

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

RUI SÉRGIO DOS SANTOS FERREIRA DA SILVA  
Mestre em Ciências

PRODUÇÃO DE RIBOFLAVINA  
POR FERMENTAÇÃO COM  
*Ermothecium ashbyii*

*Estudo de propriedades físico-químicas  
e formulação de meios de cultura com  
sub-produtos de indústrias de alimentos*

ORIENTADOR

*Dr. Ricardo Sadir*, Livre Docente

Professor Titular da Faculdade de Tecnologia de Alimentos

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

CAMPINAS  
ESTADO DE SÃO PAULO

T. 85  
-1973.-

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

*À minha esposa Daisy*  
*e*  
*à minha filha Letícia*

# C O N T E Ú D O

## SUMÁRIO

## SUMMARY

### CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

### CAPÍTULO II REVISÃO DA LITERATURA

- 2.1 - Produção de Riboflavina com *E. ashbyii*
- 2.2 - Produção de Riboflavina com *A. gossypii*
- 2.3 - Processo de Fermentação
- 2.4 - Recuperação da Riboflavina dos Caldos de Fermentação

### CAPÍTULO III MATERIAIS E MÉTODOS

- 3.1 - Microrganismo
- 3.2 - Meios de Cultura
- 3.3.- Processo Fermentativo
- 3.4 - Equipamentos para o Desenvolvimento da Fermentação em Frascos
- 3.5 - Equipamentos para Fermentação em Escala Laboratorial
- 3.6 - Reagentes e Equipamentos Complementares
- 3.7 - Técnicas de Análises

### CAPÍTULO IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 4.1 - Comparação do Potencial Riboflavinogênico de Linhagens de *E. ashbyii* e *A. gossypii*

- 4.2 - Cinética da Produção de Riboflavina no Meio de Cultura Glucose-Peptonas-Extrato de Levedura
- 4.3 - Modelo Cinético de Kono Aplicado à Produção de Riboflavina por Fermentação
- 4.4 - Características Reológicas da Fermentação
- 4.5 - Efeito da Fonte de Carbono na Composição de Meio de Cultura para Produção de Riboflavina em Frascos Agitados
- 4.6 - Efeito da Fonte Nitrogenada na Produção de Riboflavina
- 4.7 - Efeito de Óleos Vegetais na Produção de Riboflavina
- 4.8 - Cinética da Produção de Riboflavina no Meio de Cultura Melaço-Soro de Macerado de Milho-Óleo de Milho
- 4.9 - Produção de Riboflavina no Fermentador

## CAPÍTULO V

## CONCLUSÕES

## CAPÍTULO VI

## QUADROS E FIGURAS

## APÊNDICES

## NOMENCLATURA

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## AGRADECIMENTOS

## S U M Á R I O

Foram investigadas condições de cultura de cinco linhagens de fungos, conhecidos como produtores de riboflavina. Entre as linhagens ensaiadas, selecionou-se o *Eremothecium ashbyii* IZ-1389 como maior produtor de vitamina B<sub>2</sub>.

Durante o processo fermentativo, estudaram-se o crescimento micelial, o consumo de substrato, as variações de pH e a produção de riboflavina. A cinética da fermentação foi explicada pela teoria de Kono. A viscosidade do caldo foi medida e seu comportamento reológico estudado pelo modelo de Ostwald - de Waele (lei da potência).

As experiências foram feitas em frascos agitados e fermentador em escala de laboratório, e 47 meios de cultura foram testados. A maior produção de riboflavina obtida foi de 1,087 g/l depois de 144 horas de fermentação, com o fermentador operando num alto nível de aeração (1,0 vvm), sem condições de limitação de oxigênio, e trabalhando com um meio de cultura constituído de açúcares totais de melaço de cana 25 g/l, soro de macerado de milho 28 g/l e óleo de milho 12 g/l.

## S U M M A R Y

The cultural conditions of five strains of moulds, known as riboflavin producers, were studied. The strain *Erremothecium ashbyii* IZ-1389 was selected as the higher producer among the species assayed.

Mycelial dry weights, sugars consumption, changes in pH and riboflavin production were determined in order to apply these data to the Kono Kinetic Theory. The rheological behavior of the fermentation media was studied by the Ostwald - de Waele Model (power law).

Experiments were done in shaker and in laboratory fermentor, and 47 fermentation media were examined. Maximum riboflavin production of 1.087 g/l was obtained in 144 hours of fermentation, with the fermentor operating at a higher rate of oxygen supply (1.0 vvm), without limitation of oxygen dissolved concentration, and working with a culture medium consisting of total sugars from sugar cane blackstrap molasses 25 g/l, corn steep liquor 20 g/l and corn oil 12 g/l.

# C A P Í T U L O I

## INTRODUÇÃO

As fermentações oferecem, de um modo geral, a vantagem de uma produção, relativamente mais fácil, de compostos com estruturas complexas, os quais são quimicamente sintetizados com dificuldade. A riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) tem uma estrutura complexa, sendo portanto um produto adequado para sua obtenção por processos fermentativos.

Em alguns países, entretanto, em virtude das vitaminas terem sido utilizadas, inicialmente, como medicamento para a população, seu principal método de obtenção foi a síntese química. Outros países, preferiram empregar vitaminas para enriquecimento da alimentação animal. Consequentemente, a produção de vitaminas por microrganismos é conveniente, levando-se ainda em consideração, que suas proteínas celulares podem ser utilizadas diretamente como forragem (55).

No Brasil não se produz ainda riboflavina. Mas, se por um lado, nosso país possui uma química de síntese incipiente, por outro, apresenta matérias primas para processos fermentativos, como resíduos agrícolas e sub-produtos de indústrias de alimentos, que poderiam ser utilizadas em fermentações mais nobres, como é o caso da produção de riboflavina (8).

## C A P Í T U L O I I

### REVISÃO DA LITERATURA

As primeiras tentativas, para a produção microbiológica da riboflavina, foram feitas com *Saccharomyces cerevisial*, sem o menor êxito. Melhores resultados foram obtidos com *Clostridium acetobutylicum* num meio de cultura constituído, basicamente, de grãos e soro de leite, com rendimentos de 0,05 a 0,1 g/l. O principal problema dessa fermentação anaeróbica era o controle dos níveis de ferro, pois concentrações superiores a 1,0 ppm reduziam de 75% a produção da vitamina B<sub>2</sub> (9; 22).

Posteriormente, procurou-se utilizar leveduras como *Candida guilliermondii* e *Candida flareri*. Estes microrganismos eram menos sensíveis ao ferro (40 - 60 ppm) e chegavam a produzir cerca de 0,6 g/l de riboflavina (22; 48).

Foi, no entanto, com dois fungos leveduriformes, os ascomi cetos *Eremothecium ashbyii* Guilliermond, e *Ashbya gossypii* (Ashby e Nowell) Guilliermond, que se tem obtido produções de riboflavina superiores a 5,0 g/l, em fermentações aeróbicas, nas quais o teor de ferro não seria crítico (9; 22).

#### 2.1. - Produção de riboflavina com E. ashbyii

A produção de riboflavina com *E. ashbyii* tem sido conseguida com a utilização de carboidratos (glucose, sacarose, frutose, maltose, manose) ou lipídeos como fontes de carbono. Para OSMAN e SOLIMAN (43) certos carboidratos (galactose, celobiose, amido, celulose) seriam muito menos efetivos do que a glucose. GOODWIN (18), entretanto, acredita que misturas de carboidratos seriam mais riboflavinogênicas.

Com relação as fontes de nitrogênio, DEMAÏN (9) cita vários amino-ácidos (asparagina, serina, histidina, glutamato, aspartato,



treonina, tirosina, cistina, leucina, arginina), que tem sido comu-  
mente empregados na formulação de meios quimicamente definidos, des-  
tinados ao crescimento e/ou produção de riboflavina.

Embora, nem todos os estudos sobre as exigências nutricional-  
es do *E. ashbyii* estejam em acordo (24), três vitaminas (biotina,  
inositol e tiamina) parecem ser fundamentais para seu crescimento e  
produção de riboflavina.

Vários meios de cultura, quimicamente definidos, foram pro-  
postos por YAW (64); MACLAREN (33) e HICKEY (24), de modo a produzi-  
rem 0,2 g/l de riboflavina, sem, todavia, alcançarem os rendimentos  
dos meios de cultura complexos (20).

PIERSMA (47) apresentou um meio de cultura líquido compos-  
to, basicamente, de carboidratos (1%), extrato de malte (1,5 a 2%)  
e proteínas de origem animal (2 a 4%). O pH inicial variava de 5,5  
a 6,5 e a incubação era a 27°C, com aeração. Nestas condições o  
rendimento em riboflavina era da ordem de 0,5 g/l.

STILES (59) empregou um processo, para obtenção de ribofla-  
vina por fermentação submersa com *E. ashbyii*, no qual utilizava vi-  
nhaças de várias procedências e/ou levedura seca, leite desnatado,  
ervilhas, farinha de peixe, farinha de soja etc. O volume de inócu-  
lo era da ordem de 1% (v/v), com um tempo de fermentação de cerca  
de 90 horas a 29°C. O maior rendimento obtido foi de 0,436 g/l com  
vinhaça de cereais.

HICKEY (24) propôs um meio de cultura complexo constituído  
de glucose e maltose, mais certas proteínas (caseína) e oleato de  
sódio (0,06%). Após 5 dias de fermentação o rendimento alcançado  
foi de aproximadamente 1,4 g/l de riboflavina.

MOSS e KLEIN (41) encontraram que bons rendimentos de ribo-  
flavina poderiam ser produzidos, por fermentação submersa com *E.*  
*ashbyii*, em meios de cultura contendo misturas de carboidratos (1 a  
5%), lentilha (2 a 4%), sais de amônio (0,5%) e cloreto de sódio  
(0,5%). O pH da fermentação era controlado entre 6,8 e 7,5, a tempe-  
ratura regulada para 28°C e o inóculo era de cerca de 10% por volu-  
me.

A duração da fermentação situava-se entre 5 e 8 dias. Nestas condições, o rendimento em riboflavina poderia chegar a 2,48 g/l.

GADEN Jr., *et al.* (14) propuseram um método para obtenção de riboflavina a partir do melaço cítrico, usando o *E. ashbyii* NRRL 1363. Os autores recomendaram a utilização de melaço cítrico clarificado (6% em açúcares redutores) suplementado pela adição de extrato de levedura comercial (0,3%) para produção de riboflavina na concentração de 0,72 g/l em frascos agitados. O meio de cultura foi inoculado com 4% por volume de uma pré-fermentação de 24 horas. O pH inicial era ajustado entre 6,5 e 8,0. A fermentação durava de 7 a 9 dias e a temperatura de incubação era 28 - 29°C. O método era recomendado para o enriquecimento do melaço cítrico para alimentação animal.

A importância dos lipídeos na produção de riboflavina por fermentação não tem sido sempre reconhecida (24). No entanto, a utilização dos lipídeos, como fonte de energia, pode ser considerada como o fator econômico mais importante nesta fermentação (22).

PHELPS (46) descreveu o efeito dos glicerídeos em meios proteicos com extrato de malte (1,75%) e glucose (0,5%). Mostrou, também, que concentrações de glicerídeos superiores a 0,6% produziam um efeito estimulativo na produção de riboflavina pelo *E. ashbyii*, chegando a converter rendimentos de 0,5 g/l em 1,0 g/l. Entretanto, ao que parece, apenas recentemente, esse importante aspecto da fermentação voltou a ser devidamente estudado por KOJIMA *et al.* (26), com o *E. ashbyii*, pela adição de óleos vegetais, num meio constituido de glucose, peptona e extrato de levedura.

Talvez, algumas das aparentes contradições encontradas, por diferentes pesquisadores, possam estar relacionadas com o emprego de linhagens diferentes ou modificadas do *E. ashbyii*, que poderiam ter diferentes exigências nutricionais (24).

## 2.2. - Produção de riboflavina com *A. gossypii*

WICKERHAM *et al.* (66) foram os primeiros a relatar que o *A. gossypii* NRRL 1056 poderia produzir uma significativa quantidade de riboflavina (0,381 g/l), num meio de cultura composto de

glucose, peptona e extrato de levedura, suplementado ou não por extrato de malte. O microrganismo e a fermentação tem características muito similares àquelas do *E. ashbyii* (49; 50; 51). A glucose, sacarose, maltose e os lipídeos tem sido considerados boas fontes de carbono (20; 39). Além disso, tem sido comum o emprego de soro de macerado de milho, vinhaça e seus sólidos solúveis, resíduos proteicos animais, como fonte de nitrogênio (22; 62).

TANNER Jr., *et al.* (62) mostraram, entretanto, que o amido e pentoses (xilose, arabinose) não são metabolizáveis pelo *A. gossy*pii. Encontraram, também, que a sacarose e a maltose só poderiam substituir a glucose, como fonte de carbono, se estiverem sob formas relativamente puras. Por isso, as tentativas no sentido da utilização de melaços, de várias origens, nesta fermentação não tiveram êxito (14). Os mesmos autores propuseram meios de cultura baseados em glucose, soro de macerado de milho e resíduos das indústrias frigoríficas de carnes. O pH inicial era controlado entre 6,0 e 7,0, os frascos agitados foram incubados a  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e o inóculo de 1% por volume, era proveniente de uma pré-fermentação de 24 horas de idade.

PFEIFER *et al.* (45) estudaram a fermentação em escala piloto, utilizando os meios de cultura de TANNER (62). Os experimentos foram conduzidos com níveis de aeração variando entre 0,125 e 1,0 vvm e agitação entre 100 e 250 rpm, para produzir rendimentos de 0,5 a 0,848 g/l. O caldo foi evaporado e secado, resultando num concentrado contendo 2,5% de riboflavina.

MALZAHN *et al.* (34) apresentaram um processo de obtenção de riboflavina, por fermentação com *A. gossypii*, cujo meio de cultura tinha como componentes críticos, lipídeos e proteínas do colágeno, suplementados com fatores acessórios do soro de macerado de milho, dos sólidos solúveis de vinhaça e do extrato de levedura. Rendimentos da ordem de 5,0 g/l foram obtidos em tais meios. No processo descrito por esses investigadores a quantidade de ar utilizada foi de 1/3 vvm e a potência consumida era aproximadamente 1 HP/m<sup>3</sup> de meio de cultura.

DEMAIN (9), muito recentemente, mostrou um marcante desenvolvimento dos meios quimicamente definidos (sintéticos) para fermentação com *A. gossypii*, com rendimentos que alcançavam 1,0 g/l. Na formulação desses meios, os principais componentes eram a glicose, biotina, tiamina, inositol, asparagina, glicina, tirosina, hipoxantina, Tween 80 e sais minerais ( $MgSO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $FeSO_4$ ).

### 2.3. - Processo de fermentação

Foi devido a WICKERHAM *et al.* (66), que se difundiu a utilização de um meio de cultura constituído por glucose, peptona, extrato de levedura e extrato de malte, agarizado ou não, para o estudo de fungos riboflavinogênicos. De acordo com TANNER Jr., *et al.* (62), o extrato de malte teria a finalidade de estimular a velocidade de formação da riboflavina no meio glucose-peptona-extrato de levedura-extrato de malte solidificado com agar. O benefício, porém, não ficou evidenciado no meio glucose-peptona-extrato de levedura-extrato de malte, líquido (sem adição de agar). Este meio, com ou sem a inclusão do extrato de malte (meio glucose-peptona-extrato de levedura), parece conter todas as exigências necessárias para o crescimento e riboflavinogênese dos fungos *A. gossypii* e *E. ashbyii* (51). O meio glucose-peptona-extrato de levedura-extrato de malte (e/ou glucose-peptona-extrato de levedura) têm sido empregados por um grande número de investigadores como PRIDHAM e RAPER (49); MICKELSON (39); PFEIFER *et al.* (45); MACLAREN (33); GADEN Jr., *et al.* (14); KAPRÁLEK (25); MALZAHN *et al.* (34); KOJIMA *et al.* (26), para seleção, cultivo e conservação, bem como, para estudos morfológicos, biofísico-químicos e fisiológicos de várias linhagens dos fungos *Eremothecium ashbyii* e *Ashbya gossypii*.

Numerosos estudos foram feitos com relação a biogênese da riboflavina em microrganismos, principalmente, pelo grupo do Dr. GODWIN (16; 17; 18; 19; 20). Entretanto, os mecanismos de controle da superprodução deste metabólito não são, ainda, bem conhecidos (9; 10).

#### 2.4. - Recuperação da riboflavina dos caldos de fermentação

Vários métodos têm sido aplicados para recuperação da riboflavina, particularmente, quando os caldos de cultura possuem mais de 1,0 g/l de vitamina B<sub>2</sub> (24).

Após o término da fermentação, o caldo pode ser evaporado até uma concentração de 30% de sólidos e secado, em secadores de tambor, para se obter um produto destinado a alimentação animal (22). Pode-se, também, obter um produto cristalino para consumo humano. Para tal, segundo HANSON (22), deve-se ajustar o pH do caldo até 4,5 e, em seguida, aquecê-lo durante 1 hora a 121°C, para solubilizar completamente a riboflavina. O material insolúvel é removido por filtração. O filtrado é tratado por agentes redutores para precipitação da riboflavina. O precipitado de riboflavina pode ser dissolvido em água, solventes polares ou soluções alcalinas. A reoxidação é feita por aeração e a recuperação é processada por cristalização.

# C A P Í T U L O   I I I

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. - Microorganismos

As seguintes cinco linhagens, de fungos ascomicetos, foram experimentadas para verificação de sua capacidade de produzir riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>):

- a) *Eremothecium ashbyii* CBS 741.70
- b) *Ashbya gossypii* CBS 117.28
- c) *Eremothecium ashbyii* IZ 1389
- d) *Ashbya gossypii* IOC 2388
- e) *Ashbya gossypii* IM 2102

Os fungos *E. ashbyii* CBS 741.70 e *A. gossypii* CBS 117.28 foram adquiridos do "Centraalbureau voor Schimmelcultures" (Baarn, Holanda), enquanto que, o *E. ashbyii* IZ 1389 foi fornecido pelo Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo em Piracicaba.

Do Instituto Oswaldo Cruz (Ministério da Saúde, Rio de Janeiro) obteve-se o *A. gossypii* IOC 2388 e do Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (Recife) recebeu-se o *A. gossypii* IM 2102.

Todas essas culturas puras foram recebidas em tubos de ágar inclinados. A partir destas, foram inoculados tubos estoque com ágar-glucose-peptona-extrato de levedura-extrato de malte, incubados a  $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 48 - 72 horas. As culturas, após mostrarem um crescimento satisfatório foram conservadas em refrigerador ( $3 - 5^{\circ}\text{C}$ ) por um período não superior a 8 semanas. Efetuaram-se, posteriormente, repasses periódicos (27; 34). Foram feitos repiques das culturas estoque (padrão) para tubos com o mesmo meio, mantidas continuamente a  $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por uma semana. Destes tubos, repiques sucessivos de

7 em 7 dias foram efetuados, a fim de manter ativos os fungos (14; 33). A partir destes últimos, retirou-se o material de semeadura para as experiências.

Alguns autores, (9; 20) mencionam a possibilidade de certas linhagens do fungo *E. ashbyii* perderem a capacidade de superprodução de riboflavina. Tomando-se os cuidados usuais (22; 24) não foi notada nenhuma evidência de qualquer variação durante o período de realização dos experimentos.

Como os fungos *E. ashbyii* e *A. gossypii* são considerados fitopatogênicos (infectam flores do algodoeiro), todas as culturas e demais resíduos foram esterilizados antes de serem eliminados (43).

### 3.2. - Meios de cultura

Para manutenção das linhagens utilizou-se o meio ágar-glucose-peptona-extrato de levedura-extrato de malte cuja composição é a seguinte (66):

| <u>composição</u>                     | <u>g/l</u> |
|---------------------------------------|------------|
| glucose mono-hidratada (cerelose)     | 10         |
| peptona                               | 5          |
| extrato de levedura                   | 3          |
| extrato de malte                      | 3          |
| ágar                                  | 20         |
| água destilada para completar 1 litro |            |
| pH : 6,5 (antes da esterilização)     |            |

Os tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo cada um 12 ml de meio, foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Antes de sua utilização, foram aquecidos em banho-maria até fusão do ágar e inclinados. Em cada repicagem, pelo menos um tubo era tomado para controle de eventuais contaminações.

Para estudar variáveis físico-químicas da fermentação, empregou-se o meio líquido glucose-peptona-extrato de levedura, com a seguinte composição (25; 33; 39; 62; 66):

| <u>composição</u>   | <u>g/l</u> |
|---------------------|------------|
| glucose             | 15         |
| peptona             | 5          |
| extrato de levedura | 3          |

água destilada para completar 1 litro

pH : 6,5 (antes da esterilização)

pré-fermentação: 24 h e agitação: 300 rpm

Os frascos erlenmeyers de 500 ml, cada um contendo 50 ml de meio (13), foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, havia uma pequena diminuição do pH em 0,1 - 0,2 unidades. O material de vidro utilizado para transferências e outras operações, foi esterilizado durante 2 horas a 160°C (calor seco).

Com a finalidade de encontrar o meio natural mais adequado para obter alto rendimento de riboflavina, usaram-se 47 meios de cultura, em experimentos com frascos agitados, baseados em melaço de cana, soro de macerado de milho, vinhaça de milho, óleos de milho, soja, amendoim e algodão. (ver no Capítulo VI os quadros 7, 8, 9 e 10 que mostram as formulações destes meios).

O melaço de cana é o mel final que não possui sacarose economicamente recuperável (32). O melaço utilizado foi preparado pela mistura de amostras, retiradas ao longo da época de colheita de cana de açúcar. Foi armazenado em refrigerador. A principal análise do melaço, tendo em vista a sua utilização como fonte energética, apresentou o seguinte resultado:

açúcares totais (expressos em glucose) : 58,33%

Na grande maioria dos ensaios, o melaço utilizado foi clarificado. Esta clarificação foi obtida de acordo com técnicas similares às de BORZANI e col. (5) (ver apêndice D).

O soro de macerado de milho resulta da água na qual o cereal é macerado durante sua industrialização. De sua análise obteve-se a seguinte composição média:



sólidos totais : 49,6% (105 - 110°C)  
nitrogênio total : 3,75% (base úmida)

O soro de macerado de milho utilizado, foi preparado pela mistura de diversas amostras de vários lotes de "milhocina" e estocado em refrigerador. Este soro, antes de ser empregado na formulação de meios de cultura, sofria uma clarificação parcial (2; 8), pois de acordo com ALI e AL - KHALIDI (2) a clarificação é muito importante para a obtenção de resultados reprodutíveis. (ver apêndice E).

A vinhaça (restilo) de milho é um resíduo da destilação de móstos da fermentação alcoólica do cereal. Esse resíduo é filtrado ou centrifugado, sendo a parte solúvel utilizada nos experimentos. Os sólidos solúveis da vinhaça de milho usada, correspondiam a 4,67% (base úmida).

Foram utilizados os seguintes óleos vegetais: milho, soja, amendoim e de algodão. Na grande maioria das experiências os óleos vegetais utilizados já eram refinados (ver apêndice F).

O meio de cultura 22 foi usado para ensaios no fermentador (escala laboratório):

| <u>composição</u>                    | <u>g/l</u> |
|--------------------------------------|------------|
| açúcares totais (A.T.) do melaço     | 25         |
| soro de macerado de milho (S.M.M.)   | 28         |
| óleo de milho (O.M.)                 | 12         |
| água corrente para completar 1 litro |            |
| volume do meio de cultura : 500 ml   |            |
| pH : 6,5 (antes da esterilização)    |            |
| pré-fermentação : 24 h               |            |
| esterilização : 30 minutos a 121°C   |            |

Em decorrência das dificuldades geralmente encontradas, quando se trabalha com microrganismos em meios naturais, procurou-se adotar um grande rigor no preparo dos materiais de ensaio.

### 3.3. - Processo fermentativo

#### 3.3.1. - Inóculo

As condições de preparação do inóculo para fermentação com *A. gossypii*, foram estudadas por vários autores (49; 50; 51; 62). De acordo com esses autores, foram escolhidas as seguintes condições:

volume : 1% (v/v)  
idade : 24 h  
tipo : vegetativo

Para fermentação com *E. ashbyii*, as seguintes condições foram empregadas (14; 15; 56)

volume : 5% (v/v)  
idade : 24 h  
tipo : vegetativo

Quando se tratava de meios de cultura naturais (complexos), a pré-fermentação era feita em duas etapas. Na primeira a semeadura era feita das culturas inclinadas para o meio glucose-peptona-extrato de levedura. Depois de 24 horas (28°C, 300 rpm), seguia-se a segunda etapa, com a transferência de um inóculo (5% v/v) do meio glucose-peptona-extrato de levedura, para pelo menos três frascos (500 ml com 50 ml de meio) contendo o meio natural que se iria ensaiar. Essa nova pré-fermentação, tinha uma duração de 24 horas (28°C, 300 rpm). Depois disso, os frascos eram cuidadosamente examinados, e aqueles que apresentassem uma suspensão uniforme das formas vegetativas, eram selecionados para fornecer o inóculo para o processo fermentativo (fermentação submersa).

#### 3.3.2. - Temperatura

Existem poucas discordâncias quanto a temperatura a ser utilizada, desde que os autores consultados situam o nível de temperatura entre 26 e 30°C, com maior incidência em 28°C (9; 14; 25; 39; 51; 56; 62). Nos testes efetuados a temperatura foi fixada em 28°C.

### 3.3.3. - pH

O pH ótimo inicial de quase todas as fermentações, para produção de riboflavina com fungos riboflavinogênicos, situa-se entre 6,0 e 7,0 (14; 22; 25; 27; 62). O pH inicial foi fixado em 6,5, nas experiências com frascos agitados e com o fermentador.

### 3.4. - Equipamentos para o desenvolvimento da fermentação em frascos.

Para os ensaios em frascos agitados, utilizou-se um incubador-agitador rotativo com as seguintes características:

Procedência: New Brunswick Scientific Co., Inc.

Denominação: Psycrotherm

Modelo : G-27

Velocidade : 40 a 400 rpm ( $\pm$  5)

Passo : 2,54 cm

Temperatura: 0 a 60°C ( $\pm$  0,5)

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyers de 500 ml (valor nominal), com os meios de cultura perfazendo 10% deste volume e a um nível de agitação de 300 rpm (13; 25; 39; 60; 62). Para manutenção de condições assépticas, foram utilizados tampões de algodão recobertos com gaze. As perdas por evaporação foram corrigidas por adição gradual de água esterilizada.

### 3.5. - Equipamentos para fermentação em escala laboratorial.

Empregou-se um fermentador com as seguintes características:

Procedência : Fermentation Design, Inc.

Denominação : Mini-Ferm

Modelo : M-1000

Vaso de fermentação: Copo de vidro "pyrex" de 1000 ml, com um volume útil de 800 ml.

Agitação : agitador magnético, recoberto de "teflon" com uma velocidade variável de 330 a 690 rpm, calibrada por estroboscópio.

Aeração : O ar é admitido no recipiente sobre o agitador magnético. A medida de sua vasão é feita em rotâmetro com a escala 0 - 1,5 litros por minuto, calibrado para 1 atm. e 21,1°C.

Filtro de ar : O meio filtrante é de lã de vidro, capaz de reter contaminantes, do ar não estéril, de até 0,5 microns.

Temperatura : A temperatura é mantida com precisão ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) por resistência elétrica e/ou por circulação de água refrigerada ou não.

A velocidade operacional de agitação do fermentador foi de 500 rpm. As determinações da concentração de oxigênio dissolvido durante o transcurso das experiências, foram efetuadas com eletrodos de oxigênio (modelo E-100) e um medidor-registrador (modelo DOAR) com escala de 0 - 100%.

### 3.6. - Reagentes e equipamentos complementares

Os reagentes e preparados químicos, bioquímicos e microbiológicos utilizados, eram das marcas Merck, Baker, Carlo Erba, Difco. Além dos materiais comumente usados em laboratório, tais como, tubos, beakers, erlenmeyers, pipetas, buretas, provetas, funis, etc., foram empregados os seguintes equipamentos:

- a) Fotofluorímetro Coleman, modelo 12C, com lâmpada de va-por de mercúrio, filtros B-2 e PC-2, cubetas nº 12-190 , operando com transformador Sta-Bal;

- b) Espectrofotômetro Coleman, modelo 295E, com cubetas nº 6 -326;
- c) Balança analítica Mettler H20T ( máx. 160 g, div. 0,01 mg),
- d) Balanças de precisão Mettler:
  - P160N (máx. 160 g, div. 1 mg), com lâmpada infravermelha para secagem, modelo LP11.
  - P1000 (máx. 1000 g, div. 1g);
- e) Autoclaves e esterilizadores:
  - Esterilizador Fabbe, modelo 104, nº 1773 (máx. 3 kg/cm<sup>2</sup>).
  - Autoclave Steroclave, nº 25X (máx. 30 psig);
- f) Potenciômetro, pH-meter H-5, Horiba, com ajuste automático da temperatura e precisão de  $\pm 0,05$  unidades de pH;
- g) Microscópio Carl Zeiss (aumento 40 x 12,5 = 500 vezes);
- h) Centrífuga Excelsa 3 da Fanem (0 - 5000 rpm);
- i) Estufas:
  - Fanem, modelo 306/2, nº 58669 (máx. 180°C)
  - Fabbe, modelo 119 (máx. 300°C);
- j) Bomba de vácuo Welch da Sargent Scientific Co., modelo 1399, série 8334 (min. 1,0 mm Hg);
- l) Banho-maria da Fanem, modelo 120/2, nº 61098;
- m) Destilador de água da Consolidated Stills and Sterilizers (fluxo: 1 galão por hora);
- n) Refrigerador Friolândia e Congelador Metalfrio;
- o) Viscosímetro Epprecht - Rheomat 15, da Contraves A.G., com banho termostático e estabilizador de tensão Kron.

### 3.7. - Técnicas de análise

O peso seco do micélio foi estimado por filtração (papel Whatman nº 52) do caldo de cultura, posterior lavagem com água (200 ml) e secagem a  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 3 horas (25; 27). O cálculo do peso seco do micélio pode ser feito, desde que se determine previamente, o peso do papel de filtro, cuja perda de umidade seja conhecida.

O pH foi determinado com um potenciômetro Horiba. As determinações foram efetuadas no meio de cultura com o micélio e depois de separado este último por filtração. Não se encontraram diferenças entre os valores obtidos segundo os dois procedimentos.

Os açúcares totais (expressos em glucose), do meio glucose-peptona-extrato de levedura, foram determinados utilizando-se o reagente antrona, segundo uma modificação (23) do método original de MORRIS (40). Esse método já tinha sido empregado com êxito neste laboratório (53). As determinações dos açúcares nos caldos de cultura foram feitas após a separação do micélio por filtração. Os açúcares totais (expressos em glucose) dos meios naturais com melaço de cana, foram estimados pelo processo de LANE - EYNON (7; 31; 37), de acordo com modificação de FALCONE e col. (11). O nitrogênio total foi determinado pelo método de KJELDAHL (37).

A riboflavina (total) foi determinada, de acordo com método da A.O.A.C. (37), por fluorimetria, da seguinte maneira. Amostras do caldo de cultura são hidrolisadas em autoclave (30 minutos,  $120^{\circ}\text{C}$ ) em presença de HCl 0,1N. Posteriormente, ajusta-se o pH a 4,5, dilui-se convenientemente com água destilada e filtra-se. Compara-se então, no fotofluorímetro com uma amostra padrão de riboflavina (Merck). Durante as medidas de fluorescência, deve-se evitar uma excessiva exposição das amostras à luz, principalmente, ultravioleta (ver apêndice A).

A viscosidade foi medida num viscosímetro de cilindros concêntricos, aparelho de Contraves (36). Esse instrumento consiste de um recipiente cilíndrico e um cilindro maciço concêntrico. No espaço entre ambos, o fluido é submetido a uma tensão cisalhante ( $\tau$ )

produzida pela rotação do cilindro maciço. Um indicador fornece as variáveis utilizadas na determinação do diagrama básico de fluxo. As velocidades do cilindro maciço ( $\dot{\gamma}$ ) podem ser expressas em rpm ou  $s^{-1}$ . As leituras podem ser convertidas em tensão de cisalhamento ( $dina/cm^2$ ) ou viscosidade (centipoise). A taxa de cisalhamento de um fluido não-Newtoniano ( $\dot{\gamma}_{ostw.}$ ) pode ser determinada, dividindo-se o valor da taxa de cisalhamento para fluido Newtoniano, por um fator de compensação (C), calculado pela fórmula:

$$C = \frac{n \left[ 1 - \left( \frac{R_i}{R_e} \right)^{2/n} \right]}{1 - \frac{R_i}{R_e}} \quad |3 - 1|$$

Inicia-se a medida com a velocidade mais baixa do cilindro maciço e aumenta-se gradativamente. Posteriormente, efetua-se o procedimento inverso. Quando se trabalha com suspensões, existe a possibilidade de sedimentação e/ou centrifugação das partículas, de modo a tornar menos uniforme a distribuição da tensão de cisalhamento a través do fluido (ver apêndice C).

As observações microscópicas das culturas, foram empregadas principalmente, para a verificação das mudanças na morfologia do micélio, durante o transcurso da fermentação, bem como, para o controle de eventuais contaminações.

## C A P Í T U L O   I V

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. - Comparação do potencial riboflavinogênico de linhagens de *E. ashbyii* e de *A. gossypii*

Observou-se que os fungos *E. ashbyii* CBS-741.70, *E. ashbyii* IZ-1389 e *A. gossypii* IOC-2388 apresentavam colônias amarelo-brilhantes, depois da incubação no meio de ágar-glucose-peptona-extrato de levedura-extrato de malte, enquanto que nos fungos *A. gossypii* IM-2102 e *A. gossypii* CBS-117.28, notavam-se colônias amarelo-pálidas.

O potencial riboflavinogênico deve ser entendido como a capacidade de produção de riboflavina (peso/volume de meio de cultura) para determinadas condições de cultura. A medida da capacidade de produção de riboflavina foi efetuada, utilizando-se o meio glucose-peptona-extrato de levedura em frascos agitados. Os resultados sobre a produção de riboflavina durante 168 h (7 dias) foram obtidos, preparando-se uma série de frascos idênticos, e tomando-se três frascos a cada dia, de cada fungo, para análises.

Os resultados obtidos estão indicados no quadro 1 e na figura 1. Como se considera que o meio glucose-peptona-extrato de levedura contem todas as exigências necessárias para crescimento e riboflavinogênese satisfatórios, os resultados indicam que o fungo *E. ashbyii* IZ-1389, deve possuir maior capacidade de produção de riboflavina, do que os outros fungos experimentados. Pode-se também tomar 120 horas (5 dias), como um período adequado para a fermentação, nas condições experimentais ensaiadas.

#### 4.2. - Cinética da produção de riboflavina no meio de cultura glucose-peptona-extrato de levedura

Uma vez escolhido o *E. ashbyii* IZ-1389, passou-se a estudar variáveis físico-químicas da fermentação, no meio glucose-



peptona-extrato de levedura. O período de fermentação estendeu-se por 120 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores médios obtidos estão representados no quadro 2 e nas figuras 2 e 3. Os resultados do desenvolvimento da fermentação para produção de riboflavina parecem mostrar duas fases distintas. Na primeira, a glucose (açúcares totais) é consumida e o caldo torna-se mais ácido (pH mínimo = 5,1). Esta variação ocorre até as 20 - 30 primeiras horas. Enquanto o consumo de glucose vai se completando, há um aumento gradual do pH (segunda fase) e o caldo torna-se alcalino (pH = 7,7; 120 h), com um pH maior do que o inicial (pH = 6,5; 0 h). É provável que a desaminação da peptona contribua para o aumento do pH (9). Apenas uma pequena quantidade de riboflavina aparece na cultura antes da glucose estar metabolizada. A maior parte da vitamina B<sub>2</sub> forma-se na segunda fase, e atinge 0,207 gramas por litro de meio de cultura depois de 120 horas de fermentação.

O micélio desenvolveu-se de preferência em filamentos. O crescimento celular máximo encontrado foi de 6,94 g/l, depois de 58 horas de fermentação, aparentemente, coincidindo com o consumo completo de glucose.

Os resultados da variação do pH e consumo de glucose podem ser comparáveis aos de MICKELSON (39) com *A. gossypii* e de KAPRÁLEK (25) com linhagem não riboflavinogênica de *E. ashbyii*.

O fungo *E. ashbyii* IZ-1389 foi controlado, durante a execução dos trabalhos experimentais, em relação a sua capacidade de produção de riboflavina. Em 16 ensaios de controle para um período de fermentação de 48 horas, obtiveram-se os seguintes resultados (58):

produção média de riboflavina = 43,5 mg/l

desvio padrão =  $\pm$  2,44 mg/l

peso seco médio do micélio = 6,69 g/l

desvio padrão =  $\pm$  0,58 g/l

Pode-se portanto admitir, que praticamente não houve evidência de uma variação substancial, na capacidade riboflavinogênica do *E. ashbyii* IZ-1389.

#### 4.3. - Modelo cinético de Kono aplicado à produção de riboflavina por fermentação.

KONO e ASAI (30) estabeleceram modelos cinéticos para o crescimento celular e formação de produtos em fermentações (ver apêndice B).

Para o desenvolvimento do modelo matemático, em relação ao curso da fermentação descrito em 4.2., foram formuladas as seguintes hipóteses:

- h.1) O crescimento celular é fundamentado na fase de crescimento exponencial e na fase de declínio (da velocidade de crescimento);
- h.2) A produção de riboflavina está associada ao não crescimento celular.

A partir dos resultados da figura 2 pode-se construir as figuras 4 e 5, para a obtenção dos parâmetros característicos do modelo, utilizando-se um processo gráfico-analítico sugerido por KONO e ASAI (30). Na figura 4 a inclinação das linhas  $\overline{OP}$ ,  $\overline{OQ}$  e  $\overline{OR}$  representam os valores de  $\mu$ ,  $\rho_1$  e  $\rho_2$  respectivamente. O valor  $X_c$  (concentração crítica) indica a concentração celular limite, entre as fases exponencial e de declínio.  $X_M$  representa a concentração celular máxima teórica nas condições de cultivo. A figura 5 mostra a fase adicional de produção (depois de  $P'_c$ ), onde  $\rho'$  (inclinação de  $\overline{ST}$ ) é a velocidade específica de produção nesta fase.  $P_M$  é a concentração máxima de riboflavina prevista teoricamente. Os valores característicos do modelo cinético são representados no quadro 3. A partir desses valores, a concentração celular e a concentração de riboflavina, podem ser calculadas como segue (ver apêndice B):

a) Fase de crescimento exponencial:  $4 \text{ h} \leq t \leq 20,5 \text{ h}$

Da equação [B - 7],

$$X = 3,02 \exp [0,126 (t - 20,5)] \quad [4 - 1]$$

Da equação [B - 11],

$$P = 2 \quad [4 - 2]$$

b) Fase de declínio:  $t \geq 20,5$  h

Da equação |B - 8|,

$$X = 7,12 - 4,10 \exp [- 0,093 (t - 20,5)] \quad |4 - 3|$$

Da equação |B - 12|,

$$P = - 26,39 + 28,39 \exp [- 0,093 (t - 20,5)] + \\ + 2,64 (t - 20,5) \quad |4 - 4|$$

c) Fase adicional:  $73 \text{ h} \leq t \leq 120 \text{ h}$

Da equação |B - 13|,

$$P = 211,80 - 92,50 \exp [- 0,063 (t - 73)] \quad |4 - 5|$$

Os valores calculados apresentam ampla concordância com os valores experimentais observados, como se pode ver no quadro 4 e na figura 6.

Pode-se utilizar a equação |4 - 3|, para estimar-se valores da concentração celular no período final da fase de declínio (até 71,5 h), com a restrição de que os resultados experimentais, parecem indicar uma lenta diminuição celular, enquanto que os valores calculados pela equação |4 - 3|, tendem a um lento crescimento celular com o tempo. A velocidade máxima de produção de riboflavina

$\left[ \frac{dP}{dt} \right]_{\text{máx.}} = 5,83 \text{ mg/l/h}$  ocorre depois de 73 horas ( $t'_c$ ) de fermentação. Embora esteja próxima, não coincide com a parte final da fase de declínio (da velocidade de crescimento celular). A velocidade máxima de crescimento celular ocorre após 20,5 horas ( $t_c$ ) de fermentação. Ela tem o valor de  $\left[ \frac{dX}{dt} \right]_{\text{máx.}} = 0,38 \text{ g/l/h}$ , enquanto que a máxima velocidade específica de produção de riboflavina (produtividade), foi calculada como  $\rho_{\text{máx.}} = 0,874 \text{ mg de riboflavina por g de micélio seco por hora}$ . Os valores de  $X_M$  e  $P_M$  calculados são comparáveis aos seus respectivos valores experimentais. O tempo de duplicação ( $t_d$ ) calculado foi de 5,5 horas.

Os modelos cinéticos servem para uma melhor interpretação de resultados experimentais, bem como, para permitir eventuais comparações e generalizações.

#### 4.4. - Características reológicas da fermentação

As características reológicas do caldo de *E. Ashbyii* IZ-1389 foram medidas pelo método descrito em 3.7 e estão indicadas nos quadros 5-A, 5-B, 5-C e 5-D. A viscosidade de cada amostra foi medida a 28°C, três vezes dentro de 1 minuto da amostragem, com várias velocidades de rotação do viscosímetro. Embora esse procedimento não represente necessariamente o comportamento absoluto de escoamento do caldo, uma mudança relativa na viscosidade aparente ( $\eta_a$ ) pode ser detectada. Seguiu-se o desenvolvimento da fermentação descrito em 4.2.

Para estudar-se o comportamento reológico do caldo, foi escolhido o modelo de Ostwald - de Waele (ver apêndice C):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad |4 - 6|$$

Os diagramas de fluxo (reogramas) do caldo fermentativo micelial podem ser vistos nas figuras 7 e 8, onde se determinou os valores de  $n$  (índice de comportamento) e  $K$  (índice de consistência), respectivamente, para vários tempos característicos da fermentação. As variações dos parâmetros reológicos ( $n$  e  $K$ ) durante a fermentação foram as seguintes:

- a) Tempo de fermentação = 16,5 h (durante a fase exponencial):

$$\tau = 185 \dot{\gamma}^{0,477} \quad |4 - 7|$$

$$\eta_a = 185 \dot{\gamma}^{-0,523} \quad |4 - 8|$$

- b) Tempo de fermentação = 58 h (durante a fase de declínio):

$$\tau = 530 \dot{\gamma}^{0,428} \quad |4 - 9|$$

$$\eta_a = 530 \dot{\gamma}^{-0,572} \quad |4 - 10|$$

c) Tempo de fermentação = 80 h ( no início da fase adicio  
nal):

$$\tau = 365 \dot{\gamma}^{0,455} \quad |4 - 11|$$

$$\eta_a = 365 \dot{\gamma}^{-0,545} \quad |4 - 12|$$

d) Tempo de fermentação = 110 h (no final da fase adicio  
nal):

$$\tau = 244 \dot{\gamma}^{0,490} \quad |4 - 13|$$

$$\eta_a = 244 \dot{\gamma}^{-0,510} \quad |4 - 14|$$

Examinando-se o quadro 6, observa-se que o caldo apresentou um comportamento pseudoplástico, e portanto, não-Newtoniano, duran  
te a fermentação.

São relativamente poucos os estudos reológicos de caldos de fermentação (1; 3). Entretanto alguns estudos efetuados, mostraram que o índice de comportamento (n) varia de 0,3 a 0,9 e o índice de consistência (k) varia de 200 a 3500 pseudocentipoise (61). Os resultados experimentais obtidos neste trabalho também se enquadram nas faixas mencionadas. Notou-se ainda que o índice de consistência (k), parece mostrar uma tendência proporcional ao crescimento celu  
lar, enquanto que o índice de comportamento (n), apresenta uma tên  
dência inversa.

Quando um caldo exibe características não-Newtonianas, os fenômenos de transferência de calor e massa dependem em grande par  
te das características reológicas do fluido fermentativo (63). Portanto, pode ser possível melhorar o desempenho de uma fermentação controlando sua viscosidade (57).

#### 4.5. - Efeito da fonte de carbono na composição de meio de cultura para produção de riboflavina em frascos agitados.

O principal objetivo das próximas experiências rela  
tadas, era a formulação de um meio de cultura natural para a fermen

tação com *E. ashbyii* IZ-1389, que alcançasse rendimento satisfatório de riboflavina.

Com fonte de carbono, foi escolhido o melaço de cana, que foi diluído e clarificado convenientemente, de modo que seus açúcares totais, expressos em glucose, representassem de 10 a 40 g/l. O melaço entretanto, nem sempre pode ser considerado como fonte satisfatória de nitrogênio para fermentação (42; 52). Por isso, utilizou-se uma correção com adição de soro de macerado de milho. Na falta de melhores informações, fixou-se em 20 g/l a concentração de soro de macerado de milho, na série inicial de experimentos, que foi o nível mais satisfatório encontrado por ALI e AL-KHALIDI (2) para um meio de glucose - soro de macerado de milho com *E. ashbyii* ATCC 6747.

O quadro 7 e a figura 9 apresentam os resultados obtidos e as principais condições de cultura. Os melhores rendimentos de riboflavina, nas condições ensaiadas, foram obtidos com 25 e 30 g/l de açúcares totais do melaço em 144 horas (6 dias) de fermentação. Aparentemente, a melhor concentração de açúcares totais do melaço para a fermentação é 25 g/l. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes. Quando se usou melaço não clarificado (meio nº 5) houve uma redução 42,32% na produção. Logo, parece ser evidente, que a clarificação é importante para obtenção de melhores produções. O melhor resultado (0,241 g/l) de riboflavina é inteiramente comparável ao obtido no meio glucose-peptona-extrato de levedura.

#### 4.6. - Efeito da fonte nitrogenada na produção de riboflavina.

O soro de macerado de milho tem sido utilizado na formulação de meios de alto rendimento de riboflavina na fermentação com *A. gossypii* (34). Apenas recentemente, alguns pesquisadores têm recomendado o emprego de soro de macerado de milho para fermentações com *E. ashbyii*. O soro tem a vantagem adicional de não aumentar tanto a viscosidade do meio de cultura, como fazem de um modo geral, farinhas, farelos e tortas (56). Os sólidos solúveis de vinhaça tem sido empregados como suplemento nesses tipos de fermentação (20; 22).

Partindo-se do meio nº 4 e fixando-se a concentração dos açúcares totais do melaço, procurou-se encontrar o nível mais satisfatório do soro de macerado de milho. O quadro 8 e a figura 10 indicam os valores experimentais obtidos e as principais condições de cultivo. Os resultados mostraram um aumento gradual da produção de riboflavina com o aumento da concentração inicial de soro de macerado de milho, bem como, o decréscimo da produção quando se usa uma quantidade excessiva do mesmo. As melhores produções de riboflavina nas condições ensaiadas, foram obtidos na faixa de concentração de 24 a 30 g/l de soro de macerado de milho, com um máximo em 28 g/l. O ajuste do nível mais satisfatório do soro de macerado de milho representou um aumento da ordem de 20% sobre a produção de riboflavina (relação entre o meio nº 13 e o nº 4).

No quadro 9 estão representados os resultados do emprego dos sólidos solúveis de vinhaça de milho na formulação básica (meio nº 13) do meio de cultura. A adição de vinhaça de milho não teve praticamente efeito ou produziu um efeito negativo. Esses resultados foram de certo modo inesperados, pois vários autores (20; 22) advogam o emprego dos sólidos solúveis de vinhaça nesta fermentação. Entretanto, isto pode significar, que pelo menos nas condições experimentais desta investigação, a formulação básica do meio de cultura já incluía uma fonte nitrogenada satisfatória.

#### 4.7. - Efeito de óleos vegetais na produção de riboflavina

Os resultados foram apresentados no quadro 10 e na figura 11. Sobre determinações feitas em triplicata, obtiveram-se valores médios da influência da adição inicial dos óleos de milho, soja, amendoim e algodão no meio de cultura. Uma ampla faixa de concentrações foi testada juntamente com a formulação básica. O melhor resultado (meio nº 22) apresentou 0,773 g/l de riboflavina, utilizando-se uma concentração inicial de 12 g/l de óleo de milho. Isto representa um aumento de produção da ordem de duas vezes e meia (250%) em relação a produção do meio base (meio nº 13). Com o óleo de soja conseguiu-se praticamente duplicar a produção, com a adição

inicial de 18 g/l do citado óleo. Pode-se notar que até o nível de 6 g/l o comportamento dos óleos de soja, amendoim e algodão é similar com relação a produção da vitamina B<sub>2</sub>. Altas concentrações iniciais de óleo de algodão (27 g/l) chegam a ser inconvenientes. As experiências com óleos não refinados e com óleo de milho, como única fonte de energia (carbono) para fermentação, não resultaram em produções superiores às aquelas obtidas com o meio nº 22. KOJIMA *et al.* (27), muito recentemente, estudando a influência dos óleos e gorduras na constituição de meios de cultura para fermentação com *E. ashbyii* IFO-6023, formularam a hipótese, de que os glicerídeos dos ácidos graxos insaturados (C<sub>12</sub> - C<sub>18</sub>), principalmente os triglicerídeos, são os principais responsáveis pelo grande aumento na produção de riboflavina. Essa hipótese, poderia explicar em parte, os melhores rendimentos de riboflavina obtidos com o óleo de milho.

#### 4.8. - Cinética da produção de riboflavina no meio de cultura melaço-soro de macerado de milho-óleo de milho.

Escolhido o meio de cultura nº 22, procurou-se estudar variáveis físico-químicas da fermentação em frascos agitados. O período de fermentação estendeu-se por 168 horas (7 dias). As médias dos resultados obtidos e as principais condições da fermentação estão representadas no quadro 11 e na figura 12. Conforme esses resultados, o curso da fermentação pode ser dividido em etapas distintas, de forma semelhante ao observado no desenvolvimento da fermentação no meio glucose-peptona-extrato de levedura. Entretanto, como o tempo de fermentação foi mais prolongado, aparece uma fase de autólise (terceira fase), caracterizada pela aparente ausência de maior biossíntese de vitamina B<sub>2</sub> (25).

O micélio apresentou geralmente, uma forma filamentosa. Por se tratar de um meio de cultura heterogêneo, não se conseguiu resultados reprodutíveis do peso seco do micélio. Um dos únicos métodos disponíveis (6) para determinação da concentração fúngica em meios de cultura heterogêneos, só pode ser aplicado, se o desenvolvimento microbiano for em forma agregada ("peletizada"). No caso de micélio filamentoso haveria ganho ou perda de material celular. Além



desse problema, a fermentação apresenta substratos mistos e duas fa-  
zes líquidas, que dificultam uma melhor interpretação do curso da  
mesma.

A viscosidade deste caldo não pode ser medida pelo método  
descrito em 3.7. As variações dos resultados com o tempo apresenta-  
ram desvios (negativos) de até 80%. A forma micelial e a constitui-  
ção do meio de cultura podem ter sido responsáveis pelo insucesso  
das medidas. BONGENAAR *et al.* (4) em recente publicação, mostraram  
que, quando se trabalha com suspensões (dispersões), como é o caso  
deste caldo, existe a possibilidade da suspensão tornar-se não homo-  
gênea pela decantação (centrifugação) e interação entre as partícu-  
las, o que favoreceria a formação de uma camada menos densa, nas pro-  
ximidades das superfícies dos cilindros. Essa hipótese poderia ex-  
plicar em parte, a dificuldade de obtenção de dados reprodutíveis  
de viscosidade para esse caldo, com o viscosímetro de cilindros con-  
cêntricos (coaxiais).

#### 4.9. - Produção de riboflavina no fermentador

Foram realizadas experiências de fermentação descon-  
tínua no fermentador descrito em 3.5. Procurou-se comparar os resul-  
tados do fermentador com aqueles obtidos em frascos agitados. Além  
disso, estudou-se a variação da concentração de oxigênio durante o  
desenvolvimento da fermentação. Os resultados foram apresentados no  
quadro 12 e nas figuras 13, 14 e 15.

Quando se utilizou um nível de aeração de 1,0 vvm, a concen-  
tração de oxigênio dissolvido caiu para cerca de 18% (mínimo) depois  
de 31 horas de fermentação, correspondendo a uma taxa de demanda  
de oxigênio máxima da cultura. Nessas condições a produção de ribo-  
flavina chegou a 1,087 g/l depois de 6 dias de fermentação, embora  
o resultado de 1,063 g/l em 5 dias já possa ser considerado satisfa-  
tório. Entretanto, utilizando-se um nível de aeração de 0,5 vvm, que  
deve ter provocado uma redução na taxa de transferência de oxigênio  
(54), a concentração de oxigênio dissolvido permanece em 0% por um  
período de 19 horas. Esse período de limitação de oxigênio acarre-  
tou, entre outras coisas, uma diminuição substancial na produção de

riboflavina. Contudo, não era possível testar se a condição de limitação de oxigênio, era o único fator responsável pela redução da produção da vitamina B<sub>2</sub>(21).

O meio de cultura (nº 22) utilizado, não tem propensão para formar espumas nos níveis de aeração ensaiados, provavelmente devido, a ação antiespumante do óleo de milho. Entretanto, na fase final da fermentação, quando o óleo de milho deve estar em grande parte metabolizado, forma-se uma incipiente camada de espuma. Não existiu portanto, a possibilidade extravazamento do caldo pela parte superior do fermentador.

## C A P Í T U L O V

### C O N C L U S Õ E S

1. Das 5 linhagens ensaiadas, o fungo *Eremothecium ashbyii* IZ-1389 foi o responsável pela maior produção de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>).
2. A teoria cinética de Kono foi aplicada ao processo fermentativo. Os valores calculados da concentração celular e da concentração de riboflavina, com base nessa teoria, mostram ampla concordância em relação aos valores experimentais obtidos.
3. As variações reológicas do caldo de fermentação foram seguidas pela utilização do modelo de Ostwald - de Waele (lei da potência). O caldo estudado apresentou um comportamento pseudoplástico.
4. Dos óleos vegetais ensaiados, foi com o óleo de milho, que se obteve o maior aumento na produção de riboflavina.
5. Nas condições ensaiadas, o meio de cultura mais satisfatório para produção de riboflavina em frascos agitados, consistia de açúcares totais de melaço de cana 25 g/l, soro de macerado de milho 28 g/l e óleo de milho 12 g/l. Obteve-se uma produção de riboflavina de 0,752 g/l, depois de 144 horas de fermentação. A adição de sólidos solúveis de vinhaça de milho ao meio de cultura é aparentemente desnecessária, e em alguns casos prejudicial.
6. Trabalhando-se num fermentador, com o meio anteriormente descrito em 5., chegou-se a produzir 1,087 g/l de riboflavina. A taxa ótima de aeração deve estar situada entre 0,5 e 1,0 vvm.

# CAPÍTULO VI

## QUADROS E FIGURAS

### QUADRO 1

Seleção do fungo de maior capacidade de produção de riboflavina

| Fungos                          | <i>E. ashbyii</i><br>IZ-1389   | <i>E. ashbyii</i><br>CBS-741.70 | <i>A. gossypii</i><br>IOC-2388 | <i>A. gossypii</i><br>IM-2102 | <i>A. gossypii</i><br>CBS-117.28 |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Tempo de<br>Fermentação<br>dias | Produção de riboflavina (mg/l) |                                 |                                |                               |                                  |
| 1                               | 4,4                            |                                 |                                |                               |                                  |
| 2                               | 39,3                           | 9,8                             | 4,1                            |                               |                                  |
| 3                               | 112                            | 44,3                            | 12,2                           | 3,5                           | 2,4                              |
| 4                               | 184                            | 83,6                            | 15,6                           | 6,9                           | 4,5                              |
| 5                               | 207                            | 89                              | 27,3                           | 8,4                           | 6,3                              |
| 6                               | 203                            | 87                              | 32,4                           | 9,7                           | 7,0                              |
| 7                               | 194                            | 75,4                            | 32                             | 9,9                           | 8,7                              |

meio de cultura : glucose-peptona-extrato de levedura

## QUADRO 2

Cinética da produção de riboflavina por fermentação num meio de glucose-peptona-extrato de levedura com *E.ashbyii* IZ-1389 em frascos agitados

| Tempo de Fermentação<br>h | Consumo de glucose<br>g/l | Peso seco do micélio<br>g/l | pH  | Produção de riboflavina<br>mg/l |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----|---------------------------------|
| 4                         | 14,53                     | 0,366                       | 6,4 |                                 |
| 8                         | 13,60                     | 0,612                       | 5,9 |                                 |
| 16,5                      | 5,09                      | 1,64                        | 5,4 |                                 |
| 24,5                      | 2,87                      | 4,39                        | 5,1 | 4,6                             |
| 31                        | 1,66                      | 5,25                        | 5,2 | 14,7                            |
| 43,5                      | 0,62                      | 6,47                        | 5,6 | 33,8                            |
| 48                        | 0,21                      | 6,69                        | 5,9 | 43,5                            |
| 58                        |                           | 6,94                        | 6,1 | 70,1                            |
| 71,5                      |                           | 6,67                        | 6,4 | 111,4                           |
| 80                        |                           | 6,41                        | 6,8 | 141                             |
| 94                        |                           | 4,93                        | 7,2 | 181                             |
| 110                       |                           | 3,86                        | 7,5 | 202                             |
| 120                       |                           | 3,25                        | 7,7 | 207                             |

inóculo : 5% (v/v) de 24 - 25 h de idade (vegetativo)

pH inicial : 6,5

meio de cultura: glucose 15 g/l

peptona 5 g/l

extrato de levedura 3 g/l

temperatura : 28°C

agitação : 300 rpm

### QUADRO 3

Valores característicos do modelo cinético de Kono  
para produção de riboflavina por fermentação

|          |                       |
|----------|-----------------------|
| $\mu$    | 0,126 h <sup>-1</sup> |
| $\rho_1$ | 0                     |
| $\rho_2$ | 0,370 h <sup>-1</sup> |
| $\rho'$  | 0,063 h <sup>-1</sup> |
| $X_C$    | 3,02 g/l              |
| $X_M$    | 7,12 g/l              |
| $P_C$    | 2,0 mg/l              |
| $P'_C$   | 119,3 mg/l            |
| $P_M$    | 211,8 mg/l            |
| $t_C$    | 20,5 h                |
| $t'_C$   | 73 h                  |

fungo : *E. ashbyii* IZ-1389

meio de cultura : glucose-peptona-extrato de levedura

temperatura : 28° C

QUADRO 4

Comparação entre os valores previstos pelo modelo cinético  
de Kono e os resultados experimentais obtidos

| Tempo<br>h | X <sub>exper.</sub><br>g/l | X <sub>calc.</sub><br>g/l | X <sub>ca</sub> - X <sub>ex</sub><br>g/l | P <sub>exper.</sub><br>mg/l | P <sub>calc.</sub><br>mg/l | P <sub>ca</sub> - P <sub>ex</sub><br>mg/l |
|------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
| 4          | 0,366                      | 0,378                     | 0,012                                    |                             |                            |                                           |
| 8          | 0,612                      | 0,625                     | 0,013                                    |                             |                            |                                           |
| 16,5       | 1,64                       | 1,82                      | 0,18                                     |                             |                            |                                           |
| 24,5       | 4,39                       | 4,29                      | -0,10                                    | 4,6                         | 3,87                       | -0,73                                     |
| 31         | 5,25                       | 5,57                      | 0,32                                     | 14,7                        | 12,02                      | -2,68                                     |
| 43,5       | 6,47                       | 6,63                      | 0,16                                     | 33,8                        | 37,67                      | 3,87                                      |
| 48         | 6,69                       | 6,80                      | 0,11                                     | 43,5                        | 48,41                      | 5,91                                      |
| 58         | 6,94                       | 6,99                      | 0,05                                     | 70,1                        | 73,47                      | 3,37                                      |
| 71,5       | 6,67                       | 7,08                      | 0,41                                     | 111,4                       | 108,49                     | -2,91                                     |
| 80         |                            |                           |                                          | 141                         | 152,08                     | 11,08                                     |
| 94         |                            |                           |                                          | 181                         | 187,16                     | 6,16                                      |
| 110        |                            |                           |                                          | 202                         | 202,81                     | 0,81                                      |
| 120        |                            |                           |                                          | 207                         | 207,01                     | 0,01                                      |

QUADRO 5 - A

Resultados utilizados na determinação do diagrama de fluxo (reograma) do caldo de fermentação micelial para produção de riboflavina.

| $\dot{\gamma}$<br>rpm | $\dot{\gamma}_{\text{ostw.}}$<br>$s^{-1}$ | $\tau$<br>leitura do<br>viscosímetro | $\tau$<br>dina/cm <sup>2</sup> | $\eta_a$<br>centipoise |
|-----------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 7,513                 | 15,94                                     | 3,6                                  | 7,0632                         | 44,31                  |
| 9,885                 | 20,96                                     | 4,2                                  | 8,2404                         | 39,31                  |
| 13,19                 | 27,98                                     | 4,65                                 | 9,1233                         | 32,61                  |
| 17,40                 | 36,91                                     | 5,4                                  | 10,5948                        | 28,70                  |
| 25,08                 | 53,20                                     | 6,4                                  | 12,5568                        | 23,60                  |
| 33,67                 | 71,42                                     | 7,4                                  | 14,5188                        | 20,33                  |

fungo : *E. Ashbyii* IZ-1399

meio de cultura : glucose-peptona-extrato de levedura

tempo de fermentação : 16,5 h

temperatura : 28°C



QUADRO 5 - B

Resultados utilizados na determinação do diagrama de fluxo (reograma) do caldo de fermentação micelial para produção de riboflavina.

| $\dot{\gamma}$<br>rpm | $\dot{\gamma}_{ostw.}$<br>s <sup>-1</sup> | $\tau$<br>leitura do<br>viscosímetro | $\tau$<br>dina/cm <sup>2</sup> | $\eta_a$<br>centipoise |
|-----------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 5,595                 | 12,01                                     | 6,4                                  | 12,5568                        | 121,1                  |
| 7,513                 | 16,13                                     | 7,3                                  | 14,3226                        | 102,8                  |
| 9,885                 | 21,22                                     | 8,2                                  | 16,0884                        | 87,82                  |
| 13,19                 | 28,32                                     | 9,3                                  | 18,2466                        | 74,60                  |
| 17,40                 | 37,36                                     | 10,1                                 | 19,8162                        | 61,43                  |
| 25,08                 | 53,85                                     | 11,7                                 | 22,9554                        | 49,37                  |
| 33,67                 | 72,30                                     | 12,9                                 | 25,3098                        | 40,55                  |

fungo : *E. ashbyii* IZ-1389

meio de cultura : glucose-peptona-extrato de levedura

tempo de fermentação : 58 h

temperatura : 28°C

QUADRO 5 - C

Resultados utilizados na determinação do diagrama de fluxo (reograma) do caldo de fermentação micelial para produção de riboflavina.

| $\dot{\gamma}$<br>rpm | $\dot{\gamma}_{ostw.}$<br>s <sup>-1</sup> | $\tau$<br>leitura do<br>viscosímetro | $\tau$<br>dina/cm <sup>2</sup> | $\eta_a$<br>centipoise |
|-----------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 5,595                 | 11,93                                     | 5,5                                  | 10,79                          | 90,44                  |
| 7,513                 | 16,02                                     | 6,4                                  | 12,56                          | 78,40                  |
| 9,885                 | 21,08                                     | 7,3                                  | 14,32                          | 67,93                  |
| 13,19                 | 28,13                                     | 8,2                                  | 16,09                          | 57,20                  |
| 17,40                 | 37,11                                     | 9,4                                  | 18,44                          | 49,69                  |
| 25,08                 | 53,49                                     | 10,9                                 | 21,39                          | 39,99                  |
| 33,67                 | 71,81                                     | 12,5                                 | 24,52                          | 34,15                  |

fungo : *E. ashbyii* IZ-1389

meio de cultura : glucose-peptona-extrato de levedura

tempo de fermentação : 80 h

temperatura : 28°C

QUADRO 5 - D

Resultados utilizados na determinação do diagrama de fluxo (reograma) do caldo de fermentação micelial para produção de riboflavina.

| $\dot{\gamma}$<br>rpm | $\dot{\gamma}_{\text{ostw.}}$<br>s <sup>-1</sup> | $\tau$<br>leitura do<br>viscosímetro | $\tau$<br>dina/cm <sup>2</sup> | $\eta_a$<br>centipoise |
|-----------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 5,595                 | 11,83                                            | 4,4                                  | 8,63                           | 72,95                  |
| 7,513                 | 15,89                                            | 5,0                                  | 9,81                           | 61,74                  |
| 9,885                 | 20,90                                            | 5,8                                  | 11,38                          | 54,45                  |
| 13,19                 | 27,90                                            | 6,8                                  | 13,34                          | 47,81                  |
| 17,40                 | 36,80                                            | 7,6                                  | 14,91                          | 40,52                  |
| 25,08                 | 53,04                                            | 9,0                                  | 17,66                          | 33,29                  |
| 33,67                 | 71,21                                            | 10,8                                 | 21,19                          | 29,76                  |

fungo : *E. ashbyii* IZ-1389

meio de cultura : glucose-peptona-extrato de levedura

tempo de fermentação : 110 h

temperatura : 28°C

QUADRO 6

Variação dos parâmetros reológicos do modelo de Ostwald - de  
Waele (lei da potência) durante a fermentação para produção  
de riboflavina com *E. ashbyii* IZ-1389

| Tempo<br>h | n<br>adimensional | K<br>$\text{dina} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^n \cdot 10^2$<br>(pseudocentipoise) |
|------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16,5       | 0,477             | 185                                                                                       |
| 58         | 0,428             | 530                                                                                       |
| 80         | 0,455             | 365                                                                                       |
| 110        | 0,490             | 244                                                                                       |

meio de cultura: glucose-peptona-extrato de levedura

temperatura: 28°C

n = índice de comportamento reológico

K = índice de consistência

QUADRO 7

Composição do meio de cultura para fermentação.  
Efeito da concentração inicial de melaço de cana.

| meio de cultura | Açúcares totais do melaço | Produção de riboflavina g/l |       |       |
|-----------------|---------------------------|-----------------------------|-------|-------|
| nº              | g/l                       | 120 h                       | 144 h | 168 h |
| 1               | 10                        | 0,084                       | 0,082 | 0,078 |
| 2               | 15                        | 0,097                       | 0,110 | 0,106 |
| 3               | 20                        | 0,158                       | 0,179 | 0,167 |
| 4               | 25                        | 0,212                       | 0,241 | 0,226 |
| 5 (a)           | 25                        |                             | 0,139 |       |
| 6               | 30                        | 0,199                       | 0,218 | 0,210 |
| 7               | 35                        | 0,164                       | 0,175 | 0,176 |
| 3               | 40                        | 0,148                       | 0,166 | 0,169 |

fungo: *E. ashbyii* IZ-1389

melaço de cana: clarificado

soro de macerado de milho: 20 g/l (clarificado)

(a): melaço não clarificado

frascos agitados: 300 rpm (28°C)

### QUADRO 8

Composição do meio de cultura para fermentação.

Efeito da concentração inicial de soro de macerado de milho.

| Meio de cultura<br>nº | Soro de macerado<br>de milho<br>g/l | Produção de<br>riboflavina<br>g/l |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 9                     | 15                                  | 0,188                             |
| 4                     | 20                                  | 0,258                             |
| 10                    | 22                                  | 0,271                             |
| 11                    | 24                                  | 0,306                             |
| 12                    | 26                                  | 0,304                             |
| 13                    | 28                                  | 0,316                             |
| 14                    | 30                                  | 0,311                             |
| 15                    | 35                                  | 0,282                             |

fungo: *E. ashbyii* IZ-1389

soro de macerado de milho: clarificado

açúcares totais do melaço: 25 g/l (clarificado)

tempo de fermentação: 144 h (6 dias)

frascos agitados: 300 rpm (28°C)

QUADRO 9

Composição do meio de cultura para fermentação.

Efeito da concentração inicial de vinhaça de milho.

| Meio de cultura<br>nº | Sólidos solúveis<br>de vinhaça<br>g/l | Produção de<br>riboflavina<br>g/l |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 16                    | 1,0                                   | 0,302                             |
| 17                    | 3,0                                   | 0,286                             |
| 18                    | 5,0                                   | 0,259                             |

fungo: *E. ashbyii* IZ-1389

meio de cultura (base): açúcares totais do melaço 25 g/l e  
soro de macerado de milho 28 g/l

tempo de fermentação: 144 h (6 dias)

frascos agitados: 300 rpm (28°C)

QUADRO 10

Composição do meio de cultura para fermentação. Influência da adição de óleos vegetais

| Tipo de óleo vegetal             |         | Produção de riboflavina (g/l) |         |              |         |                  |         |                 |
|----------------------------------|---------|-------------------------------|---------|--------------|---------|------------------|---------|-----------------|
| Concentração de óleo vegetal g/l | meio nº | óleo de milho                 | meio nº | óleo de soja | meio nº | óleo de amendoim | meio nº | óleo de algodão |
| 0,0                              | 13      | 0,297                         | 13      | 0,297        | 13      | 0,297            | 13      | 0,297           |
| 3,0                              | 19      | 0,406                         | 28      | 0,381        |         |                  |         |                 |
| 6,0                              | 20      | 0,527                         | 29      | 0,402        | 37      | 0,405            | 41      | 0,391           |
| 9,0                              | 21      | 0,662                         | 30      | 0,495        |         |                  |         |                 |
| 12                               | 22      | 0,773                         | 31      | 0,596        | 38      | 0,554            | 42      | 0,509           |
| 12 (a)                           | 45      | 0,591                         |         |              |         |                  |         |                 |
| 12 (b)                           | 46      | 0,394                         |         |              |         |                  |         |                 |
| 15                               | 23      | 0,722                         | 32      | 0,620        |         |                  |         |                 |
| 18                               | 24      | 0,674                         | 33      | 0,635        | 39      | 0,493            | 43      | 0,414           |
| 18 (a)                           |         |                               | 47      | 0,403        |         |                  |         |                 |
| 21                               | 25      | 0,636                         | 34      | 0,608        |         |                  |         |                 |
| 24                               | 26      | 0,584                         | 35      | 0,544        |         |                  |         |                 |
| 27                               | 27      | 0,537                         | 36      | 0,462        | 40      | 0,389            | 44      | 0,244           |

fungo: *E. ashbyii* IZ-1389

meio de cultura(base): açúcares totais do melaço  
25 g/l e soro de macerado  
de milho 28 g/l

tempo de fermentação: 144 h (6 dias)

(a): óleo não refinado (bruto)

(b): o meio de cultura não contém melaço  
frascos agitados: 300 rpm (28°C)



QUADRO 11

Cinética da produção de riboflavina por fermentação num meio de melaço-soro de macerado de milho-óleo de milho com *E. abyssi* IZ-1389 em frascos agitados.

| Tempo de Fermentação<br>h | Consumo de Açúcares totais<br>g/l | pH  | Produção de riboflavina<br>g/l |
|---------------------------|-----------------------------------|-----|--------------------------------|
| 24                        | 5,79                              | 5,6 | 0,034                          |
| 48                        | 1,28                              | 6,2 | 0,111                          |
| 72                        |                                   | 6,7 | 0,209                          |
| 96                        |                                   | 7,0 | 0,411                          |
| 120                       |                                   | 7,4 | 0,569                          |
| 144                       |                                   | 7,8 | 0,752                          |
| 168                       |                                   | 8,0 | 0,738                          |

inóculo: 5% (v/v) de 24-26 h de idade (vegetativo)

pH inicial: 6,5 (ajustado com NaOH 0,5N e/ou HCl 0,5N)

meio de cultura (nº 22): açúcares totais do melaço 25 g/l

soro de macerado de milho 28 g/l

óleo de milho 12 g/l

água corrente para completar 1 litro

temperatura: 28°C

agitação: 300 rpm

QUADRO 12

Produção de riboflavina no fermentador a diferentes  
níveis de aeração

| Tempo de<br>Fermentação<br>dias | Produção de riboflavina (g/l) |         |
|---------------------------------|-------------------------------|---------|
|                                 | 0,5 vvm                       | 1,0 vvm |
| 1                               | 0,056                         | 0,092   |
| 2                               | 0,213                         | 0,406   |
| 3                               | 0,446                         | 0,733   |
| 4                               | 0,610                         | 0,951   |
| 5                               | 0,729                         | 1,063   |
| 6                               | 0,823                         | 1,087   |
| 7                               | 0,821                         | 0,994   |

inóculo: 5% (vvm)

pH inicial: 6,5

meio de cultura nº 22

temperatura: 28°C

agitação: 500 rpm

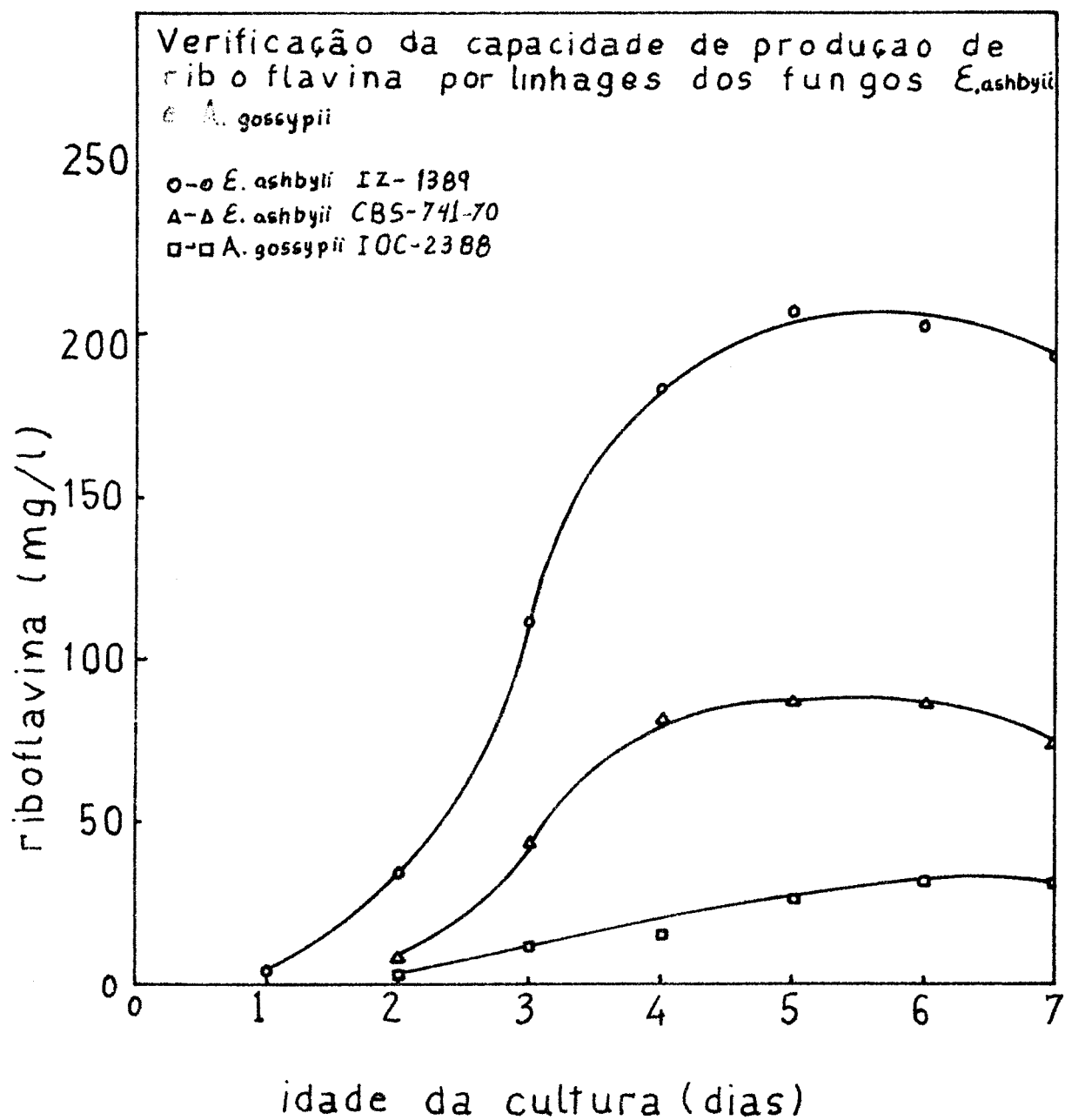


FIGURA (1)

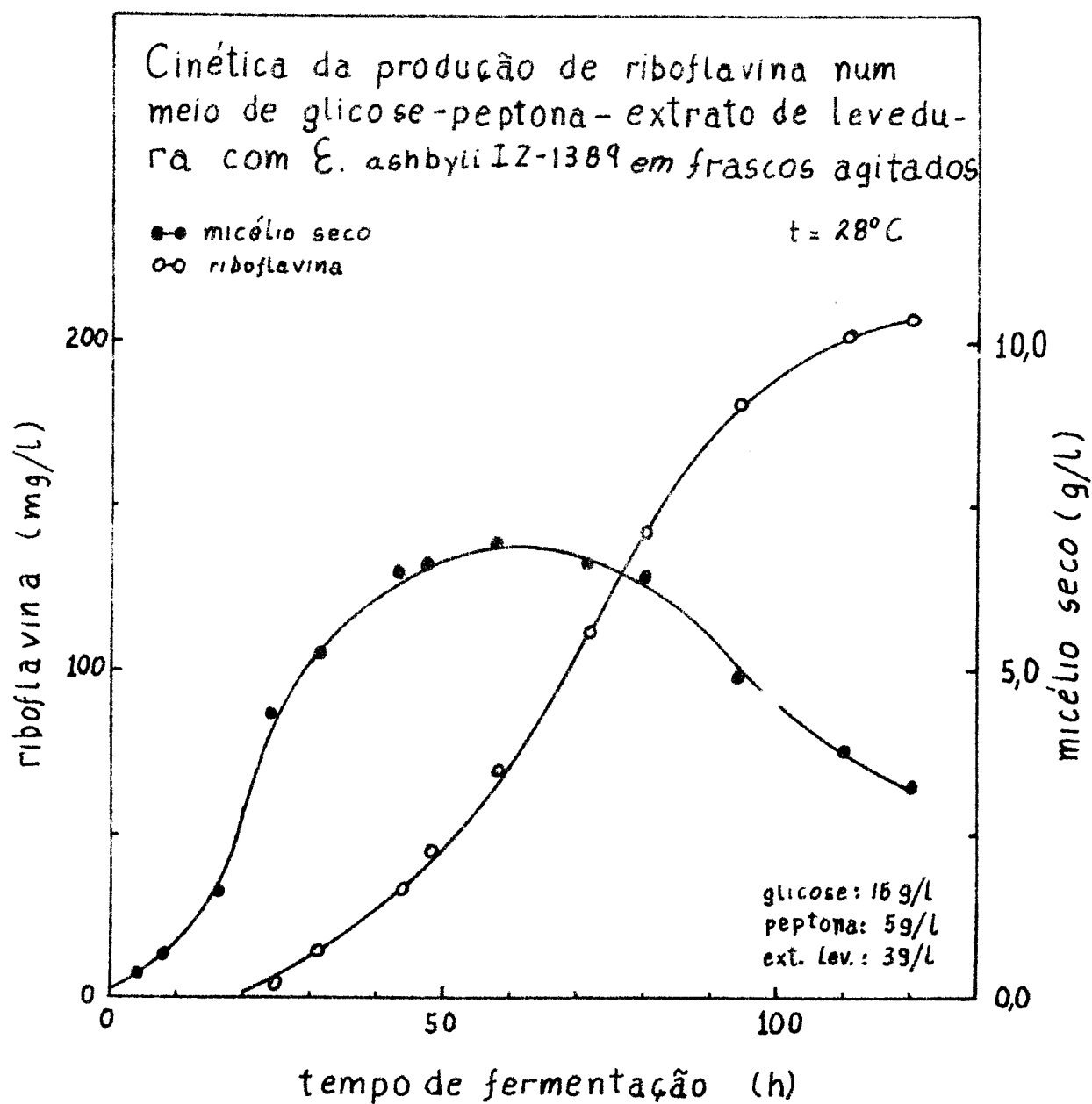
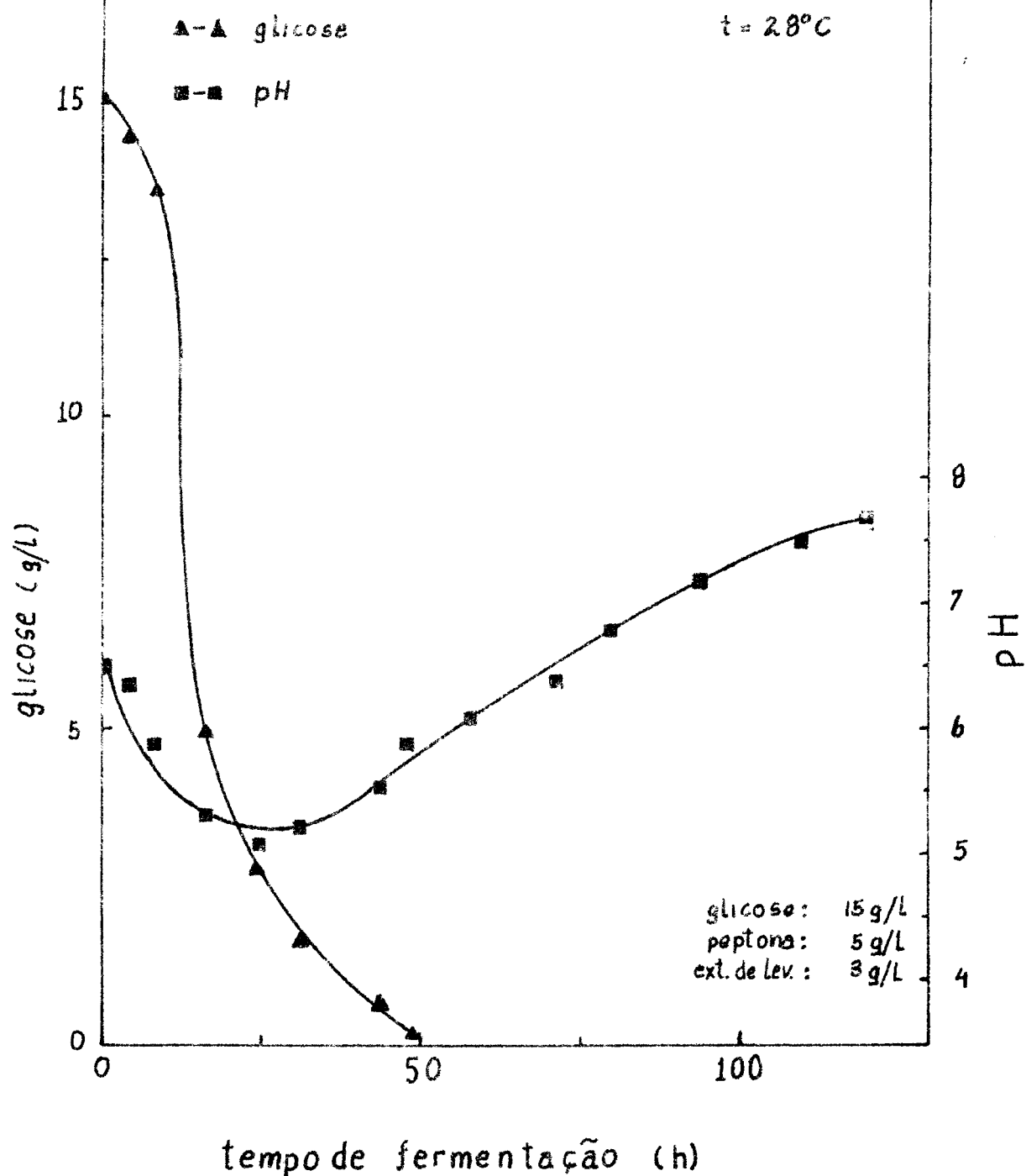


FIGURA (2)

Consumo de glicose e variação do pH durante a produção de riboflavina pelo *E. ashbyii* 12-1389 em frascos agitados.



FIGURA(3)

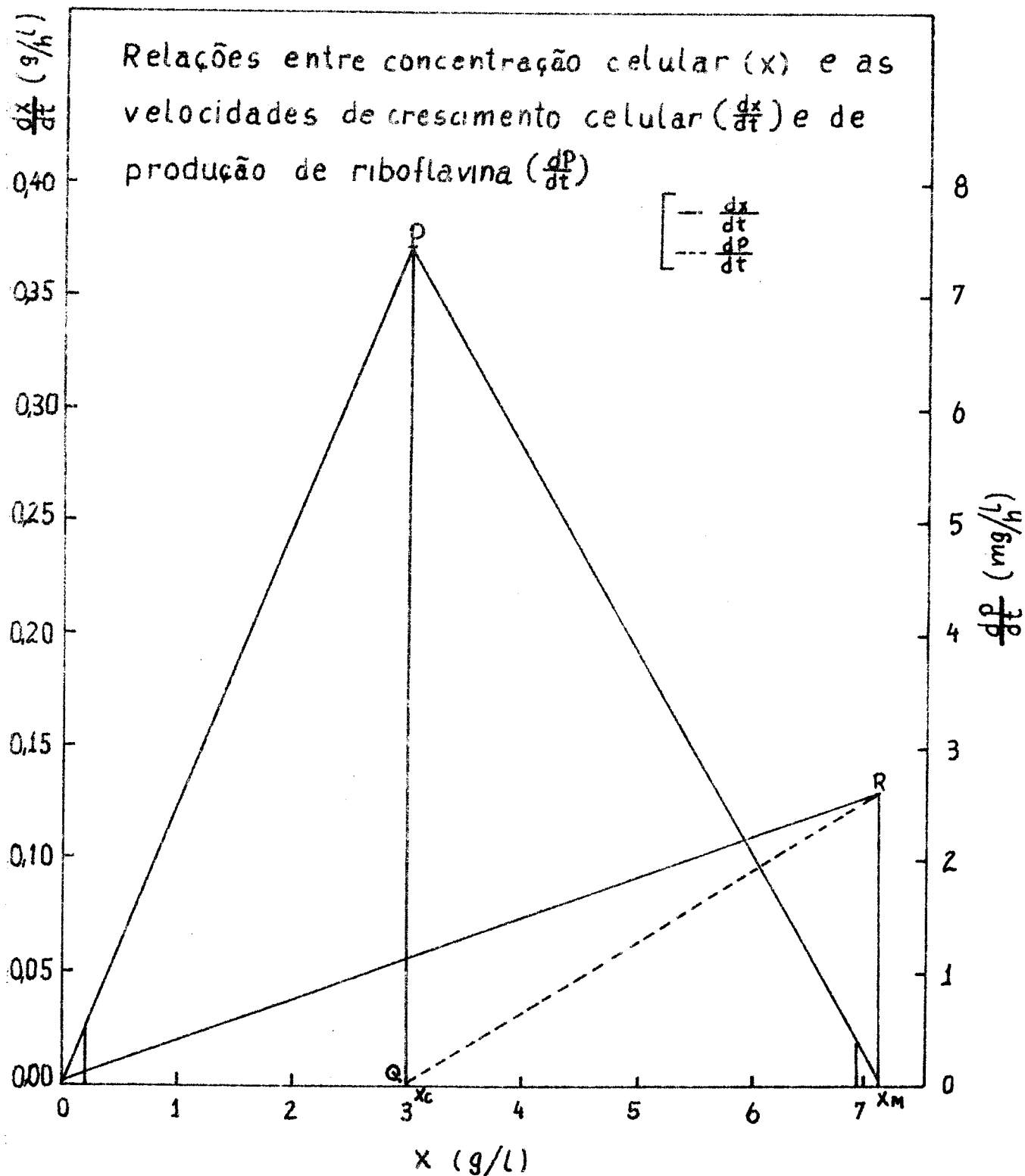


FIGURA (4)

Relações entre a concentração de riboflavina (P) e a sua velocidade de produção ( $\frac{dP}{dt}$ ).

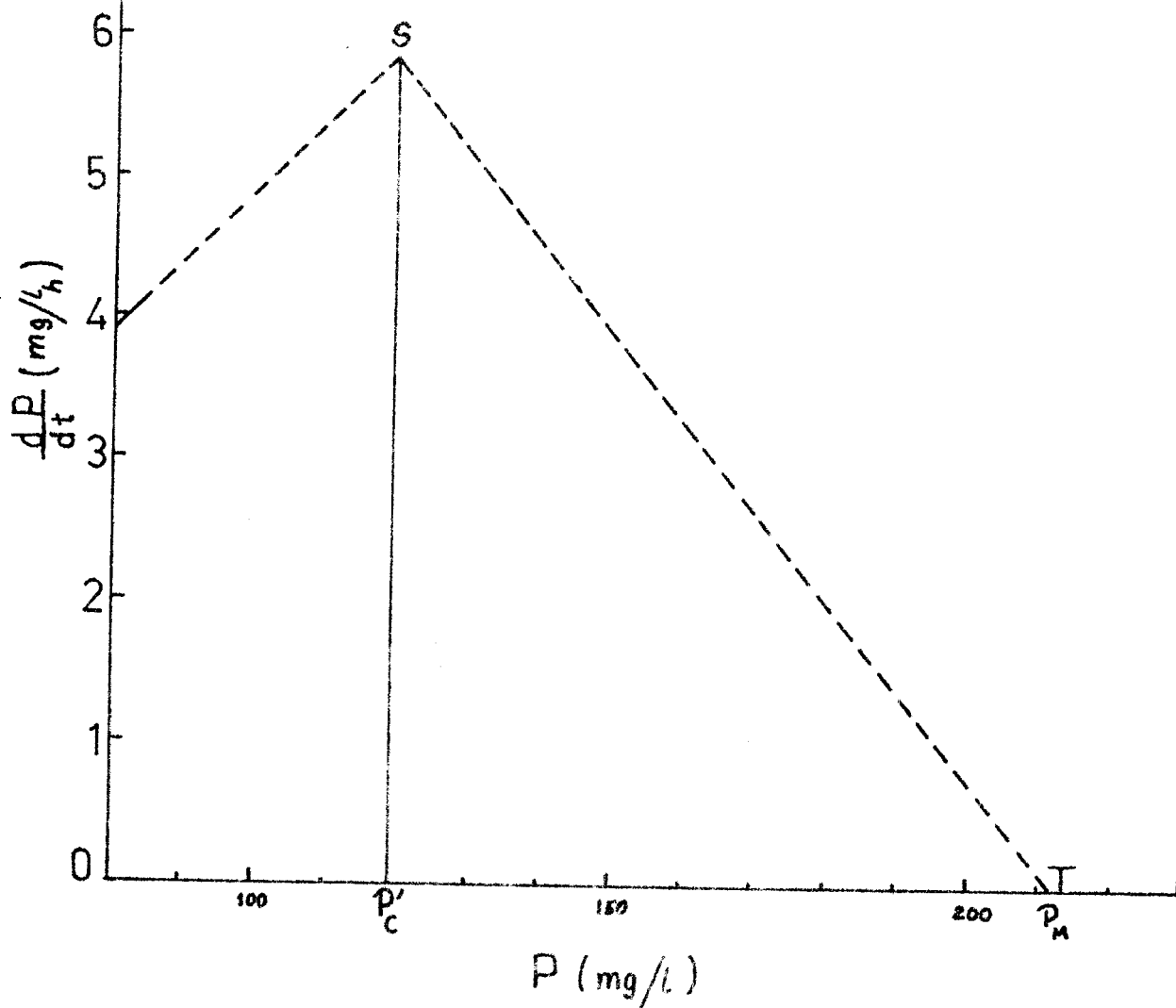


FIGURA (5)

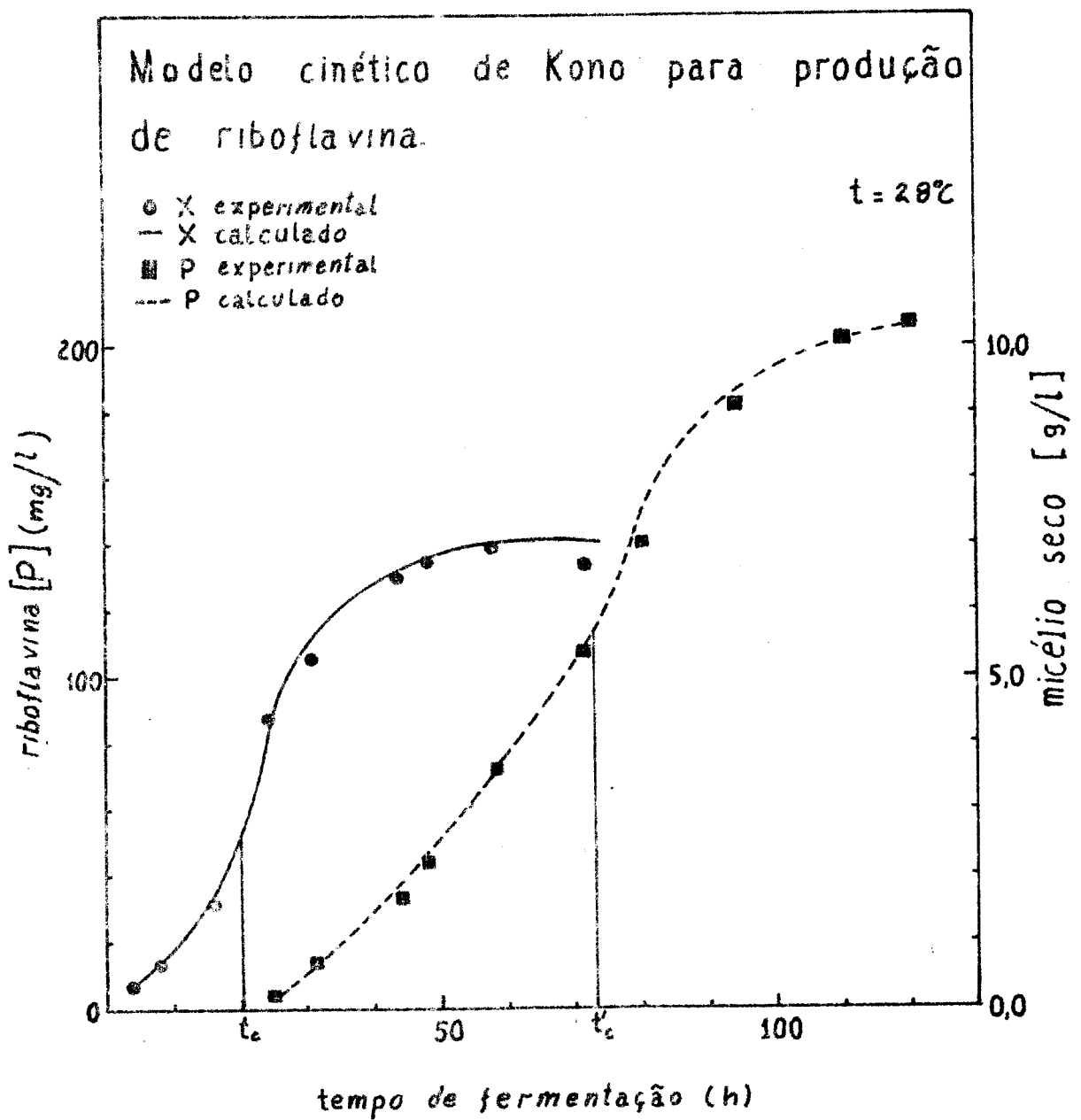


FIGURA (6)



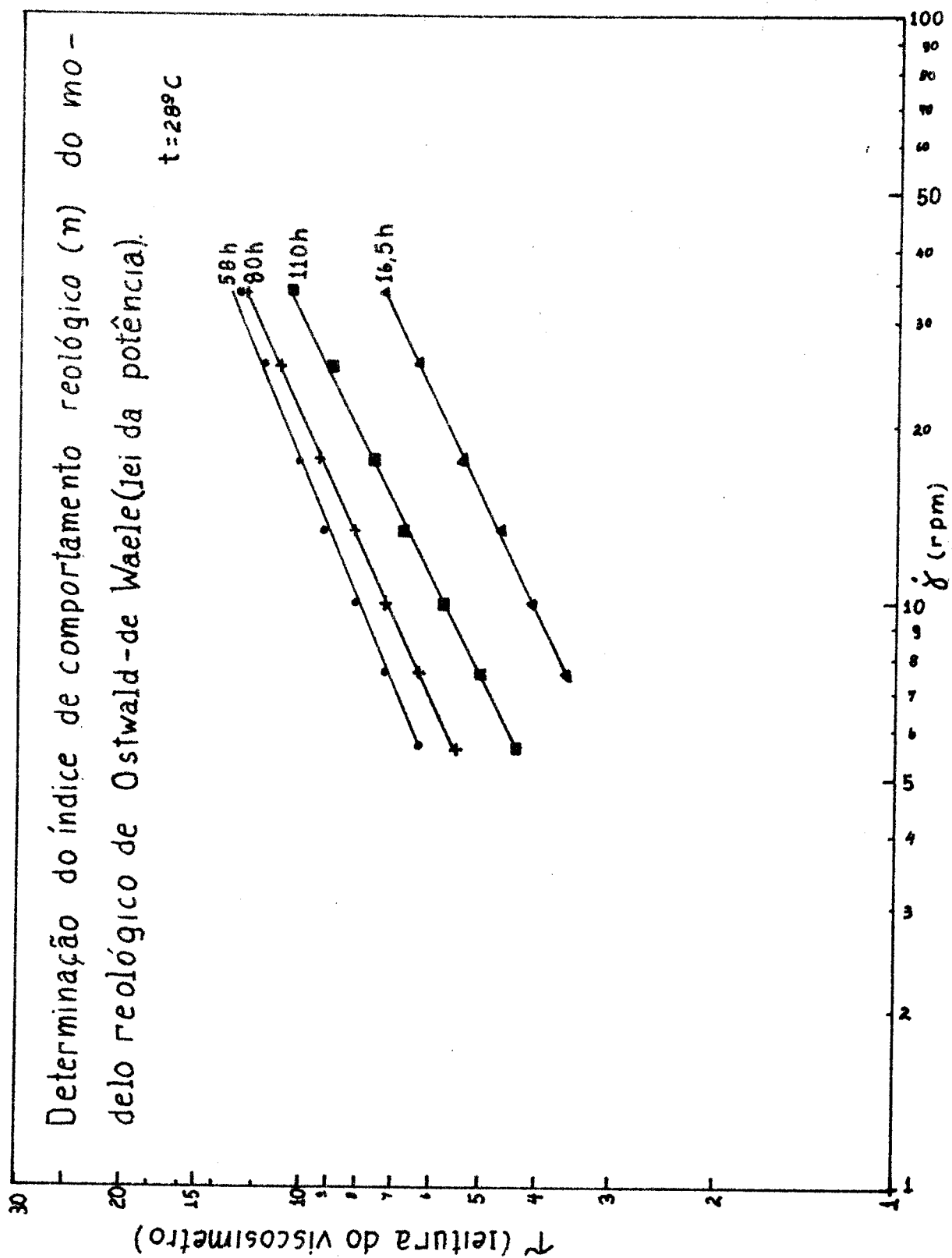
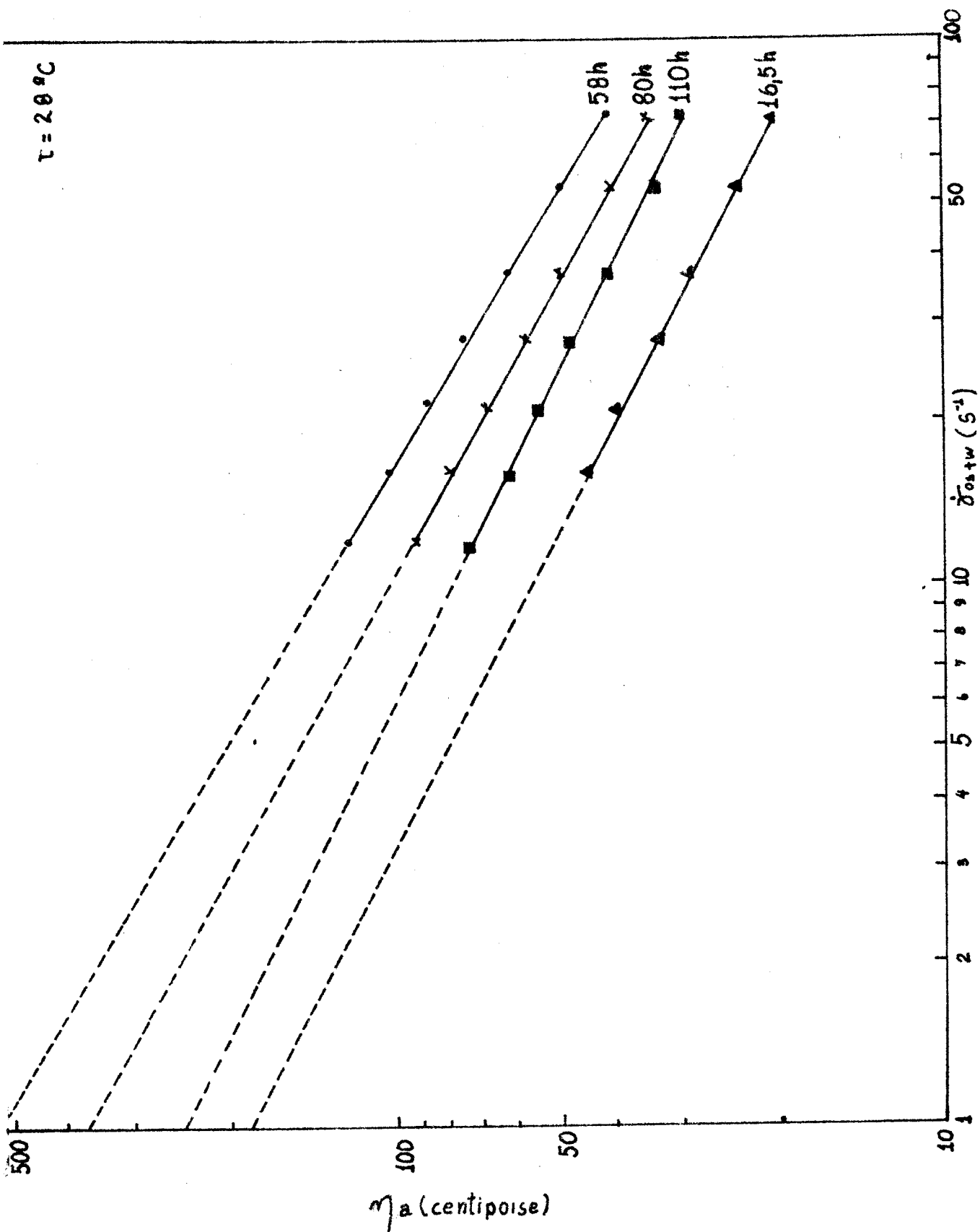


FIGURA (7)



Determinação do índice de consistência do caldo (K) do modelo reológico de Ostwald-de Waele (lei da potência).

FIGURA (8)

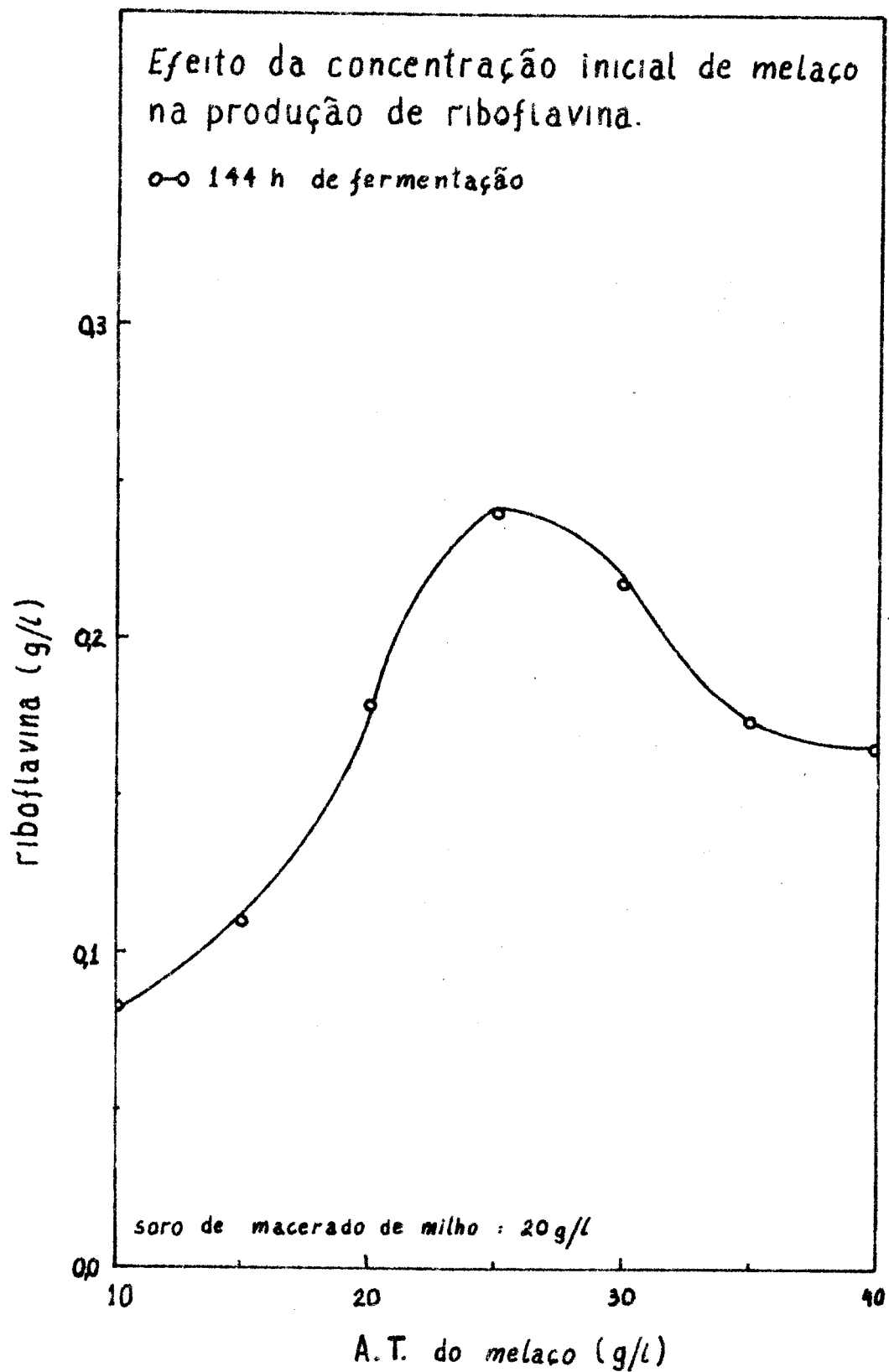


FIGURA (9)

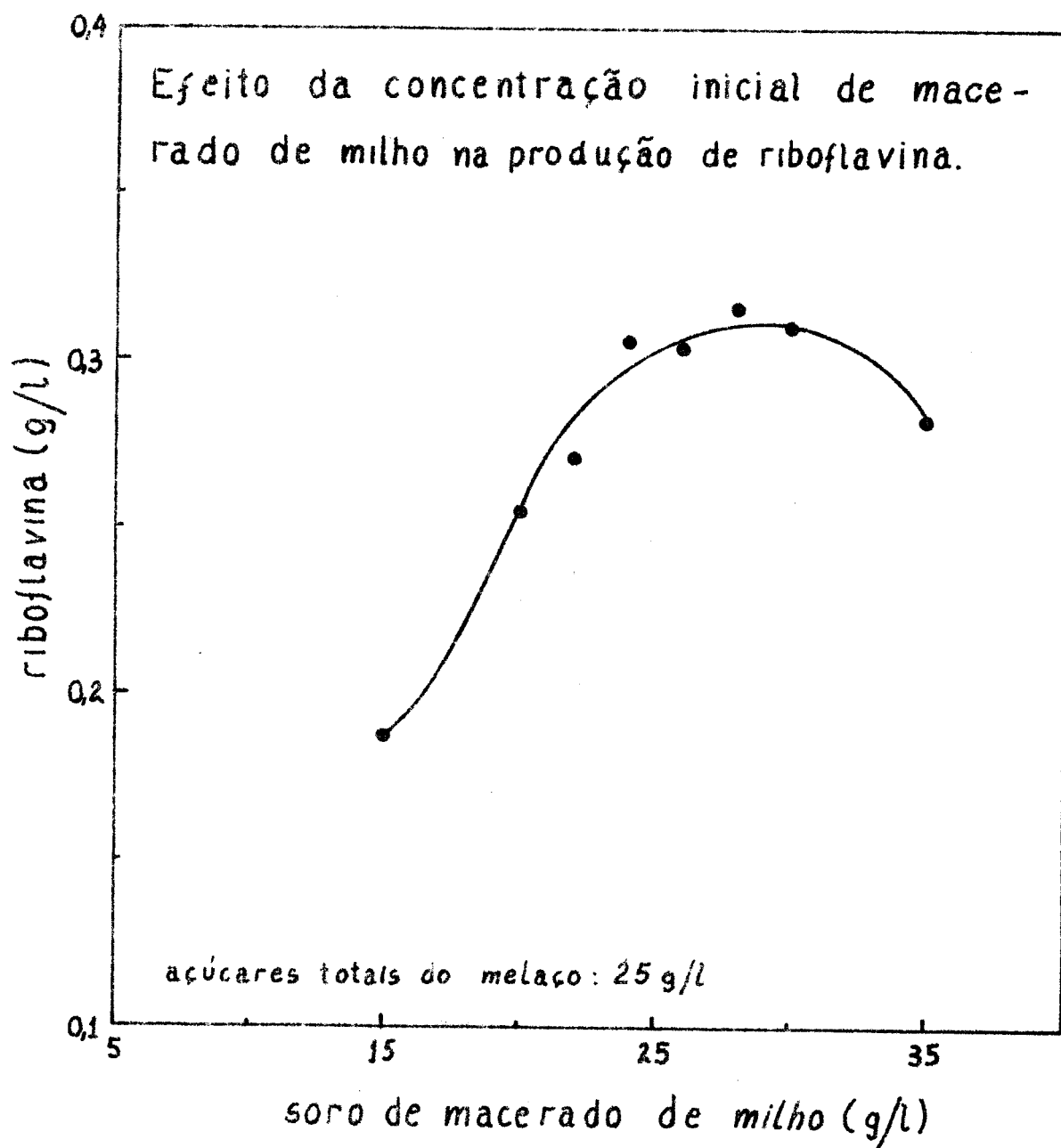


FIGURA (10)

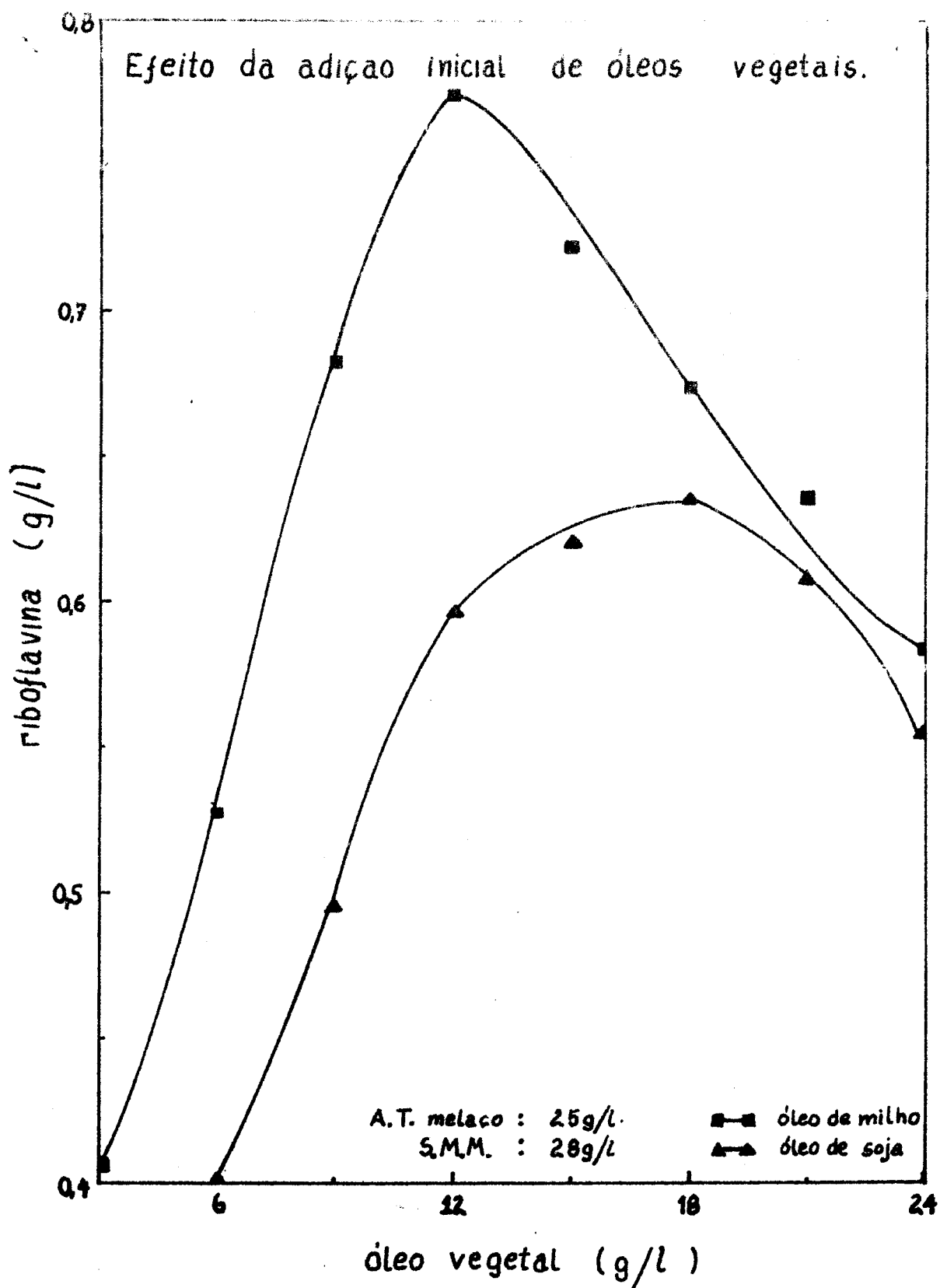


FIGURA (11)

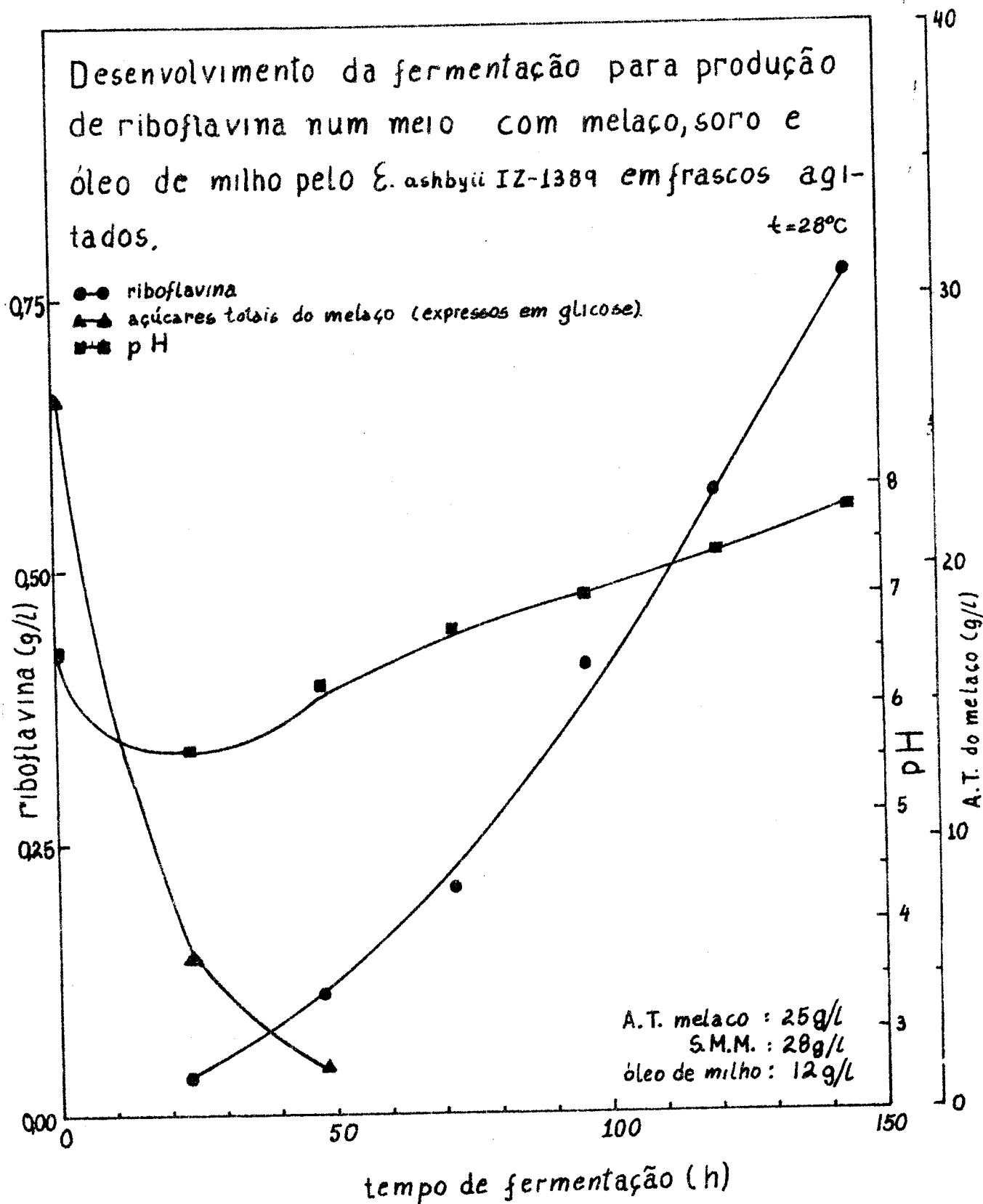


FIGURA (12)

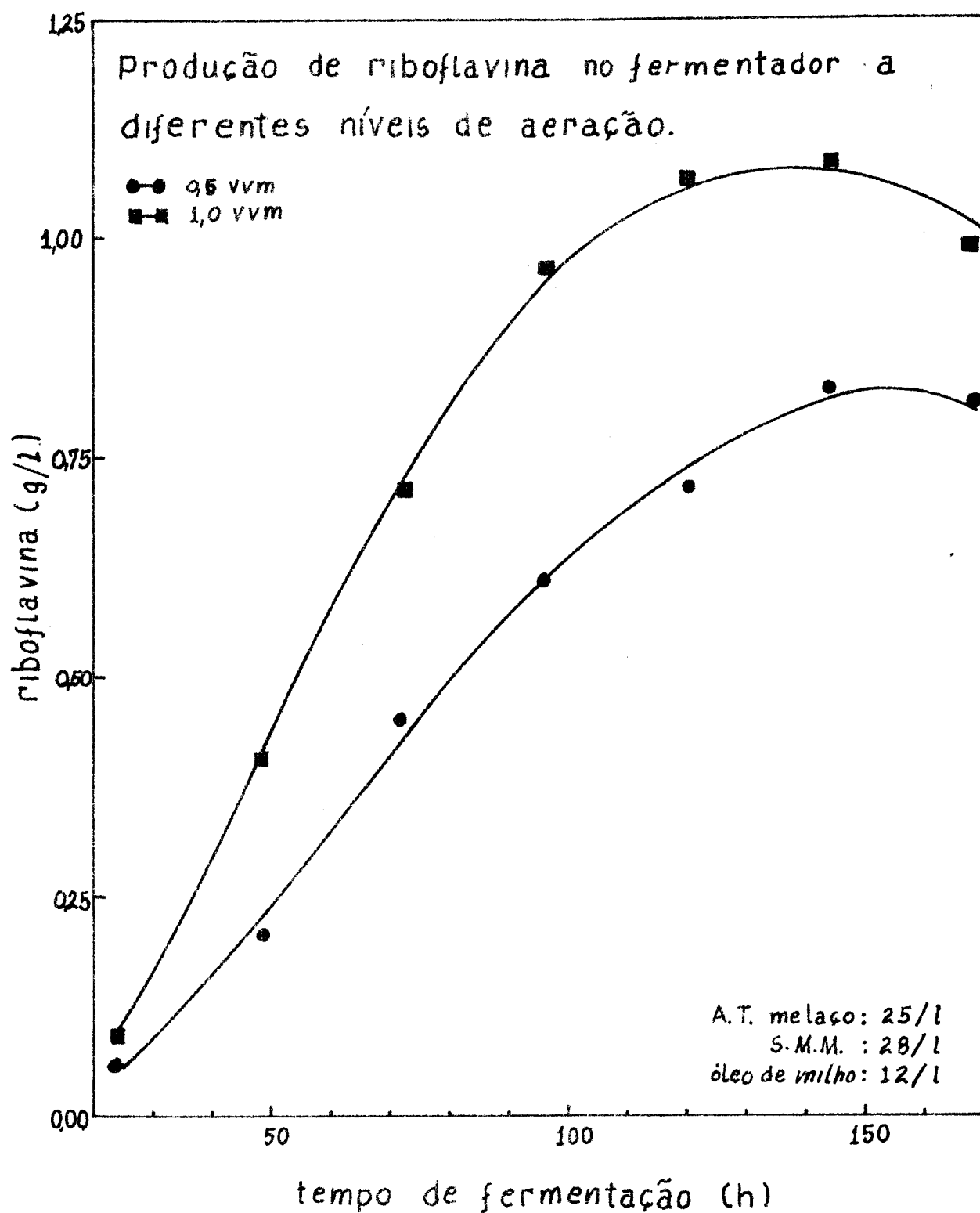


FIGURA (13)

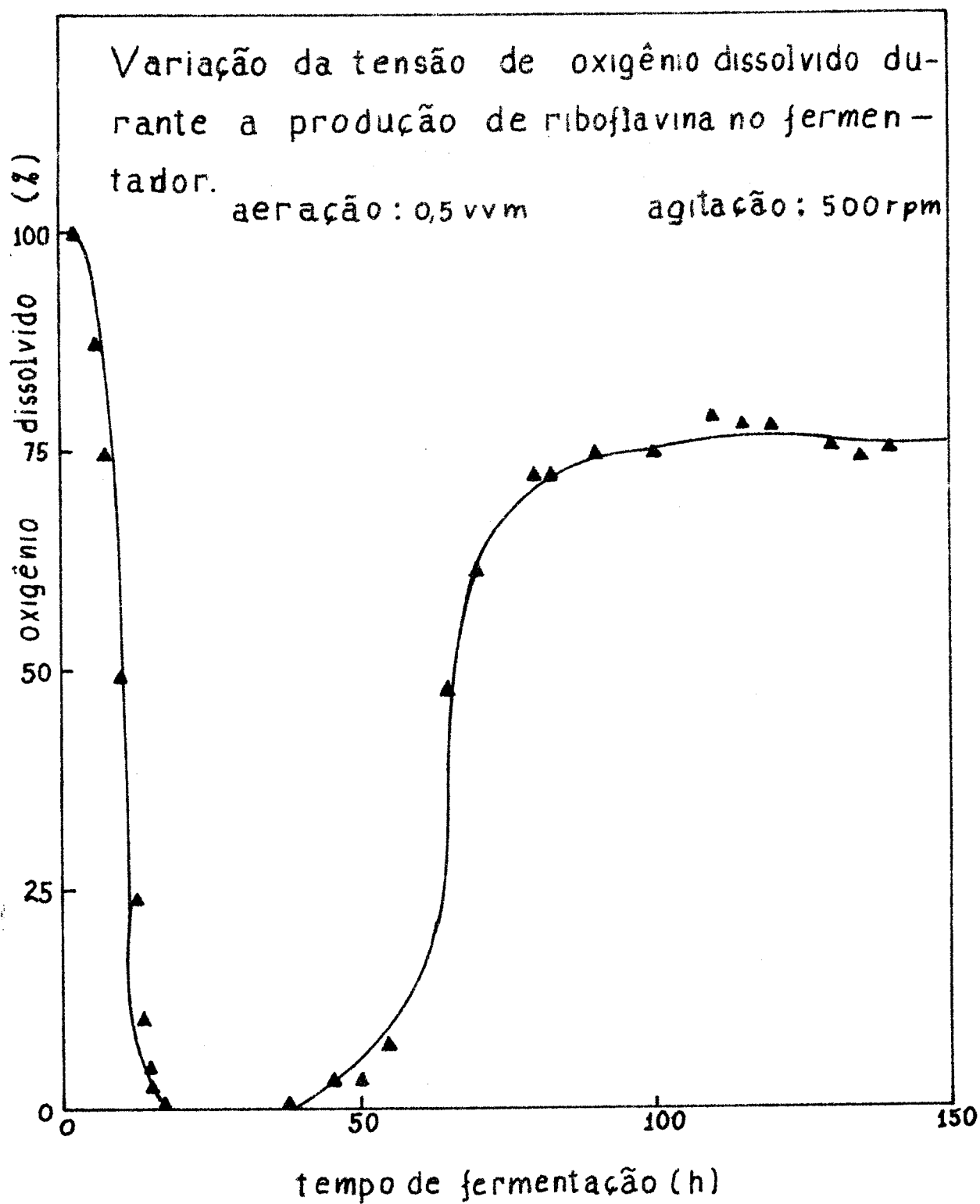


FIGURA (14)



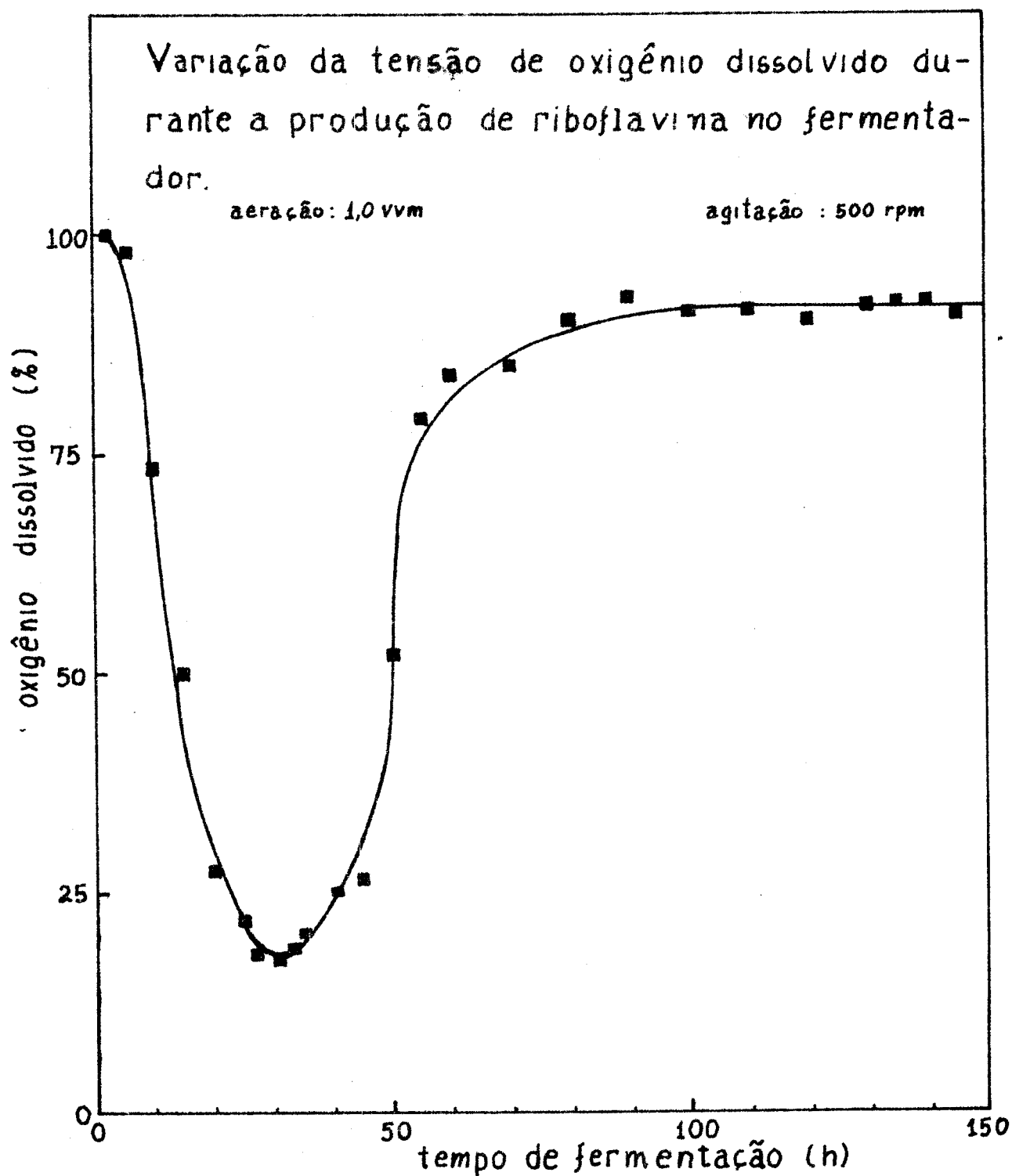
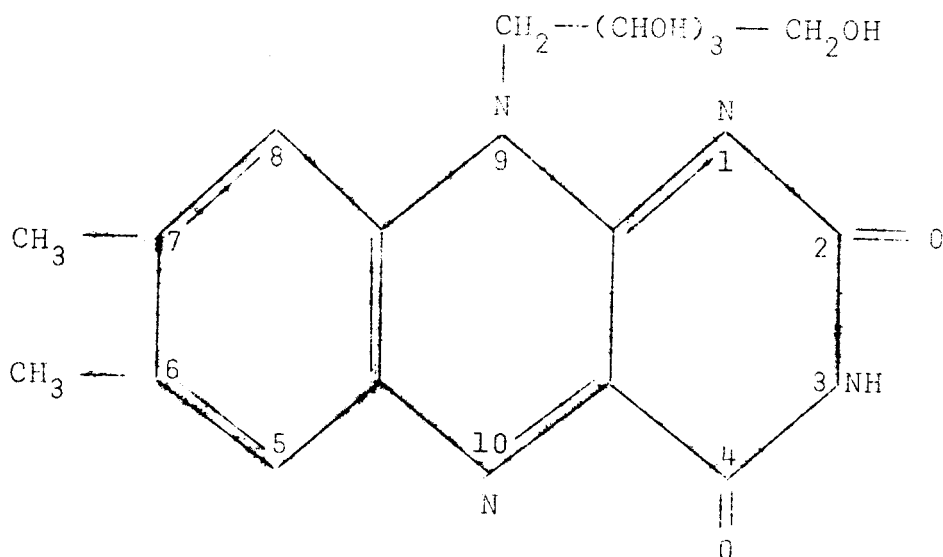


FIGURA (15)

# A P Ê N D I C E A

## Riboflavina e suas propriedades (35; 38; 65)

A riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>, lactoflavina, vitamina G) é um pigmento amarelo-esverdeado, fluorescente e solúvel na água, amplamente distribuído nas células vegetais e animais. Possui a seguinte fórmula estrutural:



6,7-dimetil-9 [D,1' ribitil] isoaloxazina

Cristaliza no álcool absoluto na forma de agulhas de coloração amarelo-alaranjada.

|                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| Fórmula empírica                | $C_{17}H_{20}N_4O_6$       |
| Peso molecular                  | 376                        |
| Ponto de Fusão                  | 274 a 282°C (decomposição) |
| Rotação Ótica $[\alpha]_D^{20}$ | -114° (em NaOH 0,1N)       |
| Potencial redox                 | -0,21 V (pH = 7,0)         |

A riboflavina é estável em ácidos minerais fortes e frente a maioria dos agentes oxidantes. É reduzida, reversivelmente, com hidrossulfito de sódio, cloretos de estanho e titânio e sulfetos alcalinos, dando uma leucobase (composto desidrogenado). É muito sensível a luz, principalmente ultravioleta. A irradiação de soluções alcalinas produz lumiflavina (6,7,8 - trimetilisoaloxazina) e de soluções ácidas resulta em lumicromo (6,7 - dimetilaloxazina), que se caracteriza por uma fluorescência azulada.

Uma das propriedades que distinguem a riboflavina é a sua fluorescência amarelo-esverdeada em soluções quase neutras, que alcança um máximo a pH de 6,7 a 6,8.

Para que a molécula da flavina tenha atividade vitamínica é necessário que pelo menos um dos grupos metila esteja na posição 6 ou 7. A riboflavina apresenta-se, geralmente, nas células vivas combinada com ácido fosfórico ou com ácido fosfórico e adenílico, que podem combinar-se com proteínas específicas para formar enzimas oxidativas.

A riboflavina é essencial ao metabolismo de todos os animais, mas não é indispensável nas dietas dos bovinos e ovinos dada a síntese bacteriana no rúmen. Na avicultura e suinocultura, entretanto, é absolutamente indispensável uma dieta que inclua a riboflavina. A deficiência riboflavínica pode ser caracterizada, de um modo geral, pelo crescimento lento, anormalidades oculares e dermatites. No homem observam-se sintomas tanto epidérmicos como oftalmológicos, tais como, pele áspera, sulcos à volta da boca (quilo-se), dermatite e vascularização córnea. A exigência mínima diária de riboflavina para o homem adulto aproxima-se de 1,5 - 2,5 mg. Na suinocultura, a exigência ótima é cerca de 2,0 - 3,0 mg por quilograma de alimento sólido.

Modelo Cinético de Kono (28; 29; 30)

Kono apresentou modelos cinéticos para o crescimento celular e formação de produtos, que poderiam ser aplicados a fermentações descontínuas. Seu modelo é baseado em considerações da cinética química. Introduzindo os novos conceitos de concentração crítica e coeficiente de atividade de consumo, Kono procura explicar o crescimento celular em todas as fases, inclusive na fase de adaptação (acomodação ou aclimação).

A equação geral para o crescimento celular seria dada por:

$$\frac{dX}{dt} = k_1^i k_2^j E^i S^j - k_3 P \quad |B - 1|$$

onde,

$$i = 1, j = 0 \quad \text{para } X < X_c$$

$$i = 0, j = 1 \quad \text{para } X \geq X_c$$

e, por equações auxiliares que relacionam E, S e P com X. A concentração crítica ( $X_c$ ) é a concentração celular limite existente entre a fase exponencial e a fase de declínio.

A velocidade de crescimento celular, na fase de indução (I), fase transiente (II) e fase exponencial (III) passa a ser dada por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \phi X \quad |B - 2|$$

onde o coeficiente de atividade de consumo ( $\phi$ ) tem o seguinte valor:

$$\text{na fase de indução (I)} \quad \phi = 0$$

$$\text{na fase transiente (II)} \quad \phi = \frac{X - (1 - \phi_L) X_0}{X}$$

na fase exponencial (III)  $\phi = 1$

O coeficiente de atividade de consumo ( $\phi$ ) é definido como sendo a fração de todas as células que pode consumir substrato e multiplicar-se num tempo qualquer de crescimento celular.

A velocidade de crescimento celular na fase de declínio (IV)  $\left[ \left( \frac{dX}{dt} \right)_C > \left( \frac{dX}{dt} \right)_D > 0 \right]$  é expressa por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_D (X_M - X) \quad |B - 3|$$

ou

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu X_C}{(X_M - X_C)} (X_M - X) \quad |B - 4|$$

A forma integral das equações que representam o crescimento celular é a seguinte:

$$\text{fase de indução (I)} \quad X = X_0 \quad |B - 5|$$

$$\text{fase transiente (II)} \quad X = X_0 + (X_L - X_0) \left( \frac{t - t_0}{t_L - t_0} \right)^2 \quad |B - 6|$$

$$\text{fase exponencial (III)} \quad X = X_C \exp [\mu(t - t_C)] \quad |B - 7|$$

$$\text{com,} \quad t_d = \frac{0,693}{\mu} \quad |B - 7.1|$$

fase de declínio (IV)

$$X = X_M - (X_M - X_C) \exp \left[ \frac{-\mu X_C}{X_M - X_C} (t - t_C) \right] \quad |B - 8|$$

Após a fase de declínio (IV), aparece uma fase de diminuição celular (V). Como este fenômeno é, geralmente, causado por fatores muito complexos, não foi estabelecido uma equação geral para esta fase.

A equação geral para a velocidade de produção de um metabólito pode ser escrita como segue:

$$\frac{dP}{dt} = \rho_1 \phi X + \rho_2 (1 - \phi) X \quad |B - 9|$$

A equação |B - 9| pode ser reescrita:

$$\frac{dP}{dt} = \rho_1 X_{\text{cresc.}} + \rho_2 X_{\text{não cresc.}} \quad |B - 10|$$

Os valores de  $\rho_1$  e  $\rho_2$  representam as características do processo fermentativo, de modo que:

- Quando  $\rho_1 > 0$  e  $\rho_2 > 0$ , a formação de produto está associada ao crescimento e não crescimento celular;
- Se  $\rho_1 > 0$  e  $\rho_2 = 0$ , a formação de produto está associada ao crescimento celular;
- Para  $\rho_1 = 0$  e  $\rho_2 > 0$ , a formação de produto está associada ao não crescimento celular;
- Sendo  $\rho_1 > 0$  e  $\rho_2 < 0$ , a formação de produto está associada com o crescimento e decresce com o não crescimento celular.

As equações relativas à concentração de produto num processo fermentativo podem ser derivadas, matematicamente, a partir da equação geral |B - 9|.

Então,

na fase de crescimento exponencial:

$$P = - \frac{\rho_1 X_C}{\mu} \left\{ 1 - \exp [\mu(t - t_C)] \right\} + P_C \quad |B - 11|$$

na fase de declínio da velocidade de crescimento celular:

$$P = \left( \frac{\rho_1}{\mu} - \frac{\rho_2 X_M}{\mu X_C} \right) (X_M - X_C) \left\{ 1 - \exp \left[ - \frac{\mu X_C}{X_M - X_C} (t - t_C) \right] \right\} + \rho_2 X_M (t - t_C) + P_C \quad |B - 12|$$

E, finalmente

na fase adicional de produção, quando  $\rho_2 > 0$ :

$$P = P_M - (P_M - P'_C) \exp [-\rho'(t - t'_C)] \quad |B - 13|$$

## A P Ê N D I C E

### Modelo reológico de Ostwald - de Waele (44)

O modelo de Ostwald - de Waele, também conhecido como lei da potência, é a equação mais utilizada na engenharia para a descrição do comportamento reológico de fluidos não-Newtonianos, embora sua formulação seja totalmente empírica.

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad |C - 1|$$

mas,

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

então,

$$\eta_a = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad |C - 2|$$

A lei da potência, nas suas formas mais usuais, equações |C - 1| e |C - 2|, apresenta dois parâmetros, K (índice de consistência) e n (índice de comportamento reológico).

Quando,

$n = 1$ , o fluido é Newtoniano e  $\eta_a = K = \text{constante}$

$n < 1$ , o fluido é pseudoplástico (a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento,  $\dot{\gamma}$ )

$n > 1$ , o fluido é dilatante (a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento,  $\dot{\gamma}$ )

# A P Ê N D I C E D

## Composição do melaço de cana (32)

A composição do melaço de cana, abaixo apresentada, foi fornecida pela Usina Santa Helena (Piracicaba), que cedeu o melaço utilizado para as experiências.

| <u>determinações</u>                    | <u>porcentagens</u> |
|-----------------------------------------|---------------------|
| °<br>Brix . . . . .                     | 89,60               |
| Polarização ...                         | 41,60               |
| Sacarose . . . . .                      | 44,43               |
| Açúcares redutores expressos em glucose | 12,50               |
| Açúcares totais expressos em glucose .  | 59,15               |
| Pureza . . . . .                        | 46,40               |



## A P Ê N D I C E E

### Composição de um soro de macerado de milho

Uma análise dos principais componentes nitrogenados de uma amostra de soro de macerado de milho ("milhocina") da Refinações de Milho Brasil Ltda (Mogi-Guaçu) apresentou os seguintes resultados: (12)

| <u>Aminoácidos</u>      | <u>mg/100 g (base úmida)</u> |
|-------------------------|------------------------------|
| ác. glutâmico . . . . . | 2600                         |
| alanina . . . . .       | 2000                         |
| prolina . . . . .       | 1700                         |
| leucina . . . . .       | 1300                         |
| glicina . . . . .       | 850                          |
| cistina . . . . .       | 850                          |
| ác. aspártico . . . . . | 800                          |
| valina . . . . .        | 800                          |
| lisina . . . . .        | 650                          |
| serina . . . . .        | 600                          |
| isoleucina . . . . .    | 500                          |
| tirosina . . . . .      | 500                          |
| fenilalanina . . . . .  | 500                          |
| treonina . . . . .      | 450                          |
| histidina . . . . .     | 400                          |
| arginina . . . . .      | 300                          |
| metionina . . . . .     | 280                          |
| triptofano . . . . .    | 180                          |

O soro de macerado de milho utilizado nas experiências foi fornecido pela Refinações de Milho Brasil, enquanto que a vinhaça de milho foi obtida na Drury's S.A. (Sorocaba).

A P Ê N D I C E F

Composição de um óleo de milho

A análise de uma amostra de óleo de milho ("mazola") da Refinações de Milho Brasil apresentou os seguintes resultados: (12)

| <u>determinações</u> | <u>porcentagens</u> |
|----------------------|---------------------|
| ác. linoleico        | 46,9                |
| ác. oleico           | 36,9                |
| ác. palmítico        | 12,8                |
| ác. esteárico        | 2,0                 |
| ác. linolênico       | 1,2                 |
| ác. mirístico        | 0,08                |

O óleo de milho utilizado nos ensaios foi obtido da Refinações de Milho Brasil Ltda., enquanto que os óleos de soja, amendoim e algodão foram fornecidos pela Anderson Clayton S.A.

## N O M E N C L A T U R A

### Letras Maiúsculas

|   |                                                                            |
|---|----------------------------------------------------------------------------|
| C | fator de correção da taxa de cisalhamento                                  |
| E | concentração da substância E, que reage com o substrato limitante          |
| K | índice de consistência [ $\text{dina}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^n$ ] |
| P | concentração de produto (riboflavina) [mg/l, g/l]                          |
| R | raio do cilindro do viscosímetro                                           |
| S | concentração de substrato limitante                                        |
| X | concentração celular [g/l]                                                 |

### Letras Minúsculas

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| k | constante de velocidade de reação |
| n | índice de comportamento           |
| t | tempo [h]                         |

### Letras Gregas

|                |                                                                                   |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| $\dot{\gamma}$ | taxa de cisalhamento [rpm, $\text{s}^{-1}$ ]                                      |
| $\phi$         | coeficiente de atividade de consumo                                               |
| $\Phi$         | coeficiente de atividade de crescimento                                           |
| $\mu$          | velocidade específica de crescimento celular [ $\text{h}^{-1}$ ]                  |
| $\eta_a$       | viscosidade aparente [ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , poise]   |
| $\rho$         | velocidade específica de produção de metabólito (riboflavina) [ $\text{h}^{-1}$ ] |
| $\tau$         | tensão de cisalhamento [ $\text{dina}\cdot\text{cm}^{-2}$ ]                       |

### Subscritos

|        |                                                                |
|--------|----------------------------------------------------------------|
| c      | ponto crítico                                                  |
| calc.  | calculado                                                      |
| cresc. | crescimento                                                    |
| D      | fase de declínio (celular)                                     |
| d      | duplicação celular                                             |
| e      | externo                                                        |
| exper. | experimental                                                   |
| i      | interno                                                        |
| L      | fase transiente (celular)                                      |
| M      | máximo teórico                                                 |
| ostw.  | modelo de Ostwald - de Waele                                   |
| o      | refere-se à condição inicial                                   |
| 1      | refere-se à produção associada ao crescimen-<br>to celular     |
| 2      | refere-se à produção não associada ao cresci-<br>mento celular |

### Superescritos

|      |                            |
|------|----------------------------|
| ,    | fase adicional de produção |
| i, j | ordem de reação            |

### Abreviaturas

|      |                                                      |
|------|------------------------------------------------------|
| AOAC | "Association of Official Agricultural Chemis-<br>ts" |
| exp  | exponencial base e                                   |
| ppm  | partes por milhão                                    |
| rpm  | rotações por minuto                                  |
| v/v  | volume por volume (% em volume)                      |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS  
=====

1. AIBA, S.; HUMPHREY, A.E. and MILLIS, N.F. Biochemical Engineering, New York, Academic Press, 1965.
2. ALI, S.N. and AL-KHALIDI, U.A.S. The Precursors of the Xylene Ring in Riboflavin, Biochem. J. 98:182, 1966.
3. BLAKEBROUGH, N. Biochemical and Biological Engineering Science, London, Academic Press, 1967, vol. 1.
4. BONGENAAR, J.J.T.M.; KOSSEN, N.W.F.; METZ, B. and MEIJBOOM, F. W. A Method for Characterizing the Rheological Properties of Viscous Fermentation Broths. Biotechnol. Bioeng. 15 (1):201, 1973.
5. BORZANI, W.; FALCONE, M. and VAIRO, M.L.R. Kinetics of the Continuous Alcoholic Fermentation of Blackstrap Molasses. Appl. Microbiol. 8:136, 1960.
6. ———; LESER, E.W.; VENOSA, C.M.S. and MARTINS, V.M.N.C. Sieving Method for Determination of Mold Concentration in Heterogeneous Culture Media. Biotechnol. Bioeng. 14 (2):273, 1972.
7. BROWNE, C.A. and ZERBAN, F.W. Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis, New York, John Wiley, 1948.
8. CASSIDA, L.E. Industrial Microbiology, New York, John Wiley, 1968.
9. DEMAİN, A.L. Riboflavin Oversynthesis. Annual Review of Microbiology 26:369, 1972.
10. ——— Overproduction of Microbial Metabolites and Enzymes due to Alteration of Regulation. In Advances in Biochemical Engineering, ed. T.K. Ghose and A. Fiechter, New York, Springer - Verlag, 1971, vol. 1.

11. FALCONE, M.; VAIRO, M.L.R. e BORZANI, W. Processo Simplificado para a Dosagem de Açúcares Redutores Totais em Melaços de Cana. An. Farm. Quim. São Paulo 10 (5/6):69, 1959.
12. FIGUEIREDO, I.B. Comunicação Pessoal. Dados não Publicados.
13. FREEDMAN, D. The Shaker in Bioengineering. Proc. Biochem. 3 (3):29, 1969.
14. GADEN Jr., E.L.; PETSAVIAS, D.N. and WINOKER, J. Citrus Waste Utilization. J. Agric. Food Chem. 2(12):632, 1954.
15. GOLYSHEVA, M.G. et al. Development of conditions for preservation of *Eremothecium ashbyii* strain in active state and production of inoculate. Mikrobiologiya 34 (4):661, 1965. In Chem. Abst. 64:2715 d.
16. GOODWIN, T.W. and PENDLINGTON, S. 1. Studies on Biosynthesis of Riboflavin. Biochem. J. 57:631, 1954.
17. ——— and JONES, O.T.G. 3. Studies on Biosynthesis of Riboflavin. Biochem. J. 64:9, 1956.
18. ——— Production and biosynthesis of riboflavin in microorganisms. In Progress in Industrial Microbiology, ed. D.J.D. Hockenhull, New York, Interscience Publishers, 1959, vol. 1.
19. ——— and HORTON, A.A. 6. Studies in Flavinogenesis. Biochem. J. 75:53, 1960.
20. ——— Vitamins. In Biochemistry of Industrial Microorganisms, ed. C.Rainbow and A.H. Rose, London, Academic Press, 1963.
21. GRAY, P.P.; DUNNIL, P. and LILLY, M.D. Kinetics of  $\beta$ -Galactosidase Production by a Constitutive Mutant of *Escherichia coli*. J. Ferment. Technol. 50 (6):381, 1972.

22. HANSON, A.M. Riboflavin. In Microbial Technology, ed. H.J. Pepler, New York, Reinhold, 1967.
23. HART, F.L. and FISHER, H.J. Modern Food Analysis, New York, Springer - Verlag, 1971.
24. HICKEY, R.J. Production of Riboflavin by Fermentation. In Industrial Fermentations, ed. L.A. Underkofler and R. J. Hickey, New York, Chemical Publishing, 1954, vol. 2.
25. KAPRÁLEK, F. The Physiology of Riboflavin Production by *Eremothecium ashbyii*. J. Gen. Microbiol. 29:403, 1962.
26. KOJIMA, I. *et al.* Fermentative procedures for vitamin production. In Biochemical and Industrial Aspects of Fermentation, K. Sakaguchi; T. Uemura and S. Kinoshita, Tokyo, Kodansha, 1971.
27. ———; YOSHIKAWA, H.; OKAZAKI, M. and TERUI, G. Studies on Riboflavin Production by *Eremothecium ashbyii*. 1. On Inhibiting Factors of Riboflavin Production and Their Control. J. Ferment. Technol. 50 (10):716, 1972.
28. KONO, T. Kinetics of Microbial Cell Growth. Biotechnol. Bioeng. 10:105, 1968.
29. ——— and ASAI, T. Kinetics of Continuous Cultivation. Biotechnol. Bioeng. 11:19, 1969.
30. ——— and ASAI, T. Kinetics of Fermentation Processes. Biotechnol. Bioeng. 11:293, 1969.
31. LEME Jr., J. Análise do Melão. 2ª Semana de Fermentação Alcoólica, ed. J.R. de Almeida, Piracicaba, Instituto Zimotécnico E.S.A.L.Q. - U.S.P., 1966, vol. 1.

32. ————— e Borges, J.M. Açúcar de Cana, Viçosa, Imprensa Universitária URMG, 1965.
33. MACLAREN, J.A. The effects of certain purines and pyrimidines upon the production of riboflavin by *E. ashbyii*. J. Bacteriol. 63:233, 1952.
34. MALZAHN, R.C.; PHILLIPS, R.E. and HANSON, A.M. Bacteriol.Proc. 21, 1963. In Microbial Technology, ed. H.J. Peppler, New York, Reinhold, 1967.
35. MAYNARD, L.A. e LOSSLI, J.K. Nutrição Animal, Rio de Janeiro, Freitas Bastos, 1966.
36. MEASUREMENT OF RHEOLOGICAL PROPERTIES, Zürich, Contraves A.G., 1966.
37. METHODS OF ANALYSIS, ed. W. Horwitz, Washington, Association of Official Agricultural Chemists, 1965.
38. METODOS DE ANALISIS DE VITAMINAS, ed. Asociacion de Químicos de Vitaminas, León, Editorial Academica, 1969.
39. MICKELSON, M.N. The Metabolism of Glucose by *Ashbya gossypii*. J. Bacteriol. 59:669, 1950.
40. MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science 107:254, 1948.
41. MOSS, A.R. and KLEIN, R., British Patent 615.847 (1947). In Industrial Fermentations, ed. L.A. Underkofler and R.J. Hickey, New York, Chemical Publishing, 1954, vol. 2.
42. OLBRICH, H. O Melão, Rio de Janeiro, Edição do Instituto do Açúcar e do Alcool, 1960.
43. OSMAN, H.G. and SOLIMAN, M.H.M. Biosynthesis of riboflavin by *Eremothecium ashbyii*. 4. The nutritional requiremen



ts of carbon and nitrogen. Arch. Microbiol. 46 (3): 247, 1963.

44. PALOMINO, L.N.O. Comportamento Reológico dos Purês de Banana, Goiaba, Manga, Mamão à Temperatura Ambiente e Teste do Desempenho do Viscosímetro de Tubos. Dissertação apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1972.
45. PFEIFFER, V.F.; TANNER Jr., F.W.; VOJNOVICH, C. and TRAUFLER, D. H. Riboflavin by Fermentation with *Ashbya gossypii*. Ind. Eng. Chem. 42 (9):1776, 1950.
46. PHELPS, A.S., U.S. Patent 2.473.818 (1949). In Industrial Fermentations, ed. L.A. Underkofler and R.J. Hickey, - New York, Chemical Publishing, 1954, vol. 2.
47. PIERSMA, H.O., U.S. Patent 2.400.710 (1946). In Industrial - Fermentations, ed. L.A. Underkofler and R.J. Hickey, New York, Chemical Publishing, 1954, vol. 2.
48. PRESCOTT, S.C. and DUNN, C.G. Industrial Microbiology, New York, McGraw - Hill, 1959.
49. PRIDHAM, T.G. and RAPER, K.B. *Ashbya gossypii* - Its Significance in Nature and in the Laboratory. Mycologia 42 (5):503, 1950.
50. ——— and ——— Studies on Variation and Mutation in *Ashbya gossypii*. Mycologia 44 (4):452, 1952.
51. ——— Microbial Synthesis of Riboflavin. Econ. Botany 6 (2):185, 1952.
52. ROSEMBERG, J.A. Aplicações do Melaço de Cana nas Indústrias - de Fermentações e nos Laboratórios de Microbiologia Brasil Açúc. 72 (3):49, 1968.
53. ROSSELL, C.E.V. Obtenção de Ácido Giberélico por Fermentação com *Gibberella fujikuroi*. Dissertação apresentada à

Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1972.

54. RYU, D.Y. and HUMPHREY, A.E. A Reassessment of Oxygen-Transfer Rates in Antibiotics Fermentations. J. Ferment. Technol. 50 (6):424, 1972.
55. SAKAGUCHI, K., UEMURA, T. and KINOSHITA, S. Biochemical and Industrial Aspects of Fermentation, Tokyo, Kodansha 1971.
56. SANCHEZ-MARROQUIN, A.; MANRIQUE, S. y VIERNA, L. Producción de riboflavina con *Exemothecium ashbyii* en jugo de Agave. Microbiol. Espan. 23 (2):113, 1970.
57. —————; LEDEZMA, M. and BARPEIRO, J. Oxygen - Transfer and Scale - Up in Lysine Production by *Ustilago maydis* mutant. Biotechnol. Bioeng. 13:419, 1971.
58. SPIEGEL, M.R. Estatística, Rio de Janeiro, Livro Técnico, 1969.
59. STILES, H.R., U.S. Patent 2,483,855 (1949). In Industrial Fermentations, ed. L.A. Underkofler and R. J. Hickey, New York, Chemical Publishing, 1954, vol. 2.
60. SUMINO, Y.; AKIYAMA, S. and FUKUDA, H. Performance of the shaking flask. 1. Power consumption. J. Ferment. Technol. 50 (3):203, 1972.
61. TAGUCHI, H. The Nature of Fermentation Fluids, In Advances in Biochemical Engineering, ed. T.K. Ghose and A. Fiechter, New York, Springer - Verlag, 1971, vol. 1.
63. TANNER Jr., F.W.; VOJNOVICH, C. and VAN LANEN, J.M. Factors Affecting Riboflavin Production by *Ashbya gossypii*. J. Bacteriol. 58:737, 1949.
64. TUFFILE, C.M. and PINHO, F. Determination of Oxygen - Transfer Coefficients in Viscous Streptomycete Fermenta-

tions. Biotechnol. Bioeng. 12:849, 1970.

64. YAW, K.E. Production of riboflavin by *E. ashbyii* grown in a synthetic medium. Mycologia 44:307, 1952.
65. WAGNER, A.F. and FOLKERS, K. Vitamins and Coenzymes, New York, Interscience Publishers, 1964.
66. WICKERHAM, L.S., FLICKINGER, M.H. and JOHNSON, R.M. Production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. Arch. Biochem. 9: 95, 1946.

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelas possibilidades oferecidas para que esta tese fosse desenvolvida.

À Universidade Estadual de Londrina, pela ajuda econômica dispensada.

Aos colegas do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina e do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio recebido.

Aos Engenheiros Sérgio Roberto Dall'Oca e Alfredo de Almeida Vitali, bem como, ao Sr. Antônio José Quirino Simões, pela assistência, sugestões e discussões de diversas partes do trabalho.

Aos Engenheiros Carlos Eduardo Vaz Rossell e Iracema de Oliveira Moraes pelo apoio e incentivo recebidos.

A Senhorita Maria Hayako Tanaka, pelo trabalho de datilografia e ao Senhor Henrique Lück, pelo auxílio na confecção dos gráficos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.