

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

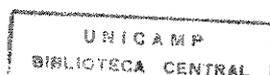
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Eng. Rodrigo de Oliveira Moraes

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE  
POR FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO  
EM COLUNAS DE RAIMBAULT**

Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE  
POR FERMENTAÇÃO EM SUBSTRATO SÓLIDO  
EM COLUNAS DE RAIMBAULT**

Autor

Eng. Rodrigo de Oliveira Moraes

Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Agosto de 1999

NIL/AUC	DL
CHAMADA:	UNICAMP
	M791e
Ex.	
EMBO BC/	38876
POC.	229/99
D	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REQO	R\$ 11,00
DATA	05/10/99
* CPD	

CM-00126232-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

M791e Moraes, Rodrigo de Oliveira  
Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por  
fermentação em substrato sólido em colunas de  
Raimbault / Rodrigo de Oliveira Moraes.--Campinas,  
SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Beta-galactosidase. 2. Bioreatores. 3. Fermentação.  
4. Análise fatorial. 5. Superfícies de resposta. I. Santana,  
Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Mestrado defendida e aprovada em 06 de agosto de 1999 pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:



---

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana



---

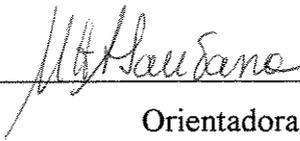
Profª Drª Deise Maria Fontana Capalbo



---

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Mestrado em Engenharia Química defendida por Rodrigo de Oliveira Moraes e aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de agosto de 1999.



---

Orientadora

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana

Aos meus pais, às minhas irmãs, à Goreti, ao Adriano,  
ao Carlos, ao Renato, ao Marcos, ao Ian e ao Lon.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profª Drª Maria Helena Andrade Santana pela orientação e amizade durante este trabalho.

Aos professores e funcionários da Área de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos que colaboraram para a elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana pela concessão do uso de seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda pela concessão do uso de seu laboratório.

Aos Sr. José Luiz Agapito Fernandes, Julio Botelho e Wilson Pauleto, da Corn Products Brasil Ltda., pela concessão do uso do laboratório da empresa.

Aos M. Engº José Antonio Marques Pereira e Fábio Ribeiro Campos da Silva pelo grande auxílio na parte experimental e pela amizade.

Ao Vinícius Cruz pela amizade e pelo auxílio na parte experimental.

Aos colegas de faculdade, em especial ao Eduardo Godoi, ao Marcelo Pontes, ao Marcelo, ao Heron, ao Igor, ao Salah, ao Adriano, ao Cesar, ao Eduardo, ao Victor, à Fernanda, à Oselys, à Rosana, à Denise, à Giuliana, à Paula, à Roberta, à Sandra e a você, que eu me esqueci de citar.

Aos amigos do Pio XII, do Cleso, da Unesp – Rio Preto e de São Paulo, em especial à Engª Simone Schlemm.

À Engª Cristiane de Freitas Martini e família, pelo apoio e pela paciência.

Ao Presidente da A.A.P.P. Sérgio Carnielli pelas inúmeras alegrias.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>i</b>
---------------	----------

---

<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
-----------------	-----------

---

### CAPÍTULO 1

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
-------------------	----------

---

1.1. Objetivo	3
---------------	---

---

### CAPÍTULO 2

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
------------------------------	----------

---

2.1. Importância da $\beta$ -Galactosidase	5
--	---

---

2.2. Produção da $\beta$ -Galactosidase	7
---	---

---

2.3. Fermentação em Substrato Sólido (FSS)	9
--	---

---

2.4. Reatores para FSS	10
------------------------	----

---

2.5. Microrganismos produtores em FSS	11
---------------------------------------	----

---

2.6. Substratos para FSS	11
--------------------------	----

---

2.7. Parâmetros importantes em processos de FSS	13
---	----

---

2.7.1. Umidade e atividade de água ( $a_w$ )	14
--	----

---

2.7.2. Temperatura e Transferência de calor	15
---	----

---

2.7.3. Transferência de massa	17
-------------------------------	----

---

2.7.3.1. Transferência de massa entre-partículas	17
--	----

---

2.7.3.2. Transferência de massa intra-partículas	17
--	----

---

2.8. Planejamento Fatorial	18
----------------------------	----

---

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

19

3.1. Sistema de colunas de Raimbault	19
3.1.1. Fornecimento de ar	20
3.1.2. Distribuidor e umidificador primário	21
3.1.3. Painel de controle e medida de vazão	21
3.1.4. Umidificadores secundários	23
3.1.5. Reatores de coluna	23
3.1.6. Controle de temperatura	25
3.1.7. Medidor de vazão	26
3.1.8. Medida de umidade relativa	26
3.2. Medições	26
3.2.1. Medida de atividade de água	26
3.2.2. Medida do pH	27
3.2.3. Determinação de umidade em bases seca e úmida	27
3.3. Fermentação em Substrato Sólido	27
3.3.1. Substrato	27
3.3.2. Inóculo	28
3.4. Extração das proteínas	29
3.5. Análises	30
3.5.1. Análise da atividade enzimática	30
3.5.2. Análise de proteínas	31
3.6. Planejamento fatorial	32
3.6.1. Primeira Série de Experimentos	32
3.6.2. Segunda Série de Experimentos	33
3.6.3. Terceira Série de Experimentos	34
3.6.4. Quarta Série de Experimentos	35
3.6.5. Análise estatística das respostas	35

## CAPÍTULO 4

<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>38</b>
4.1. Primeira Série de Experimentos	38
4.2. Segunda Série de Experimentos	40
4.2.1. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/mL	41
4.2.2. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA	44
4.2.3. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/t	47
4.2.4. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/g <sub>Sseco</sub>	50
4.3. Terceira Série de Experimentos	53
4.3.1. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/mL	54
4.3.2. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA	59
4.3.3. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/t	63
4.3.4. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/g <sub>Sseco</sub>	68
4.4. Quarta Série de Experimentos	73
4.4.1. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/mL	74
4.4.2. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA	78
4.4.3. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/t	82
4.4.4. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/g <sub>Sseco</sub>	86

4.5. Caracterização da fermentação nas condições otimizadas	90
4.6. Considerações finais	96

---

## **CAPÍTULO 5**

### **CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS**

#### **TRABALHOS** **98**

---

5.1. Conclusões	98
-----------------	----

---

5.2. Sugestões para próximos trabalhos	99
--	----

---

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **100**

---

#### **APÊNDICE** **106**

---

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Exemplos de produtos farmacêuticos que contêm $\beta$ -galactosidase	1
Fig. 2. Taxas de crescimento específico como função da atividade de água (COONEY, 1981)	15
Fig. 3 – Efeito da temperatura na taxa de crescimento específico de psicrófilos, mesófilos e termófilos (COONEY, 1981)	16
Fig. 4 – Fotografia do sistema de colunas de Raimbault utilizado neste trabalho	20
Fig. 5 – Vista lateral do distribuidor e umidificador primário	22
Fig. 6 – Painel de controle de vazão	22
Fig. 7 – Umidificador secundário	23
Fig. 8 – Reator de coluna	24
Fig. 9 – Disposição das colunas na caixa de vidro e banho termostático	25
Fig. 10 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/mL	42
Fig. 11 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e vazão de ar (Q) com resposta em UA/mL	42
Fig. 12 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e tempo de fermentação (t) com resposta em UA/mL	43

Fig. 13 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/mL)	43
Fig. 14 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA	45
Fig. 15 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e vazão de ar (Q) com resposta em UA	45
Fig. 16 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e tempo de fermentação (t) com resposta em UA	46
Fig. 17 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA)	46
Fig. 18 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/t	48
Fig. 19 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e vazão de ar (Q) com resposta em UA/t	48
Fig. 20 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e tempo de fermentação (t) com resposta em UA/t	49
Fig. 21 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/t)	49
Fig. 22 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	51
Fig. 23 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	51

Fig. 24 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ inicial do substrato e tempo de fermentação (t) com resposta em $UA/g_{S_{seco}}$	52
Fig. 25 – Representação dos resultados para atividade enzimática ( $UA/g_{S_{seco}}$ )	52
Fig. 26 – Planejamento para a 3ª série de experimentos em função do melhor resultado anteriormente obtido	53
Fig. 27 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em $UA/mL$	57
Fig. 28 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em $UA/mL$	57
Fig. 29 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e $U_{bs}$ com resposta em $UA/mL$	58
Fig. 30 – Representação dos resultados para atividade enzimática ( $UA/mL$ )	58
Fig. 31 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA	61
Fig. 32 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em UA	62
Fig. 33 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e $U_{bs}$ com resposta em UA	62
Fig. 34 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA)	63
Fig. 35 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em $UA/t$	66
Fig. 36 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em $UA/t$	66

Fig. 37 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e $U_{bs}$ com resposta em UA/t	67
Fig. 38 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/t)	67
Fig. 39 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	70
Fig. 40 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	71
Fig. 41 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e $U_{bs}$ com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	71
Fig. 42 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/g <sub>Sseco</sub> )	72
Fig. 43 – Representação da 5ª série de experimentos	73
Fig. 44 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em UA/mL	77
Fig. 45 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/mL)	78
Fig. 46 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em UA	81
Fig. 47 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA)	82
Fig. 48 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em UA/t	85
Fig. 49 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/t)	86
Fig. 50 – Representação em superfície de resposta para as variáveis $U_{bs}$ e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	89

Fig. 51 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/g <sub>Sseco</sub> )	90
Fig. 52 – Cinética comparativa da fermentação com relação a $U_{bs}$ , $U_{bu}$ , $a_w$ , pH e UA/mL	91
Fig. 53 – Cinética comparativa da fermentação com relação a $U_{bs}$ , $U_{bu}$ , $a_w$ , pH e UA	91
Fig. 54 – Cinética comparativa da fermentação com relação a $U_{bs}$ , $U_{bu}$ , $a_w$ , pH e UA/t	92
Fig. 55 – Cinética comparativa da fermentação com relação a $U_{bs}$ , $U_{bu}$ , $a_w$ , pH e UA/g <sub>Sseco</sub>	93
Fig. 56 – Cinética comparativa da fermentação com relação a $U_{bs}$ , $U_{bu}$ , $a_w$ , pH e UA/mg <sub>PT</sub>	93
Fig. 57 – Cinética comparativa da fermentação com relação a $U_{bs}$ , $U_{bu}$ , $a_w$ , pH e PT	94
Fig. 58 – Comparação entre o aumento da concentração de proteínas e a atividade enzimática do extrato expressa em UA/mL, no decorrer do tempo de fermentação	95
Fig. 59 – Comparação entre atividade de água e a umidade em base úmida no decorrer do tempo de fermentação	96
APÊNDICE – Fig. 1 – Programa em Fortran para o cálculo dos parâmetros ótimos e dos valores máximos de resposta	106
APÊNDICE – Fig. 2 – Programa em Fortran para o cálculo da máxima resposta de UA/mL e dos valores ótimos dos parâmetros experimentados	107
APÊNDICE – Fig. 3 – Programa em Fortran para o cálculo da máxima resposta de UA e dos valores ótimos dos parâmetros experimentados	107
APÊNDICE – Fig. 4 – Programa em Fortran para o cálculo da máxima resposta de UA/t e dos valores ótimos dos parâmetros experimentados	108

APÊNDICE – Fig. 5 – Programa em Fortran para o cálculo da  
máxima resposta de  $UA/g_{Sseco}$  e dos valores ótimos dos  
parâmetros experimentados

---

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Vantagens da FSS em relação à FSL (RAIMBAULT, 1997)	2
Quadro 2 – Desvantagens da FSS em relação à FSL (RAIMBAULT, 1997)	2
Quadro 3 – Microrganismos produtores de $\beta$ -galactosidase e os meios de produção	7
Quadro 4 – Aplicações da FSS na indústria (RAIMBAULT, 1997)	10
Quadro 5 – Microrganismos utilizados na FSS e suas aplicações (RAIMBAULT, 1997)	12
Quadro 6 – Níveis de garantia do substrato utilizado	28
Quadro 7 – Características do substrato	28
Quadro 8 – Planejamento Fatorial para o 1º experimento	32
Quadro 9 – Planejamento Fatorial em valores codificados e reais para o 2º experimento	33
Quadro 10 – Planejamento Fatorial em valores codificados e reais para o 3º experimento	34
Quadro 11 – Planejamento Fatorial em valores codificados e reais para o 4º experimento	35
Quadro 12 – Tabela ANOVA	36
Quadro 13 – Resultados da 1ª série de experimentos	38
Quadro 14 – Estimativa dos efeitos para a resposta UA/mL	39
Quadro 15 – Resultados da 2ª série de experimentos	40
Quadro 16 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA/mL	41

Quadro 17 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA	44
Quadro 18 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA/t	47
Quadro 19 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA/g <sub>Sseco</sub>	50
Quadro 20 – Resultados para a 3ª série de experimentos	54
Quadro 21 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA/mL	55
Quadro 22 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA/mL	55
Quadro 23 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA	59
Quadro 24 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA	60
Quadro 25 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA/t	63
Quadro 26 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA/t	64
Quadro 27 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA/g <sub>Sseco</sub>	68
Quadro 28 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	69
Quadro 29 – Resultados para a 4ª série de experimentos	73
Quadro 30 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA/mL	74
Quadro 31 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA/mL	74
Quadro 32 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA	78

Quadro 33 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA	79
Quadro 34 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA/t	82
Quadro 35 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA/t	83
Quadro 36 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	86
Quadro 37 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA/g <sub>Sseco</sub>	87
Quadro 38 – Valores encontrados no estudo da cinética da fermentação	90

## RESUMO

A enzima  $\beta$ -galactosidase é a responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose. Na ausência de  $\beta$ -galactosidase, a lactose, açúcar predominante do leite, não é digerida, causando aumento na pressão osmótica dentro do intestino delgado e conseqüentes sintomas de dor abdominal, diarreia e flatulência. Este mal é conhecido como Intolerância à Lactose, e ocorre em aproximadamente 2/3 da população adulta mundial.

Estudos anteriores mostraram a capacidade do fungo *Scopulariopsis sp* de produzir  $\beta$ -galactosidase em Fermentação em Substrato Sólido (FSS). A FSS apresenta como vantagens em relação à Fermentação em Substrato Líquido (FSL) a possibilidade do uso de substratos insolúveis como resíduos agroindustriais, condições de assepsia mais amenas, baixos consumo de água e energia, menor produção de efluentes e volume e custo de equipamentos menores. Como desvantagens, têm-se a dificuldade no controle de temperatura, no escalonamento para plantas industriais e o risco de contaminação devido à baixa taxa de crescimento dos fungos.

Dentre os reatores de escala laboratorial, o sistema de colunas de Raimbault apresenta vantagens em relação ao sistema estático convencional em frascos por possibilitar a condução da fermentação em diferentes condições experimentais simultaneamente, em reatores de leito fixo aproximadamente isotérmicos com injeção de ar úmido à vazão controlada.

A produção de  $\beta$ -galactosidase foi otimizada através da técnica de planejamento fatorial, em relação aos parâmetros umidade inicial do substrato, vazão de ar e tempo de fermentação, os quais apresentaram maior significância no processo.

Os resultados obtidos mostram que, para o tempo de fermentação de 168 horas, os níveis ótimos dos parâmetros são 2,98 L/h de ar e 0,531 de umidade inicial para o substrato em base seca. Nessas condições, a máxima atividade enzimática é de 4,775 UA/mL.

Nas condições otimizadas, a fermentação foi caracterizada através dos perfis temporais de atividade enzimática, concentração de proteínas, pH, atividade de água e umidade do substrato.

## ABSTRACT

The enzyme  $\beta$ -Galactosidase is responsible for the hydrolysis of lactose in glucose and galactose. In the absence of  $\beta$ -galactosidase, the predominant sugar of milk, lactose, is not digested, causing an increase of osmotic pressure inside the small intestine and consequent symptoms of abdominal pain, diarrhea and flatulence. This disease is known as Lactose Intolerance and occurs in about 2/3 of world adult population.

Previous studies had shown the capacity of the mold *Scopulariopsis* sp. to produce  $\beta$ -galactosidase in Solid Substrate Fermentation (SSF). The SSF presents as advantages related to Submerged Fermentation (SmF) the possibility of the use of insoluble substrate such as agro-industrial wastes, mild conditions of asepsis, low electric power consumption, waste water generation, equipment volume and cost. As disadvantages it shows a difficulty to control temperature, the scaling-up for industrial plants and the risk of contamination due to the low growth rate of the molds.

Amongst the reactors for laboratorial scale, Raimbault columns reactor setup presents advantages related to conventional static fermentation in flasks since it makes possible the conduction of the process in different experimental conditions, in approximately isothermal fixed-bed reactors with a controlled intake of humid air.

The production of  $\beta$ -galactosidase was optimized using the technique of factorial planning in relation to the parameters initial moisture of the substrate, air flow and fermentation time, which had presented greater significance in the process.

The results obtained show that, for a 168 hours-fermentation time, the optimum levels of the parameters are 2.98 L/h of air and 0,531 of initial moisture for the substrate in dry base. In these conditions, the maximum enzyme activity is 4.775 UA/mL.

At the optimized conditions, fermentation was characterized through time profiles of enzyme activity, protein concentration, pH, water activity and moisture of the substrate.

## CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

A enzima  $\beta$ -galactosidase encontra aplicações na área alimentícia, tanto na produção de derivados de leite, caso do leite condensado, de alimentos dietéticos para pessoas que apresentam intolerância à lactose, quanto no tratamento de resíduos da indústria, como o soro de leite, e na área farmacêutica, na forma de cápsulas, pastilhas ou pó solúvel, também com a finalidade de aliviar os efeitos da intolerância à lactose e facilitar a digestão de alimentos derivados de leite. A Figura 1 mostra alguns exemplos de produtos farmacêuticos que contêm  $\beta$ -galactosidase.



Figura 1 - Exemplos de produtos farmacêuticos que contêm  $\beta$ -galactosidase

A produção de  $\beta$ -Galactosidase tem sido estudada em Fermentação em Substrato Líquido (FSL) com leveduras (CHAMPLUVIER et al, 1988; CHEN et al, 1992; LINAWATI et al, 1992;

ALEGRE, 1988; GOMEZ et al, 1983), fungos (CASTILLO et al, 1984) e bactérias (FLÔRES, 1995). Os estudos da produção da  $\beta$ -Galactosidase através de Fermentação em Substrato Sólido (FSS) são mais escassos, e foram feitos com fungos cultivados em frascos (PASTORE, 1982; PARK et al, 1979).

A FSS apresenta várias vantagens em relação à FSL. As suas desvantagens estão associadas principalmente à dificuldade na homogeneização do sistema e na transferência de calor. Nos quadros 1 e 2 são apresentadas as principais vantagens e desvantagens da FSS em relação à FSL.

Quadro 1 – Vantagens da FSS em relação à FSL (RAIMBAULT, 1997)

FATOR	FSL	FSS
Substratos	Substratos Solúveis (açúcares)	Substratos Insolúveis Poliméricos (amido, celulose, pectinas, ...)
Condições de assepsia	Esterilização por calor e controle de assepsia	Tratamento por vapor e condições não estéreis
Água	Grandes volumes de água consumidos e de produção de efluentes	Consumo de água limitado, baixa atividade de água ( $a_w$ ) e ausência de efluentes
Aeração	Limitação pela solubilidade do oxigênio e altas quantidades de ar requeridas	Aeração facilitada e grande superfície de transferência de massa
Contaminação	Risco de contaminação por bactérias	Risco de contaminação devido à baixa taxa de crescimento fúngica. Por outro lado, dificulta contaminação bacteriana devido à baixa $a_w$
Energia	Alto consumo de energia	Baixo consumo de energia
Volume e custo do equipamento	Grandes volumes e alto custo tecnológico	Pequenos volumes e baixo custo dos equipamentos

Quadro 2 – Desvantagens da FSS em relação à FSL (RAIMBAULT, 1997).

FATOR	FSL	FSS
Aquecimento metabólico	Fácil controle de temperatura	Baixa capacidade de transferência de calor
Agitação	Produz boa homogeneização	Condições estáticas são preferidas
Escalonamento	Equipamentos industriais disponíveis	Necessidade de engenharia e projeto de novos equipamentos
Inoculação e processo	Inoculação fácil e processo contínuo	Inoculação por esporos e processo em batelada

Um dos problemas da FSS é a baixa capacidade de transferência de calor do substrato sólido, o que causa dificuldades na dissipação do calor gerado pelo metabolismo do microrganismo e a conseqüente ocorrência de gradientes de temperatura no interior de reatores estáticos

Em escala laboratorial, esse problema é minimizado com o uso do sistema de colunas de Raimbault, onde existe a injeção de ar úmido ao leito fixo, promovendo a evaporação da água presente no substrato e a conseqüente perda de energia térmica pelo mesmo. Outro meio de controle de temperatura neste sistema constitui-se no banho térmico no qual as colunas se encontram mergulhadas. Outra vantagem da aeração forçada é a constante administração de oxigênio ao meio, evitando-se assim a limitação do crescimento microbiano por este fator.

Comparado ao sistema convencional de FSS em frascos, o sistema de colunas de Raimbault apresenta ainda a vantagem de possibilitar a condução da fermentação em diversas condições experimentais simultaneamente, em reatores de leito fixo aproximadamente isotérmicos

Neste trabalho foi estudada a FSS para a produção de  $\beta$ -galactosidase em colunas de Raimbault. A relevância desta pesquisa está não só no estudo da produção de uma enzima de expressivo valor na indústria alimentícia e farmacêutica, mas sobretudo na contribuição para a sua produção através da FSS, cujos estudos de processo ainda são escassos.

### **1.1. Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por FSS abordando os aspectos de otimização de variáveis importantes do processo e caracterização cinética da fermentação nas condições otimizadas.

O estudo foi feito nas seguintes etapas:

- montagem e calibração do sistema de colunas de Raimbault;

- planejamento fatorial dos experimentos;
- identificação dos parâmetros importantes do processo;
- otimização dos parâmetros através da metodologia de superfícies de resposta, e
- caracterização cinética da fermentação.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Importância da $\beta$ -Galactosidase

A  $\beta$ -galactosidase (EC.3.2.1.23) é uma enzima produzida naturalmente pelas células presentes no intestino delgado do homem. Tem como função a hidrólise da lactose, o açúcar predominante do leite, em glicose e galactose. Quando não hidrolisada, a lactose não é absorvida no trato intestinal, causando um aumento no gradiente osmótico no interior do intestino delgado e conseqüente perda de líquidos por parte do organismo, o que causa diarreia. Esta lactose também é fermentada por bactérias presentes no cólon, produzindo gases como hidrogênio, dióxido de carbono e metano, o que causa flatulência. Estes sintomas são acompanhados também por dores abdominais. Pessoas que apresentam esses sintomas quando da ingestão de produtos que contém lactose são conhecidos como intolerantes à lactose (TOTH, 1999).

A intolerância à lactose acomete perto de 2/3 da população mundial. Nos Estados Unidos, onde pesquisas a esse respeito foram mais aprofundadas, têm-se os seguintes dados: entre 30 e 50 milhões de americanos apresentam intolerância à lactose, sendo que algumas fatias étnicas da população são mais afetadas do que outras; 75% dos descendentes de africanos e índios, e 90%

dos descendentes de asiáticos são intolerantes à lactose. Este mal atinge com menor frequência os descendentes de europeus (LVHHN, 1999).

A intolerância à lactose assume três tipos:

a) Primária – Deficiência de  $\beta$ -galactosidase na pessoa adulta. A produção da enzima diminui com a idade, como um efeito recessivo autossomático. É mais comum na adolescência e no início da idade adulta. A severidade dos sintomas dependem da atividade da  $\beta$ -galactosidase intestinal e da quantidade de lactose ingerida.

b) Secundária – Deficiência temporária de  $\beta$ -galactosidase causada por infecção gastrointestinal ou por desordens intestinais causadas por ingestão de medicamentos.

c) Congênita – Condição extremamente rara que resulta na completa ausência de  $\beta$ -galactosidase devido a defeito genético (TOTH, 1999).

Não sendo conhecida uma cura para o mal da intolerância à lactose, faz-se necessário o uso de produtos derivados de leite que tenham sua quantidade de lactose reduzida, ou a ingestão de suplementos de  $\beta$ -galactosidase disponíveis no mercado.

A  $\beta$ -galactosidase também é de especial importância na indústria de laticínios, onde apresenta aplicação tanto na fase de produção, para queijos, iogurtes, sorvetes e leite condensado, como para a fase de tratamento dos efluentes, em especial do soro de leite, de alto valor de carga orgânica. A lactose é o maior subproduto da produção de queijo, constituindo aproximadamente 70% dos sólidos do soro. O produto hidrolisado deste soro pode ser utilizado na própria indústria tanto como edulcorante quanto como substituinte para sólidos de xarope de milho (ZVI et al, 1977).

## 2.2. Produção da $\beta$ -galactosidase

$\beta$ -Galactosidase é produzida através de vários tipos de processos fermentativos e vários agentes de fermentação, como mostra o quadro 3:

Quadro 3 – Microorganismos produtores de  $\beta$ -galactosidase e os meios de produção.

Agentes da fermentação	Tipo de fermentação	fonte
<b>Leveduras</b>		
<i>Candida pseudotropicalis</i>	FSL	GOMEZ et al, 1983
<i>Kluyveromyces</i> sp.	FSL	CHAMPLUVIER et al, 1988
<i>Saccharomyces fragilis</i>	FSL	ALEGRE, 1988
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FSL	LINAWATI et al, 1992
<i>Kluyveromyces</i> sp.	FSL	CHEN et al, 1992
<b>Fungos</b>		
<i>Aspergillus oryzae</i>	FSS	PARK et al, 1979
<i>Scopulariopsis</i> sp.	FSS	PASTORE, 1982
<i>Trichoderma reesei</i>	FSL	CASTILLO et al, 1984
<b>Bactéria</b>		
<i>Erwinia aroidae</i>	FSL	FLÔRES, 1995

Utilizando-se de soro de queijo como meio líquido para fermentação contínua, através da levedura *Candida pseudotropicalis*, GOMEZ et al (1983) estudaram a otimização de parâmetros relativos ao crescimento celular e à composição do meio de cultura para a produção de  $\beta$ -galactosidase.

CHAMPLUVIER et al (1988) utilizaram várias linhagens da levedura *Kluyveromyces* para a produção de  $\beta$ -galactosidase intracelular em FSL e estudaram vários métodos de permeabilização da membrana celular para a utilização da enzima confinada.

ALEGRE (1988) estudou a produção de  $\beta$ -galactosidase em várias linhagens das leveduras *Saccharomyces fragilis* e *Candida pseudotropicalis*. Uma das linhagens de *Saccharomyces*

*fragilis* obteve o melhor resultado para o consumo de lactose em soro de queijo concentrado, que era o objetivo do trabalho.

LINAWATI et al (1992) produziram  $\beta$ -galactosidase através de FSL utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em um sistema de reação do tipo batelada alimentada com a finalidade de desenvolver um modelo não-estruturado que descrevesse o crescimento da levedura e o comportamento da produção da enzima.

Também a levedura *Kluyveromyces fragilis* foi utilizada por CHEN et al (1992) para produzir  $\beta$ -galactosidase em meio líquido, e o estudo baseou-se em um planejamento fatorial para a determinação do meio de cultura ótimo para uma melhor produtividade, utilizando-se também da metodologia de superfícies de resposta.

CASTILLO et al (1984) estudaram a produção de  $\beta$ -galactosidase em fermentação submersa contínua através do fungo *Trichoderma reesei*, avaliando diversas fontes de carbono para a constituição de um meio de fermentação ótimo.

Soro de queijo foi utilizado para a produção de  $\beta$ -galactosidase pela bactéria *Erwinia aroideae* por FLÔRES (1995). Neste trabalho, estudou-se a suplementação do meio de cultura, a variação da temperatura de fermentação e a caracterização cinética da enzima obtida.

Já utilizando-se de sistema de FSS, PARK et al (1979) fizeram um estudo para a seleção de fungos que produzissem  $\beta$ -galactosidase extracelular utilizando farelo de trigo como substrato. Dentre os fungos *Scopulariopsis* sp., *Spicaria* sp. e *Aspergillus niger*, o primeiro mostrou maior produtividade, atingindo o valor de 1,40  $\mu\text{mol}_{\text{ONP}}/\text{min}/\text{mL}$ . Este trabalho mostra, também, que a  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis* sp, produzida em FSS, é altamente termoestável e bastante ativa em pH ácido comparada à  $\beta$ -galactosidase produzida através de leveduras.

PASTORE (1982) também produziu  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. em meio sólido, com farelo de trigo como substrato. Neste trabalho, estudou-se, além da produção, a purificação da enzima e determinou-se as características da enzima purificada. Dentre as várias linhagens

estudadas, a de melhor resultado apresentou a atividade enzimática de 1,26  $\mu\text{mol}_{\text{ONP}}/\text{min}/\text{mL}$  e 4,21 unidades de atividade por mg de proteína para o preparado bruto. O procedimento para a obtenção deste preparado era através da adição de 200 mL de água deionizada a 20 g de substrato fermentado, trituração através de bastão de vidro, filtração em papel Whatman nº 1, precipitação com álcool etílico 70% (v/v), centrifugação e secagem a frio. A fermentação foi feita em frascos erlenmeyer de 500 mL, incubados a 30 °C, contendo 20 g de meio de cultura constituído de partes iguais de farelo de trigo e de água deionizada, e inoculados com 1 mL de suspensão de esporos.

### 2.3. Fermentação em Substrato Sólido (FSS)

A FSS é um processo microbiano que ocorre principalmente na superfície de materiais sólidos que têm como propriedade a capacidade de absorver ou conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Os materiais sólidos podem ser biodegradáveis, como amido e celulose, ou não, como amberlite e poliuretano (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997).

Os seguintes processos são exemplos típicos de FSS:

- “Koji” japonês, produzido através de arroz, como substrato sólido, e o fungo *Aspergillus oryzae*.

- “Tempeh” da Indonésia ou “Ragi” da Índia, que usam sementes de leguminosas quebradas como substrato e uma variedade de fungos não-tóxicos como inóculo microbiano.

- Queijo azul francês, que usa queijo fresco como substrato e fungos como *Penicillium roquefortii* como inóculo.

- Compostagem de fibras lignocelulósicas, naturalmente contaminadas por uma grande variedade de microrganismos como bactérias celulolíticas, fungos e *Streptomyces* sp. (RAIMBAULT, 1997).

Atualmente, na indústria de fermentação, a FSS é aplicada para a obtenção de vários produtos. No quadro 4 são apresentadas algumas dessas aplicações.

Quadro 4 – Aplicações da FSS na indústria (RAIMBAULT, 1997).

Aplicação	Exemplos
Alimentos fermentados	Koji, Tempeh, Ragi, Attieke, Queijos
Bioconversão de resíduos	bagaço de cana, polpa de café
Aditivos de alimentos	flavorizantes, corantes, óleos essenciais
Bioinseticidas	<i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> , <i>Trichoderma</i>
Crescimento de plantas, hormônios	<i>Rhizobium</i> , <i>Trichoderma</i> , Giberelina
Produção de enzimas	amilases, celulasas, proteases, pectinases, xilanases
Fármacos	penicilina e probióticos
Produção de ácidos orgânicos	ácidos cítrico, fumárico, gálico, láctico
Fermentação alcoólica	<i>Schwanniomyces</i> sp., malteação
Metabólitos fúngicos	Hormônios e alcalóides

#### 2.4. Reatores para FSS

Há três tipos básicos de reatores para FSS: os de bandeja, os agitados e os de leito empacotado.

Os reatores de bandeja são caracterizados por sua simplicidade. O substrato é disposto sobre bandejas de madeira ou aço-inox, normalmente perfuradas, a fim de se facilitar a convecção de ar. Além das bandejas, são utilizadas bolsas plásticas microporosas para o acondicionamento do substrato a fermentar. Neste tipo de reator, não há aeração forçada nem agitação mecânica. Por esse motivo, para evitar o aquecimento metabólico do meio e para manter condições aeróbias, apenas camadas finas de sólidos podem ser usadas.

Entre os reatores agitados incluem-se os rotativos, tradicionalmente em forma de tambor, podendo ou não conter chicanas em seu interior. Existem também os reatores estáticos, em que outros sistemas de agitação asseguram a mistura do meio sólido, como, por exemplo, um tacho de bater massa de panificação adaptado e um vaso cilíndrico horizontal com uma rosca sem-fim

interna. A agitação pode ser contínua ou esporádica, o controle de temperatura é difícil, e a mistura do meio é associada com problemas de cisalhamento e danificação da estrutura de alguns microrganismos ou do próprio meio.

Os reatores do último tipo incluem os de leito empacotado e aeração forçada através da camada de substrato. Muitas variações de projeto são possíveis. Para uso em laboratório, esses reatores são tipicamente colunas cilíndricas feitas de vidro ou plástico. O controle da temperatura é feito através da colocação da coluna em um banho térmico ou utilizando-se colunas encamisadas com circulação de líquido refrigerante. A própria aeração forçada permite o controle da temperatura ao forçar a evaporação da água constituinte do substrato (DURAND, 1997).

## **2.5. Microrganismos usados em FSS**

Bactérias, leveduras e fungos podem crescer sob condições de fermentação sólida. As bactérias são principalmente utilizadas em compostagem, silagem e processos alimentícios. Leveduras são usadas para a produção alcoólica, de alimentos ou de ração. Os fungos filamentosos, porém, constituem o grupo de microrganismos mais importante usado em processos de FSS devido a suas características fisiológicas e bioquímicas.

O quadro 5 apresenta alguns exemplos de processos de FSS para cada categoria de microrganismo envolvida.

## **2.6. Substratos para FSS**

Geralmente, os substratos para FSS são compostos ou produtos heterogêneos da agricultura ou subprodutos da agroindústria. Suas estruturas macromoleculares básicas (celulose, amido, pectina, lignocelulose, fibras) conferem as propriedades de sólido aos substratos. A macromolécula estrutural pode simplesmente fornecer uma matriz inerte onde o carbono e as fontes de energia (açúcares, lipídeos, ácidos orgânicos) são absorvidos (bagaço de cana, fibras

inertes, resinas). Na maioria dos casos, porém, a matriz macromolecular representa o substrato, e fornece também o carbono e a fonte de energia.

Quadro 5 – Microrganismos utilizados na FSS e suas aplicações (RAIMBAULT, 1997).

<b>Microflora</b>	<b>Processo FSS</b>
<b>Bactérias</b>	
<i>Bacillus</i> sp.	Compostagem, amilase
<i>Pseudomonas</i> sp.	Compostagem
<i>Serratia</i> sp.	Compostagem
<i>Streptococcus</i> sp.	Compostagem
<i>Lactobacillus</i> sp.	Silagem, produção de alimentos
<i>Clostridium</i> sp.	Silagem, produção de alimentos
<b>Leveduras</b>	
<i>Endomycopsis burtonii</i>	Mandioca, arroz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol, produção de alimentos
<i>Schwanniomyces castelii</i>	Etanol, amilase
<b>Fungos</b>	
<i>Alternaria</i> sp.	Compostagem
<i>Aspergillus</i> sp.	Compostagem, produtos industriais, produção de alimentos
<i>Fusarium</i> sp.	Compostagem, giberelina
<i>Monilia</i> sp.	Compostagem
<i>Mucor</i> sp.	Compostagem, produção de alimentos, enzimas
<i>Rhizopus</i> sp.	Compostagem, produção de alimentos, enzimas, ácidos orgânicos
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Compostagem, degradação de lignina
<i>Trichoderma</i> sp.	Compostagem, controle biológico, biopesticida
<i>Amylomyces rouxii</i>	Mandioca, arroz
<i>Aspergillus oryzae</i>	Koji, produção de alimentos e ácido cítrico
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Tempeh, soja, amilase, lipase
<i>Aspergillus niger</i>	Ração, proteínas, amilase, ácido cítrico
<i>Pleurotus oestreatus</i>	Cogumelo
<i>Lentinus edodes</i>	Cogumelo
<i>Penicilium notatum, roquefortii</i>	Penicilina, queijo

A preparação e o pré-tratamento do substrato sólido são etapas de importância para se transformar o substrato cru em uma forma utilizável na FSS. Essas etapas incluem:

- diminuição do tamanho da partícula através de moagem, raspagem ou corte;
- hidrólise físico-química ou enzimática dos polímeros para aumentar a disponibilidade do substrato ao microrganismo;
- suplementação com nutrientes (fósforo, nitrogênio, sais) e adequação do pH e umidade;
- cozimento ou tratamento a vapor para pré-degradação da estrutura macromolecular e eliminação da maioria dos contaminantes.

O principal problema da FSS é a alta heterogeneidade do substrato que causa uma dificuldade em se concentrar em uma única categoria do processo hidrolítico, levando a tentativas superficiais de modelamento. Esta heterogeneidade é devida à estrutura não-uniforme do substrato (mistura de amido, lignocelulose, pectina), variação entre bateladas de substratos, o que limita a reprodutibilidade, e dificuldade da mistura da massa sólida durante a fermentação a fim de evitar a compactação do meio e a ocorrência de gradientes de crescimento microbiano, temperatura, pH e umidade, impossibilitando a coleta de uma amostra significativa (RAIMBAULT, 1997).

## **2.7. Parâmetros importantes em processos de FSS**

Fatores ambientais como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento microbiano e a formação de produto

### 2.7.1. Umidade e atividade de água ( $a_w$ )

A FSS pode ser definida como o crescimento microbiano em partículas sólidas na ausência de água livre. A água presente em processos de FSS aparece complexada com a matriz sólida ou como uma fina camada tanto absorvida nas partículas ou fracamente ligada nas regiões capilares do sólido (RAIMBAULT, 1997).

A  $a_w$  é o parâmetro que melhor expressa a quantidade de água presente em um sólido, sendo definida como:

$$a_w = \frac{p}{p^0}$$

onde  $p$  é a pressão parcial de vapor da água no substrato e  $p^0$  é a pressão parcial de vapor da água pura à mesma temperatura e pressão. Pode também ser expressa em relação à Umidade Relativa de Equilíbrio ( $URE\%$ ), sendo numericamente igual à sua fração:

$$a_w = \frac{URE\%}{100}$$

Outra maneira de se definir a  $a_w$  é em relação à pressão osmótica:

$$P_{osm.} = -\frac{R \cdot T}{V \ln a_w}$$

onde  $V$  é o volume molar parcial da água,  $R$  é a constante dos gases e  $T$  é a temperatura absoluta (PELIZER et al, 1998).

A redução da  $a_w$  tem grande efeito no crescimento microbiano, como mostra a Figura 2. As bactérias são muito mais sensíveis à redução da  $a_w$  do que os fungos (COONEY, 1981). Como a FSS é mais utilizada com fungos, a diminuição da  $a_w$  é também importante tecnologicamente

como um modo de se prevenir contaminações com bactérias, que só crescem com  $a_w$  acima de 0.95. Os fungos, em contrapartida, são capazes de crescer em ambientes com atividade de água de até 0.7, em seu limite inferior.

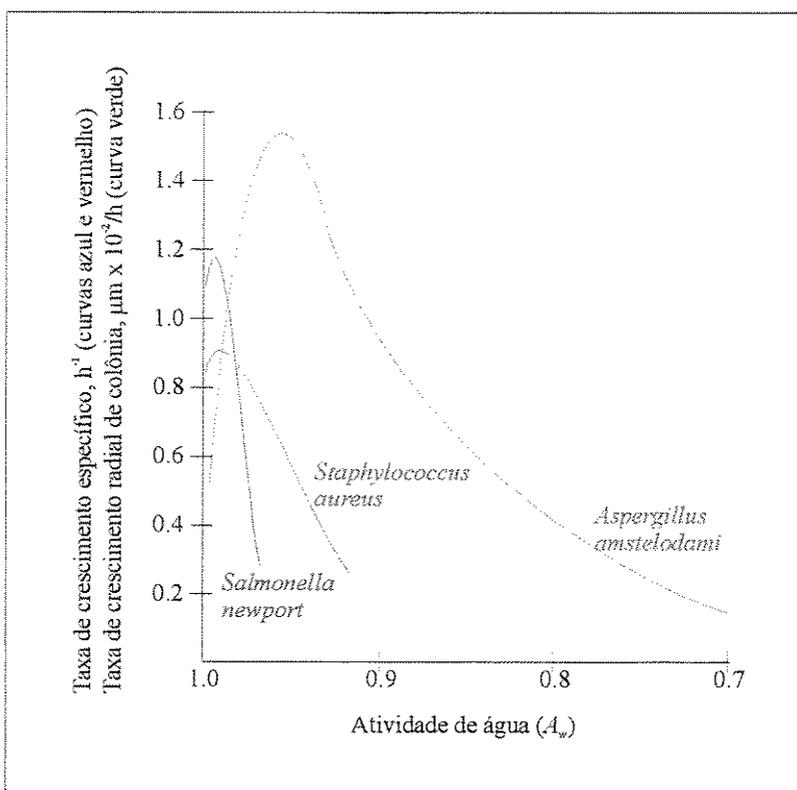


Figura 2 – Taxas de crescimento específico como função da atividade de água (COONEY, 1981).

### 2.7.2. Temperatura e Transferência de calor

A taxa de crescimento microbiano é uma função da temperatura. Geralmente, os microrganismos crescem em temperaturas na faixa de 25 a 30° C. Porém existem no meio ambiente microrganismos capazes de crescer a temperaturas abaixo de 0° C e acima de 93° C, sendo a necessidade fundamental por água em estado líquido. O efeito da temperatura na taxa de crescimento pode ser visualizada na Figura 3, onde são mostrados três grupos de microrganismos,

psicrófilos, mesófilos e termófilos. Observa-se na figura que o efeito da temperatura sobre o crescimento microbiano apresenta as seguintes características:

- O crescimento só ocorre dentro de um intervalo de temperatura de 30° C para todo microrganismo;
- A taxa de crescimento aumenta lentamente com a temperatura, até que a taxa de crescimento máxima seja atingida;
- Acima da temperatura correspondente à máxima taxa de crescimento, esta última decresce rapidamente conforme se aumenta a temperatura (COONEY, 1981).

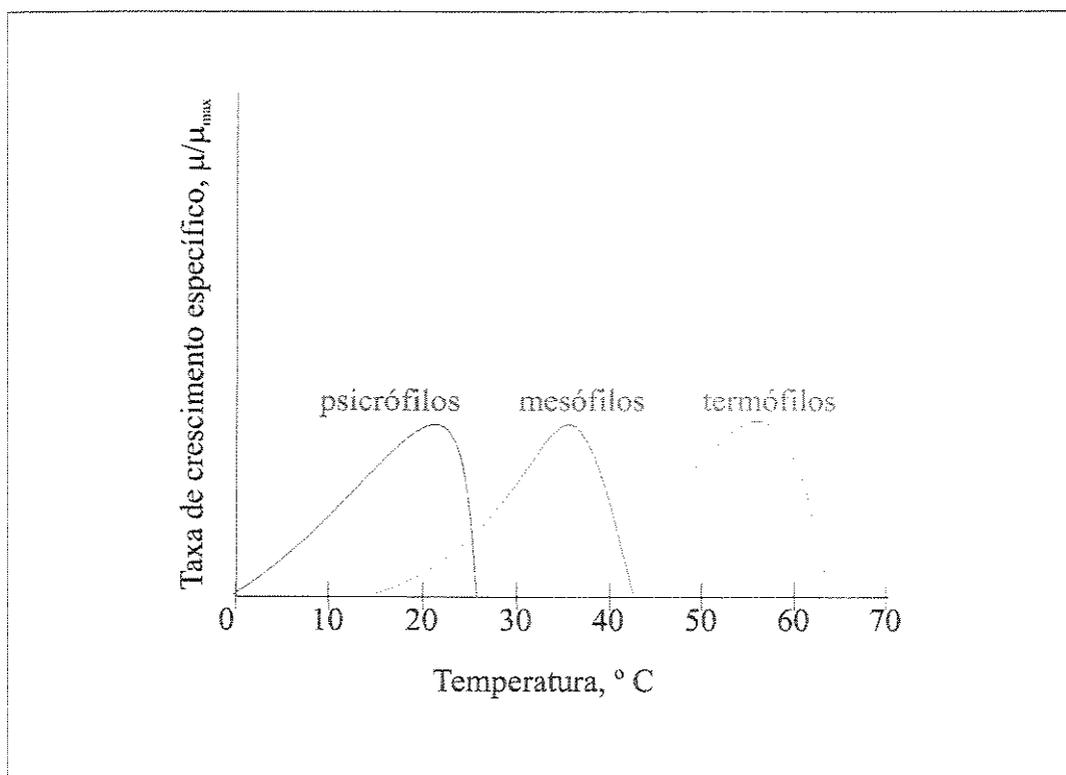


Figura 3 – Efeito da temperatura na taxa de crescimento específico de psicrófilos, mesófilos e termófilos (COONEY, 1981).

A equação estequiométrica global da respiração é altamente exotérmica e a geração de calor devida aos altos níveis de atividade microbiana nos sólidos cria gradientes de temperatura

devido às limitações da transferência de calor dos substratos sólidos. A remoção do calor gerado é provavelmente o fator mais problemático nos processos FSS em larga escala, e os equipamentos para refrigeração convectivos ou condutivos mostram-se inadequados para dissipar o calor metabólico devido à baixa condutividade térmica da maioria dos substratos sólidos, resultando em um gradiente de temperatura indesejável. Somente a refrigeração por aeração resulta em um melhor controle da transferência de calor nos sistemas de FSS. Embora a função primeira da aeração durante cultivos aeróbios em FSS seja a de fornecer oxigênio para o crescimento celular e retirar o dióxido de carbono produzido, ela também tem importante função na transferência de calor e massa entre o substrato sólido e a fase gasosa. O uso de ar umidificado, além de controlar a temperatura do meio através da evaporação, ainda permite repor a perda de umidade conseqüente (RAIMBAULT, 1997)

### **2.7.3. Transferência de massa**

#### **2.7.3.1. Transferência de massa entre-partículas**

A transferência de oxigênio da fração intersticial do substrato sólido para o microrganismo é a transferência de massa entre-partículas. O volume ocupado pelo ar dentro do substrato dá a fração de vazio, que depende das características e da umidade do substrato. A umidade do substrato deve ser otimizada. Se é muito alta, a fração de vazio é ocupada pela água, impedindo a presença de oxigênio e criando condições anaeróbias. Por outro lado, se a umidade é muito baixa, o crescimento microbiano é reduzido. Agitação e aeração são bons métodos para se aumentar a transferência de oxigênio entre-partículas e retirar o dióxido de carbono produzido no processo fermentativo.

#### **2.7.3.2. Transferência de massa intra-partícula**

A transferência de massa intra-partícula refere-se à transferência de nutrientes e enzimas no interior da massa do substrato sólido. Os principais aspectos considerados são a difusão de

oxigênio no substrato contendo a biomassa e a degradação do substrato sólido pelas enzimas secretadas pelos microrganismos agentes da fermentação.

A difusão de oxigênio é limitante na taxa de crescimento especialmente dentro do substrato. Isto ocorre porque o oxigênio precisa passar através da biomassa que está respirando, na superfície da partícula, para só então se difundir na fase aquosa no interior do substrato.

A difusão de enzimas também é importante na transferência de massa intra-partícula porque, na maioria dos casos, o substrato é insolúvel em água, e o microrganismo precisa de substrato solúvel para crescer. Por esta razão, a ação de enzimas extracelulares degradando o substrato sólido em fragmentos solúveis é muito importante. Se a resistência da transferência de massa é grande, ela pode ser um limitante no crescimento microbiano (RAMANA MURTHY et al, 1993).

## **2.8. Planejamento Fatorial**

O planejamento fatorial é uma ferramenta muito útil para racionalizar um conjunto de experimentos e conduzir a resultados que envolvem a interação entre as variáveis. No caso de investigação sobre FSS, onde o processo e as análises mostram-se dispendiosas em termos de custo e tempo, a obtenção de resultados conclusivos com um número menor de experimentos torna-se imprescindível.

Através do planejamento fatorial de experimentos, é possível se distinguir os parâmetros do processo que têm influência mais significativa e dispensar outros menos influentes. Por meio das respostas fornecidas por um planejamento fatorial, e fazendo-se uso da metodologia de superfícies de resposta, pode-se obter um modelo empírico para a região experimental investigada, bem como definir os valores ótimos para os parâmetros considerados como os de maior importância (BRUNS et al, 1996).

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Sistema de colunas de Raimbault

O sistema de colunas de Raimbault para estudos de Fermentação em Substrato Sólido (FSS) foi constituído de colunas de vidro que se encontram imersas em um banho termostático, alimentados com ar úmido em sentido ascendente provido por uma bomba de ar ou compressor.

Neste trabalho, foi projetado e construído um sistema de reação utilizando colunas de Raimbault com modificações em relação ao anteriormente descrito. Essas modificações visaram facilitar o controle da vazão através da construção de um painel de controle de válvulas dotado de manômetros individuais; e o desenho do umidificador secundário, feito a partir de frasco erlenmeyer a fim de aumentar a superfície de troca entre a água e o ar a ser injetado. A Figura 4 apresenta o sistema de reação construído neste trabalho para a condução da FSS.

O sistema de reação é composto basicamente de 8 partes: fornecimento de ar; distribuidor e umidificador primário; painel de controle de vazão; umidificadores secundários; colunas; banho termostático; medidores de vazão; e medidor de umidade relativa.

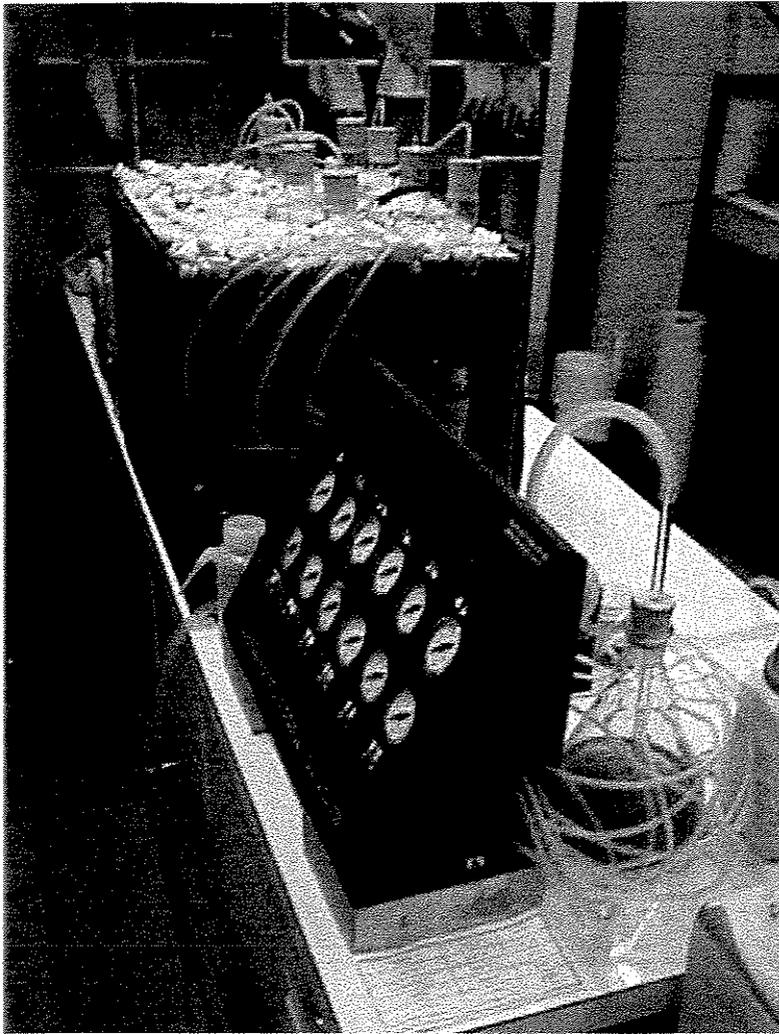


Figura 4 – Fotografia do sistema de colunas de Raimbault utilizado neste trabalho

### 3.1.1. Fornecimento de ar

Inicialmente desejava-se utilizar um compressor para o fornecimento de ar no sistema. O compressor disponível em laboratório era um de uso odontológico, dotado de pressostato que mantinha sua pressão de operação entre 120 e 180 psi. Esta variação de pressão refletia conseqüentemente na vazão de aeração das colunas. Por esse motivo, resolveu-se adotar ar sintético sob pressão como fonte de aeração. Apesar de inviável economicamente em maiores escalas, o ar sintético satisfaz várias necessidades para uma investigação em escala laboratorial como: composição de gases constante; umidade constante; pressão constante, e esterilidade.

O gás utilizado foi ar sintético, fornecido pela White Martins, com composição de  $20 \pm 0,5\%$  de Oxigênio e  $80 \pm 0,5\%$  de Nitrogênio, em cilindro de  $9,6 \text{ m}^3$  de capacidade volumétrica e envase a  $200 \text{ kgf/cm}^2$  de pressão a  $21^\circ \text{ C}$ . Para o controle da pressão de saída, foi utilizada uma válvula de precisão do mesmo fornecedor com pressão máxima de  $2,0 \text{ kgf/cm}^2$ .

### **3.1.2. Distribuidor e umidificador primário**

O distribuidor e umidificador primário foi construído a partir de um frasco erlenmeyer de 1 litro. O ar proveniente do cilindro entra no distribuidor através de um tubo de vidro com extremidade em vidro sinterizado, onde borbulha em 500 mL de água destilada. A saída é distribuída para 12 tubos de vidro soldados próximos à extremidade superior do erlenmeyer, como mostra a Figura 5.

### **3.1.3. Painel de controle e medida de vazão**

O controle da vazão das diferentes colunas foi feito através de 12 manômetros com escala até 3,0 psi de pressão e 12 válvulas globo de latão fixados em painel de madeira, como mostra a Figura 6. Os manômetros destinam-se ao controle e registro da pressão de entrada em cada coluna simultaneamente.

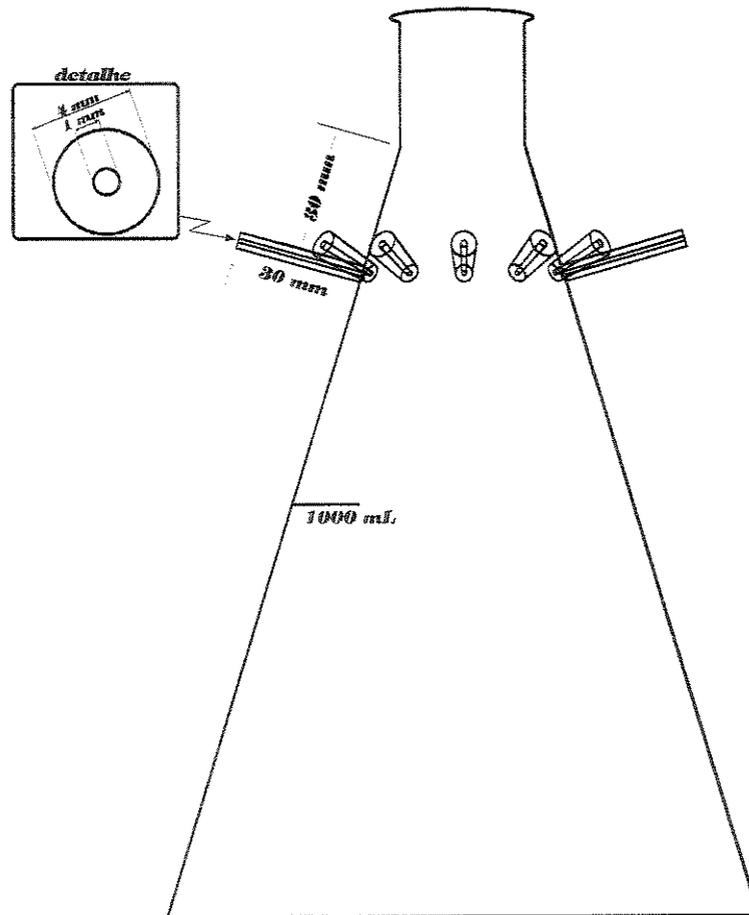


Figura 5 – Vista lateral do distribuidor e umidificador primário

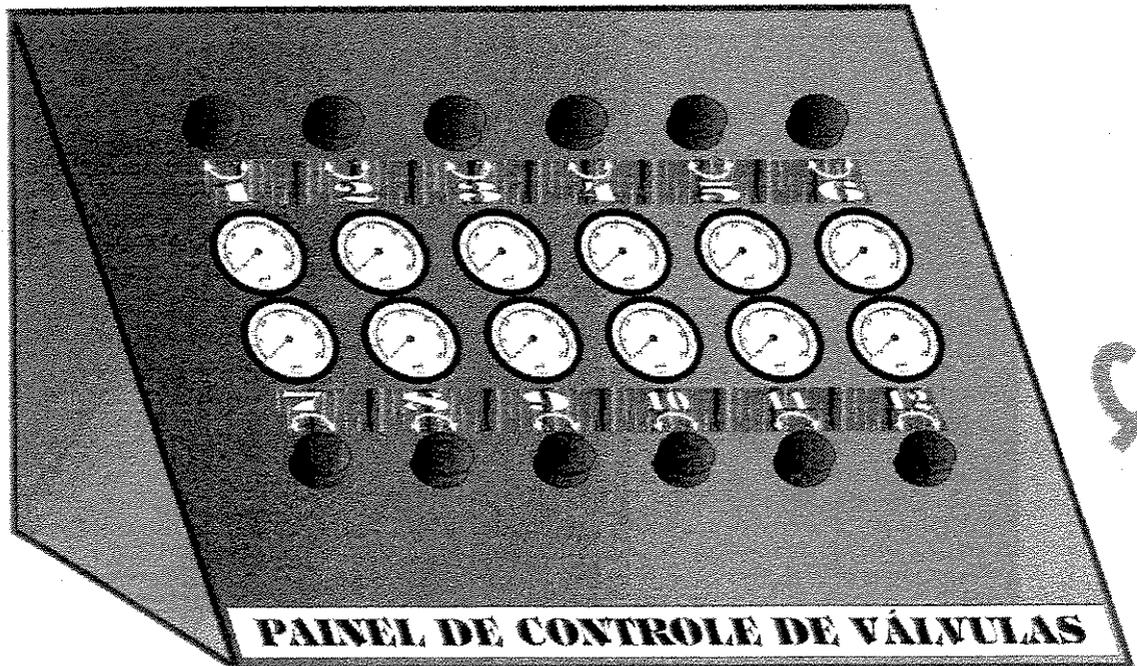


Figura 6 – Painel de controle de vazão

### 3.1.4. Umidificadores secundários

Os umidificadores secundários foram construídos com base em frascos erlenmeyer de 200 mL, dotados de entrada lateral e borbulhador, como mostrado na Figura 7. O ar entra pelos tubos soldados na lateral do umidificador, sendo borbulhados em 100 mL de água destilada. A saída do ar úmido se dá pela extremidade superior do umidificador, onde a coluna se encaixa através de rolha de poliuretano.

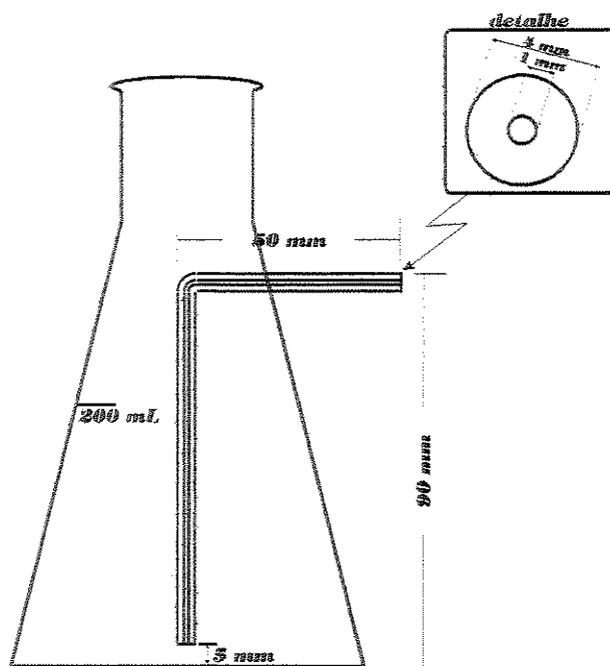


Figura 7 – Umidificador secundário

### 3.1.5. Reatores de coluna

As colunas foram construídas baseadas no sistema de Raimbault, apresentado por DE ARAUJO et al (1997). As colunas foram feitas de vidro, com volume útil de aproximadamente 80 mL, o que corresponde aproximadamente à massa de 20 g do substrato utilizado (Figura 8). Sua base é encaixada no umidificador secundário, e o topo é fechado por uma rolha de poliuretano autoclavável, perfurada por um tubo de vidro com 1,0 mm de diâmetro interno.

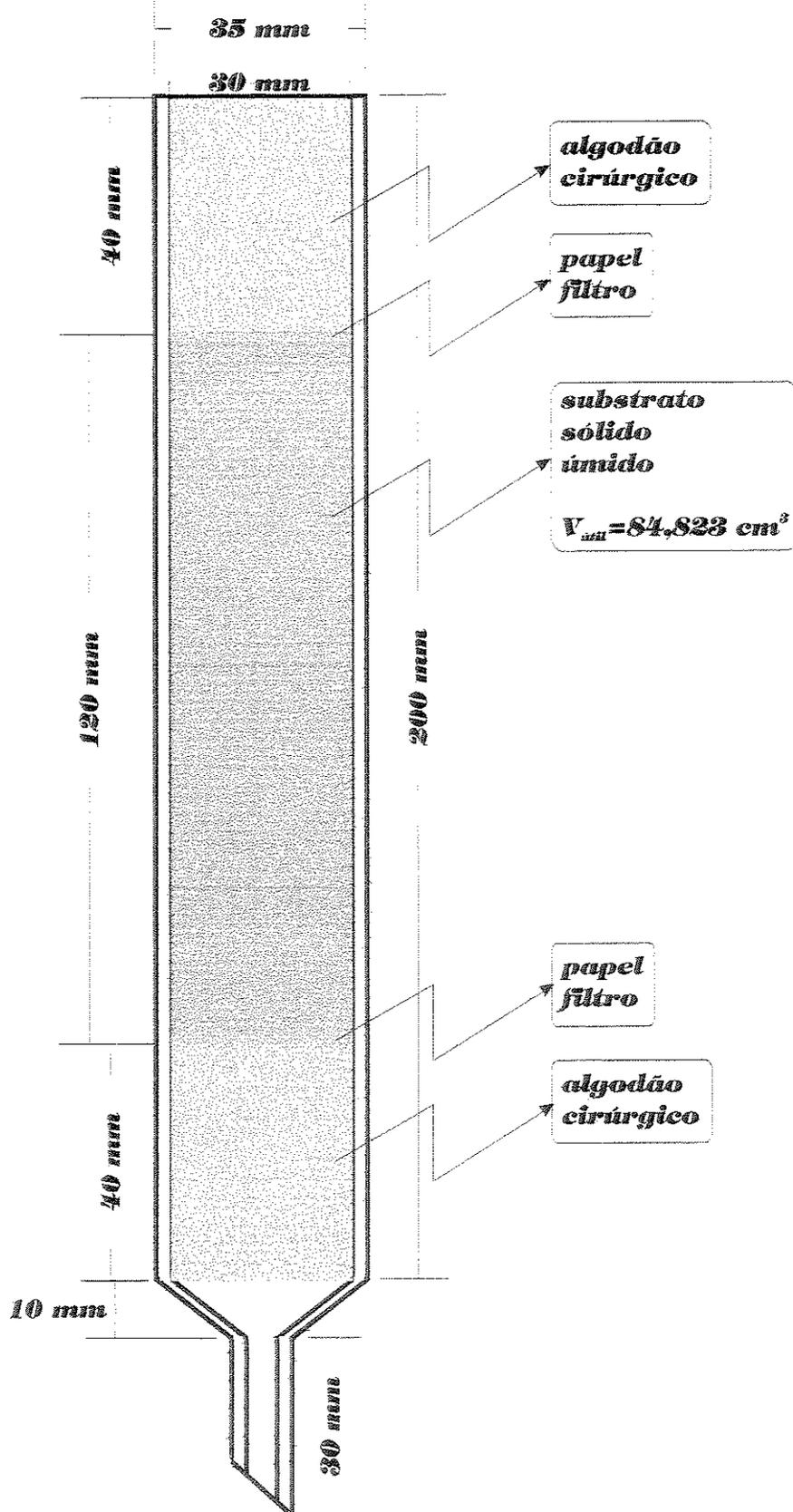


Figura 8 – Reator de coluna

### 3.1.6. Controle de temperatura

Com a finalidade de controlar a temperatura no interior das colunas, as mesmas foram dispostas, juntamente com os umidificadores secundários, no interior de uma caixa de vidro (Figura 9), com recirculação de água cuja temperatura era controlada através de banho termostático PolyScience, modelo 8000. O registro da temperatura na caixa de vidro era feito através de termômetro, e a perda de calor entre o banho e a caixa era de 2° C

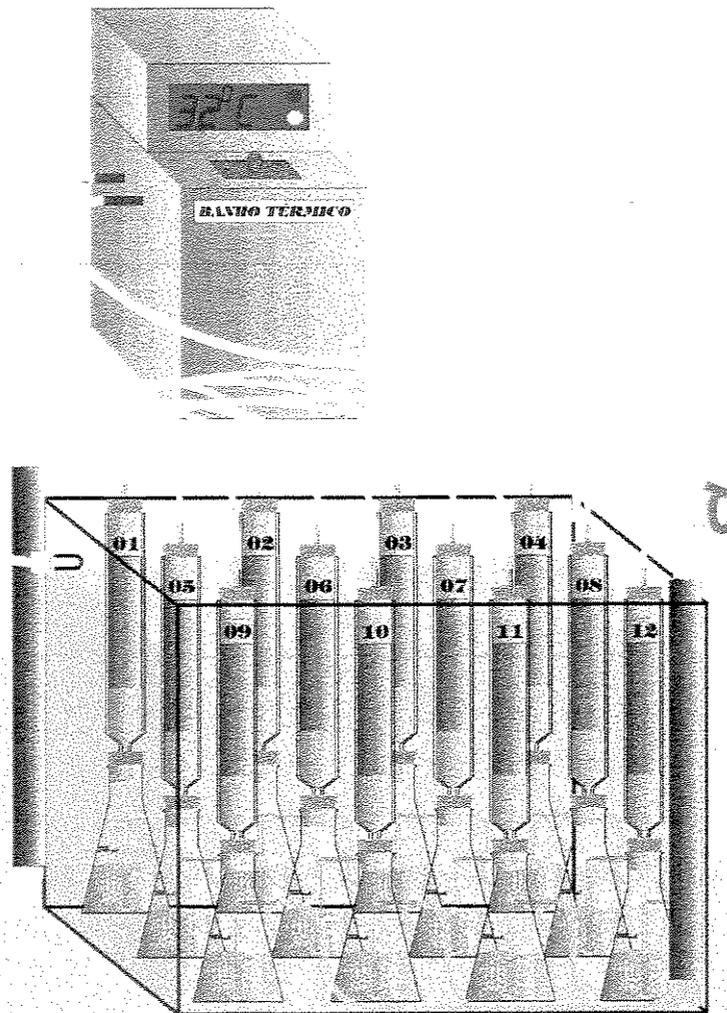


Figura 9 – Disposição das colunas na caixa de vidro e banho termostático

### **3.1.7. Medidor de vazão**

A vazão foi medida através de um tubo capilar acoplado a um manômetro de tubo em U. A passagem de ar através do tubo capilar produz uma queda de pressão que é proporcional à vazão na faixa de baixas vazões. Devido às baixas vazões utilizadas, utilizaram-se, como capilares, duas agulhas de diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 10 cm, e o manômetro foi disposto inclinado a 45° para maior sensibilidade na medida da queda de pressão. O medidor foi calibrado através de bolhometro com capacidade de 20 mL.

### **3.1.8. Medida de umidade relativa**

A umidade relativa do ar de entrada no reator foi medido através de um sensor Digi-Sense – Temperature/Humidity Logger, produzido pela Cole-Parmer Instrument Co. O sensor era acoplado a uma cuba de 30 mm de diâmetro e 50 mm de comprimento, com uma entrada e uma saída de ar, disposta no interior da caixa de vidro e conectada à saída de um dos umidificadores secundários.

## **3.2. Medições**

### **3.2.1. Medida da atividade de água**

A atividade de água do substrato foi medida através de equipamento AquaLab CX2 – Water Activity Measurement. O uso deste equipamento foi gentilmente concedido nos laboratórios da Corn Products Brasil Ltda., na cidade de Jundiaí, SP. O princípio de funcionamento do aparelho é através da determinação da umidade relativa de equilíbrio do ar que envolve a amostra inserida.

### 3.2.2. Medida do pH

O pH do substrato foi medido em pHmetro digital, de forma indireta. Para o substrato fermentado, foram utilizados os extratos enzimáticos obtidos da fermentação. Para a medida do pH do substrato inicial, foi preparado um filtrado seguindo-se os mesmos procedimentos usados na obtenção do extrato enzimático, ou seja, a cada 20 g de substrato úmido e esterilizado foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada, de pH = 5,80, extraindo-se o caldo através de pressão com um pistilo de vidro previamente flambado e posterior filtragem em algodão.

### 3.2.3. Determinação de umidade em bases seca e úmida

As umidades em bases seca ( $U_{bs}$ ) e úmida ( $U_{bu}$ ) foram determinadas colocando-se amostras do substrato em estufa a 105° C até atingirem peso constante, medido após resfriamento das amostras no interior de um dessecador em balança analítica.

O cálculo para  $U_{bs}$  e  $U_{bu}$  é dado por:

$$U_{bs} = \frac{M_1 - M_2}{M_2}$$
$$U_{bu} = \frac{M_1 - M_2}{M_1}$$

Eq. 1

onde  $M_1$  = peso da amostra úmida e  $M_2$  = peso da amostra seca.

## 3.3. Fermentação em Substrato Sólido

### 3.3.1. Substrato

O substrato sólido utilizado foi o farelo de trigo.

O farelo de trigo utilizado é produzido por Moinho Paulista Ltda, e apresenta os níveis de garantia mostrados no quadro 6 em sua embalagem:

Quadro 6 – Níveis de garantia do substrato utilizado.

Umidade base seca (máximo)	13,50%
Proteína Bruta (máximo)	14,00%
Extrato Etéreo (mínimo)	3,00%
Fibra Bruta (máximo)	11,00%
Matéria Mineral (máximo)	6,50%

Testes feitos neste trabalho mostraram que esse substrato apresenta as características mostradas no quadro 7:

Quadro 7 – Características do substrato:

Umidade base seca	0,1476
Umidade base úmida	0,1286
Atividade de água	0,611

A preparação do substrato foi feita adicionando-se água destilada à concentração desejada e posterior esterilização em autoclave a 121° C por 20 minutos.

### 3.3.2. Inóculo

O microrganismo *Scopulariopsis* sp. foi mantido em tubos de ensaio inclinados com 10 mL de meio de cultura PDA (batata, dextrose e ágar), no interior de estufa de cultura a 30° C.

Uma semana antes da obtenção do inóculo, o microrganismo foi repicado e foram usados apenas os tubos que mostravam crescimento homogêneo e total preenchimento da superfície do meio de cultura.

Para a obtenção do inóculo, depositou-se 5 mL de água destilada esterilizada em cada tubo e procedeu-se uma gentil raspagem sobre o microrganismo, com alça de platina, a fim de desprendê-lo do meio de cultura e colocá-lo em suspensão no líquido. Essa suspensão do microrganismo foi entornada em um frasco erlenmeyer limpo e esterilizado, onde se procedeu uma máxima homogeneização do inóculo através de agitação.

Cada 20 g de substrato sólido (correspondente ao leito de uma coluna), recebeu 1 mL deste inóculo. Procedeu-se uma mistura entre o inóculo e o substrato com o uso de um pistilo de vidro previamente flambado.

O substrato já inoculado foi então transferido para as colunas. Todo o procedimento foi feito no interior de câmara de fluxo positivo previamente higienizada, e próximo à chama do bico de Bunsen, a fim de se evitar contaminação.

Uma melhor padronização do inóculo não foi possível de ser obtida pelas características fisiológicas do microrganismo. Por se manter firmemente preso ao meio de cultura e por se organizar em colônias, os métodos de padronização disponíveis em laboratório, como contagem de células em Câmara de Neubauer e análise espectrofotométrica da dispersão do inóculo não mostraram funcionalidade.

### **3.4. Extração das proteínas**

A extração das proteínas foi feita da seguinte forma: em um erlenmeyer de 500 mL esterilizado foram adicionados, aos 20 g de substrato fermentado, 50 mL de água destilada esterilizada, procedeu-se uma extração do substrato através de pressão exercida por um pistilo de vidro e deixando-se descansar por 1 hora. Essa mistura de água e substrato foi então filtrada em algodão cirúrgico sob pressão. Recuperou-se, em média, 25 mL de extrato.

### 3.5. Análises

#### 3.5.1. Análise da atividade enzimática

A determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis* sp. foi feita com substrato O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG).

A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi medida acrescentando-se a 1690  $\mu$ L de solução tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, 10  $\mu$ L de solução enzimática e 150  $\mu$ L de substrato ONPG. A mistura foi incubada a 60° C por 15 minutos.

A reação foi interrompida com a adição de 150  $\mu$ L de carbonato de cálcio, e a concentração de ONP foi medida através da absorvância da solução em espectrofotômetro a 420 nm de comprimento de onda, utilizando-se uma curva de calibração previamente determinada.

Uma unidade de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ortonitrofenol (ONP) em um minuto, sob as condições acima descritas.

$$\frac{UA}{mL} = \left( \frac{V_T}{V_A} \right) \times \frac{Abs}{t} \times \frac{1}{C_{ext}} \times f_d \times \frac{1}{L} \quad \text{Eq. 2}$$

onde

$UA$  = atividade enzimática

$V_T$  = volume do ensaio

$V_A$  = volume da amostra

$Abs$  = absorvância medida a 420 nm

$t$  = tempo de incubação em minutos

$C_{ext}$  = coeficiente de extinção ( $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ )

$f_d$  = fator de diluição

$L$  = caminho ótico (cm)

Assim,

$$\frac{UA}{mL} = \left( \frac{2000}{10} \right) \times \frac{Abs}{15} \times \frac{1}{4.35} \times 1 \times \frac{1}{1}$$

Eq. 3

$$\frac{UA}{mL} = 3.065 Abs$$

Além da atividade enzimática ser expressa em UA/mL, as respostas também foram dadas em atividade enzimática total (UA), onde se multiplicou a atividade enzimática pelo volume de extrato obtido; em produtividade (UA/t), onde se dividiu a atividade enzimática total pelo tempo de fermentação; em atividade enzimática por grama de substrato seco (UA/g<sub>Sseco</sub>), onde se dividiu a atividade enzimática total pela massa de substrato seco, e em atividade enzimática específica (UA/mg<sub>PT</sub>), onde se dividiu a atividade enzimática expressa em UA/mL pela concentração de proteínas do extrato enzimático, expressa em mg/mL.

### 3.5.2. Análise de proteínas

A análise de proteínas foi feita através do método de BRADFORD (1976).

Inicialmente, 5 µL do extrato enzimático são adicionados a 795 µL de solução tampão Tris-HCl 30 µM pH 7,5 e a 200 µL do reagente Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate 500-0006. A solução é medida em espectrofotômetro a 595 nm de comprimento de onda. A curva padrão foi obtida através de ensaios com a proteína de referência BSA, e apresentou a seguinte relação:

$$Abs = 0.04075C$$

Eq. 4

onde

*Abs* é a absorvância medida a 595 nm

*C* é a concentração de proteína em mg/mL

O cálculo da concentração de proteínas é dado, então, por:

$$PT(mg/mL) = \frac{800\mu L}{5\mu L} \times \frac{Abs}{0.04078} \times \frac{1}{1000} \quad \text{Eq. 5}$$

### 3.6. Planejamento fatorial

#### 3.6.1. Primeira Série de Experimentos

No primeiro planejamento fatorial, foram estudados inicialmente os parâmetros tempo de fermentação (t), concentração de esporos, em volume de inóculo, em relação ao substrato (X) e vazão de ar (Q). O substrato utilizado foi preparado com partes iguais de farelo de trigo e água destilada.

Foi usado um planejamento fatorial do tipo  $2^3$  (dois níveis e três variáveis), com ponto central

A descrição do planejamento fatorial em valores codificados e reais é apresentada no Quadro 8.

Quadro 8 – Planejamento Fatorial para o 1º experimento

		Amostra	Planejamento Fatorial em Valores Codificados			Planejamento Fatorial em Valores Reais		
			Vazão (L/h)	Tempo de fermentação (h)	X (mL)	Vazão (L/h)	X (mL)	Tempo de fermentação (h)
modelo linear	fatorial completo $2^3$	1	-1	-1	-1	0.1	1.0	96
		2	+1	-1	-1	0.3	1.0	96
		3	-1	+1	-1	0.1	3.0	96
		4	+1	+1	-1	0.3	3.0	96
		5	-1	-1	+1	0.1	1.0	144
		6	+1	-1	+1	0.3	1.0	144
		7	-1	+1	+1	0.1	3.0	144
		8	+1	+1	+1	0.3	3.0	144
	ponto central	9	0	0	0	0.2	2.0	120
		10	0	0	0	0.2	2.0	120
		11	0	0	0	0.2	2.0	120

Devido à capacidade do sistema, 12 colunas, foi possível se fazer, na primeira série de experimentos, apenas aqueles relativos ao planejamento do modelo linear. A partir dos resultados obtidos, verificou-se, através dos valores dos efeitos, que o parâmetro concentração de esporos, na região estudada, não apresentava influência significativa na resposta atividade enzimática. Por isso, substituí-se a variável concentração de esporos pela umidade inicial do substrato em base seca ( $U_{bs}$ ). A diferença entre os níveis para a vazão de ar foi aumentada para que se pudesse realçar sua influência, o que não havia sido possível na primeira série de experimentos.

### 3.6.2. Segunda Série de Experimentos

No Quadro 9 são apresentados os valores codificados e reais para o planejamento fatorial da segunda série de experimentos incluindo a variável umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato.

Quadro 9 – Planejamento Fatorial em valores codificados e reais para a 2ª série de experimentos.

		Amostra	Planejamento Fatorial em Valores Codificados			Planejamento Fatorial em Valores Reais		
			Vazão (L/h)	Tempo de fermentação (h)	$U_{bs}$ inicial	Vazão (L/h)	Tempo de fermentação (h)	$U_{bs}$ inicial
modelo linear	fatorial completo $2^3$	1	-1	-1	-1	0.6	96	0.9100
		2	+1	-1	-1	1.8	96	0.9100
		3	-1	+1	-1	0.6	144	0.9100
		4	+1	+1	-1	1.8	144	0.9100
		5	-1	-1	+1	0.6	96	1.8572
		6	+1	-1	+1	1.8	96	1.8572
		7	-1	+1	+1	0.6	144	1.8572
		8	+1	+1	+1	1.8	144	1.8572
	ponto central	9	0	0	0	1.2	120	1.2728
		10	0	0	0	1.2	120	1.2728
		11	0	0	0	1.2	120	1.2728

Nesta série, uma análise dos efeitos mostraram que as três variáveis tiveram influência significativa na resposta do processo. No entanto, os resultados mostraram que se estava fora da faixa onde se encontrariam os parâmetros otimizados. Por isso, partiu-se para um terceiro planejamento, descrito no Quadro 10.

### 3.6.3. Terceira Série de Experimentos

O planejamento fatorial construído para a terceira série de experimentos é o descrito no Quadro 10:

Quadro 10 – Planejamento Fatorial em valores codificados e reais para o 3º experimento.

		Planejamento Fatorial em Valores Codificados			Planejamento Fatorial em Valores Reais			
		Amostra	Vazão (L/h)	Tempo de fermentação (h)	$U_{bs}$ inicial	Vazão (L/h)	Tempo de fermentação (h)	$U_{bs}$ inicial
modelo linear	fatorial completo $2^3$	1	-1	-1	-1	0.5	120	0.6519
		2	+1	-1	-1	3	120	0.6519
		3	-1	+1	-1	0.5	168	0.6519
		4	+1	+1	-1	3	168	0.6519
		5	-1	-1	+1	0.5	120	1.2728
		6	+1	-1	+1	3	120	1.2728
		7	-1	+1	+1	0.5	168	1.2728
		8	+1	+1	+1	3	168	1.2728
	ponto central	9	0	0	0	1.8	144	0.9100
		10	0	0	0	1.8	144	0.9100
		11	0	0	0	1.8	144	0.9100
modelo quadrático	ponto central	12	0	0	0	1.8	144	0.9100
		13	0	0	0	1.8	144	0.9100
	planejamento estrela	14	$-\sqrt{2}$	0	0	0	144	0.9100
		15	$+\sqrt{2}$	0	0	3.6	144	0.9100
		16	0	$-\sqrt{2}$	0	1.8	110	0.9100
		17	0	$+\sqrt{2}$	0	1.8	178	0.9100
		18	0	0	$-\sqrt{2}$	1.8	144	0.5621
		19	0	0	$+\sqrt{2}$	1.8	144	1.4716

### 3.6.4. Quarta Série de Experimentos

Para a quarta série de experimentos, a variável tempo de fermentação foi retirada devido a interpretações nos resultados já obtidos, passando o planejamento a ser um do tipo  $2^2$  com ponto central e planejamento estrela, para modelagem quadrática. O quadro 11 mostra como foi feito o planejamento:

Quadro 11 – Planejamento Fatorial em valores codificados e reais para o 4º experimento.

		Planejamento Fatorial em Valores Codificados			Planejamento Fatorial em Valores Reais	
	Amostra	Vazão (L/h)	$U_{bs}$ inicial	Vazão (L/h)	$U_{bs}$ inicial	
modelo linear	fatorial completo $2^2$	1	-1	-1	2.0	0.436
		2	+1	-1	4.0	0.436
		3	-1	+1	2.0	0.910
		4	+1	+1	4.0	0.910
	ponto central	5	0	0	3.0	0.652
		6	0	0	3.0	0.652
modelo quadrático	planejamento estrela	7	$-\sqrt{2}$	0	1.6	0.652
		8	$+\sqrt{2}$	0	4.4	0.652
		9	0	$-\sqrt{2}$	3.0	0.357
		10	0	$+\sqrt{2}$	3.0	1.037

### 3.6.5. Análise estatística das respostas

Para a análise dos resultados obtidos através dos planejamentos fatoriais foram utilizados dois programas de cálculo computacional: *Fatorial* e *Modreg*. Estes programas são parte integrante do livro “Planejamento e Otimização de Experimentos” (BRUNS et al, 1996).

O programa *Fatorial* faz o cálculo dos efeitos para cada uma das variáveis e suas interações. Os efeitos são descritos como a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior de uma determinada variável.

Para se determinar a influência de um efeito no sistema, compara-se a magnitude do valor deste efeito ao erro experimental. A estimativa de erro experimental, quando na ausência de replicatas, pode ser feita através da comparação dos valores absolutos dos efeitos principais e dos efeitos de interação. Se há uma diferença significativa entre eles, pode-se considerar que os valores dos efeitos de interação são decorrentes de erros experimentais no processo, e o erro padrão do efeito pode ser calculado utilizando-se esses valores.

O programa *Modreg* faz o cálculo da tabela ANOVA, dos parâmetros do modelo empregado e seus erros padrão.

A tabela ANOVA (acrônimo de Analysis of Variance) é calculada como descrito no Quadro 12:

Quadro 12 – Tabela ANOVA

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p - 1)$
Resíduos	$SQ_{res} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_{res} = SQ_{res} / (n - p)$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m - p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n - m)$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

% de variância explicada:  $SQ_{reg} / SQ_T$

% de variância explicável:  $(SQ_T - SQ_{ep}) / SQ_T$

onde:

$n_i$  = número de repetições no nível  $i$

$m$  = número de níveis distintos

$n$  = número total de observações

$p$  = número de parâmetros do modelo

Para se determinar se há evidência de falta de ajuste ao modelo empregado, deve-se observar se a porcentagem de variância explicada está longe da porcentagem de variância explicável. Também deve-se observar se a relação entre a média quadrática de falta de ajuste e a média quadrática de erro puro é menor do que o valor de F tabelado para os graus de liberdade da falta de ajuste, erro puro, e o intervalo de confiança desejado. Outro método é através do cálculo da variância do ponto central ( $s^2$ ). Se o valor da variância for próximo do valor da média quadrática do erro puro, há evidência de falta de ajuste ao modelo.

Para se determinar se a regressão é significativa para o modelo, a relação entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos deve ser de 4 a 5 vezes maior do que o valor de F tabelado para os graus de liberdade da regressão, do resíduo, e do intervalo de confiança desejado.

A partir do modelo encontrado pode-se determinar os valores ótimos para os parâmetros estudados igualando-se a zero a primeira derivada do modelo em relação a cada um dos parâmetros estudados. Substituindo-se os ótimos no modelo, obtém-se a resposta máxima. O cálculo foi feito utilizando-se o software Fortran Powerstation, e o programa segue o algoritmo descrito no Apêndice - Figura I.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 4.1. Primeira Série de Experimentos

Para a primeira série de experimentos foram obtidos os seguintes resultados, apresentados no Quadro 13:

Quadro 13 – Resultados da 1ª série de experimentos

amostra	Q (L/h)	X (mL)	t (h)	UA/mL	UA	UA/t
1	0.1	1	96	1,0038	25,0956	0,2614
2	0.3	1	96	1,2119	30,2977	0,3156
3	0.1	3	96	1,0841	27,1035	0,2823
4	0.3	3	96	1,1340	28,3515	0,2953
5	0.1	1	144	1,8341	45,8543	0,3184
6	0.3	1	144	1,8747	46,8675	0,3254
7	0.1	3	144	1,7481	43,7043	0,3035
8	0.3	3	144	1,9234	48,0850	0,3339
9	0.2	2	120	0,9998	24,9968	0,2083
10	0.2	2	120	1,1071	27,6781	0,2306
11	0.2	2	120	1,1600	29,0002	0,2416

A estimativa dos efeitos para a primeira série de experimentos é dada no Quadro 14:

Quadro 14 – Estimativa dos efeitos para a resposta UA/mL:

média	1.4768
Q	0.1185
X	-0.0087
interação Q x X	-0.0058
t	0.7366
interação Q x t	-0.0106
interação X x t	-0.0100
interação Q x X x t	0.0732

Observa-se, por esta estimativa, que os valores absolutos dos efeitos principais são significativamente maiores que os valores absolutos dos efeitos de interação tanto de 2ª quanto de 3ª ordens. Admite-se, portanto, que os efeitos de 1ª ordem são suficientes para descrever adequadamente a superfície de resposta, e pode-se usar os demais efeitos para se obter uma estimativa do erro experimental nos valores dos efeitos.

$$V_{\text{efeito}} = (1/4)[(-0.0058)^2 + (-0.0106)^2 + (-0.0100)^2 + (0.0732)^2]$$

$$s = (V)^{1/2}$$

$$s_{\text{efeito}} \cong 0.0374$$

Eq. 6

Sendo o valor absoluto do erro padrão do efeito maior do que o valor absoluto do efeito (ex: X = -0.0087 ± 0.0374), não se pode dizer que o valor do efeito é obrigatoriamente diferente de zero. Portanto, considera-se o efeito X como não significativo. Para os outros efeitos, podemos dizer que a resposta aumenta conforme se aumentam os níveis dos fatores, e o tempo de fermentação tem mais influência na resposta do que a vazão de ar.

A intenção dessa série de experimentos era justamente a de se definir a influência da variação da concentração do inóculo nos resultados, já que este fator é de difícil quantificação devido à fisiologia do microrganismo utilizado.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que melhores resultados seriam obtidos com um aumento no valor da vazão de ar e no tempo de fermentação. O fator concentração de inóculo foi fixado no valor de 1 mL de inóculo para cada 20 g de substrato úmido. Para substituição da variável concentração de inóculo, experimentou-se a variação da umidade inicial do substrato em base seca ( $U_{bs}$ ).

#### 4.2. Segunda Série de Experimentos

Para a segunda série de experimentos foram obtidos os seguintes resultados, apresentados no Quadro 15:

Quadro 15 – Resultados da 2ª série de experimentos

		Resultados					Planejamento Fatorial em Valores Reais		
		Amostra	UA/mL	UA	UA/t	UA/g <sub>Sseco</sub>	Vazão (L/h)	Tempo de fermentação (h)	$U_{bs}$
modelo linear	fatorial completo 2 <sup>3</sup>	1	1.3787	34.4682	0.3590	3.2963	0.6	96	0.9100
		2	1.7511	43.7780	0.4560	4.1867	1.8	96	0.9100
		3	2.6056	65.1406	0.4524	6.2297	0.6	144	0.9100
		4	2.9558	73.8962	0.5132	7.0670	1.8	144	0.9100
		5	0.5453	16.3586	0.1704	2.3467	0.6	96	1.8572
		6	0.4810	14.4301	0.1503	2.0700	1.8	96	1.8572
		7	0.6240	18.7192	0.1300	2.6853	0.6	144	1.8572
		8	0.4234	12.7012	0.0882	1.8220	1.8	144	1.8572
	ponto central	9	1.3798	37.9456	0.3162	4.3547	1.2	120	1.2728
		10	1.2690	34.8977	0.2908	4.0049	1.2	120	1.2728
		11	1.3034	35.8425	0.2987	4.1133	1.2	120	1.2728

#### 4.2.1. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/mL

A estimativa dos efeitos para a segunda série de experimentos com respostas expressas em UA/mL é apresentada no Quadro 16:

Quadro 16 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA/mL:

média	1.3456
Q	0.1145
t	0.6132
interação Q x t	-0.0396
U	-1.6544
interação Q x U	-0.2469
interação t x U	-0.6026
interação Q x t x U	-0.0285

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais, caracterizando um modelo quadrático. Estima-se o erro experimental, portanto, a partir do valor absoluto do efeito de interação de 3ª ordem, e se conclui que todos os fatores, desta vez, são importantes no processo. Os fatores vazão e tempo de fermentação aumentam significativamente a resposta quando se aumentam seus níveis. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato mostrou ser o fator de maior importância, aumentando significativamente a resposta quando se diminui o seu nível. As representações gráficas em superfícies de resposta mostram estas tendências (Figuras 10, 11 e 12).

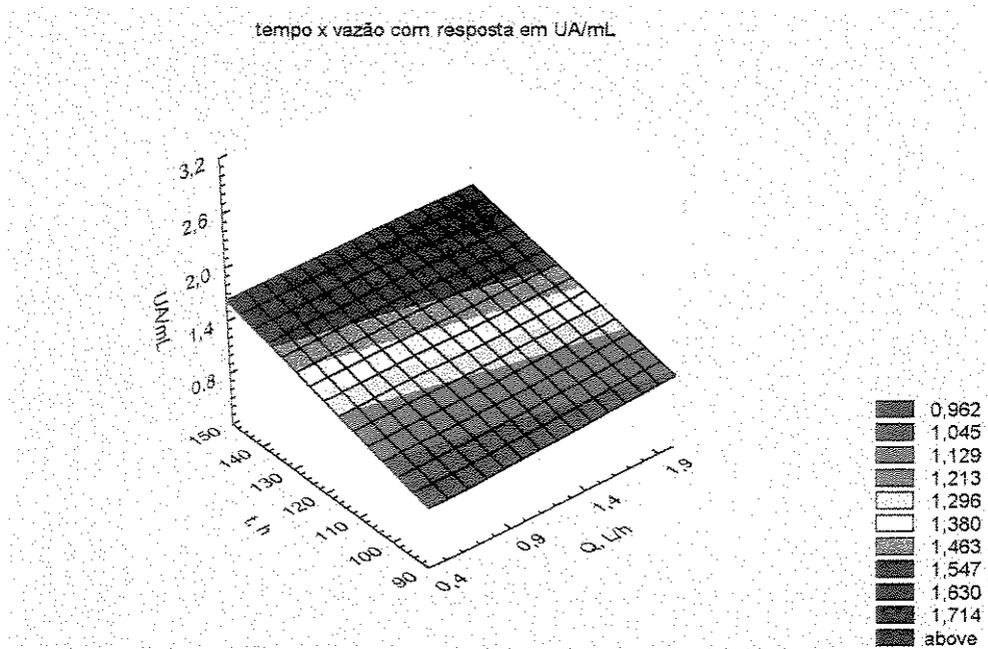


Figura 10 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/mL

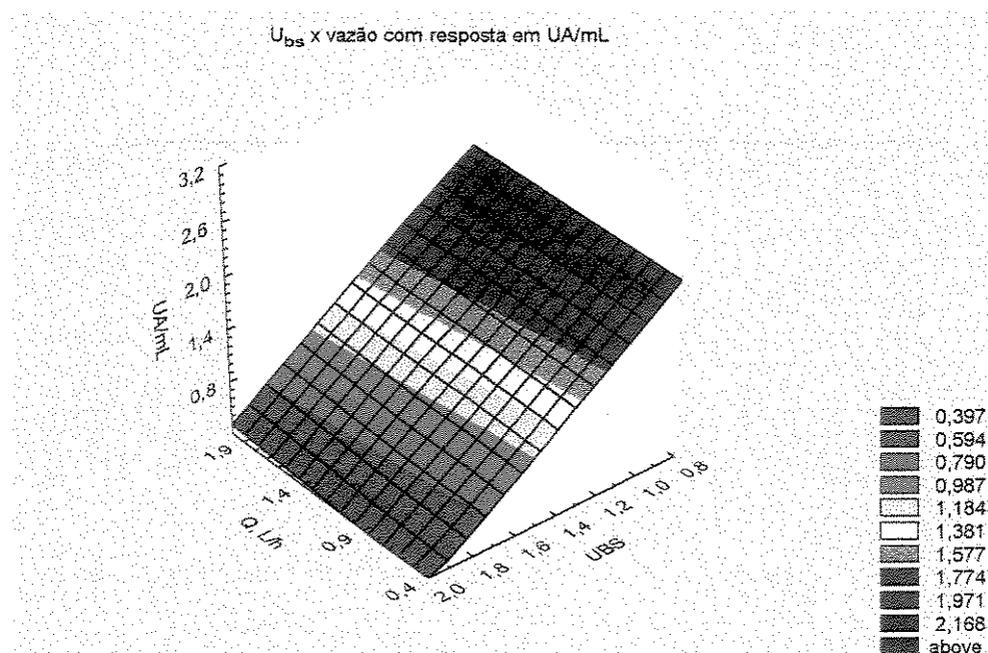


Figura 11 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e vazão de ar (Q) com resposta em UA/mL

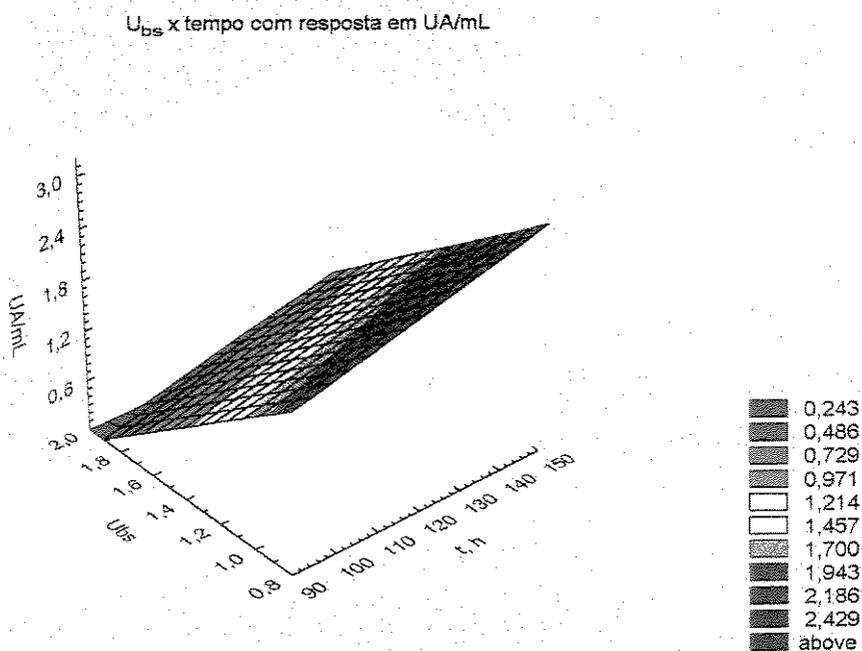


Figura 12 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e tempo de fermentação ( $t$ ) com resposta em UA/mL.

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA/mL ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (144 h), a maior vazão (1.8 L/h) e a menor  $U_{bs}$  (0.9100) (Figura 13).

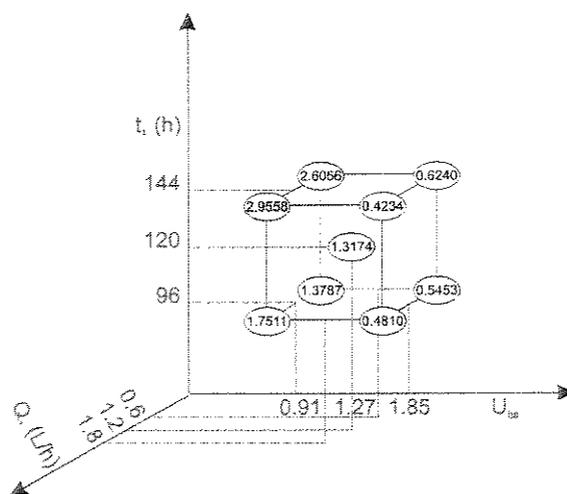


Figura 13 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/mL)

#### 4.2.2. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA

O Quadro 17 apresenta a estimativa dos efeitos para a segunda série de experimentos com respostas expressas em UA:

Quadro 17 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA:

média	34.9365
Q	2.5297
t	15.3556
interação Q x t	-1.1609
U	-38.7685
interação Q x U	-6.5030
interação t x U	-15.0397
interação Q x t x U	-0.8838

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais, caracterizando um modelo quadrático. Estima-se o erro experimental, portanto, a partir do valor absoluto do efeito de interação de 3ª ordem, e se conclui que todos os fatores, desta vez, são importantes no processo. Os fatores vazão e tempo de fermentação aumentam significativamente a resposta quando se aumentam seus níveis. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato mostrou ser o fator de maior importância, aumentando significativamente a resposta quando se diminui o seu nível. As representações gráficas em superfícies de resposta mostram estas tendências (Figuras 14, 15 e 16).

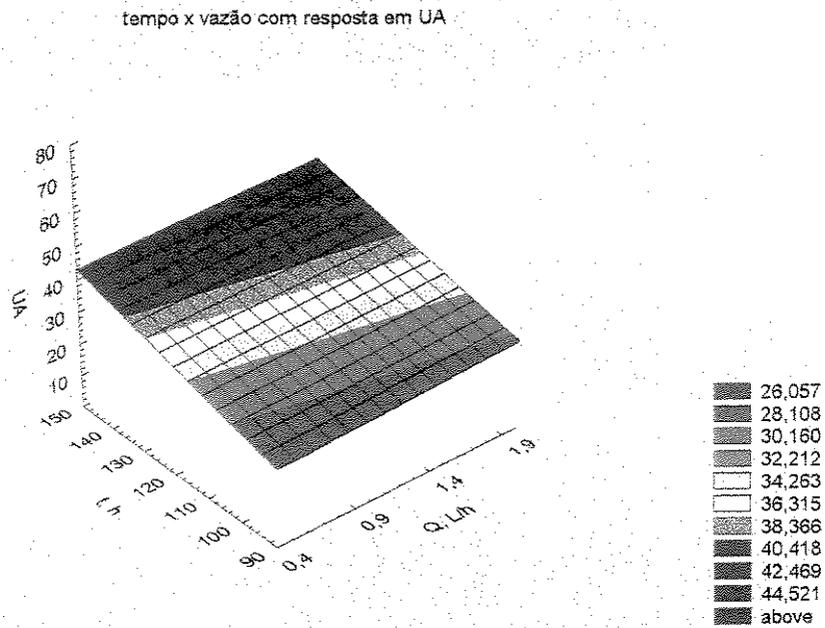


Figura 14 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação ( $t$ ) e vazão de ar ( $Q$ ) com resposta em UA

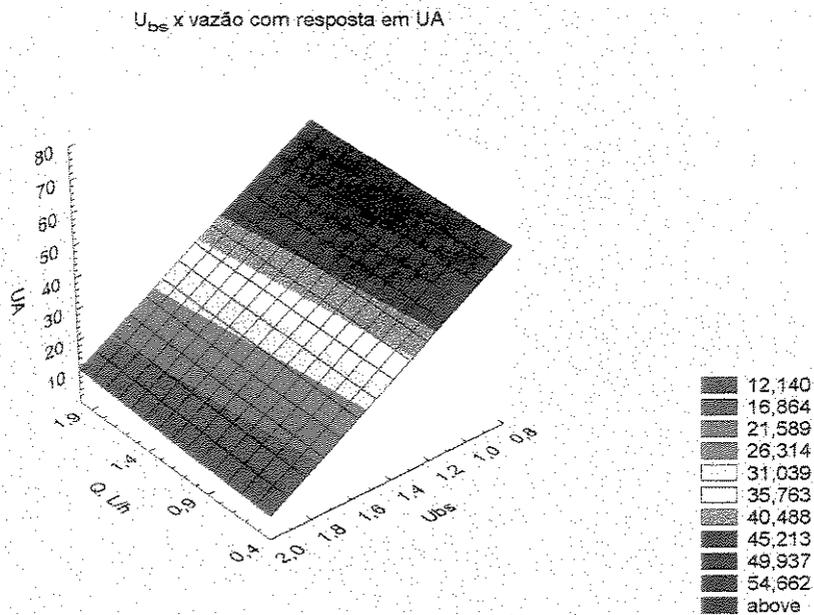


Figura 15 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e vazão de ar ( $Q$ ) com resposta em UA

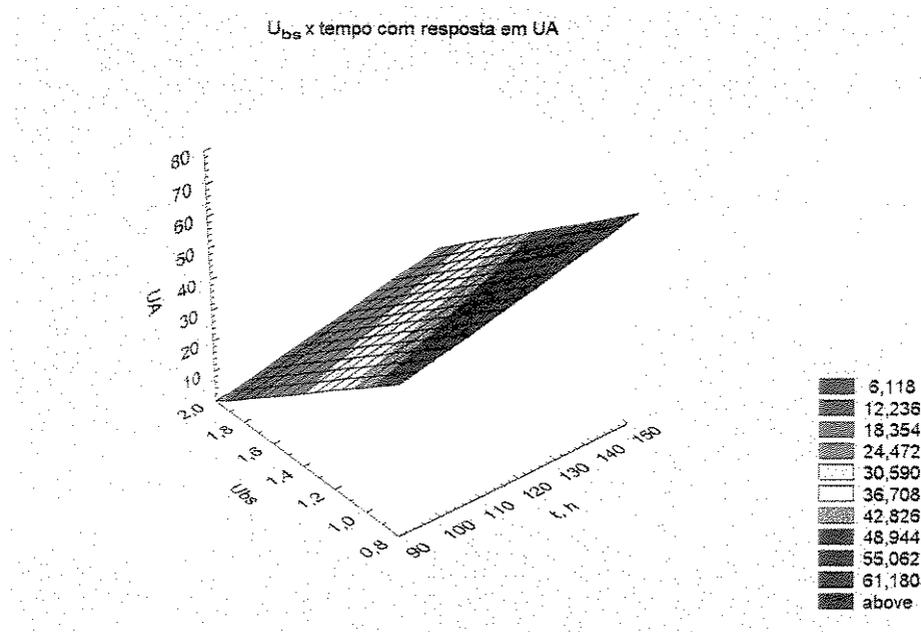


Figura 16 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e tempo de fermentação ( $t$ ) com resposta em UA

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (144 h), a maior vazão (1.8 L/h) e a menor  $U_{bs}$  (0.9100) (Figura 17).

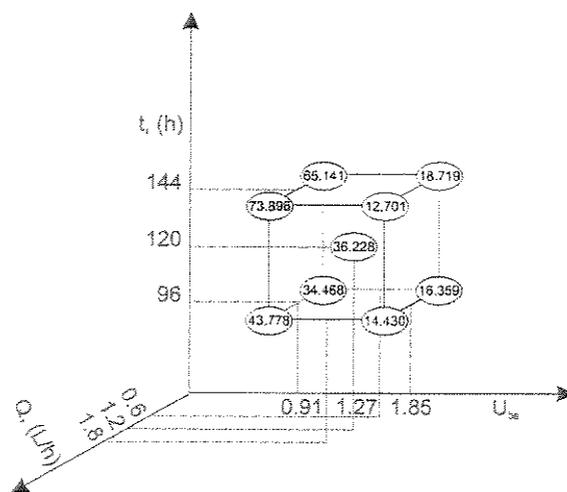


Figura 17 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA)

#### 4.2.3. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/t

A estimativa dos efeitos para a segunda série de experimentos é apresentada no Quadro 18, com respostas expressas em UA/t:

Quadro 18 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA/t:

média	0.2899
Q	0.0240
t	0.0120
interação Q x t	-0.0145
U	-0.3104
interação Q x U	-0.0549
interação t x U	-0.0633
interação Q x t x U	0.0036

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais, caracterizando um modelo quadrático. Estima-se o erro experimental, portanto, a partir do valor absoluto do efeito de interação de 3ª ordem, e se conclui que todos os fatores, desta vez, são importantes no processo. Os fatores vazão e tempo de fermentação aumentam significativamente a resposta quando se aumentam seus níveis. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato mostrou ser o fator de maior importância, aumentando significativamente a resposta quando se diminui o seu nível. As representações gráficas em superfícies de resposta mostram estas tendências (Figuras 18, 19 e 20).

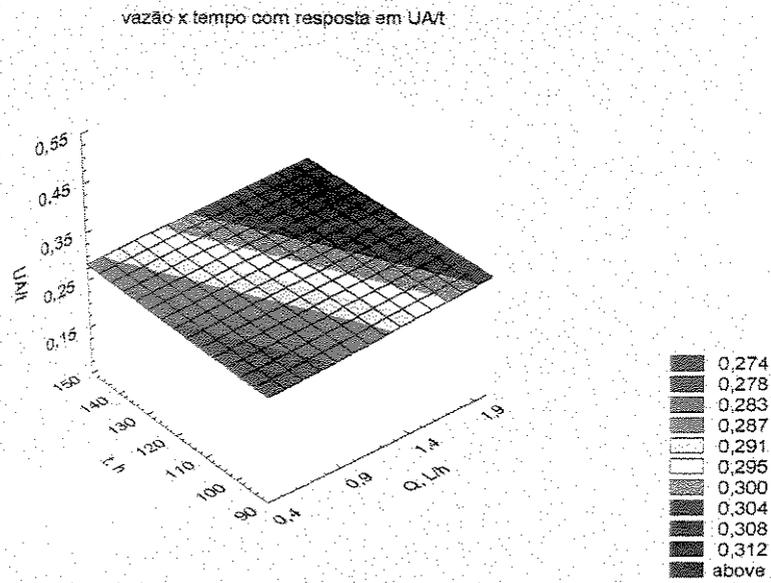


Figura 18 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/t

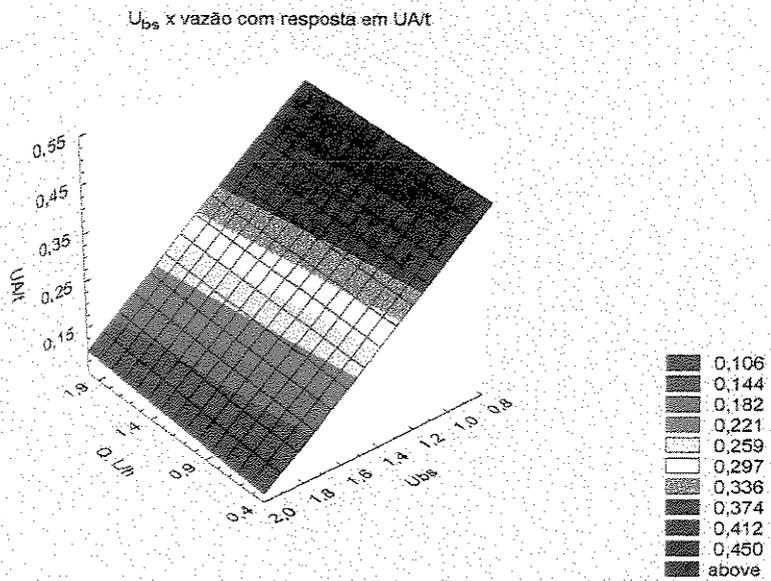


Figura 19 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e vazão de ar (Q) com resposta em UA/t

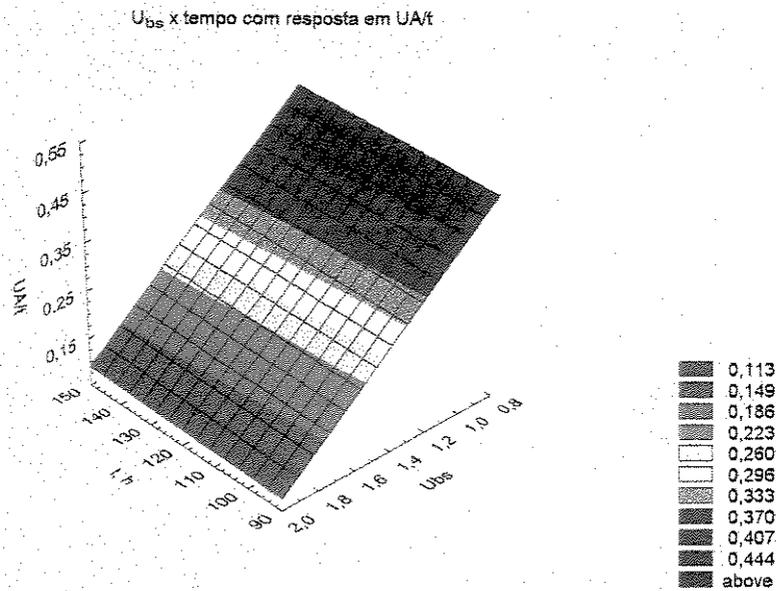


Figura 20 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e tempo de fermentação (t) com resposta em UA/t

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA/t ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (144 h), a maior vazão (1.8 L/h) e a menor  $U_{bs}$  (0.9100) (Figura 21).

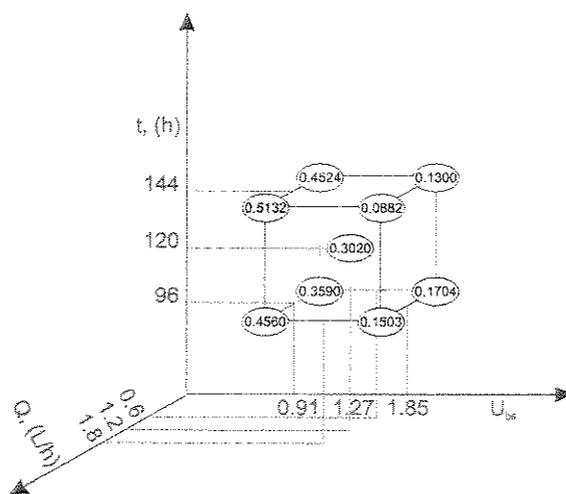


Figura 21 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/t)

#### 4.2.4. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/g<sub>Sseco</sub>

O quadro 19 apresenta a estimativa dos efeitos da resposta UA/g<sub>Sseco</sub> para a segunda série de experimentos:

Quadro 19 – Estimativa dos efeitos para a 2ª série de experimentos com respostas em UA/g<sub>Sseco</sub>:

média	3.7130
Q	0.1469
t	1.4761
interação Q x t	-0.1599
U	-2.9639
interação Q x U	-0.7169
interação t x U	-1.4308
interação Q x t x U	-0.1334

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais, caracterizando um modelo quadrático. Estima-se o erro experimental, portanto, a partir do valor absoluto do efeito de interação de 3ª ordem, e se conclui que todos os fatores, desta vez, são importantes no processo. Os fatores vazão e tempo de fermentação aumentam significativamente a resposta quando se aumentam seus níveis. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato mostrou ser o fator de maior importância, aumentando significativamente a resposta quando se diminui o seu nível. As representações gráficas em superfícies de resposta mostram estas tendências (Figuras 22, 23 e 24).

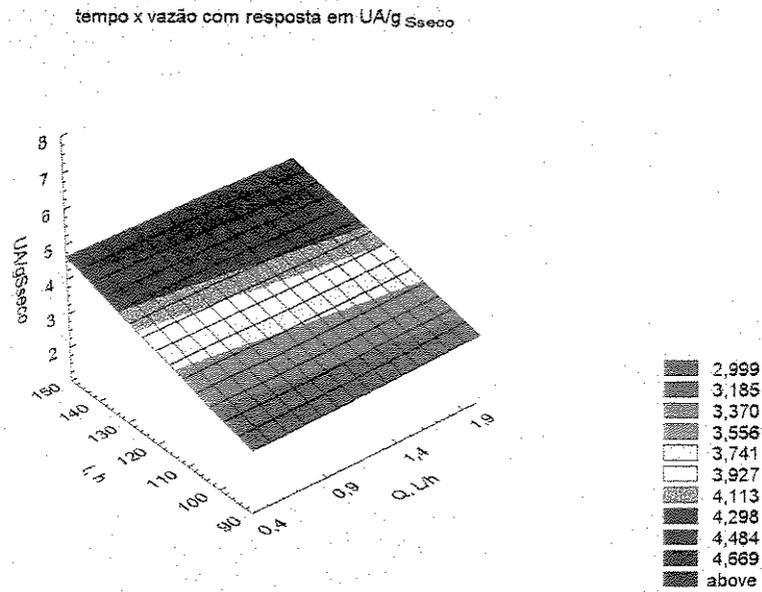


Figura 22 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g<sub>Sseco</sub>

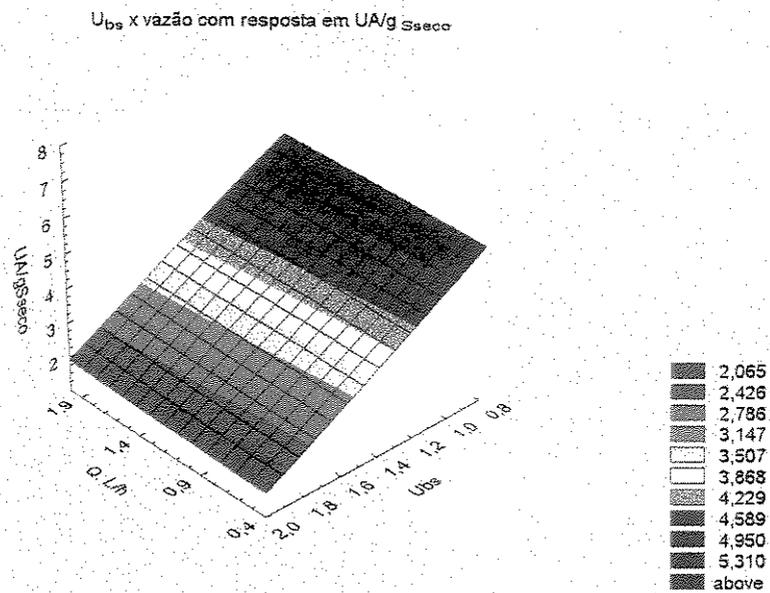


Figura 23 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g<sub>Sseco</sub>

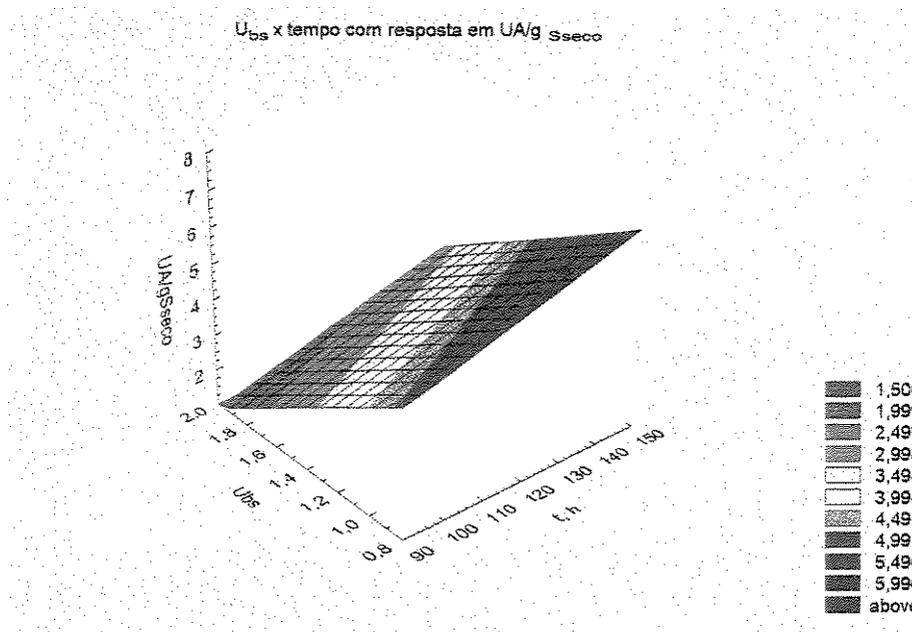


Figura 24 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  inicial do substrato e tempo de fermentação (t) com resposta em UA/g<sub>Sseco</sub>

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA/g<sub>Sseco</sub> ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (144 h), a maior vazão (1.8 L/h) e a menor  $U_{bs}$  (0.9100) (Figura 25).

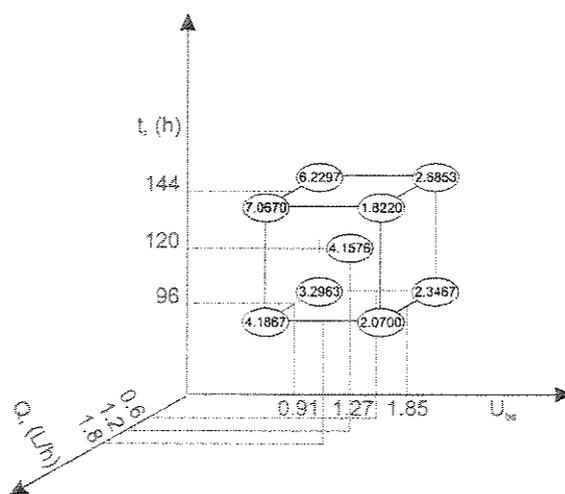


Figura 25 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/g<sub>Sseco</sub>)

Apesar de se ter mostrado que os efeitos de interação entre os fatores são importantes, o que indica que um modelo de 2ª ordem representaria melhor o processo no intervalo experimentado, não foi feito o planejamento estrela porque também ficou claro que as melhores respostas para o processo estão fora do campo experimentado. Parte-se, então, para um novo planejamento fatorial, onde se utiliza, como valores dos parâmetros para o ponto central os correspondentes à melhor resposta obtida nesta série de experimentos, como mostra a Figura 26:

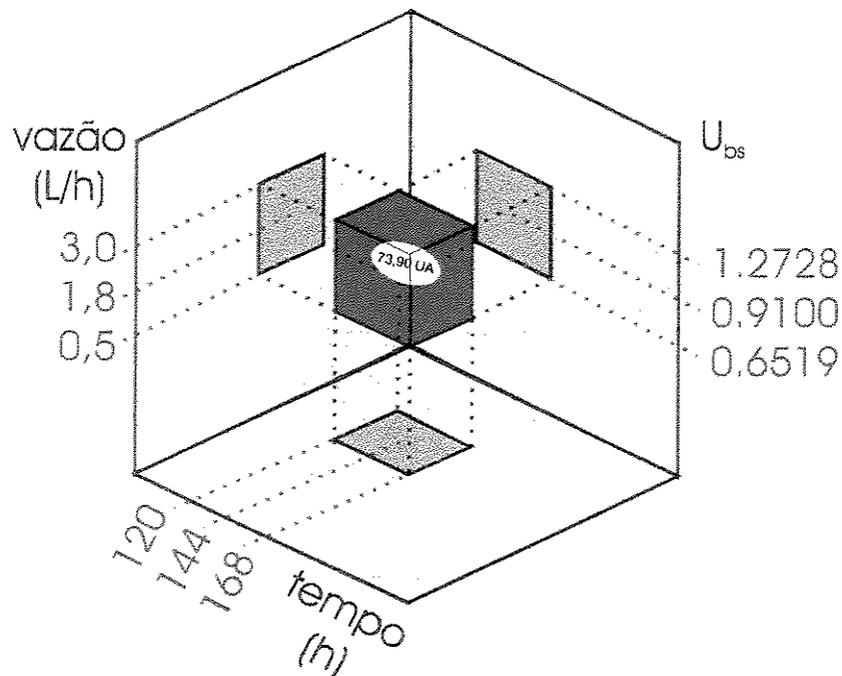


Figura 26 – Planejamento para a 3ª série de experimentos em função do melhor resultado anteriormente obtido

#### 4.3. Terceira Série de Experimentos

Os resultados obtidos na terceira série de experimentos seguem no Quadro 20:

Quadro 20 – Resultados para a 3ª série de experimentos

		Resultados				Planejamento Fatorial em Valores Reais			
		Amostra	UA/mL	UA	UA/t	UA/g <sub>Sseco</sub>	Vazão (L/h)	Tempo de fermentação (h)	U <sub>bs</sub>
modelo linear	fatorial completo 2 <sup>3</sup>	1	3.2311	72,6998	0,6058	5,9593	0.5	120	0.6519
		2	3.7543	84,4718	0,7039	6,9243	3.0	120	0.6519
		3	4.2564	95,7690	0,5701	7,8504	0.5	168	0.6519
		4	4.7295	106,4138	0,6334	8,7230	3.0	168	0.6519
		5	1.3536	37,2240	0,3102	4,2719	0.5	120	1.2728
		6	1.8653	51,2958	0,4275	5,8867	3.0	120	1.2728
		7	2.5452	69,9930	0,4166	8,0325	0.5	168	1.2728
		8	2.7854	76,5985	0,4559	8,7905	3.0	168	1.2728
	ponto central	9	2.9949	74,8727	0,5199	7,1604	1.8	144	0.9100
		10	2.9541	73,8538	0,5129	7,0629	1.8	144	0.9100
		11	3.0628	76,5692	0,5317	7,3226	1.8	144	0.9100
modelo quadrático	ponto central	12	3.0249	75,6234	0,5252	7,2322	1.8	144	0.9100
		13	2.9727	74,3169	0,5161	7,1072	1.8	144	0.9100
	planejamento estrela	14	0.1542	3,8550	0,0268	0,3687	0.0	144	0.9100
		15	3.9456	98,6400	0,6850	9,4333	3.6	144	0.9100
		16	3.2355	80,8875	0,7353	7,7356	1.8	110	0.9100
		17	4.1235	103,0875	0,5791	9,8587	1.8	178	0.9100
		18	4.0234	86,5031	0,6007	6,7075	1.8	144	0.5621
19	1.4712	41,9292	0,2912	5,2303	1.8	144	1.4716		

#### 4.3.1. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/mL

O Quadro 21 mostra a estimativa dos efeitos para a terceira série de experimentos com respostas em UA/mL:

Quadro 21 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA/mL:

média	3.0651
Q	0.4371
t	1.0281
interação Q x t	-0.0804
U	-1.8555
interação Q x U	-0.0611
interação t x U	0.0278
interação Q x t x U	0.0553

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais, com exceção do efeito de interação entre tempo de fermentação e  $U_{bs}$  inicial do substrato, caracterizando um modelo quadrático. Os fatores vazão e tempo de fermentação aumentam significativamente a resposta quando se aumentam seus níveis. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato aumenta significativamente a resposta quando se diminui o seu nível.

O Quadro 22 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA/mL:

Quadro 22 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA/mL

FONTE DE VARIÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	19.4573	9	2.1619	
				5.2955
RESÍDUOS	3.6743	9	0.4083	
FALTA DE AJUSTE	3.6669	5	0.7334	
				395.1234
ERRO PURO	0.0074	4	0.0019	
TOTAL	23.1316	18		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 84.1156

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.9679

Como a porcentagem de variância explicada não está próxima da porcentagem máxima de variância explicável, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95% é devida à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser muito maior do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 7)

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = 395.1234 \gg 6.26 = F_{5,4,0.05} \quad \text{Eq. 7}$$

Ainda outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático é dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central (Eq. 8), ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro

$$s^2 = \frac{\sum (resp - média_{resp})^2}{v}$$

$$s^2 = \frac{(2.9949 - 3.0019)^2 + (2.9541 - 3.0019)^2 + (3.0628 - 3.0019)^2 + (3.0249 - 3.0019)^2 + (2.9727 - 3.0019)^2}{4}$$

$$s^2 = 0.0019 \quad \text{Eq. 8}$$

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F$  ao nível de confiança de 95% (Eq. 9).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 5.2955 = 1.66 \times 3.18 = F_{9,9,0.05} \quad \text{Eq. 9}$$

Observando-se os resultados como superfícies de resposta (Figuras 27, 28 e 29), verifica-se que não há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, não é possível determinar os valores máximos dos parâmetros igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero.

O modelo não pode ser considerado representativo para a resposta atividade enzimática, expressa em UA/mL, uma vez que não há inflexão que identifique um máximo nas superfícies de resposta obtidas.

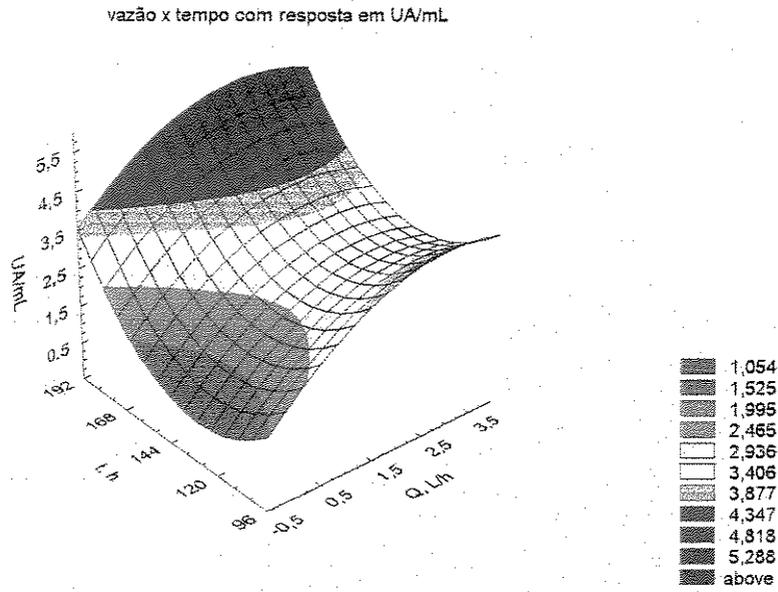


Figura 27 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/mL

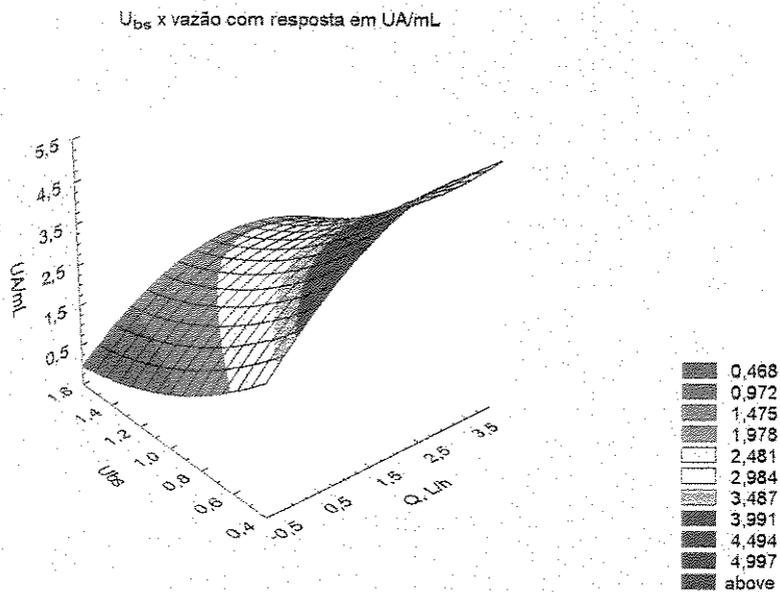


Figura 28 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  e vazão de ar (Q) com resposta em UA/mL

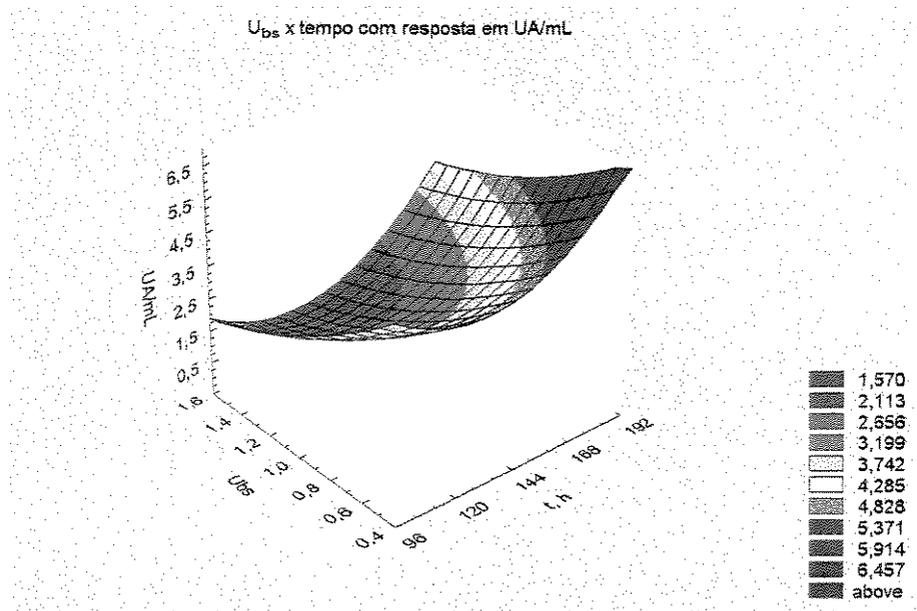


Figura 29 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e U<sub>bs</sub> com resposta em UA/mL

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA/mL ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (168 h), a maior vazão (3.0 L/h) e a menor U<sub>bs</sub> (0.6519) (Figura 30).

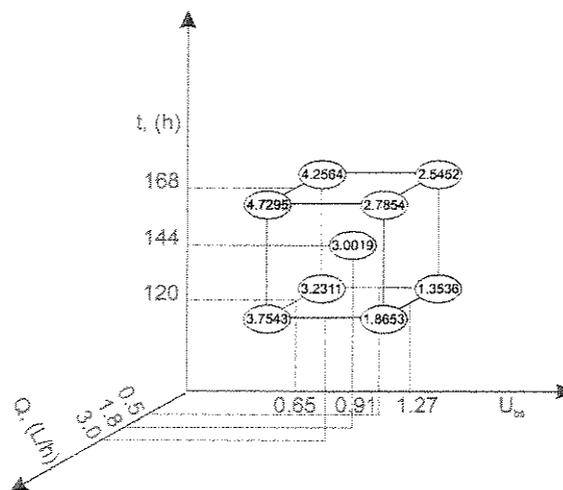


Figura 30 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/mL)

#### 4.3.2. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA

O Quadro 23 mostra a estimativa dos efeitos para a terceira série de experimentos com respostas em UA:

Quadro 23 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA:

média	74.3082
Q	10.7735
t	25.7707
interação Q x t	-2.1484
U	-31.0608
interação Q x U	-0.4349
interação t x U	3.2651
interação Q x t x U	-1.5848

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais, com exceção do efeito de interação entre vazão de ar e  $U_{bs}$  inicial do substrato, caracterizando um modelo quadrático. Os fatores vazão e tempo de fermentação aumentam significativamente a resposta quando se aumentam seus níveis. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato aumenta significativamente a resposta quando se diminui o seu nível.

O Quadro 24 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA:

Quadro 24 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	8811.9730	9	979.1081	
				3.8204
RESÍDUOS	2306.5590	9	256.2843	
FALTA DE AJUSTE	2301.9220	5	460.3844	
				397.1848
ERRO PURO	4.6365	4	1.1591	
TOTAL	11118.5300	18		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 79.2548

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.9583

Como a porcentagem de variância explicada não está próxima da porcentagem máxima de variância explicável, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95% é devida à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser muito maior do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 10)

$$\frac{MQ_{fej}}{MQ_{ep}} = 397.1848 \gg 6.26 = F_{5,4,0.05} \quad \text{Eq. 10}$$

Ainda outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático é dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F$  ao nível de confiança de 95% (Eq. 11).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 3.8204 = 1.20 \times 3.18 = F_{9,9,0.05} \quad \text{Eq. 11}$$

Observando-se os resultados como superfícies de resposta (Figuras 31, 32 e 33), verifica-se que não há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, não é possível determinar os valores máximos dos parâmetros igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero.

O modelo não pode ser considerado representativo para a resposta atividade enzimática, expressa em UA, uma vez que não há inflexão que identifique um máximo nas superfícies de resposta obtidas.

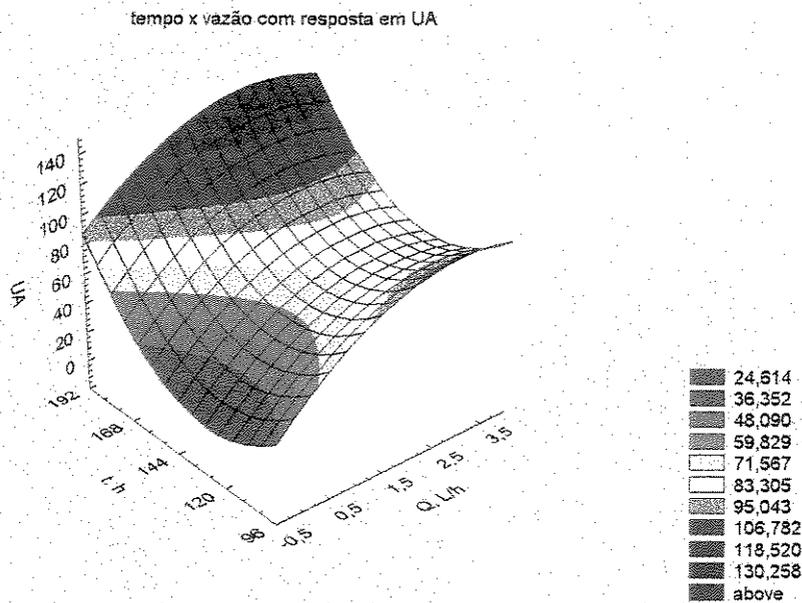


Figura 31 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA

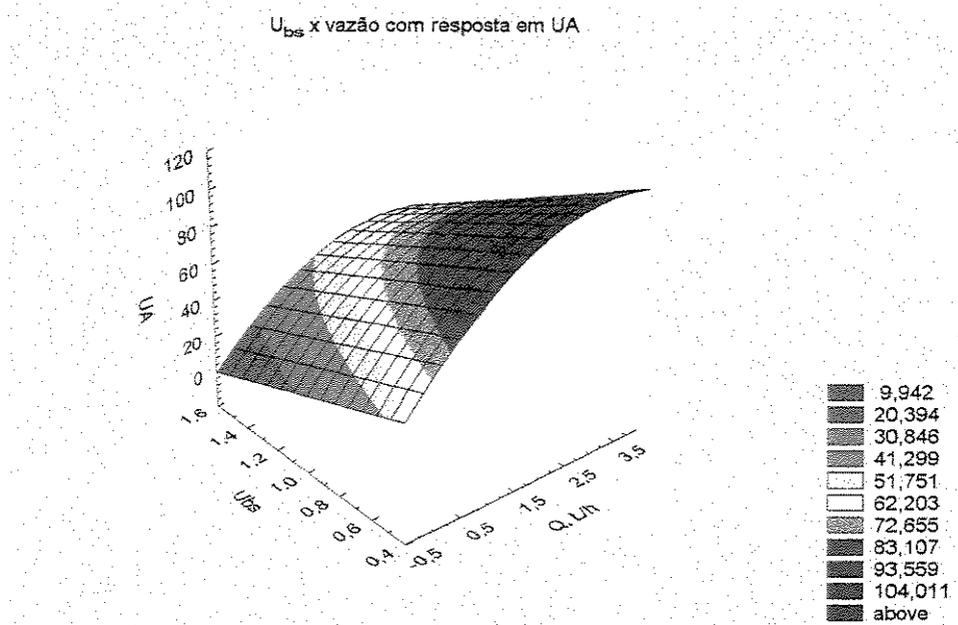


Figura 32 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  e vazão de ar (Q) com resposta em UA

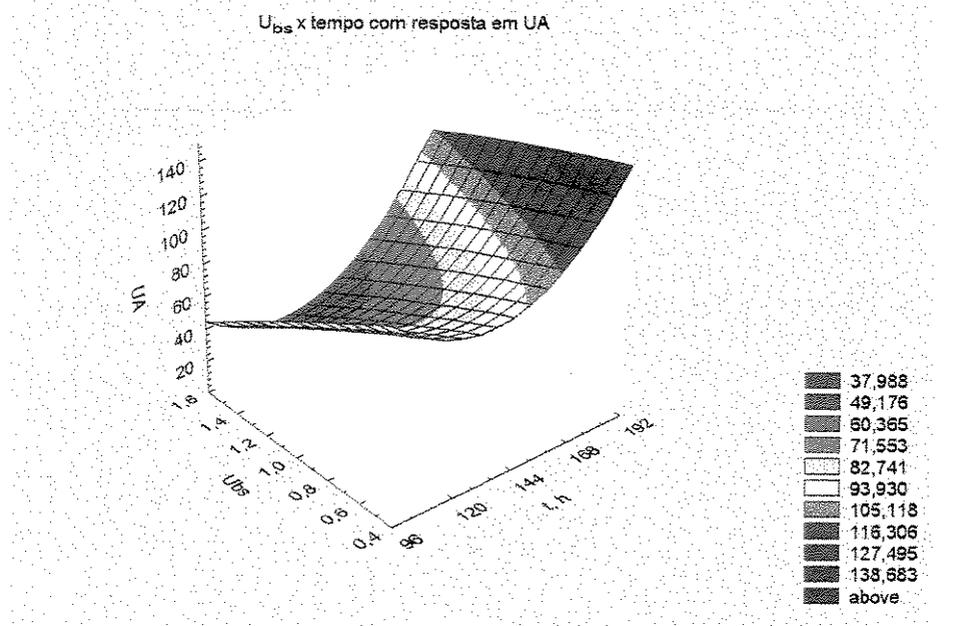


Figura 33 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e  $U_{bs}$  com resposta em UA

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (168 h), a maior vazão (3.0 L/h) e a menor  $U_{bs}$  (0.6519) (Figura 34).

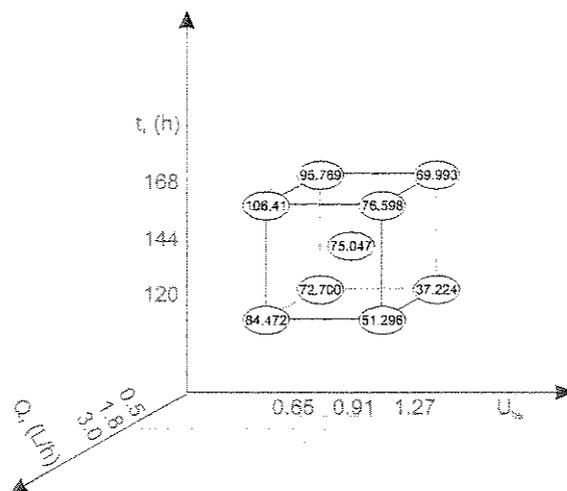


Figura 34 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA)

#### 4.3.3. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/t

O Quadro 25 mostra a estimativa dos efeitos para a terceira série de experimentos com respostas em UA/t:

Quadro 25 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA/t:

média	0.5154
Q	0.0795
t	0.0072
interação Q x t	-0.0282
U	-0.2258
interação Q x U	-0.0012
interação t x U	0.0602
interação Q x t x U	-0.0108

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais vazão de ar e  $U_{bs}$  inicial do substrato, com

exceção do efeito de interação entre vazão de ar e  $U_{bs}$  inicial do substrato, caracterizando um modelo quadrático. O efeito principal do fator tempo de fermentação não é significativo devido ao fato de a resposta para esse planejamento ser justamente uma função do tempo de fermentação. O fator vazão aumenta significativamente a resposta quando se aumenta seu nível. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato aumenta significativamente a resposta quando se diminui o seu nível.

O Quadro 26 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA/t:

Quadro 26 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA/t

FONTE DE VARIÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	0.3875	9	0.0431	
				3.4313
RESÍDUOS	0.1129	9	0.0125	
FALTA DE AJUSTE	0.1127	5	0.0225	
				404.6836
ERRO PURO	0.0002	4	0.0001	
TOTAL	0.5005	18		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 77.4331

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.9555

Como a porcentagem de variância explicada não está próxima da porcentagem máxima de variância explicável, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95% é devida à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser muito maior do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 12)

$$\frac{MQ_{fej}}{MQ_{ep}} = 404.6836 \gg 6.26 = F_{5,4,0.05} \quad \text{Eq. 12}$$

Ainda outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático é dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central, ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de F ao nível de confiança de 95% (Eq. 13).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 3.4313 = 1.08 \times 3.18 = F_{9,9,0.05} \quad \text{Eq. 13}$$

Observando-se os resultados como superfícies de resposta (Figuras 35, 36 e 37), verifica-se que não há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, não é possível determinar os valores máximos dos parâmetros igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero.

O modelo não pode ser considerado representativo para a resposta atividade enzimática, expressa em UA/t, uma vez que não há inflexão que identifique um máximo nas superfícies de resposta obtidas.

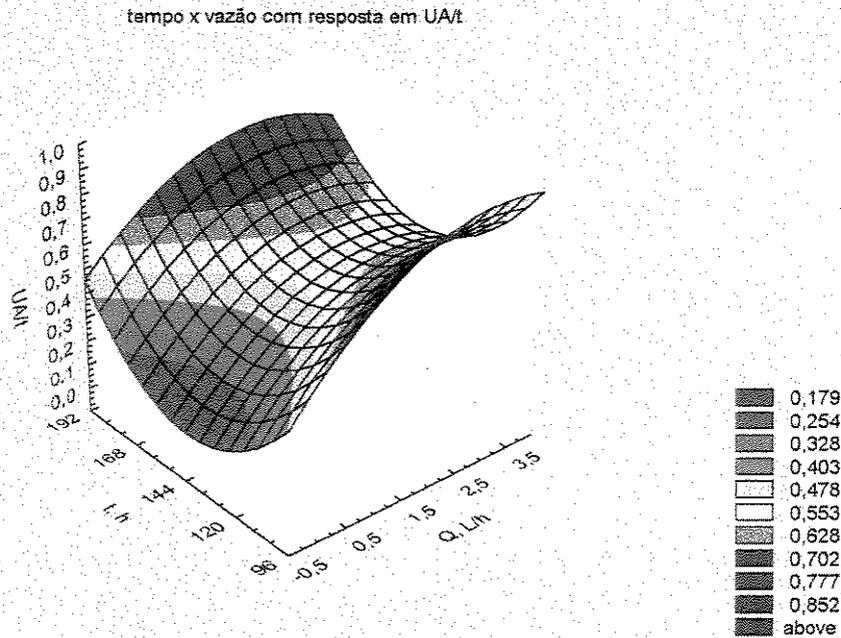


Figura 35 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/t

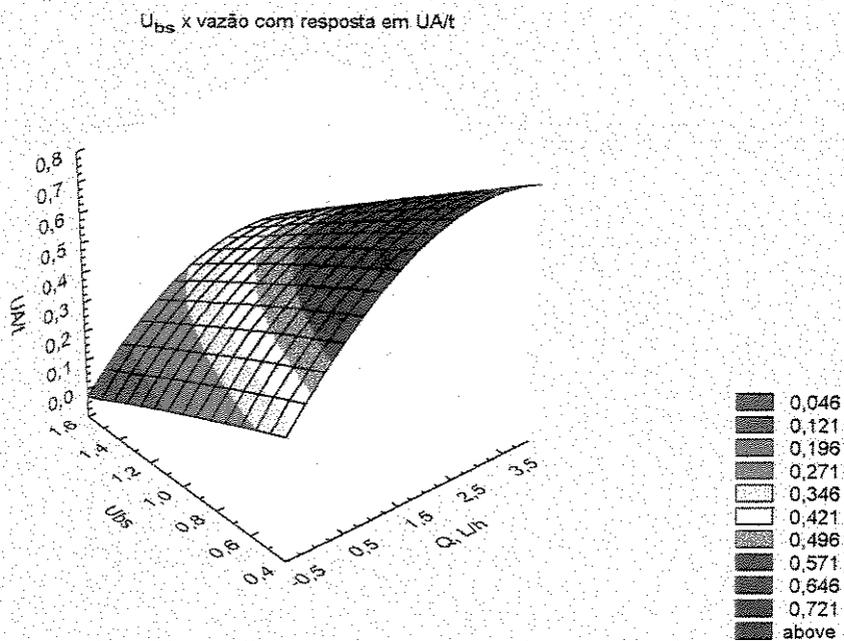


Figura 36 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  e vazão de ar (Q) com resposta em UA/t

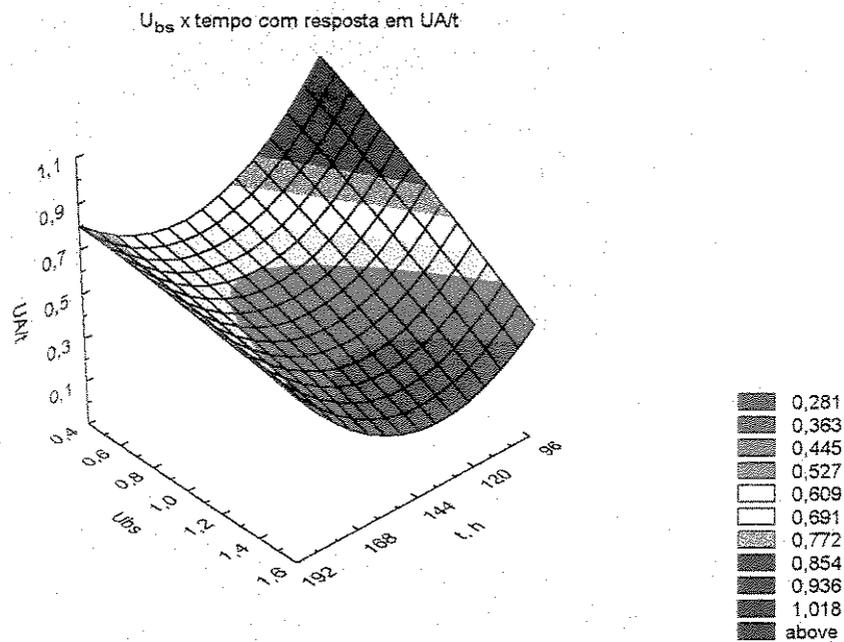


Figura 37 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e U<sub>bs</sub> com resposta em UA/t

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA/t ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (168 h), a maior vazão (3.0 L/h) e a menor U<sub>bs</sub> (0.6519) (Figura 38).

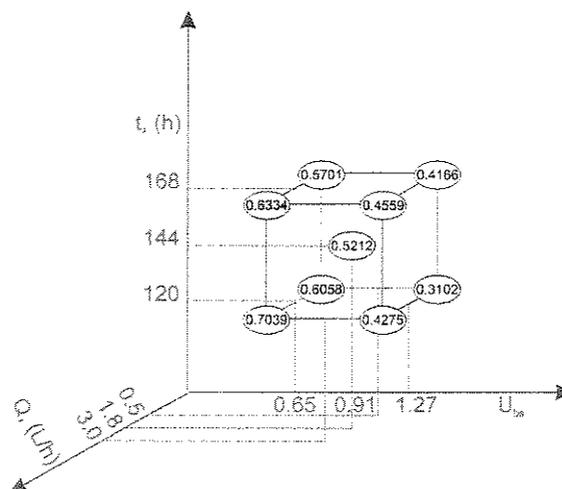


Figura 38 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/t)

#### 4.3.4. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/g<sub>Sseco</sub>

O Quadro 27 mostra a estimativa dos efeitos para a terceira série de experimentos com respostas em UA/g<sub>Sseco</sub>:

Quadro 27 – Estimativa dos efeitos para a 3ª série de experimentos com respostas em UA/g<sub>Sseco</sub>:

média	7.0548
Q	1.0526
t	2.5886
interação Q x t	-0.2373
U	-0.6189
interação Q x U	0.1338
interação t x U	0.7437
interação Q x t x U	-0.1911

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que os efeitos de interação de 2ª ordem são importantes assim como os efeitos principais, com exceção do efeito de interação entre vazão de ar e  $U_{bs}$  inicial do substrato, caracterizando um modelo quadrático. Os fatores vazão de ar e tempo de fermentação aumentam significativamente a resposta quando se aumentam seus níveis. A umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato aumenta significativamente a resposta quando se diminui o seu nível.

O Quadro 28 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA/g<sub>Sseco</sub>:

Quadro 28 – Tabela ANOVA para 3ª série de experimentos com resposta em UA/g<sub>Sseco</sub>

FONTE DE VARIACÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	58.3135	9	6.4793	2.7311
RESÍDUOS	21.3513	9	2.3724	
FALTA DE AJUSTE	21.3089	5	4.2618	401.9335
ERRO PURO	0.0424	4	0.0106	
TOTAL	79.6648	18		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 73.1986

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.9468

Como a porcentagem de variância explicada não está próxima da porcentagem máxima de variância explicável, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95% é devida à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser muito maior do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 14)

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = 401.9335 \gg 6.26 = F_{5,4,0.05} \quad \text{Eq. 14}$$

Ainda outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático é dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central, ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro.

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F$  ao nível de confiança de 95% (Eq. 15).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 2.7311 = 0.86 \times 3.18 = F_{9,9,0.05} \quad \text{Eq. 15}$$

Observando-se os resultados como superfícies de resposta (Figuras. 39, 40 e 41), verifica-se que não há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, não é possível determinar os valores máximos dos parâmetros igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero.

O modelo não pode ser considerado representativo para a resposta atividade enzimática, expressa em UA/g<sub>Sseco</sub>, uma vez que não há inflexão que identifique um máximo nas superfícies de resposta obtidas.

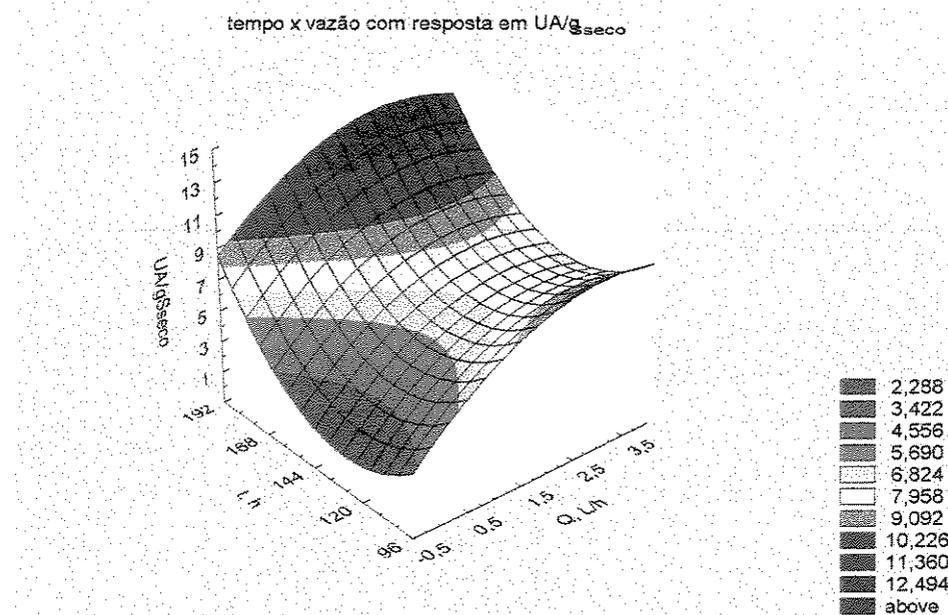


Figura 39 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação (t) e vazão de ar (Q) com resposta em UA/g<sub>Sseco</sub>

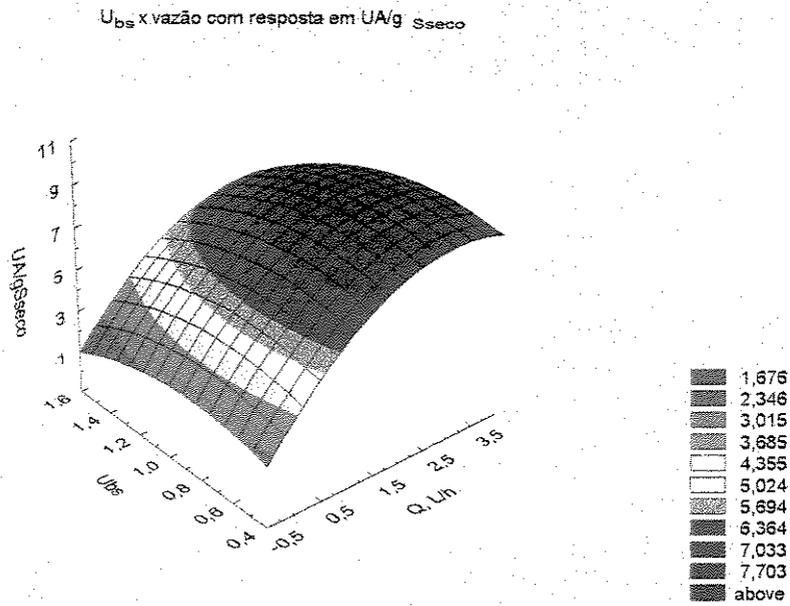


Figura 40 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  e vazão de ar ( $Q$ ) com resposta em  $UA/g_{Sseco}$

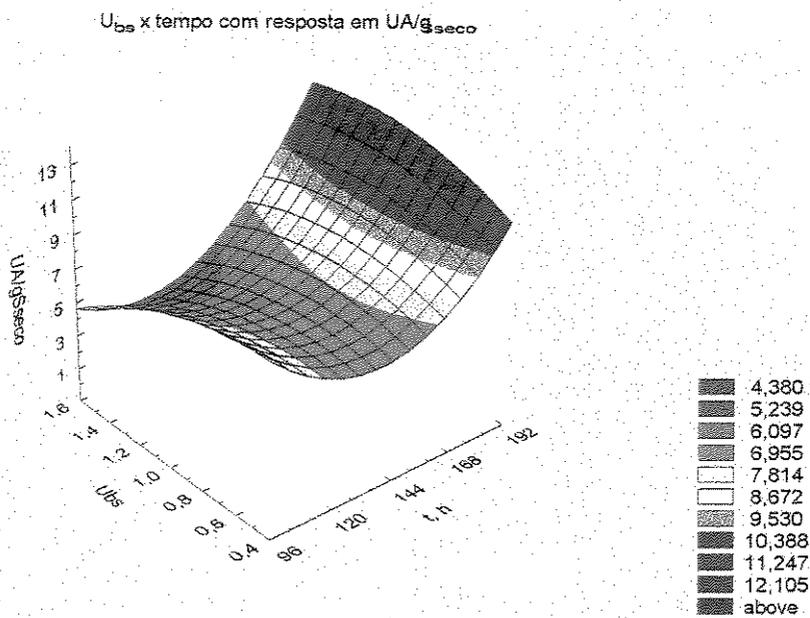


Figura 41 – Representação em superfície de resposta para as variáveis tempo de fermentação ( $t$ ) e  $U_{bs}$  com resposta em  $UA/g_{Sseco}$

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em  $UA/g_{Sseco}$  ocorreram usando-se o maior tempo de fermentação (168 h), a maior vazão (3.0 L/h) e a menor  $U_{bs}$  (0.6519) (Figura 42).

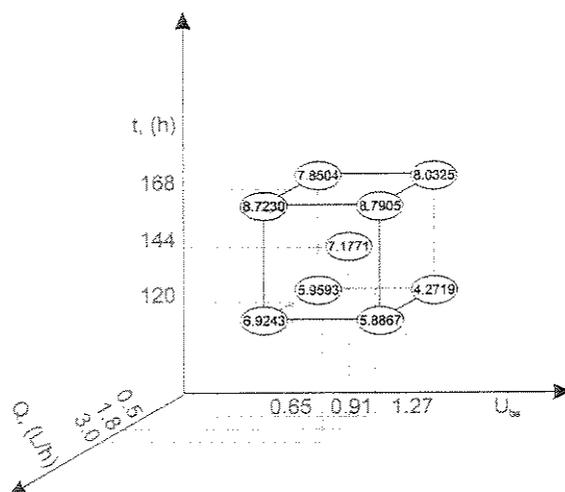


Figura 42 – Representação dos resultados para atividade enzimática ( $UA/g_{Sseco}$ )

Na impossibilidade de se otimizar os parâmetros estudados, no campo experimentado, os estudos seguiram a partir do melhor resultado encontrado, ou seja:

$$Q = 3,0 \text{ L/h}$$

$$t = 168 \text{ h}$$

$$U_{bs} = 0,6519.$$

Como há uma tendência do ponto de máxima resposta encontrar-se a intervalos de tempo de fermentação maiores do que 168 horas, o que, em termos de processo, seria inviável, tanto por motivos econômicos quanto por risco de contaminação, resolveu-se por otimizar as variáveis vazão de ar e umidade inicial do substrato somente. O novo planejamento foi feito, então, a partir da seguinte base, demonstrada na Figura 43.

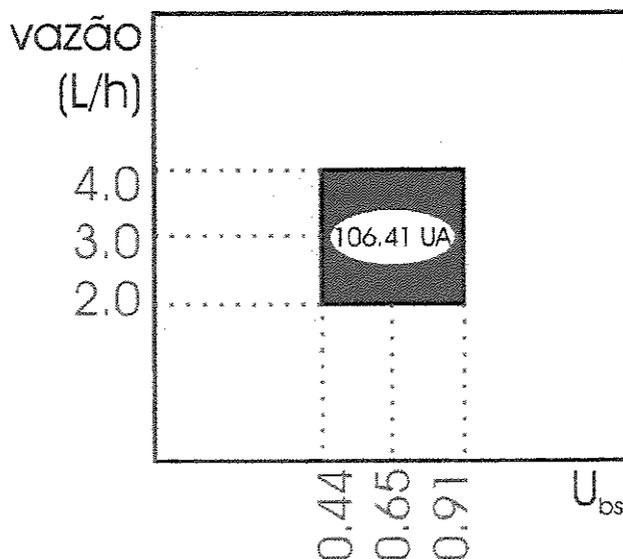


Figura 43 – Representação da 5ª série de experimentos

#### 4.4. Quarta Série de Experimentos

Os resultados obtidos na quarta série de experimentos seguem no Quadro 29:

Quadro 29 – Resultados para a 4ª série de experimentos

		Resultados				Planejamento Fatorial em Valores Reais		
		Amostra	UA/mL	UA	UA/t	UA/g <sub>Sseco</sub>	Vazão (L/h)	U <sub>bs</sub>
modelo linear	fatorial completo 2 <sup>2</sup>	1	3,8129	76,2572	0,4539	5,4696	2.0	0.436
		2	3,5799	71,5984	0,4262	5,1354	4.0	0.436
		3	2,1782	54,4548	0,3241	5,2077	2.0	0.910
		4	2,0719	51,7985	0,3083	4,9537	4.0	0.910
	ponto central	5	4,6723	105,1279	0,6258	8,6175	3.0	0.652
		6	4,5466	102,2981	0,6089	8,3856	3.0	0.652
modelo quadrático	planejamento estrela	7	3,1753	71,4452	0,4253	5,8565	1.6	0.652
		8	3,3633	75,6749	0,4504	6,2032	4.4	0.652
		9	4,3257	82,1879	0,4892	5,6143	3.0	0.357
		10	2,8893	75,1211	0,4471	7,6973	3.0	1.037

#### 4.4.1. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/mL

O Quadro 30 mostra a estimativa dos efeitos para a quarta série de experimentos com respostas em UA/mL:

Quadro 30 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA/mL:

média	2.9107
Q	-0.1696
U	-1.5713
interação Q x U	0.0633

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que tanto a vazão de ar quanto a umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato, principalmente, tem influência significativa nas respostas, aumentando os resultados quando se diminuem seus níveis.

O Quadro 31 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA/mL:

Quadro 31 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA/mL

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	6.7607	5	1.3521	7.0806
RESÍDUOS	0.7639	4	0.1910	
FALTA DE AJUSTE	0.7560	3	0.2520	31.8602
ERRO PURO	0.0079	1	0.0079	
TOTAL	7.5246	9		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 89.8484

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.8949

Como a porcentagem de variância explicada está relativamente próxima da porcentagem máxima de variância explicável, não há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Também não há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95% devido à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser menor do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 16)

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = 31.8602 < 230.2 = F_{3,1,0.05} \tag{Eq. 16}$$

Há uma evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático, porém, dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central, ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F$  ao nível de confiança de 95% (Eq. 17).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 7.0806 = 1.13 \times 6.26 = F_{5,4,0.05} \tag{Eq. 17}$$

Observando-se os resultados como superfície de resposta (Figura 44), verifica-se que há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, é possível se determinar os valores máximos dos parâmetros da equação do modelo encontrado igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero. O cálculo dos máximos foi feito através do programa descrito no Apêndice – Figura 2, pelo método de integração de primeira ordem de Euler.

O modelo obtido através do planejamento fatorial, para UA/mL, com os valores dos parâmetros codificados, é o que segue:

$$UA/mL = 4.6096 - 0.0092q - 0.6468u - 0.8022q^2 - 0.6331u^2 + 0.0317qu \tag{Eq. 18}$$

$\pm 0.0628 \quad \pm 0.0314 \quad \pm 0.0314 \quad \pm 0.0416 \quad \pm 0.0416 \quad \pm 0.0444$

Percebe-se que há coeficientes com valores absolutos menores do que o valor de seus respectivos erros padrão (apresentados sob os coeficientes na equação). Por isso, não se pode dizer que esses coeficientes são diferentes de zero. Entretanto, se se desprezar estes coeficientes, o cálculo do máximo e dos parâmetros ótimos torna-se impossível. Portanto, esses coeficientes foram mantidos no modelo, e os valores obtidos devem ser considerados com esta ressalva.

$$\begin{aligned}q_{\text{ótimo}} &= -0.0158 \\u_{\text{ótimo}} &= -0.5112 \\UA/mL_{\text{máximo}} &= 4.7750\end{aligned}$$

A relação entre os valores dos parâmetros codificados e os valores reais é a seguinte:

$$\begin{aligned}q &= \frac{Q - 3.0}{1.0} \\u &= \frac{U - 0.652}{0.237}\end{aligned}\tag{Eq. 19}$$

Logo, os parâmetros otimizados em valores reais, para a resposta UA/mL são

$$\begin{aligned}Q_{\text{ótimo}} &= 2.98 \text{ L/h} \\U_{\text{ótimo}} &= 0.531\end{aligned}$$

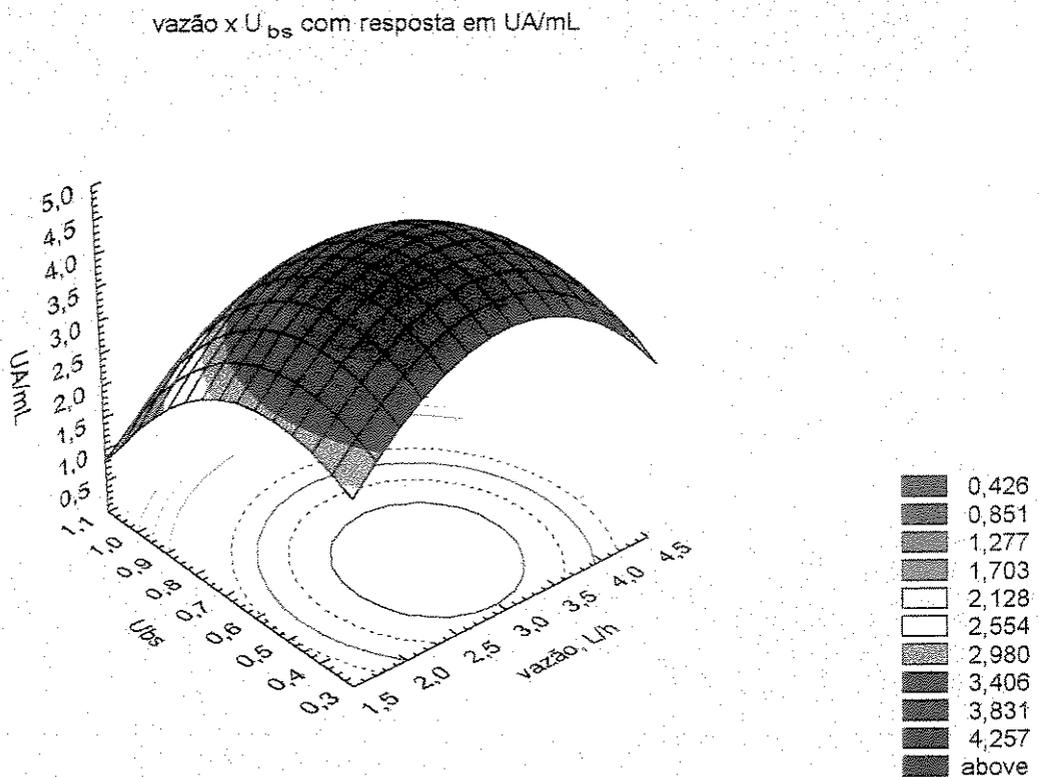


Figura 44 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  e vazão de ar ( $Q$ ) com resposta em UA/mL

A representação gráfica da Figura 44 inclui as curvas de nível correspondentes à superfície de resposta. A curva de nível em vermelho escuro delimita a área onde se encontraram as melhores respostas para o experimento.

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA/mL ocorreram, com o tempo de fermentação de 168 h, usando-se a vazão (3.0 L/h) e a  $U_{bs}$  (0.6519) do ponto central (Figura 45).

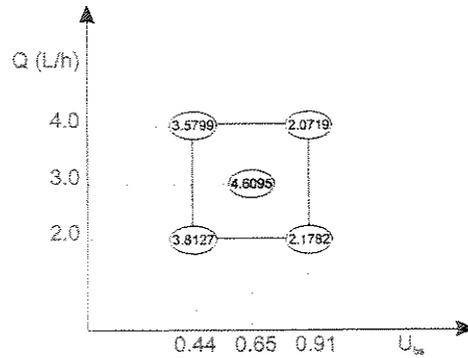


Figura 45 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/mL)

#### 4.4.2. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA

A estimativa dos efeitos para as respostas expressas em UA, para a quarta série de experimentos é mostrada no Quadro 32:

Quadro 32 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA:

média	63.5281
Q	-3.6593
U	-20.7994
interação Q x U	0.9995

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que tanto a vazão de ar quanto a umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato, principalmente, tem influência significativa nas respostas, aumentando os resultados quando se diminuem seus níveis.

O Quadro 33 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA:

Quadro 33 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA

FONTE DE VARIACÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	2198.6730	5	439.7349	
				3.7672
RESÍDUOS	466.9077	4	116.7269	
FALTA DE AJUSTE	462.9038	3	154.3013	
				38.5380
ERRO PURO	4.0039	1	4.0039	
TOTAL	2665.5810	9		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 82.4838

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.8498

Como a porcentagem de variância explicada não está próxima da porcentagem máxima de variância explicável, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Não há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95%, porém, devido à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser menor do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 20)

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = 38.5380 < 230.2 = F_{3,1,0.05} \quad \text{Eq. 20}$$

Outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático é dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central, ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F$  ao nível de confiança de 95% (Eq. 21).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 3.7672 = 0.6 \times 6.26 = F_{5,4,0.05} \quad \text{Eq. 21}$$

Observando-se os resultados como superfície de resposta (Figura 46), verifica-se que há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, é possível se determinar os valores máximos dos parâmetros da equação do modelo encontrado igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero. O cálculo dos máximos foi feito através do programa descrito no Apêndice – Figura 3, pelo método de integração de primeira ordem de Euler.

O modelo obtido através do planejamento fatorial, para UA, com os valores dos parâmetros codificados, é o que segue:

$$UA = 103.7168 \pm 1.4149 - 0.1673 \pm 0.7075 q - 6.4499 \pm 0.7075 u - 18.2266 \pm 0.9360 q^2 - 15.6786 \pm 0.9360 u^2 + 0.4998 \pm 1.0005 qu \quad \text{Eq. 22}$$

Verifica-se que há coeficientes com valores absolutos menores do que o valor de seus respectivos erros padrão (apresentados sob os coeficientes na equação). Por isso, não se pode dizer que esses coeficientes são diferentes de zero. Entretanto, se se desprezar estes coeficientes, o cálculo do máximo e dos parâmetros ótimos torna-se impossível. Portanto, esses coeficientes foram mantidos no modelo, e os valores encontrados devem ser considerados com esta ressalva.

$$q_{\text{ótimo}} = -0.0074$$

$$u_{\text{ótimo}} = -0.2058$$

$$UA_{\text{máximo}} = 104.3811$$

A relação entre os valores dos parâmetros codificados e os valores reais é a seguinte:

$$q = \frac{Q - 3.0}{1.0}$$

$$u = \frac{U - 0.652}{0.237} \quad \text{Eq. 23}$$

Logo, os parâmetros otimizados em valores reais, para a resposta UA são

$$Q_{\text{ótimo}} = 2.99 \text{ L/h}$$

$$U_{\text{ótimo}} = 0.603$$

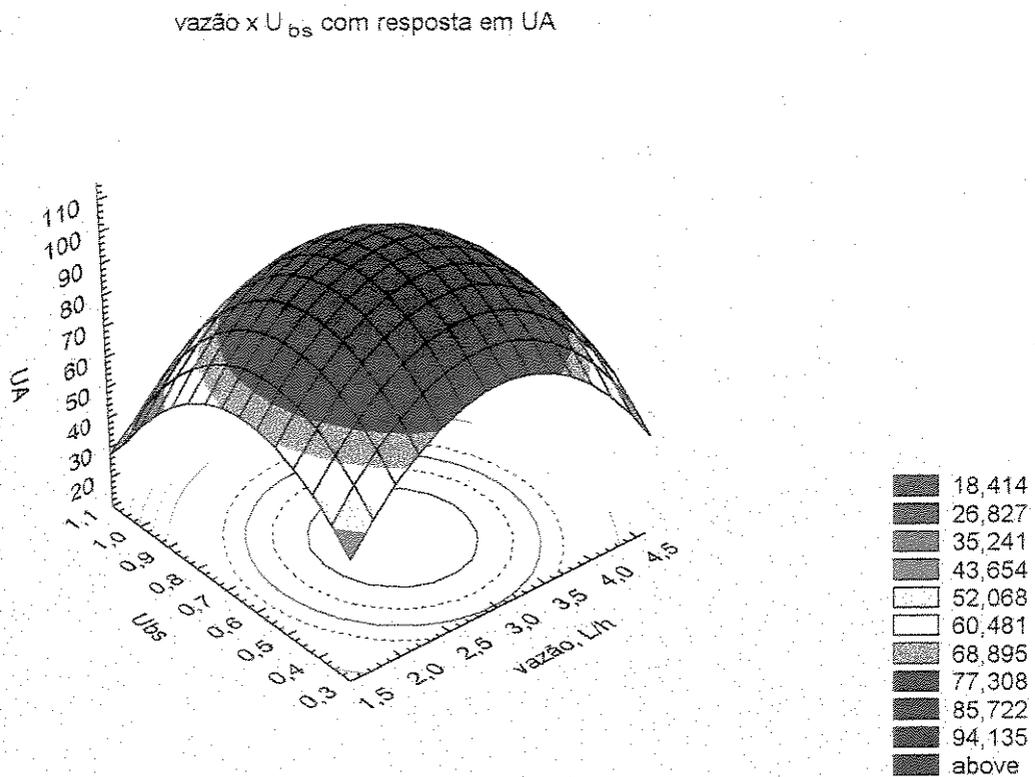


Figura 46 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  e vazão de ar ( $Q$ ) com resposta em UA

A representação gráfica apresentada na Figura 46 mostra as curvas de nível, na base do gráfico. A curva em vermelho escuro delimita a área onde se encontram as melhores respostas para UA.

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA ocorreram, com o tempo de fermentação de 168 h, usando-se a vazão (3.0 L/h) e a  $U_{bs}$  (0.6519) do ponto central (Figura 47).

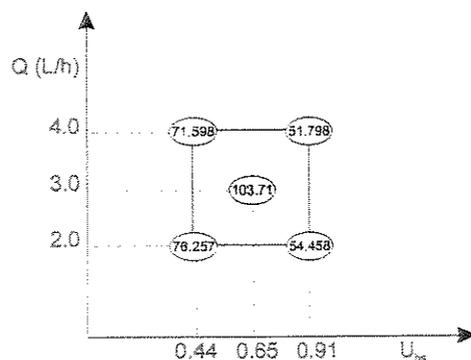


Figura 47 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA)

#### 4.4.3. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/t

O Quadro 34 apresenta a estimativa dos efeitos para a quarta série de experimentos com respostas em UA/t:

Quadro 34 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA/t:

média	0.3781
Q	-0.0218
U	-1.1238
interação Q x U	0.0060

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que tanto a vazão de ar quanto a umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato, principalmente, tem influência significativa nas respostas, aumentando os resultados quando se diminuem seus níveis.

O Quadro 35 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA/t:

Quadro 35 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA/t

FONTE DE VARIÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	0.0779	5	0.0156	
				3.7668
RESÍDUOS	0.0165	4	0.0041	
FALTA DE AJUSTE	0.0164	3	0.0055	
				38.5620
ERRO PURO	0.0001	1	0.0001	
TOTAL	0.0944	9		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 82.4824

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.8499

Como a porcentagem de variância explicada não está próxima da porcentagem máxima de variância explicável, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Não há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95%, porém, devido à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser menor do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 24)

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = 38.5620 < 230.2 = F_{3,1,0.05} \quad \text{Eq. 24}$$

Outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático é dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central, ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F$  ao nível de confiança de 95% (Eq. 25).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 3.7668 = 0.6 \times 6.26 = F_{5,4,0.05} \quad \text{Eq. 25}$$

Observando-se os resultados como superfície de resposta (Figura 48), verifica-se que há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, é possível se determinar os valores máximos dos parâmetros da equação do modelo encontrado igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero. O cálculo dos máximos foi feito através do programa descrito no Apêndice – Figura 4, pelo método de integração de primeira ordem de Euler.

O modelo obtido através do planejamento fatorial, para UA/t, com os valores dos parâmetros codificados, é o que segue:

$$UA/t = 0.6174 \pm 0.0071 - 0.0010 \pm 0.0035 q - 0.0384 \pm 0.0035 u - 0.1085 \pm 0.0047 q^2 - 0.0933 \pm 0.0047 u^2 + 0.0030 \pm 0.0050 qu \quad \text{Eq. 26}$$

Nota-se que há coeficientes com valores absolutos menores do que o valor de seus respectivos erros padrão (apresentados sob os coeficientes na equação). Por isso, não se pode dizer que esses coeficientes são diferentes de zero. Entretanto, se se desprezar estes coeficientes, o cálculo do máximo e dos parâmetros ótimos torna-se impossível. Portanto, esses coeficientes foram mantidos no modelo, e os valores encontrados devem ser considerados com esta ressalva.

$$\begin{aligned} q_{\text{ótimo}} &= -0.0075 \\ u_{\text{ótimo}} &= -0.2059 \\ UA/t_{\text{máximo}} &= 0.6214 \end{aligned}$$

A relação entre os valores dos parâmetros codificados e os valores reais é a seguinte:

$$\begin{aligned} q &= \frac{Q - 3.0}{1.0} \\ u &= \frac{U - 0.652}{0.237} \end{aligned} \quad \text{Eq. 27}$$

Logo, os parâmetros otimizados em valores reais, para a resposta UA/t são

$$Q_{\text{ótimo}} = 2.99 \text{ L/h}$$

$$U_{\text{ótimo}} = 0.603$$

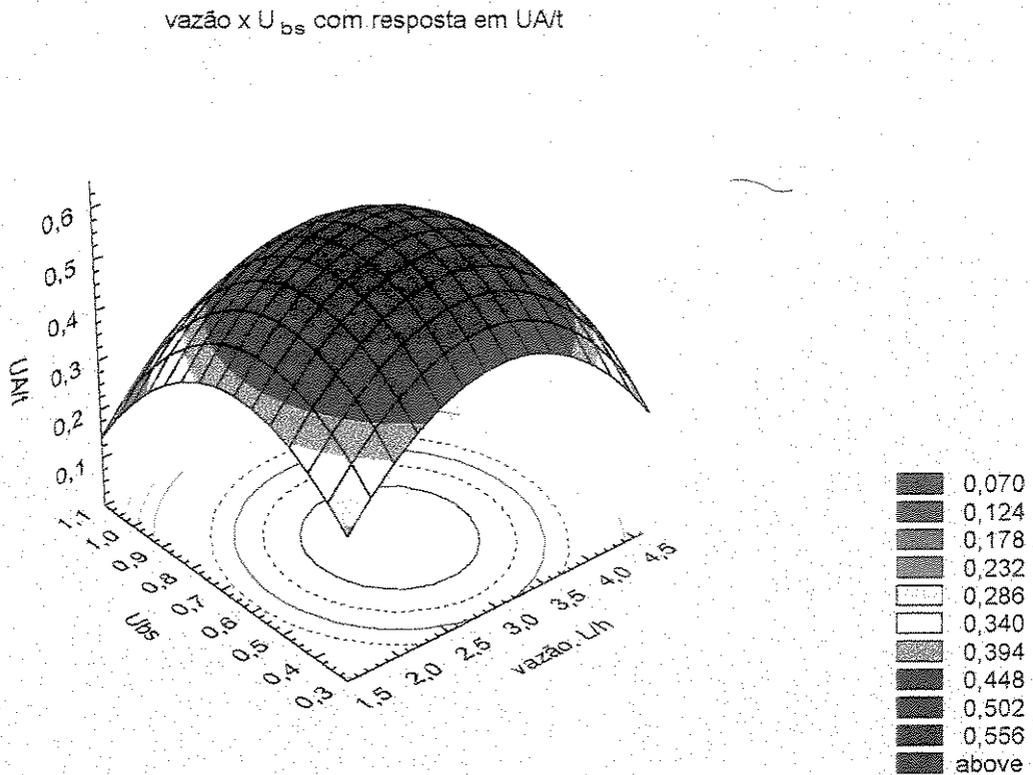


Figura 48 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{\text{bs}}$  e vazão de ar ( $Q$ ) com resposta em UA/t

As curvas de nível mostradas na Figura 48 apresentam a área onde se encontram as melhores respostas em UA/t, caracterizadas pela linha em vermelho escuro.

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em UA/t ocorreram, com o tempo de fermentação de 168 h, usando-se a vazão (3.0 L/h) e a  $U_{\text{bs}}$  (0.6519) do ponto central (Figura 49).

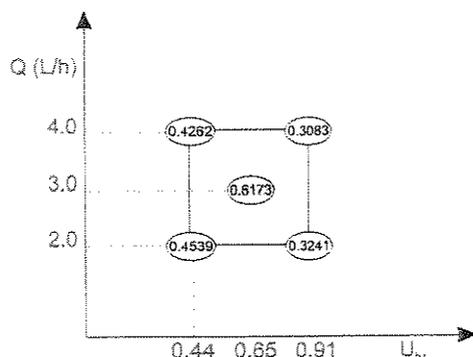


Figura 49 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/t)

#### 4.4.4. Análise das respostas de atividade enzimática expressas em UA/g<sub>Sseco</sub>

É apresentada no Quadro 36 a estimativa dos efeitos para a quarta série de experimentos com reposta em UA/g<sub>Sseco</sub>:

Quadro 36 – Estimativa dos efeitos para a 4ª série de experimentos com resposta em UA/g<sub>Sseco</sub>:

média	5.1916
Q	-0.2941
U	-0.2218
interação Q x U	0.0401

Observando-se a estimativa dos efeitos, percebe-se que tanto a vazão de ar quanto a umidade em base seca ( $U_{bs}$ ) inicial do substrato, principalmente, tem influência significativa nas respostas, aumentando os resultados quando se diminuem seus níveis.

O Quadro 37 apresenta a tabela ANOVA para a análise estatística das respostas para atividade enzimática expressa em UA/g<sub>Sseco</sub>:

Quadro 37 – Tabela ANOVA para 4ª série de experimentos com resposta em UA/g<sub>Sseco</sub>

FONTE DE VARIÇÃO	SOMA QUADRÁTICA	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIA QUADRÁTICA	TESTE F
REGRESSÃO	13.1435	5	2.6287	
				2.4710
RESÍDUOS	4.2553	4	1.0638	
FALTA DE AJUSTE	4.2284	3	1.4095	
				52.3865
ERRO PURO	0.0269	1	0.0269	
TOTAL	17.3988	9		

% DE VARIÂNCIA EXPLICADA = 75.5427

% MÁXIMA DE VARIÂNCIA EXPLICÁVEL = 99.8454

Como a porcentagem de variância explicada não está próxima da porcentagem máxima de variância explicável, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático.

Não há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95%, porém, devido à relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro ser menor do que o valor de  $F$  tabelado (Eq. 28)

$$\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} = 52.3865 < 230.2 = F_{3,1,0.05} \quad \text{Eq. 28}$$

Outra evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático é dada pelo valor de  $s^2$ , calculado com base nas repetições do ponto central, ser muito próximo do valor da média quadrática do erro puro

A regressão não é significativa para o modelo já que a relação entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo é menos do que 4 a 5 vezes maior do que o valor tabelado de  $F$  ao nível de confiança de 95% (Eq. 29).

$$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}} = 2.4710 = 0.39 \times 6.26 = F_{5,4,0.05} \quad \text{Eq. 29}$$

Observando-se os resultados como superfície de resposta (Fig. 50), verifica-se que há um resultado máximo dentro do campo estudado, e nessa situação, é possível se determinar os valores máximos dos parâmetros da equação do modelo encontrado igualando-se a primeira derivada de cada variável a zero. O cálculo dos máximos foi feito através do programa descrito no Apêndice – Figura 5, pelo método de integração de primeira ordem de Euler.

O modelo obtido através do planejamento fatorial, para  $UA/g_{S_{seco}}$ , com os valores dos parâmetros codificados, é o que segue:

$$UA/g_{S_{seco}} = 8.5019 \pm 0.1160 - 0.0122q \pm 0.0580 + 0.3128u \pm 0.0580 - 1.5241q^2 \pm 0.0767 - 1.2111u^2 \pm 0.0767 + 0.0200qu \pm 0.0820 \quad \text{Eq. 30}$$

Percebe-se que há coeficientes com valores absolutos menores do que o valor de seus respectivos erros padrão (apresentados sob os coeficientes na equação). Por isso, não se pode dizer que esses coeficientes são diferentes de zero. Entretanto, se se desprezar estes coeficientes, o cálculo do máximo e dos parâmetros ótimos torna-se impossível. Portanto, esses coeficientes foram mantidos no modelo, e os valores encontrados devem ser considerados com esta ressalva.

$$\begin{aligned} q_{\text{ótimo}} &= -0.0032 \\ u_{\text{ótimo}} &= 0.1291 \\ UA/g_{S_{seco-\text{máximo}}} &= 8.5221 \end{aligned}$$

A relação entre os valores dos parâmetros codificados e os valores reais é a seguinte:

$$\begin{aligned} q &= \frac{Q - 3.0}{1.0} \\ u &= \frac{U - 0.652}{0.237} \end{aligned} \quad \text{Eq. 31}$$

Logo, os parâmetros otimizados em valores reais, para a resposta  $UA/g_{S_{seco}}$  são

$$Q_{\text{ótimo}} = 3.00 \text{ L/h}$$

$$U_{\text{ótimo}} = 0.683$$

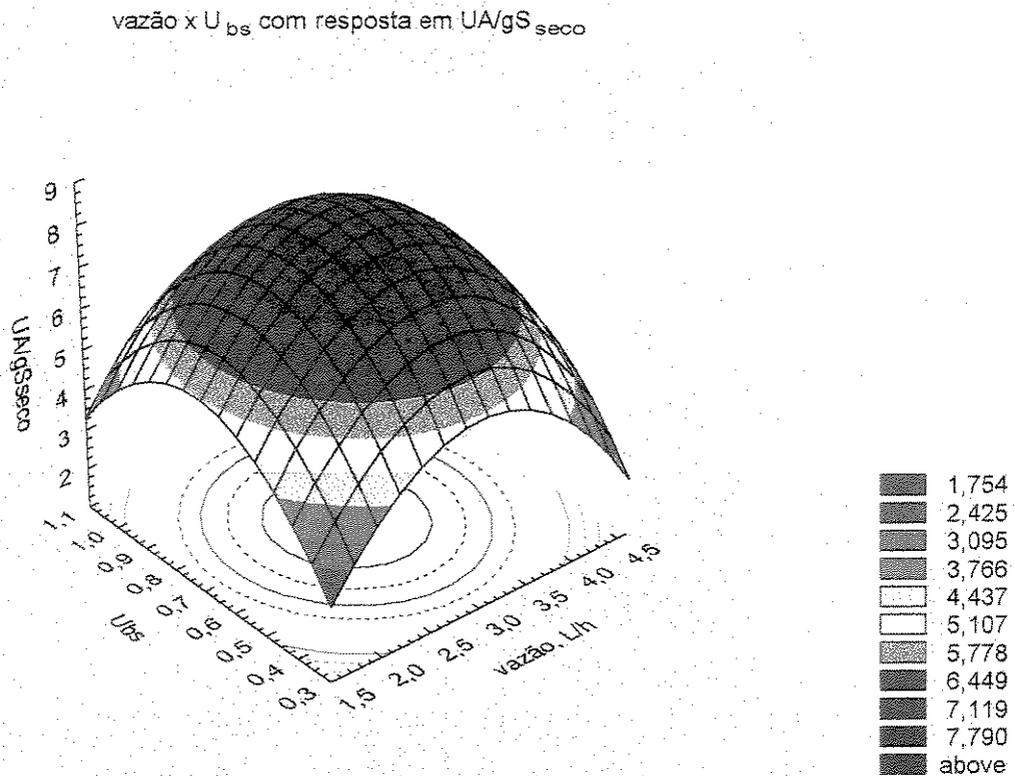


Figura 50 – Representação em superfície de resposta para as variáveis  $U_{bs}$  e vazão de ar ( $Q$ ) com resposta em  $UA/g_{S_{seco}}$

A curva de nível representada pela cor vermelho escuro, na Figura 50, delimita a região onde se encontraram as melhores respostas para  $UA/g_{S_{seco}}$ .

Outra representação mostra que os melhores resultados de atividade enzimática expressas em  $UA/g_{S_{seco}}$  ocorreram, com o tempo de fermentação de 168 h, usando-se a vazão (3.0 L/h) e a  $U_{bs}$  (0.6519) do ponto central (Figura 51).

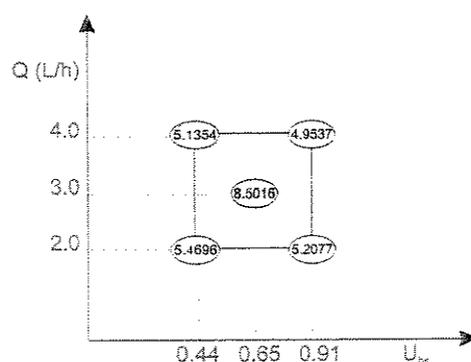


Figura 51 – Representação dos resultados para atividade enzimática (UA/g<sub>Sseco</sub>)

#### 4.5. Caracterização da fermentação nas condições otimizadas

A caracterização da fermentação nas condições otimizadas ( $Q = 3.0$  L/h,  $U_{bs} = 0.652$ ), foi feita a partir dos perfis de atividade enzimática (expressa em UA/mL, UA, UA/t e UA/g<sub>Sseco</sub>), atividade enzimática específica (UA/mg<sub>PT</sub>), concentração de proteína (PT), umidade em base seca ( $U_{bs}$ ), umidade em base úmida ( $U_{bu}$ ), atividade de água ( $a_w$ ) e pH, com o tempo de fermentação.

O Quadro 38 mostra os valores dos parâmetros característicos da fermentação no período de 168 horas de fermentação:

Quadro 38 - Valores encontrados no estudo da cinética da fermentação

tempo de fermentação	UA/mL	UA	UA/t	UA/g <sub>Sseco</sub>	UA/mg <sub>PT</sub>	PT (mg/mL)	$U_{bs}$	$U_{bu}$	$a_w$	pH
0 h	-	-	-	-	-	0,4440	0,5824	0,3680	0,965	6.12
48 h	0,8110	18,2470	0,3801	1,4957	1,6805	0,4826	1,6936	0,6288	0,992	5.85
72 h	2,8522	64,1747	0,8913	5,2605	5,5143	0,5172	0,3608	0,2652	0,930	6.26
96 h	3,4325	77,2316	0,8045	6,3308	6,2269	0,5512	2,4677	0,7116	0,985	6.18
120 h	3,6008	81,0181	0,6752	6,6412	5,7421	0,6271	2,6866	0,7287	0,985	6.83
144 h	4,1260	92,8346	0,6447	7,6098	5,6845	0,7258	2,8829	0,7425	0,977	6.89
168 h	4,3900	98,7754	0,5879	8,0968	4,5794	0,9586	3,2933	0,7671	0,984	6.99

As representações gráficas seguintes mostram as respostas de atividade enzimática (expressas em UA/mL, UA, UA/t, UA/g<sub>SSeco</sub>), atividade enzimática específica (UA/mg<sub>PT</sub>) e concentração de proteínas (PT), comparadas aos parâmetros observados ( $U_{bs}$ ,  $U_{bu}$ ,  $a_w$  e pH), com relação ao tempo de fermentação:

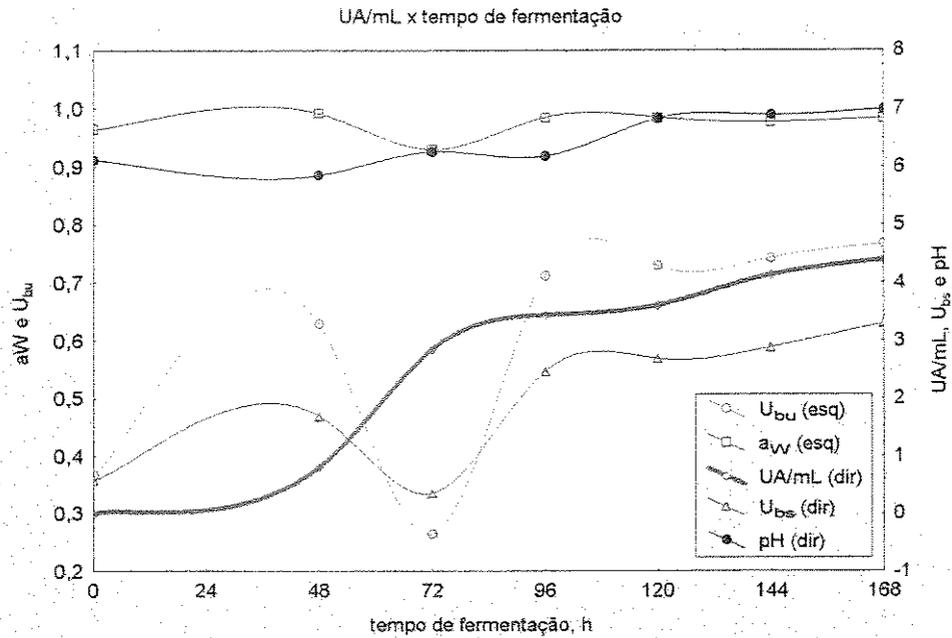


Figura 52 - Cinética comparativa da fermentação com relação a  $U_{bs}$ ,  $U_{bu}$ ,  $a_w$ , pH e UA/mL

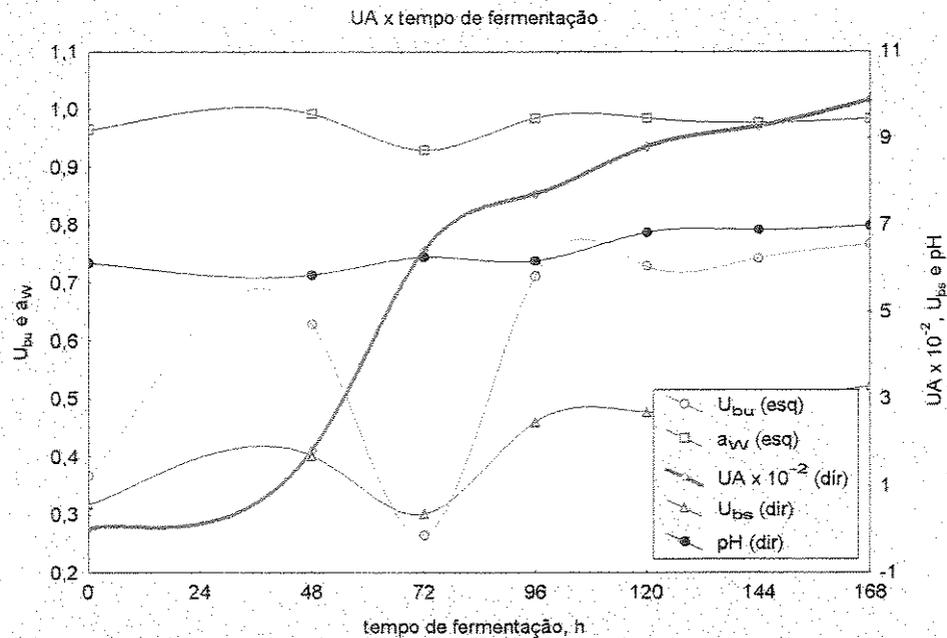


Figura 53 - Cinética comparativa da fermentação com relação a  $U_{bs}$ ,  $U_{bu}$ ,  $a_w$ , pH e UA

Percebe-se pelas representações gráficas das Figuras 52 e 53 que a fase onde há maior crescimento na produção de enzima é a mesma onde há um decréscimo na umidade e na atividade de água, provavelmente devido a uma maior geração de calor no processo fermentativo, fazendo com que mais água seja arrastada, por evaporação, pelo ar que flui pelo reator.

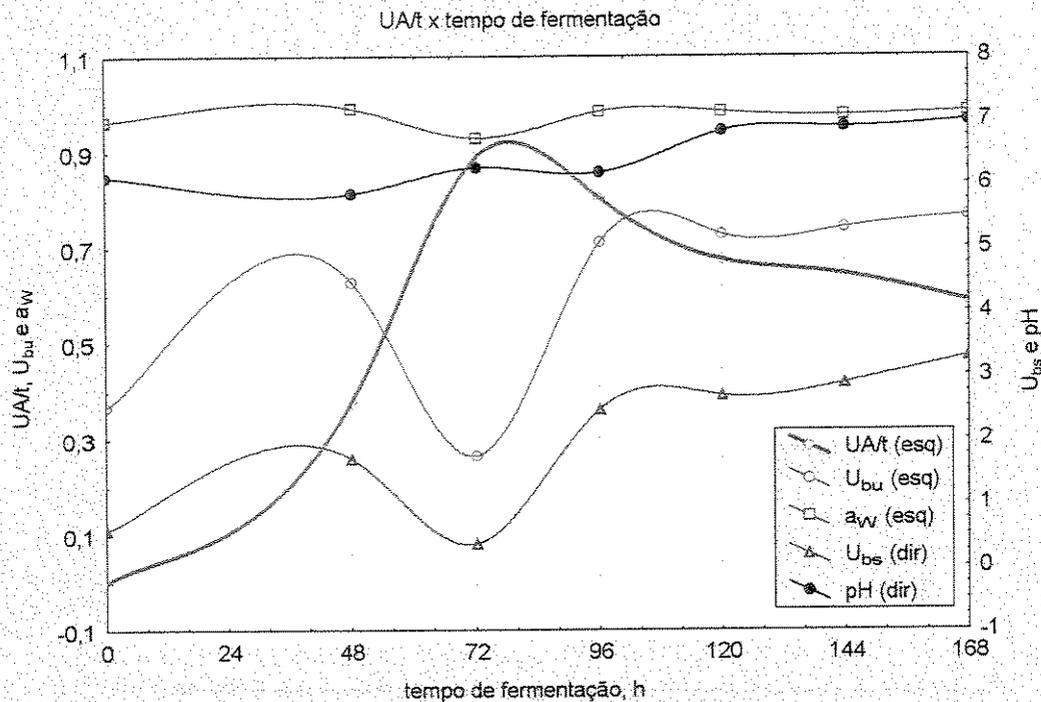


Figura 54 - Cinética comparativa da fermentação com relação a  $U_{bs}$ ,  $U_{bu}$ ,  $a_w$ , pH e UA/t

A produtividade, expressa em UA/t, apresenta seu máximo valor no período de 72 horas, que é também a fase de menores umidades e atividade de água, como mostra a Figura 54. O fato de o crescimento nas respostas de atividade enzimática ter diminuído após o tempo de fermentação de 72 horas faz com que nesse ponto se tenha obtido a maior produtividade.

A representação gráfica da Figura 55 apresenta o mesmo fenômeno anteriormente observado, onde a fase de maior crescimento na resposta coincide com a fase de menores umidades e atividade de água.

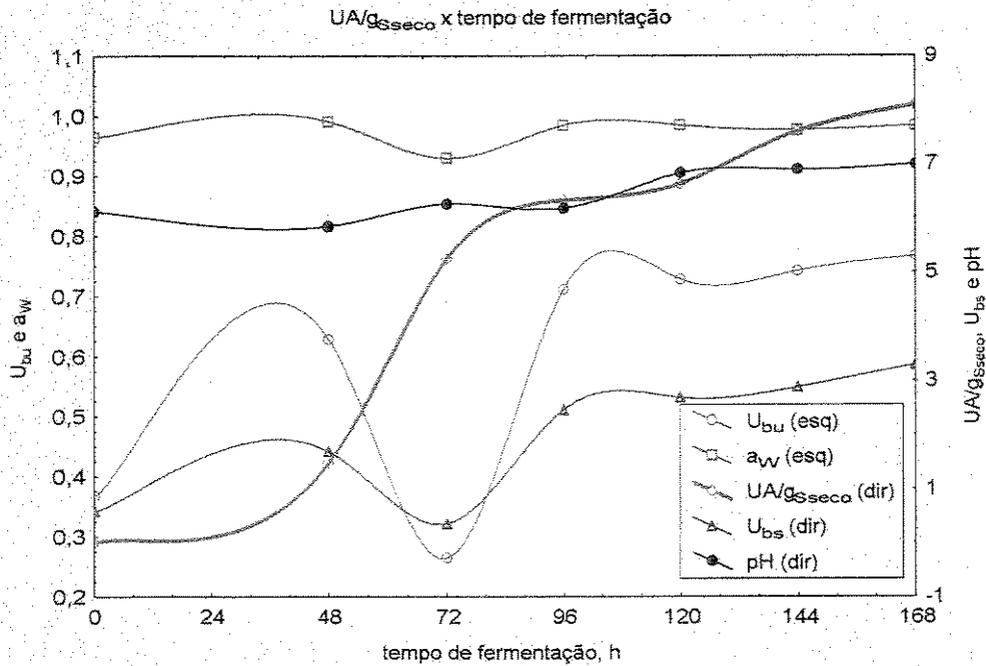


Figura 55 - Cinética comparativa da fermentação com relação a  $U_{bs}$ ,  $U_{bu}$ ,  $a_w$ , pH e  $UA/g_{Sseco}$

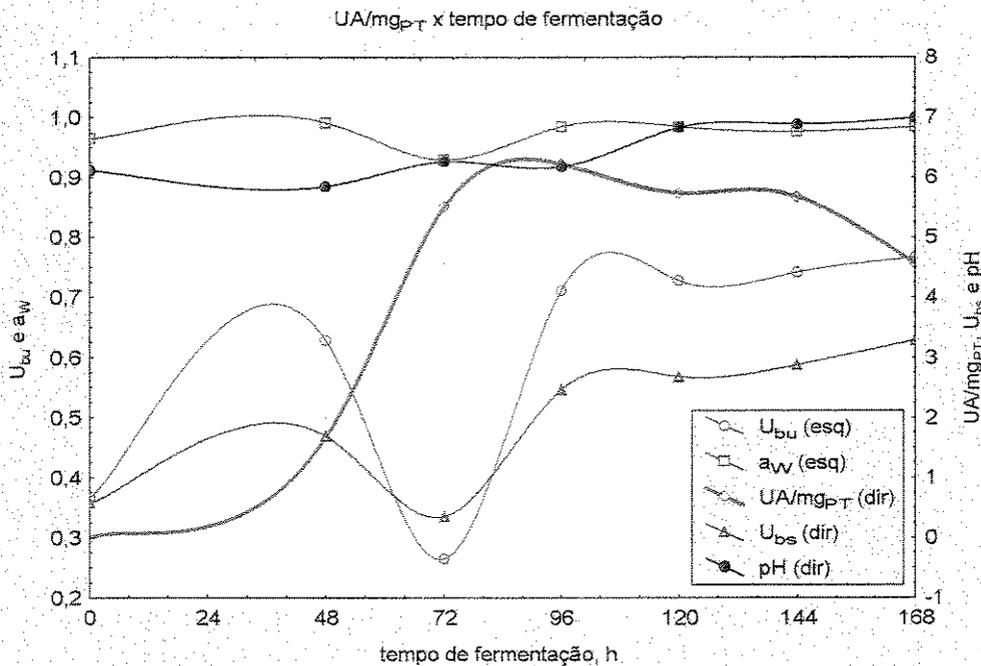


Figura 56 - Cinética comparativa da fermentação com relação a  $U_{bs}$ ,  $U_{bu}$ ,  $a_w$ , pH e  $UA/mg_{PT}$

Na representação gráfica apresentada pela Figura 56, observa-se que a fase de maior crescimento na resposta coincide com a fase de menores umidades e atividade de água, assim como acontece quando as respostas são expressas em outras formas de atividade. O decréscimo

na resposta, depois do período de 96 horas, mostra que a produção de enzima decai em relação à produção de outras fontes protéicas, sejam outros metabólitos, sejam constituintes do próprio microrganismo.

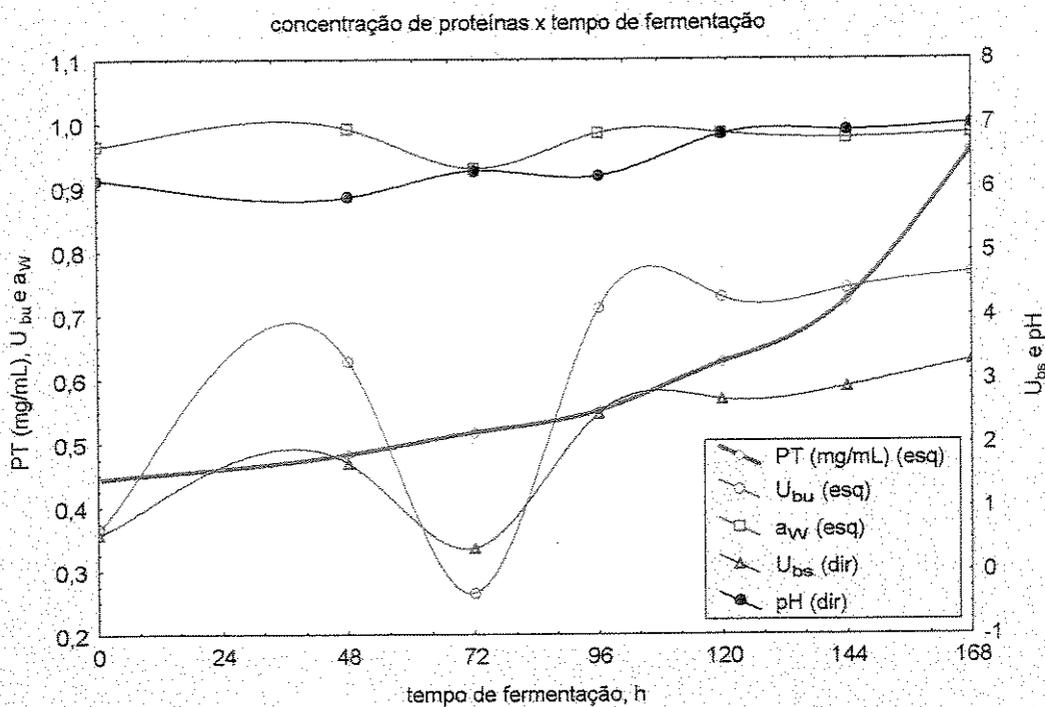


Figura 57 - Cinética comparativa da fermentação com relação a  $U_{bs}$ ,  $U_{bu}$ ,  $a_w$ , pH e PT

Através da representação gráfica mostrada na Figura 57, verifica-se que o aumento na concentração de proteínas segue um comportamento praticamente independente da variação de umidade, atividade de água e pH.

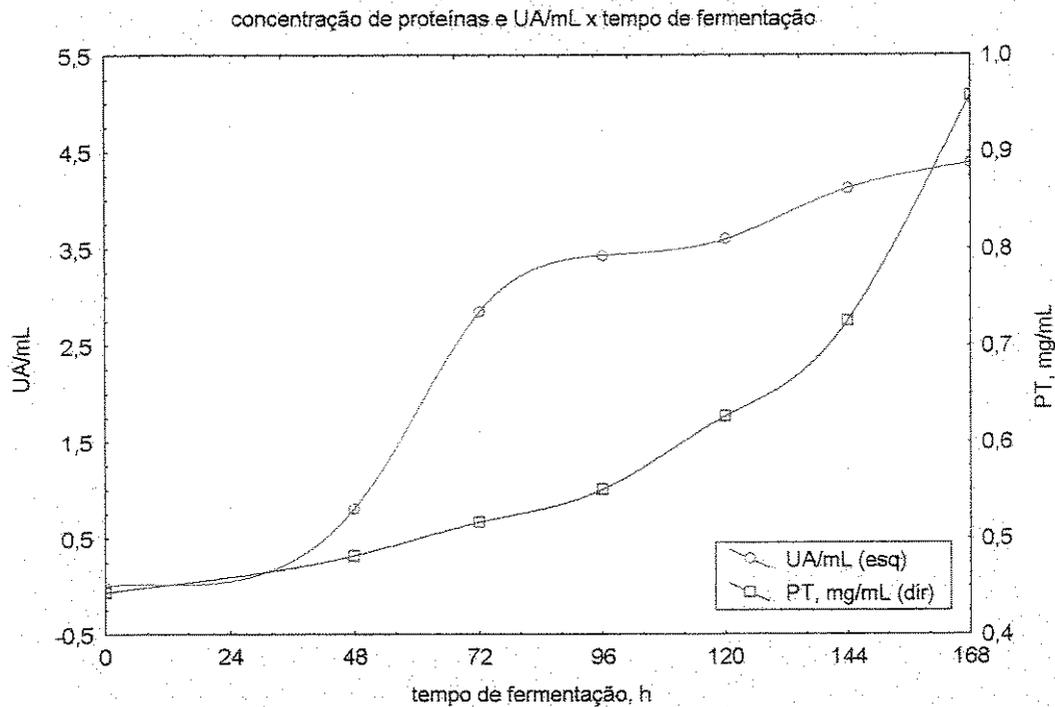


Figura 58 - Comparação entre o aumento da concentração de proteínas e a atividade enzimática do extrato expressa em UA/mL, no decorrer do tempo de fermentação.

A Fig. 58 mostra a representação gráfica que relaciona a concentração de enzima com a concentração de proteínas no extrato enzimático. É interessante constatar que o crescimento na concentração de proteínas não é acompanhado proporcionalmente pelo aumento na concentração de enzima. Entre os períodos de 48 e 96 horas, parece haver um predomínio na produção da enzima de interesse. Após esse período, embora a concentração de proteínas continue aumentando, a concentração enzimática tem seu crescimento diminuído. O contínuo aumento na concentração de proteínas parece estar relacionado à produção de outras fontes protéicas, como outros metabólitos ou crescimento celular do próprio microrganismo. Já a queda no crescimento da concentração da enzima de interesse parece estar ligada a algum tipo de inibição, ou pelo próprio produto, ou pelo aumento de concentração da presença de outros metabólitos. Pode estar havendo, também, uma limitação pelo consumo no substrato de algum nutriente que induza a produção de  $\beta$ -galactosidase em detrimento de outras formas protéicas.

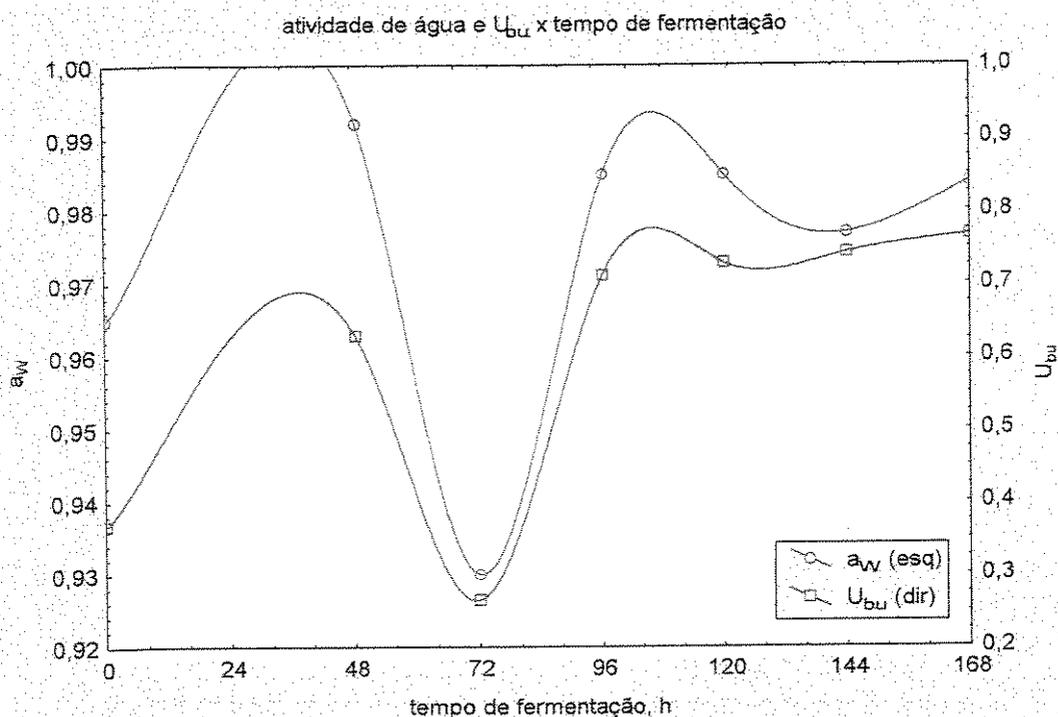


Figura 59 - Comparação entre atividade de água e a umidade em base úmida no decorrer do tempo de fermentação

Através da representação gráfica mostrada na Fig. 59, observa-se que o substrato fermentado tem maior capacidade de absorção de água após o tempo de 96 horas, onde a umidade continua aumentando embora a atividade de água diminua. Isso é devido provavelmente ao aumento na concentração microbiana e ao fato de os microrganismos terem a água como parte importante de suas constituições. Isso significa que, a partir das 96 horas, apesar de a umidade do meio continuar aumentando, as condições do mesmo, para o microrganismo, em relação à água disponível para o seu desenvolvimento, permanecem praticamente inalteradas.

#### 4.6. Considerações finais

Apesar da dificuldade em se padronizar o inóculo, as variações devidas a possíveis erros experimentais mostraram não influenciar significativamente nos resultados, já que as respostas apresentaram boa reprodutibilidade quando obtidas a partir de diferentes séries de experimentos.

Dentre os parâmetros estudados, a vazão de ar foi a que apresentou menos influência. Este resultado é provavelmente devido à ambigüidade dos fenômenos que o aumento deste parâmetro acarreta. Por um lado, ele promove um controle mais eficaz da temperatura, através da evaporação da água presente no substrato, bem como aumenta a taxa de transferência de massa. Por outro lado, a maior injeção de ar úmido provoca o aumento da atividade de água a níveis pouco interessantes a fungos filamentosos.

A umidade inicial do substrato é o parâmetro de maior influência no processo. Maiores atividades de água no início do processo provocam grande diminuição na produtividade enzimática. Como a atividade de água aumenta bastante, devido à vazão de ar úmido, principalmente após as 96 horas de fermentação, mantendo-se então praticamente constante e alta, pode-se dizer que a alta umidade prejudica principalmente o crescimento microbiano quando em sua fase lag.

O parâmetro tempo de fermentação apresenta grande influência nas respostas obtidas. A produtividade, porém, tende a baixar após as 96 horas de fermentação. O fungo *Scopulariopsis* sp. tem crescimento bastante lento se comparado com outros fungos comumente estudados, como o *Aspergillus niger*, por exemplo. A fixação do tempo de fermentação em 168 horas foi interessante pelo fato de se evitar contaminações devido à alta atividade de água apresentada pelo substrato durante a fermentação e por permitir a realização de maior quantidade de ensaios.

O planejamento fatorial dos experimentos foi bastante útil na condução do trabalho em vistas da otimização dos parâmetros. Embora tenham surgido algumas evidências de falta de ajuste ao modelo encontrado através da metodologia de superfície de resposta, o mesmo apresentou resultados como máximas respostas e ótimos parâmetros bastante razoáveis, ao comparados com as respostas obtidas experimentalmente. É importante salientar que o planejamento de experimentos é normalmente empregado para reações químicas mais previsíveis do que processos bioquímicos.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

#### 5.1. Conclusões

A máxima atividade enzimática obtida foi 4,775 UA/mL para os parâmetros 2,98 L/h de vazão de ar, 0,531 de umidade inicial do substrato em base seca e tempo de fermentação de 168 h. Esse resultado mostra melhora na produção enzimática em relação a resultados anteriormente relatados (PARK et al (1979), 1,40 UA/mL e PASTORE (1982), 1,26 UA/mL).

Dentre os parâmetros estudados, a vazão de ar é o que apresenta a menor influência nos resultados porque, ao mesmo tempo em que melhora o controle de temperatura e a transferência de massa, também aumenta em muito a atividade de água do meio, diminuindo a taxa de crescimento do microrganismo.

A umidade inicial do substrato é o parâmetro de maior influência no processo. Maiores valores de atividade de água no início do processo provocam grande diminuição na produtividade enzimática, podendo-se dizer que a alta umidade prejudica principalmente o crescimento microbiano em sua fase lag.

O microrganismo produz  $\beta$ -galactosidase até o tempo máximo estudado, de 168 horas. Após 96 horas, porém, a produtividade começa a diminuir.

A concentração de proteínas aumenta até o tempo máximo estudado, de 168 horas. A concentração de  $\beta$ -galactosidase, porém, não apresenta comportamento proporcional, demonstrando que o microrganismo tende a produzir outras formas protéicas no decorrer da fermentação.

A metodologia de superfícies de resposta como ferramenta para a obtenção de um modelo para a produção enzimática mostrou deficiências ao evidenciar falta de ajuste. As respostas previstas pelo modelo, porém, são bastante próximas das encontradas experimentalmente.

O sistema de fermentação de colunas de Raimbault mostrou eficiente controle operacional e boa reprodutibilidade nos resultados obtidos.

## **5.2. Sugestões para próximos trabalhos**

Devido à dificuldade em se padronizar o inóculo através de métodos como espectrofotometria e contagem de células, sugere-se a utilização de análise de concentração de proteínas no inóculo para esse fim.

Como a atividade de água se mostrou um fator bastante importante principalmente no começo do processo fermentativo, e como esse fator é dependente da vazão de ar úmido administrado no reator, sugere-se a variação da vazão de ar durante o processo, começando-se com menores valores e aumentando-se gradativamente.

Um acompanhamento respirométrico do processo também seria bastante interessante, a fim de se determinar as reais necessidades do microrganismo em relação à injeção de oxigênio no sistema, bem como se fazer um melhor acompanhamento cinético da fermentação, com vistas à confecção de um modelo matemático para o crescimento de biomassa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRE, R. M. **Contribuição ao Estudo de Aproveitamento de Soro de Queijo para Produção de Lactase e Etanol.** Campinas: FEA, Unicamp, 1988. Tese Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1988.
- BRADFORD, M. B. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1, p. 248-254, 1976.
- BRUNS, R. E., BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1996. 299p.
- CASTILLO, F. J., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Lactase production in continuous culture by *Trichoderma reesei* RUT-C30. **Biotechnology Letters**, v.6, n.9, p. 593-596, 1984.
- CHAMPLUVIER, B., KAMP, B., ROUXHET, P. G. Preparation and properties of  $\beta$ -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, n.10, p. 611-617, Oct. 1988.

- CHEN, K. -C., LEE, T. -C., HOUNG, J. -Y. Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, n.8, p. 659-664, Aug. 1992.
- COONEY, C. L. Growth of Microorganisms. In: REHM, H. -J., REED, G. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vol.** v.1. Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemie, 1981. p. 73-112.
- DE ARAUJO, A. A., LEPILLEUR, C., DELCOURT, S., COLAVITTI, P., ROUSSOS, S. Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 93-111.
- DURAND, A., RENAUD, J., MARATRAY, J., ALMANZA, S. The INRA-Dijon reactors: Design and applications. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 71-92.
- FLÔRES, S. H. **Produção de  $\beta$ -Galactosidase por *Erwinia aroideae* cultivada em soro de queijo**. Campinas: FEA, Unicamp, 1995. Tese Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1995.
- GOMEZ, A., CASTILLO, F. J. Production of Biomass and  $\beta$ -D-Galactosidase by *Candida pseudotropicalis* Grown in Continuous Culture on Whey. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, n.5, p. 1341-1357, 1983.

LINAWATI, H., GREENFIELD, P. F., LEE, P. L. Model for  $\beta$ -galactosidase production with a recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch culture. **Biotechnology Progress**, v.8, n.4, p. 298-306, Jul-Aug. 1992.

LVHHN – Lehigh Valley Hospital and Health Network. **Digestive Disorders**. Disponível na Internet. [http://www.lvhhn.org/healthy\\_you/body/digestive/disorders/lactose/](http://www.lvhhn.org/healthy_you/body/digestive/disorders/lactose/). 25 jan. 1999.

PARK, Y. K., De SANTI, M. S. S., PASTORE, G. M. Production and Characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Food Science**, v.44, n.1, p. 100-103, 1979.

PASTORE, G. M. **Produção, purificação, estudos das propriedades e aplicação da  $\beta$ -galactosidase de *Scopulariopsis* sp.** Campinas: FEAA, Unicamp, 1982. Tese Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, 1982.

PELIZER, L. H., ANDRADE, A. T., MORAES, I. O. O papel da atividade de água na fermentação em estado sólido – Escolha de um método de determinação em escala laboratorial. **Revista Universidade Guarulhos – Ciências Exatas e Tecnológicas**, Guarulhos, ano III, n.4, p. 33-37, Aug. 1998.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. In: INTERNATIONAL TRAINING COURSE ON SOLID STATE FERMENTATION, 1997, Curitiba. Apostila do curso. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1997.

- RAMANA MURTHY, M. V., KARANTH, N. G., RAGHAVA RAO, K. S. M. S. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v.38, p. 99-147, 1993.
- TOTH, P. P. **Gastroenterology: Lactose Intolerance**. In: University of Iowa Family Practice Handbook, 3<sup>rd</sup> Edition, Chapter 4. Disponível na Internet. <http://vh.radiology.uiowa.edu/Providers/ClinRef/FPHandbook/Chapter04/17-4.html>. 25 jan. 1999.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 5-22.
- ZVI, B., SHARON, N. **Biotechnological Applications of Proteins and Enzymes**. New York, NY: Academic Press, INC., 1977. 367p.

## PROGRAMAS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS

BRUNS, R. E., BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S. **Modreg**. Campinas, 1996.

Programa para modelagem de superfícies de resposta.

BRUNS, R. E., BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S. **Fatorial**. Campinas, 1996.

Programa para análise de planejamentos fatoriais.

COREL. **Draw 6.00**. California, 1996. Arte gráfica.

COREL. **Draw 8.00**. California, 1997. Arte gráfica.

COREL. **Photo-paint 6.00**. California, 1995. Editor de fotografias.

MICROSOFT. **Excel 97**. California, 1997. Editor de planilhas e cálculos.

MICROSOFT. **Fortran Visual Workbench v 1.00**. California, 1993. Programa de cálculo computacional.

MICROSOFT. **Word 97**. California, 1997. Editor de texto.

NETSCAPE. **Netscape Communicator 4.03**. California, 1997. Navegador para Internet.

STATSOFT. **Statistica for Windows 5.0**. Oklahoma, 1995. Gerador de gráficos.

## APÊNDICE

```
QOTIMO=0.
UOTIMO=0.
MAXIMA=0.
DELTA=0.05
WRITE(6,1)
1 FORMAT(' QOTIMO      UOTIMO      QDOT      UDOT      MAXIMA')
100 QDOT=PRIMEIRA DERIVADA DA EQUAÇÃO DO MODELO EM RELAÇÃO A Q
    UDOT=PRIMEIRA DERIVADA DA EQUAÇÃO DO MODELO EM RELAÇÃO A U
    QOTIMO=QOTIMO+QDOT*DELTA
    UOTIMO=UOTIMO+UDOT*DELTA
    MAXIMA=EQUAÇÃO DO MODELO ENCONTRADO
    IF(QDOT.GT.0.000001)GO TO 100
    IF(QDOT.LT.-0.000001)GO TO 100
    IF(UDOT.GT.0.000001)GO TO 100
    IF(UDOT.LT.-0.000001)GO TO 100
    WRITE(6,2)QOTIMO,UOTIMO,QDOT,UDOT,MAXIMA
2 FORMAT(5X,5F8.4)
STOP
END
```

Figura 1 – Programa em Fortran para o cálculo dos parâmetros ótimos e dos valores máximos de resposta

```

Q=0.
U=0.
UAmL=0.
DELTA=0.05
WRITE (6,1)
1 FORMAT (' Q      U      QDOT      UDOT      UAmL' )
100 QDOT=-Q+0.0198*U-0.0057
    UDOT=-U+0.0250*Q-0.5108
    Q=Q+QDOT*DELTA
    U=U+UDOT*DELTA
    UAmL=4.6096-0.0092*Q-0.6468*U-0.8022*Q**2-0.6331*U**2+0.0317*Q*U
    IF (QDOT.GT.0.000001) GO TO 100
    IF (QDOT.LT.-0.000001) GO TO 100
    IF (UDOT.GT.0.000001) GO TO 100
    IF (UDOT.LT.-0.000001) GO TO 100
    WRITE (6,2) Q, U, QDOT, UDOT, UAmL
2 FORMAT (5X,5F8.4)
STOP
END

```

Figura 2 – Programa em Fortran para o cálculo da máxima resposta de UA/mL e dos valores ótimos dos parâmetros experimentados

```

Q=0.
U=0.
UA=0.
DELTA=0.05
WRITE (6,1)
1 FORMAT (' Q      U      QDOT      UDOT      UA' )
100 QDOT=-0.1673-36.4532*Q+0.4998*U
    UDOT=-6.4499-31.3572*U+0.4998*Q
    Q=Q+QDOT*DELTA
    U=U+UDOT*DELTA
    UA=103.7168-0.1673*Q-6.4499*U-18.2266*Q**2-15.6786*U**2+0.4998*Q*U
    IF (QDOT.GT.0.000001) GO TO 100
    IF (QDOT.LT.-0.000001) GO TO 100
    IF (UDOT.GT.0.000001) GO TO 100
    IF (UDOT.LT.-0.000001) GO TO 100
    WRITE (6,2) Q, U, QDOT, UDOT, UA
2 FORMAT (5X,5F8.4)
STOP
END

```

Figura 3 – Programa em Fortran para o cálculo da máxima resposta de UA e dos valores ótimos dos parâmetros experimentados

```

Q=0.
U=0.
UAt=0.
DELTA=0.05
WRITE (6,1)
1 FORMAT (' Q U QDOT UDOT UAt')
100 QDOT=-0.001-0.217*Q+0.003*U
UDOT=-0.0384-0.1866*U+0.003*Q
Q=Q+QDOT*DELTA
U=U+UDOT*DELTA
UAt=0.6174-0.001*Q-0.0384*U-0.1085*Q**2-0.0933*U**2+0.003*Q*U
IF(QDOT.GT.0.000001)GO TO 100
IF(QDOT.LT.-0.000001)GO TO 100
IF(UDOT.GT.0.000001)GO TO 100
IF(UDOT.LT.-0.000001)GO TO 100
WRITE (6,2) Q, U, QDOT, UDOT, UAt
2 FORMAT (5X, 5F8.4)
STOP
END

```

Figura 4 – Programa em Fortran para o cálculo da máxima resposta de UA/t e dos valores ótimos dos parâmetros experimentados

```

Q=0.
U=0.
UAg=0.
DELTA=0.05
WRITE (6,1)
1 FORMAT (' Q U QDOT UDOT UAg')
100 QDOT=-0.0122-3.0482*Q+0.02*U
UDOT=0.3128-2.4222*U+0.02*Q
Q=Q+QDOT*DELTA
U=U+UDOT*DELTA
UAg=8.5019-0.0122*Q+0.3128*U-1.5241*Q**2-1.2111*U**2+0.02*Q*U
IF(QDOT.GT.0.000001)GO TO 100
IF(QDOT.LT.-0.000001)GO TO 100
IF(UDOT.GT.0.000001)GO TO 100
IF(UDOT.LT.-0.000001)GO TO 100
WRITE (6,2) Q, U, QDOT, UDOT, UAg
2 FORMAT (5X, 5F8.4)
STOP
END

```

Figura 5 – Programa em Fortran para o cálculo da máxima resposta de UA/g<sub>Sseco</sub> e dos valores ótimos dos parâmetros experimentados