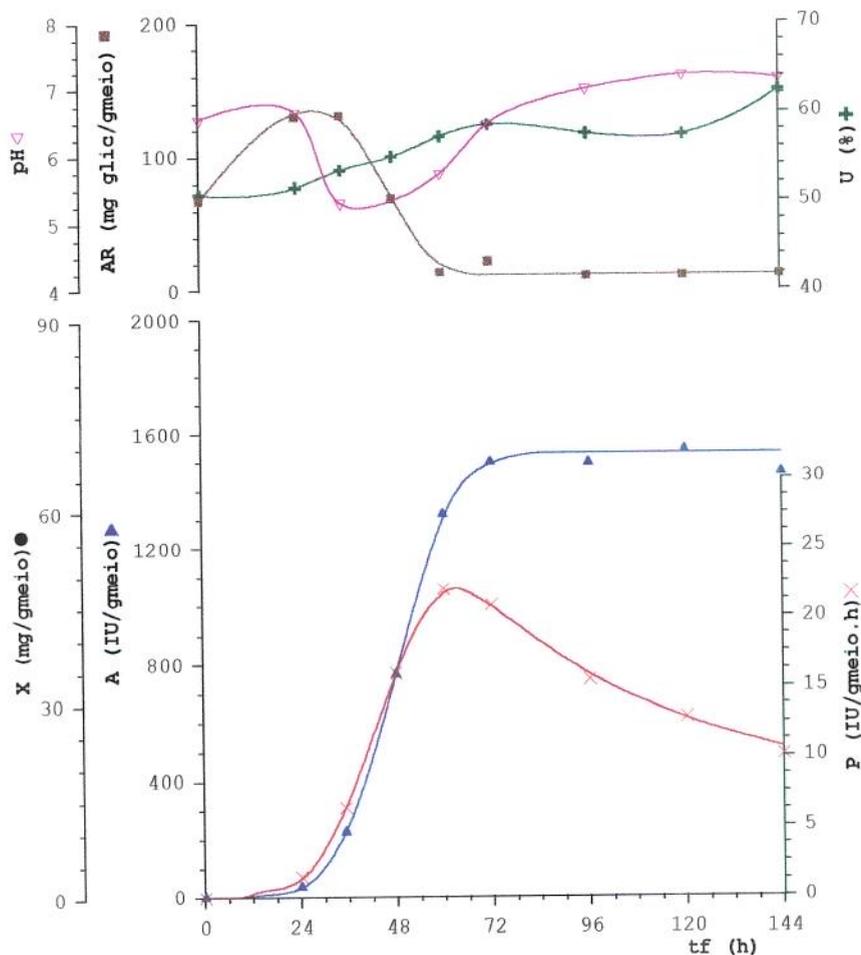


**Figura 4.24.** Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C12 ( $VMM=40 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.25.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C13 ( $VMM=50 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	2,0	0,0	50,86	6,57	68
24	37,8	1,5	51,61	6,68	130
35	227,7	6,4	53,56	5,32	131
48	769,6	16,0	55,03	5,29	69
60	1322,4	22,0	57,31	5,75	14
72	1503,9	20,9	58,64	6,49	22
96	1499,9	15,6	57,61	7,01	11
120	1546,5	12,9	57,47	7,22	11
144	1464,0	10,2	62,42	7,17	12

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

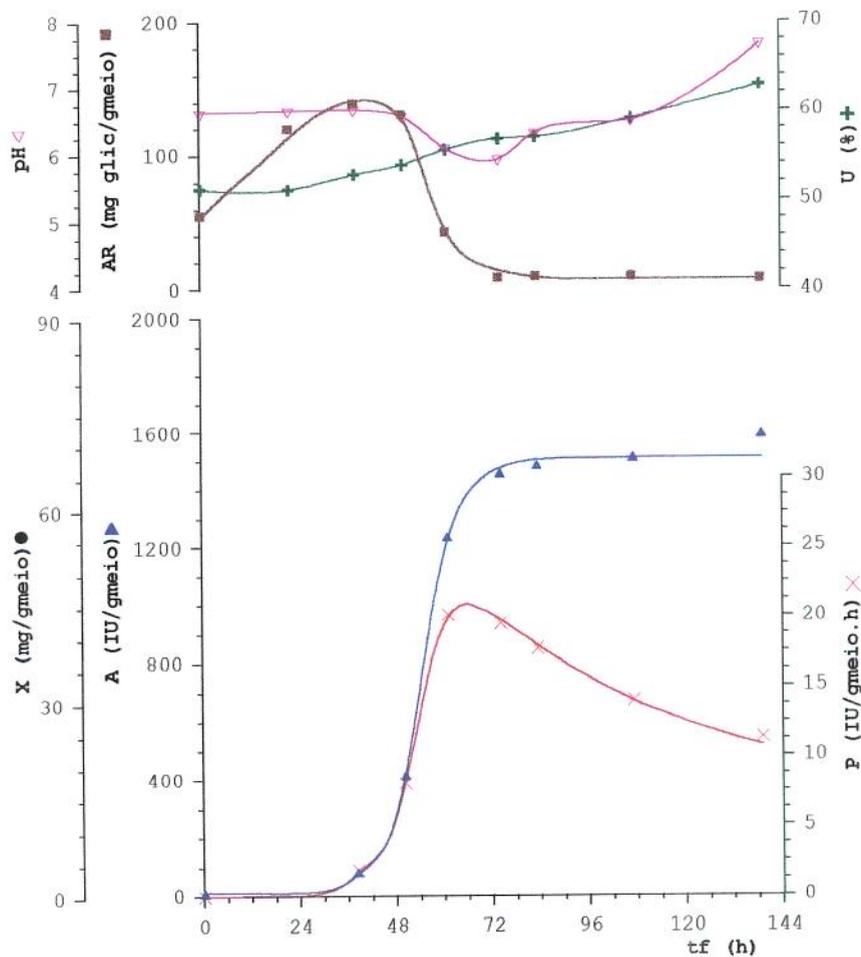


**Figura 4.25.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C13 ( $VMM=50 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.26.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C14 (VMM=50 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,31	6,65	56
22	-	-	51,23	6,68	120
38	77,2	1,9	52,90	6,69	139
50	412,3	8,1	53,97	6,59	131
61	1234,8	20,1	55,64	6,11	43
74	1454,5	19,6	56,87	5,94	9
83	1482,9	17,8	57,07	6,34	10
107	1511,6	14,1	59,20	6,53	10
139	1591,3	11,5	62,91	7,68	8

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

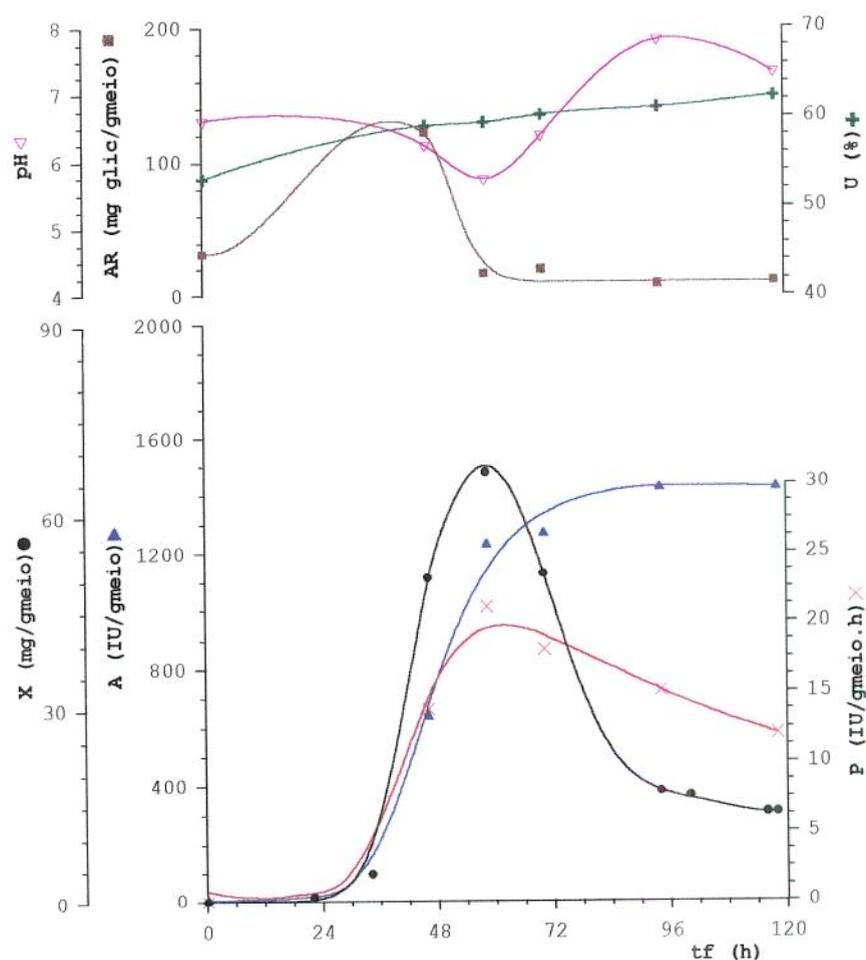


**Figura 4.26.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C14 (VMM=50 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.27.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C15 (VMM=50 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	X	U	pH	A.R.
0	4,4	0,0	0,32	53,17	6,63	32
22	-	-	1,07	-	-	-
34	-	-	4,69	-	-	-
46	639,3	13,8	50,65	59,09	6,25	122
58	1233,0	21,2	67,06	59,47	5,75	17
70	1272,8	18,1	51,19	60,31	6,40	20
94	1427,7	15,1	17,50	61,14	7,83	9
100	-	-	16,80	-	-	-
118	1429,5	12,1	14,24	62,39	7,34	11

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); X (mg<sub>cel</sub>/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

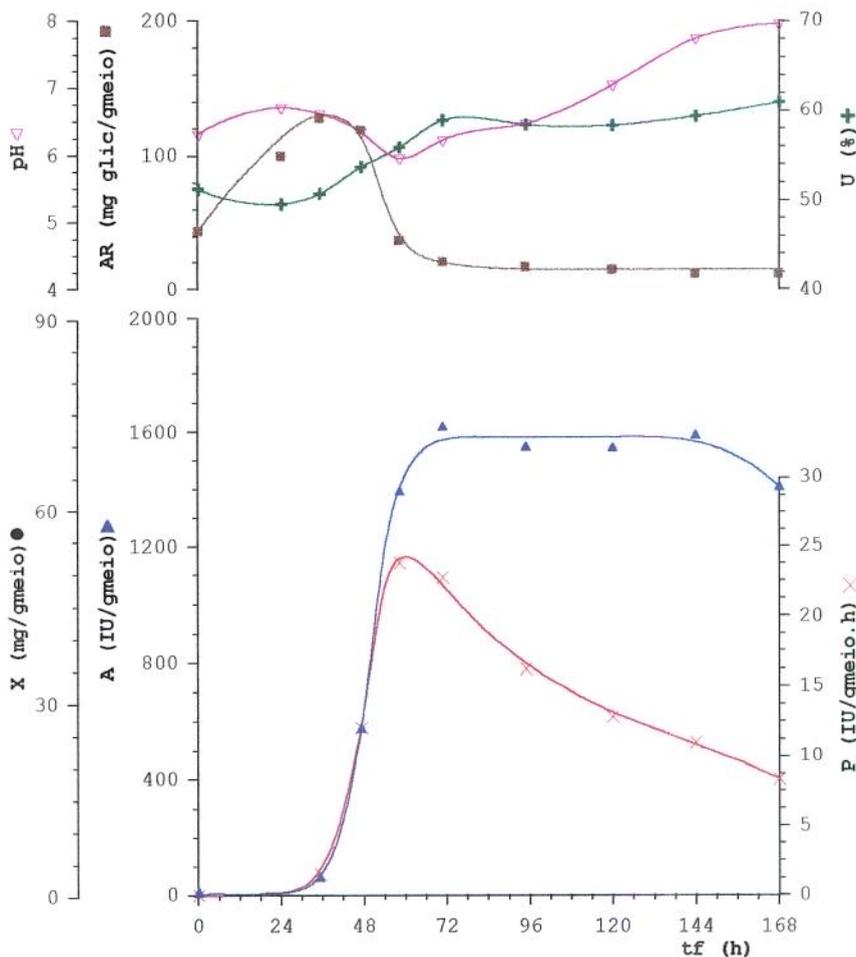


**Figura 4.27.**Atividade enzimática, produtividade, concentração celular, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C15 (VMM=50 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.28.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C16 (VMM=60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,37	6,33	44
24	-	-	49,69	6,72	100
35	60,7	1,6	50,82	6,63	128
47	574,4	12,1	53,80	6,36	119
58	1395,0	23,9	55,98	5,97	38
71	1619,0	22,8	59,96	6,24	21
95	1549,2	16,3	58,48	6,48	17
120	1545,7	12,8	58,39	7,06	15
144	1590,5	11,0	59,39	7,75	12
168	1411,7	8,4	61,01	7,97	12

$t_f$ (h); A(IU/g<sub>farelo</sub>); P(IU/h/g<sub>farelo</sub>); U(%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

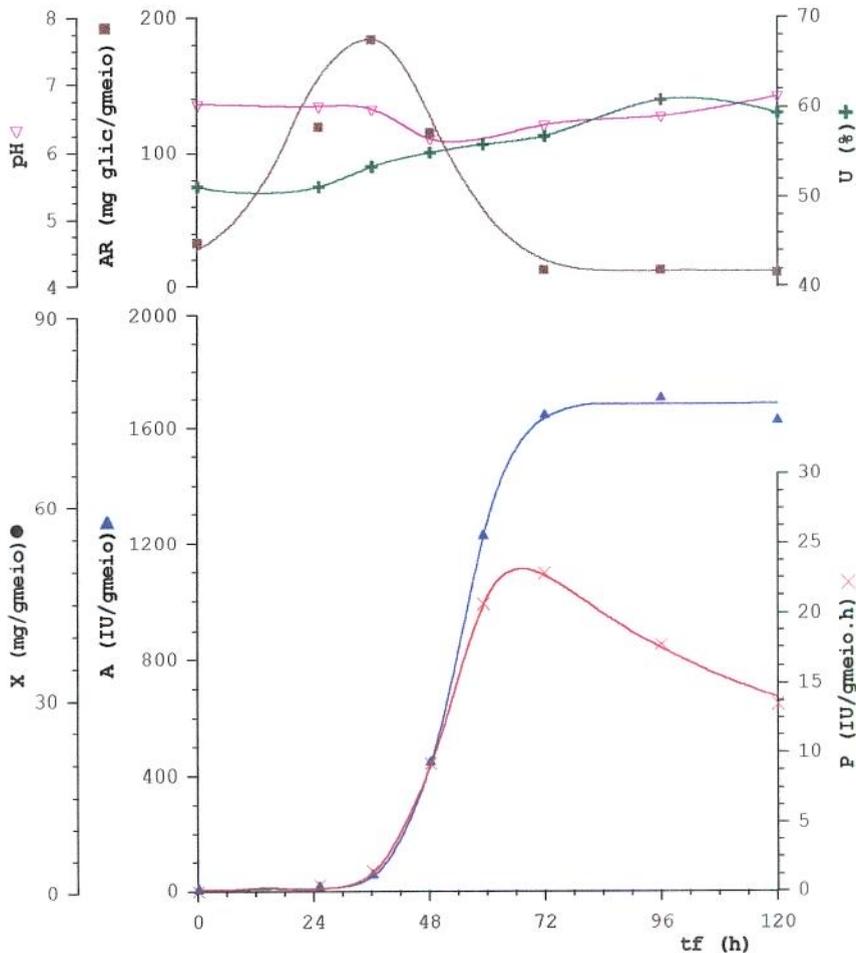


**Figura 4.28.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C16 (VMM=60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.29.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C17 (VMM=60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	4,9	0,0	51,31	6,72	33
25	15,8	0,4	51,28	6,69	119
36	58,6	1,5	53,51	6,65	184
48	450,8	9,3	55,08	6,22	115
59	1230,1	20,8	55,99	-	-
72	1648,6	22,8	56,90	6,41	13
96	1709,4	17,8	60,87	6,54	13
120	1628,9	13,5	59,39	6,84	11

$t_f$ (h); A(IU/g<sub>farelo</sub>); P(IU/h/g<sub>farelo</sub>); U(%); A.R.(mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

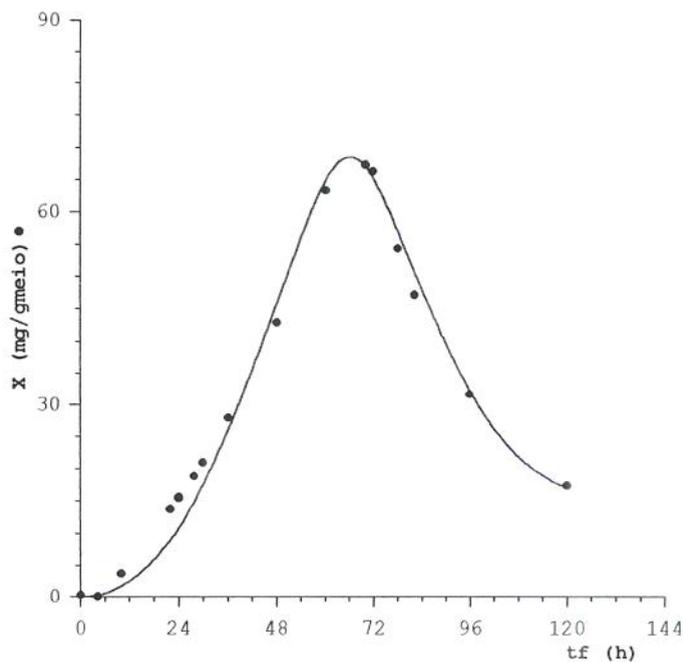


**Figura 4.29.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C17 (VMM=60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.30.** Valores para a concentração celular medida durante o experimento C18 ( $VMM=60 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	$X$
0	0,33
4	0,04
10	3,71
22	13,72
24	15,46
28	18,80
30	20,94
36	27,89
48	42,87
60	63,32
70	67,18
72	66,19
78	54,29
82	47,08
96	31,60
120	17,35

$t_f$  (h);  $X$  ( $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )

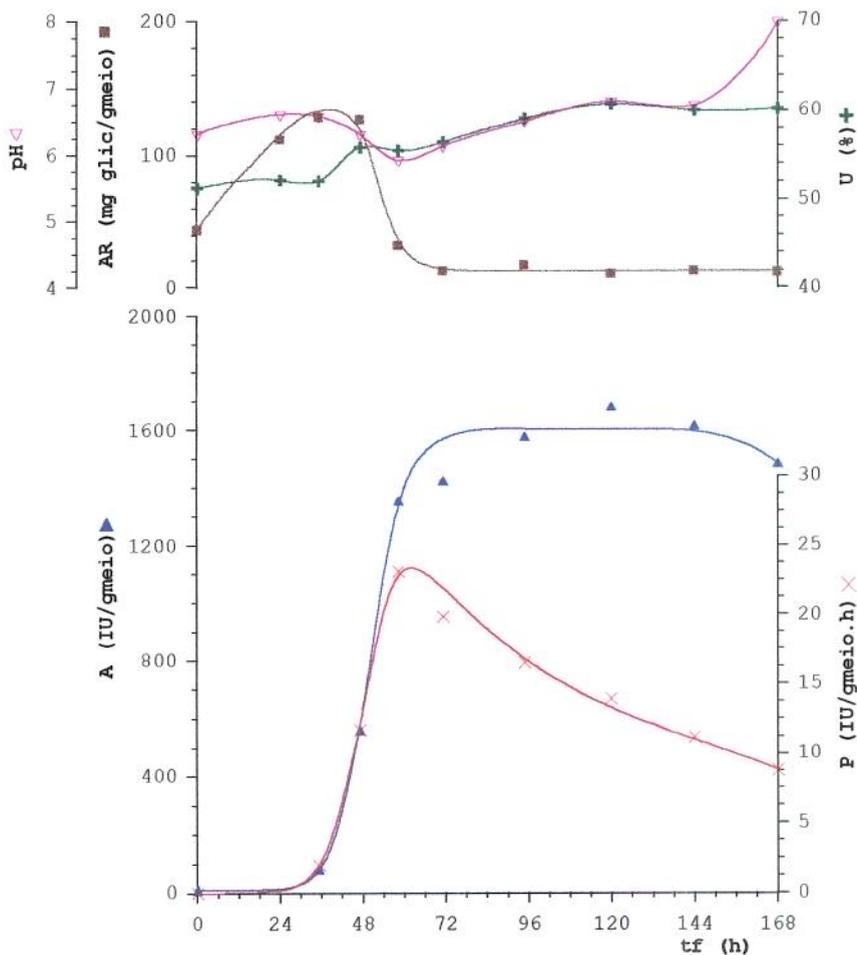


**Figura 4.30.** Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C18 ( $VMM=60 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.31.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C19 (VMM=70 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,37	6,33	44
24	-	-	52,26	6,62	112
35	76,2	2,0	52,14	6,59	129
47	557,7	11,7	55,90	6,32	127
58	1354,4	23,2	55,56	5,93	32
71	1424,0	19,9	56,52	6,14	13
95	1576,5	16,6	59,13	6,51	17
120	1681,7	14,0	60,74	6,81	11
144	1615,8	11,2	60,04	6,75	13
168	1484,2	8,8	60,25	8,00	12

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

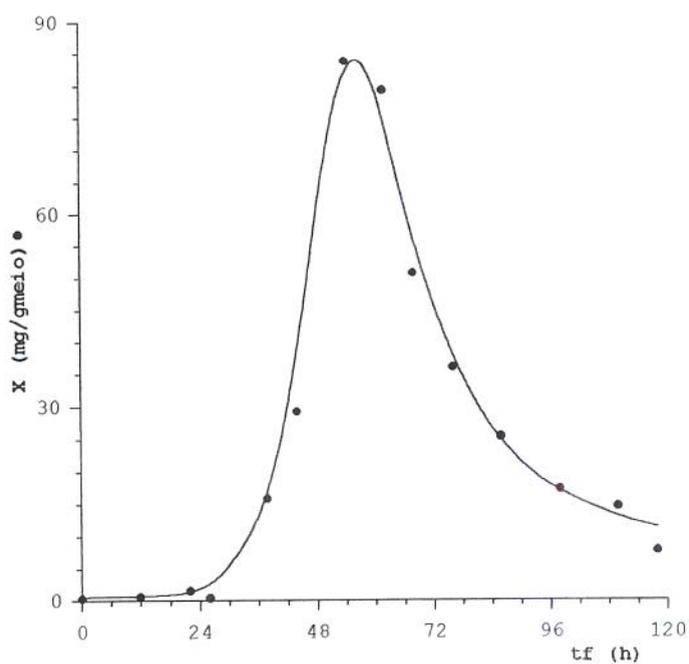


**Figura 4.31.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C19 (VMM=70 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.32.** Valores para a concentração celular medida durante o experimento C20 ( $VMM=70 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	$X$
0	0,31
12	0,55
22	1,45
26	0,36
38	15,87
44	29,2
54	83,75
62	79,27
68	50,80
76	35,99
86	25,38
98	17,23
110	14,56
118	7,69

$t_f(\text{h}); X \text{ (mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}})$

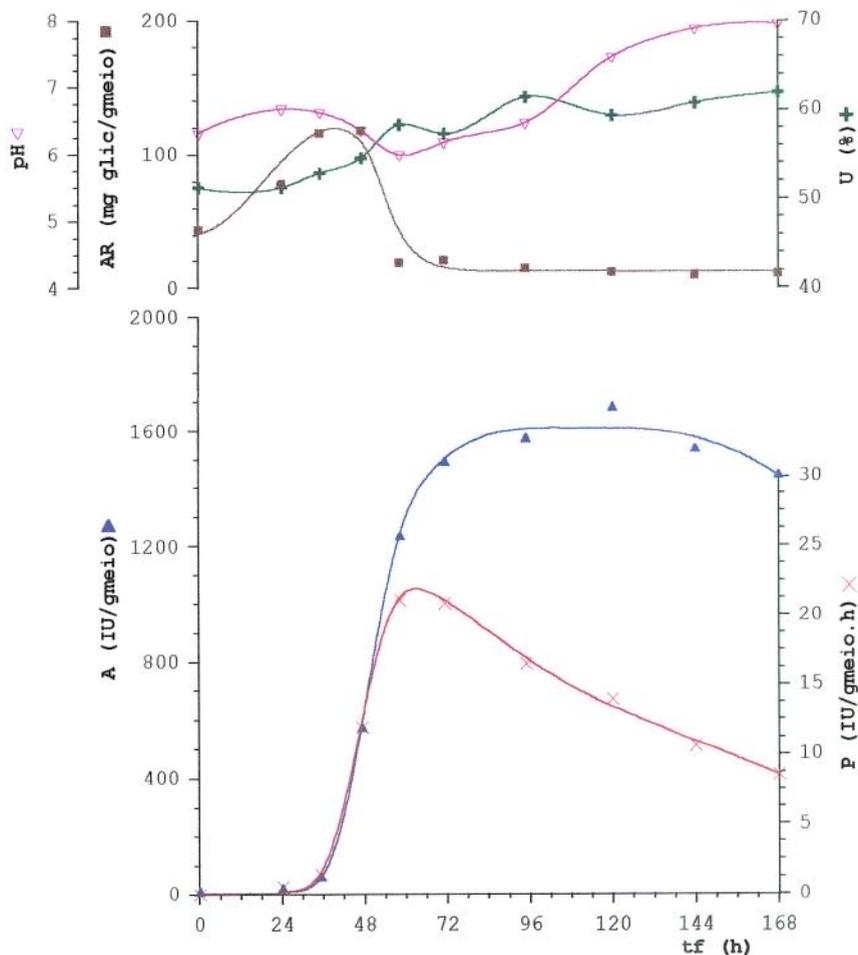


**Figura 4.32.** Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C20 ( $VMM=70 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.33.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C21 ( $VMM=80 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,37	6,33	44
24	18,7	0,5	51,35	6,69	78
35	56,9	1,5	52,96	6,64	116
47	570,5	12,0	54,64	6,37	118
58	1236,4	21,2	58,37	6,00	19
71	1493,7	21,0	57,38	6,19	21
95	1575,7	16,5	61,45	6,48	15
120	1682,7	14,0	59,41	7,46	12
144	1539,1	10,7	60,79	7,89	10
168	1447,7	8,6	61,98	7,96	11

$t_f$  (h); A (IU/ $g_{farelo}$ ); P (IU/h/ $g_{farelo}$ ); U (%); A.R. ( $mg_{glicose}/g_{farelo}$ )

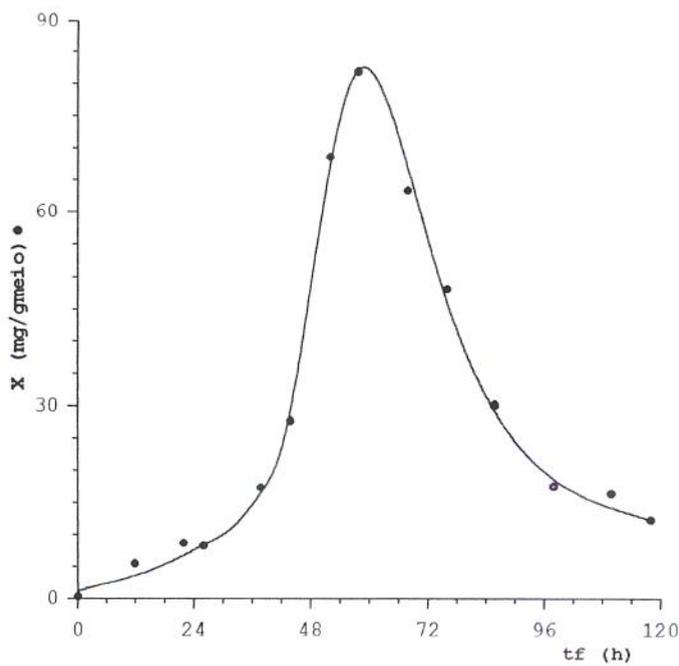


**Figura 4.33.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C21 ( $VMM=80 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

**Tabela 4.34.** Valores para a concentração celular medida durante o experimento C22 ( $VMM=80 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	$X$
0	0,30
12	5,44
22	8,60
26	8,22
38	17,32
44	27,65
52	68,53
58	81,86
68	63,29
76	48,03
86	30,08
98	17,45
110	16,31
118	12,22

$t_f(\text{h}) ; X (\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}})$

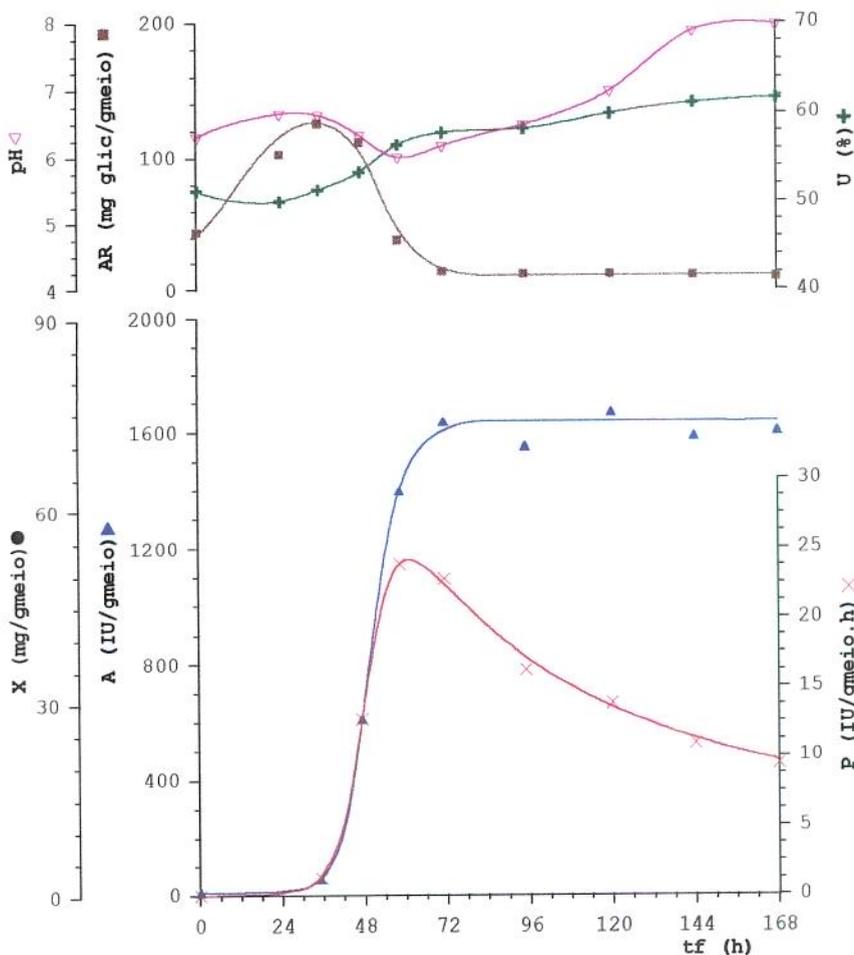


**Figura 4.34.** Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C22 ( $VMM=80 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.35.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C23 ( $VMM=90 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,37	6,33	44
24	-	-	50,15	6,67	103
35	50,8	1,3	51,45	6,65	126
47	606,7	12,8	53,46	6,35	112
58	1397,2	24,0	56,54	6,02	38
71	1634,0	22,9	57,89	6,19	14
95	1551,5	16,3	58,30	6,50	12
120	1667,2	13,9	60,00	7,00	12
144	1586,8	11,0	61,19	7,89	11
168	1603,5	9,5	61,72	7,98	10

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

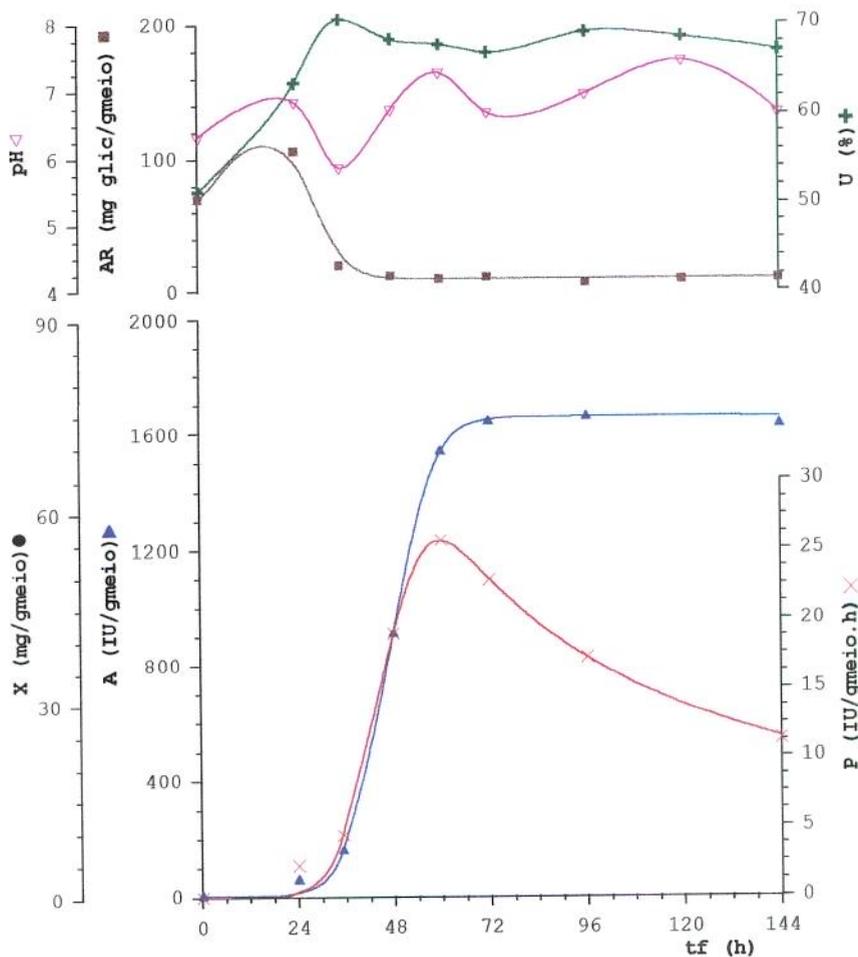


**Figura 4.35.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C23 ( $VMM=90 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

**Tabela 4.36.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C24 ( $VMM=90 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	3,6	0,0	51,40	6,34	70
24	57,3	2,2	63,56	6,86	106
35	159,2	4,4	70,63	5,88	20
48	912,5	18,9	68,38	6,74	12
60	1542,5	25,6	67,78	7,29	10
72	1645,2	22,8	66,88	6,70	11
96	1661,9	17,3	69,17	6,97	7
120	-	-	68,60	7,46	9
144	1633,6	11,3	67,07	6,69	10

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

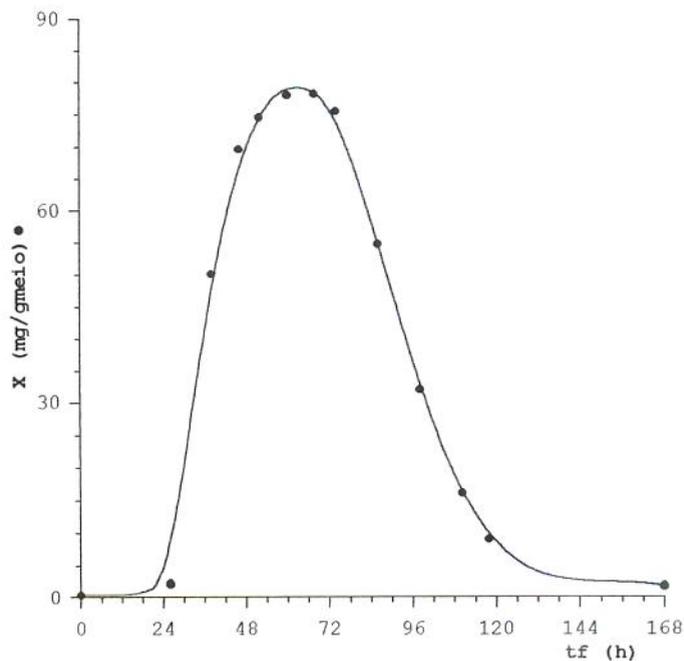


**Figura 4.36.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C24 ( $VMM=90 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ )

**Tabela 4.37.** Valores para a concentração celular medida durante o experimento C25 ( $VMM=90 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	$X$
0	0,34
26	2,15
38	50,09
46	69,64
52	74,59
60	77,95
68	78,18
74	75,51
86	54,76
98	32,07
110	16,14
118	8,94
168	1,77

$t_f$  (h);  $X$  ( $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )

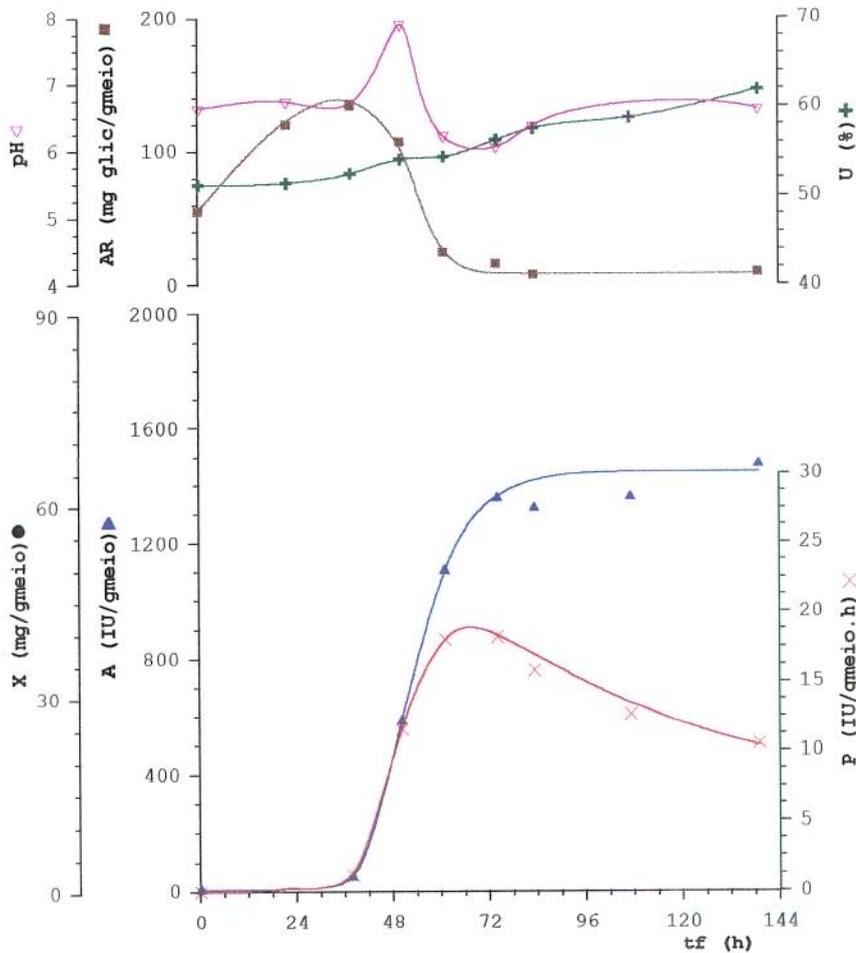


**Figura 4.37.** Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C25 ( $VMM=90 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.38.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C26 (VMM=100 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,1	0,0	51,31	6,65	56
22	-	-	51,51	6,75	120
38	50,8	1,2	52,54	6,73	134
50	587,2	11,6	54,13	7,91	107
61	1108,9	18,1	54,43	6,24	25
74	1360,0	18,3	56,31	6,07	16
83	1325,5	15,9	57,61	6,39	8
107	1363,7	12,7	58,81	-	-
139	1478,7	10,6	61,97	6,64	10

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

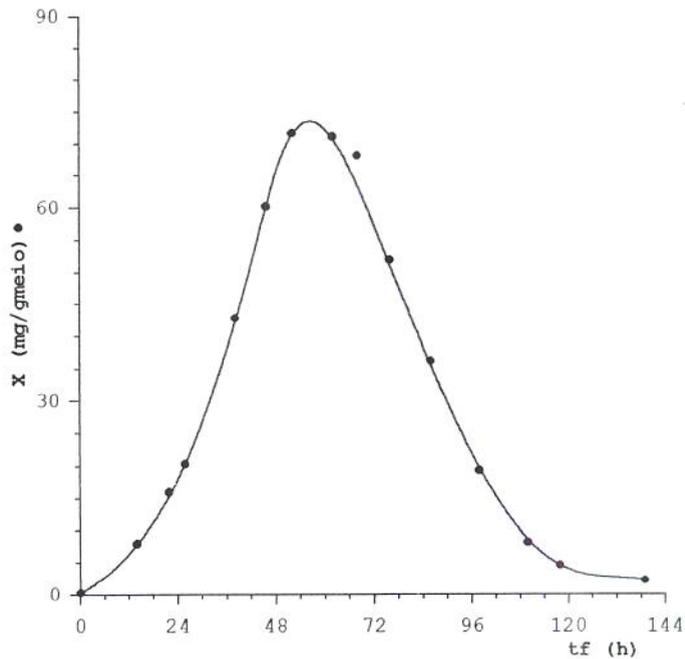


**Figura 4.38.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C26 (VMM=100 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

**Tabela 4.39.** Valores para a concentração celular medida durante o experimento C27 ( $VMM=100 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

$t_f$	$X$
0	0,30
14	7,98
22	15,96
26	20,36
38	42,79
46	60,16
52	71,62
62	71,09
68	68,13
76	51,93
86	36,10
98	19,24
110	8,13
118	4,48
139	2,10

$t_f \text{ (h)} ; X \text{ (mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}})$

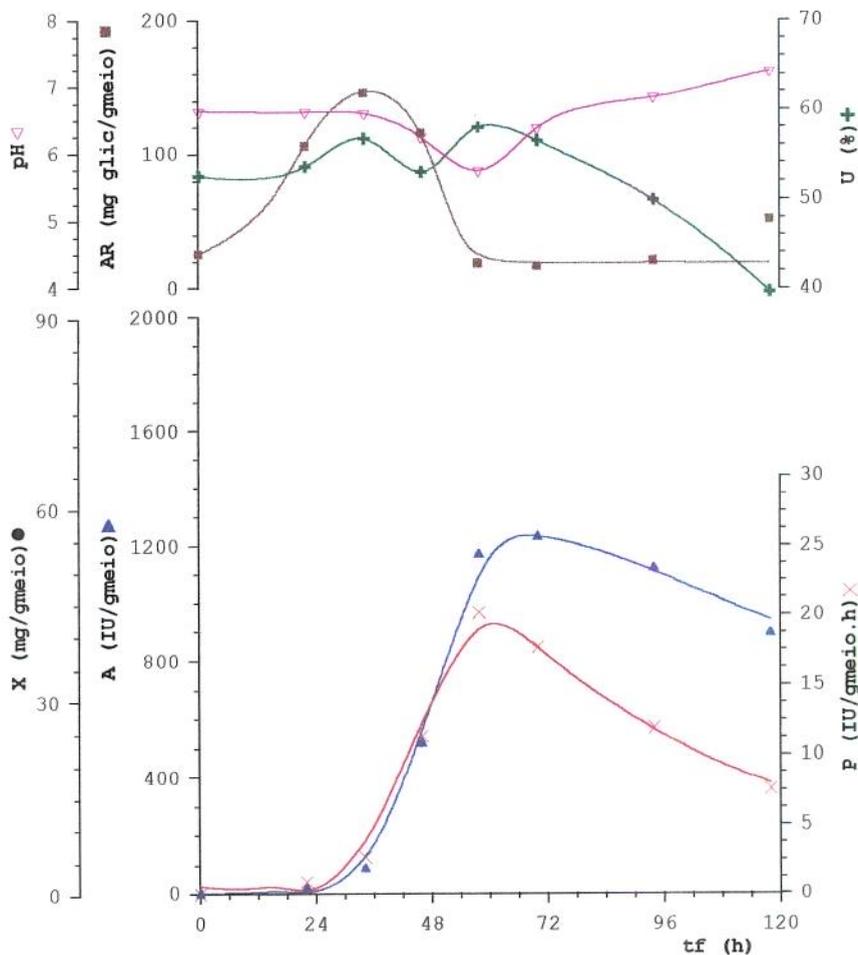


**Figura 4.39.** Concentração celular, em função do tempo de fermentação, para o experimento C27 ( $VMM=100 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ )

**Tabela 4.40.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C28 (VMM=150 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	0,0	0,0	52,63	6,65	26
22	20,5	0,9	53,63	6,64	106
34	90,6	2,7	56,78	6,62	146
46	522,6	11,4	53,06	6,26	116
58	1174,4	20,2	58,06	5,76	19
70	1235,9	17,7	56,57	6,39	17
94	1127,6	12,0	50,00	6,86	21
118	899,3	7,6	39,71	7,25	52

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)



**Figura 4.40.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C28 (VMM=150 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>)

A produção da enzima amiloglicosidase pelo fungo apresentou, em todos os experimentos, um comportamento qualitativo semelhante, porém diferenciado no aspecto quantitativo.

No ensaio C1, processo sem aeração, a produção significativa de enzima começou a ocorrer somente após 48 horas de fermentação, perdurando até 141 horas, quando o valor máximo para a atividade foi atingido (822,8 IU/g<sub>meio</sub>). Tal valor é bem próximo dos obtidos na fase anterior deste trabalho (etapas 4.1.1 a 4.1.4), quando se utilizaram embalagens de polipropileno para o crescimento do fungo. Ao final da otimização das condições físico-químicas de obtenção da enzima, chegou-se à seguinte expressão (Equação 4.23):

$$\begin{aligned}
 A = & -2354,65 + 29,83.t_f + 5,23 \times 10^{-4}.X + 0,63.t_e \\
 & - 0,06.t_f^2 - 2,40 \times 10^{-11}.X^2 + 0,28.t_e^2 \\
 & - 1,49 \times 10^{-6}.t_f.X - 0,13.t_f.t_e - 3,02 \times 10^{-6}.X.t_e \quad (4.23)
 \end{aligned}$$

Sua aplicação para as condições utilizadas em C1 ( $X=4 \times 10^6$  esporos/ml e  $t_e=40$  minutos) fornece valores teóricos para a atividade de 706 IU/g<sub>meio</sub> quando  $t_f=117$ h e 783 IU/g<sub>meio</sub> para 141 horas de fermentação. O primeiro valor teórico é o mesmo encontrado experimentalmente, enquanto que o segundo difere em menos que 5% do valor real apresentado na Tabela 4.13, comprovando o sucesso do planejamento de otimização realizado e a aplicabilidade da equação obtida. Portanto, na ausência de aeração forçada, o microrganismo utilizado mostrou produzir farelos fúngicos com iguais atividades enzimáticas, independente do biorreator usado. A espessura do meio, para os experimentos realizados, também pareceu ser de pouca influência, uma vez que este valor era de aproximadamente 20mm nas embalagens de polipropileno, e de 190mm no experimento C1.

Ao final do processo fermentativo foi constatada uma redução na atividade enzimática (770,6 IU/g<sub>farelo</sub> para  $t_f=168$ h), fato que também foi observado nos ensaios C16, C19, C21 e C28. A explicação para o acontecimento é creditada à presença de proteases, produzidas durante a fermentação, conforme o

relatado por RAMAKRISHNA *et alii* (1994). Uma das causas conhecidas da síntese destas enzimas é a manutenção do microrganismo em condições ambientais e/ou nutricionais desfavoráveis. Com exceção de C28, os outros 4 experimentos tiveram seus finais protelados até 168h, tempo bem superior ao qual o meio já estava completamente tomado por esporos. No caso de C28, em função da grande aeração utilizada, após 72 horas de fermentação, a esporulação já estava bem adiantada (conforme constatação visual).

A partir do ensaio C2 pôde-se notar a importância da aeração na produção da enzima. Mesmo com a pequena aeração de  $5\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  usada em C2, após 47 horas de fermentação a atividade já tinha alcançado o valor de  $228,2\text{ IU}/\text{g}_{\text{meio}}$ , que continuou crescendo significativamente até 95 horas (Figura 4.14). Este ponto representa 46 horas de fermentação a menos e uma atividade maior que aquela do processo sem aeração. Entretanto, a atividade alcançada ao final do processo,  $895,8\text{ IU}/\text{g}_{\text{meio}}$ , pouco diferenciou-se do experimento C1.

A disponibilidade de oxigênio parece aumentar de forma considerável a partir da aeração de  $10\text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ , conforme o verificado pelos experimentos C3 e C4, cujos dados são apresentados nas Tabelas 4.15 e 4.16 e nas Figuras 4.15 e 4.16. Analisando-se C3, nota-se que a atividade de  $1395,8\text{ IU}/\text{g}_{\text{meio}}$  após 83 horas manteve-se quase que estável até o final do processo, cujo valor  $1494,3\text{ IU}/\text{g}_{\text{meio}}$  é 67% acima da maior atividade alcançada no experimento C2. Fato semelhante ocorreu com C4, no qual a atividade para  $t_f=94\text{h}$  ( $1391,1\text{ IU}/\text{g}_{\text{meio}}$ ) é 77% superior ao valor encontrado para C2 no mesmo tempo.

O experimento C5, cuja aeração foi aumentada para  $20\text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ , apresentou resultados bem próximos aos dos ensaios anteriores. A atividade máxima medida foi de  $1401,0\text{ IU}/\text{g}_{\text{meio}}$  no tempo de 120h, que é praticamente idêntica ao valor de  $1395,0\text{ IU}/\text{g}_{\text{meio}}$  alcançada em C4. Uma explicação provável para este fato seria a falta de homogeneidade e muitas vezes de reprodutibilidade dos processos semi-sólidos.

Com o aumento da taxa de aeração para 30 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub> (ensaios C7 e C8), a atividade enzimática voltou a crescer, porém com uma intensidade menor. O maior valor obtido para a atividade do meio nesta vazão, 1547,5 IU/g<sub>meio</sub>, diferenciou em 10,5% do anteriormente citado para a vazão de 20 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>. No experimento C8, a amostragem do ponto t<sub>f</sub>=22h não foi devidamente realizada, uma vez que o valor de 144,8IU/g<sub>meio</sub> para a atividade neste tempo de fermentação não foi alcançado em nenhuma outra corrida.

Como pode ser notado nas Figuras 4.22 à 4.36, após 72 horas de fermentação, e utilizando uma aeração variando entre 40 e 90 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>, a atividade atinge um valor em torno de 1600-1700 IU/g<sub>meio</sub>. Para as condições usadas neste trabalho, a máxima atividade foi alcançada com a VMM de 60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub> (ensaios C16 e C17), cujo valor alcançou 1709,4.

Com o aumento da VMM para 100 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub> (ensaio C26, Figura 4.38), percebeu-se uma nítida redução na atividade enzimática do meio. Segundo GUMBIRA-SA'ID *et alii* (1992), altas taxas de aeração têm o mesmo efeito de altas rotações na fermentação líquida, causando abrasão e ruptura do micélio. FUTATSUGI *et alii* (1993), trabalhando com a produção de amiloglicosidase em meio líquido, também observaram a diminuição da atividade para altas taxas de aeração, afirmando, porém, como não claramente conhecidas as causas para este comportamento adverso. GHILDYAL *et alii* (1994), contrariamente, obtiveram atividades de amiloglicosidase sempre crescentes ao trabalharem com vazões de ar na faixa de 5 a 25 l<sub>ar</sub>/min (que corresponderia a uma faixa de VMM entre 210 e 842 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>), alegando que tal resultado foi devido à boa remoção do calor pela corrente de ar. PANDEY & RADHAKRISHNAN (1992) também detectaram acréscimo na produção de amiloglicosidase com o aumento da aeração; porém, trabalharam dentro de uma faixa muito restrita na vazão de ar (0,1 - 0,15 l<sub>ar</sub>/min, correspondendo ao VMM variando de 18,4 à 27,6 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>).

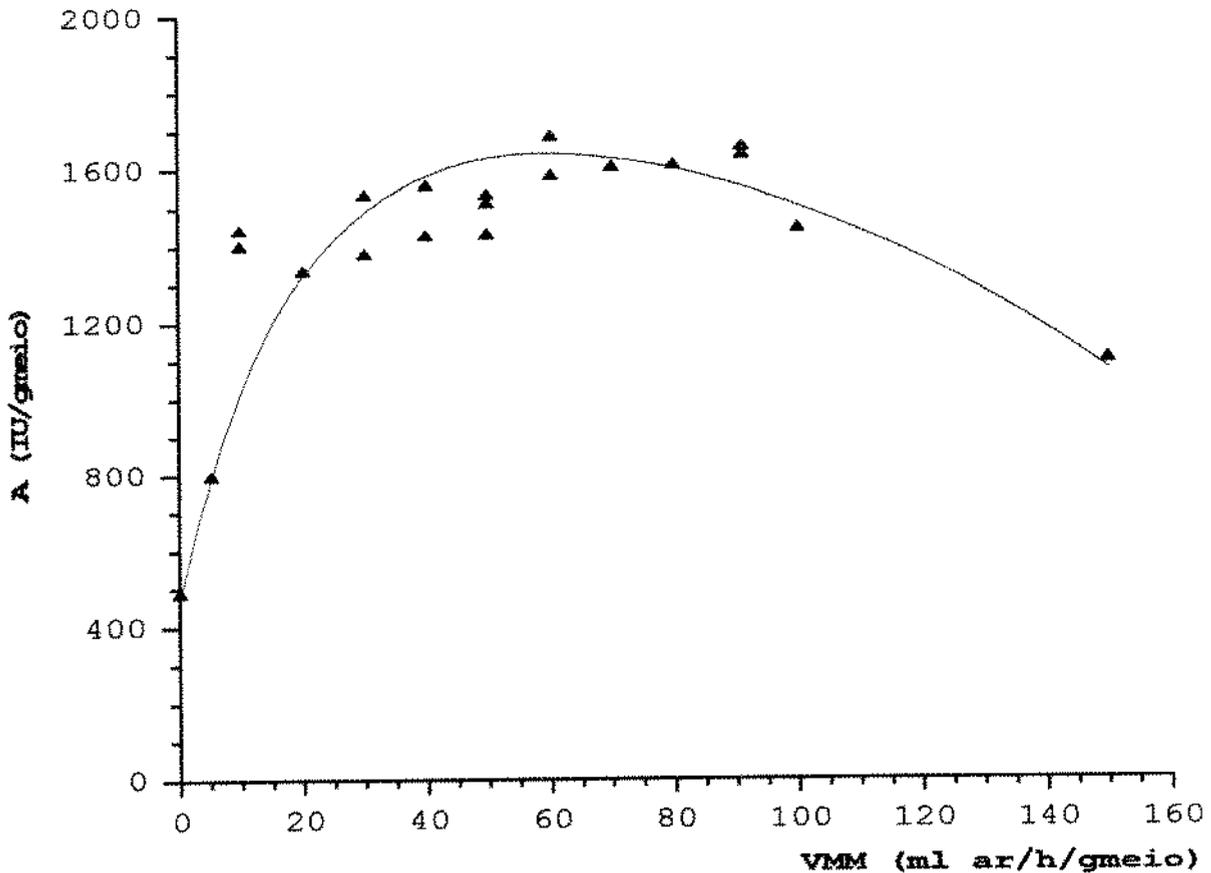
Querendo confirmar a existência do comportamento de queda na atividade, montou-se o experimento C28 (Figura 4.40), com

uma VMM de 150 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>. No tempo de 70 horas de fermentação a atividade máxima é atingida com 1235,9 IU/g<sub>meio</sub>, cerca de 30% menor que o valor alcançado com a vazão de 60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>. Após t<sub>f</sub>=72h, registrou-se uma queda acentuada na atividade enzimática do meio, chegando ao final de 118 horas com 899,3 IU/g<sub>meio</sub>.

A Figura 4.41 compara as atividades medidas no tempo de 96 horas de fermentação, quando a quase totalidade dos ensaios já havia entrado na fase estacionária de atividade enzimática, para todas as VMM utilizadas. Este gráfico ressalta a importância da aeração no processo. Percebem-se três "zonas" bem distintas da influência da aeração sobre a atividade: a. para baixos valores de VMM (0 a 30 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>) qualquer aumento na vazão acarreta grande síntese da enzima; b. uma região (de 40 a 90 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>) com pequena correlação entre produção de enzima e aumento da aeração; e c. uma faixa entre 100 e 150 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub> onde a vazão de ar atua de forma negativa na síntese enzimática. O valor de 60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>, foi adotado como sendo suficiente para uma boa oxigenação do meio e ótimo para a produção da enzima.

A produtividade do processo frente à aeração do meio apresenta um comportamento semelhante ao discutido anteriormente para a atividade. No experimento sem aeração Cl, o valor de 6,0 IU/g<sub>meio</sub>/h para a produtividade máxima só foi alcançado no tempo de 117 horas de fermentação. Assim, como para o estudo da atividade, este valor é bem próximo dos máximos alcançados quando da otimização do processo em embalagens de polipropileno. Com o "Segundo Planejamento Composto Central" (item 4.1.4) obteve-se a seguinte equação que descreve o comportamento da produtividade do processo:

$$\begin{aligned}
 P = & -15,60 + 0,21.t_f + 4,40 \times 10^{-6}.X + 0,02.t_e \\
 & - 4,51 \times 10^{-4}.t_f^2 - 1,82 \times 10^{-13}.X^2 + 2,30 \times 10^{-3}.t_e^2 \\
 & - 1,46 \times 10^{-8}.t_f.X - 1,21 \times 10^{-3}.t_f.t_e - 2,22 \times 10^{-8}.X.t_e \quad (4.26)
 \end{aligned}$$



**Figura 4.41.** Atividade enzimática medida no tempo de 96 horas de fermentação em função da vazão de ar por massa de meio (VMM).

A mesma, quando aplicada às condições do ensaio C1 ( $X=4 \times 10^6$  esporos/ml e  $t_e=40$  minutos), fornece os valores teóricos de 5,9; 5,6 e 4,8 IU/g<sub>meio</sub>/h para os tempos de fermentação de 117, 141 e 165 horas, respectivamente. Tais valores são, praticamente, os mesmos encontrados na Tabela 4.13, mostrando a aplicabilidade da otimização também para a produtividade.

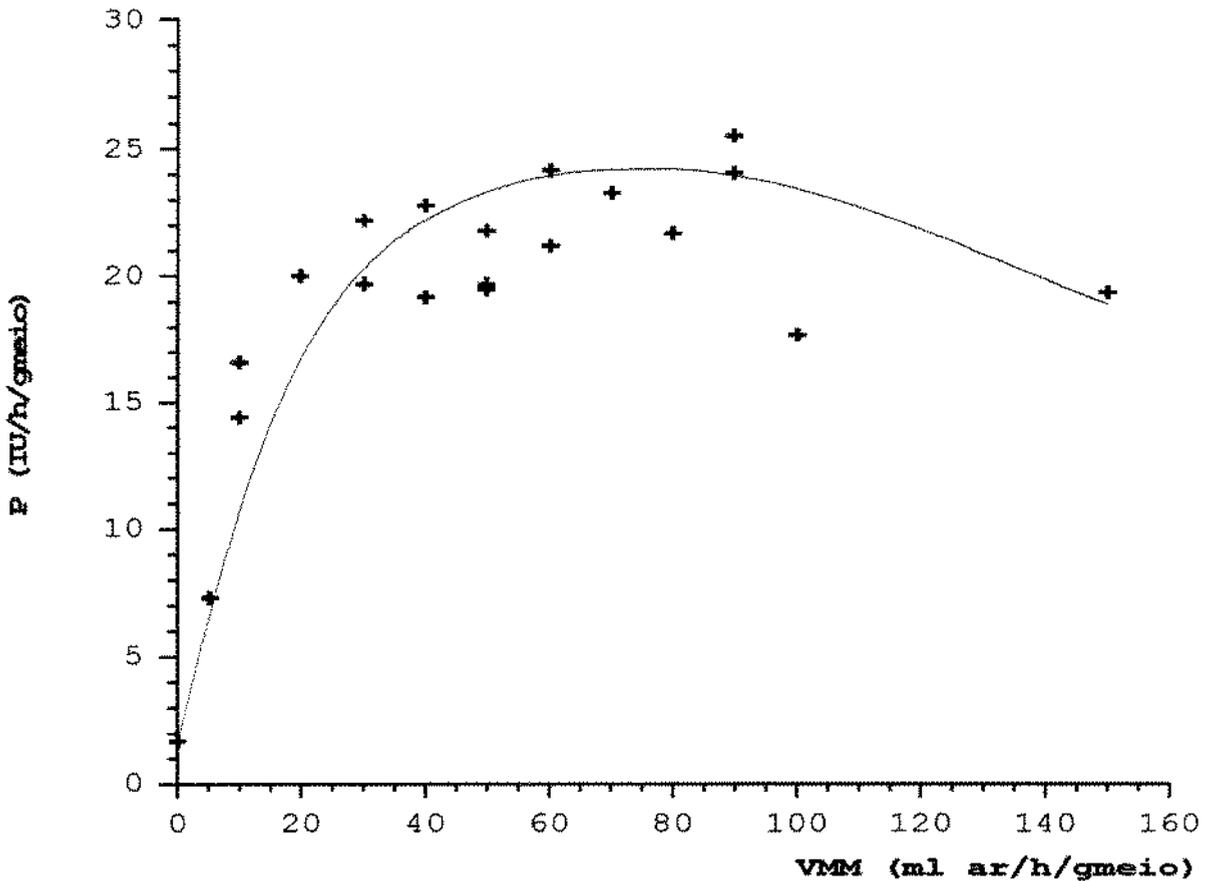
A aeração de 5 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub> para o ensaio C2 não mostrou efeito significativo sobre a produtividade máxima, que subiu para 8,2 IU/g<sub>meio</sub>/h; porém, o tempo de fermentação de 95 horas necessário para alcançar este valor representa 22 horas a menos que no experimento C1. O efeito da aeração fez-se perceber nitidamente com o aumento da VMM para 10 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub> (ensaios C3 e C4), quando o maior valor da produtividade foi de 17,9 IU/g<sub>meio</sub>/h para  $t_f=74$  h.

A provável elevação na disponibilidade de oxigênio, que faz aumentar a produtividade do processo, pareceu ser obtida com taxas de aeração da ordem de 20 a 90  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ , que pouco se diferenciaram neste aspecto. Para tais experimentos, a produtividade máxima alcançada esteve na faixa de 20 a 25  $\text{IU}/\text{g}_{\text{meio}}/\text{h}$  para um tempo de fermentação de aproximadamente 60 horas, cerca de metade do tempo ótimo do processo sem aeração.

Igualmente ao observado para a atividade do meio, com a aeração de 100 e 150  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  notou-se uma queda da produtividade. Nestes ensaios (C26 e C28) tal redução levou os valores a um nível semelhante ao obtido nos experimentos C3 e C4 (10  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ).

Com o gráfico da Figura 4.42 é possível a comparação das produtividades obtidas no tempo de 60 horas de fermentação, região de produtividade máxima para a maioria dos experimentos, em função das diversas VMM utilizadas. Igualmente ao verificado na Figura 4.41, este gráfico sugere a existência de três regiões de correlações diferentes entre produtividade e aeração, conforme anteriormente discutido. Os valores máximos logrados para a produtividade correspondem aos experimentos conduzidos com vazões de ar de 60 e 90  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ .

Assim como normalmente acontece nas fermentações em submerso, analisando as Figuras 4.13 a 4.40, nota-se que, também no processo SSF, existe a diferenciação entre os tempos de fermentação ótimos para a produção e para a produtividade máxima. Tomando como exemplo a taxa de aeração de 60  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  usada no experimento C16 (Tabela 4.28), supõe-se como vantajoso considerar o final da fermentação em  $t_f=71\text{h}$  (11 horas a mais que o tempo de produtividade máxima), uma vez que a redução de apenas 1,3  $\text{IU}/\text{g}_{\text{meio}}/\text{h}$  na produtividade do processo fermentativo iria ser compensada pelo aumento de 224  $\text{IU}/\text{g}_{\text{meio}}$  na atividade do meio. Uma decisão neste nível iria requerer uma análise de maior profundidade, que dependeria de diversos fatores, tais como custos diretos e indiretos de produção e valor agregado ao produto final, entre outros.



**Figura 4.42.** Produtividade obtida no tempo de 60 horas de fermentação em função da vazão de ar por massa de meio (VMM).

O melhor resultado alcançado para a produtividade nesta fase do trabalho (25,6 IU/g<sub>meio</sub>/h) é cerca de 260% maior que o melhor valor obtido nos processos conduzidos em embalagens de polipropileno (7,1 IU/g<sub>meio</sub>/h). Para a atividade do meio ocorreu o mesmo. Os valores máximos em reatores de coluna, aproximadamente 1700 IU/g<sub>meio</sub>, representam um acréscimo de mais de 110% ao maior valor apresentado na fase anterior (807,55 IU/g<sub>meio</sub>). PANDEY et alii (1996) também trabalhando com produção de amiloglicosidase em biorreator de coluna conseguiram atividades enzimáticas 50% superiores ao estudo em frascos erlenmeyer. A comparação destes números mostra de maneira clara tanto as vantagens do uso da aeração direta, quanto a conveniência na continuidade dos estudos de utilização do reator de coluna para a produção da enzima amiloglicosidase.

Uma análise do conteúdo de umidade dos meios mostra que, com exceção de C28 (VMM=150ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>) que apresentou um

decréscimo de 12,92%, o conteúdo de umidade do substrato, cujo valor inicial se encontrava em torno de 50%, aumentou ao longo dos processos fermentativos. SARGANTIS *et alii* (1993) detectaram tal aumento da umidade durante o curso da fermentação como sendo benéfico para o crescimento celular em processos SSF. Os autores apresentam aquele que seria um perfil ótimo de umidade do meio relativamente ao tempo de fermentação.

Afora os experimentos C1 (sem aeração) e C24 (VMM=90ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>), nos quais a variação de umidade ( $U_f - U_i$ ) ao final do processo foi de 4,70 e 15,67%, respectivamente, nos demais ensaios este aumento se manteve na faixa entre 8,08% e 11,60%. Na Tabela 4.41 são listados os valores da variação de umidade ( $U_f - U_i$ ), para os experimentos cinéticos com densidade aparente padrão, cujo valor médio foi de  $616,4 \pm 18,9$  g/l. Como o final da fermentação ocorria em tempos diferenciados, e para permitir uma melhor comparação, criou-se uma grandeza denominada de "variação média de umidade do processo", definida como  $(U_f - U_i)/t_f$ , representada na mesma tabela. Também por esta linha de raciocínio, os experimentos C1, C24 e C28 são os únicos cuja variação foge do intervalo compreendido entre 0,0509 e 0,0835%umidade/h.

Observação semelhante no aumento do conteúdo de umidade dos meios foi realizada por YANG *et alii* (1993), ao trabalharem com frascos estáticos e reator de coluna sem aeração. Tal fato foi alegado como sendo devido à produção de água metabólica ou à liberação de água resultante da oxidação dos carboidratos presentes. DORTA *et alii* (1994), utilizando-se de um fermentador semi-sólido sem aeração, calcularam a água produzida pelo metabolismo de carboidratos durante o crescimento de *Metarhizium anisopliae* em farelo de arroz.

Nas Tabelas 4.13 a 4.40 observa-se um salto no conteúdo de umidade dos meios no período que coincide com o de maior produção da enzima. Isto, aliado ao pequeno aumento de umidade em C1 (VMM=0ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>), confirma a validade da hipótese anteriormente citada, também para as fermentações em estado sólido com aeração.

**TABELA 4.41.** Valores para a variação de umidade ( $U_f-U_i$ ) e variação média de umidade do processo  $(U_f-U_i)/t_f$  observados durante as fermentações semi-sólidas em reatores de coluna

Experimento	$t_f$	$U_f-U_i$	$(U_f-U_i)/t_f$
C1	165	4,70	0,0285
C2	168	8,55	0,0509
C3	139	8,66	0,0623
C4	118	8,21	0,0696
C5	120	9,67	0,0806
C7	144	8,67	0,0602
C8	139	10,78	0,0776
C10	144	11,58	0,0804
C11	120	8,41	0,0701
C13	144	11,56	0,0803
C14	139	11,60	0,0835
C15	118	9,22	0,0781
C16	168	9,64	0,0574
C17	120	8,08	0,0673
C19	168	8,88	0,0529
C21	168	10,61	0,0632
C24	144	15,67	0,1088
C23	168	10,35	0,0616
C26	139	10,66	0,0767
C28	118	-12,92	-0,1095

$t_f$  (h);  $U_f-U_i$  (%);  $(U_f-U_i)/t_f$  (%/h)

Para tais processos, outro fator que deve contribuir para o aumento no conteúdo de umidade do meio é a eficiência de separação da água de arraste, oriunda da operação de saturação do ar. Tal efeito, que aparece mais nitidamente para altas aerações, pode ser melhor percebido comparando-se os experimentos C23 e C24, ambos com uma vazão de 90 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>. Para C24, a umidade inicial de 51,40% subiu, após 35 h de fermentação, para um valor de 70,63% e se manteve, até o final, em torno de 68-69%. Para tentar a diminuição deste ganho de umidade, resolveu-se melhorar o sistema de saturação, diminuindo-se a coluna de água e aumentando-se a coluna de separação. Com isto, os valores de umidade para C23 (ensaio realizado após este ajuste) passaram do inicial 51,37% para

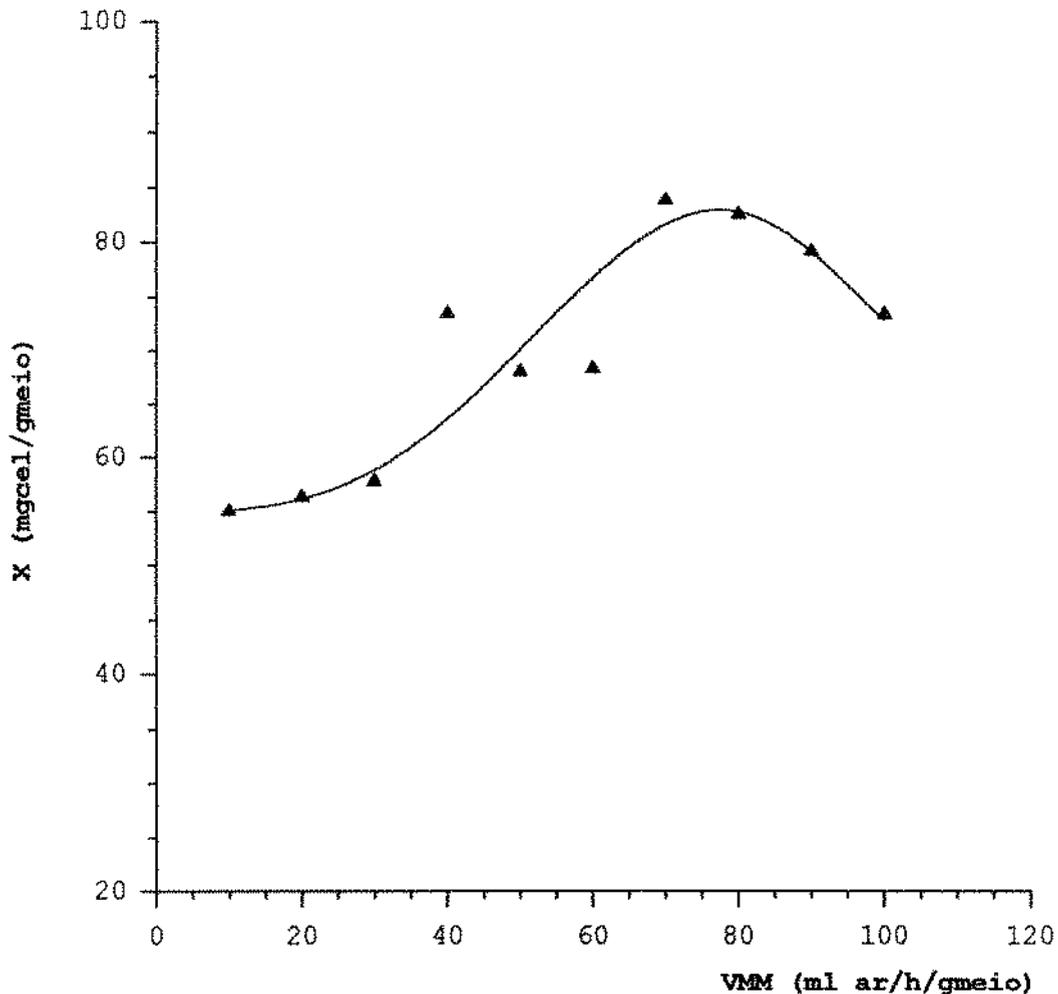
61,72%, após 168 horas de fermentação, resultados semelhantes aos obtidos em outros ensaios.

O problema citado por diversos autores (DORTA *et alii*, 1994; SARGANTIS *et alii*, 1993; LONSANE *et alii*, 1992; SAUCEDO-CASTANEDA *et alii*, 1992b; SATO *et alii*, 1982) de redução da umidade do meio, somente foi detectado no experimento C28, em que se utilizou uma alta taxa de aeração ( $VMM=150\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ). Em tal ensaio, a umidade iniciou em 52,63% e aumentou, durante a fase de produção da enzima, a 58,06%, decrescendo acentuadamente, logo após, até 39,71%. A elevação inicial reforça a idéia, anteriormente discutida, da produção de água metabólica, enquanto que a redução ao final do processo indica que o sistema de saturação do ar não estava dimensionado para repor a grande quantidade de água evaporada nesta VMM. Segundo SAUCEDO-CASTANEDA *et alii* (1992b), na presença de aeração suficiente, cerca de 7g de água são evaporadas do meio para cada 1g de amido oxidado.

Em função da metodologia adotada para a determinação da concentração celular (item 3.11) requerer a absorção do  $\text{CO}_2$ , não foi possível determinar o valor de X para os experimentos C1 ( $VMM=0\text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ), C2 ( $VMM=5\text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ) e C28 ( $VMM=150\text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ). Nos dois primeiros ensaios, a pressão na saída do reator não foi suficiente para vencer a coluna de líquido formado pela solução de NaOH, enquanto que para C28 o sistema de coleta do  $\text{CO}_2$  não suportou a alta taxa de aeração.

Comparando-se as curvas de crescimento, nota-se que para as vazões de 10 a 50  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  as etapas de germinação dos esporos e de aceleração do crescimento se estenderam até cerca de 24 horas de fermentação. Para os experimentos com aeração acima de 60  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  estas etapas têm uma duração menor e, com exceção de C25 ( $VMM=90\text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ), são difíceis de ser estipuladas. Para todas as condições de aeração utilizadas, a concentração celular máxima foi atingida entre 55 e 70 horas de fermentação, após o que iniciou-se o processo de autólise do micélio.

Com relação às concentrações celulares máximas, para os ensaios com aerações de 10 e 20  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  obtiveram-se 54,71 e 55,61  $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ , respectivamente, ao passo que para C20 (VMM=70  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ) este valor alcançou 83,75  $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ , voltando a diminuir para os experimentos C25 (VMM=90  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ) e C27 (VMM=100  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ), cujos valores foram de 78,18 e 71,62  $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ . Tal comportamento indica a tendência à existência de uma vazão de ar ótima para o crescimento celular, da mesma forma que o verificado para a atividade enzimática. No caso do crescimento celular, esta aeração pareceu estar entre 70 e 80  $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{farelo}}$ . Na Figura 4.43 estão mostrados os valores destas



**Figura 4.43.** Concentração celular máxima em função da vazão de ar por massa de meio (VMM).

concentrações celulares máximas para as condições de aeração estudadas.

A comparação das curvas de crescimento celular com as de atividade enzimática mostra que a produção da enzima amiloglicosidase se dá de forma associada ao crescimento do *Aspergillus niger*, conforme citado em 2.3.

#### 4.2.1.1. Fermentação submersa

A fim de levantar os parâmetros  $m_{CO_2}$  e  $Y_{X/CO_2}$  utilizados na determinação da concentração celular dos experimentos semi-sólidos em colunas, realizou-se uma fermentação líquida de acordo com o descrito em 3.13. Os valores experimentais, obtidos para a concentração celular, a condutividade elétrica ( $\lambda$ ) da solução de NaOH, a massa de  $CO_2$  liberado, a velocidade de respiração ( $Q_{CO_2} \cdot X$ ), o pH, os açúcares redutores e os açúcares redutores totais ao longo do processo fermentativo, encontram-se listados na Tabela 4.42. A Figura 4.44 mostra o comportamento destas variáveis (com exceção de  $\lambda$ ) como função do tempo de fermentação. As amostras foram analisadas, no mínimo, em duplicata, sendo que para a determinação da quantidade de  $CO_2$  liberado a partir dos valores de  $\lambda$  (conforme 3.12), usaram-se as seguintes correlações:

$$M_{CO_2} = V_{NaOH} \cdot 22 \cdot (N_1 - N) \quad (4.27)$$

e

$$N = 0,00534 \cdot \lambda - 0,04633 ; \quad r = 0,9973 \quad (4.28)$$

onde:

$M_{CO_2}$  = massa de gás carbônico liberada durante a fermentação ( $g_{CO_2}$ );

$V_{NaOH}$  = volume de hidróxido de sódio usado para coleta do  $CO_2$  liberado na fermentação (5,8 litros);

$N_1$  = normalidade inicial da solução de NaOH;

$N$  = normalidade da solução de NaOH no tempo de amostragem;

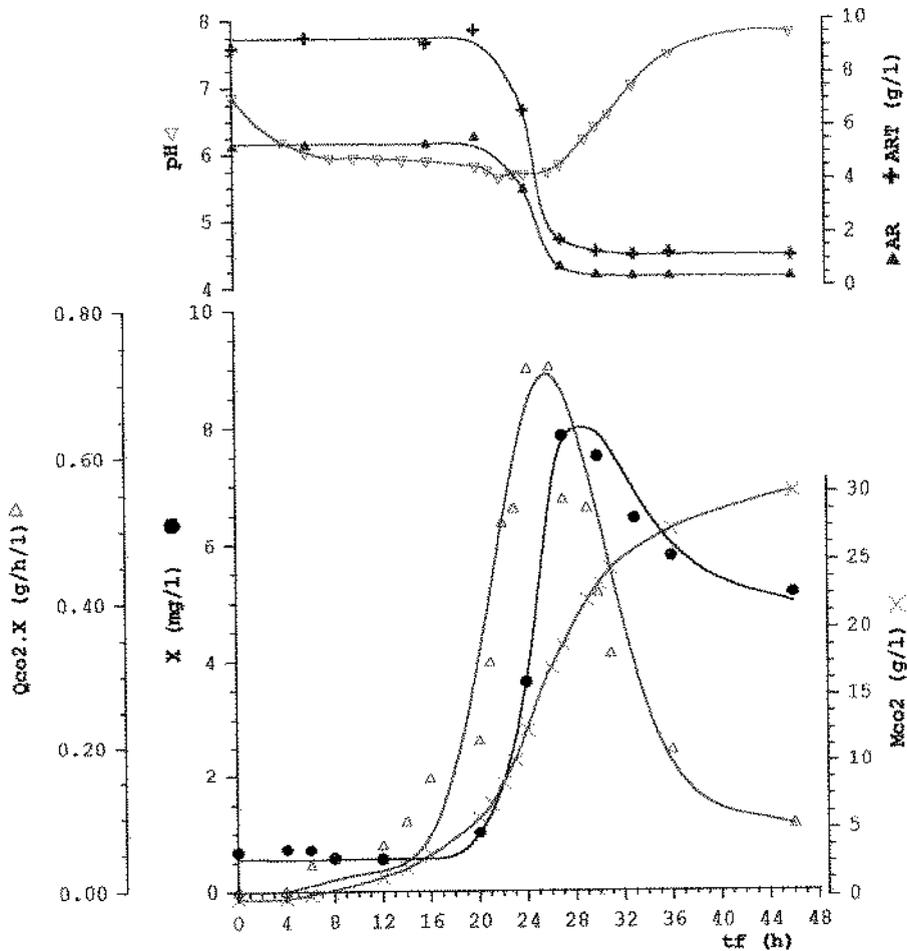
$\lambda$  = condutividade elétrica da solução de NaOH no tempo de amostragem (mS).

**Tabela 4.42.** Valores para a concentração celular (X), condutividade elétrica ( $\lambda$ ) da solução de NaOH, massa de CO<sub>2</sub> liberado ( $M_{CO_2}$ ), velocidade de respiração ( $Q_{CO_2} \cdot X$ ), pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) medidos durante a fermentação submersa

tf (h)	X (g/l)	$\lambda$ (mS)	$M_{CO_2}$ (g <sub>CO2</sub> )	$Q_{CO_2} \cdot X$ (g <sub>CO2</sub> /h/l)	pH	AR (g/l)	ART (g/l)
0	0,668	184,1	0,00	0,000	6,87	5,28	9,00
4	0,723	184,1	0,00	0,000	6,20	-	-
6	0,710	183,8	0,26	0,035	6,04	5,33	9,39
8	0,573	-	-	-	5,95	-	-
10	0,538	-	-	-	5,95	-	-
12	0,548	181,9	1,53	0,062	5,94	-	-
14	0,540	181,0	2,17	0,095	5,92	-	-
16	0,525	179,5	3,19	0,155	5,90	5,36	9,19
20	1,000	175,5	5,87	0,209	5,82	5,63	9,66
21	-	174,0	6,89	0,318	5,77	-	-
22	-	171,6	8,52	0,509	5,65	-	-
23	-	169,2	10,22	0,529	5,70	-	-
24	3,637	165,8	12,54	0,733	5,70	3,68	6,64
26	-	158,9	17,19	0,733	5,74	-	-
27	7,860	156,4	18,89	0,542	5,84	0,79	1,81
29	-	151,6	22,20	0,530	6,22	-	-
30	7,505	149,7	23,48	0,413	6,41	0,47	1,37
31	-	148,2	24,50	0,330	6,60	-	-
33	6,450	-	-	-	7,04	0,42	1,23
36	5,790	143,9	27,43	0,195	7,50	0,42	1,32
46	5,165	140,0	30,149	0,091	7,82	0,40	1,20

Para o cálculo da velocidade de respiração, admitiu-se, inicialmente, como linear a variação de um ponto de amostragem

a outro. A partir desta primeira aproximação, fizeram-se interpolações com intervalos cada vez menores, objetivando-se "alisar" a curva e obter resultados mais precisos. A Figura 4.44 mostra o comportamento de  $X$ ,  $\lambda$ ,  $M_{CO_2}$ ,  $Q_{CO_2} \cdot X$ , AR e ART como função do tempo de fermentação.



**Figura 4.44.** Concentração celular ( $X$ ), massa de  $CO_2$  liberado ( $M_{CO_2}$ ), velocidade de respiração ( $Q_{CO_2} \cdot X$ ), pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), em função do tempo, para a fermentação submersa

Supondo todo o  $CO_2$  que sai do fermentador como originário dos processos metabólicos do microrganismo, um balanço de massa para este gás fornece, segundo NARAHARA et alii (1982), a seguinte equação:

$$Q_{CO_2} = m_{CO_2} + \frac{1}{Y_{X/CO_2}} \mu \quad (4.29)$$

onde:

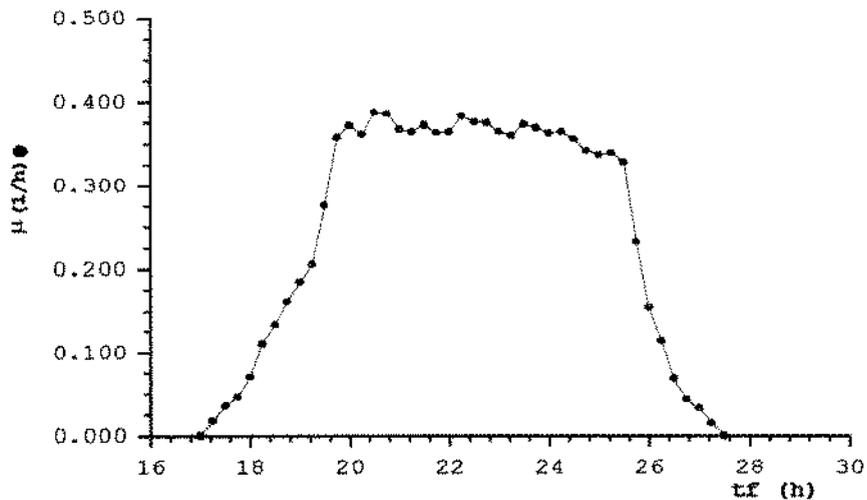
$Q_{CO_2}$  = velocidade específica de respiração ( $g_{CO_2}/h/g_{cel}$ );

$m_{CO_2}$  = coeficiente de manutenção para  $CO_2$  ou velocidade específica de produção de  $CO_2$  para manutenção ( $g_{CO_2}/h/g_{cel}$ );

$Y_{X/CO_2}$  = fator de conversão para X- $CO_2$  ( $g_{cel}/g_{CO_2}$ );

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

A partir dos valores experimentais da Tabela 4.42 e da Figura 4.44, e utilizando-se de ampliações gráficas, interpolações e derivações (LEDUY & ZAJIC, 1973), calcularam-se as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) e de respiração ( $Q_{CO_2}$ ). Na Figura 4.45 são mostrados os valores para  $\mu$  em função do tempo de fermentação, enquanto que a Tabela 4.43 lista os valores de  $\mu$  e  $Q_{CO_2}$  que apresentaram uma melhor correlação quando ajustados à Equação 4.29.



**Figura 4.45.** Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) em função do tempo de fermentação durante a fermentação submersa

**Tabela 4.43.** Valores para a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) e velocidade específica de respiração ( $Q_{CO_2}$ ) calculados a partir dos dados experimentais e usados para determinar  $Y_{X/CO_2}$  e  $m_{CO_2}$ .

$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$Q_{CO_2}$ ( $g_{CO_2}/h/g_{cel}$ )
0,000	0,0770
0,011	0,0810
0,026	0,0845
0,063	0,0905
0,107	0,0935
0,125	0,0944
0,144	0,0980
0,176	0,1011
0,207	0,1060
0,228	0,1088
0,249	0,1130
0,289	0,1202
0,306	0,1240
0,340	0,1400
0,360	0,1600

Como pode ser notado pela Figura 4.44, houve um tempo muito grande (cerca de 16 horas) entre a inoculação e o início do consumo de substrato e do crescimento celular. O motivo deste comportamento foi a adição do anti-espumante de uma maneira equivocada, que criou uma espécie de camada isolante na volta dos esporos, fazendo com que os mesmos ficassem inicialmente aglomerados. Através do acompanhamento com microscópio ótico, notou-se que a "germinação" destes esporos só teve início após um aumento momentâneo na agitação e a conseqüente remoção desta camada de anti-espumante. Em seguida a este fato, ocorreram uma queda marcante nos níveis de ART e AR e um crescimento acentuado da concentração celular e da produção de  $CO_2$ . De acordo com os valores de  $\mu$  (Figura 4.45) percebe-se que a fase de crescimento exponencial iniciou com aproximadamente 20 horas

de cultivo, finalizando no tempo de 25 horas. A massa celular continuou crescendo até  $t_f=28$  horas, instante em que as concentrações de AR e ART aproximaram-se de zero. A partir deste momento o fungo entrou em processo de lise celular e esporulação, tendo como efeito a redução da velocidade de respiração e o aumento do pH.

Assim, a partir dos valores da Tabela 4.43, chegou-se à seguinte equação e valores para  $Y_{X/CO_2}$  e  $m_{CO_2}$ :

$$Q_{CO_2} = 0,0747 + 0,1790.\mu \quad ; \quad r=0,9464 \quad (4.30)$$

$$Y_{X/CO_2} = 5,5866 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{CO}_2}$$

$$m_{CO_2} = 0,0747 \text{ g}_{\text{CO}_2}/\text{h}/\text{g}_{\text{cel}} = 1,698 \text{ mmol}_{\text{CO}_2}/\text{h}/\text{g}_{\text{cel}}$$

O valor encontrado para  $m_{CO_2}$  é semelhante ao estimado (1,79  $\text{mmol}_{\text{CO}_2}/\text{h}/\text{g}_{\text{cel}}$ ) por NARAHARA et alii (1982) para o crescimento de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido com arroz como substrato. Com relação a  $Y_{X/CO_2}$ , o alto valor encontrado pode ter como causa uma não-absorção total, por parte da solução de NaOH, do gás carbônico desprendido. Conforme o citado por MAIORANO et alii (1992), referindo-se ao *Aspergillus oryzae*, existe na literatura uma discrepância difícil de ser explicada entre os diversos valores citados para  $Y_{X/O_2}$  e  $m_{O_2}$  (ou, no caso,  $Y_{X/CO_2}$  e  $m_{CO_2}$ ).

#### 4.2.2. Influência da densidade aparente do meio

A natureza dos substratos empregados nos processos SSF faz com que, após preparado o meio, exista uma variação em sua densidade aparente (ou compactação). Tal variação irá depender, entre outros fatores, do tipo de substrato, do processo de preparo do meio, do biorreator utilizado e da maneira de acomodar o leito fixo. Para o aumento de escala ("scale-up") do

presente reator de coluna, esta variável pode vir a limitar o processo fermentativo, dificultando a transferência de calor e massa.

Como a literatura é pobre a respeito deste assunto, planejou-se uma série de ensaios visando a um melhor entendimento sobre o comportamento da produção da enzima relativamente à densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ), definida pela seguinte equação:

$$d_{ap} = \frac{M}{V_u} ; \quad (4.31)$$

onde:

$M$  = massa inicial de meio (g);

$V_u$  = volume do reator ocupado pela massa  $M$  de meio (l).

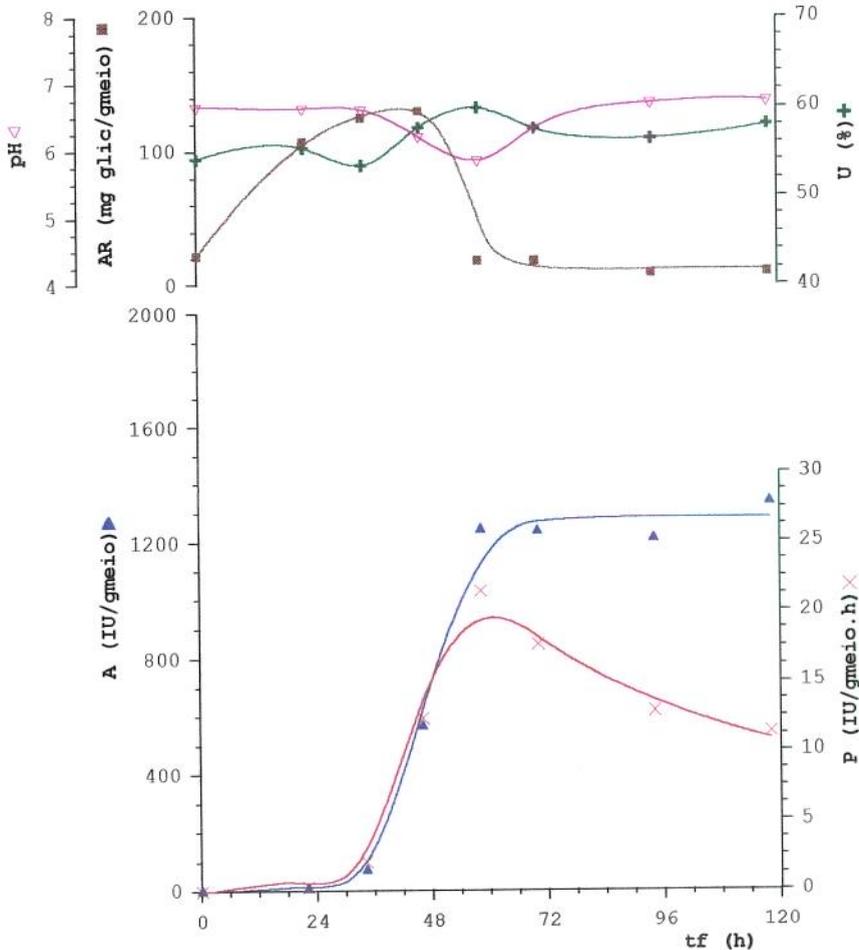
Como para esta série de experimentos a  $d_{ap}$  foi previamente definida, para cada reator se calculou a massa de meio e a altura de leito necessárias para as condições estabelecidas. Os valores extremos para  $d_{ap}$  (499 e 924 g/l) foram obtidos após uma série de testes. Com a presente formulação do meio foi praticamente impossível obter valores abaixo de 499 g/l, sendo que uma carga de substrato acima de 924 g/l acarretava interrupção da aeração, que quando aumentada arrastava o meio de uma maneira pistonada. A aeração para todos os ensaios foi mantida fixa em 60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>, conforme o estipulado em 4.2.1.

As Tabelas 4.44 a 4.48 apresentam os valores experimentais obtidos para a atividade enzimática (A), a produtividade (P), a umidade (U), o pH e os açúcares redutores (AR) ao longo das 5 fermentações montadas para estudar o efeito da densidade aparente do meio, enquanto que os comportamentos gráficos para tais variáveis são mostrados nas Figuras 4.46 a 4.50.

**Tabela 4.44.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C29 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=499g/l$

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	0,0	0,0	54,19	6,68	22
22	7,1	0,3	55,40	6,65	107
34	71,6	2,1	53,45	6,63	125
46	568,6	12,4	57,65	6,22	130
58	1247,5	21,5	59,90	5,87	18
70	1242,0	17,7	57,58	6,35	18
94	1216,0	12,9	56,45	6,73	9
118	1342,3	11,4	58,06	6,76	10

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

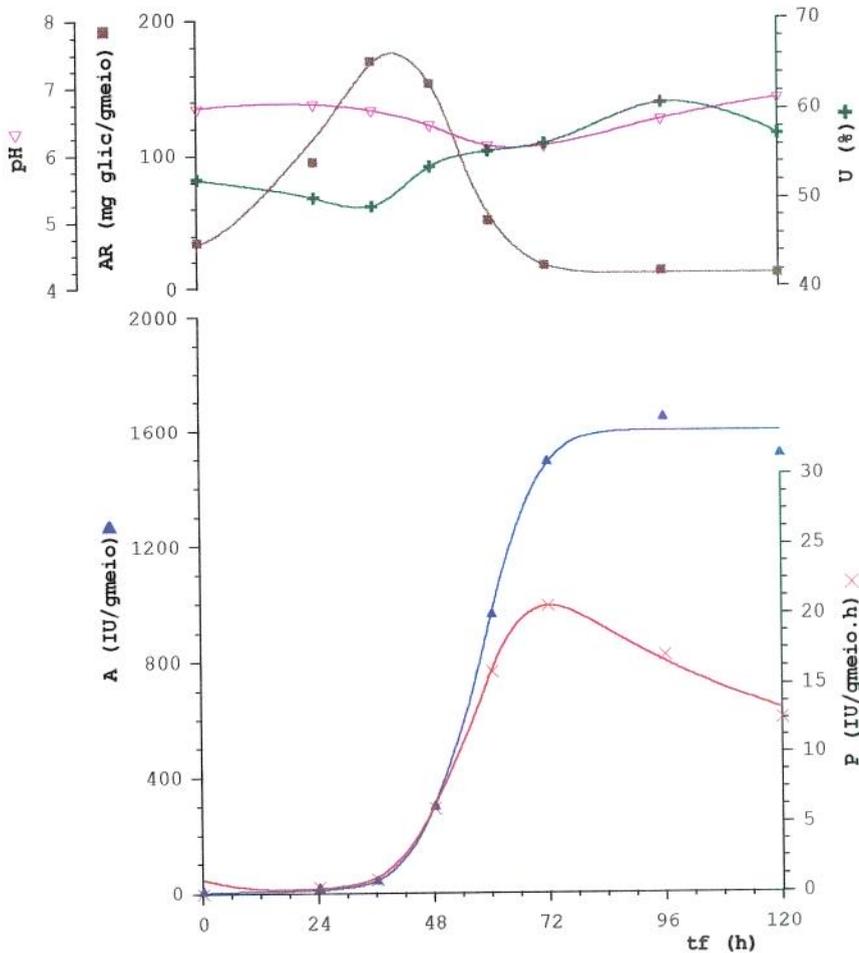


**Figura 4.46.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C29 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=499g/l$

**Tabela 4.45.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C30 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=586g/l$

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	6,3	0,0	52,40	6,71	35
24	16,7	0,4	50,28	6,76	95
36	42,3	1,0	49,28	6,67	170
48	300,7	6,1	53,72	6,45	153
60	965,3	16,0	55,46	6,14	51
72	1492,4	20,6	56,27	6,14	17
96	1647,1	17,2	60,76	6,53	13
120	1516,8	12,6	57,30	6,84	11

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

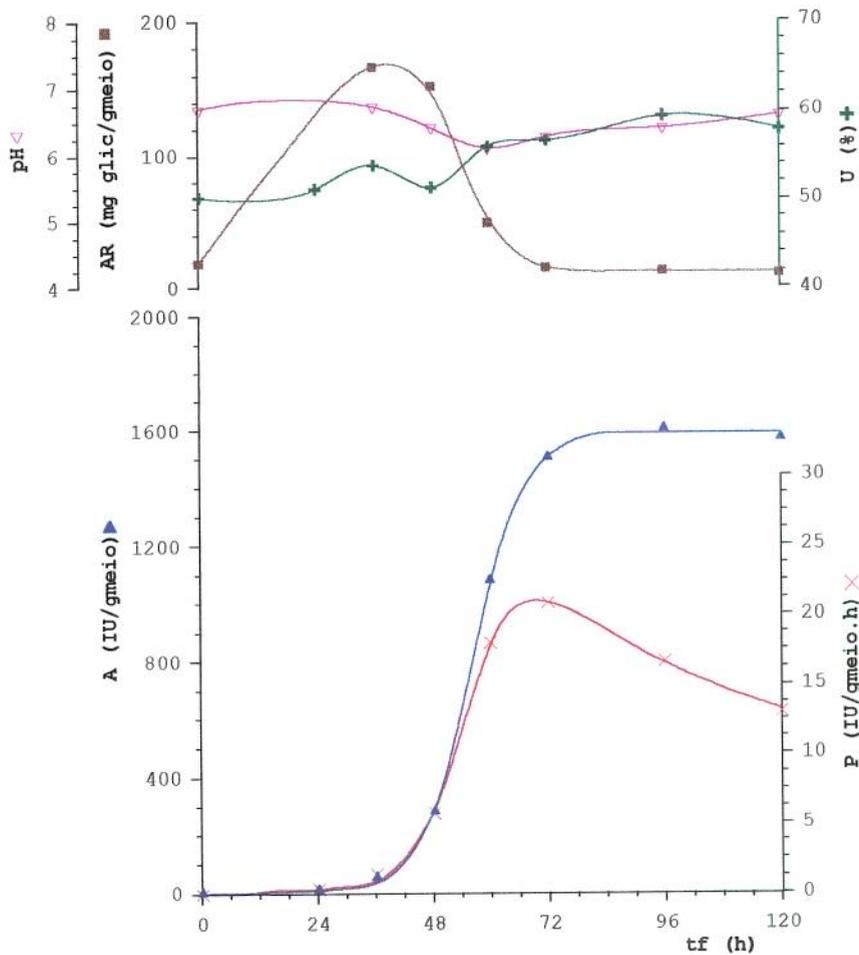


**Figura 4.47.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C30 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=586g/l$

**Tabela 4.46.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C31 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=755g/l$

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	7,0	0,0	50,32	6,71	19
24	15,7	0,4	51,25	-	-
36	58,4	1,4	53,97	6,74	166
48	286,3	5,8	51,40	6,43	152
60	1085,8	18,0	56,07	6,12	49
72	1509,4	20,9	56,76	6,29	15
96	1607,2	16,7	59,45	6,42	13
120	1574,4	13,1	57,97	6,61	11

$t_f$  (h); A (IU/ $g_{farelo}$ ); P (IU/h/ $g_{farelo}$ ); U (%); A.R. (mg $_{glicose}/g_{farelo}$ )

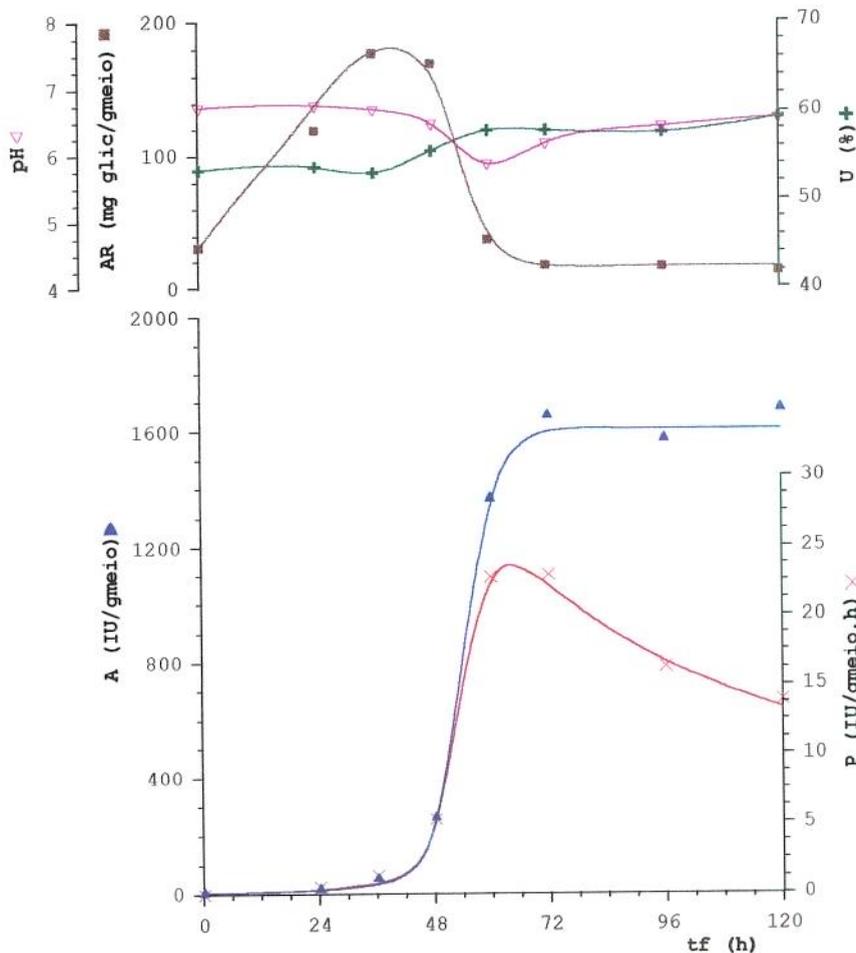


**Figura 4.48.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C31 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=755g/l$

**Tabela 4.47.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C32 ( $VMM=60 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ) -  $d_{\text{ap}}=858\text{g}/\text{l}$

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	5,7	0,0	53,44	6,74	31
24	18,7	0,5	53,78	6,77	119
36	55,6	1,4	53,11	6,71	177
48	263,7	5,4	55,56	6,49	169
60	1370,9	22,8	57,86	5,88	37
72	1657,7	22,9	57,87	6,19	17
96	1575,6	16,4	57,63	6,44	16
120	1678,6	14,0	59,34	6,57	13

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)

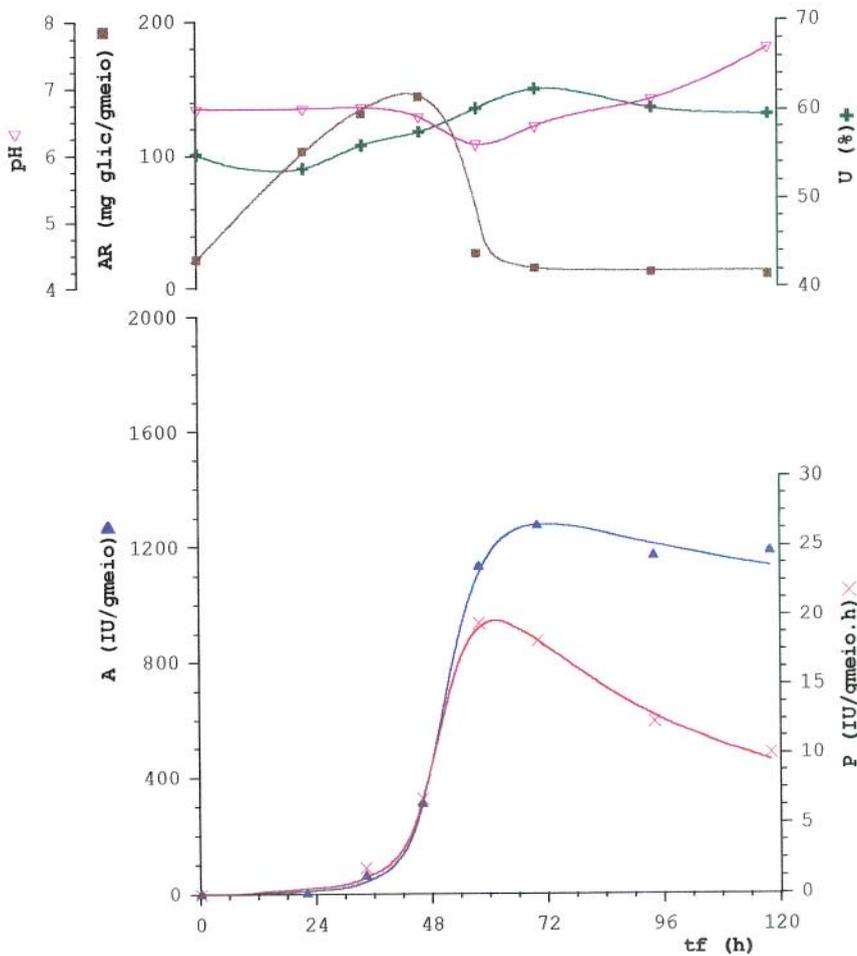


**Figura 4.49.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C32 ( $VMM=60 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ ) -  $d_{\text{ap}}=858\text{g}/\text{l}$

**Tabela 4.48.** Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C33 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=924g/l$

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	0,0	0,0	55,20	6,71	22
22	2,1	0,1	53,59	6,71	103
34	63,1	1,9	56,13	6,72	131
46	310,5	6,8	57,62	6,58	144
58	1133,0	19,5	60,27	6,16	26
70	1274,6	18,2	62,42	6,43	15
94	1170,2	12,4	60,30	6,84	12
118	1186,2	10,1	59,58	7,61	10

$t_f$ (h); A(IU/ $g_{farelo}$ ); P(IU/h/ $g_{farelo}$ ); U(%); A.R. (mg $_{glicose}/g_{farelo}$ )



**Figura 4.50.** Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C33 ( $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/h/g_{meio}$ ) -  $d_{ap}=924g/l$

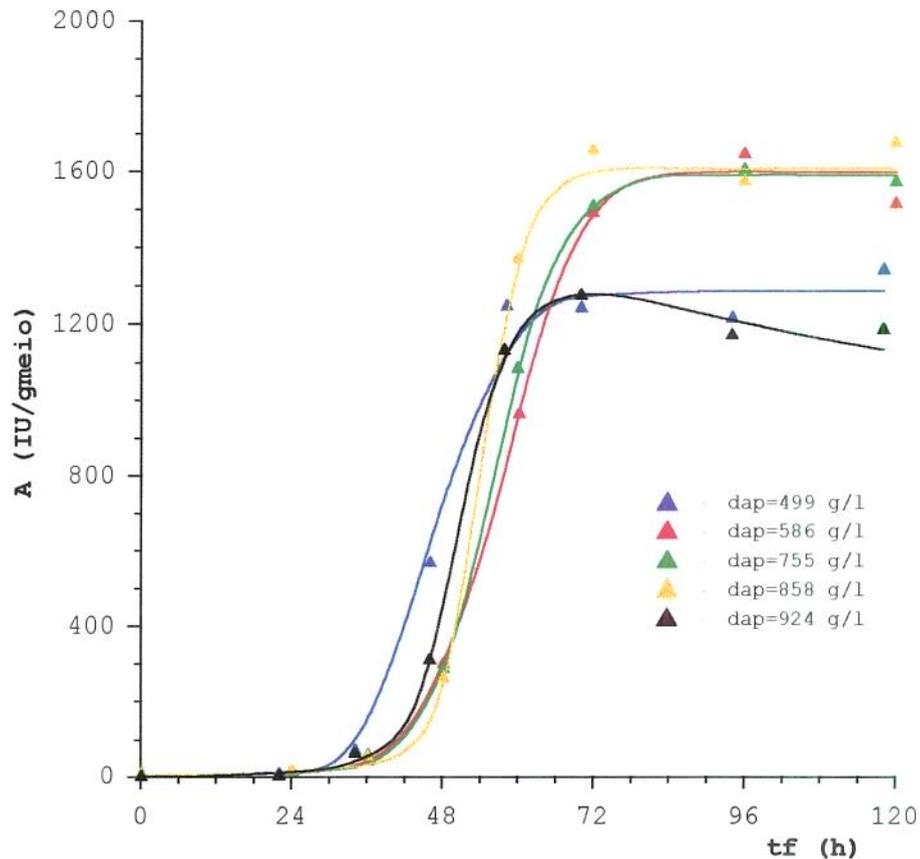
O meio com menor compactação ( $d_{ap}=499$  g/l) foi o que apresentou, no início do processo fermentativo, uma atividade enzimática maior; porém, a partir de 70 horas de fermentação foi alcançado um patamar de cerca de 1250 IU/g<sub>farelo</sub>. Comportamento semelhante foi mostrado pelo ensaio C33 ( $d_{ap}=924$  g/l). O decréscimo no valor da atividade após 70 horas é, provavelmente, devido a uma maior concentração de proteases no meio, consequência da diminuição do oxigênio disponível. Para as demais densidades testadas ( $d_{ap}=586, 755$  e  $858$  g/l), observam-se quase que os mesmos perfis de síntese enzimática, com o máximo da atividade em torno de 1600 IU/g<sub>farelo</sub>. A estes resultados podem ser somados os experimentos C16 e C17, anteriormente apresentados, com densidades aparentes de 617 e 602 g/l e as mesmas condições de aeração, cujos patamares finais também estão ao redor de 1600 IU/g<sub>farelo</sub>. Tais comportamentos podem ser percebidos na Figura 4.51, onde se comparam as curvas de atividade para as diversas densidades aparentes utilizadas.

Segundo GHILDYAL *et alii* (1993) os principais fatores que causam a diminuição da atividade enzimática com o aumento da densidade do meio são a dificuldade de remoção do calor metabólico gerado e a formação de gradientes nas concentrações de oxigênio e de gás carbônico. Para o presente caso, em função das altas compactações usadas, o decréscimo da atividade do meio também pode estar ligado a problemas espaciais de crescimento do fungo.

Resultado qualitativamente semelhante ao presente trabalho foi obtido por PANDEY & RADHAKRISHNAN (1992). Tais autores utilizaram farelo de trigo com densidades variando de 320 a 400 g/l e obtiveram a melhor atividade enzimática para o meio com 350 g/l.

Dois outros artigos levam a resultados opostos. BARRIOS-GONZÁLEZ *et alii* (1993) concluíram que o aumento da compactação do meio aumentou a produção de penicilina por *Penicillium chrysogenum* em meio semi-sólido; porém, as densidades usadas foram baixas e de pequena variação (230, 310 e 350 g/l).

Contrariamente, GUMBIRA-SA'ID *et alii* (1993) verificaram que o aumento da massa inicial de grânulos de sagu no reator acarretava uma diminuição no crescimento do *Rhizopus oligosporus* utilizado na produção de proteína unicelular.



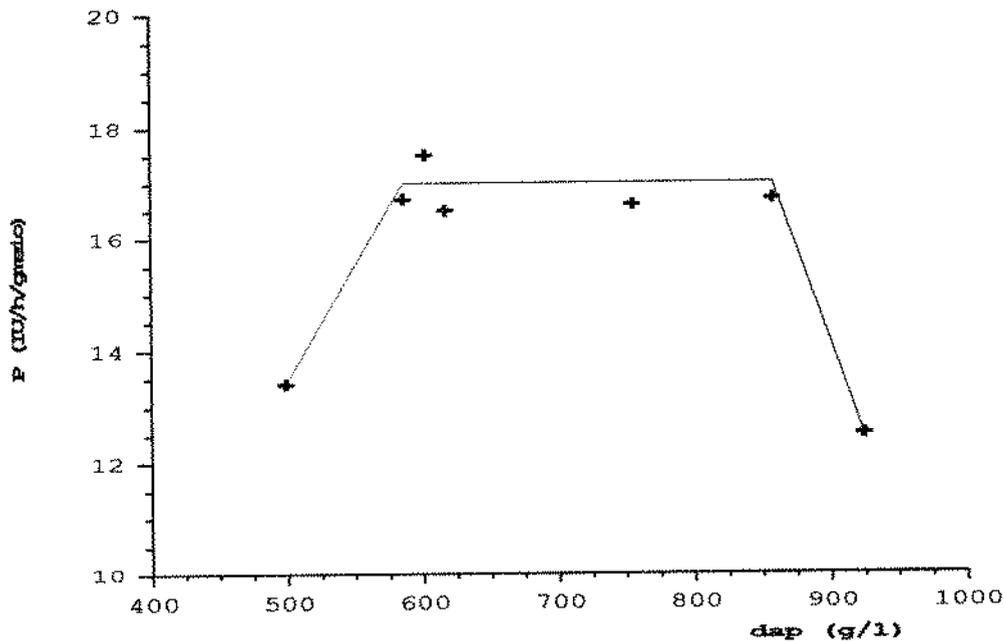
**Figura 4.51.** Efeito da densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ) sobre a atividade enzimática, ao longo do processo fermentativo -  $VMM=60 \text{ ml}_{ar}/\text{h}/\text{g}_{meio}$ .

Detalhe importante de ser observado é que, em função da casca adicionada como inerte, conseguiu-se trabalhar com densidades aparentes bem maiores do que os valores anteriormente citados da literatura.

Com relação à produtividade do processo, percebeu-se igual conduta, com os valores máximos sendo encontrados nos experimentos com densidades variando de 586 a 858 g/l, conforme

pode ser observado na Figura 4.52, onde além destes 5 ensaios também são mostrados os valores das produtividades máximas dos experimentos C16 e C17 ( $d_{ap}=617$  e  $602$  g/l, respectivamente e  $VMM=60$  ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>).

Os resultados obtidos apontam para boas perspectivas com relação ao estudo do uso deste tipo de reator em fermentações semi-sólidas de maior escala, uma vez que a compactação máxima dificilmente é obtida de forma espontânea.



**Figura 4.52.** Variação da produtividade máxima em função da densidade aparente do meio ( $d_{ap}$ ) -  $VMM=60$  ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>.

#### 4.2.3. Variações na temperatura do leito semi-sólido

A liberação de grandes quantidades de calor devida à atividade metabólica é uma característica marcante das fermentações semi-sólidas (GHILDYAL et alii, 1994). Vários autores (MODAK & RAJAGOPALAN, 1994; CASTAÑEDA et alii, 1992b; LONSANE et alii, 1985) citam a necessidade da rápida remoção deste calor, evitando possíveis efeitos deletérios sobre o processo.

Para entender o fenômeno de transferência de calor envolvido nos reatores de coluna utilizados, optou-se por levantar o comportamento da temperatura do meio, ao longo da fermentação, em diferentes posições do leito. Assim, três ensaios (C34, C35 e C36) foram instrumentados de acordo com o estabelecido em 3.16. A aeração usada nestes ensaios foi mantida fixa em  $60 \text{ ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ , escolhida conforme o discutido no item 4.2.1.

O experimento C34 operou com as condições padrões de controle de temperatura descritas em 3.4.2, enquanto que para C36 o sistema de aquecimento/resfriamento foi desconectado, tentando-se assim diminuir a remoção de calor por condução. No ensaio C35, estudou-se o efeito do resfriamento evaporativo. Para isto, adotou-se um procedimento semelhante ao de C36, e o sistema de saturação do ar foi colocado no banho termostaticado, fazendo com que a temperatura de entrada do ar no reator fosse de  $30^{\circ}\text{C}$ .

As Tabelas 4.49 a 4.51 apresentam os valores medidos para as temperaturas dos pontos medidos nos três experimentos, enquanto que nas Figuras 4.53 a 4.55 são mostrados os perfis obtidos para as diferentes alturas do leito.

A simples comparação destas figuras (construídas no mesmo tamanho e escala) mostra a importância do sistema de controle de temperatura. A maior temperatura alcançada no meio C34 foi de  $33,3^{\circ}\text{C}$ , ao passo que para C35 e C36 este valor foi de  $43,9$  e  $51,0^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

Para o experimento C34, representado pela Figura 4.53, as temperaturas máximas foram alcançadas entre 38 e 74 horas de fermentação, período que coincide com a faixa de maior aumento da atividade enzimática obtida para os ensaios C16 e C17 (Figuras 4.28 e 4.29), desenvolvidos nas mesmas condições de fermentação. O ponto máximo atingido pela temperatura ( $33,3^{\circ}\text{C}$ ) representa um acréscimo de somente 10% no valor de  $30^{\circ}\text{C}$

**TABELA 4.49.** Valores da temperatura para as diversas alturas (h) do leito semi-sólido, do banho termostaticado e do ambiente, medidos durante o ensaio C34.

$t_f$ (h)	Temperatura (°C)							banho	ambiente
	h=0	h=70	h=140 (centro)	h=140 (parede)	h=210	h=280			
0	30,4	29,5	29,5	28,7	29,0	29,2	28,2	29,2	
22	31,3	29,9	29,7	29,6	29,6	30,3	29,5	29,9	
38	32,4	30,9	30,7	29,9	30,4	30,6	29,3	30,5	
50	33,3	32,2	32,2	30,0	31,6	31,3	27,8	30,2	
61	32,8	32,4	32,2	30,1	31,1	30,9	29,0	28,4	
74	32,1	30,8	30,8	29,2	30,0	30,5	28,2	31,2	
83	31,5	30,4	30,3	28,9	29,6	30,1	27,9	30,3	
91	31,4	30,1	30,1	29,0	29,5	30,2	28,7	29,4	
107	30,0	29,5	29,5	28,4	28,9	29,0	26,9	29,3	
117	30,7	29,8	29,7	28,9	29,2	29,2	27,5	29,9	
132	29,5	29,7	29,6	29,4	29,1	28,8	27,9	29,1	
139	30,3	29,7	29,6	29,0	29,2	29,4	29,0	31,2	

**TABELA 4.50.** Valores da temperatura para as diversas alturas (h) do leito semi-sólido, do banho termostaticado e do ambiente, medidos durante o ensaio C35.

$t_f$ (h)	Temperatura (°C)							banho	ambiente
	h=0	h=70	h=140 (centro)	h=140 (parede)	h=210	h=280			
0	32,8	30,2	28,9	30,1	28,6	29,3	30,4	25,0	
9	31,6	32,0	31,0	31,1	30,3	29,9	28,1	25,0	
24	32,3	33,8	33,3	33,8	32,4	31,3	27,3	25,6	
28	32,9	35,3	34,9	35,1	33,8	32,1	27,9	25,8	
36	34,2	41,0	42,1	40,9	41,2	36,7	27,5	24,5	
43	35,2	43,6	43,9	42,6	43,4	39,1	28,2	24,8	
48	35,1	42,7	43,2	42,1	42,8	39,0	27,1	25,0	
59	35,0	40,2	41,2	40,3	40,6	36,7	27,4	25,5	
66	33,8	38,2	39,1	38,2	38,3	34,7	28,5	24,2	
69	33,1	37,4	38,3	37,2	37,4	33,7	33,2	24,5	
72	34,8	38,7	39,3	38,6	38,4	35,3	28,5	25,1	
77	35,7	39,6	40,2	40,1	39,3	36,0	28,6	26,6	
80	35,7	39,8	40,6	40,1	39,7	36,0	28,5	25,8	
96	32,0	35,4	36,1	35,5	34,8	31,4	25,0	22,6	
120	31,1	33,2	34,2	34,8	33,2	30,6	25,9	23,5	

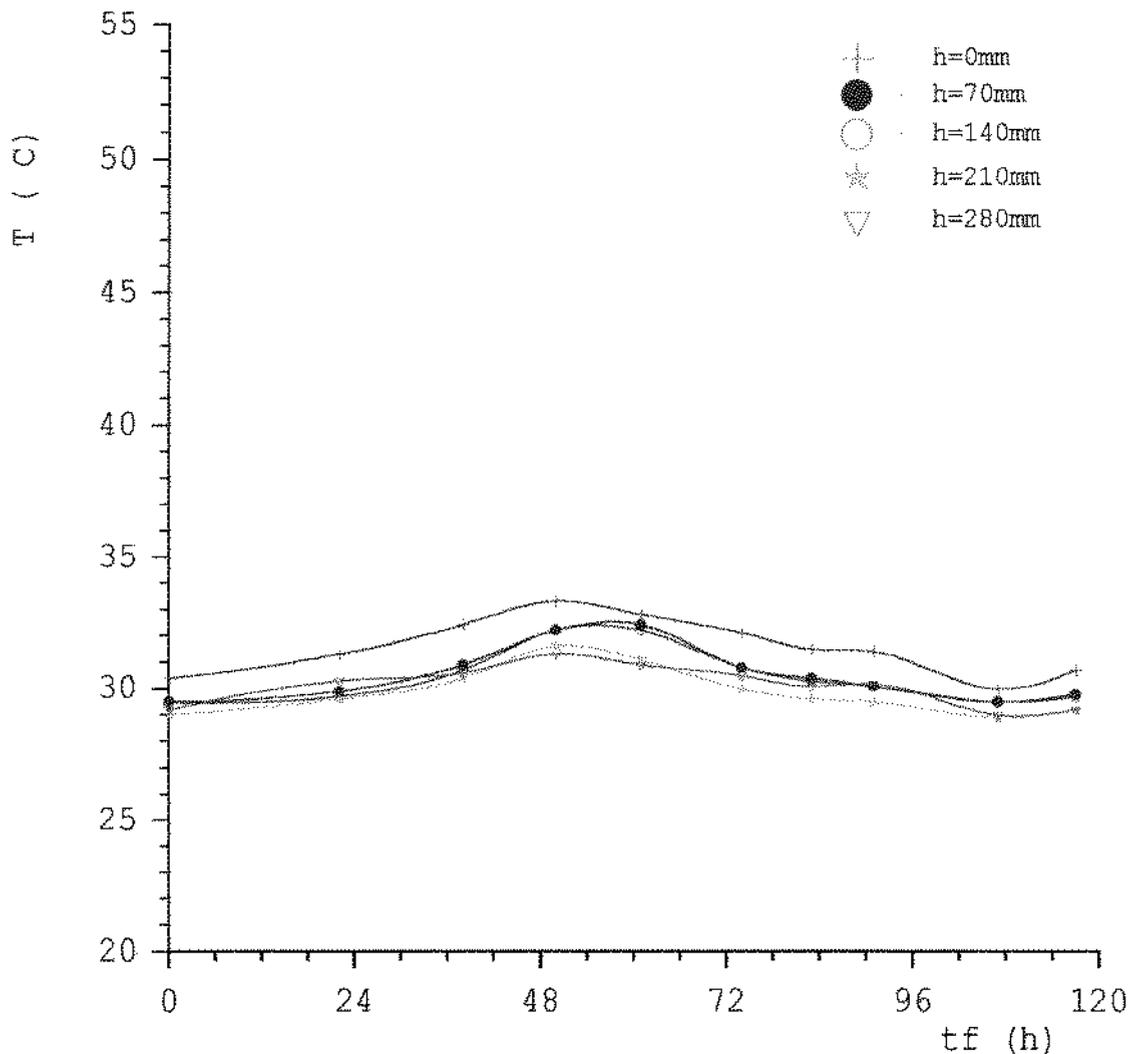
**TABELA 4.51.** Valores da temperatura para as diversas alturas (h) do leito semi-sólido, do banho termostatzado e do ambiente, medidos durante o ensaio C36.

$t_z$ (h)	Temperatura (°C)						
	h=0	h=70	h=140 (centro)	h=140 (parede)	h=210	h=280	ambiente
0	27,0	28,6	28,6	28,2	28,5	28,1	26,5
10	27,2	27,5	27,4	28,1	27,3	27,5	27,0
21	26,6	27,2	27,3	28,0	27,3	27,3	26,6
24	27,2	27,5	27,6	28,0	27,6	27,6	27,6
36	27,7	29,1	29,6	29,8	29,6	28,9	26,9
48	29,6	35,2	40,1	37,9	41,7	37,6	27,3
50	31,1	38,1	43,8	41,4	45,7	41,2	28,0
54	32,8	42,4	48,7	46,0	51,0	46,1	28,5
60	33,5	43,6	48,2	45,9	49,2	44,4	28,6
69	31,7	38,3	40,1	39,6	38,7	35,6	27,6
72	30,9	36,9	38,2	38,2	36,5	33,9	27,4
80	30,1	34,7	35,0	35,2	33,0	31,4	26,2
96	28,5	31,8	31,7	32,2	30,4	29,3	25,4
120	28,7	31,4	30,8	31,4	30,1	29,3	26,5

estabelecido inicialmente para o processo. A quase sobreposição dos pontos axiais, indicando uma rápida dissipação do calor, mostra a importância do mecanismo de condução para a transferência de calor ao longo do reator estudado, que pode ser melhor observado pela comparação com C36, em que a condução foi forçadamente reduzida.

Os perfis apresentados na Figura 4.54 mostram a importância da convecção, além de demonstrar que, para as condições estabelecidas durante os ensaios, o resfriamento evaporativo não foi suficiente para evitar que a temperatura do meio C35 alcançasse, com 43 horas de fermentação, 43,9°C. Tal valor é cerca de 50% superior ao inicialmente fixado. Como a maior parte do calor gerado deveria ser removida na forma de calor latente de evaporação (SATO et alii, 1982), para o resfriamento evaporativo ter um efeito mais pronunciado, seria necessário eliminar a saturação do ar de entrada no reator. Optou-se por

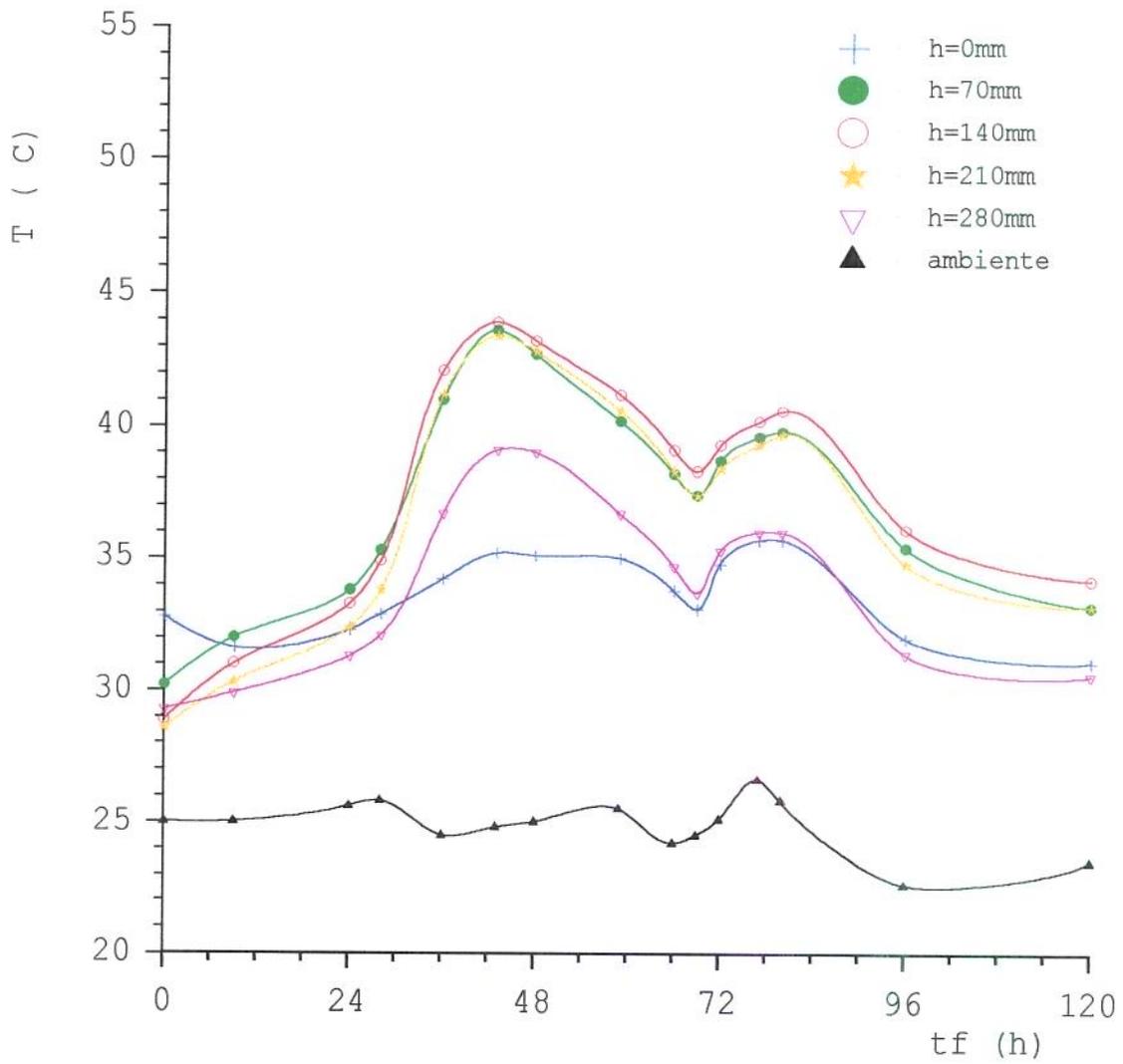
não utilizar tal condição, pois o resultado de tal procedimento seria a redução tanto da umidade quanto da atividade do meio, conforme anteriormente discutido no item 4.2.1. As maiores temperaturas do meio foram registradas no período compreendido entre 36 e 80 horas de fermentação. A altura do leito que apresentou maiores valores para a temperatura foi de 140mm, sendo estes valores muito próximos dos obtidos para as alturas de 70 e 210mm, o que parece mostrar a existência de



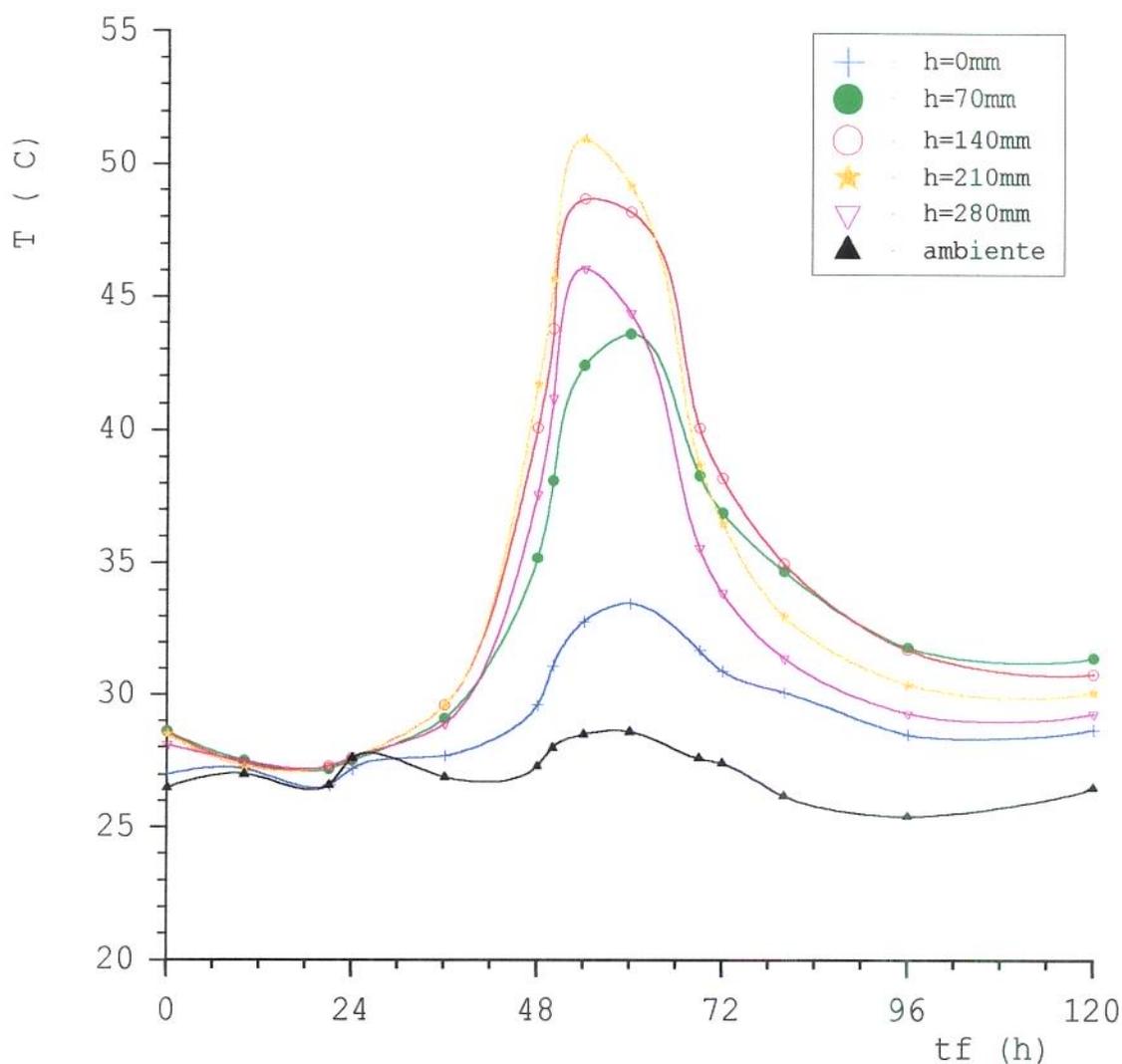
**Figura 4.53.** Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido, em função do tempo de fermentação, para o ensaio C34.

contribuições semelhantes, tanto da condução como da convecção, para a transferência de calor do meio. A elevação da temperatura do meio de 77 a 80 horas é, provavelmente, a aumentada de 25,8 para 33,2°C (Tabela 4.50).

A Figura 4.55 mostra que a não remoção (ou remoção ineficiente) do calor liberado pelas reações metabólicas pode fazer com que a temperatura do meio alcance níveis considerados impróprios para o crescimento do fungo estudado. Somente a aeração, diferente do proposto por GHILDYAL *et alii* (1994), não foi suficiente para resfriar o meio e manter a temperatura em níveis considerados aceitáveis. A temperatura do meio que inicia, em todos os pontos amostrados, próxima da ambiente (26,5-27,0°C), após 24 horas de fermentação, sofre um grande acréscimo. Entre 54 e 60 horas de fermentação, a temperatura do leite, na altura de 210mm, elevou-se até 51°C, distanciando-se muito do valor de 30°C, estabelecido como ótimo. Como consequência deste afastamento da idealidade, o metabolismo do microrganismo é prejudicado, e rapidamente a temperatura decresce para níveis em torno de 30,0-35,0°C. Nota-se, pela mesma figura, que a temperatura do meio cresce, axialmente, até a altura de 210mm, devido à transferência convectiva do calor da parte inferior da coluna pelo ar ascendente (GOWTHAMAN *et alii*, 1993). A queda da temperatura no topo da coluna (h=280mm) deve-se ao fato de que, neste ponto, o meio troca calor tanto com a corrente de ar quanto com o ambiente.



**Figura 4.54.** Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido e do ambiente, em função do tempo de fermentação, para o ensaio C35.



**Figura 4.55.** Perfis de temperatura das diversas alturas ( $h$ ) do leito semi-sólido e do ambiente, em função do tempo de fermentação, para o ensaio C36.

Com o uso dos gradientes axial e radial de temperatura é possível estipular, com maior confiança, a contribuição de cada mecanismo de troca térmica. Um equilíbrio entre condução e convecção tem como consequência a igualdade entre os valores dos gradientes, enquanto que um maior valor do gradiente radial indica uma contribuição mais elevada do mecanismo de condução.

A Tabela 4.52 apresenta os valores para os gradientes axial ( $G_{ax}$ ) e radial ( $G_{rd}$ ) médios de temperatura de C34, C35 e C36, definidos como:

$$G_{ax} = \frac{T_{210} - T_0}{h} \quad e \quad G_{rd} = \frac{T_p - T_c}{R}$$

onde:

$T_{210}$  = temperatura do meio para a altura de 210mm (°C);

$T_0$  = temperatura na base do leito (°C);

$h$  = altura do leito = 210 mm;

$T_p$  = temperatura do meio para a altura de 140mm e posição radial R (°C);

$T_c$  = temperatura do meio para a altura de 140mm e posição radial zero (°C);

$R$  = raio do reator = 46mm.

**Tabela 4.52.** Valores para os gradientes axial ( $G_{ax}$ ) e radial ( $G_{rd}$ ) médios de temperatura dos experimentos C34, C35 e C36

Experimento	$G_{ax}$ (°C/mm)	$G_{rd}$ (°C/mm)
C34	0,0073	0,0464
C35	0,0190	0,0319
C36	0,0286	0,0429

O fato do gradiente radial para C34 ser 6 vezes maior que o axial mostra que o sistema de controle de temperatura usado propiciou uma grande influência do mecanismo de condução. Para C35 e C36, observam-se a diminuição da contribuição da condução e o aumento da convecção no processo de transferência de calor. Para estes experimentos, os valores de  $G_{rd}$  são menos que o dobro de  $G_{ax}$ . Esta influência que passou a ter a convecção também pode ser notada pelo crescimento dos gradientes axiais destes dois experimentos comparativamente com o de C34.

Os gradientes axiais apresentados na Tabela 4.52 são da mesma ordem de grandeza do valor de 0,017°C/mm encontrado por SAUCEDO-CASTAÑEDA *et alii* (1990); porém, o gradiente radial medido por estes foi 0,5°C/mm, ou seja, superiores aos obtidos

no presente trabalho. Tais valores mostram uma forte influência da condução radial no trabalho dos pesquisadores citados e um equilíbrio nos mecanismos de condução e convecção dos reatores usados nesta tese. Ainda assim, para os experimentos desenvolvidos, talvez em função do pequeno diâmetro do reator, a remoção radial de calor por condução se mostrou importante. A quebra de tal "equilíbrio" citado, dando maior ênfase à convecção, seria alcançada com o aumento da aeração (VMM); porém outras consequências, discutidas nos itens anteriores, poderiam advir com esta mudança.

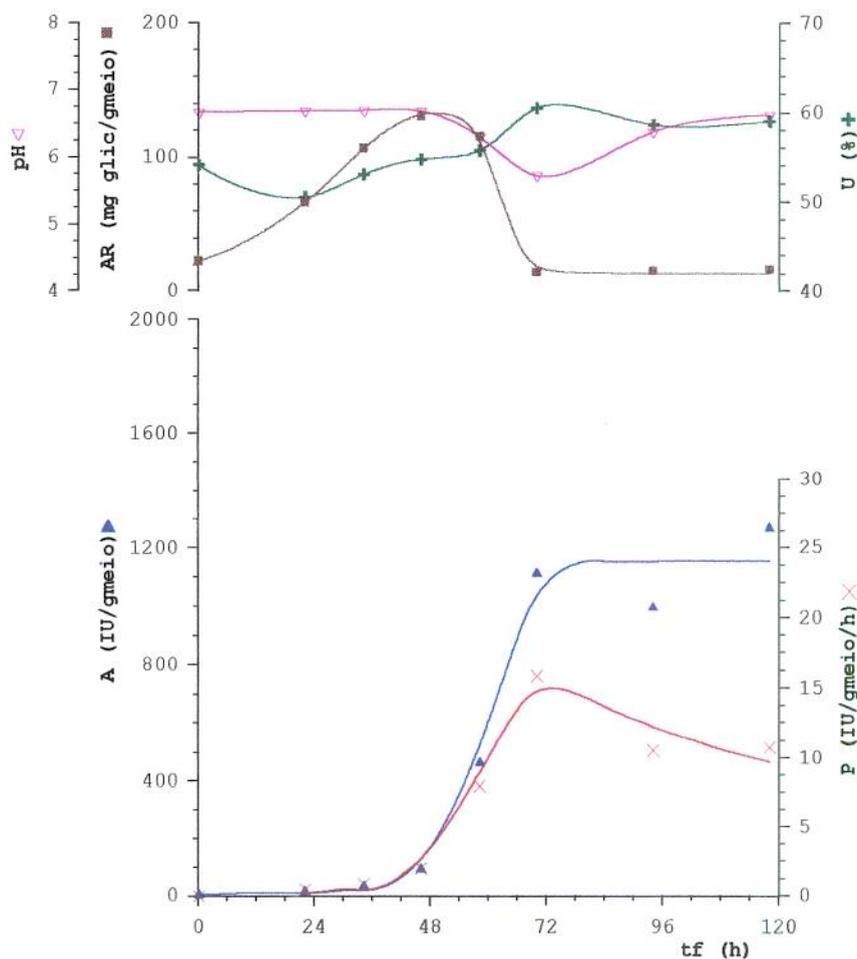
A consequência direta do problema resultante da não remoção eficiente do calor gerado, pode ser notada pelos resultados obtidos com o experimento C37. As condições para tal ensaio foram idênticas àsquelas de C36, ou seja, nenhum controle de temperatura foi utilizado. A Tabela 4.53 apresenta os valores para a atividade enzimática, a produtividade, a umidade, o pH e os açúcares redutores medidos durante esta fermentação. O comportamento gráfico de tais variáveis é mostrado na Figura 4.56. A atividade enzimática máxima alcançada neste ensaio se aproxima de 1200 IU/g<sub>farelo</sub>. Os experimentos C16 e C17 (Figuras 4.28 e 4.29), conduzidos com a mesma aeração (60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>) e controle da temperatura, apresentaram as maiores atividades como sendo de 1600 e 1700 IU/g<sub>farelo</sub>, respectivamente, que correspondem a um aumento na faixa de 30 a 40%, relativamente a C37.

O maior valor obtido para a produtividade de C37 foi no tempo de 70 horas de fermentação, com cerca de 15 IU/g<sub>farelo</sub>/h. C16 e C17, por outro lado, apresentaram produtividades máximas de 24 e 23 IU/g<sub>farelo</sub>/h, para os tempos de 54 e 66 horas, respectivamente. Esta elevação de 60% é consequência da redução do tempo de síntese da enzima e da maior atividade enzimática do meio, uma vez que melhores condições de temperatura foram fornecidas aos processos metabólicos do fungo.

**Tabela 4.53.**Valores para a atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores medidos durante o experimento C37 (VMM=60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>) - sem controle de temperatura

$t_f$	A	P	U	pH	A.R.
0	4,0	0,0	54,22	6,68	23
22	15,2	0,5	50,60	6,70	67
34	35,8	0,9	53,15	6,71	107
46	93,7	2,0	54,84	6,70	131
58	465,7	8,0	55,85	6,31	116
70	1116,5	15,9	60,57	5,74	15
94	998,7	10,6	58,72	6,39	16
118	1272,5	10,8	59,10	6,64	17

$t_f$  (h); A (IU/g<sub>farelo</sub>); P (IU/h/g<sub>farelo</sub>); U (%); A.R. (mg<sub>glicose</sub>/g<sub>farelo</sub>)



**Figura 4.56.**Atividade enzimática, produtividade, umidade, pH e açúcares redutores, em função do tempo de fermentação, para o experimento C37 (VMM=60 ml<sub>ar</sub>/h/g<sub>meio</sub>) - sem controle de temperatura

### 4.3.Caracterização cinética da amiloglicosidase (farelo fermentado)

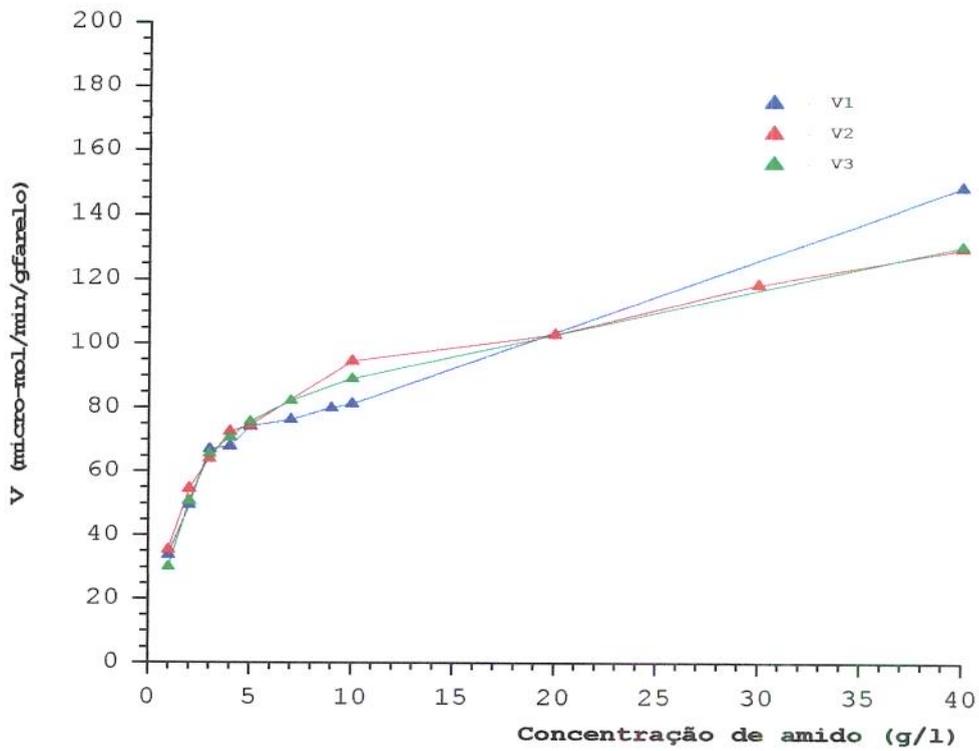
A caracterização cinética da amiloglicosidase bruta extraída do farelo fermentado foi efetuada conforme o descrito em 3.18. Foram conduzidos 22 ensaios, com análises em duplicata, cujos resultados são apresentados e comentados a seguir.

#### 4.3.1.Influência da concentração de substrato na atividade enzimática do farelo fermentado

A determinação da influência da concentração de substrato sobre a atividade enzimática (no caso, velocidade inicial) do farelo fermentado foi realizada com extratos enzimáticos diluídos de maneira que sua atividade, nas condições padrões descritas em 3.7, estivesse próxima de 150 IU/g<sub>farelo</sub>. Foram efetuados 3 ensaios, sendo que a Tabela 4.54 e Figura 4.57 apresentam as velocidades iniciais medidas nestes experimentos como função da concentração inicial de amido.

**Tabela 4.54.**Valores para a velocidade inicial (V) da reação enzimática em função da concentração de substrato para os três ensaios realizados.

amido (g/l)	V <sub>1</sub> ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )	V <sub>2</sub> ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )	V <sub>3</sub> ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )
1	34,07	35,63	30,29
2	49,66	54,78	51,00
3	67,25	64,36	65,92
4	68,14	72,82	71,04
5	74,38	74,82	75,94
7	76,61	-	82,40
9	80,17	-	-
10	81,51	94,87	89,30
20	-	103,33	-
30	-	118,92	-
40	149,00	-	130,94



**Figura 4.57.** Velocidade inicial da reação enzimática (V) em função da concentração de substrato para os três ensaios realizados

O tratamento destes dados experimentais de acordo com o método de Lineweaver-Burk ( $V^{-1} \times S^{-1}$ ), com a regressão feita por mínimos quadrados, forneceu as seguintes equações:

$$\text{Ensaio 1: } \frac{1}{V} = 0,01917 \frac{1}{S} + 0,00997; \quad r=0,9935 \quad (4.32)$$

$$\text{Ensaio 2: } \frac{1}{V} = 0,01968 \frac{1}{S} + 0,00857; \quad r=0,9982 \quad (4.33)$$

$$\text{Ensaio 3: } \frac{1}{V} = 0,02248 \frac{1}{S} + 0,00835; \quad r=0,9859 \quad (4.34)$$

A substituição destas equações na originária do método,  $\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$ , fornece os valores para  $K_M$  e  $V_{max}$  listados na

Tabela 4.55, onde:

- $V$  = Velocidade da reação enzimática;  
 $S$  = Concentração de substrato;  
 $K_M$  = Constante de Michaelis-Menten;  
 $V_{max}$  = Velocidade máxima da reação enzimática.

**Tabela 4.55.** Valores para a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) obtidos em cada ensaio

Ensaio	$K_M$ (g/l)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{farelo}}$ )
1	1,92	100,30
2	2,30	116,70
3	2,69	119,76

A comparação destes valores cinéticos com os encontrados na bibliografia é de difícil prática, uma vez que não existe uma uniformidade das condições de análise. As enzimas são diferentes quanto a sua origem, grau de pureza e concentrações usadas. Os substratos são os mais variados possíveis (amidos de diversas origens, amido solúvel, amilose, amilopectina, maltodextrinas, maltose,...), bem como suas concentrações e tampões utilizados. As condições de tempo, temperatura e determinação analítica do produto formado variam tanto quanto as unidades enzimáticas empregadas para expressar os resultados.

Os resultados de  $K_M$  apresentados na Tabela 4.55, com valor médio de  $2,30 \pm 0,39$  g/l, encontram-se próximos dos valores de 1,67 g/l (enzima livre) e 2,85 g/l (enzima imobilizada) determinados por NEHETE et alii (1987) para a glicoamilase de

*Aspergillus awamori* NRRL 3112, cujos ensaios analíticos foram conduzidos à temperatura de 50°C e 30 minutos de incubação. Valor semelhante ( $K_M=3,125$  g/l) também foi encontrado por SUKARA & DOELLE (1989) para a amiloglicosidase obtida de *Rhizopus* sp. PRZYBYT & SUGIER (1988), trabalhando com amiloglicosidase comercial de *Aspergillus niger* e hidrólise de 15 minutos a 55°C encontraram valores para  $K_M$  de 13,3 g/l quando a enzima se encontrava livre e 30,5 g/l quando imobilizada em DEAE-celulose. Também trabalhando com amiloglicosidase comercial de *Aspergillus niger*, JACH & SUGIER (1983) obtiveram  $K_M = 0,0406$  g/l. Na mesma linha de glicoamilase de *Aspergillus niger*, SZAJÁNI *et alii* (1985) encontraram os valores de 7,0 e 14,0 g/l para a constante de Michaelis-Menten usando a enzima livre e imobilizada, respectivamente. FAGERSTRÖM & KALKKINEN (1995) produziram glicoamilase de *Trichoderma reesei* recombinante e o valor estimado de  $K_M$  para a enzima purificada foi de 0,11 g/l, sendo que, por comparação de seqüências de aminoácidos, a enzima produzida mostrou somente 60% de identidade com a glicoamilase de *Aspergillus*.

#### 4.3.2. Influência do pH na atividade enzimática

A determinação da influência do pH sobre a atividade enzimática do farelo fermentado foi efetuada através de 5 ensaios com extratos enzimáticos obtidos a partir de amostras de diferentes fermentações. A Tabela 4.56 e a Figura 4.58 mostram as atividades medidas nestes experimentos como função do pH do substrato. Os resultados estão expressos como atividade relativa ( $A_r$ ), definida como:

$$A_r (\%) = \frac{A}{A_{\max}} \times 100 \quad (4.35)$$

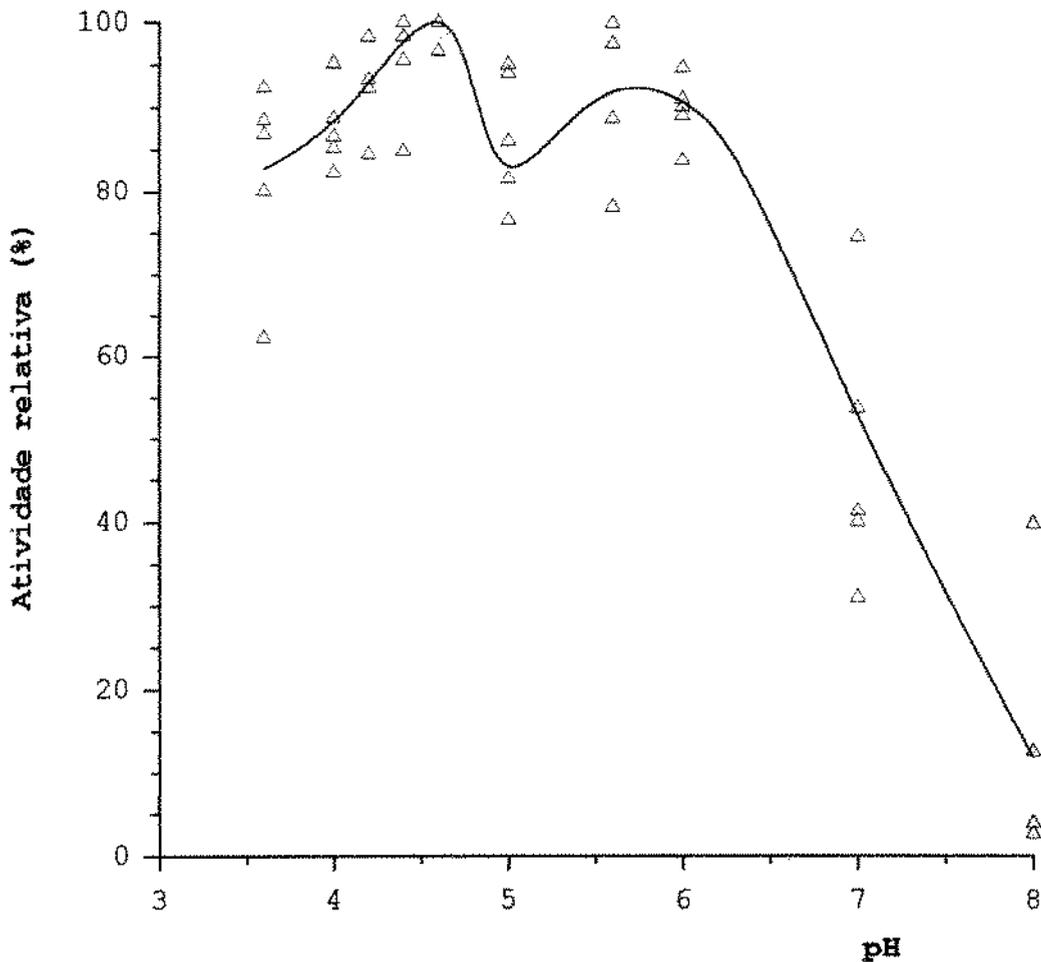
onde:

$A$  = Atividade da amostra (IU/g<sub>farelo</sub>);

$A_{\max}$  = Atividade máxima do ensaio (IU/g<sub>farelo</sub>).

**Tabela 4.56.** Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do pH para os cinco ensaios realizados

pH	$A_{r-1}$ (%)	$A_{r-2}$ (%)	$A_{r-3}$ (%)	$A_{r-4}$ (%)	$A_{r-5}$ (%)	$A_{r-média}$ (%)
3,6	62,2	80,1	88,5	92,3	86,8	82,7
4,0	95,2	82,3	88,7	86,6	85,3	88,4
4,2	98,3	84,4	93,3	-	92,3	92,9
4,4	100,0	84,8	95,6	100,0	98,3	96,6
4,6	96,6	100,0	100,0	-	100,0	100,0
5,0	94,9	95,0	86,1	76,6	81,6	87,6
5,6	97,4	88,6	99,8	-	78,1	91,8
6,0	91,0	89,4	90,5	94,6	83,7	90,6
7,0	53,7	40,1	41,3	74,6	31,0	48,6
8,0	-	12,7	2,6	39,9	3,9	14,9

**Figura 4.58.** Atividade enzimática relativa em função do pH para os cinco ensaios realizados

Como pode ser observado na Figura 4.58, o pH ótimo de atuação da enzima foi 4,6. A redução do pH para 3,6 ou aumento para 5,0 ainda manteve ativa cerca de 85% da atividade; porém, percebeu-se em todas as determinações um crescimento da atividade para aproximadamente 92% (média) quando o pH foi elevado para 5,6, mostrando um segundo pico de atividade que decresce acentuadamente com o aumento do pH.

O surgimento destes dois picos pode ser explicado pela existência de, pelo menos, duas iso-enzimas de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*, conforme mencionado por KILIKIAN (1989), RAMASESH *et alii* (1982), FOGARTY & BENSON (1983). FUTATSUGI *et alii* (1993) purificaram duas formas de glicoamilase de *Saccharomycopsis fibuligera* com pesos moleculares de 55.000 e 57.000 Da, ao que corresponderam valores de pH ótimos de 4,5 e 5, respectivamente. RAMASESH *et alii* (1982) isolaram 2 iso-enzimas de amiloglicosidase de *Aspergillus niger* e determinaram como pH ótimos 3,5 e 4,7; porém, tais valores estão, provavelmente, relacionados aos pesos moleculares destas frações que, segundo KILIKIAN (1989), podem variar de 60.000 até 290.000 Da. JACH & SUGIER (1983) encontraram máximos de atividade para os pH 3,5 e 4,5.

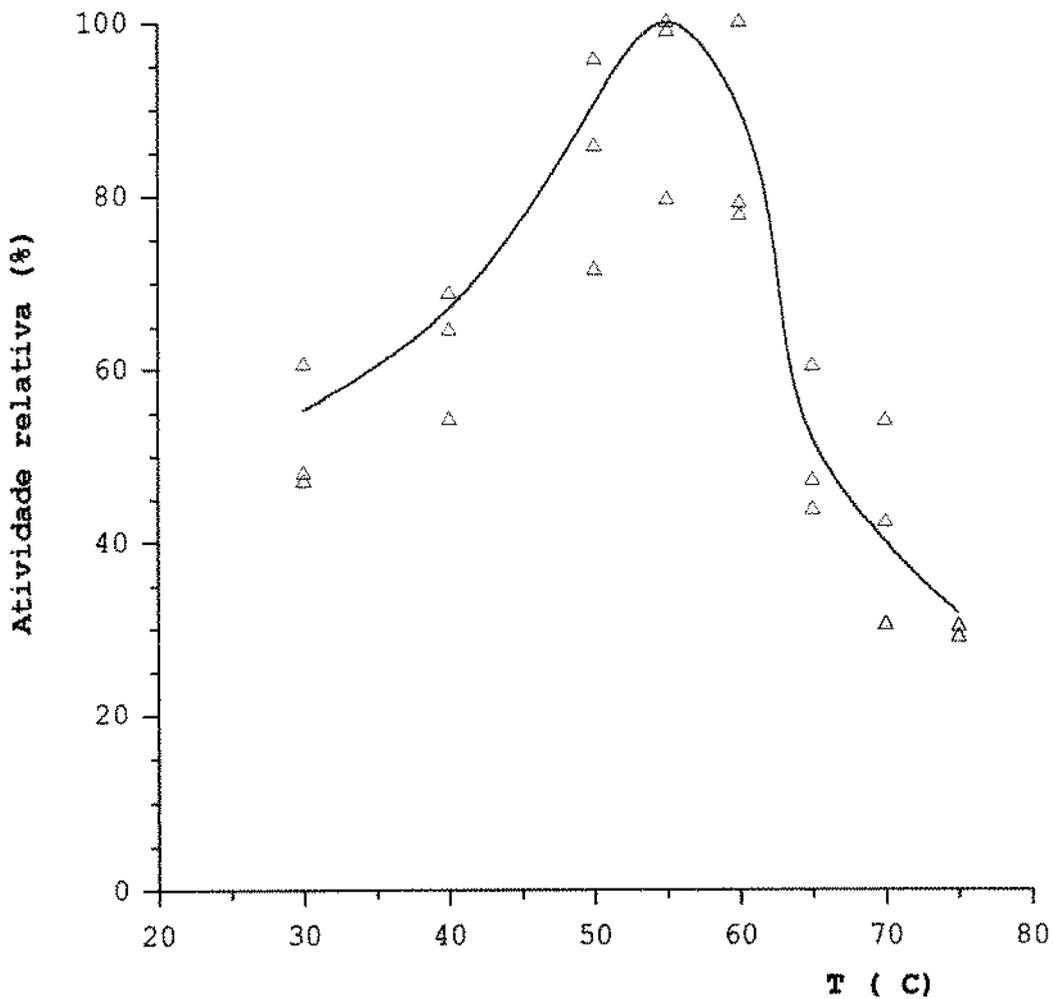
Por outro lado, diversos artigos (FAGERSTRÖN & KALKKINEN, 1995; SCHAFFHAUSER & STORY, 1993; YAJIMA *et alii*, 1989; SZÁJANI *et alii*, 1985) apresentam um único valor para o pH ótimo da amiloglicosidase, variando de 4,0 a 5,6.

#### 4.3.3. Influência da temperatura na atividade enzimática

Para determinar a influência da temperatura sobre a atividade enzimática do farelo fermentado foram realizados 3 ensaios com extratos enzimáticos obtidos a partir de amostras de diferentes fermentações. A Tabela 4.57 e a Figura 4.59 mostram as atividades medidas nestes experimentos como função da temperatura de incubação da mistura amido/extrato enzimático. Os resultados estão expressos como atividade relativa (%).

**Tabela 4.57.** Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função da temperatura para os três ensaios realizados

T (°C)	$A_{r-1}$ (%)	$A_{r-2}$ (%)	$A_{r-3}$ (%)	$A_{r-média}$ (%)
30	47,3	47,0	60,5	55,4
40	64,6	68,8	54,2	67,1
50	71,5	85,7	95,7	90,5
55	100,0	100,0	79,6	100,0
60	77,7	79,2	100,0	91,8
65	43,8	60,3	47,1	54,1
70	30,4	54,0	42,2	45,3
75	-	29,0	30,2	31,8



**Figura 4.59.** Atividade enzimática relativa em função da temperatura para os três ensaios realizados

De acordo com o apresentado na Figura 4.59, a temperatura ótima para a atividade enzimática do farelo fermentado foi 55°C. Tal valor se mostra próximo dos encontrados por diversos autores. SCHAFHAUSER & STORY (1993) determinaram o valor para a temperatura ótima como estando entre 55 e 70°C, enquanto que SUKARA & DOELLE (1989) encontraram a faixa ideal de 55 a 60°C. YAJIMA *et alii* (1989) e SZAJANI *et alii* (1985) obtiveram atividade máxima a 60°C. Como mostrado na Tabela 4.57, as temperaturas de 50 e 60°C também apresentaram valores elevados na atividade (91% relativamente à temperatura de 55°C), que diminuiu de forma marcante quando se trabalhou em outras temperaturas. A 70°C, a atividade corresponde a 45,3% do valor máximo, o que difere do registrado por HAASUM *et alii* (1991), FAGERSTRÖM & KALKKINEN (1995) e JACH & SUGIER (1983) que determinaram esta temperatura como a de atividade máxima.

#### 4.3.4. Estabilidade térmica da enzima

No levantamento da estabilidade térmica da enzima não purificada foram realizados 9 ensaios com extratos enzimáticos obtidos a partir de amostras de diferentes fermentações. As Tabelas 4.58 a 4.61 e a Figura 4.60 mostram as atividades medidas nestes experimentos como função da temperatura e do tempo de pré-incubação do extrato enzimático. Os resultados estão expressos como atividade relativa (%).

**Tabela 4.58.** Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 40°C

t (h)	$A_{r-40}$ (%)
0	100,0
1	94,6
2	95,4
3	99,7
4	93,6
5	89,4

**Tabela 4.59.** Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 50°C para os três ensaios realizados

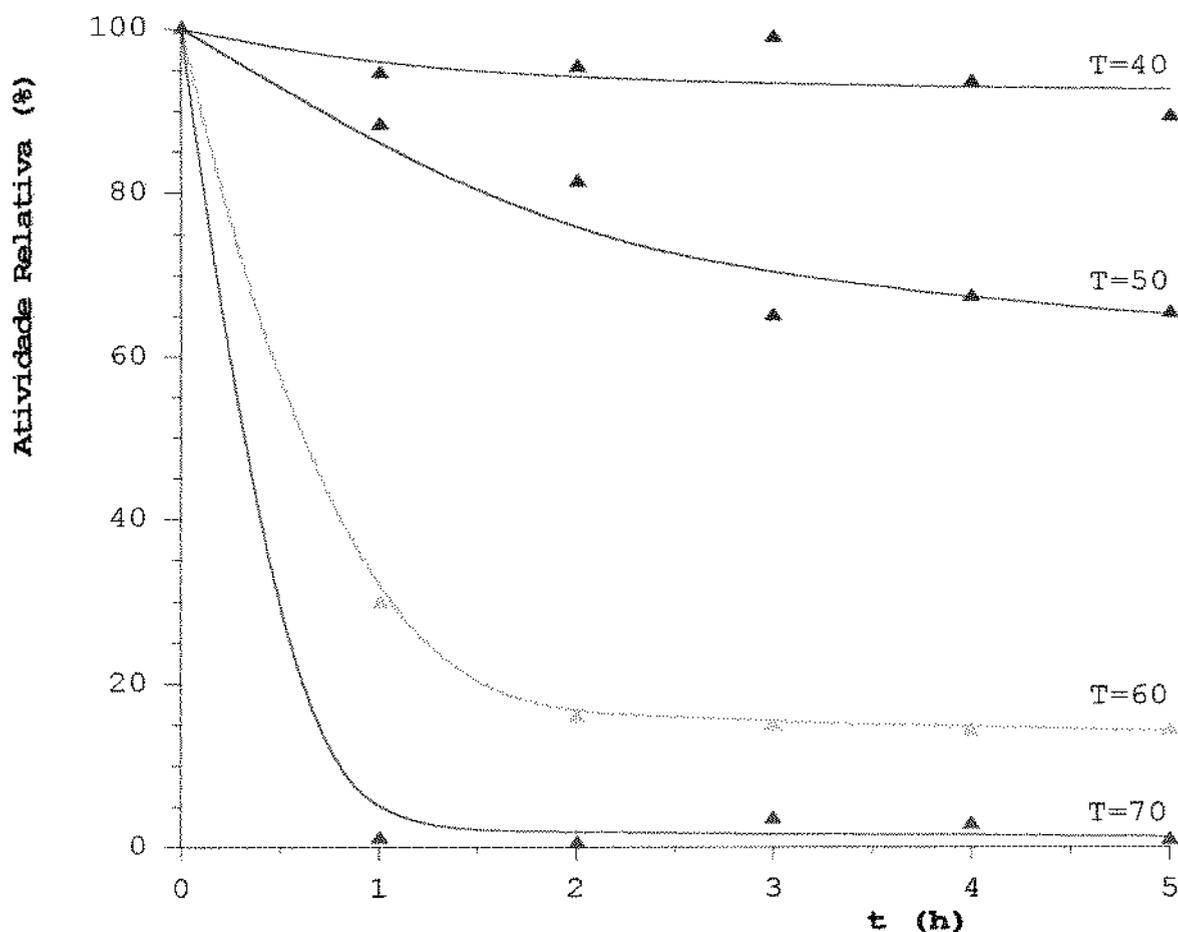
t (h)	$A_{r50-1}$ (%)	$A_{r50-2}$ (%)	$A_{r50-3}$ (%)	$A_{r50-média}$ (%)
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	92,5	80,2	92,2	88,3
2	96,6	62,1	85,3	81,3
3	27,0	79,1	78,9	61,7
4	64,0	60,1	78,1	67,4
5	64,5	54,8	76,8	65,4

**Tabela 4.60.** Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 60°C para os três ensaios realizados

t	$A_{r60-1}$ (%)	$A_{r60-2}$ (%)	$A_{r60-3}$ (%)	$A_{r60-média}$ (%)
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	22,6	42,0	24,6	29,7
2	16,8	27,3	3,2	15,8
3	6,9	28,5	9,1	14,8
4	5,7	28,8	8,1	14,2
5	15,6	25,5	1,9	14,3

**Tabela 4.61.** Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do tempo de pré-incubação na temperatura de 70°C para os dois ensaios realizados

t	$A_{r70-1}$ (%)	$A_{r70-2}$ (%)	$A_{r70-média}$ (%)
0	100,0	100,0	100,0
1	1,9	0,0	1,0
2	0,7	0,0	0,4
3	0,1	6,8	3,4
4	0,1	5,5	2,8
5	0,6	1,3	0,9



**Figura 4.60.** Atividade enzimática relativa média em função do tempo de pré-incubação nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C.

Analisando os resultados apresentados nas Tabelas 4.58 a 4.61 e na Figura 4.60 percebe-se que a atividade enzimática do farelo fermentado se manteve quase que inalterada após 5 horas na temperatura de 40°C. A estabilidade a 50°C também se mostrou adequada, já que, após 2 horas nesta temperatura, 80% da atividade inicial foram preservadas. A manutenção por um longo período de tempo da atividade enzimática a 50°C representa um fato importante, uma vez que se encontra na região determinada como de temperatura ótima para a atividade, conforme 4.3.3. Por outro lado, a permanência de 1 hora a 60 e 70°C foi suficiente para inativar cerca de 70 e 95%, respectivamente, da atividade enzimática do farelo.

Da mesma forma que os valores aqui encontrados, JACH & SUGIER (1983) e FOGARTY & BENSON (1983) registraram alta estabilidade da enzima pura em temperaturas abaixo de 55°C. A amiloglicosidase de *Rhizopus niveus* com que trabalharam YAJIMA *et alii* (1989) mostrou-se altamente instável, uma vez que teve perda completa da atividade quando mantida por 10 minutos a 60°C. Também quanto à estabilidade, ALAZARD & RAIMBAULT (citados por FOGARTY & BENSON, 1983) afirmaram ser a amiloglicosidase de *Aspergillus niger* sintetizada em fermentação semi-sólida significativamente mais termoestável que aquela produzida pelo mesmo fungo em cultivo líquido.

A representação da Figura 4.60 na forma de  $\log A/A_0$  contra tempo (Figura 4.61) mostra que entre 0 e 2 horas existe uma razoável linearidade, ou seja, a desativação (ou desnaturação) térmica da enzima pode ser aproximada de um modelo cinético de primeira ordem, expresso por (DIXON *et alii*, 1979):

$$\frac{dA}{dt} = -K_d A \quad (4.36)$$

ou,

$$\frac{A}{A_0} = e^{-K_d \cdot t} \quad (4.37)$$

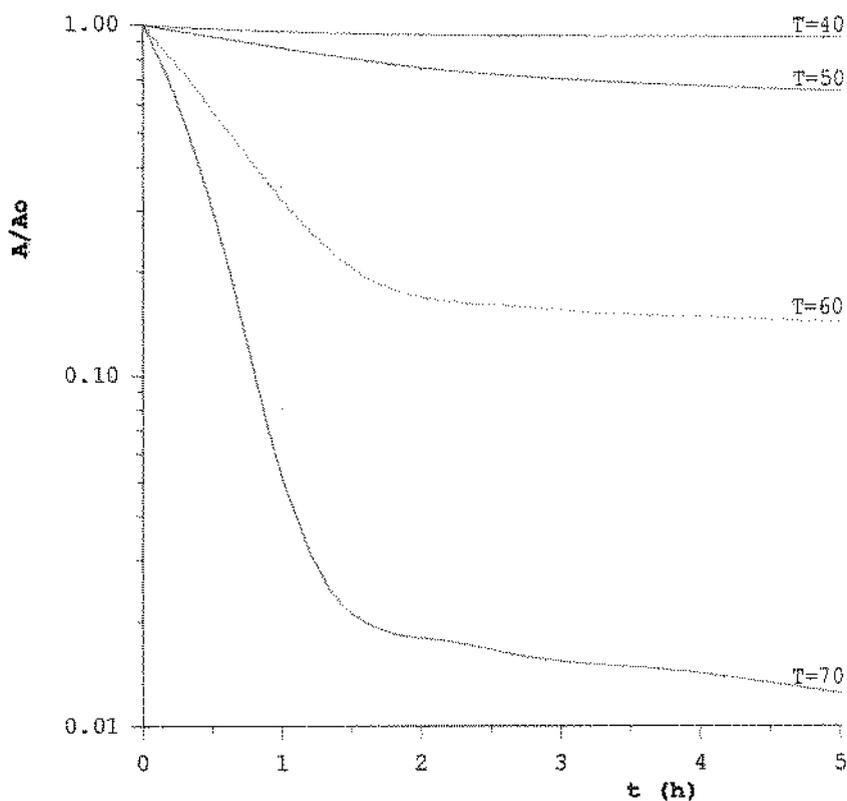
onde:

A = Atividade enzimática no tempo "t" (IU/g<sub>farelo</sub>);

A<sub>0</sub> = Atividade enzimática inicial (IU/g<sub>farelo</sub>);

K<sub>d</sub> = Constante de desnaturação (ou desativação) térmica da enzima;

t = Tempo de medida da atividade (h).



**Figura 4.61.** Atividade enzimática relativa média em função do tempo de pré-incubação nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70°C, em escala semi-logarítmica.

Assumindo que a forma geral da Equação de Arrhenius (BAILEY & OLLIS, 1986) possa ser adaptada à desativação térmica da enzima, a variação de  $K_d$  com relação à temperatura assume a seguinte expressão:

$$K_d = K e^{-E_d / R.T} \quad (4.38)$$

onde:

$K$  = Fator de frequência ou de proporcionalidade;

$E_d$  = Energia de desativação térmica;

$R$  = Constante dos gases ideais (1,98 cal/gmol.K);

$T$  = Temperatura absoluta (K).

A partir da Equação 4.37 também é possível calcular o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), definido como o tempo necessário para que a atividade enzimática inicial seja reduzida à metade:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 0,5}{K_d} \quad (4.39)$$

A Tabela 4.62 apresenta os valores de  $K_d$  para as temperaturas utilizadas, os coeficientes de correlação ( $r$ ) para a regressão exponencial da Equação 4.37, bem como os tempos de meia vida para a enzima em cada condição.

**Tabela 4.62.** Valores para a constante de desativação térmica ( $K_d$ ); tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima; e coeficiente de correlação ( $r$ ) da regressão exponencial para cada temperatura de pré-incubação

T (°C)	$K_d$ ( $h^{-1}$ )	$r$	$t_{1/2}$ (h)
40	0,0294	0,9836	23,6
50	0,1418	0,9990	4,9
60	0,9655	0,9898	0,7
70	2,3153	0,9694	0,3

A regressão exponencial dos valores de  $K_d$  apresentados na Tabela 4.62 com relação a  $T^{-1}$ , de acordo com a Equação 4.38, fornece o valor de 31,98 Kcal/gmol para a energia de desativação ( $E_d$ ) da enzima, e a seguinte expressão para a variação de  $K_d$ :

$$K_d \text{ (h}^{-1}\text{)} = 8,0478 \times 10^{20} \cdot e^{-16153/T}; \quad r=0,9929 \quad (4.40)$$

Os valores para o tempo de meia vida apresentados na Tabela 4.62 corroboram a anteriormente comentada boa estabilidade da atividade enzimática do farelo nas temperaturas de 40 e 50°C e a queda acentuada a partir de 60°C. O resultado para a energia de desativação (31,98 Kcal/gmol) praticamente coincide com o valor

de 28,90 Kcal/gmol encontrado por CABRAL et alii (citado por ZANIN, 1989).

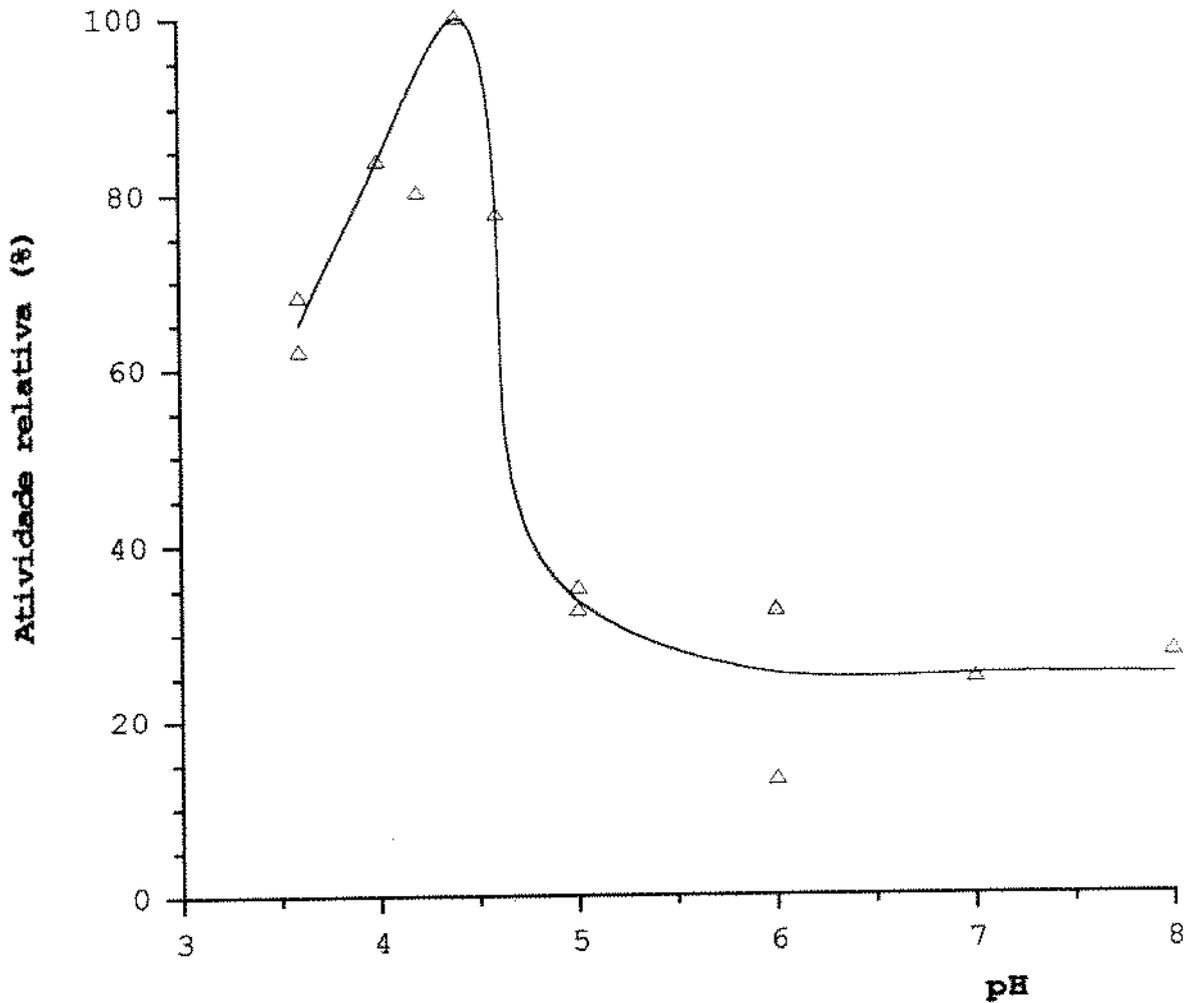
#### 4.3.5. Estabilidade da enzima com o pH

No procedimento adotado para determinar a estabilidade da enzima não purificada frente ao pH foram realizados 2 ensaios com extratos enzimáticos obtidos a partir de amostras de diferentes fermentações. A Tabela 4.63 e a Figura 4.62 mostram as atividades medidas nestes experimentos como função do pH de pré-incubação do extrato enzimático. Os resultados estão expressos como atividade relativa (%).

**Tabela 4.63.** Valores para a atividade enzimática relativa ( $A_r$ ) em função do pH de pré-incubação para os dois ensaios realizados

pH	$A_{r-1}$ (%)	$A_{r-2}$ (%)	$A_{r-média}$ (%)
3,6	62,0	68,2	65,1
4,0	83,9	-	83,9
4,2	-	80,2	80,2
4,4	100,0	100,0	100,0
4,6	77,7	-	77,7
5,0	35,1	32,6	33,9
6,0	13,2	32,6	22,9
7,0	24,7	-	24,7
8,0	27,7	-	27,7

Como notado na Tabela 4.63 e na Figura 4.62, foi no pH 4,4 que o farelo fermentado apresentou maior atividade após incubação a 60°C por 24 horas. Para valores de pH próximos a este (4,0 a 4,6), a atividade se manteve alta, cerca de 80% do valor máximo. Porém, para valores de pH acima de 5,0 somente



**Figura 4.62.** Atividade enzimática relativa média em função do pH de pré-incubação

30% da atividade se manteve inalterada após o período mencionado. Resultado semelhante foi obtido para a glicoamilase de *Aspergillus niger* por SZAJÁNI et alii (1985), que encontraram como pH ótimo para a estabilidade os valores compreendidos entre 3,5 e 4,0. FOGARTY et alii (1983) também encontraram a máxima estabilidade no pH 4,0; sendo que no pH 7,0 ainda restavam 90% da atividade. RAMASESH et alii (1982) observaram alta estabilidade da fração amiloglicosidase I de *Aspergillus niger* na faixa de pH entre 3,0 e 5,0; porém, a fração amiloglicosidase II mostrou-se pouco estável neste intervalo, preservando 100% de atividade residual somente nos pH 1,0 e 2,0.

#### 4.4. Condutividade térmica do meio

Para a determinação da condutividade térmica do meio escolheram-se 4 ensaios (C15, C28, C29 e C33), conduzidos de maneiras diferentes. Com isto pode-se também estudar a influência exercida pela densidade aparente, a umidade do meio e o tempo de fermentação sobre tal propriedade física. A condutividade térmica medida, bem como os valores para as variáveis anteriormente mencionadas são listados na Tabela 4.64.

**Tabela 4.64.** Valores para a condutividade térmica ( $k$ ), densidade aparente ( $d_{ap}$ ), umidade do meio ( $U$ ) e tempo de fermentação ( $t_f$ ).

Amostra	$k$ (W/m/°C)	$d_{ap}$ (g/l)	$U$ (%)	$t_f$ (h)
1	0,3219	611	53,17	0
2	0,3053	611	53,17	0
3	0,1809	611	53,17	0
4	0,2732	611	53,17	0
5	0,2462	611	53,17	0
6	0,6298	611	59,09	46
7	0,7142	611	59,09	46
8	0,5420	611	59,09	46
9	0,4802	611	59,47	58
10	0,5254	611	59,47	58
11	0,3619	611	59,47	58
12	0,5733	611	59,47	58
13	0,3149	611	60,31	70
14	0,3706	611	60,31	70
15	0,2793	611	60,31	70
16	0,3019	611	60,31	70
17	0,5576	611	61,14	94
18	0,6124	611	61,14	94
19	0,4271	611	61,14	94
20	0,5272	611	62,39	118
21	0,6411	611	62,39	118
22	0,4245	611	62,39	118
23	0,9100	924	55,20	0
24	0,9387	924	55,20	0
25	1,4580	924	53,59	22
26	0,5959	924	53,59	22
27	0,8412	924	56,13	34
28	1,5720	924	56,13	34
29	2,1270	924	56,13	34
30	1,6538	924	57,62	46
31	1,2344	924	57,62	46
32	1,1100	924	57,62	46
33	2,4924	924	62,42	70
34	2,4019	924	62,42	70

Tabela 4.64. continuação

Amostra	k (W/m/°C)	d <sub>ap</sub> (g/l)	U (%)	t <sub>f</sub> (h)
35	2,6551	924	62,42	70
36	1,7912	924	59,58	118
37	1,6598	924	59,58	118
38	0,8943	924	59,58	118
39	0,2192	499	54,19	0
40	0,2114	499	54,19	0
41	0,1949	499	54,19	0
42	0,3454	499	55,40	22
43	0,4967	499	55,40	22
44	0,3471	499	55,40	22
45	0,3549	499	53,45	34
46	0,2775	499	53,45	34
47	0,3410	499	53,45	34
48	0,2679	499	57,65	46
49	0,4445	499	57,65	46
50	0,3254	499	57,65	46
51	0,3671	499	59,90	58
52	0,3080	499	59,90	58
53	0,3741	499	59,90	58
54	0,4819	499	59,90	58
55	0,8038	499	57,58	70
56	0,5724	499	57,58	70
57	0,3662	499	57,58	70
58	0,2775	499	56,45	94
59	0,5272	499	56,45	94
60	0,3019	499	56,45	94
61	0,4237	499	58,06	118
62	0,4176	499	58,06	118
63	0,4263	499	58,06	118
64	0,4124	499	58,06	118
65	0,4872	575	52,63	0
66	0,3480	575	52,63	0
67	0,4828	575	52,63	0
68	0,5359	575	52,63	0
69	0,4558	575	53,63	22
70	0,3280	575	53,63	22
71	0,3906	575	53,63	22
72	0,6751	575	56,78	34
73	0,8778	575	56,78	34
74	0,6220	575	56,78	34
75	0,7107	575	56,78	34
76	0,5663	575	53,06	46
77	0,5133	575	53,06	46
78	0,8360	575	53,06	46
79	0,6951	575	53,06	46
80	0,4184	575	57,32	64
81	0,8578	575	57,32	64
82	0,0908	575	57,32	64
83	0,3602	575	57,32	64
84	0,2418	575	57,32	64
85	0,1166	575	39,71	118
86	0,1844	575	39,71	118
87	0,2288	575	39,71	118
88	0,1679	575	39,71	118

A correlação das variáveis foi realizada a partir destes dados (Tabela 4.64). O nível de confiança inicialmente usado para a previsão dos modelos foi de 95%.

Iniciou-se com uma regressão linear multivariada, verificando as correlações parciais entre as variáveis e a condutividade, ou seja, a contribuição individual de cada variável independente ( $d_{ap}$ ,  $U$  e  $t_f$ ) sobre a predição da variável dependente ( $k$ ). Para esta análise, a condutividade térmica mostrou-se altamente correlacionada com a densidade do meio e em menor escala com a umidade. A correlação com o tempo de fermentação foi baixa. O modelo linear obtido apresentou um coeficiente de correlação múltipla ( $R$ ) igual a 0,8123.

Na tentativa de obter um modelo de melhor correlação, utilizou-se a regressão multivariada não linear. Os dados foram trabalhados com equações polinomiais, exponenciais, de potências e logarítmicas, sendo, novamente, que as melhores correlações de  $k$  foram com  $d_{ap}$  e  $U$ . O modelo que melhor descreveu o comportamento da condutividade térmica foi o seguinte:

$$k = 47,5080 + 0,0115 \cdot d_{ap} + 0,1295 \cdot U - 6,0737 \cdot \ln(d_{ap}) - 5,5555 \cdot \ln(U) \quad (4.41)$$

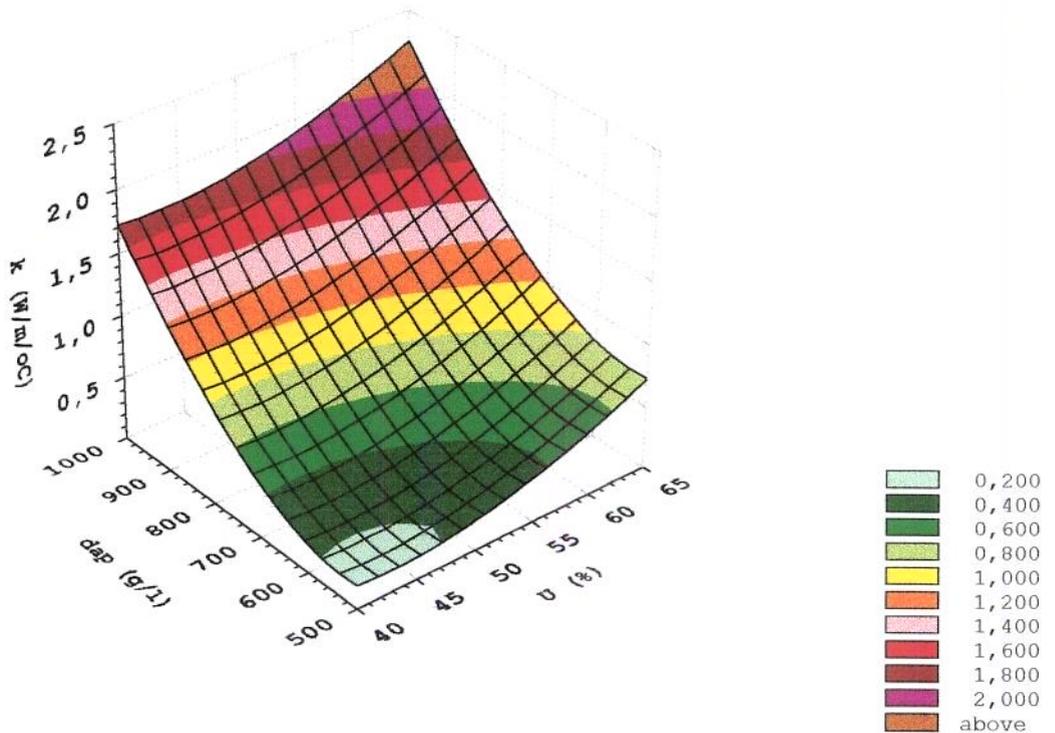
onde  $k$  é dado em  $W/m/^\circ C$ , com  $d_{ap}$  e  $U$  expressos em  $g/l$  e %, respectivamente. A Equação 4.41 foi obtida utilizando-se os 74 resultados de melhor correlação da Tabela 4.64. O valor calculado para o coeficiente de correlação múltipla ( $R$ ) foi de 0,8496, enquanto que o Quadro 4.10 apresenta a análise de variância para este modelo. A comparação do valor calculado para  $F$ , com o valor tabelado, mostra que o modelo ajustado para explicar a variação de  $k$  com  $d_{ap}$  e  $U$  é significativo a um nível de confiança acima de 99%, ou seja, bem acima dos 95% estipulados inicialmente.

**Quadro 4.10.** Análise de variância do modelo obtido para a condutividade térmica

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Modelo	16,0564	4	4,0141	43,17
Desvios	6,4167	69	0,0930	—
Total	22,4731	73	—	—

Valor de F tabelado:  $F(0,99;4;69)=13,64$

A Figura 4.63 mostra o efeito de  $d_{ap}$  e  $U$  sobre a condutividade térmica, onde se percebe o grande acréscimo sofrido por  $k$  com o aumento da densidade do meio. Nota-se também que a elevação de  $k$  com o aumento da umidade do meio se dá de uma maneira bem menos acentuada.

**Figura 4.63.** Variação da condutividade térmica ( $k$ ) com a densidade aparente ( $d_{ap}$ ) e a umidade ( $U$ ) do meio.

A aquisição dos dados de tempo e temperatura via computador (e não manual como realizado neste trabalho) certamente levaria a erros de medidas bem menores e um coeficiente de correlação maior.

Na literatura pesquisada não foi encontrado qualquer estudo referente à condutividade térmica de meios semi-sólidos fermentados. Os valores aqui determinados para a condutividade são superiores aos encontrados para farinhas de cereais. A causa mais provável para isto deve ser a alta concentração de umidade (comparado às farinhas), a baixa porosidade do meio e o crescimento do microrganismo.

Diversos autores (MURR, 1992; LOPES FILHO, 1988; SWEAT, 1986; LOZANO *et alii*, 1979) têm correlacionado a condutividade térmica de vários materiais com o conteúdo de umidade. HALLIDAY *et alii* (1995) estudaram o efeito da temperatura e da umidade na condutividade térmica de farinha de milho e grânulos de batata de diferentes densidades e verificaram que, para o milho, a densidade tinha pouca influência no valor final da condutividade, que variou entre 0,1 e 0,4 W/m/°C. Os valores para a condutividade dos grânulos de batata mostraram maior dependência com a densidade; porém, para nenhum dos dois materiais foi apresentada uma correlação matemática. SWEAT (1986), citando outros autores, mostra a variação da condutividade com a densidade e a umidade para as farinhas de trigo e de soja. Para esta última a umidade foi o fator mais importante, sendo que os valores de  $k$  encontraram-se entre 0,09 e 0,50 W/m/°C.

## 5. CONCLUSÕES

Das fermentações em embalagens flexíveis de polipropileno, pôde-se concluir que:

-Com a utilização do planejamento experimental obtiveram-se valores crescentes para a atividade enzimática e a produtividade; porém, os valores máximos para estas respostas são encontrados em condições operacionais diferentes. Para a atividade enzimática os valores otimizados foram:  $T = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $U = 50\%$ ,  $C = 15\%$ ,  $t_f = 159,4$  horas e  $X = 2,7 \times 10^5$  esporos/ $g_{\text{meio}}$ , e um tempo de esterilização menor que 50,7 minutos. Por sua vez, as melhores condições encontradas para a produtividade do processo foram:  $T = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $U = 50\%$ ,  $C = 15\%$ ,  $t_f = 60,5$  h,  $X = 6,9 \times 10^6$  esporos/ $g_{\text{meio}}$  e  $t_e$  menor que 45 minutos.

-A atividade de amiloglicosidase do farelo fúngico, obtido segundo as condições e variáveis descritas neste trabalho, pode ser prevista pelo seguinte modelo:

$$A = -2354,65 + 29,83.t_f + 5,23 \times 10^{-4}.X + 0,63.t_e \\ - 0,06.t_f^2 - 2,40 \times 10^{-11}.X^2 + 0,28.t_e^2 \\ - 1,49 \times 10^{-6}.t_f.X - 0,13.t_f.t_e - 3,02 \times 10^{-6}.X.t_e.$$

-O modelo que expressa os valores para a produtividade deste processo é o seguinte:

$$P = -15,60 + 0,21.t_f + 4,40 \times 10^{-6}.X + 0,02.t_e \\ - 4,51 \times 10^{-4}.t_f^2 - 1,82 \times 10^{-13}.X^2 + 2,30 \times 10^{-3}.t_e^2 \\ - 1,46 \times 10^{-8}.t_f.X - 1,21 \times 10^{-3}.t_f.t_e - 2,22 \times 10^{-8}.X.t_e.$$

Com relação aos resultados obtidos para as fermentações em reatores de coluna, concluiu-se que:

-O aumento da aeração de 0 a 40  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/g_{\text{meio}}$  exerce efeito positivo, tanto sobre a atividade enzimática, quanto sobre a produtividade do processo, sendo que a faixa

compreendida entre 40 e 90  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  não acarreta um aumento expressivo nos valores finais das duas respostas estudadas. A partir de 100  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$ , a aeração atua de forma negativa na síntese enzimática. O valor de 60  $\text{ml}_{\text{ar}}/\text{h}/\text{g}_{\text{meio}}$  foi suficiente para uma boa oxigenação do meio e ótimo para a produção da enzima.

- Na ausência de aeração, os modelos de 2ª ordem, propostos para predizerem a atividade enzimática do meio e a produtividade do processo fermentativo usando embalagens de polipropileno, são aplicáveis a reatores de coluna com leito fixo.
- A atividade enzimática do farelo, utilizando-se o reator de coluna proposto, atingiu um máximo de 1700 IU/ $\text{g}_{\text{meio}}$ . Isto representa um aumento superior a 100% sobre os valores obtidos nos processos conduzidos em embalagens de polipropileno (807,55 IU/ $\text{g}_{\text{meio}}$ ). Para a produtividade do processo, o acréscimo alcançado foi cerca de 260%. Os melhores valores encontrados foram de 25,6 e 7,1 IU/ $\text{g}_{\text{meio}}/\text{h}$ , respectivamente.
- No intervalo compreendido entre 586 e 858 g/l, a densidade aparente do meio mostrou não ter influência sobre a atividade enzimática e a produtividade. Valores fora desta faixa influenciaram negativamente.
- A aeração não se mostrou suficiente para a remoção do calor metabólico gerado durante o presente processo fermentativo, sendo necessário um sistema adicional de controle e manutenção da temperatura do meio.
- Os reatores utilizados apresentaram um maior gradiente radial do que axial da temperatura, e a troca de calor se realizou de duas maneiras diferentes: radialmente a contribuição maior para o fluxo de calor foi dada pelo mecanismo de condução e na direção axial pela convecção.

A partir dos experimentos para caracterização cinética e determinação da condutividade térmica do farelo fermentado, tiraram-se as seguintes conclusões:

-Os ensaios cinéticos mostraram os valores  $2,30 \pm 0,39$  g/l para a Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) da enzima não purificada e  $112,25 \pm 10,46$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}_{\text{farelo}}$  para a velocidade máxima ( $V_{\text{max}}$ ). Os valores ótimos de temperatura e pH foram, respectivamente, de  $55^\circ\text{C}$  e 4,6. Nos testes de estabilidade o pH 4,4 se mostrou o mais indicado. O valor calculado para a energia de desativação enzimática foi de 31,98 Kcal/gmol, enquanto que a constante de desativação térmica é dada pela seguinte expressão:  $K_d$  ( $\text{h}^{-1}$ ) =  $8,0478 \times 10^{20} \cdot e^{-16153/T}$ .

-A condutividade térmica do meio semi-sólido fermentado é função direta da densidade aparente e da umidade do meio. A análise de 88 medições indica que o modelo matemático que melhor descreve o comportamento da condutividade térmica com estas variáveis é o seguinte:

$$k = 47,5080 + 0,0115 \cdot d_{\text{ap}} + 0,1295 \cdot U - 6,0737 \cdot \ln(d_{\text{ap}}) - 5,5555 \cdot \ln(U)$$

## 6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Como a idéia inicial do presente trabalho era de contribuir para o desenvolvimento da fermentação semi-sólida, sugere-se, para a continuidade deste estudo, as seguintes possibilidades de pesquisa:

- estudar a influência da variação da VMM na temperatura do meio;
- estudar a influência altura do leito fixo na atividade enzimática;
- estudar o efeito que a concentração de casca tem sobre o valor da densidade máxima possível de ser utilizada nos fermentadores de coluna;
- encontrar um modelo que descreva e simule a atividade enzimática e a produtividade para os reatores de coluna;
- estudar o aumento de escala dos fermentadores de coluna;
- estudar e modelar os mecanismos de troca térmica nos fermentadores de maior escala;
- estudar as possibilidades de aumento de escala do inóculo;
- estudar a viabilidade da construção de um fermentador de coluna com secador acoplado;
- testar novos substratos para os fermentadores de coluna.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, T.E.; KRISHNASWAMY, C. & RAMAKRISHNA, S.V. Effect of hydrolysis conditions of cassava on the oligosaccharide profile and alcohol fermentation. Starch/Stärke, v.39, n.7, p.237-240, 1987.
- ABRAHAM, T.E.; SREEDHARAN, V.P. & RAMAKRISHNA, S.V. Development of an alternate route for the hydrolysis of cassava flour. Starch/Stärke, v.41, n.12, p.472-476, 1989.
- AGUERO, J.M.Z. Influência do pH e da concentração inicial de substrato na síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus* em cultivo submerso. São Paulo, 1987. 256p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS -AACC Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. vol 1 e 2, St. Paul-Minnesota, 8<sup>th</sup> ed., 1983.
- AMIM, G. & ALLAH, A.M.K. By-products formed during direct conversion of sugar beets to ethanol by *Zymomonas mobilis* in conventional submerged and solid-state fermentations. Biotechnology Letters, v.14, n.12, p.1187-1192, 1992.
- ANTIER, P.; MINJARES, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. & VINIEGRA-GONZALEZ, G. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. Enzyme Microbiology and Technology, v.15, n.3, p.254-260, 1993.
- AURIA, R. PALACIOS, J & REVAH, S. Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in solid state fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v.39, p.898-902, 1992.
- AURIA, R.; MORALES, M.; VILLEGAS, E. & REVAH, S. Influence of mold grow on the pressure drop in aerated solid state fermentors. Biotechnology and Bioengineering, v.41, p.1007-1013, 1993.

- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. Singapore: McGraw-Hill Book Co., 1986. 984p.
- BAJRACHARYA, R. & MUDGETT, R.E. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. Biotechnology and Bioengineering, v.22, p.2219-2235, 1980.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; GONZÁLEZ, H. & MEJIA, A. Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. Biotechnology Advances, v.11, p.539-547, 1993.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; TOMASINI, A.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. & LÓPEZ, J. Penicillin production by solid state fermentation. Biotechnology Letters, v.10, n.11, p.793-798, 1988.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.
- BEROVIC, M. & LOGAR-DERENCIN, M. Solid state fermentation of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v.56, n.2, p.209-211, 1993.
- BON, E.P.S. A importância do desenvolvimento da tecnologia enzimática no Brasil. Anais do 2º Seminário Nacional de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro, 1995.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. & HUNTER, J.S. Statistics for experimenters-an introduction to design, data analysis and model building. New York: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1987.
- CANEDO, E.L.; MARSÓN, J.S. & CALVEDO, A. Método de la sonda para la determinación de conductividad térmica en carne. Centro de Investigación e Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 1975.
- CANNEL, E. & MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. Process Biochemistry, v.15, p.24-28, 1980a.

- CANNEL,E. & MOO-YOUNG,M. Solid-state fermentation systems. Process Biochemistry, v.15, p.2-7, 1980b.
- CARRIZALEZ,V., RODRIGUEZ,H. & SARDINA,I. Determination of specific growth of molds on semi-solid cultures. Biotechnology and Bioengineering, v.23, p.321-333, 1981.
- CHEN,H., BAKIR,U., REILLY,P.J. & FORD,C. Increased thermostability of Asn182→Ala mutant *Aspergillus awamori* glucoamylase. Biotechnology and Bioengineering, v.43, p.101-105, 1994.
- CHIQUETTO,M.L.; FACCIOTTI,M.C.R.; KILIKIAN,B.V. & SCHMIDELL,W. Influence of carbon and nitrogen sources on glucoamylase production by *Aspergillus* in batch process. Biotechnology Letters, v.14, n.6, p.465-470, 1992.
- CORNELL,J.A. Experiments with mixtures-design, models and analysis of mixture data. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics, 1981.
- CORNELL,J.A. How to apply response surface methodology. American Society for Quality Control, 1990.
- DEL BIANCHI,V.L. Produção de enzimas proteolíticas ácidas por fermentação fúngica em meio semi-sólido Campinas,1990. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- DESCHAMPS,F. & HUET,M.C.  $\beta$ -Glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* in solid state fermentation. Biotechnology Letters, v.6, n.1, p.55-60, 1984.
- DESGRANGES,C.; VERGOIGNAN,C.; GEORGES,M. & DURAND,A. Biomass estimation in solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, v.35, p.200-205, 1991.
- DIXON,M.; WEBB,E.C.; THORNE,C.J.R. & TIPTON,K.F. Enzymes. 3<sup>rd</sup> ed. London: Longman Group Limited, 1979.

- DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J. & ERTOLA, R. Water balance in solid-state fermentation without forced aeration. Enzyme Microbiology Technology, v.16, p.562-565, jul, 1994.
- FACCIOTTI, M.C.R.; WUHSTRACK, G.H.; TONSO, A.; CHIQUETTO, M.L. & SCHMIDELL, W. Effect of yeast extract on glucoamylase synthesis by *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Biotechnology Letters, v.13, n.8, p.547-552, 1991.
- FACCIOTTI, M.C.R. Produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa - Estudo do processo semicontínuo e da influência da concentração inicial de polissacarídeo no processo descontínuo. São Paulo, 1986. 245p. Tese (Doutor em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- FAGERSTRÖM, R. & KALKKINEN, N. Characterization, subsite mapping and partial amino acid sequence of glucoamylase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* Biotechnology and Applied Microbiology, v.21, p.223-231, 1995.
- FOGARTY, W.M. & BENSON, C.P. Purification and properties of a thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, v.18, p.271-278, 1983.
- FOGARTY, W.M. & KELLY, C.T. Microbial Enzymes and Biotechnology. 2.Ed. Elsevier Applied Science, 1990.
- FUTATSUGI, M., OGAWA, T. & FUKUDA, H. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.76, n.6, p.521-523, 1993.
- FUTATSUGI, M., OGAWA, T. & FUKUDA, H. Scale-up of glucoamylase production by *Saccharomycopsis fibuligera*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.76, n.5, p.419-422, 1993.

- GHILDYAL,N.P., GOWTHAMAN,M.K., RAGHAVA-RAO,K.S. & KARANTH,N.G.  
Interaction of transport resistences with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. Enzyme Microbiology Technology, v.16, p.253-257, 1994.
- GHILDYAL,N.P., RAMAKRISHNA,M., LONSANE,B.K., KARANTH,N.G. & KRISHNAIAH, M.M. Temperature variations and amyloglicosidase levels at different bed depths in a solid state fermentation system. The Chemical Engineering Journal, v.51, p.B17-B23, 1993.
- GHILDYAL,N.P., RAMAKRISHNA,M., LONSANE,B.K. & KARANTH,N.G.  
Efficient and simple extration of mouldy bran in a pulsed column extractor for recovery of amyloglucosidase in concentrated form. Process Biochemistry, v.26, p.235-241, 1991
- GOWTHAMAM,M.K.; RAGHAVA,K.S.M.S.; GHILDYAL,N.P. & KARANTH,N.G..  
Gas concentration and temperature gradients in a solid-state fermentor. Biotechnology Advances, v.11, p.611-620, 1993.
- GRAJEK,W. & GERVAIS,P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. Enzyme Microbiology Technology, v.9, p.658-662, nov. 1987.
- GUMBIRA-SA'ID,E; GREENFIELDS,P.F.; MITCHELLS,D.A. & DOELLE,H.W.  
Operacional parameters for packed beds in solid-state cultivation. Biotechnology Advances, v.11, p.599-610, 1993.
- GUMBIRA-SA'ID,E.; MITCHELLS,D.A.; GREENFIELDS,P.F. & DOELLE,H.W. A packed bed solid-state cultivation system for the production of animal feed: cultivation, drying and product quality. Biotechnology Letters, v.14, n.7, p.623-628, 1992.

- GUTIERREZ-ROJAS, M. & TORRES, E.F. Curso de Fermentaciones em Medio Sólido - Biotecnología para el aprovechamiento de residuos agroindustriales y municipales. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992.
- HAASUM, I.; ERIKSEN, S.H.; JENSEN, B. & OLSEN, J.. Grow and glucoamylase production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. Applied Microbiology and Biotechnology, v.34, p.656-660, 1991.
- HALLIDAY, P.J.; PARKER, R.; SMITH, A.C. & STEER, D.C. The thermal conductivity of maize grits and potato granules. Journal of Food Engineering, v.26, p.273-288, 1995.
- HERNANDEZ, M.R.T.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S. & LONSANE, B.K. Potencial of solid state fermentation for production of ergot alkaloids. Letters in Applied Microbiology, 15: 156-159, 1992.
- HOOPER, F.C. & LEPPER, F.R. Transient heat flow apparatus for the determination of thermal conductivities. Transactions American Society of Heating and Ventilating Engineers, v.56, p.309-322, 1950.
- JACH, M. & SUGIER, H. Adsorption of glucoamylase on DEAE-cellulose. Starch/Stärke, v.35, n.12, p.427-430, 1983.
- JOUTSJOKI, V.V.; PSRKKINEN, E.E. & TORKKELI, T.K. A novel glucoamylase preparation for grain mash saccharification. Biotechnology Letters, v.15, n.3, p.277-282, 1993.
- KHURI, A. & CORNELL, J.A. Response surface: designs and analyses. American Society for Quality Control, 1987.
- KILIKIAN, B.V. Contribuição ao estudo do processo descontínuo e descontínuo alimentado na síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3122. São Paulo, 1989. Tese (Doutor em Engenharia)-Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.

- LARROCHE,C., DESFARGES,C. & GROS,J.B. Spore production of *Penicillium roqueforti* by simulated solid state fermentation. Biotechnology Letters, v.8, n.6, p.453-456, 1986.
- LE DUY,A.; ZAJIC,J.E. A geometrical approach for differentiation of a experimental function at a point applied to growth and product formation. Biotechnology and Bioengineering, v.15, p.805-810, jul, 1973.
- LIN,W.L.; FELDBERG,R.S. & CLARK,E.D.B. Kinetics of cell growth and heterologous glucoamylase production in recombinant *Aspergillus nidulans*. Biotechnology and Bioengineering, v.41, p.273-279, 1993.
- LONSANE,B.K.; GHILDYAL,N.P.; BUBIATMAN,S. & RAMAKRISHNA,S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microbiology Technology, v.7, p.258-265, 1985.
- LONSANE,B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA,G.; RAIMBAULT,M.; ROUSSOS,S.; VINIEGRA-GONZALES,G.; GHILDYAL,N.P.; RAMAKRISHNA,M. & KRISHNAIAH,M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation system. Process Biochemistry, v.27, p.259-273, 1992.
- LOPES FILHO,J.F. & FORTES, M. Condutividade térmica da batata. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.8, n.2, p.146-154, 1988.
- LÓPEZ-ULIBARRI,R., HUERTA,S., SCHETTINO-BERMÚDEZ,B. & GUTIÉRREZ-ROJAS,M. Gelatinization of Cassava Meal for Solid State Fermentation. Journal of Food Engineering, v.9, p.237-243, 1989.
- LOZANO,J.E.; URBICAIN,M.J. & ROTSTEIN,E. Thermal conductivity of apples as a function of moisture content. Journal of Food Science, v.44, n.1, p.198-199, 1979.
- MAIORANO,A.E.; BONOMI,A.; SCHMIDELL,W. & OGAKI,Y. Determinação do crescimento celular em fermentações em estado sólido. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1992.

- MAIORANO, A.E. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. São Paulo, 1990. 262p. Tese (Doutor em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- MATSUMURA, M.; HIRATA, J.; ISHII, S. & KOBAYASHI, J. Kinetics of saccharification of raw starch by glucoamylase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.42, n.1, p.51-67, 1988.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MITCHELL, D.A., DO, D.D. & GREENFIELD, P.F. A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. Biotechnology and Bioengineering, v.38, p.353-362, 1991.
- MODAK, J.M. & RAJAGOPALAN, S. Heat and mass transfer simulation studies for solid-state fermentation processes. Chemical Engineering Science, v.49, n.13, p.2187-2193, 1994.
- MOHSENIN, N.N. Thermal conductivity, diffusivity, and unit surface conductance of foods and agricultural materials. In: \_\_\_\_\_ Thermal Properties of Foods. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1980. p.122-195.
- MURR, F.E.X. Estudo dos fenômenos de secagem de batata. Campinas, 1992. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; ATTHASAMPUNNA, P.; UEDA, R. & TAGUCHI, H. Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Journal of Fermentation Technology, v.62, n.5, p.453-459, 1984.

- NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R. & TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. Journal of Fermentation Technology, v.60, n.4, p.311-319, 1982.
- NAVARATNAM, P.; ARASARATNAM, V.; MAHENDRAN, S. & BALASUBRAMANIAM, K. Formulation of medium and recycling of biomass for glucoamylase production by *Botryodiplodia theobromae*. Process Biochemistry, v.31, n.1, p.77-80, jan. 1996.
- NEHETE, P.N.; HEGDE, M.V.; REDDY, L.G. & SHANKAR, V. Immobilization of amyloglucosidase on polystyrene anion exchange resin II: kinetics and stabilities. Biotechnology Letters, v.14, n.9, p.817-822, 1987.
- NIGAM, P. & SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme and Microbial Technology, v.17, p.770-778, sep. 1995.
- NIX, G.H.; VACHON, R.I.; LOWERY, G.W. & MCCURRY, T.A. The line source method: procedure and interation scheme for combined determination of conductivity and diffusivity. In: Thermal Conductivity: Proceedings of the 8<sup>a</sup> Conference. New York: Plenum Press, 1969. p.999-1008.
- OHNISHI, H.; KITAMURA, H.; MINOWA, T.; SAKAI, H. & OHTA, T. Molecular cloning of a glucoamylase gene from a thermophilic *Clostridium* and kinetics of the cloned enzyme. European Journal of Biochemistry, v.207, p.413-418, 1992.
- OHNO, A.; ANO, T. & SHODA, M. Production of antifungal antibiotic, iturin, in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. Biotechnology Letters, v.14, n.9, p.817-822, 1992.
- OKAZAKI, N.; SUGAMA, S. & TANAKA, T. Mathematical model for surface culture of koji mold. Journal of Fermentation Technology, v.58, n.5, p.471-476, 1980.

- ORIOLE, E.; SCETTINO, B.; VINIEGRA-GONZALES, G. & RAIMBAULT, M.  
Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. Journal of Fermentation Technology, v.66, n.1, p.57-62, 1988.
- PADMANABHAN, S.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B.K. & KRISHNAIAH, M.M.  
Enhanced leaching of product at elevated temperatures: alpha-amylase produced by *Bacillus licheniformis* M27 in solid state fermentation system. Letters in Applied Microbiology, v.15, p.235-238, 1992.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P. & ASHAKUMARY, L. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. Process Biochemistry, v.31, n.1, p.43-46, jan. 1996.
- PANDEY, A. & RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. Enzyme Microbiology Technology, v.14, p.486-488, 1992.
- PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid state fermentations. Process Biochemistry, v.26, p.335-361, 1991.
- PANDEY, A. Production of starch saccharifying enzyme in solid cultures. Starch/Stärke, v.44, n.2, p.75-77, 1992a.
- PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. Process Biochemistry, v.27, p.109-117, 1992b.
- PANDEY, A., NIGAM, P. & VOGEL, M. Simultaneous Saccharification and protein enrichment fermentation of sugar beet pulp. Biotechnology Letters, v.10, n.1, p. 67-72, 1988.
- PARK, Y.K. & SANTI, M.S.S. Induction of high amyloglucosidase producing mutant from *Aspergillus awamori*. Journal of Fermentation Technology, v.55, n.2, p.193-195, 1977.
- PARK, Y.K. Insolubilização da amiloglicosidase em resina: estudo de suas propriedades e cinética. Campinas, 1972. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- PARK, Y.K. Normalização dos métodos para determinação de atividade de algumas enzimas industriais. São Paulo: Instruções Técnicas ITAL, n.2, p.9-15, 1969.
- PASTORE, G.M. Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática Campinas, 1992. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RZYBYT, M., & SUGIER, H. The properties of glucoamylase soluble and immobilized on DEAE-cellulose. Part I. Kinetics and thermodynamics of enzyme reaction. Starch/Stärke, v.40, n.3, p.108-111, 1988.
- RAIMBAULT, M. & ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. European J. Appl. Microbiol., v.9, p.199-209, 1980.
- RAMAKRISHNA, S.V., SASWATHI, N., SHEELA, R. & JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyl transferase by *Bacillus cereus*. Enzyme Microbiology Technology, v.16, p.441-444, 1994.
- RAMAMURTHY, V. & KOTHARI, R.M. Comparasion of fungal protease production by submerged and surface cultivation. Journal of Biotechnology v.27, p.349-354, 1993.
- RAMASESH, N.; SREEKANTIAH, K.R. & MURTHY, V.S. Studies on the two forms of amyloglucosidase of *Aspergillus niger* van Tieghem. Starch/Stärke, v.34, n.10, p.346-351, 1982.
- RAMESH, M.V. & LONSANE, B.K. Characteristics and novel features of thermostable  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus licheniformis* M27 under solid state fermentation. Starch/Stärke, v.42, n.6, p.233-238, 1990.

- RAMESH, M.V. & LONSANE, B.K. Regulation of alpha-amylase production in *Bacillus licheniformis* M27 by enzyme end-products in submerged fermentation and its overcoming in solid state fermentation system. Biotechnology Letters, v.13, n.5, p.355-360, 1991.
- REGULY, J.C. Biotecnologia de processos fermentativos e suas matérias-primas - Vol I e II, 1991. No prelo.
- RODRIGUES, M.I. Modelagem, simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas Campinas, 1993. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RODRIGUEZ, J.A., ECHEVARRIA, J., RODRIGUEA, F.J., SIERRA, N., DANIEL, A. & MARTINEZ, O. Solid state fermentation of dried citrus peel by *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, v.7, n.8, p.677-580, 1985.
- SAMPAIO NETO, O. Área interfacial em colunas de recheio: influência da viscosidade do líquido e da velocidade superficial do gás Campinas, 1994. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SANI, A., AWE, F.A. & AKINYANJU, J.A. Amylase synthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* grown on cassava peel. Journal of Industrial Microbiology, v.10, p.55-59, 1992.
- SARGANTANIS, J., KARIM, M.N., MURPHY, V.G. & RYOO, D. Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. Biotechnology and Bioengineering v.42, p.149-158, 1993.
- SATO, H.H. Estudo das características bioquímicas da pululanase de *Klasiella* sp e sua aplicação. Campinas, 1991. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- SATO, K.; MIYAZAKI, S.; MATSUMOTO, N.; YOSHIZAWA, K. & NAKAMURA, K. Pilot-scale solid-state fermentation by inert gas circulation using moderately thermophilic yeast. Journal of Fermentation Technology, v.66, n.2, p.173-180, 1988.
- SATO, K.; NAGATANI, M.; NAKAMURA, K.I. & SATO, S. Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in solid state culture with forced aeration. Journal of Fermentation Technology, v.61, n.6, p. 623-629, 1983.
- SATO, K., NAGATANI, M. & SATO, S. A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. Journal of Fermentation Technology, v.60, n.6, p. 607-610, 1982.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G.; TREJO-HERNÁNDEZ, M.R.; LONSANE, B.K; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; DUFOUR, D. & RAIMBAULT, M. On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic solid-state fermentations. Process Biochemistry, v.29, p.13-24, 1994.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G., GUTIÉRREZ-ROJAS, M., RAIMBAULT, M. & VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. Biotechnology and Bioengineering v.35, p.802-808, 1990.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B.K; KRISHNAIAH, M.M.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S. & RAIMBAULT, M. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. Process Biochemistry, v.27, p.97-107, 1992b.
- SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B.K; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S. & RAIMBAULT, M. Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a column fermentor. Applied Microbiology and Biotechnology, v.37, p.580-582, 1992a.

- SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B.K; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S. & RAIMBAULT, M. Importance of medium pH in solid state fermentation for growth of *Schwanniomyces castellii*. Letters in Applied Microbiology, v.15, p. 164-167, 1992c.
- SCHAFHAUSER, D. & STORY, K. Co-immobilization of amyloglucosidase and pullulanase on to granular chicken bone for enhanced starch degradation. Biotechnology and Applied Microbiology, v.17, p.103-113, 1993.
- SCHMIDELL, W. Estudo do processo fermentativo contínuo de produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 337 - Comparação com o processo descontínuo São Paulo, 1986. Tese (Livre Docência em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- SHAH, N.K., RAMAMURTHY, V. & KOTHARI, R.M. Comparative profiles of fungal alpha-amylase production by submerged and surface fermentation. Biotechnology Letters, v.13, n.5, p.361-364, 1991.
- SOCCOL, C.R. Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+)-lactique - These de Doctorat - Université de Technologie de Compiègne, 1992.
- SUDO, S.; ISHIKAWA, T.; SATO, K. & OBA, T. Comparasion of acid-stable  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid-state and submerged cultures. Journal of Fermentation Bioengineering, v.77, n.5, p.483-489, 1994.
- SUKARA, E. & DOELLE, H. A one-step process for the production of single-cell protein and amyloglucosidase. Applied Microbiology and Biotechnology, v.30, p.135-140, 1989.
- SWEAT, V.E. Thermal properties of foods. In: RAO, M.A. & RIZVI, S.S.H. Engineering Properties of Foods. New York:Marcel Dekker, Inc, 1986. cap.2, p.49-87.

- SZAJÁNI, B.; KLAMÁR, G. & LUDVIG, L. Preparation, characterization and laboratory-scale application of an immobilized glucoamylase. Enzyme Microbiology Technology, v.7, p.488-492, oct. 1985.
- WENG, Y.M. & HOTCHKISS, J.H. Headspace gas composition and chintin content as measures of *Rhizopus stolonifer* growth. Journal of Food Science, v.56, n.1, p.272-275, 1991.
- WITTRUP, K.D. WEBER, A.L. & TSAI, P. Microencapsulation selection for isolation of Yeast mutants with increased secretion of *Aspergillus awamori* glucoamylase. Biotechnology and Bioengineering, v.42, p.351-356, 1993.
- YAJIMA, H.; HIROSE, A.; ISHII, T; OHSAWA, T. & ENDO, R. Immobilization of glucoamylase onto alternative acrylonitrile-butadiene copolymer by amidination reaction. Biotechnology and Bioengineering, v.33, p.795-798, 1989.
- YANG, S.S.; JANG, H.D.; LIEW, C.M. & PREEZ, J.C. Protein enrichment of sweet potato residue by solid-state cultivation with mono- and co-cultures of amylolytic fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.9, p.258-264, 1993.
- YAMASAKI, Y. & KONNO, H. Extracellular  $\alpha$ -glucosidase from suspension-cultured sugar-beet cells. Agriculture and Biological Chemistry, v.55, n.6, p.1675-1676, 1991.
- ZANGIROLAMI, T.C. Otimização da produção de xilitol a partir de xilose por *Candida parapsilosis* através de análise por superfície de resposta. Campinas, 1992. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - FEA, UNICAMP.
- ZANIN, G.M. Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada. Campinas, 1989. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - FEA, UNICAMP.