

CELSON RICARDO DENSER PAMBOUKIAN

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO INÓCULO
NA MORFOLOGIA DO MICRORGANISMO E NA SÍNTESE
DE GLICOAMILASE POR *Aspergillus awamori*

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Engenharia.

São Paulo
1997

CELSO RICARDO DENSER PAMBOUKIAN

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DO INÓCULO
NA MORFOLOGIA DO MICRORGANISMO E NA SÍNTESE DE
GLICOAMILASE POR *Aspergillus awamori*

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Engenharia.

Área de concentração:
Engenharia Química

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Cândida Reginato Facciotti

São Paulo
1997

FICHA CATALOGRÁFICA

Pamboukian, Celso Ricardo Denser

Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori*. São Paulo, 1997.

189p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Síntese de glicoamilase: *Aspergillus awamori*.
2. Síntese de glicoamilase: Influência das condições de preparo do inóculo. 3. Morfologia de *Aspergillus awamori*: Influência das condições de preparo do inóculo. I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química. II. t.

Aos meus pais, Iris e Vicente, por todo o apoio e incentivo que recebi, não apenas durante o Mestrado, mas durante toda a vida.

Agradecimentos

À Professora Maria Cândida Reginato Facciotti, pela orientação, amizade e dedicação, essenciais para a realização de todas as etapas do Mestrado.

Ao Professor Willibaldo Schmidell Netto, pelas excelentes sugestões apresentadas ao longo do trabalho.

Ao amigo José Eduardo Olivo, pela amizade e companheirismo, pelo incentivo e pelas importantes sugestões apresentadas durante todo o Mestrado.

Às amigas Nancy Miyuki Minami e Lorena Tavares pelo auxílio na parte experimental, pelo apoio recebido durante todo o Mestrado e, principalmente, pela amizade que, sem dúvida, tornou o trabalho muito mais agradável.

Aos amigos Alberto Colli Badino Jr, Patrícia Ribeiro Vilaça, Ana Karla de Souza Abud e Renato Hirayama, pelo valioso auxílio na parte experimental do trabalho.

Aos Professores Aldo Tonso e Beatriz Vahan Kilikian e aos amigos Jesus, Gorete, Danidza e Adriana pelo agradável convívio ao longo destes anos.

Aos funcionários Euclides de Lima, Orlinda e Andrea, pelo importante apoio técnico durante o preparo dos ensaios.

Aos Professores Masazi Maeda e José Glauco Grandi, que tornaram possível a utilização do equipamento fotográfico durante a realização dos ensaios.

Às funcionárias Elisete, Denise e Graça, da secretaria; à Beth e à Marília, da biblioteca por todo o auxílio durante o Mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado.

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de símbolos	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	06
2.1 A glicoamilase	06
2.2 Microrganismos filamentosos: características e morfologia	11
2.2.1 <i>Aspergillus</i>	11
2.2.2 A morfologia de microrganismos filamentosos	12
2.2.3 Influência da morfologia na produção de metabólitos.	16
2.2.4 A utilização de análise de imagens na caracterização morfológica de microrganismos filamentosos.....	19
2.2.5 Agregação de esporos e formação de “pellets”	23
2.2.6 Influência da morfologia nas características reológicas do caldo de fermentação	26
2.3 O inóculo em processos fermentativos.....	27
2.3.1 O processo de preparo do inóculo	27
2.3.2 A influência do inóculo em processos fermentativos	29
2.3.3 A padronização do inóculo	36
3. Materiais e Métodos	38
3.1 Microrganismo	38
3.1.1 Conservação do microrganismo em meio Czapek	38
a. Preparo do meio Czapek	38
b. Descrição do método de conservação	39
3.2 Meio de cultura	40
3.2.1 Preparo do xarope de farinha de mandioca	40

3.2.2	Preparo do meio de cultura para cultivo em incubador rotativo	41
3.2.3	Preparo do meio de cultura para cultivo em fermentador	42
3.3	Preparo do inóculo e condições dos ensaios realizados	43
3.3.1	Preparo da suspensão de esporos	43
3.3.2	Determinação da concentração de esporos na suspensão	45
3.3.3	Procedimento para o preparo do inóculo e condições dos ensaios realizados	47
a.	Ensaio realizado em incubador rotativo (Grupo I)	48
b.	Ensaio realizado em fermentador, com inóculo pré-cultivado em incubador rotativo (Grupos F20 e F40)	51
c.	Ensaio realizado em fermentador, variando-se a forma de preparo do inóculo (Grupo G)	53
3.4	Preparo dos fermentadores	62
3.4.1	Esterilização dos fermentadores	63
3.4.2	Início do ensaio	64
3.5	Metodologia analítica	65
3.5.1	Determinação da concentração celular (X)	67
3.5.2	Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)	68
3.5.3	Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)	69
3.5.4	Determinação da atividade enzimática (A)	72
3.5.5	Caracterização morfológica	75
3.5.6	Caracterização reológica do caldo de fermentação	75
3.5.7	Método da glicose-oxidase para a dosagem de glicose.....	77

3.6 Tratamento dos resultados	78
3.6.1 Cálculo das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de glicoamilase	78
3.6.2 Cálculo dos fatores de conversão e produtividades ..	80
3.6.3 Cálculo dos parâmetros reológicos	81
4. Resultados e Discussão	82
4.1 Influência da concentração de esporos do inóculo no processo de produção de glicoamilase	82
4.1.1 Resultados dos ensaios realizados em incubador rotativo (Grupo I)	82
4.1.2 Ensaio realizado em fermentador, com $S_0 = 20$ g/L (Grupo F20)	94
4.1.3 Ensaio realizado em fermentador, com $S_0 = 40$ g/L (Grupo F40)	108
4.1.4 Comparação entre os inóculos dos ensaios em fermentador	129
4.2 Influência da forma de preparo do inóculo no processo de produção de glicoamilase	134
4.2.1 Influência das condições de germinação na agregação de esporos e na formação de “pellets”, em incubador rotativo	135
4.2.2 Ensaio realizado em fermentador, com $S_0 = 20$ g/L (Grupo G).....	138
4.2.2.1 Ensaio G-1, G-2 e G-3	138
4.2.2.2 Ensaio G-4, G-5 e G-6	150
4.2.2.3 Ensaio G-7 e G-8	162
5. Conclusões	175
6. Referências Bibliográficas	179
Apêndice	

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Perímetro e perímetro convexo de “pellet”	22
Figura 3.1	Esquema de preparo da suspensão de esporos	45
Figura 3.2	Esquema da câmara de Neubauer 1/400 mm ² , com destaque para o reticulado central	46
Figura 3.3	Esquema dos ensaios realizados em incubador rotativo (Grupo I)	50
Figura 3.4	Esquema dos ensaios realizados em fermentador (Grupos F20 e F40)	53
Figura 3.5	Esquema do ensaio G-1	60
Figura 3.6	Esquema dos ensaios G-2 e G-3	61
Figura 3.7	Esquema dos ensaios G-4, G-5, G-6, G-7 e G-8	61
Figura 3.8	Esquema da metodologia analítica utilizada no tratamento das amostras	66
Figura 4.1	Diâmetro de “pellets” durante o ensaio I-1	84
Figura 4.2	Diâmetro de “pellets” durante o ensaio I-2	84
Figura 4.3	Diâmetro de “pellets” durante o ensaio I-3	84
Figura 4.4	“Pellets” obtidos em 20 horas de cultivo no ensaio I-1	85
Figura 4.5	“Pellets” obtidos em 20 horas de cultivo no ensaio I-2	85
Figura 4.6	“Pellets” e hifas dispersas obtidas em 20 horas de cultivo no ensaio I-3	85
Figura 4.7	Consumo de substrato no ensaio I-1	87
Figura 4.8	Consumo de substrato no ensaio I-2	87
Figura 4.9	Consumo de substrato no ensaio I-3	87
Figura 4.10	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em incubador rotativo no ensaio I-1	88

Figura 4.11	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em incubador rotativo no ensaio I-2	88
Figura 4.12	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em incubador rotativo no ensaio I-3	88
Figura 4.13	Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios I-1, I-2 e I-3	90
Figura 4.14	Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios I-1, I-2 e I-3	91
Figura 4.15	Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios I-1, I-2 e I-3	93
Figura 4.16	Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios I-1, I-2 e I-3	93
Figura 4.17	Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios I-1, I-2 e I-3	93
Figura 4.18	“Pellet” presente no inóculo do ensaio F20-1	98
Figura 4.19	“Pellet” presente no inóculo do ensaio F20-2	98
Figura 4.20	“Pellets” presentes no inóculo do ensaio F20-3	98
Figura 4.21	Forma filamentosa no ensaio F20-1, com 6 horas de cultivo em fermentador	98
Figura 4.22	Forma filamentosa no ensaio F20-2, com 6 horas de cultivo em fermentador	98
Figura 4.23	“Pellet” obtido no ensaio F20-3, com 6 horas de cultivo em fermentador	98
Figura 4.24	Consumo de substrato no ensaio F20-1	99
Figura 4.25	Consumo de substrato no ensaio F20-2	99
Figura 4.26	Consumo de substrato no ensaio F20-3	99
Figura 4.27	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F20-1	101
Figura 4.28	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F20-2	101

Figura 4.29	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F20-3	101
Figura 4.30	Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	103
Figura 4.31	Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	104
Figura 4.32	Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	105
Figura 4.33	Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	106
Figura 4.34	Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	106
Figura 4.35	“Pellet” presente no inóculo do ensaio F40-4	111
Figura 4.36	“Pellet” presente no inóculo do ensaio F40-5	111
Figura 4.37	Aglomerados de esporos presentes no inóculo do ensaio F40-6	112
Figura 4.38	Forma filamentosa no ensaio F40-4, após 6 horas de cultivo em fermentador	112
Figura 4.39	Forma filamentosa no ensaio F40-5, após 6 horas de cultivo em fermentador	112
Figura 4.40	Forma filamentosa e aglomerados de esporos presentes no ensaio F40-6, após 6 horas de cultivo em fermentador	112
Figura 4.41	“Pellet” no ensaio F40-6, após 14 horas de cultivo em fermentador	112
Figura 4.42	Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios F40-4, F40-5 e F40-6	113
Figura 4.43	Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios F40-4, F40-5 e F40-6	113
Figura 4.44	Consumo de substrato no ensaio F40-1	115

Figura 4.45	Consumo de substrato no ensaio F40-2	115
Figura 4.46	Consumo de substrato no ensaio F40-3	115
Figura 4.47	Consumo de substrato no ensaio F40-4	116
Figura 4.48	Consumo de substrato no ensaio F40-5	116
Figura 4.49	Consumo de substrato no ensaio F40-6	116
Figura 4.50	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-1	117
Figura 4.51	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-2	117
Figura 4.52	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-3	118
Figura 4.53	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-4	118
Figura 4.54	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-5	118
Figura 4.55	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-6	119
Figura 4.56	Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios do grupo F40	121
Figura 4.57	Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios do grupo F40	123
Figura 4.58	Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios do grupo F40	125
Figura 4.59	Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios do grupo F40	127
Figura 4.60	Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios do grupo F40	127
Figura 4.61	“Pellet” obtido com uma concentração de esporos de $9,5 \times 10^3$ esp/mL	133
Figura 4.62	“Pellets” obtidos com uma concentração de esporos de $9,5 \times 10^4$ esp/mL	133

Figura 4.63	“Pellets” obtidos com uma concentração de esporos de $9,5 \times 10^5$ esp/mL	133
Figura 4.64	Atividade enzimática em função do diâmetro de “pellets” em 24 horas de cultivo em incubador rotativo	134
Figura 4.65	Esporos com 2 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 2,5	137
Figura 4.66	Esporos com 2 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 5,5	137
Figura 4.67	Esporos com 7 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 2,5	137
Figura 4.68	Esporos com 7 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 5,5	137
Figura 4.69	Micélio com 24 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 2,5	137
Figura 4.70	“Pellets” com 24 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 5,5	137
Figura 4.71	Crescimento na forma filamentosa no ensaio G-1, após 18 horas de cultivo em fermentador	141
Figura 4.72	Crescimento na forma filamentosa no ensaio G-2, após 18 horas de cultivo em fermentador	141
Figura 4.73	Crescimento na forma filamentosa no ensaio G-3, após 18 horas de cultivo em fermentador	141
Figura 4.74	Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios G-1, G-2 e G-3	141
Figura 4.75	Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios G-1, G-2 e G-3	142
Figura 4.76	Consumo de substrato no ensaio G-1	142
Figura 4.77	Consumo de substrato no ensaio G-2	143
Figura 4.78	Consumo de substrato no ensaio G-3	143

Figura 4.79	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-1	144
Figura 4.80	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-2	144
Figura 4.81	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-3	144
Figura 4.82	Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios G-1, G-2 e G-3	146
Figura 4.83	Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios G-1, G-2 e G-3	146
Figura 4.84	Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3.....	149
Figura 4.85	Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3	149
Figura 4.86	Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3	149
Figura 4.87	Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios G-4, G-5 e G-6	153
Figura 4.88	Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios G-4, G-5 e G-6	153
Figura 4.89	Consumo de substrato no ensaio G-4	154
Figura 4.90	Consumo de substrato no ensaio G-5	154
Figura 4.91	Consumo de substrato no ensaio G-6	154
Figura 4.92	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-4	155
Figura 4.93	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-5	156
Figura 4.94	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-6	156
Figura 4.95	Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios G-4, G-5 e G-6	157

Figura 4.96	Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios G-4, G-5 e G-6	158
Figura 4.97	Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6.....	161
Figura 4.98	Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6	161
Figura 4.99	Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6	161
Figura 4.100	Forma filamentosa obtida no inóculo do ensaio G-7..	165
Figura 4.101	“Pellet” obtido no inóculo do ensaio G-8	165
Figura 4.102	Forma filamentosa no ensaio G-7, após 10 horas de cultivo em fermentador	165
Figura 4.103	Forma filamentosa no ensaio G-8, após 10 horas de cultivo em fermentador	165
Figura 4.104	Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios G-7, G-8	166
Figura 4.105	Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios G-7, G-8	166
Figura 4.106	Consumo de substrato no ensaio G-7	167
Figura 4.107	Consumo de substrato no ensaio G-8	167
Figura 4.108	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-7	168
Figura 4.109	Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-8	168
Figura 4.110	Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios G-7, G-8	169
Figura 4.111	Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios G-7, G-8	170
Figura 4.112	Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios G-7, G-8	172

Figura 4.113	Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios G-7, G-8	173
Figura 4.114	Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios G-7, G-8	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Resumo dos objetivos dos grupos de ensaios realizados	48
Tabela 3.2	Densidade de inóculo (C_{esp}) nos ensaios do grupo I	50
Tabela 3.3	Densidade de inóculo (C_{esp}) nos ensaios dos grupos F20 e F40	52
Tabela 3.4	Concentração de esporos no inóculo nos ensaios do grupo G	60
Tabela 4.1	Concentração de esporos utilizados nos ensaios I-1, I-2 e I-3	83
Tabela 4.2	Resultados dos ensaios realizados em incubador rotativo	89
Tabela 4.3	Concentrações de esporos utilizadas no preparo do inóculo dos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	95
Tabela 4.4	Morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	96
Tabela 4.5	Resultados dos ensaios F20-1, F20-2, F20-3, realizados em fermentador	102
Tabela 4.6	Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3	105
Tabela 4.7	Concentrações de esporos utilizadas no preparo do inóculo dos ensaios do grupo F40	108
Tabela 4.8	Morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador nos ensaios do grupo F40	109
Tabela 4.9	Resultados dos ensaios do grupo F40, realizados em fermentador	119
Tabela 4.10	Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios do grupo F40	124

Tabela 4.11	Características dos inóculos utilizados nos ensaios em fermentador	129
Tabela 4.12	Forma de preparo do inóculo, morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador nos ensaios G-1, G-2 e G-3	139
Tabela 4.13	Resultados dos ensaios G-1, G-2 e G-3, realizados em fermentador	145
Tabela 4.14	Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios G-1, G-2 e G-3	147
Tabela 4.15	Forma de preparo do inóculo, morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador nos ensaios G-4, G-5 e G-6	151
Tabela 4.16	Resultados dos ensaios G-4, G-5 e G-6, realizados em fermentador	157
Tabela 4.17	Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios G-4, G-5 e G-6	160
Tabela 4.18	Forma de preparo do inóculo, morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador nos ensaios G-7 e G-8	164
Tabela 4.19	Resultados dos ensaios G-7 e G-8, realizados em fermentador	169
Tabela 4.20	Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios G-7 e G-8	171
Tabela A1	Resultados experimentais do ensaio I-1	A1
Tabela A2	Idem à tabela A1 para o ensaio I-2	A1
Tabela A3	Idem à tabela A1 para o ensaio I-3	A2
Tabela A4	Idem à tabela A1 para o ensaio F20-1	A2
Tabela A5	Idem à tabela A1 para o ensaio F20-2	A2
Tabela A6	Idem à tabela A1 para o ensaio F20-3	A3
Tabela A7	Idem à tabela A1 para o ensaio F40-1	A3

Lista de tabelas

Tabela A8	Idem à tabela A1 para o ensaio F40-2	A4
Tabela A9	Idem à tabela A1 para o ensaio F40-3	A4
Tabela A10	Idem à tabela A1 para o ensaio F40-4	A5
Tabela A11	Idem à tabela A1 para o ensaio F40-5	A5
Tabela A12	Idem à tabela A1 para o ensaio F40-6	A5
Tabela A13	Idem à tabela A1 para o ensaio G-1	A6
Tabela A14	Idem à tabela A1 para o ensaio G-2	A6
Tabela A15	Idem à tabela A1 para o ensaio G-3	A6
Tabela A16	Idem à tabela A1 para o ensaio G-4	A7
Tabela A17	Idem à tabela A1 para o ensaio G-5	A7
Tabela A18	Idem à tabela A1 para o ensaio G-6	A7
Tabela A19	Idem à tabela A1 para o ensaio G-7	A8
Tabela A20	Idem à tabela A1 para o ensaio G-8	A8
Tabela A21	Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio I-1	A9
Tabela A22	Idem à tabela A21 para o ensaio I-2	A10
Tabela A23	Idem à tabela A21 para o ensaio I-3	A11
Tabela A24	Idem à tabela A21 para o ensaio F20-1	A12
Tabela A25	Idem à tabela A21 para o ensaio F20-2	A13
Tabela A26	Idem à tabela A21 para o ensaio F20-3	A14
Tabela A27	Idem à tabela A21 para o ensaio F40-1	A15
Tabela A28	Idem à tabela A21 para o ensaio F40-2	A16
Tabela A29	Idem à tabela A21 para o ensaio F40-3	A17
Tabela A30	Idem à tabela A21 para o ensaio F40-4	A18
Tabela A31	Idem à tabela A21 para o ensaio F40-5	A19
Tabela A32	Idem à tabela A21 para o ensaio F40-6	A20
Tabela A33	Idem à tabela A21 para o ensaio G-1	A21
Tabela A34	Idem à tabela A21 para o ensaio G-2	A22
Tabela A35	Idem à tabela A21 para o ensaio G-3	A23
Tabela A36	Idem à tabela A21 para o ensaio G-4	A24

Lista de tabelas

Tabela A37	Idem à tabela A21 para o ensaio G-5	A25
Tabela A38	Idem à tabela A21 para o ensaio G-6	A26
Tabela A39	Idem à tabela A21 para o ensaio G-7	A27
Tabela A40	Idem à tabela A21 para o ensaio G-8	A28
Tabela A41	Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio F40-4	A29
Tabela A42	Idem à tabela A41 para o ensaio F40-5	A29
Tabela A43	Idem à tabela A41 para o ensaio F40-6	A29
Tabela A44	Idem à tabela A41 para o ensaio G-1	A30
Tabela A45	Idem à tabela A41 para o ensaio G-2	A30
Tabela A46	Idem à tabela A41 para o ensaio G-3	A30
Tabela A47	Idem à tabela A41 para o ensaio G-4	A31
Tabela A48	Idem à tabela A41 para o ensaio G-5	A31
Tabela A49	Idem à tabela A41 para o ensaio G-6	A31
Tabela A50	Idem à tabela A41 para o ensaio G-7	A32
Tabela A51	Idem à tabela A41 para o ensaio G-8	A32

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Atividade enzimática (U/L);
A_m	Atividade enzimática máxima (U/L);
A_o	Atividade enzimática no início do cultivo (U/L);
AR	Concentração de açúcares redutores (g/L);
ARM	Concentração de açúcares redutores na amostra após a hidrólise (g/L);
ART	Concentração de açúcares redutores totais, expressos como glicose (g/L);
C_{esp}	Concentração de esporos nos frascos cultivados em incubador rotativo (esp/mL);
C_{ferm}	Concentração de esporos no fermentador (esp/mL);
C_{susp}	Concentração da suspensão de esporos (esp/mL);
d	Densidade da amostra (1000 g/L);
D	Diâmetro de “pellets” (mm);
D_a	Fator de diluição da amostra (adimensional);
esp	Esporos;
G	Concentração de glicose determinada pelo método da glicose oxidase (g/L);
K	Índice de consistência do fluido ($cP \cdot s^{n-1}$);
M_a	Massa da amostra (g);
\bar{N}	Número médio de esporos contados na câmara de Neubauer;
M_p	Massa do papel de filtro (g);
M_{pc}	Massa do papel de filtro contendo a massa seca de células (g);
n	Índice de comportamento do escoamento (adimensional);
P_a	Produtividade em glicoamilase (U/(L.h));
P_x	Produtividade em células (g/(L.h));
S	Concentração de substrato (açúcares redutores totais), (g/L);
S_o	Concentração inicial de substrato (g/L);
S_f	Concentração de substrato no instante t_f (g/L);
S_m	Concentração de substrato no instante t_m (g/L);
t_f	Instante de término da fonte de carbono (h);
t_m	Instante no qual foi obtida a atividade enzimática máxima (h);

Lista de Símbolos

t_0	Instante de início da fase exponencial de crescimento (h);
U	Unidade de atividade enzimática;
U_p	Teor de umidade do papel de filtro (%);
V_{campo}	Volume de cada campo na câmara de Neubauer (4×10^{-6} mL);
V_{ferm}	Volume útil do fermentador (10 L);
V_m	Volume de meio de cultura nos frascos para cultivo em incubador rotativo (200 mL);
V_{susp}	Volume da suspensão de esporos (mL);
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto;
X	Concentração celular (g/L);
X_e	Concentração celular no início da fase exponencial de crescimento (g/L);
X_f	Concentração celular no instante de término da fonte de carbono (g/L);
X_0	Concentração celular no início do cultivo (g/L);
$Y_{A/s}$	Fator de conversão substrato a glicoamilase (U/g);
$Y_{x/s}$	Fator de conversão substrato a células (g/g).

Letras gregas:

γ	Gradiente de velocidade (s^{-1});
η_a	Viscosidade aparente (cP);
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});
μ_p	Velocidade específica de produção de glicoamilase (U/(g.h));
μ_s	Velocidade específica de consumo de substrato (g/(g.h));
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});
τ	Tensão de cisalhamento (dina/cm ²).

Subscritos:

0	Referente ao início do cultivo;
cresc	Etapa de crescimento;
F	Referente ao final do cultivo (término da fonte de carbono);
germ	Etapa de germinação;
I	Referente ao inóculo.

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a influência da forma de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori*, em cultivo submerso.

Foram realizados ensaios variando-se a concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo para o fermentador (pré-cultivo de células em incubador rotativo a 200 rpm e 35 °C, por 24 horas) no intervalo entre $9,5 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^7$ esporos/mL. Os inóculos preparados com concentração de esporos entre $9,5 \times 10^3$ e $9,5 \times 10^5$ esporos/mL apresentaram-se na forma de uma suspensão de “pellets” e conduziram a um crescimento na forma filamentosa, em fermentador. A produção de glicoamilase, nos ensaios com concentração inicial de substrato de 40 g/L, realizados em fermentador, não foi influenciada pela concentração de esporos nessa faixa, mantendo-se entre 2100 e 2200 U/L. O aumento da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo para $1,8 \times 10^7$ esporos/mL conduziu à formação de um inóculo na forma filamentosa contendo muitos aglomerados de esporos não germinados, que levaram a um crescimento, em fermentador, na forma de “pellets”, reduzindo a produção de glicoamilase para cerca de 1600 U/L e mostrando que o crescimento na forma de “pellets” não é indicado para a produção de glicoamilase.

Foram estudadas, também, outras formas de preparo do inóculo, variando-se as condições de germinação dos esporos (pH e tempo de pré-cultivo do inóculo). A forma de preparo do inóculo que conduziu a uma maior produção de glicoamilase, em fermentador, foi o cultivo de esporos em incubador rotativo, a pH 2,5 durante 7 horas, o que evitou a aglomeração de esporos durante a etapa de germinação e a formação de “pellets” em fermentador, conduzindo a um crescimento na forma filamentosa e a uma alta produção de glicoamilase.

ABSTRACT

The influence of the inoculum preparation on *Aspergillus awamori* morphology and glucoamylase synthesis in submerged cultures has been investigated.

A series of runs were performed, varying the spore concentration of the inoculum (inoculum size) in the range from 9.5×10^3 to 1.8×10^7 spores/mL. The inoculum was cultivated in shaker, at 35 °C and 200 rpm, for 24 hours.

The inoculum prepared with a spore concentration in the range from 9.5×10^3 to 9.5×10^5 spores/mL was composed by a pellet suspension. This pellet suspension led to a filamentous growth in fermenter, but did not influence the glucoamylase production, which reached values from 2,100 to 2,200 U/L. The use of a higher spore concentration (1.8×10^7 spores/mL) produced an inoculum composed by dispersed hyphae and many spores agglomerates, which led to pellet formation in the fermenter and reduced glucoamylase production to 1,600 U/L. Thus, pellet formation is not recommended in the process of glucoamylase synthesis.

Some forms of inoculum preparation have been studied, varying spore germination conditions (pH and time of inoculum culture). The form of inoculum preparation that led to the highest glucoamylase activity in fermenter was the spore germination in shaker at pH 2.5 for 7 hours, which avoided pellet formation in the reactor and conducted to a high glucoamylase production.

1. Introdução

Os processos fermentativos vêm sendo utilizados desde a Antigüidade, quando, inconscientemente, o homem empregava microrganismos na fabricação de alimentos, tais como pão, vinho, cerveja e queijo.

A utilização de processos fermentativos de forma racional é relativamente recente. Nos últimos cinquenta anos houve um grande desenvolvimento destes processos, aplicados à produção de proteínas, enzimas, vitaminas, hormônios e antibióticos, além do emprego de microrganismos no tratamento biológico de resíduos.

O desenvolvimento de um processo fermentativo envolve o estudo de diversas etapas, desde a seleção do tipo de microrganismo a ser utilizado e da cepa mais produtiva, até o processo de recuperação e purificação do produto de interesse comercial. Ao lado dos estudos sobre as melhores condições de cultivo do microrganismo (pH, temperatura, condições de agitação e de aeração) é de muita importância, também, o estabelecimento das melhores condições de inoculação para o processo, visando a máxima produtividade.

LILLY (1979) destacou a existência de poucos estudos sistemáticos sobre os efeitos do inóculo em processos fermentativos, apontando o fato de que a quantidade e a qualidade do inóculo, geralmente, não têm uma importância crítica em cultivos de bactérias,

mas têm um efeito significativo no crescimento e na morfologia de microrganismos filamentosos, como fungos e actinomicetos. Essa influência do inóculo sobre a morfologia de fungos filamentosos muitas vezes se reflete na produtividade do produto de interesse no processo fermentativo, como enzimas e antibióticos. Devido a variabilidades nas condições do inóculo, tanto em termos de quantidade de células presentes como em termos da qualidade deste inóculo (morfologia, estado fisiológico, viabilidade e produtividade das células), torna-se importante a padronização do inóculo de forma a se ter sempre um inóculo nas mesmas condições, em princípio otimizadas para o processo em estudo. Tal padronização evita, geralmente, a utilização de um inóculo de baixa qualidade, o que poderia conduzir a uma queda no rendimento e na produtividade do processo (WEBB; KAMAT, 1993).

As enzimas são catalisadores orgânicos, produzidos por células vivas, que atuam nas reações químicas dos processos vitais celulares, sendo muito empregadas em indústrias alimentícias e farmacêuticas (PARK, 1975). Podem ser obtidas a partir de três fontes: por extração de vegetais (por exemplo, a papaína) ou animais (renina, tripsina e pepsina) e através do cultivo de microrganismos (como por exemplo, proteases, α -amilase, glicoamilase, pectinase). A maior parte das enzimas produzidas são empregadas no processamento de alimentos, como as enzimas amilolíticas e as pectinolíticas, devendo-se destacar, ainda, a utilização de proteases na fabricação de detergentes.

Segundo ARBIGE; PITCHER (1989), no início da década de 1960 houve um grande crescimento no mercado mundial de enzimas devido à introdução das hidrolases, com destaque para a glicoamilase, utilizada na hidrólise do amido. Atualmente, cerca de 80 % das enzimas produzidas em escala industrial são hidrolíticas e extracelulares, devido à maior facilidade de recuperação e purificação destas, em comparação com as enzimas intracelulares. MAGALHÃES (1989) destacou que, no final da década de 1980, as proteases lideravam o mercado de enzimas, com 59 % do mercado mundial. As amilases ocupavam o segundo lugar, com 28 % do mercado.

A utilização preferencial de fungos filamentosos na produção de enzimas é devida à habilidade destes microrganismos em secretar substanciais quantidades de proteínas, o que os torna também atraentes como hospedeiros para a produção de proteínas heterólogas (JEENES *et al.*, 1991). Dessa forma, as enzimas fúngicas constituem a maior parte da quantidade total de enzimas produzidas industrialmente.

A glicoamilase é uma enzima extracelular que atua na hidrólise do amido a glicose, sendo produzida por várias espécies de fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Endomyces*. A produção de glicoamilase é feita preferencialmente por *Aspergillus* em cultivo submerso, com a utilização de um meio de cultura rico em amido (AUNSTRUP, 1979).

O cultivo de linhagens de *Aspergillus* em fermentador aerado, visando a produção de glicoamilase, é normalmente precedido de um cultivo em incubador rotativo, de maneira a se ter um crescimento prévio de células. Os frascos cultivados em incubador rotativo, por sua vez, são inoculados com uma suspensão de esporos do microrganismo. A concentração de esporos nos frascos agitados pode ser considerada como sendo o tamanho ou densidade do inóculo.

Segundo WHITAKER; LONG (1973), o crescimento de fungos filamentosos pode se dar na forma de pequenas esferas (“pellets”) ou na forma de hifas dispersas (forma filamentosa). Muitos fatores influenciam a forma de crescimento de fungos, podendo-se destacar, entre eles, as características do inóculo, principalmente a concentração de esporos e a presença ou ausência de aglomerados de esporos no inóculo. A forma de crescimento, por sua vez, tem influência na síntese do produto no processo fermentativo. Como foi destacado, em trabalho recente, por RUOHANG; WEBB (1995), a produção de glicoamilase, em particular, é influenciada negativamente pelo crescimento na forma de “pellets”, fato que pode ser prevenido manipulando-se as condições de inoculação ou as condições de cultivo. Dessa forma, é importante o estudo da relação entre as características do inóculo, a morfologia do microrganismo e a produção de glicoamilase.

Assim, no presente trabalho procurou-se investigar os efeitos da concentração de esporos na morfologia obtida em incubador rotativo e sua posterior influência no ensaio conduzido em fermentador. A fim de se prevenir a formação de “pellets” no cultivo de *Aspergillus awamori*, indesejáveis no processo de produção de glicoamilase, efetuou-se um estudo visando a determinação da influência do pH na aglomeração de esporos durante a germinação, na morfologia obtida e, conseqüentemente, na produção de glicoamilase. Também foi estudada a forma de preparo do inóculo para o fermentador, com o objetivo de se determinar qual a mais adequada para a produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori* em cultivo submerso.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 A glicoamilase

A glicoamilase ou amiloglicosidase (α -D-(1,4)-glican-glicohidrolase, E.C. 3.2.1.3) é uma enzima extracelular utilizada na hidrólise do amido para a produção de xaropes de glicose ou frutose. Esta enzima atua no rompimento das ligações α -1,4 e α -1,6 da molécula de amido, transformando-o em glicose e, por esta razão, é muito empregada na indústria alimentícia, sendo uma das enzimas mais produzidas no mundo. A produção industrial de xaropes de frutose a partir de amido requer a utilização de quatro enzimas: α -amilase, glicoamilase, pululanase e glicose-isomerase (HEADON; WALSH, 1994).

A produção de glicoamilase é obtida através do cultivo de fungos filamentosos, com destaque para os gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Endomyces*. PAZUR *et al.* (1990) compararam as propriedades das glicoamilases produzidas por *Rhizopus niveus* e *Aspergillus niger*. Os dois tipos de glicoamilase (isoenzimas) apresentaram propriedades semelhantes, com massas moleculares entre 95500 e 97500 e conversão quantitativa do amido a glicose. A maior diferença entre as moléculas estava nas suas estruturas glicoprotéicas, que diferiam entre si pela composição de aminoácidos e pela natureza das unidades de carboidrato presentes. AUNSTRUP (1979) destacou que as glicoamilases de *Rhizopus* e *Endomyces* são menos termoestáveis do que a

glicoamilase produzida por *Aspergillus*, apontando o fato de que, industrialmente, esta enzima é preferencialmente produzida por *Aspergillus* em cultivo submerso. Nos cultivos de *Aspergillus*, também ocorre a produção de transglicosidase, indesejável no processo de produção de glicoamilase (SHAH *et al.* , 1987 e SHAH *et al.*, 1989). Algumas linhagens são mais adequadas para a produção de glicoamilase pois produzem pouca quantidade de transglicosidase, como é o caso do *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (AUNSTRUP, 1979).

Sendo uma enzima indutiva, a síntese de glicoamilase é bastante incrementada quando o seu substrato (indutor) está presente no meio de cultura. A produção desta enzima, assim como a de várias outras hidrolases, é regulada por mecanismos de indução e de repressão catabólica. DOMINGUES; PERALTA (1993) estudaram a influência da fonte de carbono na produção de α -amilase e de glicoamilase por *Aspergillus fumigatus*, mostrando que baixas concentrações destas enzimas eram obtidas em cultivos sem a presença de carboidratos e que polissacarídeos com ligações α -1,4 estimulavam a produção de ambas as enzimas. Além disso, a produção destas enzimas não era completamente reprimida na presença de glicose. GHOSH *et al.* (1990) também estudaram os mecanismos de regulação da síntese de glicoamilase, mostrando que maltose e carboidratos contendo unidades de maltose induziam a produção de glicoamilase e que a presença de glicose e outros monossacarídeos (sorbose e xilose) diminuía a

produção desta enzima. ALI *et al.* (1990), cultivando *Aspergillus terreus*, analisaram a influência de carboidratos não amiláceos na síntese de glicoamilase, mostrando que a sua produção é fortemente reprimida por monossacarídeos (manose, galactose, arabinose, xilose e sorbose) e outros carboidratos (lactose, rafinose e celulose). CHIQUETTO *et al.* (1992) também observaram que maltose e amido proveniente de farinha de mandioca induziam a síntese de glicoamilase por *Aspergillus*, ao passo que frutose reprimia esta síntese.

A glicoamilase tem sido extensivamente estudada no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. SCHMIDELL *et al.* (1989) analisaram a evolução deste trabalho entre 1980 e 1988, mostrando que se conseguiu, neste período, um aumento de cerca de 150 vezes na produção de glicoamilase em processo descontínuo. Os fatores que influenciam a produção de glicoamilase, tais como pH, concentração inicial de substrato (AGUERO, 1987) e temperatura (MACEDO, 1982) também foram estudados. FACCIOTTI *et al.* (1991) observaram que a síntese de glicoamilase é fortemente afetada pela concentração de extrato de levedura presente no meio de cultura, obtendo maior atividade enzimática com o aumento da concentração de extrato de levedura no meio de cultura. Ao lado dos processos descontínuos, a produção de glicoamilase foi estudada em processos descontínuo-alimentados (LESSMANN (1993), TONSO (1994) e

KILIKIAN (1996)), semicontínuos (FACCIOTTI (1986) e FACCIOTTI *et al.* (1990)) e contínuos (SCHMIDELL (1986), SCHMIDELL; FACCIOTTI (1994a) e SCHMIDELL; FACCIOTTI (1994b)).

ROUSSET; SCHLICH (1989) analisaram a influência da frequência de agitação na produção de glicoamilase e de α -amilase por *Aspergillus niger*. A maior produção de α -amilase ocorreu com agitação de 300 rpm, decrescendo para maiores frequências de agitação. Para a glicoamilase, a máxima produção ocorreu com a utilização de 400 rpm. A frequência de agitação está ligada à transferência de oxigênio no processo. FACHINI (1988), estudando o processo de produção de glicoamilase, mostrou que o aumento da frequência de agitação e da vazão específica de aeração conduziu a maiores coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio. O aumento da velocidade específica de respiração conduziu a maiores velocidades específicas de produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori*. JURKIEWICZ (1994), trabalhando com *Aspergillus awamori*, obteve um maior crescimento celular e uma maior síntese de glicoamilase com o aumento da frequência de agitação de 300 rpm para 700 rpm.

Um fator de grande importância na produção de glicoamilase é a morfologia de crescimento do microrganismo, assunto este que, até o presente momento, não havia sido abordado de forma sistemática pelo grupo de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, tendo sido realizado apenas um

estudo preliminar (PAMBOUKIAN *et al.*, 1994). O crescimento de microrganismos filamentosos pode ocorrer na forma filamentosa ou na forma de pequenas esferas (“pellets”). Segundo RUOHANG; WEBB (1995), a glicoamilase não deve ser produzida na presença de “pellets”, devendo-se utilizar, preferencialmente, a forma filamentosa para a produção desta enzima. Pode-se induzir o crescimento na forma filamentosa manipulando-se vários fatores (densidade de inóculo, agitação, pH, composição do meio de cultura).

Atualmente, muitas tentativas têm sido feitas com o objetivo de monitorizar o processo de produção de glicoamilase por meio de sistemas de medida “on-line”. IMAI *et al.* (1994) desenvolveram um sistema de monitorização da produção de glicoamilase, composto por um filtro de cerâmica, um sistema de amostragem, um sistema de homogeneização automático e um espectrofotômetro, permitindo a monitorização contínua da atividade de glicoamilase durante mais de 100 horas de cultivo. LINKO; ZHU (1992) propuseram a utilização de redes neurais a fim de estimar e prever a produção de glicoamilase em cultivos de *Aspergillus niger*, obtendo resultados satisfatórios em relação aos valores obtidos “off-line”. BADINO JR. *et al.* (1996) desenvolveram um dispositivo para a obtenção de medidas reológicas contínuas e “on-line” de caldos de fermentação. A utilização deste equipamento, associado com correlações entre os parâmetros reológicos e as velocidades específicas de crescimento e de produção de glicoamilase

(QUEIROZ *et al.*, 1997), também permite a monitorização do processo de produção de glicoamilase.

Esses recentes avanços permitem o estabelecimento de estratégias de controle do processo, visando a obtenção de elevadas atividades no caldo, bem como elevadas produtividades do processo.

2.2 Microrganismos filamentosos : características e morfologia

2.2.1 *Aspergillus*

Os fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos heterotróficos. Caracterizam-se por formarem um micélio, que é um conjunto de estruturas filamentosas denominadas hifas. A reprodução dos fungos, normalmente, ocorre por meio de esporos, podendo ser sexuada ou assexuada (LIMA, 1975).

Aspergillus é um fungo filamentoso muito importante economicamente, sendo utilizado em fermentações industriais para a produção de ácido cítrico, ácido glicônico, glicoamilase e várias enzimas. Esse fungo se reproduz por meio de esporos (conídias), formando micélios compostos por hifas septadas e ramificadas (PELCZAR *et al.*, 1980).

2.2.2 A morfologia de microrganismos filamentosos

O crescimento de fungos filamentosos pode ocorrer na forma de “pellets”, com as hifas emaranhadas formando pequenas esferas, ou na forma filamentosa, com as hifas dispersas pelo meio de cultura. WHITAKER; LONG (1973) publicaram uma revisão bibliográfica mostrando os principais aspectos da formação de “pellets” e as suas características.

Segundo esses autores, a estrutura do “pellet” é composta por três regiões:

- a) A periferia, composta por células mais jovens e que, efetivamente, se reproduzem;
- b) A camada intermediária, composta por células mais velhas;
- c) O núcleo ou “core”, composto por esporos e células não viáveis, as quais podem sofrer lise, dando origem a “pellets” ocos (“hollow pellets”).

A estrutura dos “pellets” também é variável. As hifas podem estar arranjadas soltas ou fortemente compactadas, formando “pellets” com a superfície lisa (“smooth pellets”) ou “pellets” hirsutos ou “cabeludos” (“hairy pellets”).

De acordo com VECHT-LIFSHITZ *et al.* (1990), a formação de “pellets” pode ser de dois tipos: coagulativo ou não-coagulativo. Em *Penicillium*, os “pellets” são do tipo não-coagulativo, onde um “pellet” é produzido a partir de um único esporo. No caso de *Aspergillus*, o “pellet”

é do tipo coagulativo, formando-se a partir de um aglomerado de esporos. Neste tipo de “pellet”, ocorre uma aglutinação de esporos nos estágios iniciais da germinação, a partir de onde as hifas começam a se ramificar e emaranhar, formando o “pellet”.

Os fatores que influenciam na morfologia foram citados por WHITAKER; LONG (1973) e por METZ; KOSSEN (1977). Entre estes fatores podem ser destacados:

a) A espécie e a linhagem do fungo: nem todas as espécies crescem na forma de “pellets”. Entre os fungos formadores de “pellets” estão *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopus*, entre outros (WHITAKER; LONG, 1973).

b) Meio de cultura: A composição do meio influencia na formação e estrutura dos “pellets”, principalmente a presença de micronutrientes. Por exemplo, a utilização de um meio de cultura contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio levou à formação de “pellets” em *Penicillium chrysogenum*, ao passo que a utilização de água de maceração de milho (“cornsteep liquor”) levou a um crescimento na forma filamentosa (PIRT; CALLOW, 1959). BYRNE; WARD (1989) estudaram o efeito de nutrientes na formação de “pellets” em *Rhizopus arrhizus*, mostrando que baixas concentrações de peptona no meio de cultura conduziam à formação de “pellets” e altas concentrações de peptona produziam um crescimento na forma filamentosa.

c) Agitação: A agitação atua na dispersão de aglomerados de esporos. De uma maneira geral, uma frequência de agitação alta favorece a dispersão de esporos e conduz a um crescimento na forma filamentosa, enquanto que uma frequência de agitação baixa conduz a um crescimento na forma de “pellets”, devido à aglomeração de esporos (MITARD; RIBA, 1988). GÓMEZ *et al.* (1988), cultivando *Aspergillus niger*, obtiveram a formação de “pellets” utilizando altas frequências de agitação (1000 rpm). Esse resultado contraditório foi criticado por TRÄGER *et al.* (1989), que obtiveram, em fermentador, um crescimento na forma filamentosa com agitação de 600 rpm e utilizaram um fermentador “airlift” para a obtenção de “pellets” na produção de ácido glicônico por *Aspergillus niger*. A utilização de fermentadores do tipo “airlift” favorece a formação de “pellets” devido ao cisalhamento baixo. No caso de fermentadores convencionais, o tipo de impelidor também influencia a morfologia, como foi destacado por JÜSTEN *et al.* (1996) em cultivos de *Penicillium chrysogenum*. Um outro efeito da frequência de agitação é a fragmentação de hifas e a ruptura de “pellets”. Esse fato foi estudado por SMITH *et al.* (1990) em um processo de produção de penicilina. Nos cultivos com alta frequência de agitação (1000 e 1200 rpm) houve maior rompimento das hifas devido ao alto cisalhamento, formando hifas mais curtas e menos ramificadas do que nos cultivos a 800 rpm e conduzindo, também, a uma velocidade de produção de penicilina menor. Da mesma forma, BELMAR-BEINY; THOMAS (1991)

utilizaram a técnica de análise de imagens para determinar a influência da agitação na fragmentação de hifas. VILAÇA (1997) mostrou que, para o processo de produção de glicoamilase, um alto cisalhamento conduz a maiores atividades enzimáticas e produtividades em glicoamilase, provavelmente devido à obtenção de um crescimento na forma filamentosa.

d) pH : O pH do meio de cultura atua na alteração das propriedades eletrostáticas da superfície dos esporos. Um pH baixo (entre 2 e 3) conduz a uma dispersão de esporos e a um crescimento na forma filamentosa. Um pH mais alto (entre 5 e 6) conduz a uma aglomeração de esporos e à formação de “pellets” (WAINWRIGHT *et al.*, 1993).

e) Oxigênio dissolvido: A utilização de uma vazão específica de aeração de 0,25 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) conduziu a um crescimento na forma de “pellets”, em cultivo de *Morchella hortensis*, enquanto o aumento da aeração para 0,75 vvm levou a um crescimento na forma filamentosa (WHITAKER; LONG, 1973).

f) Tamanho de inóculo: Uma alta concentração de esporos no inóculo resulta em um crescimento na forma filamentosa, ao passo que uma baixa concentração de esporos no inóculo provoca a formação de “pellets” (FOSTER, 1949), conforme será abordado mais detalhadamente no item 2.3.2.

g) Agentes tensoativos: A presença de agentes tensoativos no meio de cultura diminui a aglomeração de esporos e hifas, resultando em um crescimento na forma filamentosa (METZ; KOSSEN, 1977).

2.2.3 Influência da morfologia na produção de metabólitos

A morfologia mais adequada depende do processo e do produto de interesse. GÓMEZ *et al.* (1988) estudaram a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, mostrando que houve maior produção de ácido quando o crescimento ocorreu na forma de “pellets” do que quando o crescimento ocorreu na forma filamentosa. O principal aspecto do cultivo de fungos na forma de “pellets” está na viscosidade mais baixa do caldo de fermentação, melhorando as condições de transferência de oxigênio. A forma filamentosa resulta em uma alta viscosidade do caldo, dificultando o transporte de massa durante o processo e podendo fazer com que o oxigênio se torne limitante. O maior problema do cultivo de fungos filamentosos na forma de “pellets” está na transferência de nutrientes e de oxigênio para o interior dos “pellets”. Para “pellets” acima de um certo diâmetro crítico, ocorre limitação de nutrientes nas suas camadas internas pois o transporte de nutrientes ocorre apenas por difusão. Esse fato faz com que o crescimento celular ocorra apenas na camada externa do “pellet”, não havendo crescimento nas camadas internas. WHITTNER *et al.* (1986) analisaram a transferência de oxigênio para o interior de “pellets” de *Penicillium*

chrysogenum utilizando uma microsonda de oxigênio e mostrando que a concentração de oxigênio decai à medida que se penetra no “pellet”, podendo atingir valores limitantes, se o diâmetro do “pellet” estiver acima de um valor crítico.

Alguns autores consideram que existe uma relação entre o tipo de metabólito produzido e a morfologia mais adequada para a sua produção. BRAUN; VECHT-LIFSHITZ (1991) sugeriram que a produção de metabólitos secundários e intermediários, como por exemplo, o ácido cítrico, deveria ser feita com a utilização de “pellets”. Outros metabólitos intermediários, citados por RATLEDGE (1993), são ácido itacônico, ácido glicônico e ácido fumárico. BYRNE; WARD (1989) destacaram que o crescimento na forma de “pellets” é mais adequado para a produção de ácido itacônico por *Aspergillus terreus*. TRÄGER *et al.* (1989) utilizaram um reator “airlift” para a produção de ácido glicônico pois, neste tipo de reator, é mais fácil a obtenção de um crescimento na forma de “pellets”, devido ao cisalhamento baixo. Estes autores afirmaram que, para a produção de ácido glicônico, é desejável a formação de “pellets”. SHARMA; PADWAL-DESAI (1985) estudaram a produção de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus*, a qual deve ser realizada na presença de “pellets”, sendo maior à medida que o diâmetro de “pellets” aumenta. GBEWONYO *et al.* (1992), trabalhando com *Aspergillus terreus*, analisaram a influência da morfologia celular na produção de lovastatina, um potente medicamento utilizado na

redução do colesterol em seres humanos. A lovastatina é um metabólito secundário cuja produção é maior se o crescimento ocorre na forma de “pellets”. Por outro lado, RUOHANG; WEBB (1995) destacaram que a glicoamilase, sendo um metabólito primário, é influenciada negativamente pelo crescimento na forma de “pellets”, sendo necessária a utilização da forma filamentosa de crescimento. Segundo BYRNE; WARD (1989), enzimas pectinolíticas (metabólitos primários) são melhor produzidas pela forma filamentosa. Da mesma forma, a produção de α -amilase (metabólito primário) é mais alta com o crescimento na forma filamentosa do que com o crescimento na forma de “pellets” (CARLSEN *et al.*, 1996).

Esses fatos mostram que, em muitos casos, metabólitos primários são melhor produzidos se o crescimento ocorre na forma filamentosa e a produção de metabólitos secundários e intermediários, geralmente, é maior na presença de “pellets”. Devem ser destacadas, no entanto, algumas exceções para este fato: ácido fumárico é um metabólito secundário melhor produzido quando o crescimento ocorre na forma filamentosa (BYRNE; WARD, 1989), fato que também ocorre no caso da penicilina (CALAM, 1976). HOTOP *et al.* (1993) fizeram um estudo sobre a influência do diâmetro de “pellets” na produção de penicilina e obtiveram uma produção duas vezes maior utilizando “pellets” de 0,6 mm de diâmetro do que a produção obtida com “pellets” de 1 mm, mostrando que “pellets” grandes prejudicam a síntese de

penicilina.

De acordo com VINING (1986), a produção de metabólitos secundários ocorre em uma condição de carência ou limitação de nutrientes. No caso do crescimento na forma de “pellets”, uma parte do micélio, correspondente à camada intermediária do “pellet”, está sob limitação de nutrientes, o que poderia explicar a maior produção de alguns metabólitos secundários por esta forma de crescimento. Deve-se lembrar, no entanto, que existem outros fatores referentes à morfologia, que influenciam na produção, principalmente as características reológicas do caldo de fermentação.

2.2.4 A utilização de análise de imagens na caracterização morfológica de microrganismos filamentosos

Devido à importância da morfologia em processos fermentativos, tornou-se necessária uma caracterização mais refinada da morfologia de fungos filamentosos.

A morfologia de um microrganismo pode ser descrita microscopicamente, por meio da caracterização de comprimentos e diâmetros de hifas, ou macroscopicamente, por meio da caracterização da forma e diâmetro de “pellets” (CARLSEN *et al.*, 1996).

PROSSER; TOUGH (1991) mostraram os mecanismos de crescimento de fungos filamentosos, destacando que este crescimento ocorre apenas nas extremidades das hifas (“tips”), onde ocorre a síntese

de material celular. A função das outras partes das hifas seria a absorção de nutrientes e o fornecimento destes nutrientes para as extremidades.

METZ *et al.* (1981) propuseram um método de representação quantitativa da morfologia de fungos, definindo alguns parâmetros (comprimento da hifa principal, comprimento total das hifas, comprimento médio das ramificações, número de ramificações, número de extremidades, diâmetro médio das hifas e a unidade de crescimento de hifa (“hyphal growth unit” ou HGU) definida como sendo a relação entre o comprimento total das hifas e o número de extremidades). Essas caracterizações eram realizadas por meio de um microscópio acoplado a uma câmera fotográfica. As fotos eram digitalizadas e utilizava-se um tipo de caneta especial para a determinação das coordenadas (X,Y) de cada ponto da hifa. As distâncias entre os pontos eram calculadas via computador. Esse método era trabalhoso e lento. Atualmente, essa caracterização morfológica é realizada utilizando-se a técnica de análise de imagens. ADAMS; THOMAS (1988) e PACKER; THOMAS (1990) compararam os dois métodos em cultivos de *Penicillium chrysogenum* e *Streptomyces clavuligerus*, não encontrando diferenças significativas entre os resultados obtidos com a utilização de fotos digitalizadas e os resultados obtidos com análise de imagens. No entanto, a análise de imagens é um método mais rápido, além de não serem necessários o uso e a revelação de filmes fotográficos. RAMOS *et al.* (1996) destacaram

que, além de ser um método mais rápido, a análise de imagens eliminou a subjetividade das medições devido à pouca participação humana no processo, uma vez que estas medições são realizadas por um “software” apropriado.

THOMAS (1992) enfocou a utilização de análise de imagens para a caracterização morfológica de fungos filamentosos, enfatizando que este método fornece informações quantitativas sobre a morfologia de microrganismos.

O processo de análise de imagens envolve algumas etapas. A primeira etapa é a aquisição da imagem com a utilização de uma câmera de televisão acoplada a um microscópio óptico. A aquisição da imagem é feita por meio de um microcomputador e um “software” adequado. Após a aquisição, as características da imagem podem ser alteradas, melhorando-se sua nitidez e isolando-se microrganismos a serem medidos. Procede-se, então, às medições dos parâmetros morfológicos.

COX; THOMAS (1992) utilizaram a técnica de análise de imagens para a classificação de “pellets” de *Aspergillus niger* em diferentes tipos. Para essa classificação foi utilizada a definição de área convexa e perímetro convexo. O perímetro convexo é aquele obtido após o preenchimento de todas as concavidades do “pellet”, como mostra o esquema da figura 2.1. A área convexa é a área delimitada pelo perímetro convexo. A relação entre a área convexa do núcleo (“core”) do

“pellet” e a área convexa do “pellet” pode ser utilizada para a classificação do “pellet”. Essa relação é próxima de 1,0 para “pellets” lisos (“smooth pellets”) e menor do que 1,0 para “pellets” hirsutos (“hairy pellets”).

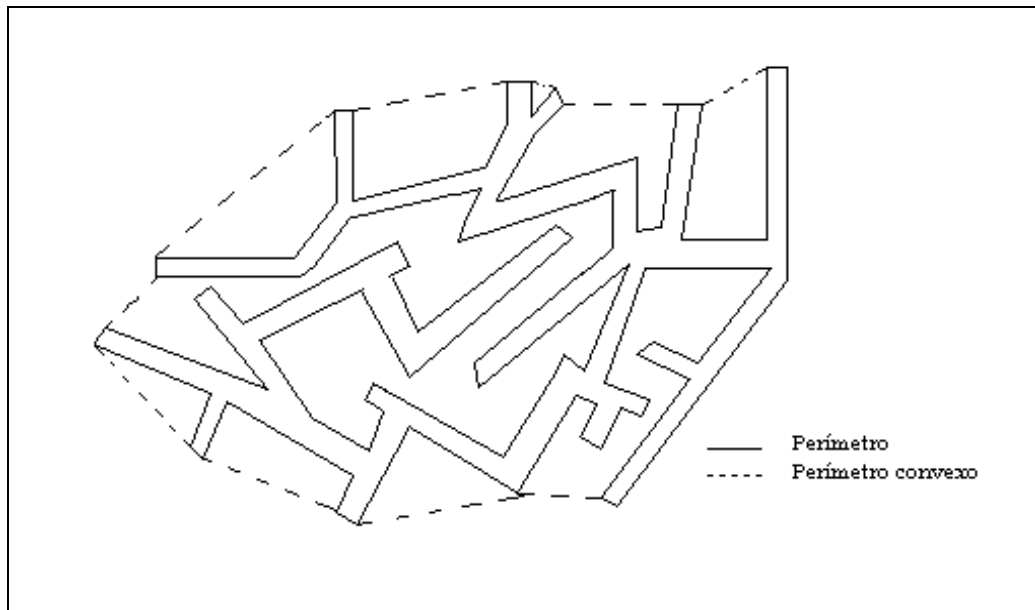


Figura 2.1 Perímetro e perímetro convexo de “pellet” (TUCKER *et al.*, 1992).

Outros trabalhos têm sido publicados mostrando as vantagens do método de análise de imagens na caracterização morfológica de microrganismos filamentosos (TUCKER *et al.*, 1992 e REICHL *et al.*, 1992).

A análise dos parâmetros morfológicos proporcionou o desenvolvimento de muitos modelos matemáticos que relacionam a morfologia com a cinética de crescimento (AYNSLEY *et al.* (1990), VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.* (1993), MEYERHOFF *et al.* (1995), MEYERHOFF; BELLGARDT (1995) e TOUGH *et al.* (1995)).

2.2.5 Agregação de esporos e formação de “pellets”

Esporos podem ser considerados como sendo o início e o final do ciclo de desenvolvimento dos fungos filamentosos. É um estado latente do microrganismo, no qual não há síntese de material celular e a atividade metabólica é reduzida (NIELSEN, 1992).

Como foi destacado anteriormente, a formação de “pellets” em *Aspergillus* é do tipo coagulativo. Os “pellets” são formados devido à agregação de esporos no início da germinação. O processo de germinação inicia-se com um aumento do volume do esporo e requer a presença de nutrientes (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, oxigênio) e condições físicas adequadas (temperatura e umidade).

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos a fim de se controlar a morfologia de crescimento. RATUSZNEI; SUAZO (1994) induziram o crescimento de *Penicillium chrysogenum* na forma de “pellets” por meio da manipulação da concentração de esporos e da frequência de agitação. Outros trabalhos têm sido realizados a fim de se evitar a aglomeração de esporos e induzir o crescimento na forma filamentosa, mais adequada para alguns processos.

RUOHANG; WEBB (1995) utilizaram baixo valor de pH (2,5) e alta frequência de agitação (900 rpm) para o cultivo de *Aspergillus awamori* visando a produção de glicoamilase e obtendo, nessas condições, um crescimento na forma filamentosa. CARLSEN *et al.* (1996), trabalhando com *Aspergillus niger*, obtiveram crescimento na

forma de “pellets” a valores de pH maiores do que 5,0 e crescimento na forma filamentosa a valores de pH menores do que 3,5.

Os mecanismos de agregação de esporos ainda não estão bem determinados. JONES *et al.* (1988) analisaram os efeitos de polímeros (ácido poliacrílico e poliacrilato de sódio) na agregação de esporos e na formação de “pellets”, destacando que as moléculas do polímero poderiam ligar-se à parede dos esporos. Dessa forma, os esporos ficariam revestidos pelo polímero e ocorreria uma repulsão entre os grupos carboxila ionizados das moléculas de polímero de esporos adjacentes. Essa repulsão diminuiria a agregação de esporos.

WAINWRIGHT *et al.* (1993) também estudaram a agregação de esporos e a influência do pH nesse processo. Os resultados obtidos mostraram que, a pH muito ácido (entre 2 e 3), houve pequena aglomeração de esporos e que, a pH mais alto (entre 5 e 7), houve maior aglomeração de esporos. A explicação desse fenômeno estaria nas características eletrostáticas da superfície dos esporos. A baixos valores de pH, essa superfície estaria protonada e ocorreria repulsão dos esporos, evitando a sua aglomeração. A utilização de baixos valores de pH teria a mesma função dos polímeros, atuando na modificação das propriedades eletrostáticas da superfície dos esporos e evitando a sua aglomeração.

BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.* (1989) estudaram o processo de germinação em suspensões concentradas de esporos de *Aspergillus*

niger e detectaram uma substância que inibe a germinação quando a concentração de esporos é alta. Essa substância seria produzida no momento da esporulação, sendo um auto-inibidor do processo de germinação. A função desse auto-inibidor seria a de evitar a germinação rápida de todos os esporos ao mesmo tempo. A lavagem dos esporos com água destilada esterilizada eliminou essa inibição, mantendo a porcentagem de germinação acima de 90 %.

SZTEJNBERG *et al.* (1990) também obtiveram um decréscimo na porcentagem de germinação com o aumento da concentração de esporos, devido a essa auto-inibição.

Um outro fator que afeta a germinação de esporos é a temperatura. Este fator foi analisado por ANDERSON; SMITH (1972) em cultivos de *Aspergillus niger*. Esse estudo mostrou que a porcentagem de germinação é dependente da temperatura e que ocorre inibição total da germinação a temperaturas altas (maiores do que 47 °C).

BOSCH *et al.* (1995) propuseram um modelo matemático para o processo de germinação de esporos, composto por três parâmetros: o primeiro parâmetro é relacionado com a porcentagem máxima de germinação na população de esporos; o segundo é um parâmetro cinético, que corresponde ao tempo necessário para se atingir metade da porcentagem máxima de germinação; o terceiro parâmetro relaciona-se com a sincronização da germinação na população de esporos (no caso limite, quando este parâmetro tende ao infinito, a

germinação é perfeitamente sincronizada, ou seja, todos os esporos germinam ao mesmo tempo). Esse modelo mostrou-se efetivo no ajuste de muitos resultados experimentais obtidos para várias espécies de microrganismos.

NIELSEN; KRABBEN (1995) também quantificaram a germinação de esporos utilizando três parâmetros: o instante no qual a germinação se inicia, o instante do término da germinação e a fração de esporos viáveis na suspensão.

2.2.6 Influência da morfologia nas características reológicas do caldo de fermentação

Em cultivos de microrganismos filamentosos, o comportamento reológico do caldo de fermentação está intimamente ligado à morfologia de crescimento do microrganismo e à concentração celular obtida no cultivo. Quando o crescimento ocorre na forma filamentosa, as hifas estão dispersas no meio de cultura e o comportamento do caldo é altamente não-newtoniano (pseudoplástico) e extremamente viscoso, dificultando a agitação e a aeração. No caso de crescimento na forma de “pellets”, a viscosidade do caldo é menor, facilitando a transferência de oxigênio.

MITARD; RIBA (1986) analisaram as propriedades reológicas de suspensões de “pellets” de *Aspergillus niger*, mostrando que a viscosidade do caldo depende do diâmetro dos “pellets” presentes.

PEDERSEN *et al.* (1993) mostraram que, em cultivos de *Penicillium chrysogenum*, a mudança da forma de crescimento de “pellets” para filamentosa, durante o cultivo, provocou um grande aumento no índice de consistência do caldo.

RUOHANG; WEBB (1995) propuseram correlações entre os parâmetros reológicos do caldo de fermentação (índice de consistência do caldo e índice de comportamento do escoamento) e a concentração celular, em cultivos de *Aspergillus awamori* na forma filamentosa.

QUEIROZ *et al.* (1997) propuseram correlações entre os parâmetros reológicos e as velocidades específicas de crescimento e de produção de glicoamilase, em cultivos descontínuos de *Aspergillus awamori*.

2.3 O inóculo em processos fermentativos

2.3.1 O processo de preparo do inóculo

Em processos fermentativos, uma das etapas iniciais é a produção do inóculo. HUNT; STIEBER (1986) analisaram esta etapa, destacando que a produção do inóculo é a etapa de preparação de uma população de microrganismos a partir de uma cultura estoque, a fim de se obter células em um estado fisiológico adequado para a inoculação do fermentador na etapa final de produção.

O tipo de inóculo (células vegetativas ou esporos) e a sua qualidade exercem uma influência importante em processos fermentativos (CALAM, 1976). Muitos fatores decorrentes do processo de inoculação podem influenciar nos resultados de uma fermentação. A concentração de células no inóculo (densidade ou tamanho de inóculo), o estado fisiológico e a idade das células e ainda, a morfologia do microrganismo são fatores importantes nas etapas de preparo do inóculo em um processo fermentativo. As características que o inóculo deve possuir dependem do processo fermentativo em que ele será utilizado e do produto de interesse na fermentação.

Segundo PARTON; WILLIS (1990), um inóculo em condições adequadas e na quantidade e concentração corretas conduz a condições ótimas de crescimento e a bons resultados no processo fermentativo. Um inóculo de má qualidade pode resultar em uma diminuição significativa da produtividade e do rendimento do processo.

A produção do inóculo para fermentações em laboratório é relativamente simples e raramente excede dois estágios. No caso industrial, é necessária a preparação de um inóculo de boa qualidade e em volume suficiente para a inoculação do fermentador na etapa final de produção. Assim, nos processos industriais, a etapa de produção do inóculo compreende vários estágios de transferência (repiques de células e pré-cultivos em frascos e em tanques), visando, em muitos casos, a obtenção de um grande volume de inóculo (PARTON; WILLIS,

1990). Segundo REISMAN (1988), todas as etapas de produção do inóculo devem ser monitorizadas a fim de se manter a viabilidade e a produtividade das células. CORBETT (1987) enfatizou que, quanto maior o número de estágios envolvidos no processo, maior é a chance de o microrganismo não se manter suficientemente ativo (produtivo), particularmente no caso de cepas mutantes, que são, geralmente, instáveis. Outro aspecto é a questão do custo elevado quando se tem vários germinadores, os quais são reatores tão sofisticados quanto o reator de produção.

2.3.2 A influência do inóculo em processos fermentativos

A concentração inicial de células em um determinado processo fermentativo é definida basicamente pela concentração de células do inóculo e pela fração de inóculo utilizada (relação entre o volume do inóculo e o volume total de líquido no fermentador).

Assim, encontram-se na literatura vários estudos sobre a influência da concentração de células do inóculo no desempenho de processos fermentativos, sendo que diversos autores empregam os termos “tamanho de inóculo” ou “densidade de inóculo” para se referirem a esta concentração.

Em particular, em cultivos de fungos filamentosos, encontram-se estudos relativos à concentração de esporos do inóculo. MEYRATH (1962) estudou a influência do tamanho de inóculo na cinética de

crescimento de *Aspergillus oryzae*, mostrando que esta influência é mais significativa se o meio de cultura é pobre em elementos traço, como Cu, Zn e Mn. Continuando seus estudos, MEYRATH; McINTOSH (1963) destacaram os efeitos da concentração de esporos do inóculo sobre o metabolismo de fontes de carbono em cultivos de *Aspergillus*, mostrando que as culturas inoculadas com menor concentração de esporos são menos eficientes na utilização de carboidratos para crescimento do que as culturas inoculadas com concentração de esporos mais alta. Nas culturas inoculadas com menor concentração de esporos, ocorre uma menor produção de micélio (menor crescimento) e uma maior produção de outras substâncias (ácidos orgânicos).

O estudo da influência da concentração de esporos do inóculo no metabolismo de fontes de nitrogênio (McINTOSH; MEYRATH, 1963), indicou que as culturas inoculadas com menor concentração de esporos também são menos eficientes na assimilação de nitrogênio, da mesma forma que ocorria com as fontes de carbono. Dessa forma, o micélio de culturas inoculadas com menor concentração de esporos apresentou menor teor de nitrogênio, mostrando que grande parte do nitrogênio presente no meio de cultura inicial foi transformado em subprodutos orgânicos e excretado para o meio.

BROWN; ZAINUDEEN (1978) analisaram o efeito da fração de inóculo sobre a cinética de crescimento e sobre o consumo de oxigênio em cultivos descontínuos de *Trichoderma reesei*. Foram analisadas

5 frações de inóculo (entre 0,5 % e 5,0 %). O aumento da fração de inóculo praticamente não alterou a velocidade específica de crescimento, mas causou uma diminuição na velocidade específica de consumo de oxigênio, principalmente no início do cultivo, onde a concentração celular é menor quando se utiliza menor fração de inóculo. Neste trabalho, os autores destacaram que o preparo de um inóculo composto por células vegetativas em fase exponencial de crescimento pode eliminar completamente a fase “lag” do processo em cultivos descontínuos de fungos filamentosos, o que é altamente desejável em processos fermentativos. Essa diminuição da fase “lag”, geralmente, provoca uma diminuição no tempo total da fermentação, aumentando o rendimento do processo.

STREHAIANO *et al.* (1983) estudaram o efeito do inóculo em fermentações alcoólicas e obtiveram a diminuição do tempo de fermentação com o aumento da fração de inóculo.

Muitos autores se referem ao tamanho de inóculo em termos de fração volumétrica, em relação ao volume total de líquido no reator. Nesses casos, devem ser especificadas, também, as características deste inóculo, principalmente a sua concentração celular. Comparações entre processos com diferentes frações de inóculo, em termos de porcentagem volumétrica, só podem ser realizadas se estes inóculos estiverem padronizados, apresentando as mesmas características.

VENOSA *et al.* (1975), cultivando *Aspergillus niger*, não observaram influência da concentração de esporos sobre o crescimento celular. No entanto, a faixa de concentrações estudada por estes autores foi muito pequena (entre $1,2 \times 10^8$ esp/L e $5,4 \times 10^8$ esp/L).

MEGEE *et al.* (1970) estudaram a formação de produtos em cultivos de fungos filamentosos, destacando que, em muitos casos, a produção diminui com o aumento do tamanho de inóculo, citando o exemplo do ácido itacônico e do ácido cítrico.

MAIORANO (1982) estudou a influência da concentração de esporos do inóculo na produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* em cultivo semi-sólido. A produção de enzimas aumentou com o aumento da concentração de esporos até o limite de $1,0 \times 10^6$ esp/grama de matéria seca. Acima deste limite, não houve influência da concentração de esporos sobre a produção enzimática.

HUNT; STIEBER (1986) relataram o processo industrial de produção de vitamina B₁₂, mostrando grande influência da concentração celular de *Pseudomonas denitrificans* do inóculo na produção de vitamina. A produção de vitamina B₁₂ diminuiu com o aumento desta concentração celular.

Estudos realizados por FRIEDRICH *et al.* (1990) mostraram o efeito do inóculo na produção de enzimas pectinolíticas, por *Aspergillus niger*. A concentração de esporos utilizada na inoculação dos frascos variou entre 10^2 e 10^8 esp/L. A atividade enzimática de pectinase

apresentou os mais altos valores com a utilização do inóculo menos concentrado. Alta concentração de esporos levou a uma redução na atividade enzimática de até 50 % para a pectinase.

Existem trabalhos recentes enfocando a importância da etapa de inoculação em processos fermentativos, mostrando que o tipo e a qualidade do inóculo têm um efeito considerável no resultado da fermentação, pois podem influenciar na morfologia de crescimento do microrganismo durante o processo. No caso particular de fungos filamentosos, o crescimento pode ocorrer de duas formas distintas: na forma de “pellets” ou na forma filamentosa, como já foi destacado anteriormente. A forma de crescimento depende, entre outros fatores, da concentração de esporos utilizada no inóculo (WHITAKER; LONG, 1973). A morfologia de actinomicetos, microrganismos muito utilizados na produção de antibióticos, também é afetada pela concentração de esporos no inóculo, como foi destacado por LAWTON *et al.* (1989), variando desde “pellets” compactos até agregados de hifas dispersos pelo meio de cultura. VECHT-LIFSHITZ *et al.* (1990) estudaram a influência do tamanho de inóculo na morfologia de *Streptomyces tendae*. A utilização de baixa concentração de esporos no inóculo (menor do que 10^6 esp/m³) conduziu à formação de “pellets” grandes (maiores do que 2 mm). Alta concentração de esporos no inóculo (em torno de 10^{12} esp/m³) provocou um crescimento na forma de “pellets” pequenos

(menores do que 1 mm). Uma maior concentração de esporos levou a um crescimento na forma filamentosa.

Conforme mencionado anteriormente, em alguns processos, a forma de “pellets” é preferível, como é o caso da produção de ácido cítrico. GÓMEZ *et al.* (1988) cultivaram *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico, utilizando dois tipos de inóculo: uma suspensão de esporos e uma suspensão de “pellets”, pré-cultivados em incubador rotativo. O inóculo proveniente da suspensão de esporos originou, em fermentador, um crescimento na forma filamentosa e o inóculo proveniente da suspensão de “pellets” levou a um crescimento também na forma de “pellets”, em fermentador, aumentando a produção de ácido cítrico. SHARMA; PADWAL-DESAI (1985) analisaram a influência da concentração de esporos do inóculo no tamanho de “pellets” de *Aspergillus parasiticus* e na produção de aflatoxina. O aumento da concentração de esporos causou uma diminuição no tamanho dos “pellets”. A produção de aflatoxina mostrou-se favorecida em condições de limitação de oxigênio, sendo máxima para “pellets” lisos de 0,6 mm de diâmetro. Tanto a produção de aflatoxina como a morfologia celular mostraram-se dependentes da concentração do inóculo.

Em outros processos, obtém-se melhores resultados com a utilização da forma filamentosa, como foi citado por SMITH; CALAM (1980), em um processo de produção de penicilina. Nesse processo,

foram utilizadas diferentes concentrações de esporos no inóculo. Os resultados mostraram que, utilizando-se pequena quantidade de esporos (10^2 esp/mL), o crescimento ocorria na forma de densos “pellets” e a produção de penicilina era baixa (500 U/mL). Inversamente, a utilização de uma concentração mais alta de esporos (10^4 esp/mL) levava a um crescimento na forma filamentosa, aumentando consideravelmente a produção de penicilina (5000 U/mL).

Além da densidade do inóculo, um outro fator importante e que deve ser estudado é a influência da idade da células no processo. RAO; PANDA (1993) mostraram que a produção de ácido glicônico é influenciada pela idade dos esporos utilizados no preparo do inóculo. O máximo rendimento em ácido glicônico foi obtido com a utilização de esporos cultivados por 6 dias em meio contendo ágar. DVADTSATOVA *et al.* (1977) estudaram a influência da idade e da fração de inóculo na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori*. Quanto à idade do micélio, a fermentação onde foi utilizado um inóculo com células mais novas (entre 10 e 24 horas de pré-cultivo) apresentou atividade enzimática mais alta do que aquela onde foi utilizado inóculo composto por células mais velhas (entre 36 e 48 horas). A fração de inóculo que levou a uma maior produção de glicoamilase foi de 1 %, comparando-se com frações de inóculo mais altas.

2.3.3 A padronização do inóculo

Em vista da influência do processo de preparação do inóculo nos resultados de um processo fermentativo, torna-se necessária a padronização das operações envolvidas nesse processo. WEBB; KAMAT (1993) relataram a importância da padronização do inóculo, destacando que ocorrem perdas significativas em processos fermentativos industriais devido a variabilidades no rendimento e na produtividade, causadas por variações da qualidade e do tamanho do inóculo.

Uma das etapas iniciais do processo de produção do inóculo geralmente envolve a transferência de células de um meio sólido para um outro meio de cultura através de uma alça metálica. Esta etapa é fonte de muita variabilidade no processo. A fim de se minimizar essa variabilidade, é comum o procedimento de preparação de uma suspensão de células através da lavagem da superfície do meio sólido com um líquido estéril (água ou solução salina). Com isso, é possível determinar a concentração de células na suspensão e calcular o volume de suspensão necessário para se ter um inóculo padrão.

MEYRATH; SUCHANEK (1972) apresentaram algumas técnicas de inoculação visando a padronização do inóculo, tanto para bactérias e leveduras como para fungos filamentosos, destacando o fato de que o objetivo desta padronização é a obtenção de culturas com propriedades reprodutíveis, principalmente nos estágios mais avançados do cultivo. No caso de fungos, o tamanho do inóculo exerce uma influência mais

significativa no metabolismo e na morfologia das células do que no caso de bactérias e leveduras.

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismo

Nos ensaios realizados, foi empregada uma cultura pura de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, proveniente do Northern Regional Research Laboratory (Illinois, Estados Unidos), órgão pertencente ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. A cultura foi recebida na forma liofilizada já há vários anos, sendo conservada em tubos de ensaio contendo meio Czapek, conforme descrito no item 3.1.1.

3.1.1 Conservação do microrganismo em meio Czapek

a. Preparo do meio Czapek

O meio Czapek é um meio de cultura sólido, à base de ágar, empregado para a esporulação do microrganismo em tubos de ensaio, em placas ou em erlenmeyers. O meio Czapek, descrito por RAPER; FENNEL (1965), apresenta a seguinte composição:

Glicose	30 g/L
NaNO ₃	2,0 g/L
K ₂ HPO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/L
KCl	0,5 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g/L
Extrato de levedura	1,0 g/L
Ágar-ágar	20 g/L

O meio era preparado e distribuído a quente nos tubos, placas ou erlenmeyers de 250 mL. Eram colocados 5 mL de meio nos tubos de ensaio, 20 mL nas placas e 100 mL nos erlenmeyers, os quais eram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Os tubos de ensaio e os erlenmeyers eram deixados em posição inclinada para a solidificação do meio de cultura.

b. Descrição do método de conservação

A conservação da cultura em tubos de ensaio contendo meio Czapek foi realizada da seguinte forma, conforme descrito por FACCIOTTI (1986) :

a) A cultura liofilizada foi suspensa em um tubo contendo 1 mL de água destilada esterilizada;

b) Duas placas de Petri, contendo 20 mL de meio Czapek cada uma, foram inoculadas com essa suspensão;

c) As placas foram incubadas a 30 °C até o aparecimento de colônias isoladas;

d) A partir das colônias existentes em uma das placas, foram inoculados quatro tubos de ensaio, contendo 5 mL de meio Czapek cada um;

e) Os tubos foram incubados a 30 °C, durante 6 dias;

f) Após esse período de incubação, os tubos foram armazenados à temperatura ambiente.

Essa cultura estoque era preservada por meio de repiques periódicos a cada dois meses.

Para o preparo do inóculo, em todos os ensaios, eram feitos repiques dos tubos da cultura estoque para outros tubos de ensaio contendo meio Czapek, como descrito no item 3.3.1.

3.2 Meio de cultura

Nos ensaios realizados em incubador rotativo e em fermentador, foi utilizado um meio de cultura líquido contendo um xarope de farinha de mandioca como principal fonte de carbono. A farinha de mandioca foi obtida junto à UNESP, de Botucatu-SP.

3.2.1 Preparo do xarope de farinha de mandioca

O xarope de farinha de mandioca era preparado da seguinte forma :

- a) Preparavam-se 4 L de solução 0,01 M de CaCl_2 ;
- b) Em uma panela de aço inoxidável, eram colocados 1520 g da farinha de mandioca;
- c) Adicionava-se a solução de CaCl_2 à farinha, procedendo-se à homogeneização;
- d) Após a homogeneização, adicionava-se 1,2 g de α -amilase bacteriana (BAN 800 MG, da Novo Nordisk). (Observação: o cálcio atua como estabilizante da α -amilase);

e) Corrigia-se o pH da suspensão para um valor entre 6,0 e 6,5 , correspondente ao intervalo ótimo de atuação da α -amilase, utilizando-se solução de NaOH 2N;

f) Acoplava-se um agitador mecânico à panela contendo a suspensão de farinha;

g) Aquecia-se a suspensão até a temperatura de 85 °C (temperatura ótima de ação da α -amilase empregada), a qual era mantida por 10 minutos;

h) Elevava-se a temperatura até a ebulição, mantendo-se por 5 minutos nesta condição, para a inativação da α -amilase;

i) A suspensão era filtrada a vácuo, produzindo-se, assim, um xarope límpido com alta concentração de açúcares redutores totais;

j) Dosavam-se as concentrações de açúcares redutores (AR) e de açúcares redutores totais (ART) do xarope, conforme as metodologias descritas nos itens 3.5.2 e 3.5.3.

Com este procedimento eram obtidos aproximadamente 3 L de xarope, com concentrações de AR e de ART da ordem de 5 g/L e 300 g/L, respectivamente.

3.2.2 Preparo do meio de cultura para cultivo em incubador rotativo

Nos cultivos em incubador rotativo foi utilizado um meio de cultura líquido com a seguinte composição :

Açúcares redutores totais (ART)	20 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/L
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,78 g/L
KH ₂ PO ₄	3,50 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/L
Extrato de levedura	0,1 g/L

Os nutrientes eram dissolvidos em água destilada e o volume de xarope necessário para se ter a concentração de açúcares redutores totais de 20 g/L no meio de cultura, calculado com base na concentração de ART do xarope determinada anteriormente, era adicionado à solução. O pH era ajustado para 5,0 e o meio era distribuído em vários erlenmeyers de 1 L, colocando-se 200 mL de meio em cada um. Os erlenmeyers eram fechados com rodilhões de algodão e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

Nos ensaios com diferentes condições de preparo do inóculo (ensaios do grupo G), o pH do meio de cultura para cultivo em incubador rotativo era ajustado para um valor diferente, conforme descrito no item 3.3.3c.

3.2.3 Preparo do meio de cultura para cultivo em fermentador

Foram realizados ensaios em fermentador, com concentração inicial de substrato (S₀) de 20 g/L ou de 40 g/L. Nos ensaios a 20 g/L, foi utilizado um meio de cultura com a mesma composição do meio

empregado nos cultivos em incubador rotativo. Nos ensaios a 40 g/L, as concentrações de todos os nutrientes foram duplicadas.

O meio de cultura era preparado dissolvendo-se os nutrientes em água destilada e adicionando-se o volume de xarope necessário para se ter a concentração inicial de substrato desejada. Ajustava-se o pH para 4,0 e adicionava-se um antiespumante à base de silicone (polidimetilsiloxano, da Daltomare Química), na proporção de 0,08 mL de antiespumante por litro de meio de cultura. Colocavam-se 10 L do meio em um balão de 12 L, fechando-o com rodilhão de algodão e esterilizando-o em autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

3.3 Preparo do inóculo e condições dos ensaios realizados

3.3.1 Preparo da suspensão de esporos

Em todos os ensaios era necessário o preparo de uma suspensão concentrada de esporos. Essa suspensão era preparada da seguinte forma :

- a) Fazia-se um repique do microrganismo conservado nos tubos de ensaio contendo meio Czapek (cultura estoque), descrito no item 3.1.1 , para outros tubos de ensaio, utilizando-se uma alça metálica;
- b) Os tubos eram incubados a 30 °C por 4 dias;
- c) Em cada tubo de ensaio contendo esporos eram adicionados, assepticamente, 3 mL de água destilada esterilizada;

- d) Os tubos eram agitados para a suspensão dos esporos;
- e) O conteúdo de cada tubo era transferido, assepticamente, para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Czapek;
- f) Os erlenmeyers eram incubados a 30 °C por 6 dias, para a esporulação do microrganismo sobre a superfície do meio de cultura;
- g) Após este período, em cada erlenmeyer eram adicionados 50 mL de uma solução de Tween 40 (Atlas Chemical Industries, Inc.), na concentração de 15 mg/L, e mais um conjunto de pérolas de vidro;
- h) Procedia-se a uma agitação manual por 1 minuto;
- i) Os conteúdos de vários erlenmeyers eram reunidos em um erlenmeyer vazio e esterilizado;
- j) Homogeneizava-se o conteúdo deste erlenmeyer por meio de uma agitação vigorosa e retirava-se uma alíquota da suspensão para a contagem de esporos, como descrito no item 3.3.2.

Nos ensaios I-1, I-2, I-3, F20-1, F20-2, F20-3, F40-1, F40-2 e F40-3 foi preparada uma grande quantidade de suspensão de esporos, a qual foi conservada sob congelamento a -18 °C. Essa suspensão foi preparada da mesma forma descrita acima, exceto pelo fato de ter sido utilizada uma solução de glicerol a 20 % para a suspensão dos esporos, ao invés da solução de Tween 40. O glicerol é um crioprotetor, que auxilia na conservação dos esporos sob congelamento (ONIONS, 1971).

A figura 3.1 mostra o esquema de preparo da suspensão de esporos.

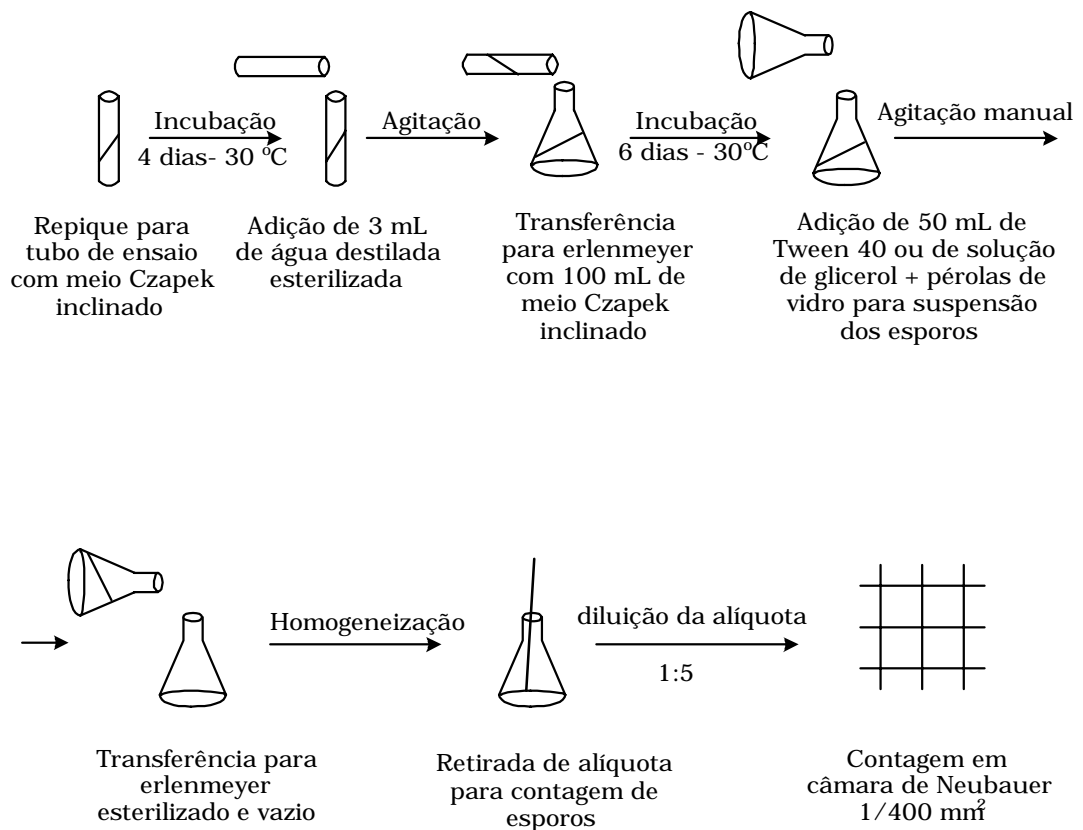


Figura 3.1 Esquema de preparo da suspensão de esporos.

3.3.2 Determinação da concentração de esporos da suspensão

A partir da alíquota de suspensão de esporos coletada, era determinada a concentração de esporos na suspensão, da seguinte forma :

- A alíquota coletada era diluída em tubo de ensaio, na proporção de 1:5 com água destilada;
- A amostra diluída era homogeneizada por agitação em vórtice;

c) Preparava-se a câmara de Neubauer $1/400 \text{ mm}^2$, composta por dois reticulados, com a amostra diluída;

d) A câmara era levada ao microscópio óptico (Leitz Wetzlar) e procedia-se à contagem, utilizando-se um aumento de 400 vezes (objetiva de 40 vezes e ocular de 10 vezes);

e) A contagem era realizada em 8 campos uniformemente distribuídos por um dos reticulados da câmara, como mostra a figura 3.2 ;

f) Repetia-se a contagem para o segundo reticulado da câmara.

Dessa forma, eram contados um total de 16 campos, procurando-se manter o número total de esporos contados superior a 500, para se ter uma boa precisão nos resultados, conforme recomendação de DACIE; LEWIS (1970).

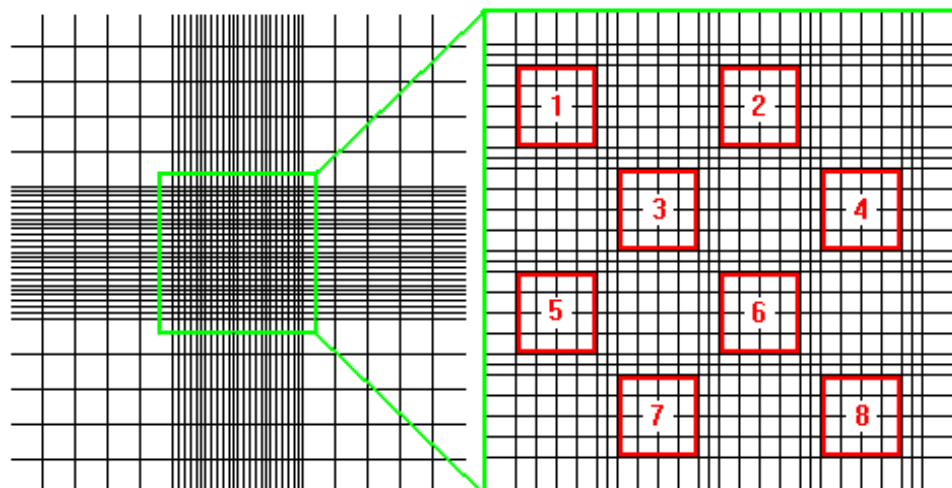


Figura 3.2 Esquema da câmara de Neubauer $1/400 \text{ mm}^2$, com destaque para o reticulado central.

Cada campo numerado na figura 3.2 possui uma área de $1/25 \text{ mm}^2$ e é composto por 16 campos menores de $1/400 \text{ mm}^2$.

O cálculo da concentração de esporos na suspensão era realizado da seguinte forma :

$$C_{susp} = \frac{D_a \cdot \bar{N}}{V_{campo}} \quad (3.1)$$

onde :

C_{susp} = Concentração de esporos na suspensão (esp/mL);

D_a = Fator de diluição ($D = 5$);

\bar{N} = Número médio de esporos nos campos de $1/25 \text{ mm}^2$;

V_{campo} = Volume de um campo de área $1/25 \text{ mm}^2$ e espessura de $0,1 \text{ mm}$ de filme líquido ($V_{campo} = 4 \times 10^{-6} \text{ mL}$).

3.3.3 Procedimento para o preparo do inóculo e condições dos ensaios realizados

Nos ensaios realizados, o inóculo era preparado partindo-se da suspensão de esporos descrita anteriormente, cuja concentração era determinada conforme o item 3.3.2.

A forma de preparo do inóculo variava de acordo com o grupo de ensaios realizados. Foram realizados quatro grupos de ensaios (Grupos I, F20, F40 e G), cujos objetivos são mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Resumo dos objetivos dos grupos de ensaios realizados.

Grupo	Ensaio	Condições	Objetivo
I	I-1 I-2 I-3	Incubador Rotativo 200 rpm 35 °C	Determinar a influência da concentração de esporos na síntese de glicoamilase em incubador rotativo. Ensaio com concentração inicial de substrato de 20 g/L.
F20	F20-1 F20-2 F20-3	Fermentador 700 rpm 1 vvm 35 °C pH 4,0	Determinar a influência da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo na síntese de glicoamilase em fermentador. Ensaio com concentração inicial de substrato de 20 g/L.
F40	F40-1 F40-2 F40-3 F40-4 F40-5 F40-6	Fermentador 700 rpm 1 vvm 35 °C pH 4,0	Determinar a influência da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo na síntese de glicoamilase em fermentador. Ensaio com concentração inicial de substrato de 40 g/L.
G	G-1 G-2 G-3 G-4 G-5 G-6 G-7 G-8	Fermentador 700 rpm 1 vvm 35 °C pH 4,0	Determinar a influência da forma de preparo do inóculo na morfologia obtida e na produção de glicoamilase em fermentador. Ensaio com concentração inicial de substrato de 20 g/L.

a. Ensaio realizado em incubador rotativo (Grupo I)

Nos ensaios do grupo I, realizados em incubador rotativo (ensaio I-1, I-2 e I-3), o inóculo consistiu da própria suspensão de esporos. Com uma pipeta graduada (de 1, 5 ou 10 mL) e esterilizada, inoculavam-se vários frascos de 1 L, contendo 200 mL de meio de cultura cada um, com um certo volume da suspensão de esporos, de forma a se ter a concentração de esporos desejada nos frascos. Para

cada ensaio foi estudada uma concentração de esporos diferente. O volume de suspensão a ser inoculado em cada frasco era calculado da seguinte forma :

$$V_{susp} = \frac{V_m C_{esp}}{C_{susp} - C_{esp}} \quad (3.2)$$

onde :

C_{esp} = Concentração de esporos nos frascos do incubador rotativo (esp/mL);

C_{susp} = Concentração de esporos da suspensão determinada conforme descrito no item 3.3.2 (esp/mL).

V_m = Volume de meio de cultura em cada frasco (200 mL);

V_{susp} = Volume da suspensão de esporos utilizado para a inoculação dos frascos (mL);

No presente trabalho, será definida como densidade ou tamanho de inóculo, a concentração de esporos utilizada nos cultivos em incubador rotativo (C_{esp}).

Os frascos foram cultivados em incubador rotativo (New Brunswick Scientific Co., modelo G-25) à temperatura de 35 °C e rotação de 200 rpm. Periodicamente, um dos frascos era retirado para as análises, em que, após a medida do pH, eram dosadas a concentração de açúcares redutores (AR), a concentração de açúcares redutores totais (ART), a atividade enzimática (A) e a concentração celular (X), como descrito no item 3.5. Media-se, ainda, o diâmetro médio dos “pellets” presentes na amostra. Também era realizada a

caracterização morfológica do microrganismo, por meio de observações microscópicas e fotografias.

A concentração de esporos da suspensão (C_{susp}), o volume de suspensão (V_{susp}) e a densidade de inóculo (C_{esp}) utilizado em cada ensaio do grupo I são mostrados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 Densidade de inóculo (C_{esp}) nos ensaios do grupo I.

Ensaio	C_{susp} (esp/mL)	V_{susp} (mL)	C_{esp} (esp/mL)
I-1	$1,9 \times 10^7$ (*)	0,1	$9,5 \times 10^3$
I-2	$1,9 \times 10^7$ (*)	1,0	$9,5 \times 10^4$
I-3	$1,9 \times 10^7$ (*)	10	$9,5 \times 10^5$

(*) Suspensão preparada com glicerol, ao invés de Tween 40, como descrito no item 3.3.1.

A figura 3.3 apresenta um esquema dos ensaios realizados em incubador rotativo (grupo I).

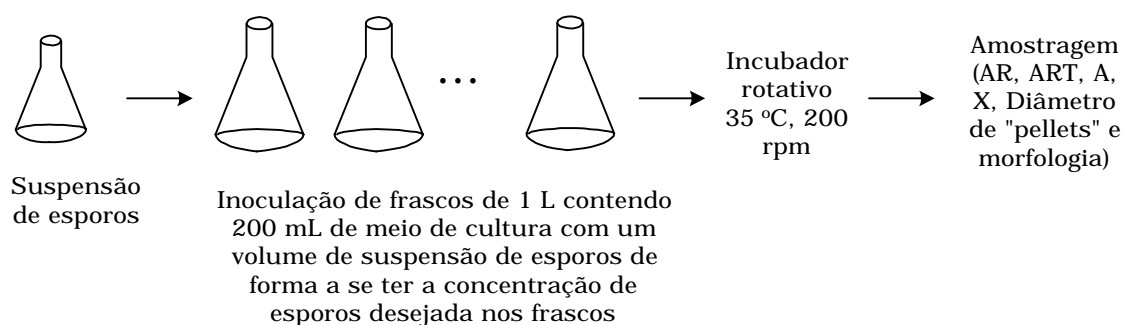


Figura 3.3 Esquema dos ensaios realizados em incubador rotativo (Grupo I).

- b. Ensaios realizados em fermentador, com inóculo pré-cultivado em incubador rotativo (Grupos F20 e F40)

Nos ensaios dos grupos F20 e F40, realizados em fermentador, o inóculo consistiu de uma suspensão de células pré-cultivadas em incubador rotativo. Essa suspensão de células era preparada da seguinte forma :

a) Inoculavam-se 6 frascos de 1 L, contendo 200 mL de meio de cultura cada um, preparado conforme o item 3.2.2, com um volume da suspensão de esporos preparada como descrito no item 3.3.1. Esse volume era calculado de forma a se ter a concentração de esporos desejada nos frascos, definida como sendo a densidade ou tamanho de inóculo, de acordo com a equação 3.2;

b) Os frascos eram cultivados em incubador rotativo por 24 horas, a 200 rpm e 35 °C;

c) Reuniam-se os conteúdos de 5 frascos, perfazendo um total de 1 L de inóculo, que era utilizado para a inoculação de 9 L de meio de cultura, transferidos previamente ao fermentador com a devida assepsia;

d) O sexto frasco era utilizado para a determinação das características do inóculo (24 horas de cultivo em incubador rotativo, nas condições estabelecidas). Para isso eram feitas, conforme descrito no item 3.5, dosagens de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), atividade enzimática (A) e concentração celular (X). Além

destas dosagens, efetuavam-se as medidas de pH e do diâmetro médio dos “pellets” presentes no inóculo. A caracterização morfológica era realizada através de observações microscópicas e fotos.

Os ensaios em fermentador foram conduzidos a pH 4,0 , temperatura de 35 °C, agitação de 700 rpm, aeração de 10 L/min (1 vvm = 1 volume de ar por volume de meio por minuto) e sobrepessão de 0,2 Kgf/cm². As amostragens foram realizadas periodicamente, para a determinação das concentrações de AR, ART, atividade enzimática, concentração celular e checagem do valor do pH, conforme descrito no item 3.5. Nos ensaios do grupo F20, empregou-se uma concentração inicial de substrato (S_0) de 20 g/L e nos ensaios do grupo F40, empregou-se $S_0 = 40$ g/L.

A concentração de esporos da suspensão (C_{susp}) , o volume de suspensão (V_{susp}) e a densidade de inóculo (C_{esp}) utilizada em cada ensaio dos grupos F20 e F40 são mostrados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Densidade de inóculo (C_{esp}) nos ensaios dos grupos F20 e F40.

Ensaio	C_{susp} (esp/mL)	V_{susp} (mL)	C_{esp} (esp/mL)
F20-1	$1,9 \times 10^7$ (*)	0,1	$9,5 \times 10^3$
F20-2	$1,9 \times 10^7$ (*)	1,0	$9,5 \times 10^4$
F20-3	$1,9 \times 10^7$ (*)	10	$9,5 \times 10^5$
F40-1	$1,9 \times 10^7$ (*)	0,1	$9,5 \times 10^3$
F40-2	$1,9 \times 10^7$ (*)	1,0	$9,5 \times 10^4$
F40-3	$1,9 \times 10^7$ (*)	10	$9,5 \times 10^5$
F40-4	$8,8 \times 10^7$	0,2	$8,8 \times 10^4$
F40-5	$8,8 \times 10^7$	12	$5,0 \times 10^6$
F40-6	$8,8 \times 10^7$	50	$1,8 \times 10^7$

(*) Suspensão preparada com glicerol, ao invés de Tween 40, como descrito no item 3.3.1.

A figura 3.4 apresenta um esquema do preparo do inóculo e das condições de cultivo nos ensaios dos grupos F20 e F40.

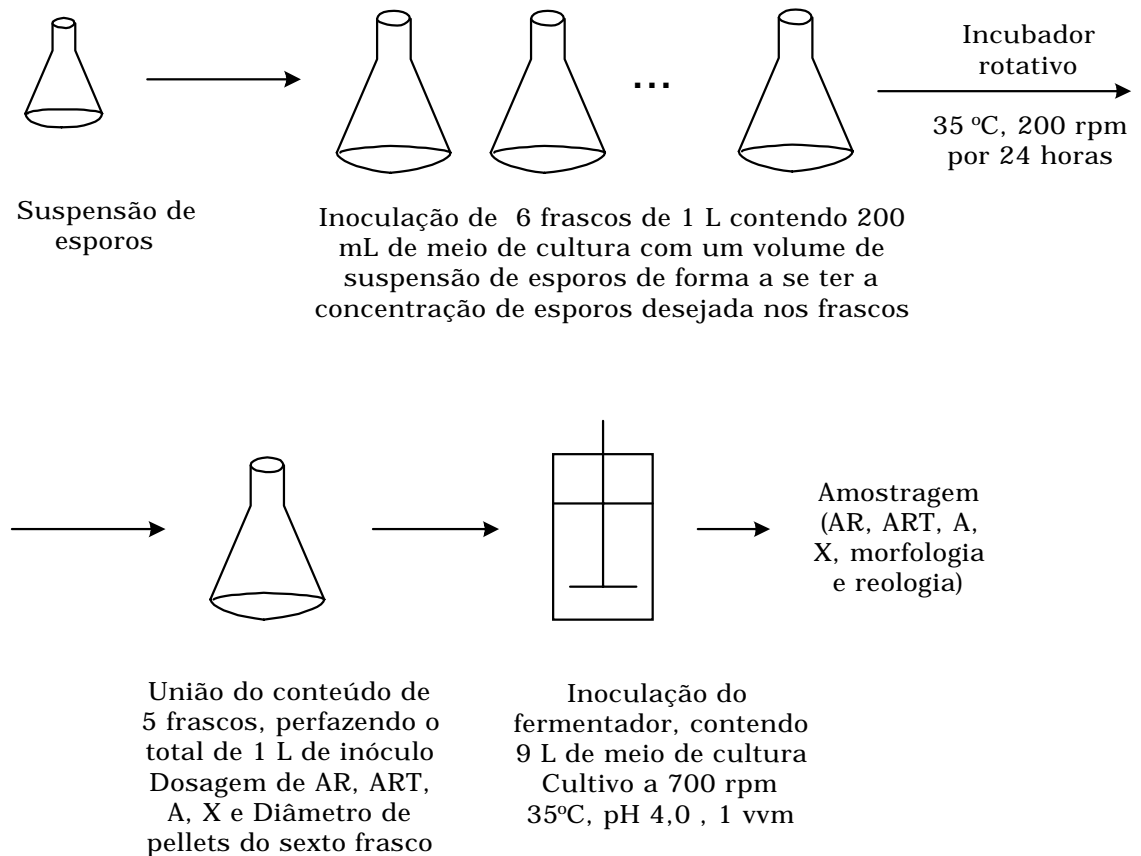


Figura 3.4 Esquema dos ensaios realizados em fermentador (Grupos F20 e F40).

- c. Ensaios realizados em fermentador, variando-se a forma de preparo do inóculo (Grupo G)

Nos ensaios do grupo G, realizados em fermentador, foi variada a forma de preparo do inóculo para o fermentador, de forma a se obter diferentes morfologias e visando-se a otimização do inóculo. Os inóculos

foram preparados da seguinte forma:

Ensaio G-1, G-2 e G-3

Nestes ensaios, foi testada a técnica proposta por RUOHANG; WEBB (1995), que cultivaram *Aspergillus awamori* em duas etapas: uma primeira etapa de germinação de esporos e uma segunda, de crescimento e produção de glicoamilase. Estes autores realizaram a etapa de germinação em fermentador, utilizando apenas 2 L de meio de cultura, sem aeração, a 900 rpm e pH 2,5. A etapa de crescimento e produção foi realizada completando-se o volume no reator para 10 L e ajustando-se as condições de cultivo (600 rpm, 0,75 vvm e pH 4,4). O baixo valor de pH utilizado na etapa de germinação tinha por finalidade evitar a aglomeração de esporos e a formação de “pellets”. No entanto, estes autores estudaram apenas as características reológicas do caldo de fermentação, não fornecendo dados sobre a produção de glicoamilase.

Assim, os ensaios G-1, G-2 e G-3 foram realizados em fermentador, com concentração inicial de substrato de 20 g/L, em duas etapas: a etapa de germinação e a de crescimento. Para isso, foi preparada uma suspensão de esporos, conforme descrito no item 3.3.1, com concentração de $5,3 \times 10^7$ esp/mL.

No ensaio G-1, um volume de 17 mL desta suspensão foi adicionado a um erlenmeyer contendo 1 L de meio de cultura, sendo

que logo após esta adição, a suspensão de esporos resultante foi utilizada para inocular 9 L de meio de cultura, transferidos previamente para o fermentador. A concentração de esporos nos 10 L de volume de reação em fermentador foi a seguinte :

$$C_{ferm} = \frac{C_{susp} V_{susp}}{V_{ferm}} \quad (3.3)$$

onde :

C_{ferm} = Concentração de esporos no fermentador (esp/mL);

C_{susp} = Concentração da suspensão de esporos (esp/mL);

V_{susp} = Volume da suspensão utilizado (17 mL);

V_{ferm} = Volume útil do fermentador (10 L).

Dessa forma, a concentração de esporos nos 10 L de meio de cultura iniciais (C_{ferm}) foi de $9,0 \times 10^4$ esp/mL.

No ensaio G-1 , tanto a etapa de germinação como a etapa de crescimento foram realizadas no fermentador, ambas nas mesmas condições : agitação de 700 rpm , pH 4,0 , aeração de 10 L/min (1 vvm), sobrepressão de 0,2 Kgf/cm² e temperatura de 35 °C. A etapa de germinação foi considerada como sendo as sete primeiras horas de cultivo, tempo necessário para o início da germinação de esporos, estabelecido previamente em incubador rotativo.

No ensaio G-2, a etapa de germinação foi realizada inoculando-se 2 L de meio de cultura, transferidos previamente ao fermentador, com a mesma quantidade da suspensão de esporos utilizada no ensaio G-1 (17 mL). A germinação foi realizada por 7 horas,

a pH 2,5 , agitação de 700 rpm , temperatura de 35 °C, sem aeração e sem sobrepressão. Após as 7 horas de germinação, o volume foi completado com meio de cultura para 10 L e as condições de cultivo foram ajustadas para os mesmos valores do ensaio G-1 (pH 4,0 , 700 rpm, 1 vvm, 35 °C), dando-se início à etapa de crescimento. Dessa forma, a concentração de esporos na etapa de germinação do ensaio G-2 foi cinco vezes superior à concentração de esporos no início da etapa de crescimento, após o volume ter sido completado para 10 L.

O ensaio G-3 foi realizado da mesma forma que o ensaio G-2, exceto pelo fato de ter sido utilizado pH 5,5 na etapa de germinação dos esporos.

De acordo com os estudos de CARLSEN *et al.* (1996), o baixo valor de pH (2,5) tende a evitar a aglomeração de esporos e a formação de “pellets”, ao passo que o pH mais alto (5,5) favorece a aglomeração de esporos e a formação de “pellets”.

Ensaio G-4, G-5 e G-6

O ensaio G-4, em fermentador, foi realizado preparando-se o inóculo da mesma forma descrita no item 3.3.3b , inoculando-se seis frascos contendo 200 mL de meio de cultura cada um, com 2,4 mL de uma suspensão de esporos ($C_{\text{susp}} = 7,8 \times 10^7$ esp/mL). O pH inicial dos frascos era de 5,0. O cultivo foi realizado em incubador rotativo por 24 horas, a 200 rpm e 35 °C. A suspensão de células obtidas dessa

forma (a partir de 5 frascos, perfazendo 1 L de inóculo) foi utilizada para a inoculação de 9 L de meio de cultura transferidos previamente ao fermentador.

Os ensaios G-5 e G-6 foram realizados da mesma forma que o ensaio G-4, utilizando-se a mesma concentração de esporos. A diferença entre os ensaios está no fato de que, nos ensaios G-5 e G-6, o cultivo em incubador rotativo foi feito por apenas 7 horas, que corresponde ao período de germinação dos esporos, ao invés de 24 horas. No ensaio G-5 a germinação em incubador rotativo foi feita a pH 2,5 e no ensaio G-6 a germinação foi efetuada a pH 5,5. O preparo do meio de cultura para cultivo em incubador rotativo foi realizado como descrito no item 3.2.2 exceto pelo ajuste do pH.

Os ensaios, conduzidos em fermentador, foram realizados nas mesmas condições dos ensaios anteriores (pH 4,0 , 700 rpm, 1 vvm, 35 °C e sobrepessão de 0,2 Kg/cm²), com amostragens periódicas para as análises descritas no item 3.5.

Ensaio G-7 e G-8

O inóculo do ensaio G-7, realizado em fermentador, foi pré-cultivado em incubador rotativo por 24 horas a pH 2,5 (no início do cultivo), agitação de 200 rpm e temperatura de 35 °C. O preparo do inóculo foi realizado da mesma forma que no ensaio G-4, exceto pelo valor inicial do pH.

O inóculo do ensaio G-8 foi preparado inoculando-se os 6 frascos para cultivo em incubador rotativo, com pH inicial de 2,5, com a mesma quantidade de suspensão de esporos utilizada nos outros ensaios do grupo G. O pH foi mantido em 2,5 por 7 horas e, então, ajustado para 4,0, adicionando-se cerca de 0,8 mL de solução de NaOH 2N. O cultivo foi realizado em incubador rotativo por mais 7 horas e, então, os conteúdos de 5 frascos foram reunidos, perfazendo um total de 1 L de inóculo, o qual foi utilizado para a inoculação do fermentador. O objetivo deste ajuste de pH foi a obtenção de um inóculo com pH próximo de 4,0 (valor do pH mantido em fermentador), o que evitaria um choque de pH no início do processo e diminuiria a fase *lag*. O tempo total de 14 horas de cultivo em incubador rotativo foi utilizado para a obtenção de um inóculo com maior concentração celular do que o inóculo cultivado por 7 horas. Entretanto, não foi possível a utilização de um tempo maior de cultivo para o inóculo, devido à ocorrência de uma queda significativa do pH a partir de aproximadamente 15 horas de cultivo em incubador rotativo, conforme observado através dos ensaios do grupo I, cujos resultados estão apresentados no item 4.1.1 (ensaios I-1 e I-2).

Conforme descrito, nos ensaios do grupo G, houve variação nas condições de preparo do inóculo para o fermentador. Em alguns ensaios, o fermentador foi inoculado com uma suspensão de células pré-cultivadas em incubador rotativo (ensaios G-4, G-7 e G-8); em

outros, o inóculo do fermentador consistiu de esporos no início da germinação, cultivados durante 7 horas em incubador rotativo (ensaios G-5 e G-6) ou no próprio fermentador (ensaios G-2 e G-3). No ensaio G-1, o fermentador foi inoculado diretamente com esporos.

Por este motivo, não foi possível fixar a concentração de esporos no preparo do inóculo para estes ensaios. Assim, procurou-se fixar o número total de esporos do inóculo de cada ensaio.

Nos ensaios G-1, G-2 e G-3 utilizaram-se 17 mL de uma suspensão de esporos contendo $5,3 \times 10^7$ esp/mL, o que corresponde a um total de $9,0 \times 10^8$ esporos.

Nos ensaios G-4, G-5, G-6, G-7 e G-8, foram inoculados 5 frascos para cada ensaio, com 2,4 mL de suspensão de esporos cada um (um total de 12 mL da suspensão de esporos por ensaio). Essa suspensão tinha a concentração de $7,8 \times 10^7$ esp/mL e, dessa forma, o número total de esporos utilizado em cada um desses ensaios foi de $9,2 \times 10^8$ esporos.

A concentração de esporos da suspensão (C_{susp}), o volume de suspensão utilizado (V_{susp}) e a concentração de esporos no inóculo (C_{ferm} ou C_{esp}) utilizada em cada ensaio do grupo G são mostrados na tabela 3.4. Os valores de C_{esp} e C_{ferm} , foram calculados com base nas equações 3.2 e 3.3, respectivamente.

Tabela 3.4 Concentração de esporos no inóculo nos ensaios do grupo G.

Ensaio	C _{susp} (esp/mL)	V _{susp} (mL)	C _{ferm} (esp/mL)	C _{esp} (esp/mL)
G-1	5,3 x 10 ⁷	17	9,0 x 10 ⁴	-----
G-2	5,3 x 10 ⁷	17	9,0 x 10 ⁴ (*)	-----
G-3	5,3 x 10 ⁷	17	9,0 x 10 ⁴ (*)	-----
G-4	7,8 x 10 ⁷	2,4	-----	9,2 x 10 ⁵
G-5	7,8 x 10 ⁷	2,4	-----	9,2 x 10 ⁵
G-6	7,8 x 10 ⁷	2,4	-----	9,2 x 10 ⁵
G-7	7,8 x 10 ⁷	2,4	-----	9,2 x 10 ⁵
G-8	7,8 x 10 ⁷	2,4	-----	9,2 x 10 ⁵

(*) Concentração de esporos no fermentador após o volume ter sido completado para 10 L.

As figuras 3.5, 3.6 e 3.7 apresentam os esquemas de preparo do inóculo e das condições de cultivo nos ensaios do grupo G.

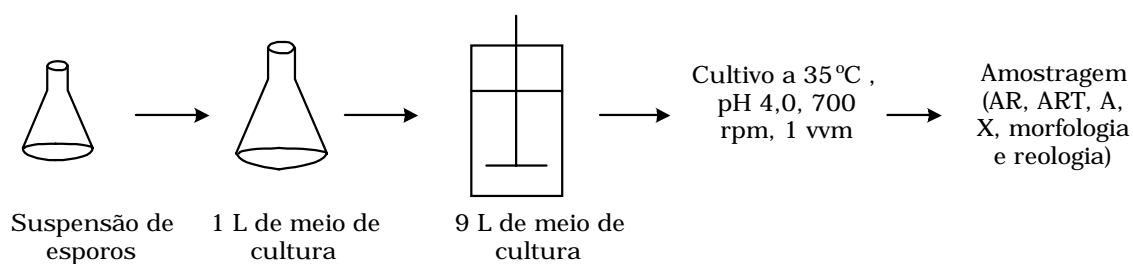


Figura 3.5 Esquema do ensaio G-1.

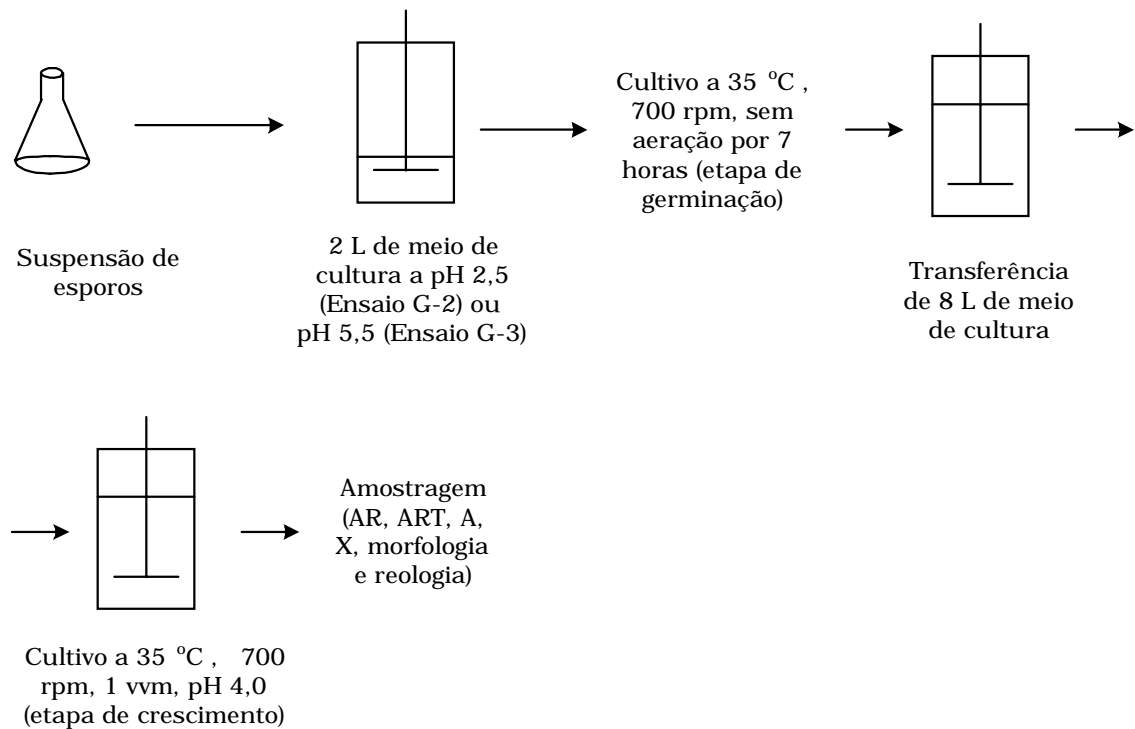


Figura 3.6 Esquema dos ensaios G-2 e G-3.

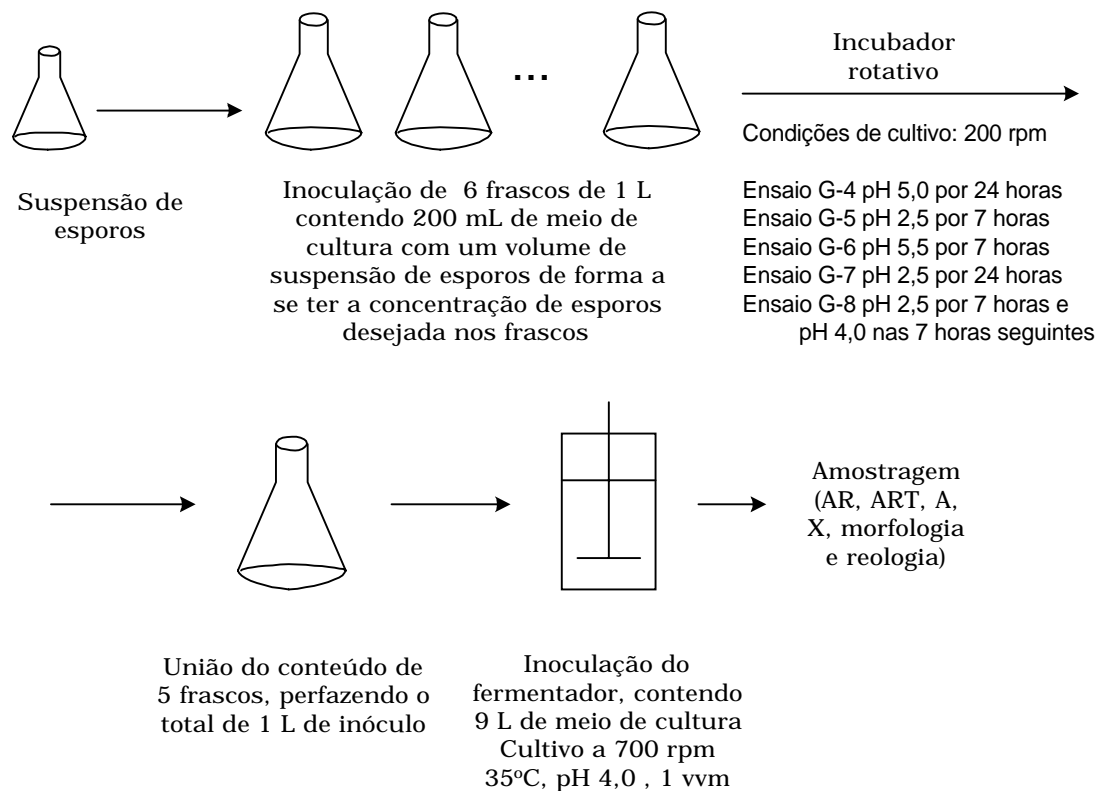


Figura 3.7 Esquema dos ensaios G-4, G-5, G-6, G-7 e G-8.

3.4 Preparo dos fermentadores

Nos ensaios realizados foram utilizados três fermentadores Biolafitte de 15 L de capacidade total, com um volume útil de 10 L. Estes fermentadores possuem diâmetro interno de 20 cm e altura de 48 cm. Cada fermentador é equipado com três turbinas tipo “flat-blade”, com quatro pás cada uma, possuindo quatro chicanas, a fim de se evitar a formação de vórtice. O diâmetro das turbinas é de 8,9 cm. A primeira turbina é posicionada no fundo do tanque, logo acima do dispersor de ar. As outras turbinas mantêm entre si uma distância de 8,9 cm. A aeração é realizada por meio de um dispersor de ar tipo cruzeta. Os fermentadores são equipados com sensores de temperatura, pressão interna, oxigênio dissolvido e pH. Devido a problemas nas sondas de oxigênio, não foi possível o acompanhamento do oxigênio dissolvido durante os ensaios. Existem filtros absolutos para a esterilização do ar na entrada e dos gases na saída do fermentador. Um condensador é acoplado à saída de gases, antes do filtro, para evitar que a umidade seja arrastada pela corrente gasosa.

Cada fermentador é acoplado a um armário de controle, onde dispõe-se de módulos de medida e de controle (medida e controle das temperaturas de esterilização e fermentação, medida e controle do pH, medida e fixação da frequência de agitação, medida e fixação da vazão de ar, medida da pressão interna do fermentador).

O controle do pH é realizado pela adição de uma solução de NaOH 2N, por meio de uma bomba peristáltica acionada pelo sistema de controle de pH. Após o término da fonte de carbono, o controle do pH é realizado pela adição de uma solução de HCl 2N, por meio de uma bomba peristáltica acionada automaticamente pelo sistema de medida e controle de pH.

3.4.1 Esterilização dos fermentadores

A esterilização dos fermentadores era realizada da seguinte forma :

- a) Inicialmente, eram acoplados ao fermentador os eletrodos de pH, temperatura e pressão interna;
- b) O eletrodo de temperatura era conectado ao armário;
- c) Colocavam-se cerca de 8 L de água destilada no fermentador;
- d) Iniciava-se o aquecimento, com a passagem de vapor pelo interior das chicanas (vapor indireto), mantendo-se uma frequência de agitação de 300 rpm ;
- e) Quando era atingida a ebulição, introduzia-se vapor direto pelo fundo do tanque, através do dispersor de ar, por 10 minutos;
- f) Introduzia-se, então, vapor direto pela cabeça do tanque por mais 10 minutos, esterilizando-se, dessa forma, as tubulações de entrada e saída do reator. Neste período mantinham-se abertas as saídas do fermentador, de forma a eliminar o ar contido em seu interior;

g) Após este período, fechavam-se todas as saídas do fermentador para que ocorresse o aumento da pressão interna e a temperatura atingisse 120 °C, a qual era mantida por 20 minutos;

h) Fechavam-se, então, as entradas de vapor e começava-se a operação de resfriamento do tanque, passando-se água pelas chicanas;

i) A fim de se evitar a formação de vácuo no interior do tanque, introduzia-se ar pelo filtro de entrada, possibilitando também a secagem dos filtros de entrada e saída;

j) Após a temperatura ser estabilizada em 35 °C, desligavam-se os sistemas de controle e o fermentador permanecia hermeticamente fechado até o início do ensaio.

3.4.2 Início do ensaio

No início do ensaio procedia-se da seguinte forma :

a) Os eletrodos de pH e pressão interna eram conectados ao armário de controle;

b) Calibrava-se o eletrodo de pressão;

c) Drenava-se a água contida no fermentador e transferia-se assepticamente 9 L de meio de cultura para o interior do fermentador (exceto nos ensaios G-2 e G-3, como foi descrito no item 3.3.3c);

d) Calibrava-se o eletrodo de pH;

e) Acoplavam-se frascos contendo soluções de NaOH 2N, HCl 2N e antiespumante (emulsão de polidimetilsiloxano, diluída na proporção

de 1:2 com água destilada) às respectivas bombas peristálticas. Essas soluções eram previamente esterilizadas em autoclave a 120 °C por 20 minutos;

f) Ligava-se o sistema de controle de temperatura e iniciava-se a agitação e a aeração do líquido;

g) Após a saturação do líquido com oxigênio e a estabilização da temperatura em 35 °C, procedia-se à inoculação do fermentador, com o inóculo preparado conforme descrito no item 3.3;

h) O cultivo era realizado nas condições descritas no item 3.3.3, com amostragens periódicas para as dosagens descritas no item 3.5.

3.5 Metodologia analítica

As amostras retiradas periodicamente do fermentador ou do incubador rotativo eram imediatamente resfriadas em banho de água e gelo, a fim de retardar o metabolismo microbiano e a atividade enzimática. Essas amostras eram tratadas, de forma a se determinar o pH, a concentração de açúcares redutores (AR), a concentração de açúcares redutores totais (ART), a atividade enzimática (A) e a concentração celular (X).

Em alguns ensaios foi feita a caracterização reológica do caldo de fermentação e em todos os ensaios foi analisada a morfologia de crescimento do microrganismo, por meio de fotos (exceto nos ensaios G-4, G-5 e G-6) e observações microscópicas. Nos ensaios em incubador

rotativo (ensaios I-1, I-2 e I-3), em que o crescimento ocorreu na forma de “pellets”, foi feita a medição do diâmetro médio dos “pellets”. A figura 3.8 mostra um esquema da metodologia analítica utilizada nos ensaios.

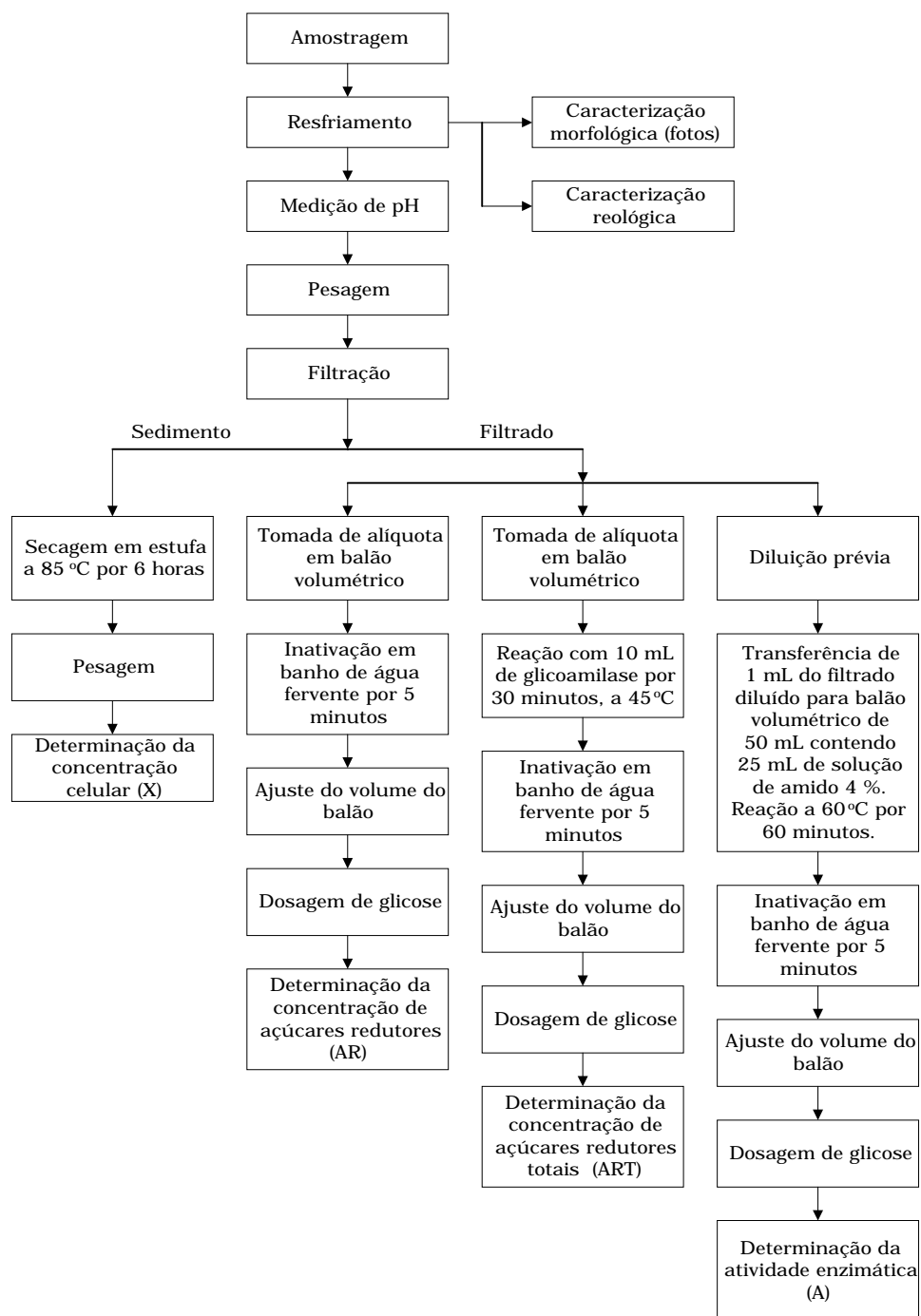


Figura 3.8 Esquema da metodologia analítica utilizada no tratamento das amostras.

3.5.1 Determinação da concentração celular (X)

A concentração celular era determinada da seguinte forma :

a) Após o resfriamento, era medido o pH da amostra e uma certa quantidade de amostra era pesada em balança analítica digital (Mettler, modelo AE160);

b) A amostra era filtrada a vácuo, utilizando-se papel de filtro quantitativo Framex 389², previamente pesado;

c) O filtrado era reservado para as dosagens de AR, ART e atividade enzimática. O sedimento retido no papel de filtro era lavado com água destilada;

d) O papel contendo as células era levado a uma estufa e mantido a 85 °C por 6 horas, tempo suficiente para a obtenção de massa constante;

e) O papel contendo as células secas era resfriado dentro de um dessecador durante cerca de 15 minutos;

f) O papel com as células era pesado em balança analítica;

g) A concentração celular, expressa em termos de massa seca, era calculada da seguinte forma :

$$X = \frac{\left[M_{pc} - M_p \left(1 - \frac{U_p}{100} \right) \right] \cdot d}{M_a} \quad (3.4)$$

onde :

d = Densidade da amostra (considerada 1000 g/L).

M_a = Massa da amostra (g);

M_p = Massa do papel de filtro (g);

M_{pc} = Massa do papel contendo a massa seca de células (g);

U_p = Teor de umidade do papel de filtro (%);

X = Concentração celular, em termos de massa seca (g/L);

3.5.2 Determinação da concentração de açúcares redutores (AR)

A concentração de AR da amostra era determinada a partir do filtrado obtido conforme descrito no item 3.5.1, da seguinte forma :

a) Colocava-se uma certa quantidade de água destilada em um balão volumétrico, de volume previamente definido, e mantinha-se este balão em um banho de água fervente por cerca de 15 minutos, antes da retirada da amostra;

b) Transferia-se um certo volume do filtrado da amostra para o balão volumétrico, utilizando-se um pipetador automático;

c) Mantinha-se o balão no banho de água fervente por 5 minutos para a inativação da enzima presente na amostra;

d) Resfriava-se o balão e completava-se o volume.

A concentração de glicose era determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase, conforme descrito no item 3.5.7.

Os volumes do balão e do filtrado dependiam do instante de cultivo e eram definidos de forma que a concentração de glicose no balão estivesse entre 0,2 g/L e 1,0 g/L (faixa de validade da curva de

calibração, no método da glicose-oxidase empregado).

A concentração de AR era calculada da seguinte forma :

$$AR = G \cdot D_a \quad (3.5)$$

onde :

AR = Concentração de açúcares redutores (g/L);

D_a = Fator de diluição da amostra (relação entre o volume do balão volumétrico e o volume do filtrado utilizado).

G = Concentração de glicose no balão, determinada pelo método da glicose-oxidase (g/L);

3.5.3 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

A concentração de ART era determinada pela dosagem de glicose, após a hidrólise enzimática dos polissacarídeos presentes na amostra. Essa hidrólise era realizada com a utilização de uma solução de glicoamilase. Eram utilizados os seguintes reagentes:

Solução de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8

Essa solução era preparada pesando-se 10,5075 g de ácido cítrico monoidratado e dissolvendo-o em 600 mL de água destilada. O pH era ajustado para 4,8 com NaOH 2N e a solução era transferida para um balão volumétrico de 1 L, completando-se o volume com água destilada.

Solução concentrada de glicoamilase

O conteúdo de um frasco com 1 g de glicoamilase liofilizada (Fluka Biochemika) era dissolvido em 200 mL do tampão citrato descrito anteriormente. Essa solução concentrada era armazenada em geladeira.

Solução de glicoamilase para as análises

Era preparada uma solução de glicoamilase, diluindo-se a solução concentrada, descrita anteriormente, em tampão citrato, na proporção de 3:100, de maneira a se ter uma atividade enzimática de 1000 U/L.

Procedimento para a determinação da concentração de ART

Para a determinação da concentração de açúcares redutores totais da amostra era adotado o seguinte procedimento:

a) Em um balão volumétrico de volume previamente estabelecido, pipetava-se um volume determinado do filtrado da amostra;

b) Adicionavam-se 10 mL da solução de glicoamilase, preparada conforme descrito anteriormente, de forma a se ter uma quantidade mínima de 0,194 U de glicoamilase por mg de polissacarídeo a ser hidrolisado (FACCIOTTI, 1986);

c) Colocava-se o balão em um banho termostático a 45 °C por 30 minutos;

d) Após este período, transferia-se o balão para um banho de água fervente por 5 minutos para a inativação da enzima;

e) Resfriava-se o balão e completava-se o seu volume.

A concentração de glicose era determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase, conforme descrito no item 3.5.7.

Os volumes do balão e do filtrado dependiam do instante de cultivo e eram definidos de forma que a concentração de glicose no balão estivesse entre 0,2 g/L e 1,0 g/L (faixa de validade da curva de calibração, no método da glicose-oxidase empregado).

A concentração de ART era determinada da seguinte forma :

$$ART = \frac{0,977(ARM - AR)}{0,9} + AR \quad (3.6)$$

$$ARM = G \cdot D_a \quad (3.7)$$

onde :

AR = Concentração de açúcares redutores inicialmente presentes na amostra, conforme item 3.5.2 (g/L);

ARM = Concentração de açúcares redutores na amostra após a hidrólise (g/L);

ART = Concentração de açúcares redutores totais na amostra (g/L);

D_a = Fator de diluição da amostra (relação entre o volume do balão volumétrico e o volume do filtrado utilizado).

G = Concentração de glicose no balão determinada pelo método da glicose-oxidase, conforme item 3.5.7 (g/L);

0,9 = Fator estequiométrico para conversão de amido em glicose;

0,977 = Fator empírico para a conversão de amido em glicose por meio da hidrólise enzimática, determinado por SCHMIDELL; FERNANDES, (1977).

3.5.4 Determinação da atividade enzimática (A)

Para esta determinação eram preparados os seguintes reagentes:

Solução de tampão acético 0,02M, pH 4,2

Esta solução era preparada adicionando-se 57 mL de ácido acético glacial a 600 mL de água destilada. Ajustava-se o pH para 4,2 com uma solução de NaOH 2N e transferia-se a solução para um balão volumétrico de 1 L, completando-se o volume com água destilada.

Solução de amido 4 %

Esta solução era preparada pesando-se, em um béquer, 40 g de amido solúvel e adicionando-se cerca de 40 mL de água destilada. A suspensão era homogeneizada e adicionada a um béquer contendo 600 mL de água destilada fervente. A solução era fervida por 2 minutos e, então, resfriada sob agitação constante. Adicionavam-se 60 mL do tampão acético descrito anteriormente e transferia-se a solução para um balão volumétrico de 1 L, completando-se o volume com água

destilada.

Procedimento para a determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática da amostra era adotado o seguinte procedimento:

- a) Colocavam-se 25 mL da solução de amido a 4 % em um balão volumétrico de 50 mL, o qual era mantido em um banho termostático a 60 °C por, aproximadamente, 15 minutos antes da retirada da amostra;
- b) Diluía-se convenientemente o filtrado da amostra (diluição prévia), obtido como foi descrito no item 3.5.1;
- c) Adicionava-se 1 mL da amostra diluída ao balão contendo a solução de amido;
- d) Mantinha-se o balão no banho a 60 °C por 1 hora;
- e) Após este período, transferia-se o balão para um banho de água fervente por 5 minutos, a fim de se inativar a enzima;
- f) Resfriava-se o balão e completava-se o seu volume com água destilada;
- g) Determinava-se a concentração de glicose no balão pelo método enzimático da glicose-oxidase, como descrito no item 3.5.7.

A atividade da glicoamilase era calculada da seguinte forma :

$$A = G \cdot D_a - AR \quad (3.8)$$

onde :

A = Atividade de glicoamilase (U/L);

AR = Concentração de açúcares redutores inicialmente presentes na amostra, determinada conforme descrito no item 3.5.2 (g/L).

D_a = Diluição total da amostra (diluição de 50 vezes no balão com amido multiplicada pela diluição prévia da amostra, que é a relação entre o volume do balão volumétrico e o volume do filtrado utilizado);

G = Concentração de glicose no balão, determinada pelo método da glicose-oxidase (g/L);

A diluição era realizada de forma que a concentração de glicose no volume de reação (26 mL) não ultrapassasse 2 g/L, conforme determinado por SCHMIDELL; MENEZES (1986).

A unidade de atividade enzimática foi definida, para a glicoamilase, como sendo a quantidade de enzima que libera 1 g de glicose em 1 hora, nas condições padronizadas (amido em excesso, temperatura de 60 °C e pH 4,2).

3.5.5 Caracterização morfológica

Durante os cultivos eram realizadas observações microscópicas, a fim de se caracterizar morfológicamente o crescimento do microrganismo. As amostras também eram fotografadas, utilizando-se uma câmara fotográfica acoplada a um microscópio óptico (modelo Jenamed 2, da Carl Zeiss Jena).

Nas amostras onde havia a presença de “pellets” (cultivos em incubador rotativo), o diâmetro médio dos mesmos era determinado por meio de uma ocular micrométrica previamente aferida. Eram medidos cerca de 20 “pellets” em cada amostra.

3.5.6 Caracterização reológica do caldo de fermentação

Nos ensaios do grupo G e nos ensaios F40-4, F40-5 e F40-6 foi realizada a caracterização reológica do caldo de fermentação durante o cultivo, utilizando-se um reômetro digital (Brookfield, modelo LV-DVIII). Essa caracterização era realizada na amostra contendo células, logo após sua retirada do fermentador, segundo a metodologia empregada por QUEIROZ (1996).

As medidas foram realizadas utilizando-se “spindles” para pequenas amostras (SSA - “Small Sample Adapter”). Os “spindles” utilizados, de acordo com a faixa de viscosidade do caldo, foram: SSA-ULAdapter (para viscosidades entre 1 e 10 cP), SSA-18/13R (entre 5 e 10.000 cP), SSA-31/13R (entre 50 e 10.000 cP) e SSA-34/13R

(entre 100 e 200.000 cP). Foi adotado o seguinte procedimento:

a) Montava-se o viscosímetro, nivelando-o e acoplando a jaqueta para controle da temperatura a um banho termostático a 35 °C;

b) Colocava-se o “spindle” adequado para a faixa de viscosidade do caldo a ser caracterizado;

c) Colocava-se a amostra no recipiente cilíndrico adequado e acoplava-se este recipiente à jaqueta, mergulhando-se o “spindle” na amostra. O volume de amostra dependia do “spindle” utilizado (16 mL para o “spindle” SSA-ULAdapter, 8 mL para o SSA-18/13R, 8 mL para o SSA-31/13R e 10 mL para o SSA-34/13R);

d) Estabelecia-se uma frequência de rotação (e, conseqüentemente, o gradiente de velocidade) e media-se a tensão de cisalhamento provocada no fluido após a estabilização do aparelho;

e) Repetia-se a determinação para outras frequências de rotação. Foram utilizadas as seguintes frequências : 1, 3, 5, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100, 110, 120, 130, 140, 150 rpm. Para as frequências mais baixas (entre 1 e 50 rpm), o tempo de estabilização do aparelho foi fixado em 1 minuto e para as frequências mais altas (entre 60 e 150 rpm), este tempo foi fixado em 30 segundos.

Com os valores da tensão de cisalhamento em função do gradiente de velocidade eram determinadas as constantes reológicas do caldo de fermentação: K (índice de consistência do fluido) e n (índice de comportamento do escoamento), conforme descrito no item 3.6.3.

3.5.7 Método da glicose-oxidase para a dosagem de glicose

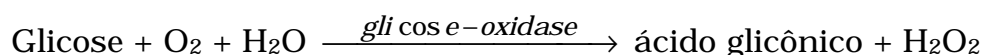
A dosagem de glicose das amostras era realizada pelo método da glicose-oxidase, implantado em um equipamento Technicon Auto-Analyser II. Era empregado um conjunto de reagentes Merck (GOD-PAP) para a dosagem de glicose por este método enzimático. Este conjunto era composto pelos seguintes reagentes :

a) Um frasco contendo 2 mL de solução de enzima glicose-oxidase (Merck, referência 1.14143);

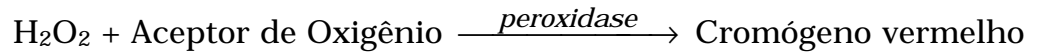
b) Um frasco contendo 500 mL de solução tampão pH 7,2 (Merck, referência 1.14144).

O reativo era preparado, misturando-se os dois frascos descritos acima.

O princípio do método é baseado em técnicas colorimétricas, sendo descrito por BARHAM; TRINDER (1972). Inicialmente, a amostra a ser analisada passa por uma membrana onde é realizada uma diálise, a fim de se eliminar macromoléculas que possam interferir na análise. A glicose que passa pela membrana é oxidada a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio em presença de glicose-oxidase, segundo a seguinte reação :



O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, oxida uma ou mais substâncias chamadas de aceptores de oxigênio, com a formação de um cromógeno vermelho, segundo a seguinte reação :



Existem vários sistemas que podem atuar como aceptor de oxigênio nesta reação. O mais empregado é o sistema que utiliza fenol e 4-aminofenazona. Estas duas substâncias reagem entre si, na presença de peróxido de oxigênio e peroxidase, formando um cromógeno vermelho, a 4-p-benzoquinona-monoimino fenazona. A concentração desta substância, determinada por métodos colorimétricos, é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Utilizavam-se soluções padronizadas de glicose, com concentrações entre 0,2 g/L e 1,0 g/L, para o levantamento de uma curva de calibração relacionando a concentração de cromógeno com a concentração de glicose presente na amostra.

3.6 Tratamento dos resultados

3.6.1 Cálculo das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de glicoamilase

As velocidades específicas são definidas da seguinte forma:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.9)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3.10)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dA}{dt} \quad (3.11)$$

onde :

μ_x = Velocidade específica de crescimento (h^{-1});

μ_s = Velocidade específica de consumo de substrato ($g/(g.h)$);

μ_p = Velocidade específica de produção de glicoamilase ($U/(g.h)$);

A = Atividade enzimática (U/L).

S = Concentração de açúcares redutores totais (g/L);

X = Concentração celular (g/L);

Na fase de crescimento exponencial, a velocidade específica de crescimento atinge o seu valor máximo e o crescimento pode ser representado pelas seguintes equações :

$$X = X_e \cdot e^{\mu_{\max} \cdot (t-t_0)} \quad (3.12)$$

$$\ln X = \ln X_e + \mu_{\max} \cdot (t - t_0) \quad (3.13)$$

onde :

μ_{\max} = Velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1});

t_0 = Instante de início da fase exponencial (h).

X_e = Concentração celular no início da fase exponencial (g/L);

O valor da velocidade específica de crescimento máxima foi estimado com base na equação 3.13. O cálculo das velocidades específicas durante o cultivo foi realizado utilizando-se o “software” “Logiciel de Lissage”, desenvolvido por SIMÕES (1994).

3.6.2 Cálculo dos fatores de conversão e produtividades

Os fatores de conversão e as produtividades foram calculados da seguinte forma :

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3.14)$$

$$Y_{A/s} = \frac{A_m - A_0}{S_0 - S_m} \quad (3.15)$$

$$P_x = \frac{X_f - X_0}{t_f} \quad (3.16)$$

$$P_A = \frac{A_m - A_0}{t_m} \quad (3.17)$$

onde :

A_m = Atividade enzimática máxima (U/L);

A_0 = Atividade enzimática no início do cultivo (U/L);

P_A = Produtividade em glicoamilase (U/(L.h)).

P_x = Produtividade em células (g/(L.h));

S_0 = Concentração de substrato no instante inicial (g/L);

S_f = Concentração de substrato no instante t_f (g/L);

S_m = Concentração de substrato no instante t_m (g/L);

t_f = Instante de término da fonte de carbono (h);

t_m = Instante da atividade enzimática máxima (h);

X_0 = Concentração celular inicial (g/L);

X_f = Concentração celular no instante de término da fonte de carbono (g/L);

$Y_{A/s}$ = Fator de conversão substrato a glicoamilase (U/g);

$Y_{x/s}$ = Fator de conversão substrato a células (g/g);

3.6.3 Cálculo dos parâmetros reológicos

Os parâmetros K e n foram calculados utilizando-se a “Lei de Potência” ou “Lei de Ostwald-Waele”, conforme a equação 3.18.

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (3.18)$$

onde :

τ = Tensão de cisalhamento (dina/cm²);

γ = Gradiente de velocidade (s⁻¹);

K = Índice de consistência (dina.sⁿ/cm² = 100 cP.sⁿ⁻¹);

n = Índice de comportamento do escoamento (adimensional).

A viscosidade aparente do caldo (η_a) é definida pela seguinte equação:

$$\eta_a = \frac{\tau}{\gamma} = K \cdot (\gamma)^{n-1} \quad (3.19)$$

onde: η_a = viscosidade aparente (cP).

Os valores de K e n são obtidos a partir dos valores experimentais de tensão de cisalhamento em função do gradiente de velocidade, determinados através do reômetro, utilizando-se a linearização da equação 3.19 :

$$\log (\eta_a) = \log (K) + (n-1) \log (\gamma) \quad (3.20)$$

4. Resultados e Discussão

Os resultados deste trabalho são apresentados em duas partes: a primeira parte (item 4.1) enfoca a influência da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo (C_{esp}), definida no item 3.3.3, sobre a morfologia obtida em incubador rotativo (morfologia do inóculo) e sobre a produção de glicoamilase em fermentador, em ensaios com concentração inicial de substrato (S_0) de 20 g/L e de 40 g/L. A segunda parte (item 4.2) mostra a influência da forma de preparo do inóculo sobre a produção de glicoamilase em fermentador, em ensaios com concentração inicial de substrato de 20 g/L. São apresentadas apenas as tabelas com os resultados globais dos ensaios. As tabelas contendo todos os resultados experimentais obtidos encontram-se no apêndice.

4.1 Influência da concentração de esporos do inóculo no processo de produção de glicoamilase

4.1.1 Resultados dos ensaios realizados em incubador rotativo (Grupo I)

Conforme descrito no item 3.3.3, na realização destes ensaios, foram utilizadas três concentrações diferentes de esporos na inoculação dos frascos cultivados em incubador rotativo, como mostra a tabela 4.1. O objetivo destes ensaios era a análise da influência da concentração de

esporos na morfologia obtida, no crescimento celular e na produção de glicoamilase em incubador rotativo.

Tabela 4.1 Concentrações de esporos utilizadas nos ensaios I-1, I-2 e I-3.

Ensaio	C_{esp} (esp/mL)
I-1	$9,5 \times 10^3$
I-2	$9,5 \times 10^4$
I-3	$9,5 \times 10^5$

A morfologia obtida nos três ensaios se apresentou predominantemente na forma de “pellets” durante todo o cultivo. O diâmetro de “pellets” aumentou no início, atingindo um valor máximo, o qual permaneceu constante durante o restante do cultivo. Esse aumento no diâmetro de “pellets” no início do cultivo pode ser visto nas figuras 4.2 (ensaio I-2) e 4.3 (ensaio I-3). No entanto, este aumento do diâmetro de “pellets” no início do cultivo não ficou muito claro na análise do ensaio I-1 (figura 4.1).

As dimensões dos “pellets” atingiram praticamente os mesmos valores máximos nos ensaios I-1 e I-3 (em torno de 1 mm), como mostram as figuras 4.1 e 4.3. Pela figura 4.2, pode-se perceber que os “pellets” atingiram um diâmetro máximo maior para o ensaio I-2 (em torno de 1,2 mm) do que para os outros dois ensaios. No entanto, houve muita flutuação nas medições de diâmetros de “pellets” para os ensaios do grupo I, principalmente no caso do ensaio I-1. Deve-se destacar que existem muitas imprecisões na metodologia de medida de diâmetro de

“pellets” utilizada, principalmente em relação ao pequeno número de “pellets” medidos (em torno de 20 “pellets”).

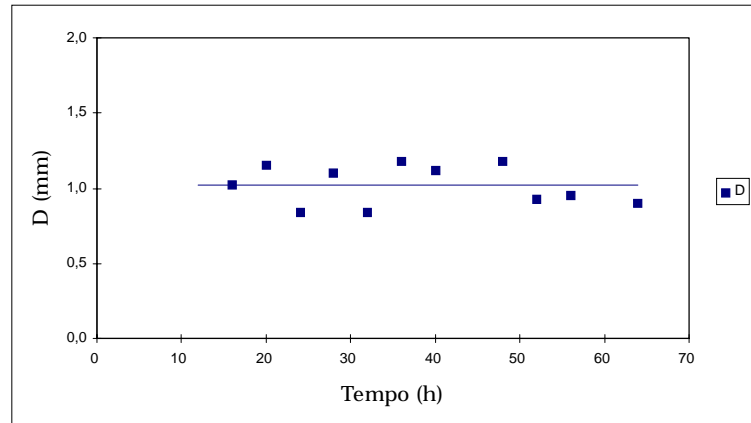


Figura 4.1 Diâmetro de “pellets” durante o ensaio I-1.

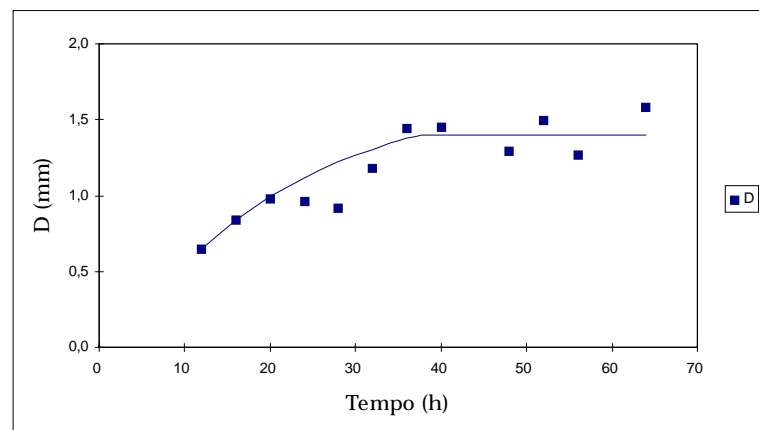


Figura 4.2 Diâmetro de “pellets” durante o ensaio I-2.

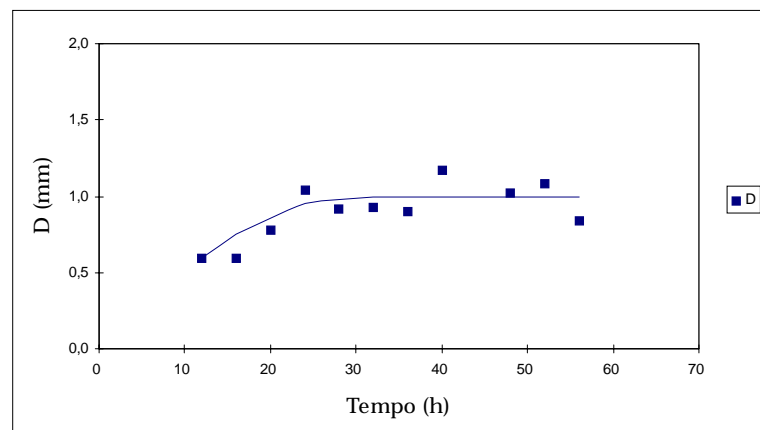


Figura 4.3 Diâmetro de “pellets” durante o ensaio I-3.

As figuras 4.4, 4.5 e 4.6 representam as formas de crescimento obtidas nos ensaios do grupo I, com 20 horas de cultivo em incubador rotativo.

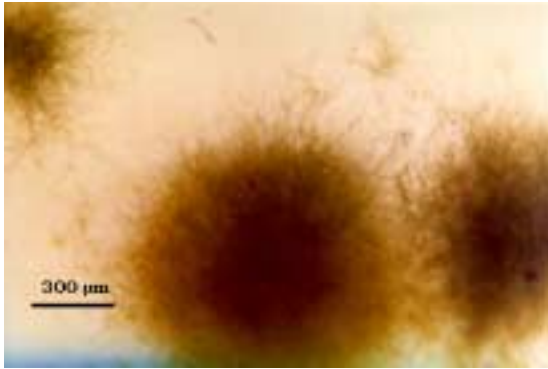


Figura 4.4 “Pellets” obtidos em 20 horas de cultivo no ensaio I-1.



Figura 4.5 “Pellets” obtidos em 20 horas de cultivo no ensaio I-2.

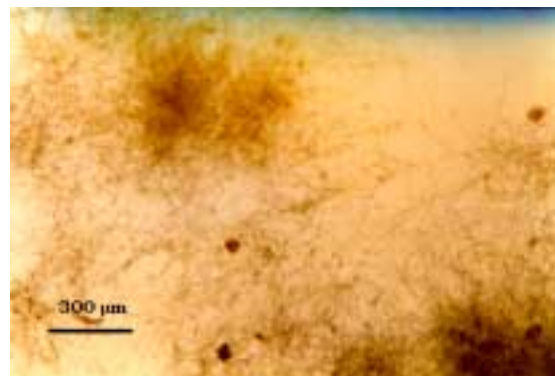


Figura 4.6 “Pellets” e hifas dispersas obtidas em 20 horas de cultivo no ensaio I-3.

As figuras 4.4 e 4.5 mostram um crescimento quase exclusivamente na forma de “pellets” nos ensaios I-1 e I-2. Na figura 4.6 pode-se perceber que, além de “pellets”, existiam algumas hifas dispersas pelo meio de cultura, com o crescimento ocorrendo na forma filamentosa. Assim, para baixas concentrações de esporos no inóculo, como foi o caso dos ensaios I-1 e I-2, o crescimento ocorreu

preferencialmente na forma de “pellets”. Para concentrações mais altas de esporos (ensaio I-3), o crescimento ocorreu como uma combinação de “pellets” e hifas dispersas, embora o crescimento na forma de “pellets” fosse predominante.

O consumo de substrato foi mais rápido no ensaio I-3, onde a fonte de carbono se esgotou em torno de 40 horas de cultivo, devido à maior concentração de esporos utilizada, o que levou a um crescimento mais rápido no início do cultivo, como pode-se perceber pelas curvas de consumo de substrato, mostradas nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9. Nos ensaios I-1 e I-2, o término da fonte de carbono ocorreu em torno de 50 horas de cultivo.

Os resultados obtidos nos ensaios do grupo I mostram diferenças significativas, tanto no crescimento celular quanto na produção de glicoamilase, em incubador rotativo. As figuras 4.10, 4.11 e 4.12 apresentam as cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase nos ensaios do grupo I, além dos perfis de pH obtidos durante estes ensaios. A tabela 4.2 apresenta um resumo dos resultados obtidos nestes três ensaios, onde as produtividades e os fatores de conversão foram calculados conforme as definições apresentadas no item 3.6.2.

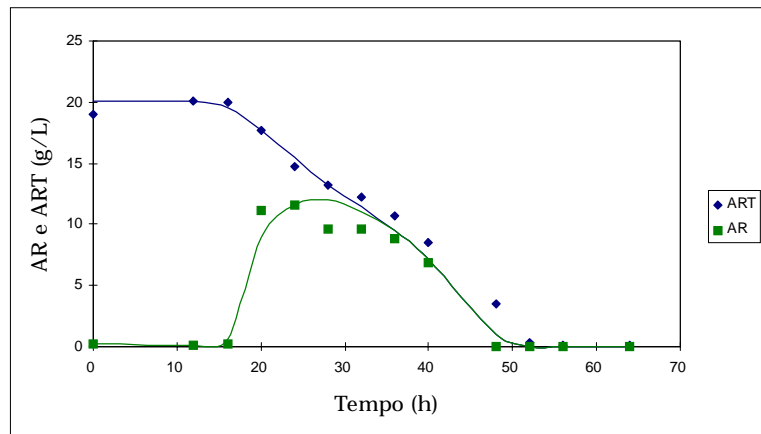


Figura 4.7 Consumo de substrato no ensaio I-1.

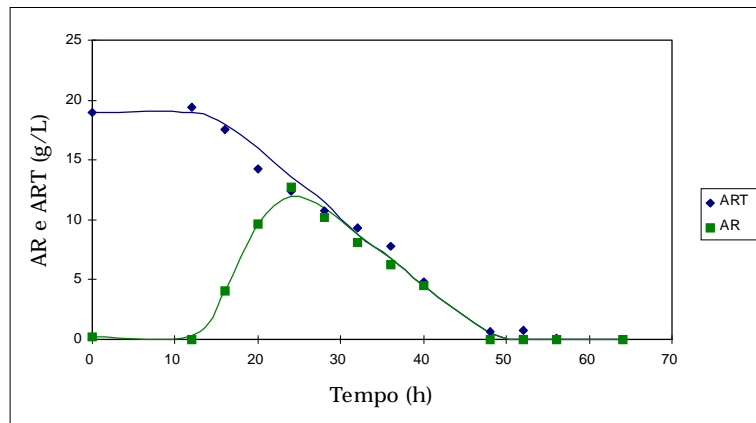


Figura 4.8 Consumo de substrato no ensaio I-2.

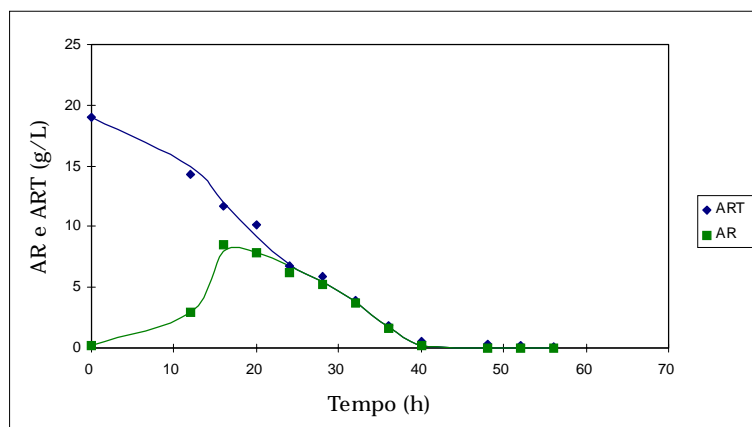


Figura 4.9 Consumo de substrato no ensaio I-3.

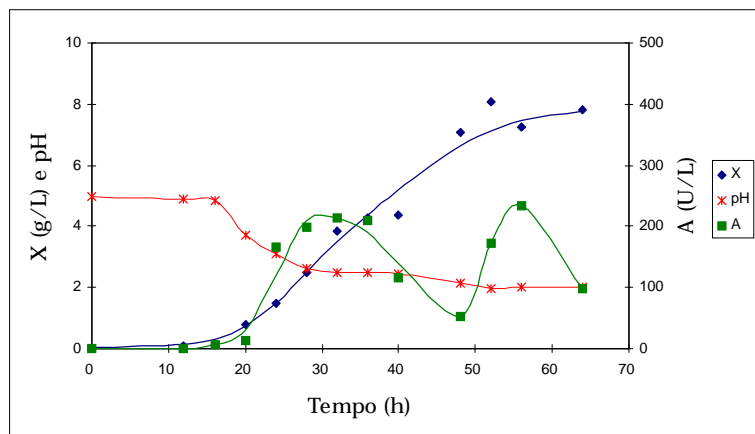


Figura 4.10 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em incubador rotativo no ensaio I-1.

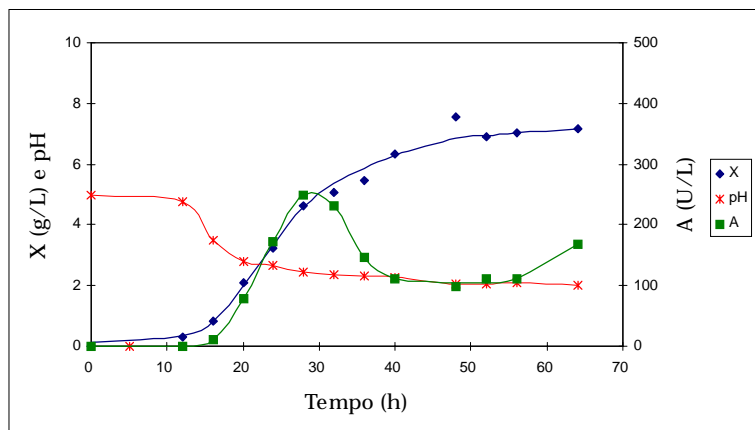


Figura 4.11 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em incubador rotativo no ensaio I-2.

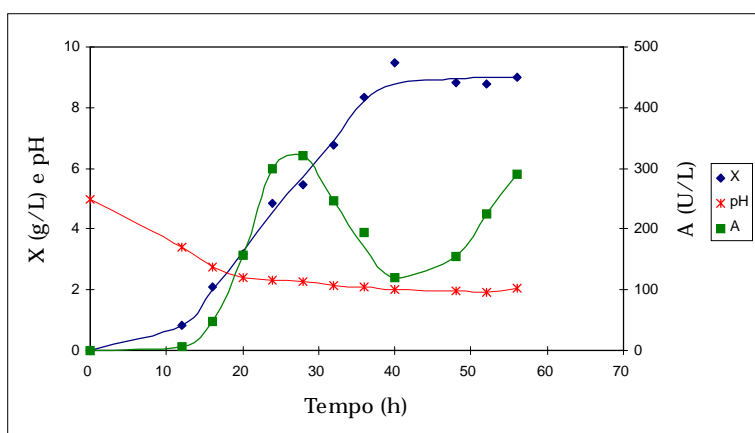


Figura 4.12 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em incubador rotativo no ensaio I-3.

Tabela 4.2 : Resultados dos ensaios realizados em incubador rotativo.

Parâmetro	Ensaio		
	I-1	I-2	I-3
S_0 (g/L)	19,0	19,0	19,0
X_F (g/L)	7,09	7,56	9,46
t_F (h)	48	48	40
A_m (U/L)	213	248	321
S_m (g/L)	12,2	10,7	5,9
t_m (h)	32	28	28
P_x (g/(L.h))	0,15	0,16	0,24
P_a (U/(L.h))	6,7	8,9	11,5
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,37	0,40	0,50
$Y_{A/S}$ (U/g)	31	30	24

No ensaio I-1, realizado com menor concentração de esporos no inóculo, atingiu-se uma concentração celular de cerca de 7,09 g/L e uma atividade enzimática de 213 U/L. No ensaio I-2, com concentração intermediária de esporos, a concentração celular atingiu 7,56 g/L e a atividade enzimática, 248 U/L. No ensaio I-3, com alta concentração de esporos, foi atingido um maior crescimento celular (9,46 g/L) e uma maior produção de glicoamilase (321 U/L), cerca de 50 % superior ao ensaio I-1.

O maior crescimento e a maior produção de enzima, aliados ao fato de que o ensaio com alta concentração de esporos apresentou uma cinética mais rápida, levaram a uma maior produtividade, tanto em células como em glicoamilase, para o ensaio I-3. A produtividade em células atingiu valores em torno de 0,15 g/(L.h) nos ensaios I-1 e I-2 e cerca de 0,24 g/(L.h) no ensaio I-3. A produtividade em glicoamilase

atingiu 6,7 U/(L.h) no ensaio I-1, 8,9 U/(L.h) no ensaio I-2 e 11,5 U/(L.h) no ensaio I-3. O fator de conversão substrato a células ($Y_{x/s}$) também aumentou com o aumento da concentração de esporos utilizada no inóculo, atingindo cerca de 0,37 g/g no ensaio I-1, 0,40 g/g no ensaio I-2 e 0,50 g/g no ensaio I-3. O fator de conversão substrato a glicoamilase ($Y_{A/s}$) atingiu 31 U/g no ensaio I-1 e 30 U/g no ensaio I-2, ficando um pouco mais baixo no ensaio I-3 (24 U/g).

A figura 4.13 mostra a comparação entre o crescimento nos três ensaios. No ensaio I-1 o crescimento foi mais lento devido à menor quantidade de esporos utilizada no ensaio, ao passo que, no ensaio I-3, o crescimento celular foi mais rápido. A cinética mais rápida obtida no ensaio I-3 também pode ser vista nos perfis de pH obtidos nos ensaios (figuras 4.10 , 4.11 e 4.12). No final dos cultivos, o pH atingiu valores em torno de 2,0 para os três ensaios.

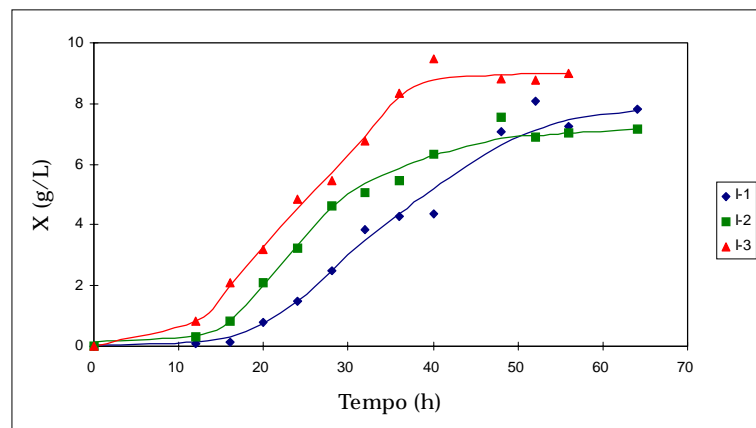


Figura 4.13 Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios I-1, I-2 e I-3.

A figura 4.14 apresenta uma comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios do grupo I.

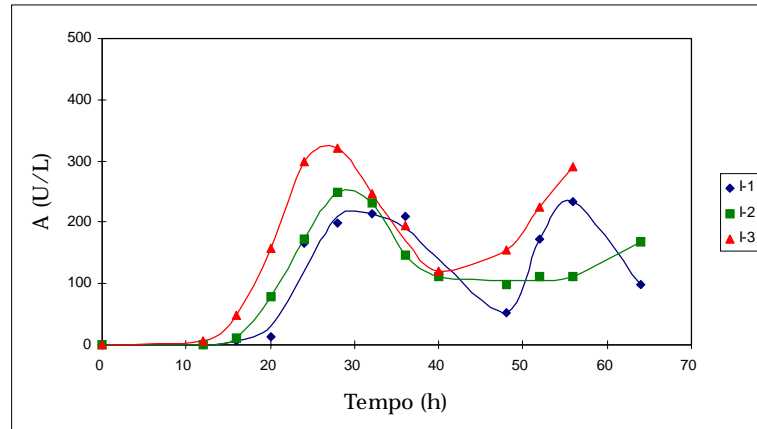


Figura 4.14 Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios I-1, I-2 e I-3.

A produção de glicoamilase atingiu valores mais altos no ensaio I-3, como foi destacado anteriormente. Analisando a figura 4.14, pode-se perceber que a atividade enzimática atingiu um valor máximo e depois decresceu, nos três ensaios realizados em incubador rotativo, apresentando um comportamento oscilatório no final do cultivo. Esse decréscimo da atividade enzimática nos três ensaios a partir de 28 horas de cultivo, aproximadamente, pode ser atribuído, segundo AGUERO (1997) a uma inativação da glicoamilase pelo baixo valor de pH atingido em incubador rotativo, como mostrado nas figuras 4.10, 4.11 e 4.12. No entanto, até o momento não existe uma explicação para o comportamento oscilatório da atividade enzimática no final do cultivo.

Analisando-se os perfis de concentração celular mostrados na figura 4.13, não fica clara a existência de uma fase exponencial de crescimento. Na verdade, aparentemente, é mais apropriado identificar-se uma fase linear de crescimento nos três ensaios, embora com duração variável para cada ensaio. Os três ensaios atingiram praticamente os mesmos valores máximos de velocidade específica de crescimento (em torno de $0,15 \text{ h}^{-1}$), como mostrado na figura 4.15. O ensaio I-1 levou mais tempo para atingir a velocidade específica de crescimento máxima (em torno de 20 horas). Os outros dois ensaios, devido à maior densidade de inóculo utilizada, atingiram a velocidade específica máxima entre 12 e 15 horas de cultivo.

As figuras 4.16 e 4.17 apresentam as velocidades específicas de consumo de substrato e de produção de glicoamilase.

A velocidade específica de consumo de substrato atingiu valores máximos praticamente iguais para os três ensaios ($0,79 \text{ g}/(\text{g.h})$ para o ensaio I-1, $0,63 \text{ g}/(\text{g.h})$ para o ensaio I-2 e $0,78 \text{ g}/(\text{g.h})$ para o ensaio I-3). No entanto, o ensaio I-3 atingiu o valor máximo em torno de 10 horas, enquanto o ensaio I-1 atingiu o valor máximo em torno de 20 horas de cultivo e o ensaio I-2, em torno de 15 horas de cultivo.

A velocidade específica de produção de glicoamilase atingiu um valor um pouco mais alto no ensaio I-1 (em torno de $15 \text{ U}/(\text{g.h})$) do que nos outros dois ensaios ($10 \text{ U}/(\text{g.h})$).

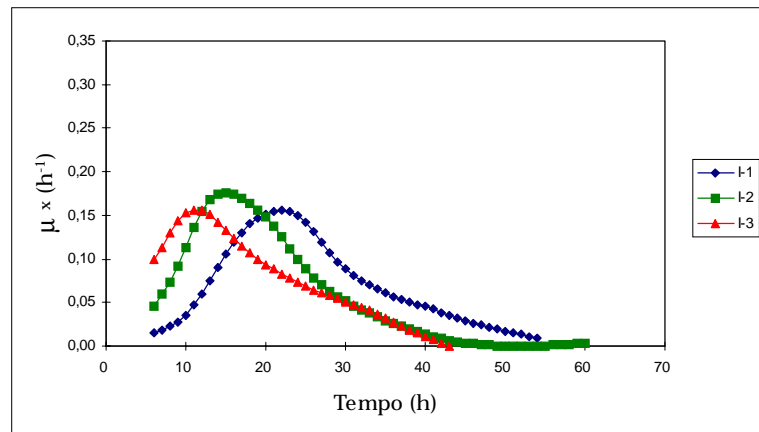


Figura 4.15 Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios I-1, I-2 e I-3.

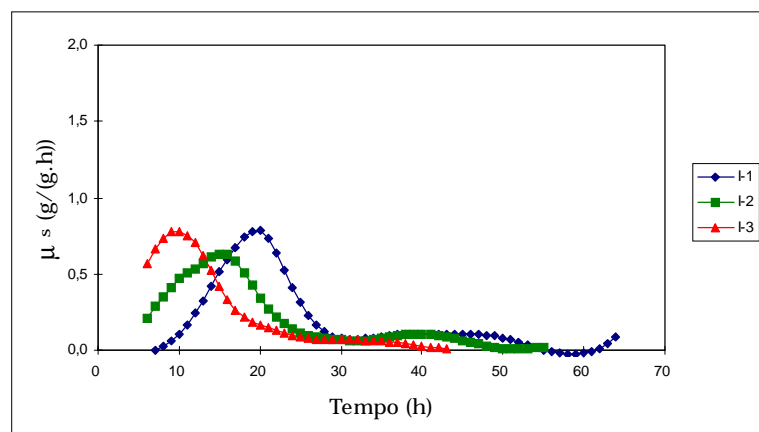


Figura 4.16 Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios I-1, I-2 e I-3.

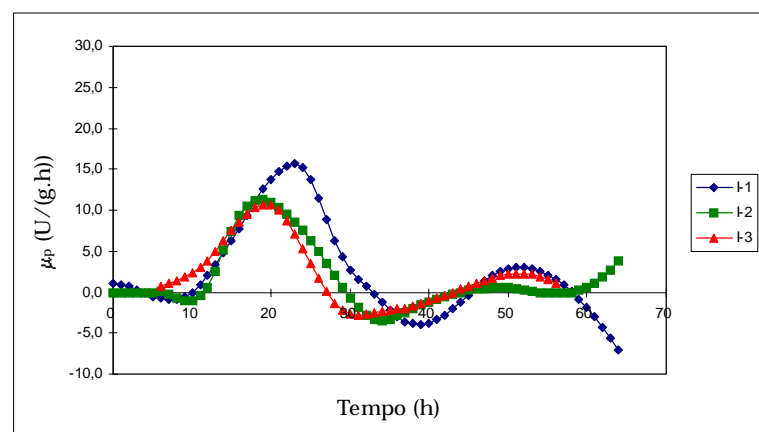


Figura 4.17 Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios I-1, I-2 e I-3.

Assim, como conclusão dos ensaios do grupo I, pode-se dizer que a utilização de uma concentração de esporos alta no inóculo (ensaio I-3) conduziu, em incubador rotativo, a uma diminuição no tempo total do processo, a um maior crescimento celular, a uma maior produção de glicoamilase e a um consumo mais rápido do substrato, em comparação com os ensaios onde foi utilizada uma concentração de esporos menor. A obtenção de uma atividade enzimática mais alta no ensaio I-3 foi conseqüência de uma morfologia mais favorável neste ensaio, com uma parcela do crescimento celular na forma filamentosa, mais recomendada para a produção de glicoamilase.

4.1.2 Ensaios realizados em fermentador, com $S_0 = 20$ g/L (Grupo F20)

As três concentrações de esporos estudadas anteriormente em incubador rotativo foram utilizadas no preparo do inóculo para os ensaios F20-1, F20-2 e F20-3, realizados em fermentador, com concentração inicial de substrato de 20 g/L. O objetivo destes ensaios foi analisar a influência da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo (C_{esp}) sobre a morfologia deste inóculo e sua posterior influência no ensaio em fermentador (morfologia, crescimento celular e produção de glicoamilase em fermentador).

A tabela 4.3 apresenta as concentrações de esporos utilizadas no preparo do inóculo (células pré-cultivadas em incubador rotativo por

24 horas, a 200 rpm e 35 °C) para os ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

Tabela 4.3 Concentrações de esporos utilizadas no preparo do inóculo dos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

Ensaio	C_{esp} (esp/mL)
F20-1	$9,5 \times 10^3$
F20-2	$9,5 \times 10^4$
F20-3	$9,5 \times 10^5$

Morfológicamente, os inóculos dos três ensaios apresentaram-se na forma de “pellets” de tamanhos distintos. O aumento da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo conduziu a uma diminuição do diâmetro dos “pellets” obtidos em 24 horas de cultivo em incubador rotativo. Além destas diferenças morfológicas, os inóculos apresentaram diferentes atividades de glicoamilase. O inóculo que foi utilizado no ensaio F20-1, o qual foi preparado com menor concentração de esporos, apresentou “pellets” com diâmetro médio de 1,60 mm e uma atividade enzimática de 66 U/L. O inóculo utilizado no ensaio F20-2, preparado com concentração intermediária de esporos, apresentou “pellets” menores (1,23 mm) e atividade enzimática maior (115 U/L) do que o inóculo do ensaio F20-1. O inóculo do ensaio F20-3, preparado com alta concentração de esporos, apresentou “pellets” pequenos (0,74 mm) e alta atividade enzimática (442 U/L). O crescimento em fermentador, apesar de as características dos inóculos terem sido diferentes, ocorreu predominantemente na forma

filamentosa, para os ensaios F20-1 e F20-2, praticamente sem a presença de “pellets”, durante todo o cultivo. Os “pellets” provenientes do inóculo foram rompidos no início dos ensaios, devido ao alto cisalhamento dentro do fermentador, dando origem a um crescimento na forma filamentosa, nos ensaios F20-1 e F20-2. No ensaio F20-3, os “pellets” menores, presentes no inóculo, mostraram-se mais difíceis de serem rompidos. Até cerca de 6 horas de cultivo em fermentador havia a presença de “pellets” no ensaio F20-3. A partir de 6 horas de cultivo, a morfologia obtida nos três ensaios foi semelhante, com o crescimento preferencialmente na forma filamentosa.

A tabela 4.4 apresenta um resumo das características morfológicas do inóculo e da morfologia obtida em fermentador, para os ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

Tabela 4.4 Morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

Ensaio	Morfologia do inóculo	Morfologia em fermentador
F20-1	Suspensão de “pellets” de 1,60 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 66 U/L.	Crescimento predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
F20-2	Suspensão de “pellets” de 1,23 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 115 U/L.	Crescimento predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
F20-3	Suspensão de “pellets” de 0,74 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 442 U/L.	Presença de “pellets” até 6 horas de cultivo e crescimento predominantemente na forma filamentosa a partir de 6 horas de cultivo.

As figuras 4.18, 4.19 e 4.20 mostram os “pellets” presentes nos inóculos dos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3, respectivamente. As figuras 4.21 e 4.22 mostram o crescimento na forma filamentosa, nos ensaios F20-1 e F20-2, respectivamente, após 6 horas de cultivo em fermentador, onde se pode notar que praticamente não existiam diferenças morfológicas entre as células presentes nestes ensaios. A figura 4.23 mostra a presença de um “pellet” no ensaio F20-3, após 6 horas de cultivo em fermentador. Assim, com 6 horas de cultivo em fermentador, já não havia mais a presença de “pellets” nos ensaios F20-1 e F20-2, com o crescimento ocorrendo predominantemente na forma filamentosa. No ensaio F20-3, os “pellets” permaneceram presentes até 6 horas de cultivo. A partir de 6 horas, o crescimento ocorreu predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets”.

Assim, apesar de terem sido utilizadas concentrações diferentes de esporos no preparo do inóculo para os ensaios do grupo F20 e de terem sido obtidas diferentes morfologias nos inóculos destes ensaios (tamanho de “pellets” distintos), os resultados obtidos em fermentador não apresentaram diferenças significativas, tanto no que se refere ao crescimento celular quanto em relação à produção de glicoamilase em fermentador, como consequência da obtenção de morfologias semelhantes nos três ensaios, a partir de cerca de 6 horas de cultivo.

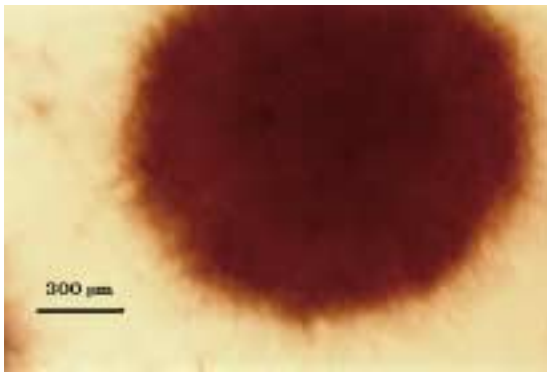


Figura 4.18 “Pellet” presente no inóculo do ensaio F20-1.

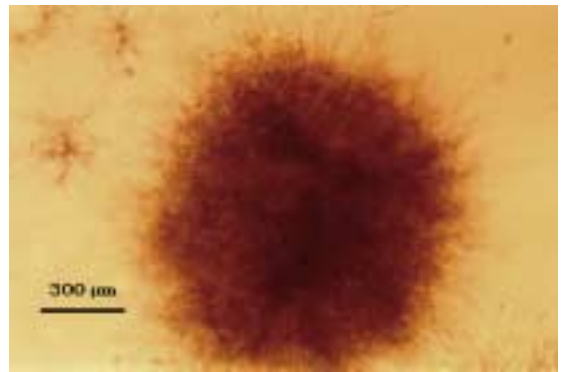


Figura 4.19 “Pellet” presente no inóculo do ensaio F20-2.

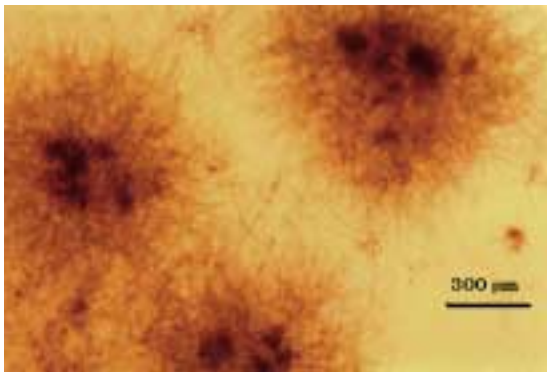


Figura 4.20 “Pellets” presentes no inóculo do ensaio F20-3.

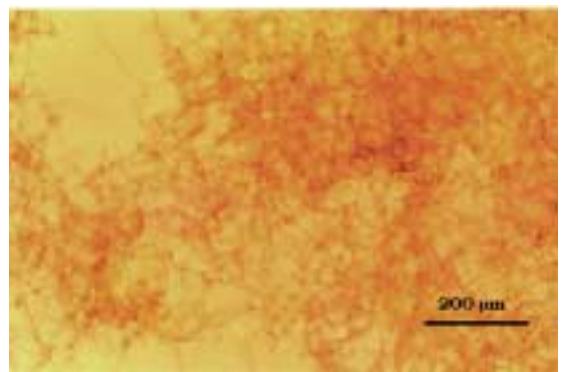


Figura 4.21 Forma filamentosa no ensaio F20-1, com 6 horas de cultivo em fermentador.

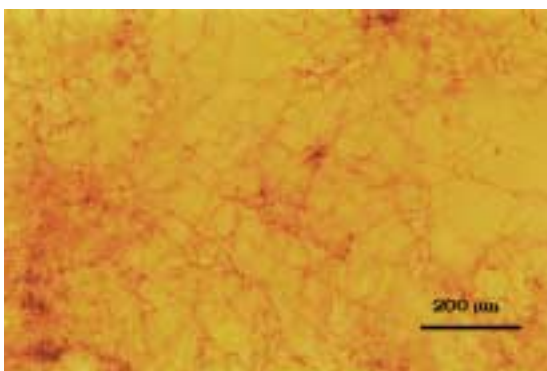


Figura 4.22 Forma filamentosa no ensaio F20-2, com 6 horas de cultivo em fermentador.

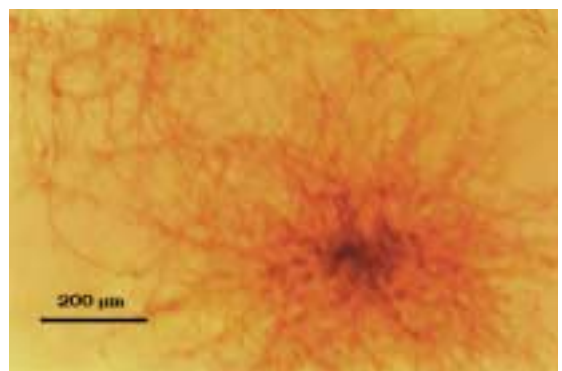


Figura 4.23 “Pellet” obtido no ensaio F20-3, com 6 horas de cultivo em fermentador.

As figuras 4.24, 4.25 e 4.26 mostram o consumo de substrato nos três ensaios do grupo F20, em função do tempo de cultivo.

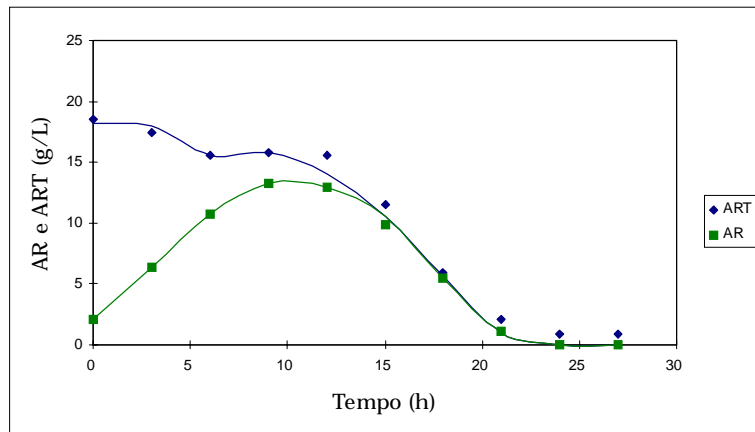


Figura 4.24 Consumo de substrato no ensaio F20-1.

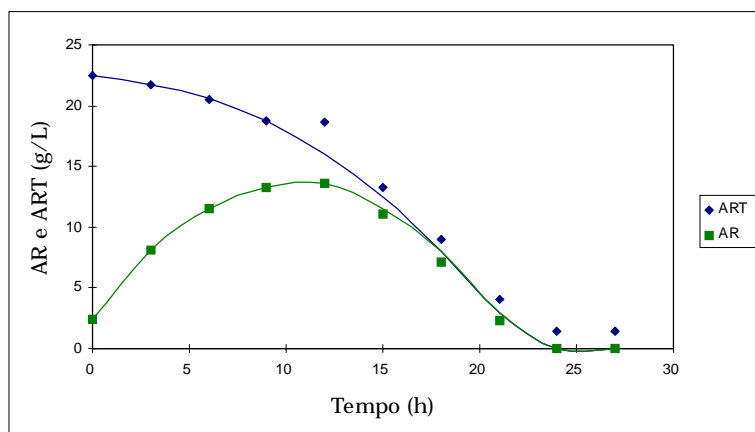


Figura 4.25 Consumo de substrato no ensaio F20-2.

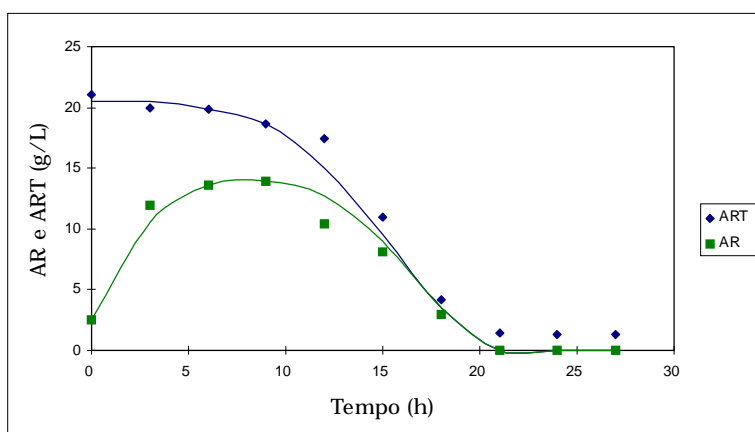


Figura 4.26 Consumo de substrato no ensaio F20-3.

Quanto ao consumo de substrato, as curvas de açúcares redutores e de açúcares redutores totais são semelhantes. Para os três ensaios, as curvas de açúcares redutores atingiram valores máximos de 13 g/L, em torno de 10 a 12 horas de cultivo. O término da fonte de carbono ocorreu por volta das 24 horas de cultivo para os ensaios F20-1 e F20-2, e um pouco mais cedo (em torno de 21 horas de cultivo) para o ensaio F20-3, devido à maior concentração celular obtida nesse ensaio durante quase todo o cultivo. Portanto, no que se refere aos mecanismos de indução e de repressão, pode-se afirmar que estes atuaram de forma semelhante nos três ensaios.

As figuras 4.27 , 4.28 e 4.29 apresentam as cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador nos ensaios do grupo F20, podendo-se observar, nos três ensaios, uma cinética de produção associada ao crescimento, característica de metabólitos primários.

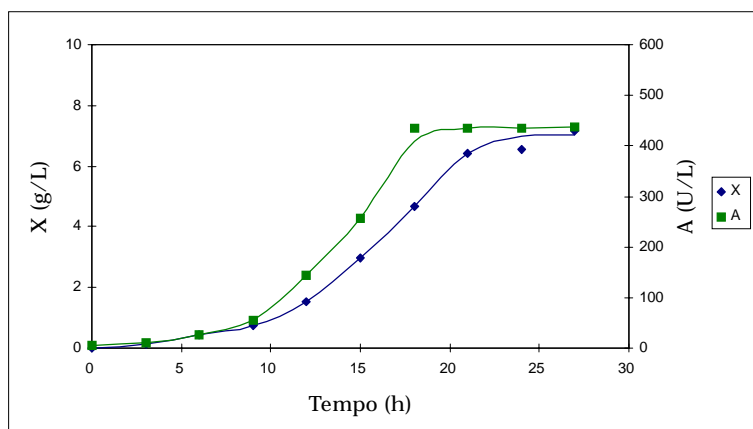


Figura 4.27 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F20-1.

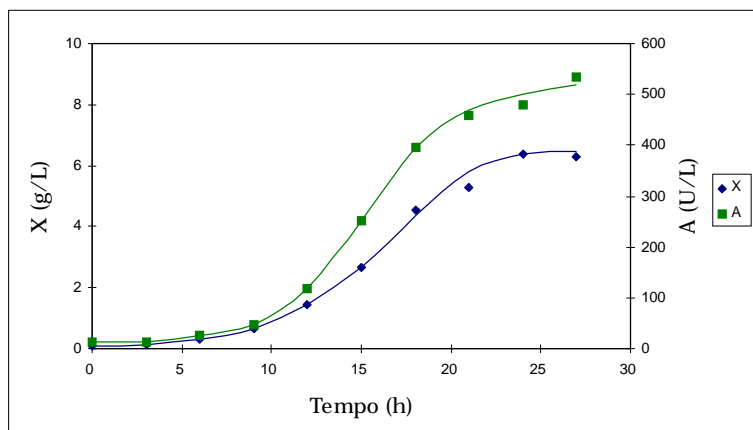


Figura 4.28 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F20-2.

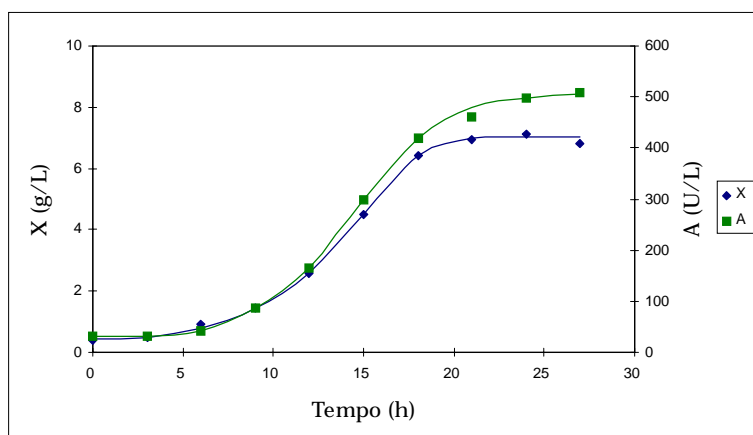


Figura 4.29 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F20-3.

A tabela 4.5 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3, em fermentador.

Tabela 4.5 Resultados dos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3, realizados em fermentador.

Parâmetro	Ensaio		
	F20-1	F20-2	F20-3
S_0 (g/L)	18,5	22,5	21,0
X_F (g/L)	6,55	6,39	6,93
t_F (h)	24	24	21
A_m (U/L)	435	534	498
t_m (h)	18	27	24
A_0 (U/L)	6	12	31
X_0 (g/L)	0,01	0,07	0,40
P_x (g/(L.h))	0,27	0,26	0,31
P_a (U/(L.h))	23,8	19,3	19,5
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,35	0,28	0,31
$Y_{A/s}$ (U/g)	23	23	22

Em relação ao crescimento celular, os três ensaios foram muito semelhantes. O ensaio F20-1 atingiu uma concentração celular máxima de 6,55 g/L, enquanto os ensaios F20-2 e F20-3 atingiram 6,39 g/L e 6,93 g/L, respectivamente. A concentração celular máxima dos ensaios F20-1 e F20-2 foi atingida em torno de 24 horas. Para o ensaio F20-3, a concentração celular máxima foi atingida em 21 horas de cultivo. Com isso, a produtividade em células apresentou valores semelhantes para os três ensaios (0,27 g/(L.h) para o ensaio F20-1, 0,26 g/(L.h) para o ensaio F20-2 e 0,31 g/(L.h) para o ensaio F20-3), o mesmo ocorrendo com o fator de conversão substrato a células.

A figura 4.30 mostra a comparação entre o crescimento celular nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3. Nos ensaios F20-1 e F20-2, as curvas de crescimento são muito semelhantes e com valores menores do que o ensaio F20-3, principalmente no início do cultivo. As duas curvas começam a se distanciar a partir das 18 horas de cultivo, onde a velocidade de crescimento do ensaio F20-2 começa a diminuir e os ensaios F20-1 e F20-3 começam a se aproximar, atingindo o mesmo patamar no final do cultivo. Esse maior crescimento no início do cultivo para o ensaio F20-3 deve-se à maior concentração celular do inóculo, o que levou a uma maior massa celular inicial no fermentador para este ensaio.

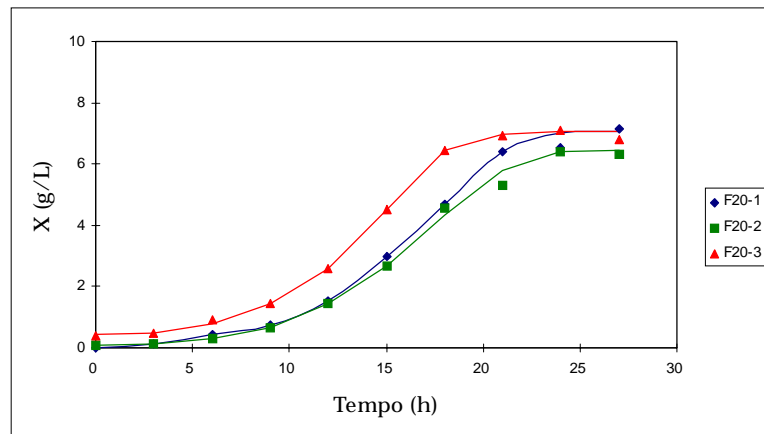


Figura 4.30 Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

A figura 4.31 apresenta a comparação entre as atividades enzimáticas obtidas em fermentador para os ensaios F20-1, F20-2 e F20-3. Analisando-se as atividades enzimáticas máximas obtidas nestes ensaios, pode-se perceber que os ensaios F20-2 e F20-3 apresentaram

praticamente os mesmos valores (534 U/L para o ensaio F20-2 e 498 U/L para o ensaio F20-3). O ensaio F20-1 atingiu uma atividade enzimática máxima de 435 U/L, cerca de 21 % menor do que o ensaio F20-2. Os perfis de atividade enzimática, no entanto, foram semelhantes para os três ensaios, não se podendo considerar que houve diferença significativa entre a produção de glicoamilase em fermentador nos ensaios do grupo F20. Apesar de a atividade enzimática máxima do ensaio F20-1 ter sido menor, este valor máximo foi atingido em torno de 18 horas de cultivo, mais cedo do que os ensaios F20-2 e F20-3, que atingiram o valor máximo em torno de 27 e 24 horas de cultivo, respectivamente. Isso conduziu a uma produtividade em glicoamilase 25 % mais alta no ensaio F20-1 (23,8 U/(L.h)) do que nos outros dois ensaios, que atingiram uma produtividade em torno de 19 U/(L.h). O fator de conversão substrato a glicoamilase apresentou valores semelhantes nos três ensaios (em torno de 23 U/g).

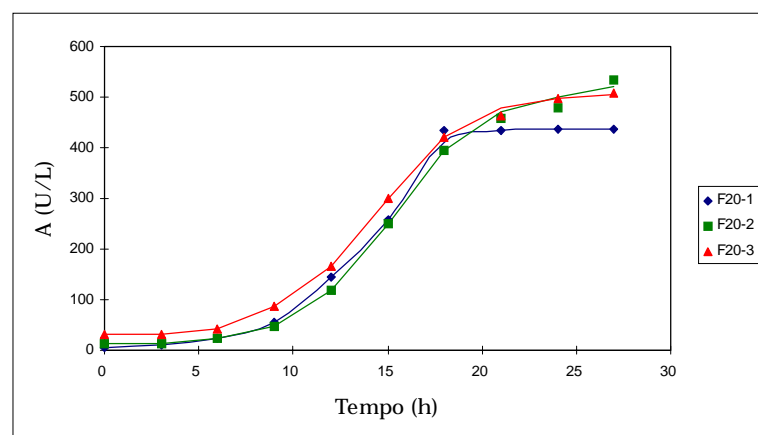


Figura 4.31 Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

Na tabela 4.6 estão apresentadas as velocidades específicas de crescimento máximas, estimadas conforme a equação 3.13.

Tabela 4.6 Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

Ensaio	μ_{\max} (h ⁻¹)	Equação	Fase exponencial
F20-1	0,20	$\ln X = 0,2042 (t-t_0) - 2,0616$ $r^2 = 0,9943$	entre 6 e 18 h
F20-2	0,23	$\ln X = 0,2296 (t-t_0) - 2,5099$ $r^2 = 0,9912$	entre 6 e 18 h
F20-3	0,17	$\ln X = 0,1724 (t-t_0) - 1,1588$ $r^2 = 0,9956$	entre 3 e 18 h

O ensaio F20-2 atingiu uma velocidade específica de 0,23 h⁻¹, 15 % mais alta do que o ensaio F20-1 (0,20 h⁻¹) e 35 % mais alta do que o ensaio F20-3 (0,17 h⁻¹). As curvas de velocidade específica de crescimento para os ensaios F20-1, F20-2 e F20-3 são apresentadas na figura 4.32, de onde se pode observar que os valores máximos estão coerentes com os valores de μ_{\max} obtidos pela equação 3.13 (tabela 4.6).

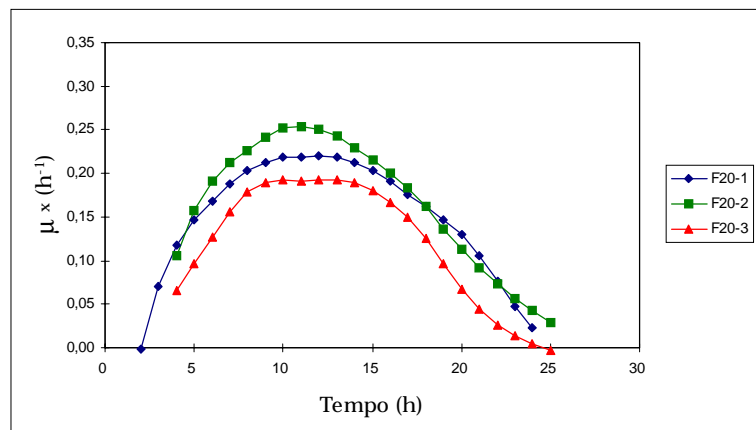


Figura 4.32 Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

As figuras 4.33 e 4.34 apresentam as velocidades específicas de consumo de substrato e de produção de glicoamilase.

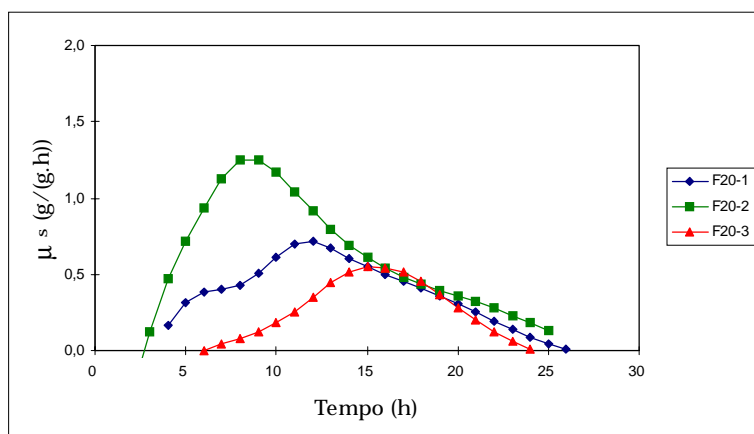


Figura 4.33 Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

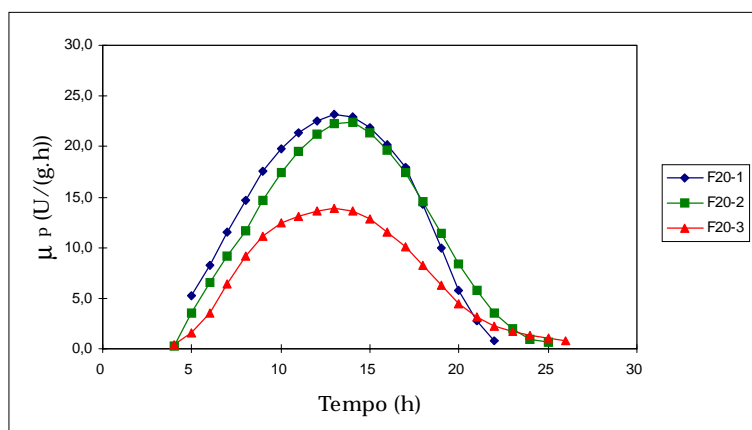


Figura 4.34 Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3.

A velocidade específica de consumo de substrato atingiu um valor máximo de 0,70 g/(g.h) em torno de 10 horas de cultivo no ensaio F20-1 e de 0,55 g/(g.h) em torno de 14 horas de cultivo no ensaio F20-3. No ensaio F20-2, foi atingido um valor mais alto de velocidade específica de consumo de substrato (cerca de 1,25 g/(g.h) com 9 horas

de cultivo).

Em relação às velocidades específicas de produção de glicoamilase, os ensaios F20-1 e F20-2 apresentaram perfis semelhantes, atingindo um valor máximo de 22 U/(g.h) em torno de 12 horas de cultivo. No ensaio F20-3, a velocidade específica de produção de glicoamilase atingiu valores inferiores aos dos ensaios F20-1 e F20-2, apresentando um valor máximo de 13 U/(g.h), por volta de 12 horas de cultivo. Essa velocidade específica de produção de glicoamilase menor indica que as células estavam individualmente menos produtivas no ensaio F20-3 do que nos demais ensaios, provavelmente devido à presença de “pellets” no início deste ensaio.

Dessa forma, pode-se concluir, a partir dos resultados dos ensaios do grupo F20, que a utilização de diferentes concentrações de esporos no preparo do inóculo conduziu a diferentes características deste inóculo, principalmente no que se refere ao tamanho médio dos “pellets” obtidos e à atividade enzimática presente no caldo cultivado em incubador rotativo. Apesar disso, não foram observadas diferenças significativas nos resultados finais dos ensaios em fermentador, com a utilização destes inóculos, tanto em relação à morfologia quanto em relação ao crescimento celular e à produção final de glicoamilase em fermentador. Assim, na faixa de concentrações de esporos estudada, não houve influência significativa do tamanho de inóculo sobre o processo em fermentador.

4.1.3 Ensaio realizados em fermentador, com $S_0 = 40$ g/L (Grupo F40)

Devido ao fato de não terem sido observadas diferenças significativas nos ensaios do grupo F20, foram realizados seis ensaios, em fermentador, estendendo-se a faixa de concentração de esporos estudada para valores mais altos. Os ensaios do grupo F40 foram realizados com concentração inicial de substrato de 40 g/L. A tabela 4.7 apresenta as concentrações de esporos utilizadas no preparo do inóculo (pré-cultivo de células em incubador rotativo) para estes ensaios.

Tabela 4.7 Concentrações de esporos utilizadas no preparo do inóculo dos ensaios do grupo F40.

Ensaio	C_{esp} (esp/mL)
F40-1	$9,5 \times 10^3$
F40-2	$9,5 \times 10^4$
F40-3	$9,5 \times 10^5$
F40-4	$8,8 \times 10^4$
F40-5	$5,0 \times 10^6$
F40-6	$1,8 \times 10^7$

Dessa forma, as mesmas concentrações de esporos dos ensaios do grupo F20 foram estudadas nos ensaios F40-1, F40-2 e F40-3. O inóculo do ensaio F40-4 foi preparado praticamente com a mesma concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo do ensaio F40-2. Os ensaios F40-5 e F40-6 foram realizados estudando-se concentrações mais altas de esporos no preparo do inóculo.

A tabela 4.8 apresenta um resumo da morfologia do inóculo e da morfologia obtida em fermentador, para os ensaios do grupo F40.

Tabela 4.8 Morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador nos ensaios do grupo F40.

Ensaio	Morfologia do inóculo	Morfologia em fermentador
F40-1	Suspensão de “pellets” de 1,60 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 76 U/L.	Crescimento predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
F40-2	Suspensão de “pellets” de 1,14 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 186 U/L.	Crescimento predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
F40-3	Suspensão de “pellets” de 0,80 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 326 U/L.	Crescimento predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
F40-4	Suspensão de “pellets” de 0,95 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 182 U/L.	Crescimento predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
F40-5	Suspensão de células, com o crescimento ocorrendo na forma filamentosa. Presença de poucos “pellets” e atividade enzimática de 491 U/L. Presença de aglomerados de esporos não germinados.	Presença de poucos “pellets” no início do cultivo (até 6 horas de cultivo, aproximadamente). Crescimento predominantemente na forma filamentosa durante a maior parte do cultivo.
F40-6	Suspensão de células, com o crescimento ocorrendo na forma filamentosa, sem a presença de “pellets” e atividade enzimática de 261 U/L. Presença de muitos aglomerados de esporos não germinados.	Crescimento na forma de “pellets” durante praticamente todo o cultivo, devido aos aglomerados de esporos provenientes do inóculo. Presença de esporos não germinados até 15 horas de cultivo.

As suspensões de células utilizadas como inóculo para o fermentador apresentaram condições bastante diferentes nestes ensaios. Os inóculos dos ensaios F40-1, F40-2, F40-3 e F40-4 apresentaram-se na forma de “pellets”, devido às concentrações de esporos utilizadas serem relativamente baixas. Esses inóculos não apresentavam esporos, apenas células vegetativas. As características dos inóculos dos ensaios F40-1, F40-2 e F40-3 eram muito semelhantes às dos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3, respectivamente. A figura 4.35 mostra um “pellet” presente no inóculo do ensaio F40-4.

A suspensão de células utilizada no ensaio F40-5, preparada com concentração mais alta de esporos, apresentava células vegetativas e alguns aglomerados de esporos que ainda não haviam germinado. Havia a presença de alguns “pellets” no inóculo do ensaio F40-5, como mostrado na figura 4.36.

No ensaio F40-6 foi utilizada uma concentração muito alta de esporos no preparo do inóculo. Dessa forma, o inóculo era composto por células vegetativas e muitos aglomerados de esporos não germinados, conforme a figura 4.37.

Essas diferentes condições dos inóculos utilizados levaram a formas diferentes de crescimento em fermentador. Nos ensaios F40-1, F40-2, F40-3 e F40-4 o crescimento celular no fermentador ocorreu predominantemente na forma filamentosa durante praticamente todo o cultivo. As morfologias obtidas em fermentador nos ensaios F40-1,

F40-2 e F40-3 foram muito semelhantes às obtidas nos ensaios F20-1, F20-2 e F20-3, respectivamente. A figura 4.38 mostra o crescimento na forma filamentosa, para o ensaio F40-4, após 6 horas de cultivo em fermentador.

No ensaio F40-5, havia a presença de poucos “pellets”, principalmente no início do cultivo, com o crescimento ocorrendo predominantemente na forma filamentosa, conforme representado na figura 4.39.

O crescimento na forma de “pellets” em *Aspergillus awamori* está associado à presença de aglomerados de esporos no meio de cultura. No ensaio F40-6, os aglomerados de esporos, provenientes do inóculo, estiveram presentes no fermentador até 6 horas de cultivo, como mostra a figura 4.40. Existiam esporos não germinados no fermentador até 15 horas de cultivo, aproximadamente. Devido à grande quantidade de aglomerados de esporos presentes, o crescimento do microrganismo ocorreu predominantemente na forma de “pellets” no ensaio F40-6 durante praticamente todo o cultivo, como mostra a figura 4.41.

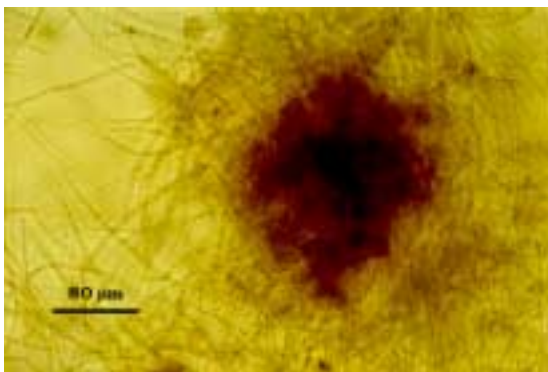


Figura 4.35 “Pellet” presente no inóculo do ensaio F40-4.

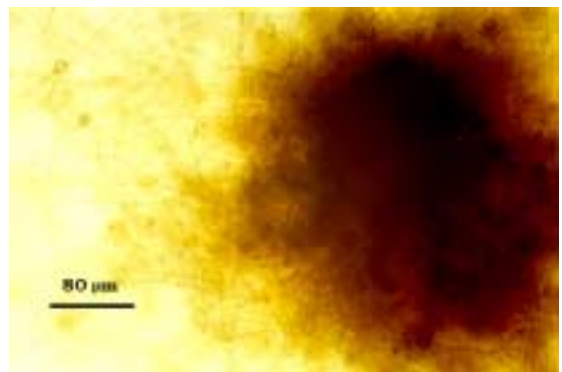


Figura 4.36 “Pellet” presente no inóculo do ensaio F40-5.

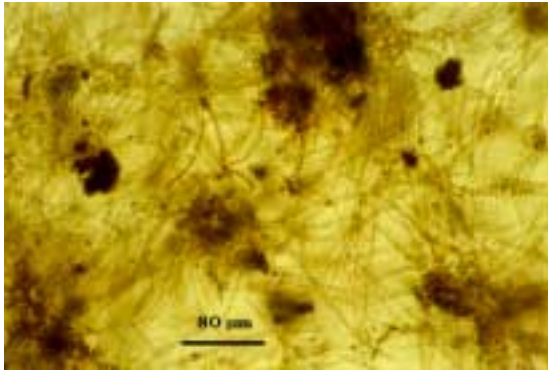


Figura 4.37 Aglomerados de esporos presentes no inóculo do ensaio F40-6.

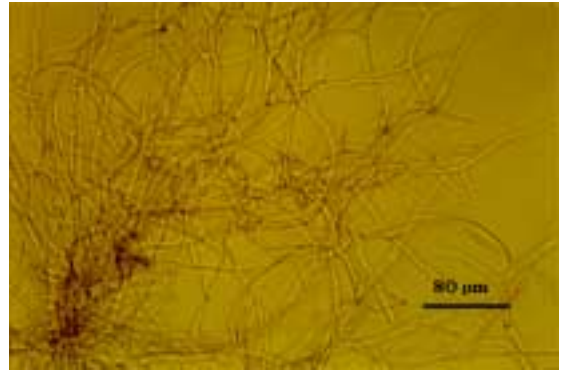


Figura 4.38 Forma filamentosa no ensaio F40-4, após 6 horas de cultivo em fermentador.

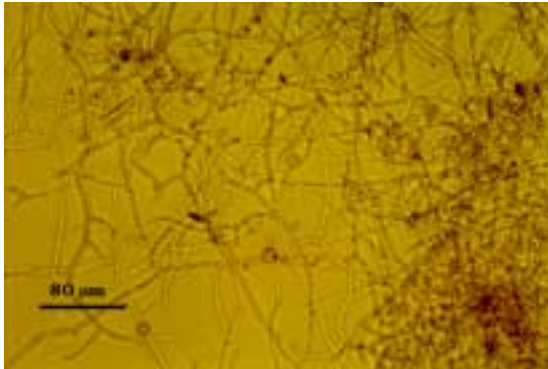


Figura 4.39 Forma filamentosa no ensaio F40-5, após 6 horas de cultivo em fermentador.

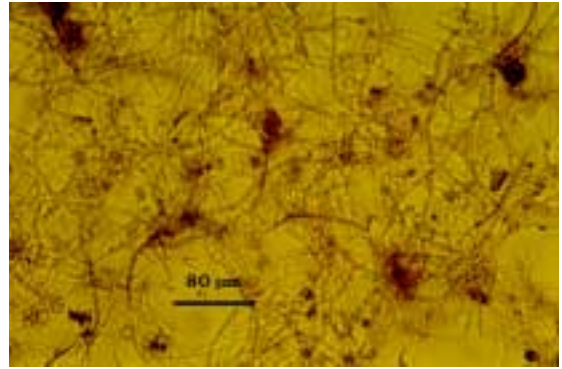


Figura 4.40 Forma filamentosa e aglomerados de esporos presentes no ensaio F40-6, após 6 horas de cultivo em fermentador.

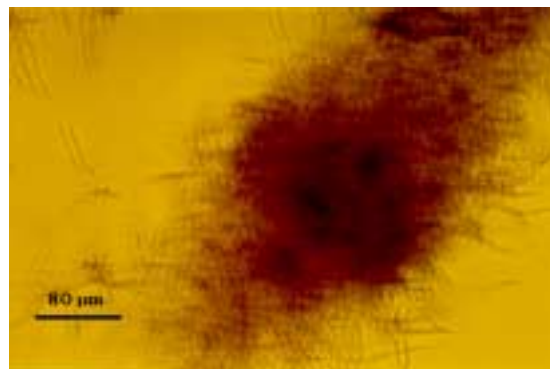


Figura 4.41 "Pellet" no ensaio F40-6, após 14 horas de cultivo em fermentador.

Nos ensaios F40-4, F40-5 e F40-6 foram também analisadas as características reológicas do caldo de fermentação durante o cultivo. A figura 4.42 representa a variação do índice de consistência do fluido (K) e a figura 4.43 representa a variação do índice de comportamento do escoamento (n), em função do tempo de cultivo.

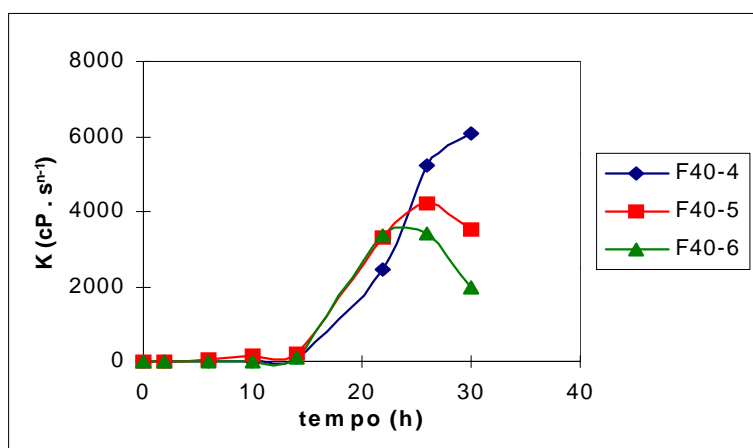


Figura 4.42 Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios F40-4, F40-5 e F40-6.

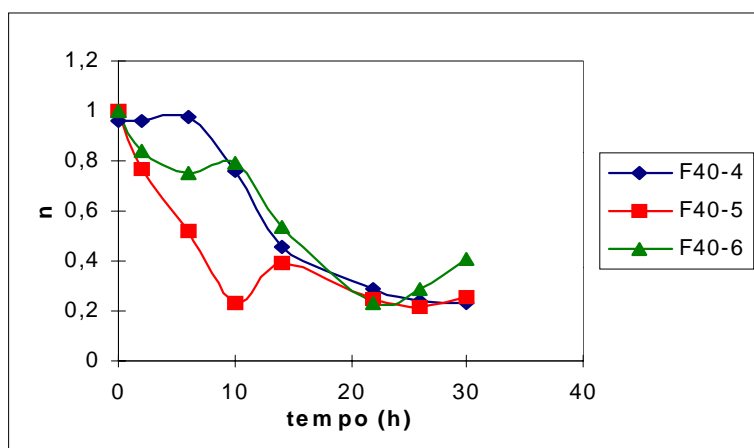


Figura 4.43 Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios F40-4, F40-5 e F40-6.

A presença predominante de “pellets” no ensaio F40-6, em fermentador, também é evidenciada pelas características reológicas do

caldo. O ensaio F40-4, cujo crescimento ocorreu majoritariamente na forma filamentosa, atingiu valores mais altos no índice de consistência (K) do que o ensaio F40-6, onde havia a presença de “pellets”. O máximo valor de K foi de 6000 cP.sⁿ⁻¹ para o ensaio F40-4, de 4200 cP.sⁿ⁻¹ para o ensaio F40-5 e de 3400 cP.sⁿ⁻¹ para o ensaio F40-6. O índice de comportamento do escoamento (n) iniciou-se em 1,0 para os três ensaios, mostrando que o caldo comporta-se como um fluido newtoniano no início do cultivo. Com o crescimento celular, o comportamento tornou-se pseudoplástico, ocorrendo uma queda no valor de n para os três ensaios.

Essas diferenças morfológicas entre os ensaios conduziram, também, a diferenças nas cinéticas de crescimento do microrganismo, de consumo de substrato e de produção de glicoamilase.

As figuras 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48 e 4.49 apresentam o consumo de substrato nos ensaios F40-1, F40-2, F40-3, F40-4, F40-5 e F40-6, respectivamente, em função do tempo de cultivo. A diferença mais significativa entre as curvas de consumo de substrato está no instante de término da fonte de carbono. Para os ensaios F40-1, F40-2, F40-3, F40-4 e F40-5, a fonte de carbono se esgotou entre 28 e 30 horas de cultivo. Para o ensaio F40-6, a fonte de carbono se esgotou em torno de 24 horas de cultivo, devido à maior concentração celular atingida neste ensaio, que acarretou um consumo mais rápido de substrato. Em termos dos mecanismos de indução e repressão, as

condições foram semelhantes, não havendo diferenças significativas entre os ensaios do grupo F40.

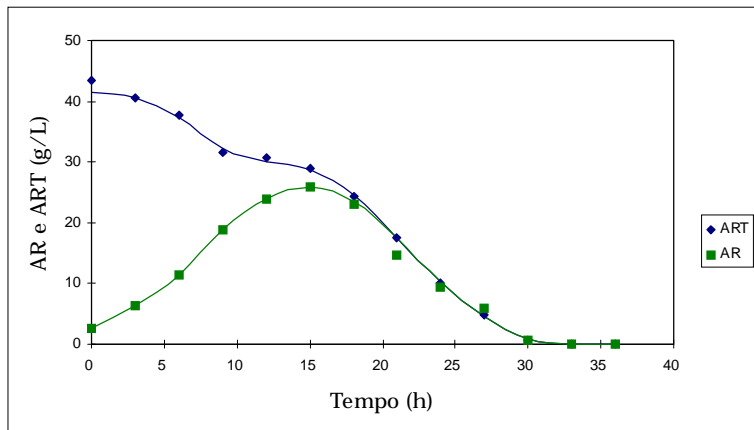


Figura 4.44 Consumo de substrato no ensaio F40-1.

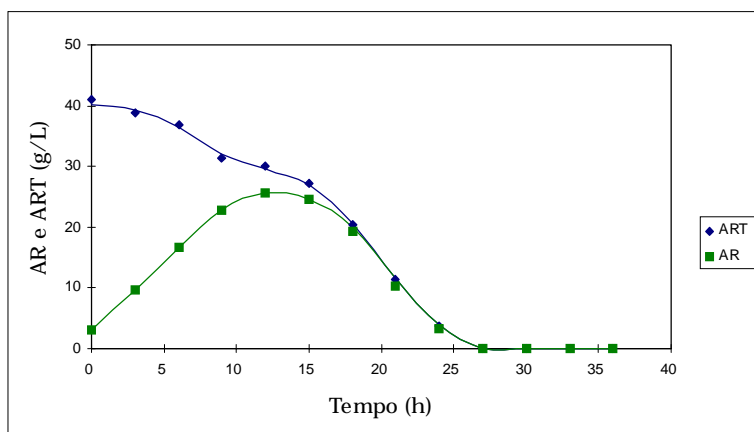


Figura 4.45 Consumo de substrato no ensaio F40-2.

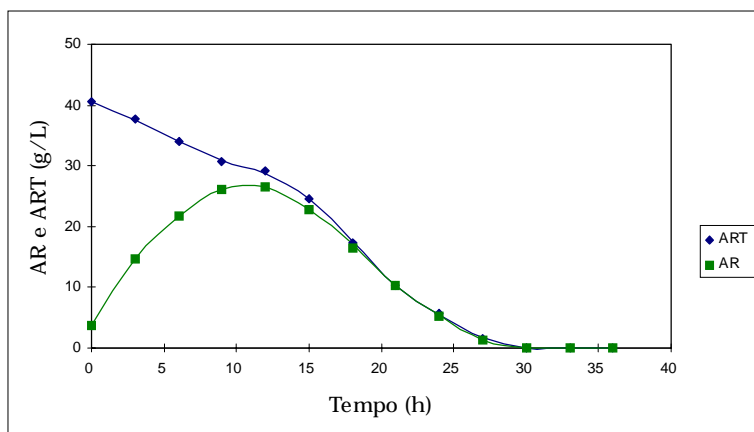


Figura 4.46 Consumo de substrato no ensaio F40-3.

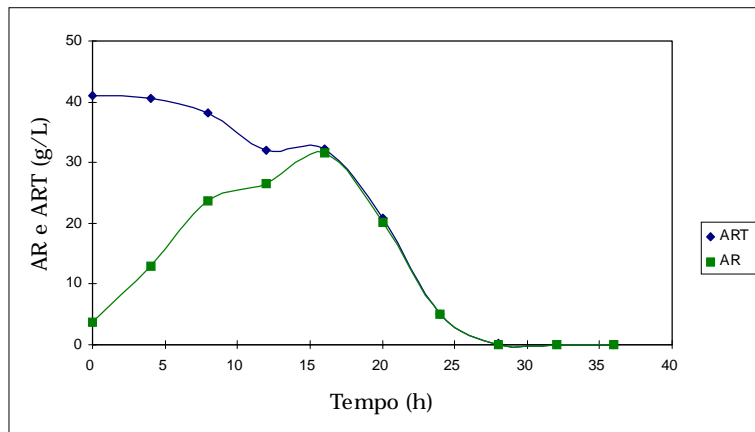


Figura 4.47 Consumo de substrato no ensaio F40-4.

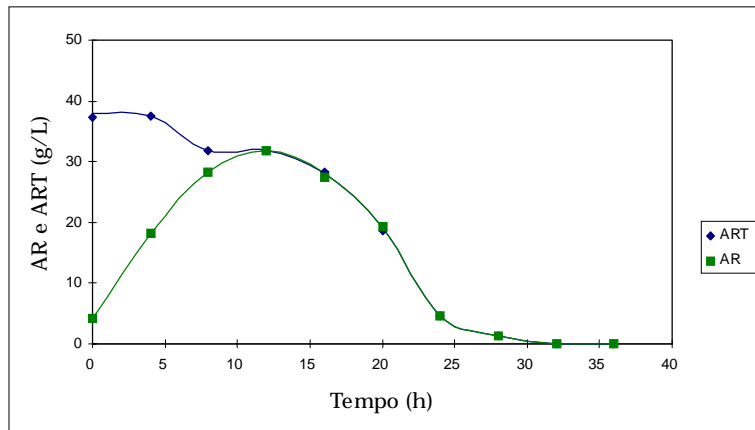


Figura 4.48 Consumo de substrato no ensaio F40-5.

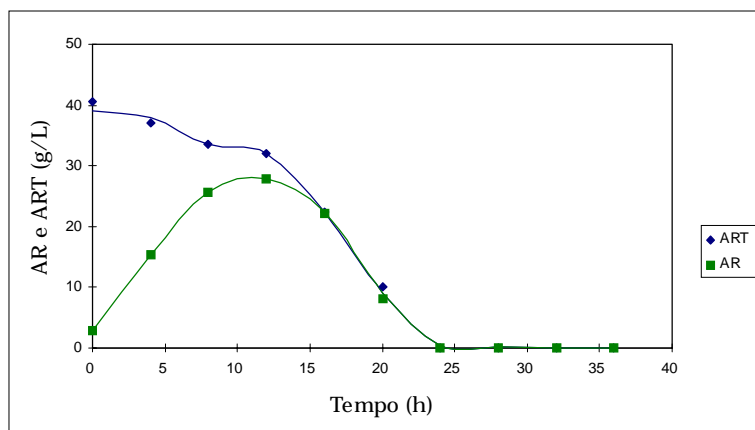


Figura 4.49 Consumo de substrato no ensaio F40-6.

As figuras 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54 e 4.55 apresentam as cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase nos ensaios F40-1, F40-2, F40-3, F40-4, F40-5 e F40-6, respectivamente, podendo-se perceber que a cinética de produção de glicoamilase é associada ao crescimento celular, como já foi destacado anteriormente, embora se observe ao final dos ensaios, um incremento na atividade enzimática após o término do crescimento celular.

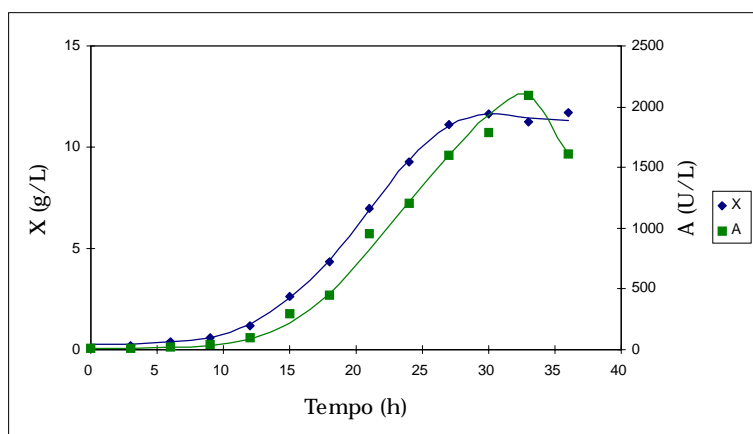


Figura 4.50 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-1.

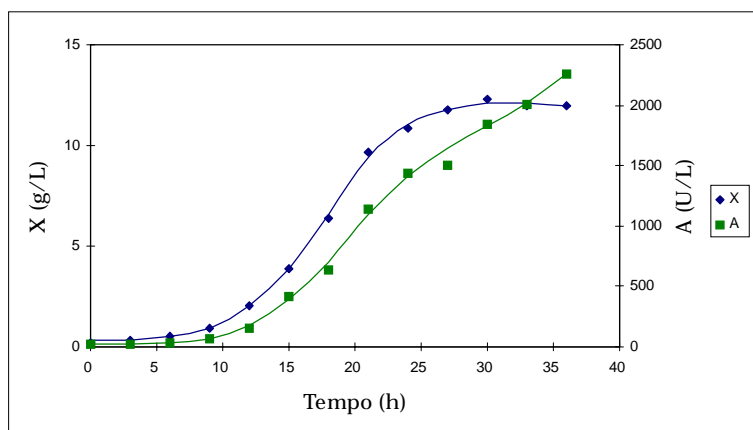


Figura 4.51 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-2.

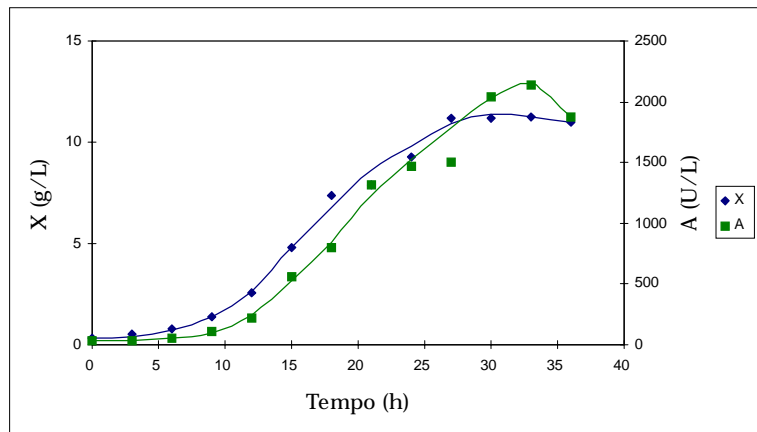


Figura 4.52 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-3.

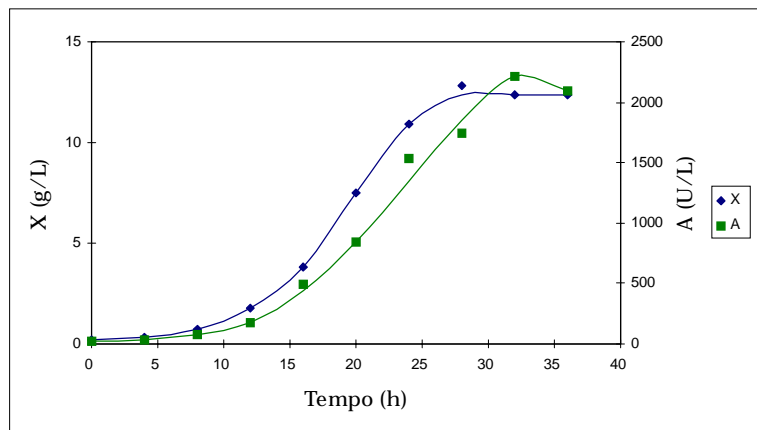


Figura 4.53 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-4.

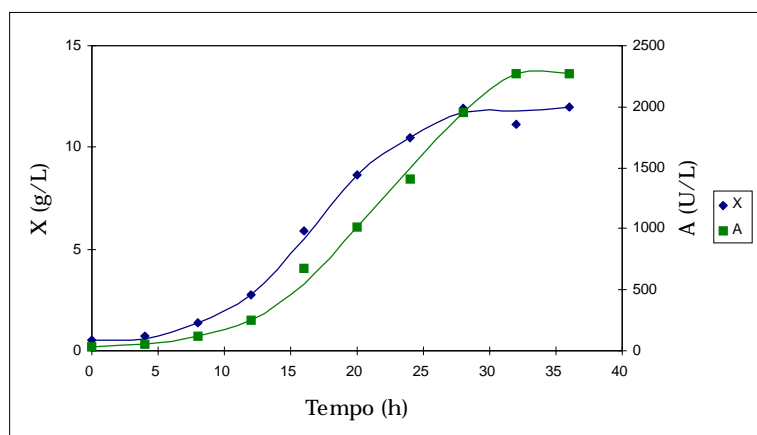


Figura 4.54 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-5.

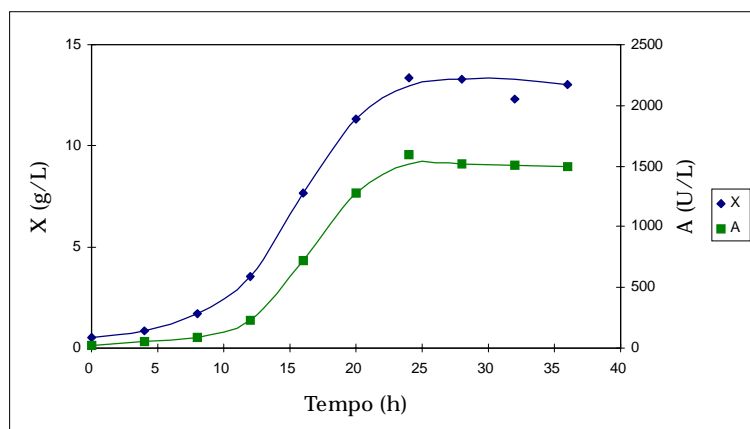


Figura 4.55 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio F40-6.

A tabela 4.9 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos ensaios do grupo F40.

Tabela 4.9 Resultados dos ensaios do grupo F40, realizados em fermentador.

Parâmetro	Ensaio					
	F40-1	F40-2	F40-3	F40-4	F40-5	F40-6
S_0 (g/L)	43,4	41,0	40,5	41,0	37,3	40,5
X_F (g/L)	11,62	12,32	11,19	12,80	11,15	13,39
t_F (h)	30	30	30	28	32	24
A_m (U/L)	2098	2264	2140	2215	2270	1592
t_m (h)	33	36	33	32	32	24
A_0 (U/L)	8	17	32	26	38	24
X_0 (g/L)	0,07	0,20	0,36	0,20	0,50	0,52
P_x (g/(L.h))	0,39	0,40	0,36	0,45	0,33	0,54
P_a (U/(L.h))	63	62	64	68	70	65
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,26	0,29	0,27	0,31	0,30	0,33
$Y_{A/s}$ (U/g)	48	55	52	53	60	39

Os ensaios F40-1 , F40-2 e F40-3 foram realizados com a suspensão de esporos em glicerol 20 %, conservada sob congelamento, conforme descrito no item 3.3.1. Os ensaios F40-4, F40-5 e F40-6,

devido à grande quantidade de suspensão de esporos utilizada, foram realizados com uma nova suspensão, preparada com Tween-40. As concentrações de esporos utilizadas nos ensaios F40-2 e F40-4 foram praticamente as mesmas, de forma que o ensaio F40-4 foi uma repetição do ensaio F40-2. Essa repetição foi feita a fim de se verificar se haveria influência da forma de preparo da suspensão de esporos utilizada no processo de produção de glicoamilase.

A tabela 4.9 mostra que, em termos de crescimento e produção de glicoamilase, esses dois ensaios foram semelhantes. Em ambos os casos foi atingida uma atividade enzimática de cerca de 2200 U/L e uma concentração celular de 12 g/L, aproximadamente. Dessa forma, as produtividades em células nos ensaios F40-2 e F40-4 foram semelhantes (0,40 g/(L.h) para o ensaio F40-2 e 0,45 g/(L.h) para o ensaio F40-4), o mesmo ocorrendo com as produtividades em glicoamilase (62 U/(L.h) para o ensaio F40-2 e 68 U/(L.h) para o ensaio F40-4). Essa comparação mostra que praticamente não houve influência do tipo de suspensão de esporos utilizada nos dois grupos de ensaios.

Nos ensaios do grupo F40, existiram algumas diferenças tanto no crescimento celular quanto na produção de glicoamilase. A figura 4.56 mostra uma comparação entre as cinéticas de crescimento nestes ensaios.

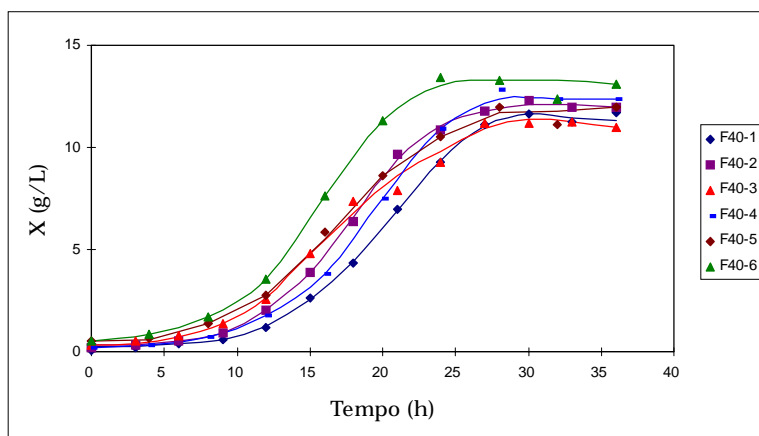


Figura 4.56 Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios do grupo F40.

O ensaio F40-1, cujo inóculo foi preparado com uma concentração mais baixa de esporos, apresentou uma cinética de crescimento mais lenta do que os demais ensaios, atingindo uma concentração celular de 11,62 g/L, cerca de 13 % inferior à concentração celular atingida no ensaio F40-6. O ensaio F40-6 apresentou uma cinética de crescimento mais rápida, atingindo uma concentração celular mais alta do que os outros ensaios (13,39 g/L). Durante todo o cultivo, o ensaio F40-6 apresentou um crescimento maior do que os outros ensaios. Os ensaios F40-2, F40-3, F40-4 e F40-5 apresentaram crescimento celular muito semelhante, atingindo uma concentração celular de cerca de 12 g/L. Assim, pode-se estabelecer uma faixa onde não existiu influência da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo (entre $9,5 \times 10^4$ esp/mL e $5,0 \times 10^6$ esp/mL) sobre o crescimento celular. A utilização de uma concentração de esporos menor no preparo do inóculo

($9,5 \times 10^3$ esp/mL, no ensaio F40-1) levou a um crescimento mais lento e a utilização de uma concentração mais alta ($1,8 \times 10^7$ esp/mL, no ensaio F40-6) conduziu a um crescimento celular mais rápido. Dessa forma, a produtividade em células foi maior no ensaio F40-6 (0,54 g/(L.h)) do que nos demais ensaios (entre 0,35 g/(L.h) e 0,45 g/(L.h)). O fator de conversão substrato a células atingiu valores muito semelhantes em todos os ensaios do grupo F40 (em torno de 0,30 g/g).

A figura 4.57 apresenta uma comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios do grupo F40. A produção final de glicoamilase foi praticamente a mesma nos ensaios F40-1, F40-2, F40-3, F40-4 e F40-5, nos quais a atividade enzimática atingiu entre 2100 U/L e 2200 U/L, embora a produção da enzima tenha sido mais lenta no ensaio F40-1, principalmente no início do cultivo. No ensaio com alta concentração de esporos (F40-6), a atividade enzimática foi 30 % mais baixa, atingindo apenas 1592 U/L. A figura 4.57 mostra que, até 20 horas de cultivo, a produção de glicoamilase era um pouco mais alta no ensaio F40-6 do que nos demais. No entanto, a partir das 24 horas de cultivo, com o término da fonte de carbono, a produção de enzima cessou. Dessa forma, a atividade enzimática atingida nesse ensaio foi menor do que a atingida nos ensaios com menor concentração de esporos, mostrando que a fonte de carbono foi utilizada preferencialmente para o crescimento e a manutenção das células ou,

eventualmente, para a síntese de metabólitos intermediários (favorecida pelo crescimento na forma de “pellets”), do que para a produção de glicoamilase. Assim, constata-se que o crescimento na forma de “pellets”, em fermentador, no ensaio F40-6 conduziu a uma menor produção de glicoamilase neste ensaio, em comparação com os outros ensaios, onde o crescimento ocorreu predominantemente na forma filamentosa. Esses fatos conduziram a um menor fator de conversão substrato a glicoamilase no ensaio F40-6 (39 U/g) do que nos demais ensaios (entre 50 U/g e 60 U/g, como mostra a tabela 4.9).

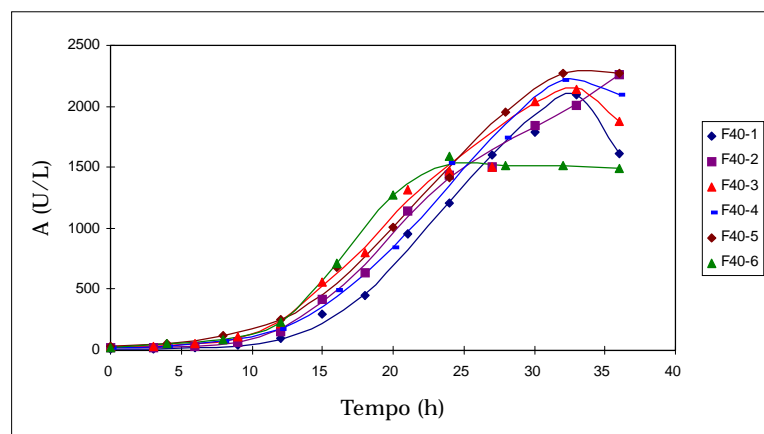


Figura 4.57 Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios do grupo F40.

Em termos de produtividade em glicoamilase, não houve diferenças significativas entre os ensaios pois o ensaio F40-6 atingiu a atividade enzimática máxima em 24 horas, enquanto os demais ensaios atingiram a atividade máxima em torno das 33 horas. As produtividades em glicoamilase ficaram entre 60 U/(L.h) e 70 U/(L.h) para todos os ensaios do grupo F40.

A tabela 4.10 apresenta as velocidades específicas de crescimento máximas atingidas nos ensaios do grupo F40, estimadas com base na equação 3.13.

Tabela 4.10 Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios do grupo F40.

Ensaio	μ_{\max} (h ⁻¹)	Equação	Fase exponencial
F40-1	0,19	$\ln X = 0,1958 (t-t_0) - 2,1091$ $r^2 = 0,9930$	entre 3 e 21 h
F40-2	0,19	$\ln X = 0,1938 (t-t_0) - 1,6939$ $r^2 = 0,9941$	entre 3 e 21 h
F40-3	0,19	$\ln X = 0,1865 (t-t_0) - 1,3127$ $r^2 = 0,9963$	entre 3 e 18 h
F40-4	0,20	$\ln X = 0,1988 (t-t_0) - 1,8856$ $r^2 = 0,9973$	entre 4 e 20 h
F40-5	0,16	$\ln X = 0,1626 (t-t_0) - 0,9709$ $r^2 = 0,9908$	entre 4 e 20 h
F40-6	0,17	$\ln X = 0,1669 (t-t_0) - 0,7803$ $r^2 = 0,9906$	entre 4 e 20 h

Os ensaios F40-1, F40-2, F40-3 e F40-4 atingiram praticamente a mesma velocidade específica de crescimento máxima (0,20 h⁻¹). Os ensaios F40-5 e F40-6, cujos inóculos foram preparados com altas concentrações de esporos, atingiram velocidades específicas de crescimento máximas cerca de 20 % menores (0,16 h⁻¹ para o ensaio F40-5 e 0,17 h⁻¹ para o ensaio F40-6). A análise da tabela 4.10 mostra que a fase exponencial de crescimento estendeu-se até 20 horas de cultivo, aproximadamente, para todos os ensaios do grupo F40, muito antes do término da fonte de carbono, devido à limitação pelo oxigênio, que ocorre nos ensaios com concentração inicial de substrato de

40 g/L. Nos ensaios do grupo F20, a fase exponencial estendeu-se até 18 horas de cultivo, praticamente durante todo o processo, devido ao fato de não existir limitação pelo oxigênio nos ensaios com concentração inicial de substrato de 20 g/L, como já foi destacado em trabalhos anteriores (FACCIOTTI, 1986).

A figura 4.58 apresenta os perfis de velocidades específicas de crescimento para os ensaios do grupo F40, mostrando que os ensaios F40-1, F40-2, F40-3 e F40-4 apresentam perfis semelhantes e os ensaios F40-5 e F40-6 apresentam velocidades específicas de crescimento menores, confirmando os valores de μ_{\max} apresentados na tabela 4.10.

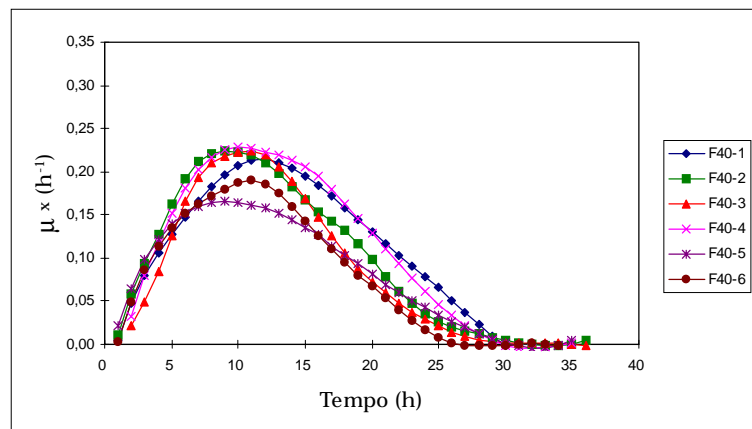


Figura 4.58 Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios do grupo F40.

A figura 4.59 apresenta os perfis de velocidades específicas de consumo de substrato para os ensaios do grupo F40. Os ensaios F40-1 e F40-2 apresentaram valores máximos mais altos do que os demais ensaios (1,80 g/(g.h), em torno de 8 horas de cultivo). O ensaio F40-3

apresentou uma velocidade específica de consumo de substrato mais baixa (1,30 g/(g.h), em torno de 8 horas de cultivo) enquanto os ensaios F40-4, F40-5 e F40-6 apresentaram baixas velocidades específicas de consumo de substrato (1,0 g/(g.h) para o ensaio F40-4; 0,45 g/(g.h) para o ensaio F40-5 e 0,50 g/(g.h) para o ensaio F40-6).

A figura 4.60 apresenta os perfis de velocidades específicas de produção de glicoamilase para os ensaios do grupo F40. Os ensaios F40-1 e F40-4 atingiram os maiores valores de velocidade específica de produção de glicoamilase (26 U/(g.h) para o ensaio F40-1 e 27 U/(g.h) para o ensaio F40-4). Os ensaios F40-2 e F40-3 atingiram valores menores de velocidade específica de produção de glicoamilase (20 U/(g.h) para o ensaio F40-2 e 24 U/(g.h) para o ensaio F40-3). O ensaio F40-5 atingiu uma velocidade específica de produção de 17 U/(g.h), cerca de 40 % menor do que as obtidas nos ensaios F40-1 e F40-4. O ensaio F40-6 também atingiu uma velocidade específica menor (19 U/(g.h)), cerca de 30 % menor do que as obtidas nos ensaios F40-1 e F40-4. Assim, a utilização de alta concentração de esporos no preparo do inóculo conduziu a uma queda nas velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de glicoamilase.

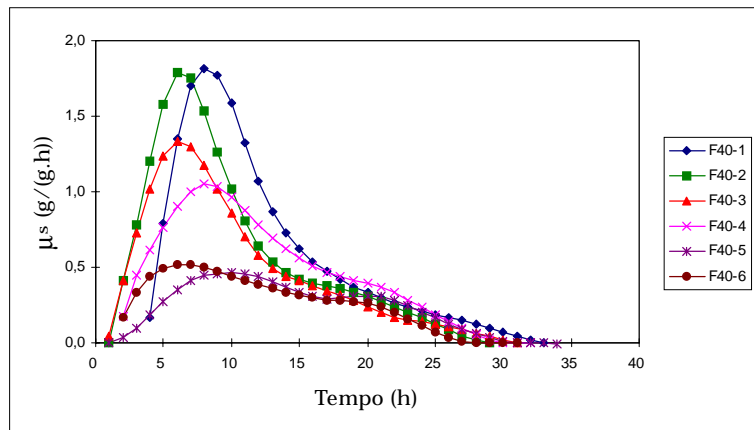


Figura 4.59 Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios do grupo F40.

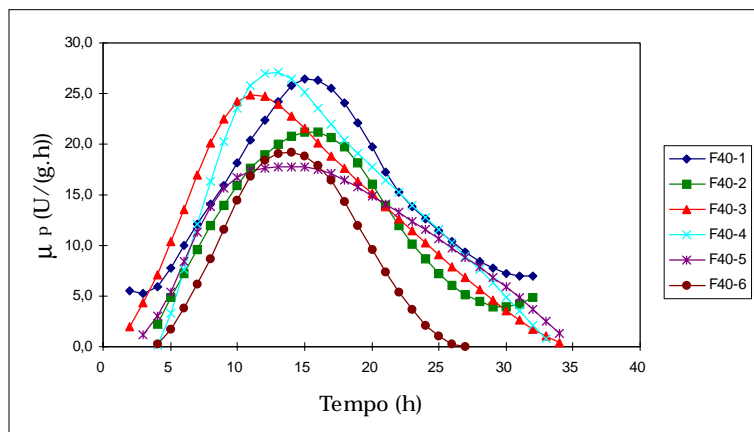


Figura 4.60 Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios do grupo F40.

Assim, nos ensaios do grupo F40, foi possível verificar a influência da concentração de esporos sobre a morfologia do inóculo e sobre a morfologia obtida em fermentador. A utilização de uma concentração muito alta de esporos ($1,8 \times 10^7$ esp/mL) gerou um inóculo com muitos aglomerados de esporos não germinados, os quais deram origem a “pellets”, no cultivo em fermentador. Essa forma de crescimento causou um crescimento celular maior e uma diminuição na

produção de glicoamilase e nas velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de glicoamilase, em fermentador. Para concentrações de esporos mais baixas (entre $9,5 \times 10^4$ esp/mL e $5,0 \times 10^6$ esp/mL), praticamente não houve influência do tamanho de inóculo sobre a morfologia obtida em fermentador e sobre a produção de glicoamilase. Para uma baixa concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo ($9,5 \times 10^3$ esp/mL), a cinética de crescimento foi mais lenta no início do cultivo, embora os valores finais de concentração celular e de atividade enzimática não tenham sido afetados.

Dessa forma, no processo de produção de glicoamilase por *Aspergillus*, deve-se evitar a inoculação de fermentadores com suspensões de células que apresentem muitos aglomerados de esporos não germinados, os quais originam “pellets” em fermentador, diminuindo a produção desta enzima. Deve-se evitar, portanto, a utilização de concentrações muito altas de esporos no preparo do inóculo. Para altas concentrações de esporos, ocorre uma auto-inibição à germinação, conforme descrito por BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.* (1989) e citado anteriormente no item 2.2.5, o que leva à formação de aglomerados de esporos não germinados, cuja presença no inóculo é indesejável. No entanto, a produção de glicoamilase não foi afetada pela concentração de esporos do inóculo entre $9,5 \times 10^4$ esp/mL e $5,0 \times 10^6$ esp/mL, o que representa uma faixa de trabalho ampla,

devendo-se observar que, para esta faixa, o crescimento celular, em fermentador, foi predominantemente filamentososo.

4.1.4 Comparação entre os inóculos dos ensaios em fermentador

Os inóculos utilizados nos ensaios F20-1, F20-2, F20-3, F40-1, F40-2 e F40-3 apresentaram-se na forma de uma suspensão de “pellets” pré-cultivados em incubador rotativo por 24 horas. Foi feita a caracterização dessas suspensões (dosagens de concentrações de AR, ART, atividade enzimática, concentração celular, medida do pH e diâmetro de “pellets”), que podem ser comparadas com os valores obtidos nos ensaios I-1, I-2 e I-3, com 24 horas de cultivo. A tabela 4.11 mostra as características dessas suspensões de células utilizadas para a inoculação dos fermentadores e os resultados obtidos em 24 horas de cultivo em incubador rotativo para os ensaios I-1, I-2 e I-3.

Tabela 4.11 Características dos inóculos utilizados nos ensaios em fermentador.

Parâmetro	Ensaio								
	9,5 x 10 ³ esp/mL			9,5 x 10 ⁴ esp/mL			9,5 x 10 ⁵ esp/mL		
	I-1	F20-1	F40-1	I-2	F20-2	F40-2	I-3	F20-3	F40-3
C_{esp}									
X_I (g/L)	1,47	0,11	1,60	3,22	0,90	2,91	4,86	4,48	5,09
pH _I	3,1	2,87	2,80	2,65	2,47	2,50	2,30	2,05	2,20
AR _I (g/L)	11,6	10,5	11,9	12,7	10,7	8,1	6,2	6,1	5,6
ART _I (g/L)	14,7	15,8	16,0	12,4	16,5	14,2	6,8	11,0	8,6
A _I (U/L)	166	66	76	173	115	186	299	442	326
D _I (mm)	0,84	1,60	1,60	0,96	1,23	1,14	1,04	0,74	0,80

Os dados da tabela anterior mostram que tanto a produção de glicoamilase quanto o crescimento celular, em incubador rotativo, são afetados pela concentração de esporos utilizada na inoculação dos frascos. Analisando-se os resultados obtidos em fermentador e discutidos anteriormente nos itens 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3, verifica-se que a produção de glicoamilase e a morfologia são mais influenciadas pelas condições do inóculo quando o cultivo é realizado em incubador rotativo do que quando o cultivo é realizado em fermentador. O fato de o efeito do tamanho de inóculo ser mais pronunciado em incubador rotativo do que em fermentador foi evidenciado por FRIEDRICH *et al.* (1990), no estudo da produção de enzimas pectinolíticas por *Aspergillus niger*. A causa para este fato está na diferença entre as condições de agitação e aeração nos cultivos em incubador rotativo e em fermentador. Em fermentador, a tensão de cisalhamento impede a aglomeração de esporos e de hifas, fazendo com que o crescimento ocorra na forma filamentosa. Em incubador rotativo, o menor cisalhamento leva a um crescimento na forma de “pellets”, exceto para concentrações de esporos muito altas, como ocorreu com os inóculos dos ensaios F40-5 e F40-6.

Em termos de concentração celular, a utilização de maior concentração de esporos levou a um maior crescimento. Com a utilização de $9,5 \times 10^3$ esp/mL, a concentração celular atingida em 24 horas de cultivo em incubador rotativo foi de cerca de 1,5 g/L, exceto para o inóculo do ensaio F20-1, onde foi obtida uma concentração

celular atípica, significativamente mais baixa (0,11 g/L). A utilização de $9,5 \times 10^4$ esp/mL levou a uma concentração celular de cerca de 3,0 g/L, exceto no inóculo do ensaio F20-2, onde foi obtida uma concentração celular significativamente menor (0,90 g/L). A utilização de $9,5 \times 10^5$ esp/mL levou a uma concentração de, aproximadamente, 5,0 g/L de células em 24 horas de cultivo em incubador rotativo.

O consumo global de substrato foi maior nos ensaios inoculados com maior concentração de esporos, restando entre 7 g/L e 11 g/L de açúcares redutores totais, após 24 horas de cultivo. Nos ensaios com baixa concentração de esporos, devido ao menor crescimento celular em 24 horas de cultivo, a concentração de açúcares redutores totais ficou entre 15 g/L e 16 g/L.

De uma forma geral, a tabela 4.11 mostra que, utilizando-se baixa concentração de esporos no inóculo ($9,5 \times 10^3$ esp/mL), ocorreu o crescimento de “pellets” grandes (1,6 mm) e a produção de glicoamilase foi baixa (em torno de 70 U/L). A utilização de alta concentração de esporos ($9,5 \times 10^5$ esp/mL) levou à formação de “pellets” menores (0,8 mm) e alta produção de glicoamilase em incubador rotativo (entre 300 U/L e 400 U/L). No entanto, isso não ocorreu no ensaio I-1, no qual foram obtidos “pellets” pequenos (0,84 mm) embora a concentração de esporos utilizada tenha sido baixa ($9,5 \times 10^3$ esp/mL). Nesse ensaio, porém, foi obtida uma atividade enzimática alta (166 U/L). Analisando-se os ensaios do grupo I, a relação entre a concentração de

esporos no inóculo e o diâmetro de “pellets” obtidos em 24 horas de cultivo em incubador rotativo não fica clara, devido a muitas flutuações no diâmetro de “pellets” para estes ensaios (figuras 4.1, 4.2 e 4.3). No entanto, os outros ensaios mostram que a utilização de baixa concentração de esporos no inóculo conduz à formação de “pellets” grandes, em 24 horas de cultivo em incubador rotativo, e baixa produção de glicoamilase; por outro lado, alta concentração de esporos no inóculo conduz à formação de “pellets” pequenos e alta produção de glicoamilase.

As figuras 4.61, 4.62 e 4.63 mostram os “pellets” obtidos em 24 horas de cultivo em incubador rotativo, para três concentrações de esporos diferentes utilizadas na inoculação dos frascos. O “pellet” mostrado na figura 4.61 foi produzido, utilizando-se uma concentração de esporos de $9,5 \times 10^3$ esp/mL. Na figura 4.62, foi utilizada uma concentração de $9,5 \times 10^4$ esp/mL e na figura 4.63 foi utilizada uma concentração de $9,5 \times 10^5$ esp/mL. As três fotos mostradas possuem a mesma ampliação. Essas figuras mostram com clareza a relação entre o tamanho de “pellets” e a concentração de esporos em cultivos em incubador rotativo.

Como foi citado anteriormente, em incubador rotativo, a produção de glicoamilase é maior quando ocorre a formação de “pellets” pequenos. Os “pellets” de dimensões maiores levam a baixas produções de glicoamilase. Essa tendência é mostrada na figura 4.64, que foi

construída com os dados da tabela 4.11. Essa figura representa a relação entre a atividade enzimática obtida em 24 horas de cultivo em incubador rotativo e o diâmetro médio dos “pellets” presentes nessa suspensão de células.

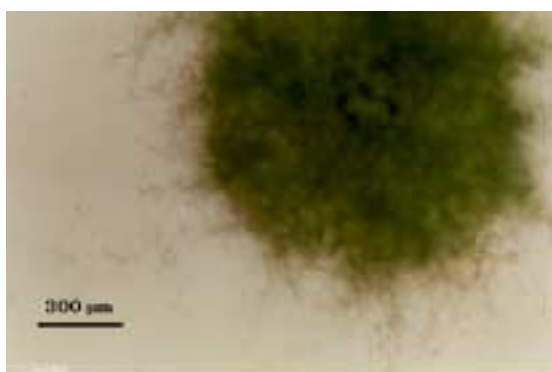


Figura 4.61 “Pellet” obtido com uma concentração de esporos de $9,5 \times 10^3$ esp/mL.

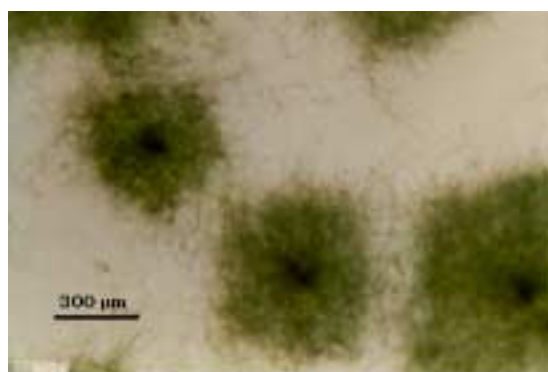


Figura 4.62 “Pellets” obtidos com uma concentração de esporos de $9,5 \times 10^4$ esp/mL.

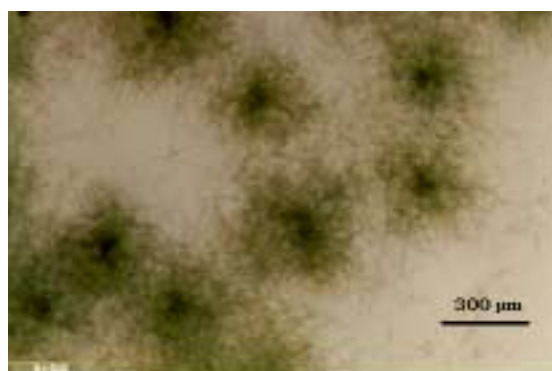


Figura 4.63 “Pellets” obtidos com uma concentração de esporos de $9,5 \times 10^5$ esp/mL.

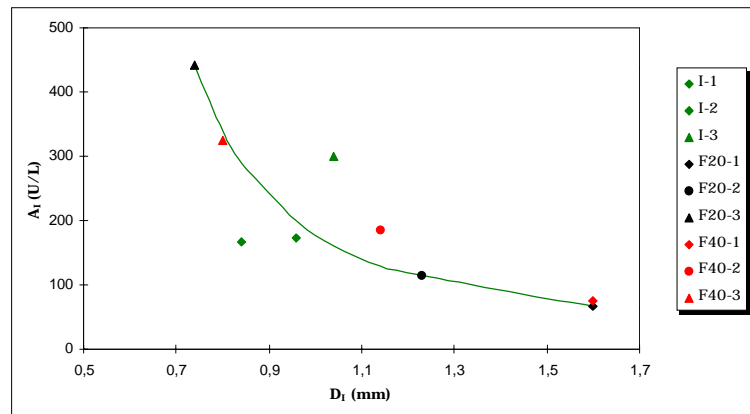


Figura 4.64 Atividade enzimática em função do diâmetro de “pellets” em 24 horas de cultivo em incubador rotativo.

4.2 Influência da forma de preparo do inóculo no processo de produção de glicoamilase

Como foi destacado no item 4.1, a presença de aglomerados de esporos no meio de cultura conduz à formação de “pellets”, em cultivos de *Aspergillus awamori*, provocando uma diminuição na produção de glicoamilase. Assim, foram estudadas algumas formas de preparo do inóculo, procurando-se evitar a formação de “pellets” em fermentador. Um dos fatores que influenciam a aglomeração de esporos e a formação de “pellets” é o pH do meio de cultura durante a germinação dos esporos, conforme já foi citado anteriormente (CARLSEN *et al.*, 1996). Dessa forma, a influência do pH durante a germinação de esporos na morfologia do microrganismo e na produção de glicoamilase foi estudada.

4.2.1 Influência das condições de germinação na agregação de esporos e na formação de “pellets”, em incubador rotativo

Inicialmente, foram realizados alguns testes em incubador rotativo a fim de se determinar o tempo necessário para o início da germinação dos esporos. Alguns frascos contendo meio de cultura preparado conforme o item 3.2.2, com o pH ajustado em 2,5 foram inoculados com esporos ($C_{\text{esp}} = 9,5 \times 10^4$ esp/mL) e o cultivo foi realizado em incubador rotativo a 200 rpm e 35 °C. Outros frascos contendo meio de cultura com o pH ajustado em 5,5 também foram utilizados. Foi efetuado um acompanhamento microscópico durante o cultivo a fim de se determinar o tempo de germinação de esporos e o efeito do pH na aglomeração de esporos e na formação de “pellets”.

As figuras 4.65 e 4.66 mostram o cultivo nos dois valores de pH, duas horas após a inoculação. A pH 2,5 quase não houve a formação de aglomerados de esporos. Os esporos apareciam isolados ou em aglomerados de três ou quatro esporos, como mostra a figura 4.65. No cultivo a pH 5,5 houve a formação de aglomerados de esporos com a formação de grumos, como mostra a figura 4.66.

Em torno de sete horas de cultivo, começou a ocorrer a germinação dos esporos tanto no cultivo a pH 2,5 como no cultivo a pH 5,5. Essa germinação se iniciou com um aumento nas dimensões dos esporos e, em seguida, com o surgimento dos tubos germinativos. A

figura 4.67 mostra o cultivo a pH 2,5 com sete horas de cultivo, onde se pode perceber que existiam alguns esporos expandindo o seu tamanho e iniciando o processo de germinação. A figura 4.68 mostra o cultivo a pH 5,5. Nesse caso, os aglomerados presentes se mostravam bem maiores do que no cultivo a pH 2,5.

Prosseguindo o cultivo até 24 horas após a inoculação, o crescimento ocorreu predominantemente na forma filamentosa a pH 2,5, praticamente sem a presença de “pellets”. A pH 5,5 o crescimento ocorreu quase que totalmente na forma de “pellets”, sem a presença de micélio livre. Esses fatos são mostrados nas figuras 4.69 e 4.70, onde se percebe claramente o efeito do pH na morfologia obtida em incubador rotativo.

As observações microscópicas mostraram que os esporos germinam com velocidades diferentes. Enquanto alguns esporos se encontram em estágios mais avançados de germinação, com a presença dos tubos germinativos, outros ainda não iniciaram o processo de expansão. Esse fato é mostrado na figura 4.68. À medida que os “pellets” são formados, os esporos que ainda não germinaram ficam presos no interior das hifas, formando o núcleo dos “pellets”. O crescimento do “pellet” ocorre ao redor deste núcleo de esporos.

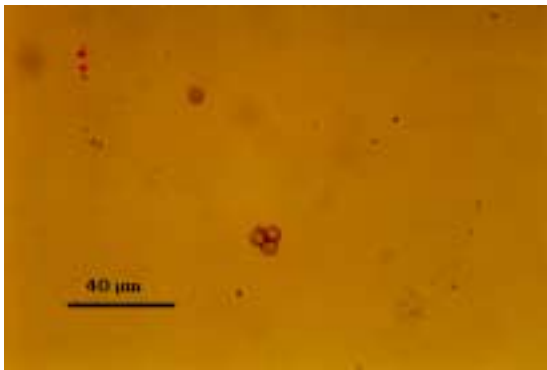


Figura 4.65 Esporos com 2 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 2,5.

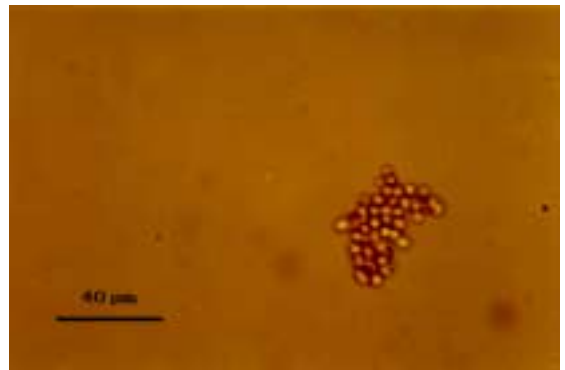


Figura 4.66 Esporos com 2 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 5,5.



Figura 4.67 Esporos com 7 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 2,5.

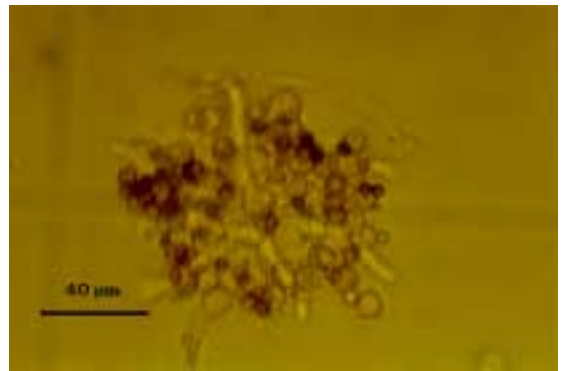


Figura 4.68 Esporos com 7 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 5,5.

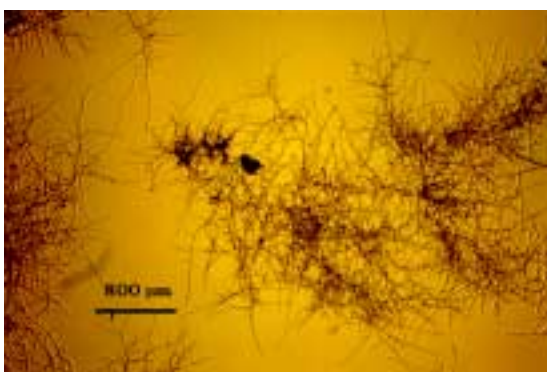


Figura 4.69 Micélio com 24 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 2,5.

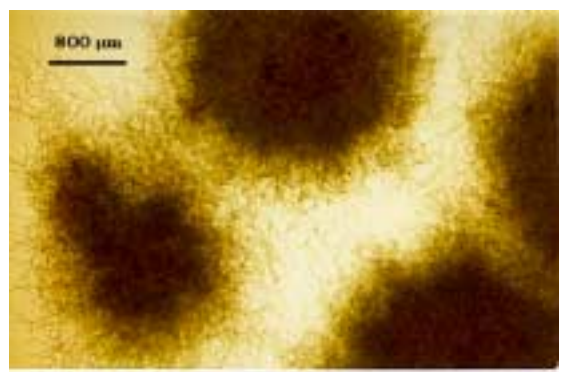


Figura 4.70 "Pellets" com 24 horas de cultivo em incubador rotativo a pH 5,5.

Essa diferença na velocidade de germinação é aparentemente causada por um processo de auto-inibição causada por altas concentrações de esporos. Quando existem esporos muito próximos uns dos outros, ocorre essa auto-inibição e apenas uma parte deles consegue germinar, como foi mostrado por BARRIOS-GONZÁLEZ *et al.* (1989). No caso da formação de aglomerados, essa inibição é mais intensa, o que leva à formação do núcleo ao redor do qual se forma o “pellet”. A baixos valores de pH, não ocorre aglomeração de esporos e essa inibição é menos pronunciada, levando a um crescimento na forma filamentosa, sem a formação de “pellets”.

4.2.2 Ensaio realizados em fermentador, com $S_0 = 20$ g/L (Grupo G)

A fim de se verificar a influência da forma de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na produção de glicoamilase, foram realizados alguns ensaios em fermentador, com concentração inicial de substrato de 20 g/L. A forma de preparo do inóculo de cada ensaio do grupo G está descrita no item 3.3.3c.

4.2.2.1 Ensaio G-1, G-2 e G-3

Os ensaios G-1, G-2 e G-3 foram realizados com o objetivo de se determinar a influência do pH na aglomeração de esporos durante a germinação em fermentador, na morfologia obtida e na produção de

glicoamilase.

A tabela 4.12 apresenta um resumo da forma de preparo do inóculo, da morfologia do inóculo (morfologia no final da etapa de germinação) e da morfologia obtida em fermentador, na etapa de crescimento, para os ensaios G-1, G-2 e G-3. A rigor, no ensaio G-1, não se deveria considerar a morfologia obtida no final da etapa de germinação como sendo a morfologia do inóculo. No entanto, este termo foi utilizado a fim de se comparar os ensaios G-1, G-2 e G-3.

Tabela 4.12 Forma de preparo do inóculo, morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador, nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

Ensaio	Forma de preparo do inóculo	Morfologia do inóculo (final da etapa de germinação)	Morfologia em fermentador, na etapa de crescimento
G-1	Esporos germinados em fermentador, em 10 L de meio de cultura, por 7 horas, a 700 rpm, 1 vvm, 35 °C e pH 4,0.	Esporos isolados no início da germinação.	Predominantemente filamentosa durante toda a etapa de crescimento, sem a presença de “pellets”.
G-2	Esporos germinados em fermentador, em 2 L de meio de cultura, por 7 horas, a 700 rpm, sem aeração, 35 °C e pH 2,5.	Esporos isolados no início da germinação.	Predominantemente filamentosa durante toda a etapa de crescimento, sem a presença de “pellets”.
G-3	Esporos germinados em fermentador, em 2 L de meio de cultura, por 7 horas, a 700 rpm, sem aeração, 35 °C e pH 5,5.	Esporos isolados no início da germinação.	Predominantemente filamentosa durante toda a etapa de crescimento, sem a presença de “pellets”.

Apesar de terem sido utilizados diferentes valores de pH durante a etapa de germinação dos esporos, não se observou a formação de aglomerados de esporos, devido ao alto cisalhamento no interior do reator. Assim, no final da etapa de germinação, as morfologias obtidas nos três ensaios eram semelhantes, com a presença de esporos isolados no início da germinação, sem aglomerados. Dessa forma, o crescimento ocorreu predominantemente na forma filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets”, nos três ensaios realizados.

As figuras 4.71, 4.72 e 4.73 apresentam a morfologia de crescimento obtida nos ensaios G-1, G-2 e G-3, respectivamente, após 18 horas de cultivo em fermentador (etapa de crescimento). Nestas fotos é possível perceber que o crescimento ocorreu predominantemente na forma filamentosa, sem a presença de “pellets” para os três ensaios.

Nestes ensaios, foram determinadas as características reológicas do caldo de fermentação. Apesar de não ter sido observada a formação de “pellets”, através de análise microscópica, nos ensaios G-1, G-2 e G-3, durante a etapa de crescimento, o valor máximo do índice de consistência (K) obtido para o ensaio G-3 foi de $314 \text{ cP}\cdot\text{s}^{\text{n}-1}$, menor do que os valores obtidos nos ensaios G-1 ($479 \text{ cP}\cdot\text{s}^{\text{n}-1}$) e G-2 ($531 \text{ cP}\cdot\text{s}^{\text{n}-1}$), o que poderia ser indicativo da presença de “pellets”. A figura 4.74 mostra a variação do índice de consistência (K) e a figura 4.75 apresenta a variação do índice de comportamento do escoamento (n) em função do tempo de cultivo para os ensaios G-1, G-2 e G-3.

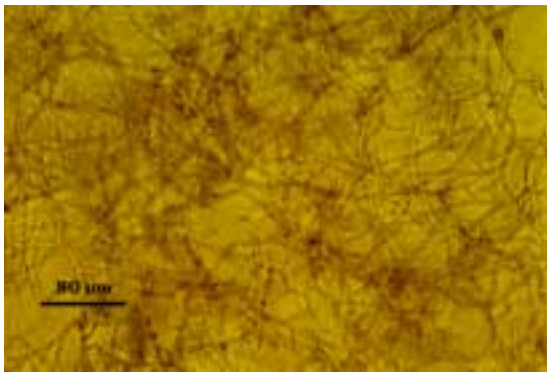


Figura 4.71 Crescimento na forma filamentosa no ensaio G-1, após 18 horas de cultivo em fermentador.

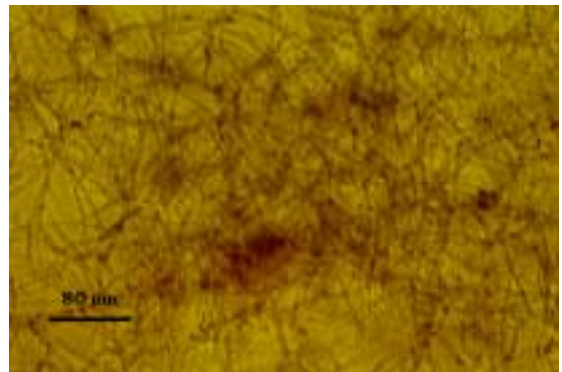


Figura 4.72 Crescimento na forma filamentosa no ensaio G-2, após 18 horas de cultivo em fermentador.

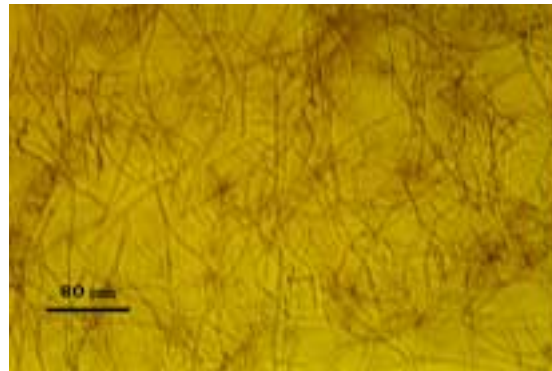


Figura 4.73 Crescimento na forma filamentosa no ensaio G-3, após 18 horas de cultivo em fermentador.

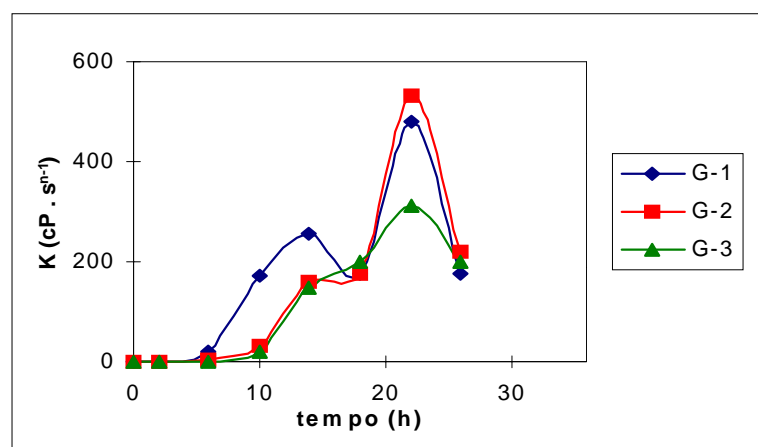


Figura 4.74 Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

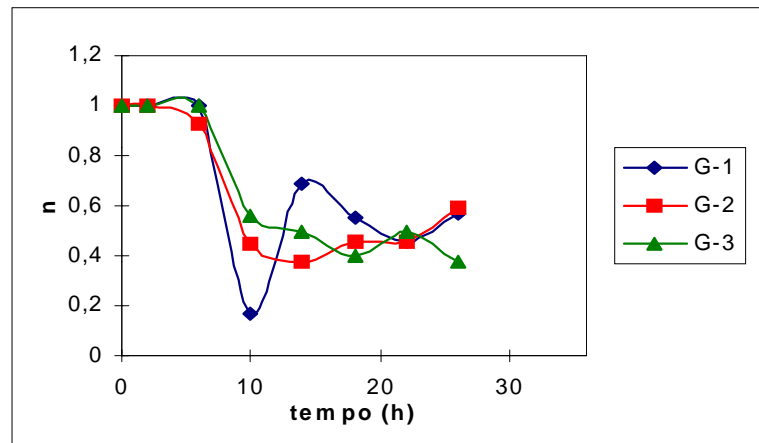


Figura 4.75 Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

As figuras 4.76, 4.77 e 4.78 apresentam as curvas de consumo de substrato para esses ensaios realizados. Os perfis de consumo de substrato foram muito semelhantes para os três ensaios, com o término da fonte de carbono em torno de 24 horas de cultivo. Assim, os mecanismos de indução e de repressão atuaram de forma semelhante nos três ensaios.

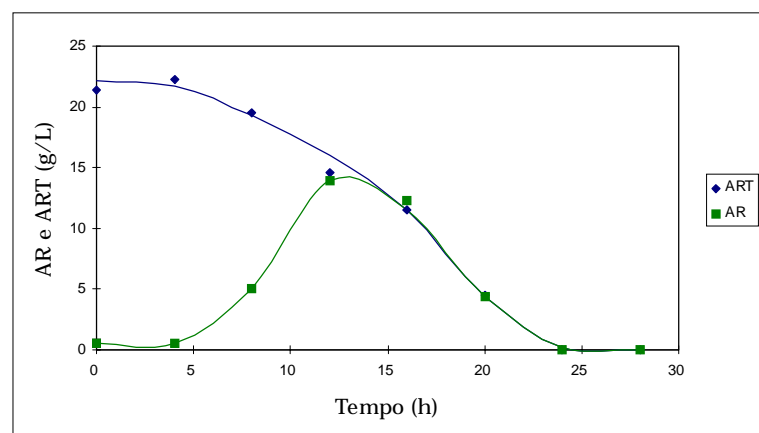


Figura 4.76 Consumo de substrato no ensaio G-1.

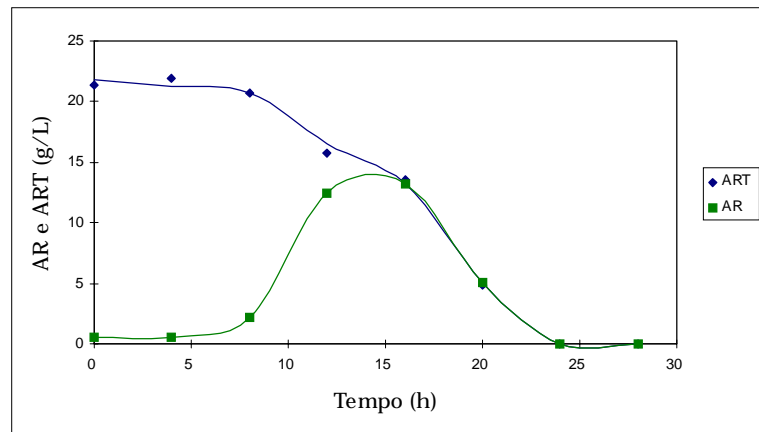


Figura 4.77 Consumo de substrato no ensaio G-2.

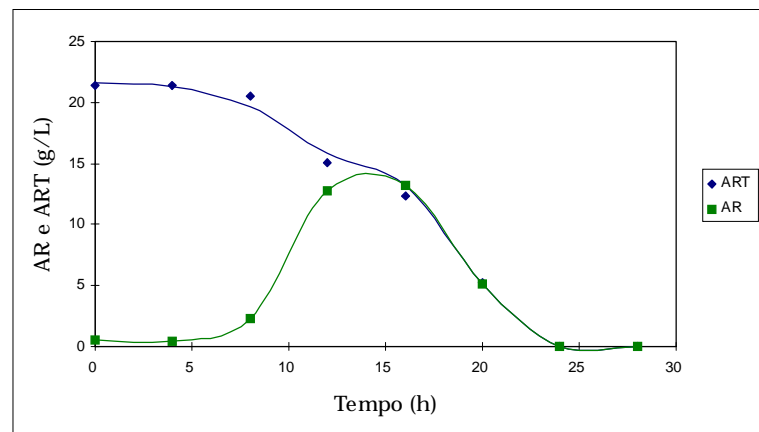


Figura 4.78 Consumo de substrato no ensaio G-3.

As figuras 4.79, 4.80 e 4.81 apresentam as cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase para os ensaios G-1, G-2 e G-3. O tempo de cultivo refere-se apenas à etapa de crescimento, isto é, após o período de 7 horas para o início da germinação dos esporos. Como já foi observado nos ensaios anteriores, os perfis de concentração celular e de produção de glicoamilase mostram uma produção associada ao crescimento celular.

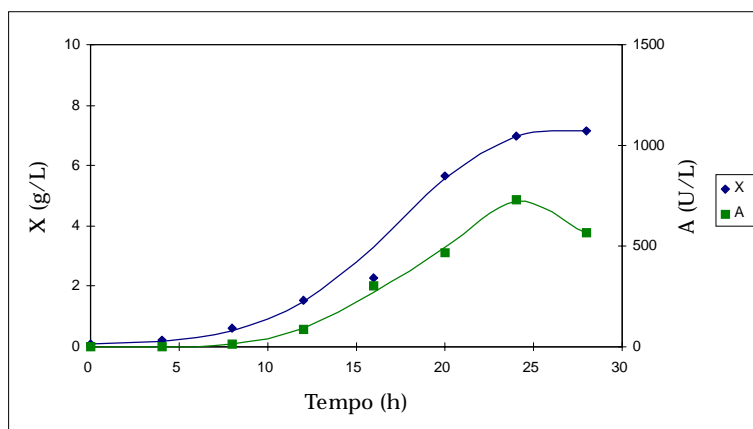


Figura 4.79 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-1.

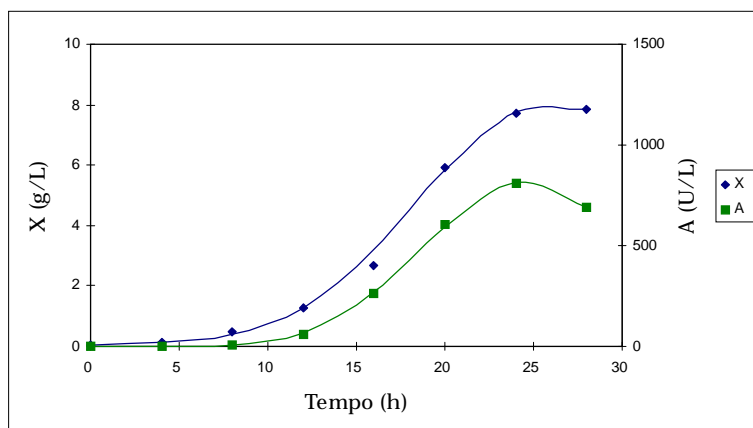


Figura 4.80 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-2.

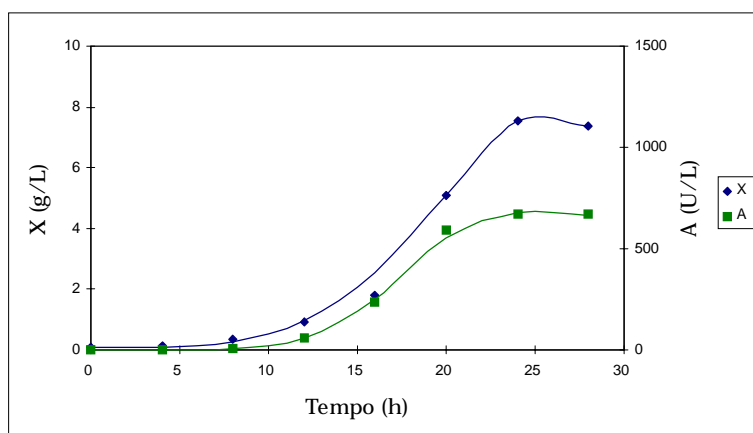


Figura 4.81 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-3.

A tabela 4.13 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

Tabela 4.13 Resultados dos ensaios G-1, G-2 e G-3, realizados em fermentador.

Parâmetro	Ensaio		
	G-1	G-2	G-3
pH_{germ}	4,0	2,5	5,5
pH_{cresc}	4,0	4,0	4,0
S_0 (g/L)	21,4	21,4	21,4
X_F (g/L)	6,97	7,73	7,56
t_F (h)	24	24	24
A_m (U/L)	733	812	670
t_m (h)	24	24	24
A_0 (U/L)	0	0	0
X_0 (g/L)	0,08	0,05	0,10
P_x (g/(L.h))	0,29	0,32	0,31
P_a (U/(L.h))	30,5	33,8	27,9
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,33	0,36	0,35
$Y_{A/s}$ (U/g)	34	38	31

A figura 4.82 apresenta a comparação entre as cinéticas de crescimento nestes ensaios. As curvas de crescimento celular mostraram perfis muito semelhantes para os três ensaios. As máximas concentrações celulares atingidas foram de 6,97 g/L para o ensaio G-1, 7,73 g/L para o ensaio G-2 e 7,56 g/L para o ensaio G-3. O tempo de cultivo (etapa de crescimento) foi de 24 horas para os três ensaios. Assim, as produtividades em células atingiram valores praticamente iguais para os três ensaios (em torno de 0,30 g/(L.h)). Da mesma forma, os fatores de conversão substrato a células foram semelhantes nos três ensaios (cerca de 0,35 g/g).

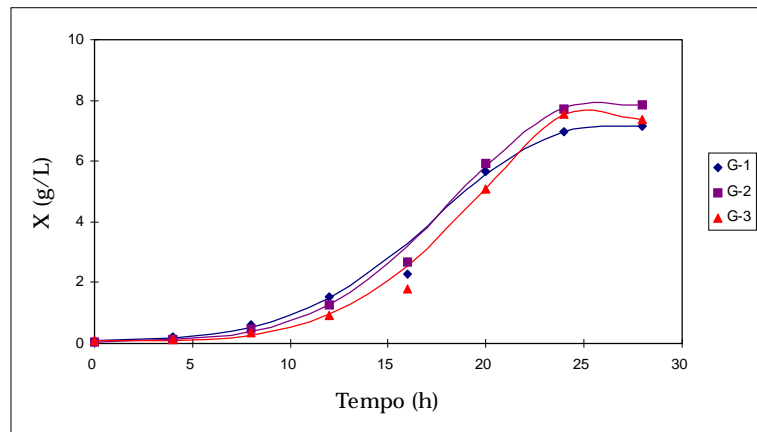


Figura 4.82 Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

A figura 4.83 apresenta uma comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

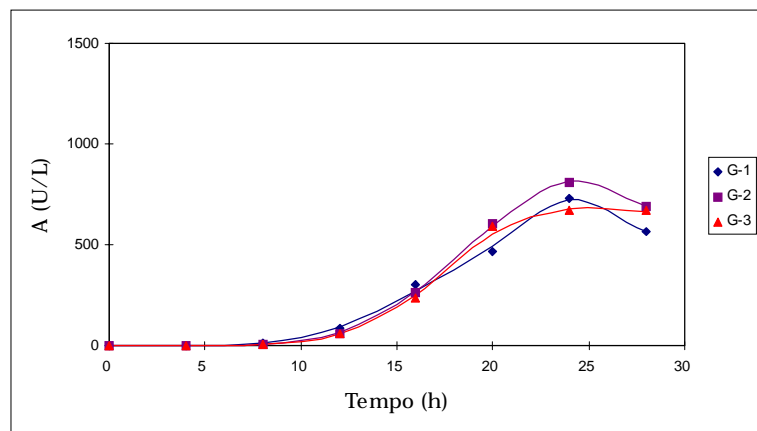


Figura 4.83 Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

A atividade enzimática atingiu valores um pouco mais altos no ensaio G-2 (812 U/L), cerca de 21 % maior do que a atingida no ensaio G-3 (670 U/L). O ensaio G-1, onde a germinação ocorreu a pH 4,0, atingiu um valor de atividade intermediário (733 U/L). Os perfis de

atividade enzimática (figura 4.83) foram muito semelhantes até as 20 horas de cultivo, aproximadamente. A partir das 20 horas, ocorreu uma queda na velocidade de produção de glicoamilase no ensaio G-3, o que conduziu a uma produção final menor neste ensaio. Com isso, a produtividade em glicoamilase ficou um pouco mais alta no ensaio G-2 (33,8 U/(L.h)) do que nos demais ensaios (30,5 U/(L.h) para o ensaio G-1 e 27,9 U/(L.h) para o ensaio G-3), o mesmo ocorrendo em relação ao fator de conversão substrato a glicoamilase (34 U/g para o ensaio G-1, 38 U/g para o ensaio G-2 e 31 U/g para o ensaio G-3).

A tabela 4.14 apresenta as velocidades específicas de crescimento máximas atingidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

Tabela 4.14 Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

Ensaio	μ_{\max} (h ⁻¹)	Equação	Fase exponencial
G-1	0,19	$\ln X = 0,1929 (t-t_0) - 2,1096$ $r^2 = 0,9834$	entre 4 e 20 h
G-2	0,20	$\ln X = 0,2038 (t-t_0) - 2,2782$ $r^2 = 0,9977$	entre 8 e 20 h
G-3	0,21	$\ln X = 0,2170 (t-t_0) - 2,7643$ $r^2 = 0,9960$	entre 4 e 20 h

As velocidades específicas de crescimento máximas obtidas também foram semelhantes nos três ensaios, atingindo valores da ordem de 0,20 h⁻¹. A fase exponencial estendeu-se até 20 horas de cultivo, praticamente até o final do processo, devido ao fato de não existir limitação pelo oxigênio em ensaios com concentração inicial de

substrato de 20 g/L, como já foi citado anteriormente.

As figuras 4.84, 4.85 e 4.86 apresentam as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de produção de glicoamilase nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

As curvas de velocidades específicas de crescimento celular dos ensaios G-1, G-2 e G-3 foram semelhantes, atingindo os mesmos valores máximos, em torno de $0,20 \text{ h}^{-1}$, coerentes com os valores de μ_{max} apresentados na tabela 4.14. No entanto, para o ensaio G-3, a velocidade específica de crescimento apresentou valores mais baixos do que os outros ensaios até, aproximadamente, 12 horas de cultivo, o que poderia indicar a presença de alguns “pellets” no início do cultivo, apesar de estes não terem sido observados na análise microscópica.

O ensaio G-1 atingiu uma velocidade específica de consumo de substrato máxima de $1,9 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{h})$, mais alta do que as velocidades específicas de consumo atingidas nos demais ensaios ($1,0 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ para o ensaio G-2 e $1,45 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ para o ensaio G-3).

Quanto à velocidade específica de produção de glicoamilase, obtiveram-se valores máximos semelhantes nos três ensaios (entre 25 e $30 \text{ U}/(\text{g}\cdot\text{h})$).

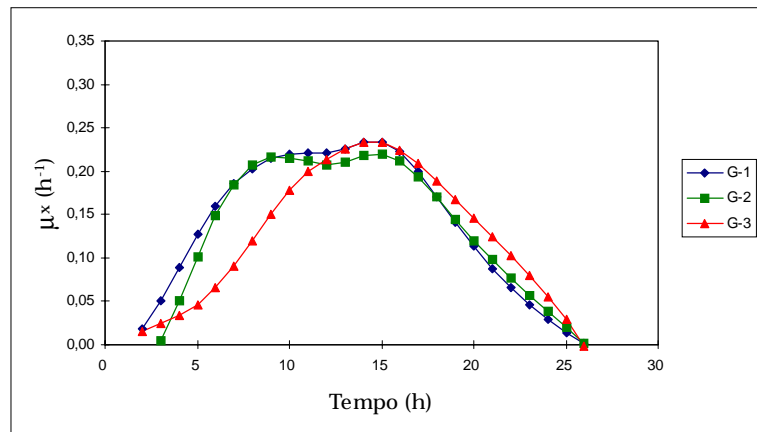


Figura 4.84 Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

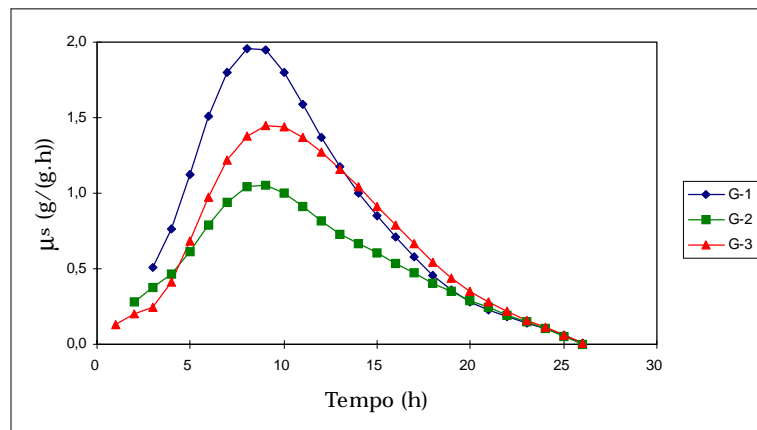


Figura 4.85 Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

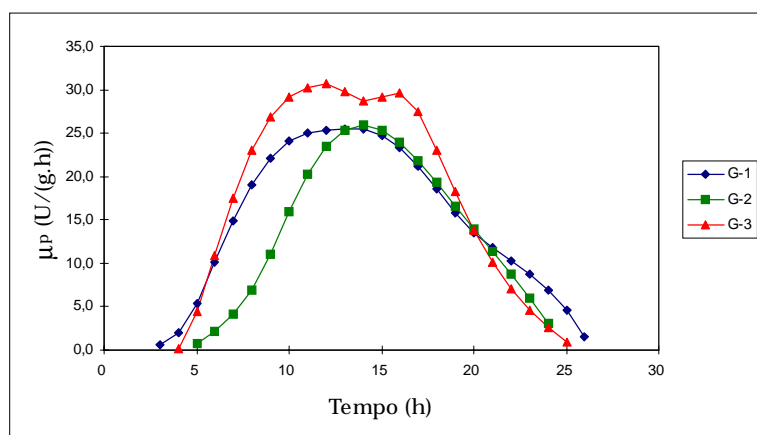


Figura 4.86 Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

Assim, apesar de terem sido utilizadas diferentes condições de germinação de esporos, o alto cisalhamento no reator impediu que houvesse a formação de aglomerados de esporos, mesmo no caso de a germinação ter sido conduzida a pH 5,5. Dessa forma não houve a formação de “pellets” e o crescimento ocorreu predominantemente na forma filamentosa, nos três ensaios. Esse fato levou a processos muito semelhantes, embora a produção final de glicoamilase tenha sido cerca de 21 % mais alta no ensaio G-2, no qual a germinação ocorreu a pH 2,5 , do que no ensaio G-3, no qual a germinação de esporos foi efetuada a pH 5,5.

4.2.2.2 Ensaios G-4, G-5 e G-6

Como foi destacado anteriormente, a frequência de agitação alta no fermentador impediu a agregação de esporos durante a etapa de germinação e a formação de “pellets”, mesmo utilizando-se pH 5,5. Dessa forma, não foi possível a observação de diferenças significativas entre as morfologias de crescimento obtidas nos ensaios G-1, G-2 e G-3.

Assim, foram realizados novos ensaios em fermentador (ensaios G-4, G-5 e G-6), conduzindo-se a etapa de germinação em incubador rotativo, onde o cisalhamento é menor e, portanto, o efeito do pH sobre a aglomeração de esporos é mais pronunciado do que em fermentador, como foi destacado no item 4.2.1. Os inóculos foram preparados conforme o item 3.3.3c.

A tabela 4.15 apresenta um resumo da forma de preparo do inóculo, da morfologia do inóculo e da morfologia obtida em fermentador, nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

Tabela 4.15 Forma de preparo do inóculo, morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador, nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

Ensaio	Forma de preparo do inóculo	Morfologia do inóculo	Morfologia em fermentador
G-4	Suspensão de células pré-cultivadas em incubador rotativo por 24 horas a 35 °C, 200 rpm e pH 5,0 no início do cultivo.	Suspensão de “pellets” de 0,59 mm de diâmetro médio e atividade enzimática de 490 U/L.	Predominantemente na forma de “pellets” durante todo o cultivo.
G-5	Esporos germinados em incubador rotativo, por 7 horas, a 200 rpm, 35 °C e pH 2,5.	Esporos isolados no início da germinação.	Filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
G-6	Esporos germinados em incubador rotativo, por 7 horas, a 200 rpm, 35 °C e pH 5,5.	Aglomerados de esporos no início da germinação.	Predominantemente na forma de “pellets” durante todo o cultivo.

Realizando-se, pois, a etapa de germinação em incubador rotativo, foi possível a obtenção de inóculos em condições distintas. O inóculo utilizado no ensaio G-4 era composto por “pellets” pequenos (0,59 mm). O inóculo utilizado no ensaio G-5, no qual a germinação foi realizada a pH 2,5, continha esporos isolados no início da germinação e o inóculo utilizado no ensaio G-6, onde a germinação foi realizada a pH 5,5, continha aglomerados de esporos no início do processo de

germinação.

Essas diferentes condições dos inóculos conduziram a morfologias distintas em fermentador. No ensaio G-4, inoculado com uma suspensão de “pellets” pequenos, o crescimento ocorreu na forma de “pellets”, em fermentador, durante praticamente todo o cultivo. No ensaio G-5, a presença de esporos isolados, no inóculo, conduziu a um crescimento predominantemente na forma filamentosa, em fermentador. A presença de aglomerados de esporos no inóculo do ensaio G-6 conduziu à formação de “pellets”, em fermentador, neste ensaio. Apesar de terem sido feitas observações microscópicas durante todo o cultivo nos ensaios G-4, G-5 e G-6, não foi possível a obtenção de fotos nestes ensaios.

A figura 4.87 mostra a variação do índice de consistência do fluido (K) e a figura 4.88 apresenta a variação do índice de comportamento do escoamento (n), em função do tempo de cultivo para os ensaios G-4, G-5 e G-6. A análise dos parâmetros reológicos mostra que o índice de consistência atingiu valores muito mais altos no ensaio G-5 ($2700 \text{ cP}\cdot\text{s}^{n-1}$) do que nos outros dois ensaios ($1186 \text{ cP}\cdot\text{s}^{n-1}$ no ensaio G-4 e $764 \text{ cP}\cdot\text{s}^{n-1}$ no ensaio G-6). Os valores de K obtidos, principalmente nos ensaios G-4 e G-5, mostraram-se muito mais altos do que os obtidos nos ensaios G-1, G-2 e G-3 (entre 300 e $500 \text{ cP}\cdot\text{s}^{n-1}$). Esses altos valores de K corresponderam a atividades enzimáticas e concentrações celulares mais altas nos ensaios G-4, G-5 e G-6 do que

nos ensaios G-1, G-2 e G-3. Assim, nos ensaios onde o crescimento ocorreu na forma de “pellets”, o índice de consistência atingiu valores menores do que no ensaio onde o crescimento ocorreu na forma filamentosa.

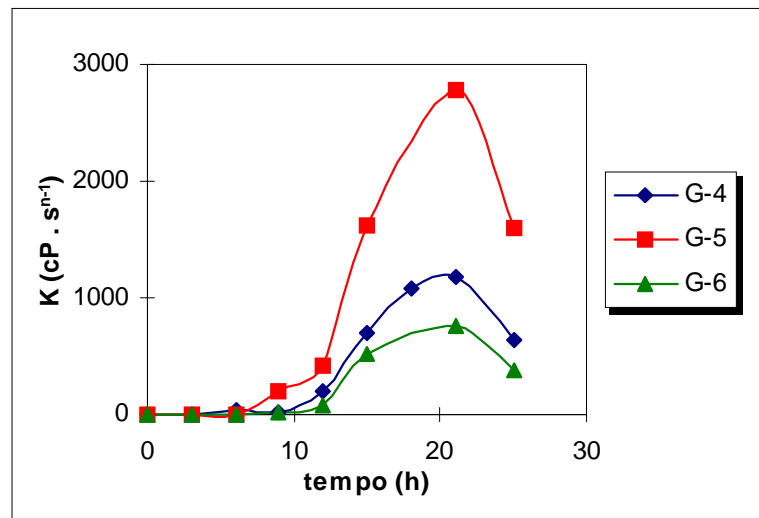


Figura 4.87 Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

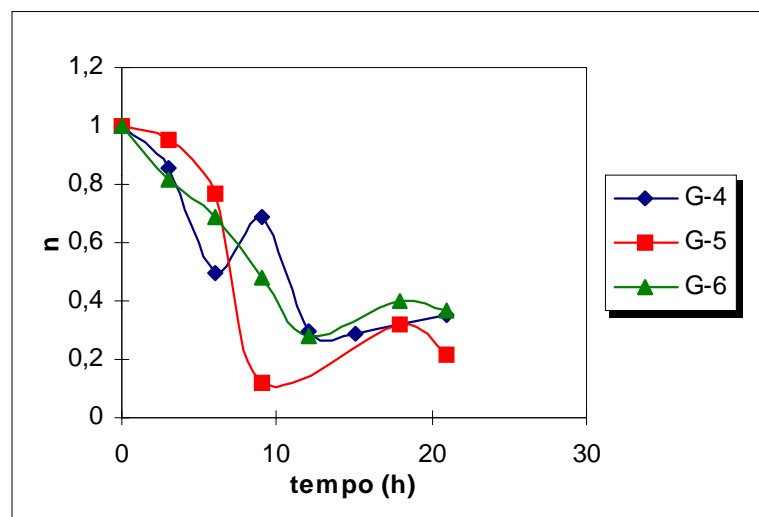


Figura 4.88 Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

As figuras 4.89, 4.90 e 4.91 apresentam as curvas de consumo de substrato para os ensaios G-4, G-5 e G-6.

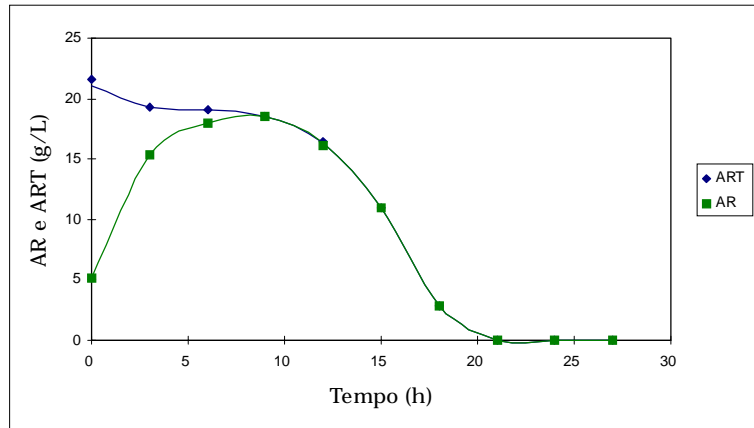


Figura 4.89 Consumo de substrato no ensaio G-4.

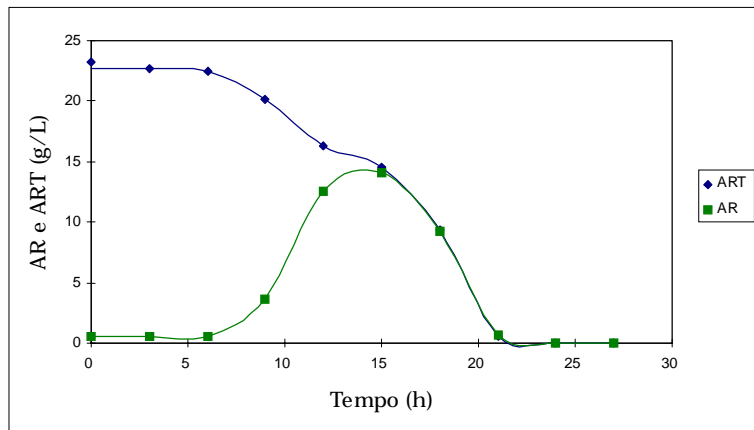


Figura 4.90 Consumo de substrato no ensaio G-5.

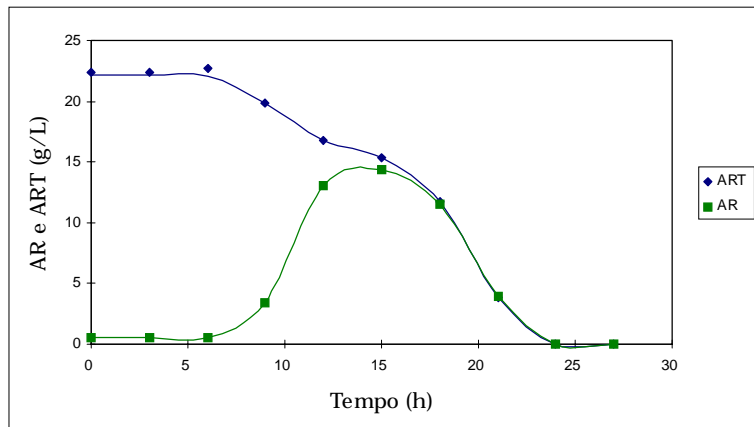


Figura 4.91 Consumo de substrato no ensaio G-6.

Para o ensaio G-4, devido à atividade enzimática mais alta do inóculo e, conseqüentemente, à atividade enzimática inicial mais alta em fermentador, houve uma hidrólise mais rápida dos polissacarídeos presentes no meio de cultura e um acúmulo mais rápido de glicose no início do cultivo do que nos ensaios G-5 e G-6. Assim, no ensaio G-4, a máxima concentração de AR ocorreu com, aproximadamente, 8 horas de cultivo. Nos ensaios G-5 e G-6, a concentração máxima de AR foi atingida em torno de 15 horas de cultivo. Dessa forma, a repressão foi mais pronunciada no ensaio G-4 do que nos demais ensaios. O término da fonte de carbono ocorreu em torno de 21 horas para os ensaios G-4 e G-5 e em torno de 24 horas para o ensaio G-6.

As figuras 4.92, 4.93 e 4.94 apresentam as cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase para os ensaios G-4, G-5 e G-6, de onde se pode perceber, como nos ensaios anteriores, uma produção de glicoamilase associada ao crescimento celular.

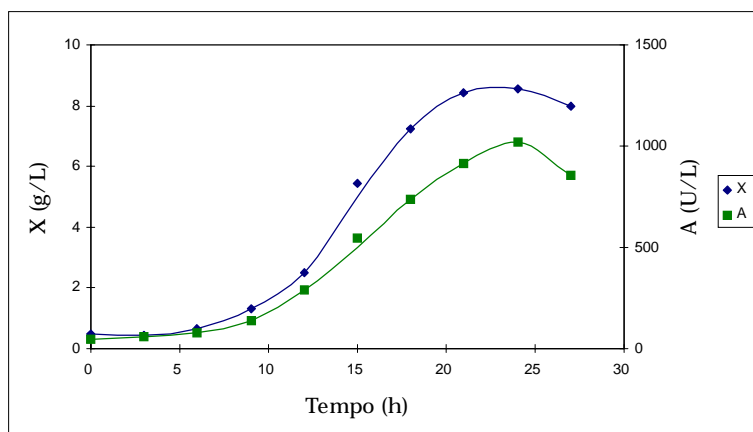


Figura 4.92 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-4.

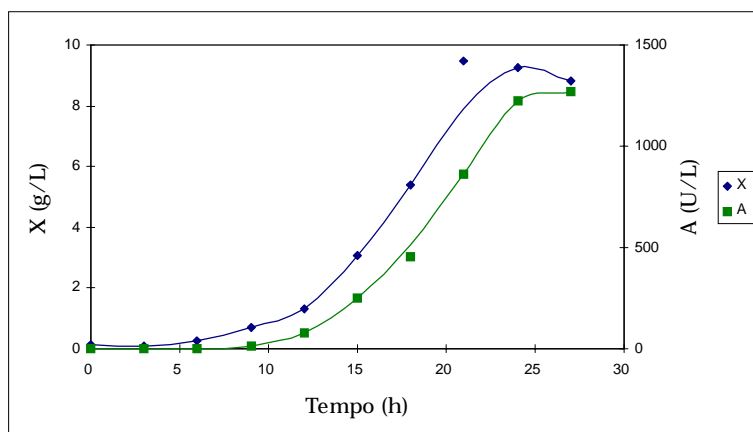


Figura 4.93 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-5.

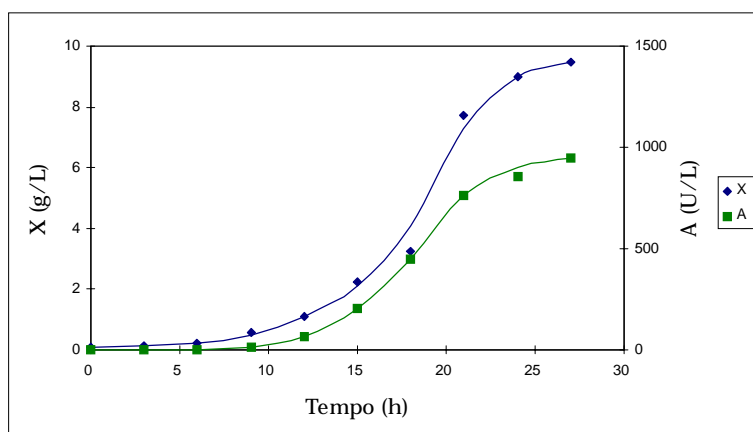


Figura 4.94 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-6.

A tabela 4.16 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos ensaios G-4, G-5 e G-6, realizados em fermentador. O pH de germinação (pH_{germ}) refere-se ao cultivo em incubador rotativo, nos ensaios G-5 e G-6. No ensaio G-4, o cultivo em incubador rotativo foi realizado com um pH inicial de 5,0, o qual decresceu ao longo do cultivo, conforme se pode verificar através dos perfis de pH dos ensaios do grupo I (item 4.1.1), realizados em incubador rotativo.

Tabela 4.16 Resultados dos ensaios G-4, G-5 e G-6, realizados em fermentador.

Parâmetro	Ensaio		
	G-4	G-5	G-6
pH_{germ}	-----	2,5	5,5
pH_{cresc}	4,0	4,0	4,0
S_0 (g/L)	21,6	23,2	22,4
X_F (g/L)	8,40	9,46	8,99
t_F (h)	21	21	24
A_m (U/L)	1019	1221	945
t_m (h)	24	24	27
A_0 (U/L)	49	0	0
X_0 (g/L)	0,50	0,13	0,09
P_x (g/(L.h))	0,38	0,44	0,37
P_a (U/(L.h))	40	51	35
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,36	0,40	0,41
$Y_{A/s}$ (U/g)	45	53	43

A figura 4.95 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento celular obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

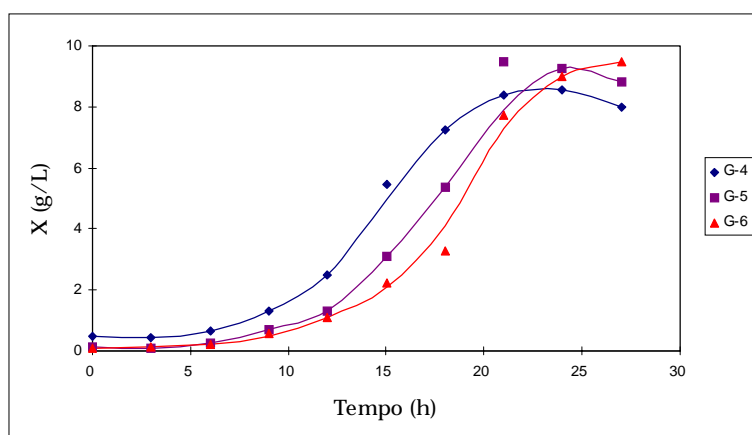


Figura 4.95 Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

As curvas de crescimento celular dos ensaios G-5 e G-6 apresentaram perfis semelhantes até 12 horas de cultivo. A partir de 12 horas, o ensaio G-5 apresentou um crescimento celular maior do que o ensaio G-6. Os ensaios G-5 e G-6 atingiram uma concentração celular de cerca de 9,0 g/L no final do cultivo. O ensaio G-4 apresentou um crescimento maior no início do cultivo devido à concentração celular mais alta do inóculo, mas atingiu praticamente a mesma concentração celular final dos outros ensaios (8,40 g/L). Dessa forma, as produtividades em células foram muito semelhantes nos três ensaios (em torno de 0,40 g/(L.h)). Os fatores de conversão substrato a células também atingiram praticamente os mesmos valores nos ensaios G-4, G-5 e G-6 (por volta de 0,40 g/g).

A figura 4.96 apresenta uma comparação entre as curvas de atividade enzimática obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6, em função do tempo de cultivo.

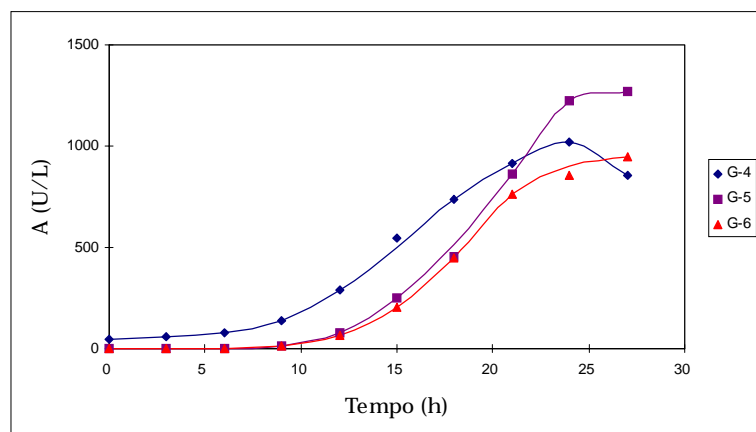


Figura 4.96 Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

Da mesma forma do que foi observado para o crescimento celular, os ensaios G-5 e G-6 apresentaram perfis de atividade enzimática muito semelhantes até 20 horas de cultivo. A partir de 20 horas de cultivo, no ensaio G-6 ocorreu uma diminuição da velocidade global de produção de glicoamilase e foi atingida uma atividade máxima de 945 U/L. A atividade enzimática mais alta foi atingida no ensaio G-5 (1221 U/L), sendo cerca de 20 % mais alta do que a atividade obtida no ensaio G-4 e 30 % superior à obtida no ensaio G-6. O ensaio G-4 apresentou uma produção de glicoamilase maior no início do cultivo, mas atingiu uma atividade enzimática máxima de 1019 U/L, mais baixa do que a atingida no ensaio G-5. Dessa forma, a produtividade em glicoamilase atingiu um valor mais alto no ensaio G-5 (51 U/(L.h)), cerca de 27 % superior à produtividade do ensaio G-4 (40 U/(L.h)) e 46 % superior à produtividade do ensaio G-6 (35 U/(L.h)). O fator de conversão substrato a glicoamilase apresentou-se um pouco maior para o ensaio G-5 (53 U/g) do que para os outros dois ensaios (em torno de 45 U/g).

A tabela 4.17 apresenta as velocidades específicas de crescimento máximas atingidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6, estimadas com base na equação 3.13. As velocidades específicas de crescimento máximas atingiram praticamente os mesmos valores nos três ensaios (em torno de 0,23 h⁻¹).

Tabela 4.17 Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

Ensaio	μ_{\max} (h ⁻¹)	Equação	Fase exponencial
G-4	0,23	$\ln X = 0,2325 (t-t_0) - 1,8181$ $r^2 = 0,9985$	entre 6 e 15 h
G-5	0,24	$\ln X = 0,2383 (t-t_0) - 2,6172$ $r^2 = 0,9908$	entre 6 e 21 h
G-6	0,23	$\ln X = 0,2291 (t-t_0) - 2,7547$ $r^2 = 0,9921$	entre 6 e 21 h

A figura 4.97 mostra as velocidades específicas de crescimento ao longo do cultivo, nos ensaios G-4, G-5 e G-6. Os perfis foram semelhantes nos três ensaios, com valores máximos coerentes com os resultados da tabela 4.17.

A figura 4.98 apresenta as velocidades específicas de consumo de substrato nos ensaios G-4, G-5 e G-6. O ensaio G-4 atingiu uma velocidade específica máxima de consumo de substrato de 0,70 g/(g.h), menor do que as obtidas nos ensaios G-5 (1,02 g/(g.h)) e G-6 (1,25 g/(g.h)), pois embora as velocidades globais tenham sido semelhantes, obteve-se maior concentração celular no ensaio G-4, acarretando menores valores de μ_s nesse ensaio.

A figura 4.99 apresenta as velocidades específicas de produção de glicoamilase. Até 10 horas de cultivo, o ensaio G-4 apresentou velocidades maiores do que os outros, atingindo o máximo de 26 U/(g.h). Os ensaios G-5 e G-6 apresentaram perfis semelhantes, atingindo uma velocidade específica de produção máxima entre 25 e 30 U/(g.h).

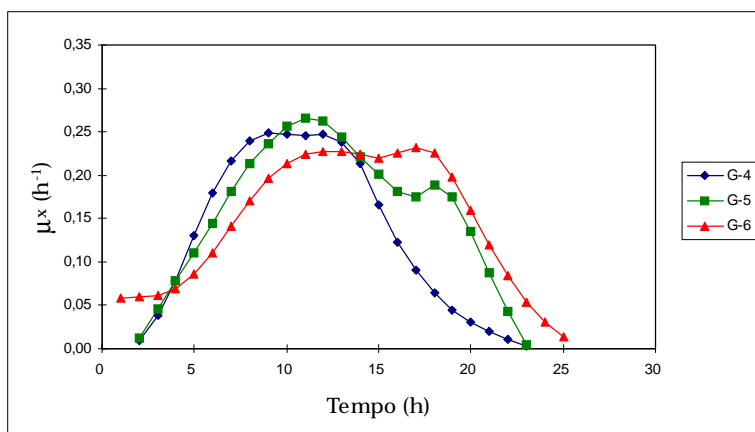


Figura 4.97 Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

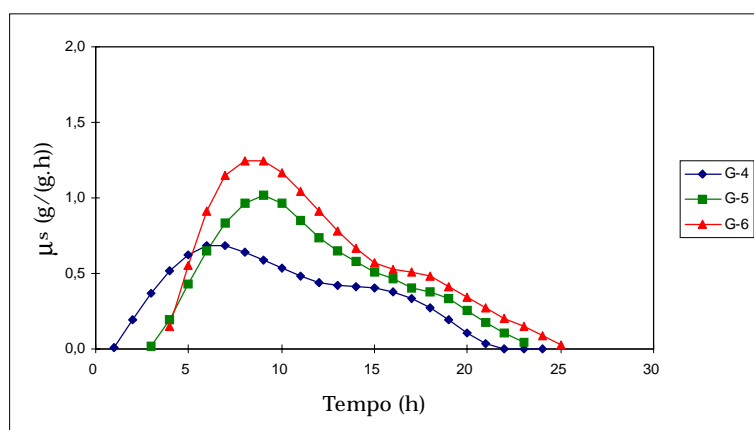


Figura 4.98 Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

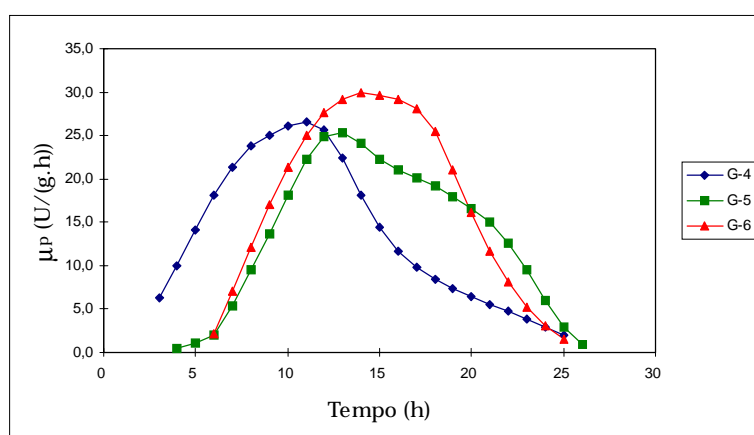


Figura 4.99 Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios G-4, G-5 e G-6.

Os resultados obtidos nos ensaios G-4, G-5 e G-6 mostraram, portanto, que utilizando-se um inóculo cultivado em incubador rotativo por 7 horas a pH 2,5 e por essa razão, contendo esporos isolados, não ocorreu a formação de “pellets” no cultivo em fermentador, conduzindo a uma alta produção de glicoamilase. A utilização de um inóculo cultivado em incubador rotativo por 7 horas a pH 5,5 e, por isso, contendo aglomerados de esporos, conduziu a um crescimento na forma de “pellets” em fermentador e a uma menor produção de glicoamilase no processo. A utilização de um inóculo contendo “pellets” também conduziu a um crescimento na forma de “pellets” em fermentador e a uma produção de glicoamilase mais baixa. Os ensaios onde ocorreu a formação de “pellets” em fermentador apresentaram, também, um menor índice de consistência do que o ensaio onde o crescimento ocorreu predominantemente na forma filamentosa.

4.2.2.3 Ensaios G-7 e G-8

A análise dos ensaios G-4, G-5 e G-6 mostrou que o melhor inóculo foi obtido cultivando-se esporos por 7 horas, em incubador rotativo, a pH 2,5. O inóculo preparado desta forma não apresentou aglomerados de esporos, apenas esporos isolados. Esse fato conduziu a um crescimento na forma filamentosa, em fermentador, sem a presença de “pellets” e a uma produção de glicoamilase mais alta.

No entanto, a utilização de um inóculo composto por esporos no

início da germinação conduz a uma fase *lag* maior, em fermentador, do que a utilização de um inóculo composto por hifas em um estágio mais avançado de desenvolvimento e, conseqüentemente, com uma maior concentração celular. Com objetivo de diminuir a fase *lag* do processo em fermentador, foram realizados os ensaios G-7 e G-8. O inóculo do ensaio G-7 foi cultivado em incubador rotativo por 24 horas a pH 2,5 no início do cultivo. O inóculo do ensaio G-8 foi cultivado em incubador rotativo por 14 horas, sendo as 7 horas iniciais a pH 2,5. Após estas 7 horas iniciais, o pH do inóculo foi corrigido para 4,0 e o inóculo foi mantido em incubador rotativo por mais 7 horas.

Pretendia-se, com a forma de preparo do inóculo utilizada no ensaio G-8:

- a. Evitar a formação de “pellets” no inóculo, com a germinação a pH 2,5 nas 7 horas iniciais de cultivo em incubador rotativo;
- b. Produzir um inóculo com maior concentração celular, cultivando-o em incubador rotativo por mais tempo (14 horas, ao invés de 7 horas);
- c. Inocular o fermentador com uma suspensão de células com pH próximo de 4,0 (pH mantido no processo em fermentador), evitando choque de pH no início do ensaio e diminuindo a fase *lag* do processo. O tempo total de cultivo em incubador rotativo de 14 horas foi escolhido devido ao fato de o pH manter-se praticamente constante, em incubador rotativo, durante esse período, conforme se pode observar a partir dos

perfis de pH obtidos nos ensaios do grupo I, em incubador rotativo (item 4.1.1).

A tabela 4.18 apresenta um resumo da forma de preparo do inóculo, da morfologia do inóculo e da morfologia obtida em fermentador nos ensaios G-7 e G-8.

Tabela 4.18 Forma de preparo do inóculo, morfologia do inóculo e morfologia obtida em fermentador, nos ensaios G-7 e G-8.

Ensaio	Forma de preparo do inóculo	Morfologia do inóculo	Morfologia em fermentador
G-7	Suspensão de células pré-cultivadas em incubador rotativo por 24 horas a 35 °C, 200 rpm e pH 2,5 no início do cultivo.	Células vegetativas com o crescimento ocorrendo na forma filamentosa, sem “pellets”.	Filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.
G-8	Suspensão de células pré-cultivadas em incubador rotativo por 14 horas, a 200 rpm e 35 °C. Nas 7 horas iniciais, o pH foi mantido em 2,5 e, então, elevado para 4,0 por mais 7 horas.	Suspensão de “pellets”, com pH 3,6.	Filamentosa, praticamente sem a presença de “pellets” durante todo o cultivo.

No ensaio G-7, o inóculo era composto por células vegetativas, com crescimento na forma filamentosa, sem a presença de “pellets”. No inóculo do ensaio G-8, apesar de a germinação ter sido realizada a pH 2,5, a elevação do pH para 4,0 causou a formação de “pellets”. O pH do inóculo ficou em torno de 3,6. As figuras 4.100 e 4.101 apresentam as

morfologias obtidas nos inóculos dos ensaios G-7 e G-8, respectivamente. As figuras 4.102 e 4.103 apresentam as morfologias obtidas após 10 horas de cultivo em fermentador nos ensaios G-7 e G-8, respectivamente. Nos dois ensaios, a morfologia foi semelhante, com o crescimento predominantemente na forma filamentosa, em fermentador.

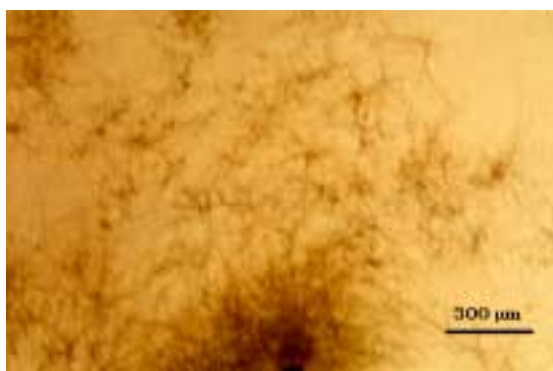


Figura 4.100 Forma filamentosa obtida no inóculo do ensaio G-7.

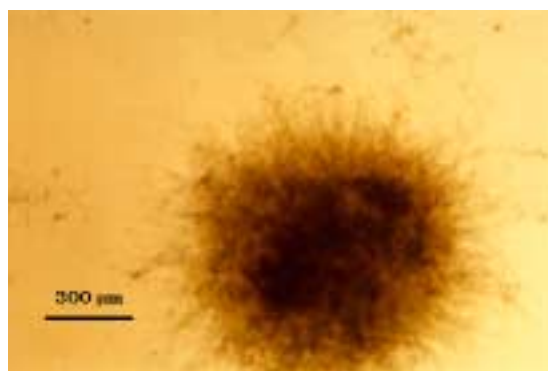


Figura 4.101 "Pellet" obtido no inóculo do ensaio G-8.

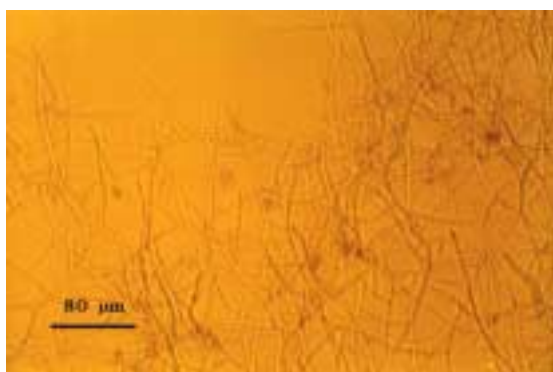


Figura 4.102 Forma filamentosa no ensaio G-7, após 10 horas de cultivo, em fermentador.

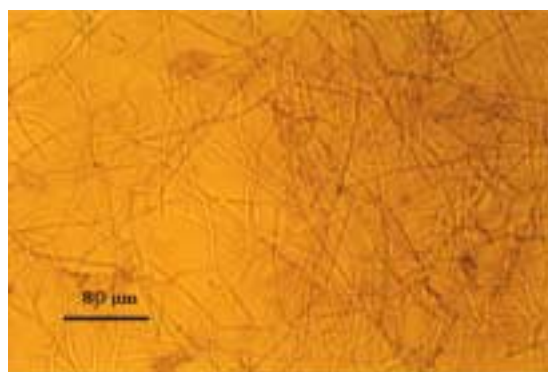


Figura 4.103 Forma filamentosa no ensaio G-8, após 10 horas de cultivo, em fermentador.

Apesar de o crescimento ter ocorrido na forma filamentosa, praticamente sem a presença de "pellets" nos ensaios G-7 e G-8, o índice de consistência atingiu valores bem mais altos no ensaio G-7

($2670 \text{ cP}\cdot\text{s}^{-1}$) do que no ensaio G-8 ($460 \text{ cP}\cdot\text{s}^{-1}$), como mostrado na figura 4.104. O menor valor de K no ensaio G-8 poderia indicar que não houve um rompimento total de todos os “pellets” presentes no inóculo, apesar de não ter sido observada a presença de “pellets” na análise microscópica, durante este ensaio. A figura 4.105 apresenta a variação do índice de comportamento do escoamento em função do tempo de cultivo, nos ensaios G-7 e G-8.

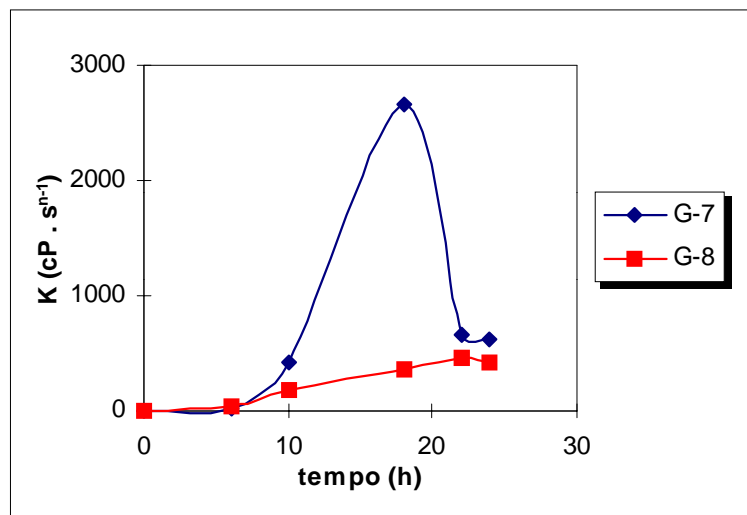


Figura 4.104 Índice de consistência do fluido (K) nos ensaios G-7 e G-8.

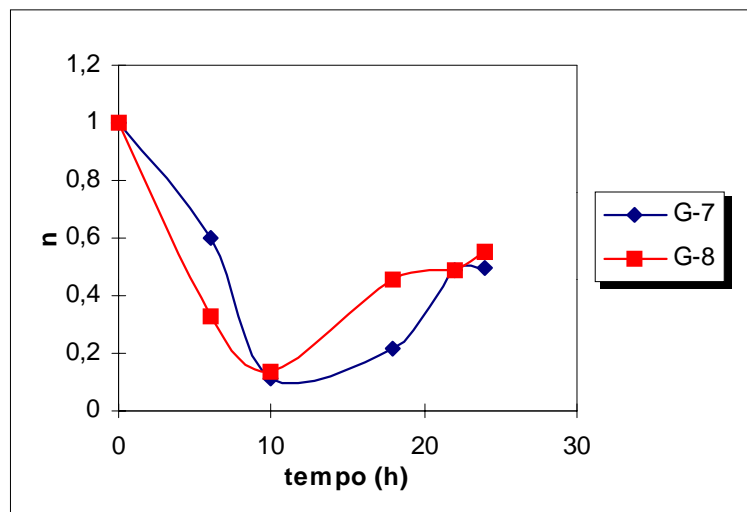


Figura 4.105 Índice de comportamento do escoamento (n) nos ensaios G-7 e G-8.

O consumo de substrato nos ensaios G-7 e G-8 está apresentado nas figuras 4.106 e 4.107. O acúmulo de glicose no início do cultivo foi mais rápido no ensaio G-7, devido à maior atividade enzimática do inóculo, o que levou a uma maior atividade enzimática inicial em fermentador. Dessa forma, a repressão foi mais pronunciada no ensaio G-7 do que no ensaio G-8. A fonte de carbono se esgotou em torno de 20 horas no ensaio G-7 e em torno de 24 horas no ensaio G-8.

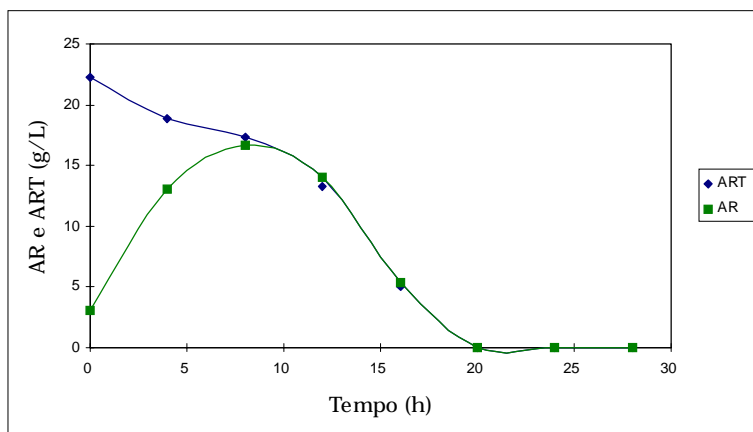


Figura 4.106 Consumo de substrato no ensaio G-7.

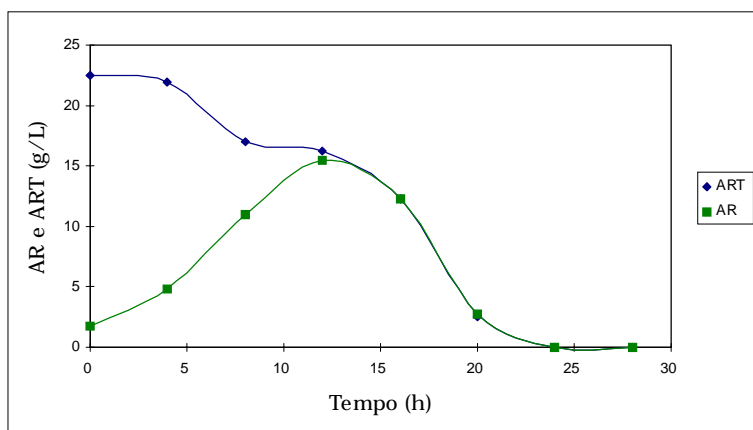


Figura 4.107 Consumo de substrato no ensaio G-8.

As figuras 4.108 e 4.109 apresentam as cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase para os ensaios G-7 e G-8. Novamente pode-se destacar que a produção de glicoamilase é associada ao crescimento.

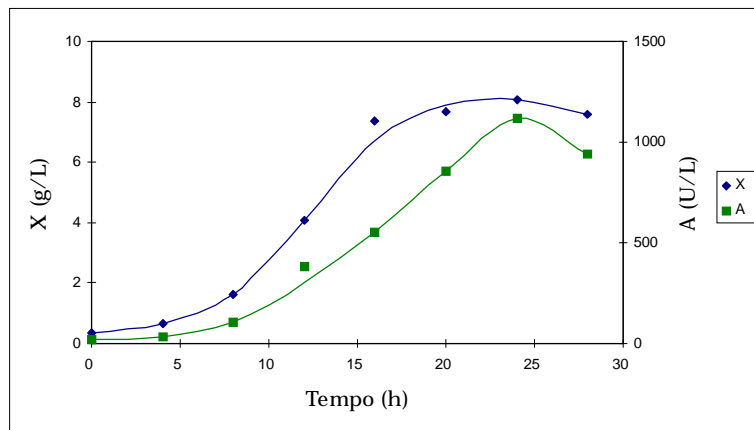


Figura 4.108 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-7.

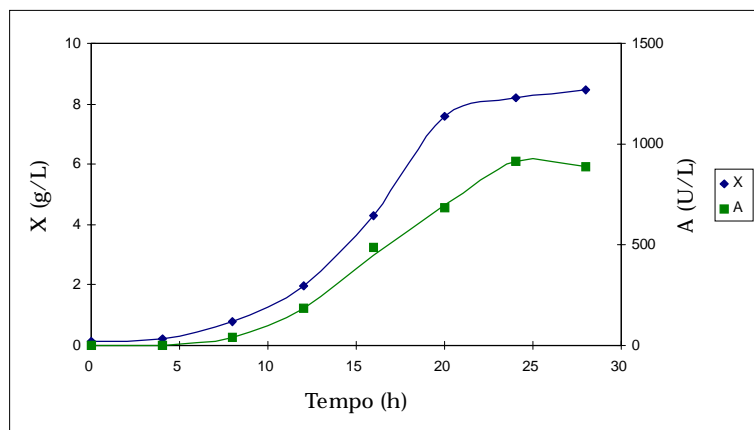


Figura 4.109 Cinéticas de crescimento e de produção de glicoamilase em fermentador no ensaio G-8.

A tabela 4.19 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos ensaios G-7 e G-8, em fermentador.

Tabela 4.19 Resultados dos ensaios G-7 e G-8, realizados em fermentador.

Parâmetro	Ensaio	
	G-7	G-8
S_0 (g/L)	22,3	22,5
X_F (g/L)	7,68	8,21
t_F (h)	20	24
A_m (U/L)	1120	916
t_m (h)	24	24
A_0 (U/L)	22	0
X_0 (g/L)	0,34	0,12
P_x (g/(L.h))	0,31	0,34
P_a (U/(L.h))	46	38
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,33	0,36
$Y_{A/s}$ (U/g)	49	41

A figura 4.110 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento celular obtidas nos ensaios G-7 e G-8.

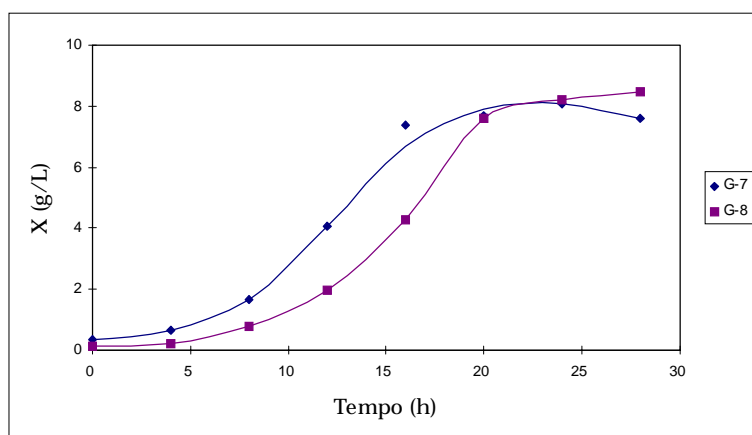


Figura 4.110 Comparação entre as cinéticas de crescimento nos ensaios G-7 e G-8.

O crescimento celular obtido no ensaio G-7 foi maior do que o obtido no ensaio G-8, no início do cultivo. Isso ocorreu devido à maior concentração celular do inóculo utilizado no ensaio G-7, que levou a uma concentração celular inicial, no fermentador, maior para este ensaio. Apesar disso, os dois ensaios atingiram praticamente a mesma concentração celular no final do cultivo (7,68 g/L no ensaio G-7 e 8,21 g/L no ensaio G-8), o que levou a produtividades em células muito semelhantes (0,31 g/(L.h) no ensaio G-7 e 0,34 g/(L.h) no ensaio G-8), o mesmo ocorrendo com o fator de conversão substrato a células (em torno de 0,35 g/g para os dois ensaios).

A figura 4.111 apresenta a comparação entre as curvas de atividade enzimática obtidas nos ensaios G-7 e G-8, em função do tempo de cultivo.

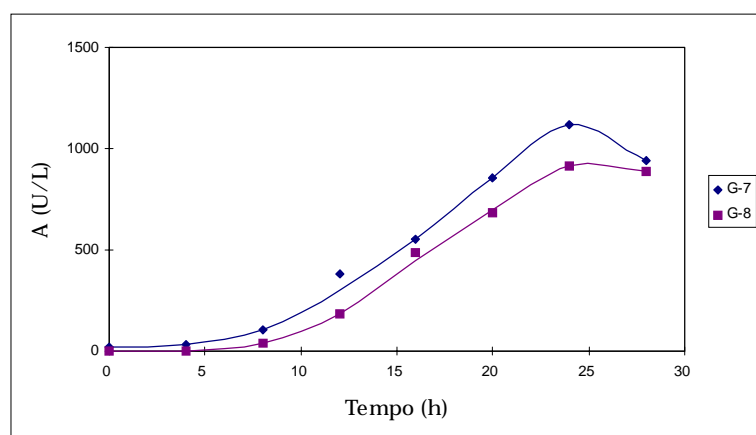


Figura 4.111 Comparação entre as cinéticas de produção de glicoamilase nos ensaios G-7 e G-8.

A produção de glicoamilase foi mais alta no ensaio G-7, durante todo o cultivo, atingindo o valor máximo de 1120 U/L, cerca de 22 % mais alta do que a atividade enzimática obtida no ensaio G-8 (916 U/L). Assim, a produtividade em glicoamilase atingida no ensaio G-7 foi de 46 U/(L.h), 21 % superior à produtividade do ensaio G-8 (38 U/(L.h)). Da mesma forma, o fator de conversão substrato a glicoamilase foi cerca de 20 % maior no ensaio G-7 (49 U/g) do que no ensaio G-8 (41 U/g).

A tabela 4.20 apresenta as velocidades específicas de crescimento máximas atingidas nos ensaios G-7 e G-8, estimadas com base na equação 3.13.

Tabela 4.20 Velocidades específicas de crescimento máximas nos ensaios G-7 e G-8.

Ensaio	μ_{\max} (h ⁻¹)	Equação	Fase exponencial
G-7	0,20	$\ln X = 0,1993 (t-t_0) - 1,1143$ $r^2 = 0,9950$	entre 0 e 16 h
G-8	0,23	$\ln X = 0,2325 (t-t_0) - 2,2031$ $r^2 = 0,9925$	entre 0 e 16 h

A tabela anterior mostra que foi possível ajustar uma fase exponencial de crescimento desde o início do cultivo. Nos ensaios anteriores (G-1 a G-6), a fase exponencial se iniciava entre 4 e 8 horas de cultivo. Portanto, as formas de preparo do inóculo utilizadas nos ensaios G-7 e G-8 mostraram-se efetivas na diminuição da fase *lag* do processo.

Os dois ensaios atingiram praticamente os mesmos valores de velocidade específica máxima de crescimento (entre $0,20 \text{ h}^{-1}$ e $0,23 \text{ h}^{-1}$), como mostra a figura 4.112.

A figura 4.113 apresenta as velocidades específicas de consumo de substrato nos ensaios G-7 e G-8, em função do tempo de cultivo. O ensaio G-8 apresentou velocidades específicas de consumo de substrato ligeiramente superiores durante todo o cultivo, devido à menor concentração celular obtida neste ensaio. A velocidade específica de consumo de substrato máxima foi de $0,72 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ no ensaio G-7 e de $0,90 \text{ g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ no ensaio G-8.

A figura 4.114 apresenta as velocidades específicas de produção de glicoamilase nos ensaios G-7 e G-8. O ensaio G-7 atingiu uma velocidade específica máxima de $23 \text{ U}/(\text{g}\cdot\text{h})$, menor do que a atingida no ensaio G-8 ($29 \text{ U}/(\text{g}\cdot\text{h})$).

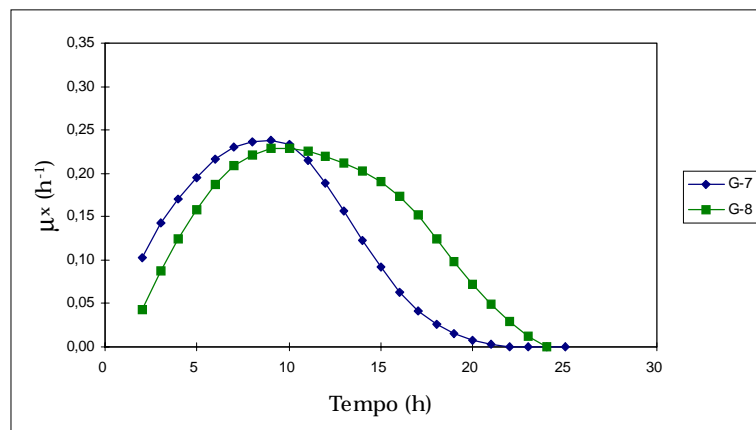


Figura 4.112 Velocidades específicas de crescimento obtidas nos ensaios G-7 e G-8.

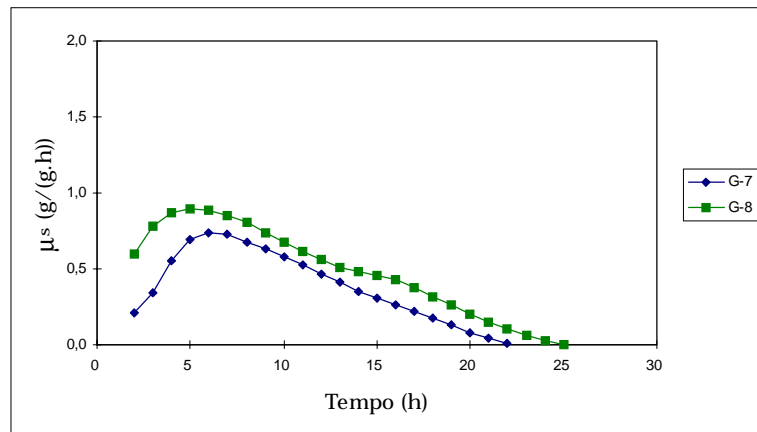


Figura 4.113 Velocidades específicas de consumo de substrato obtidas nos ensaios G-7 e G-8.

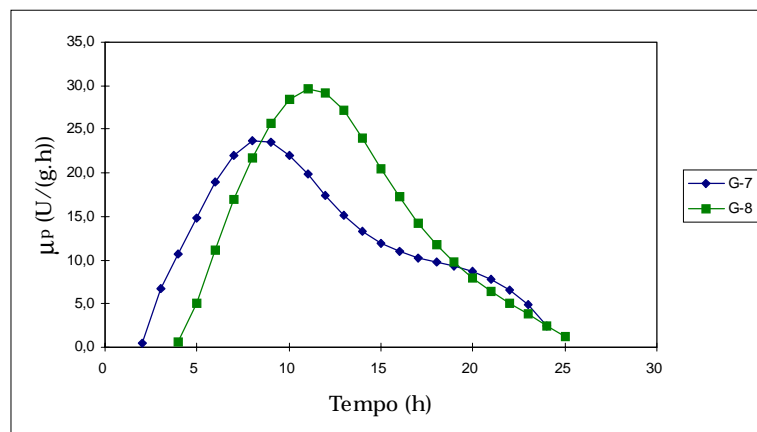


Figura 4.114 Velocidades específicas de produção de glicoamilase obtidas nos ensaios G-7 e G-8.

A análise dos ensaios do grupo G mostrou que, entre as formas de preparo do inóculo estudadas, a que conduziu a melhores resultados em fermentador foi a utilizada no ensaio G-5, quando o inóculo foi cultivado em incubador rotativo por 7 horas a pH 2,5. Essa forma de preparo do inóculo evitou a formação de aglomerados de esporos durante a germinação, evitou a formação de “pellets” durante o cultivo em fermentador e conduziu a uma maior produção de glicoamilase. O

cultivo do inóculo em incubador rotativo por 24 horas, a pH inicial 2,5 , como ocorreu no ensaio G-7, também conduziu resultados em fermentador quase tão bons quanto o ensaio G-5. A atividade enzimática máxima obtida no ensaio G-5 foi de 1221 U/L, apenas 9 % superior à obtida no ensaio G-7 (1120 U/L).

A utilização de um inóculo cultivado em incubador rotativo por 7 horas a pH 5,5 não conduziu a resultados tão bons em fermentador. O inóculo preparado desta forma (ensaio G-6) levou a um crescimento na forma de “pellets” em fermentador, devido à presença de aglomerados de esporos, conduzindo a uma atividade máxima de 945 U/L, cerca de 30 % mais baixa do que a obtida no ensaio G-5. Foi possível, com as estratégias utilizadas no preparo dos inóculos dos ensaios G-7 e G-8, a diminuição da fase *lag* do processo, obtendo-se uma fase de crescimento exponencial praticamente desde o início do cultivo.

5. Conclusões

Os resultados obtidos na primeira parte do trabalho, na qual foi analisada a influência da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo sobre a morfologia deste inóculo (pré-cultivo de células em incubador rotativo), sobre a morfologia obtida durante o cultivo em fermentador e sobre a produção de glicoamilase em fermentador, permitem concluir que:

5.1 O aumento da concentração de esporos no preparo do inóculo (entre $9,5 \times 10^3$ esp/mL e $9,5 \times 10^5$ esp/mL) conduziu a uma diminuição no diâmetro de “pellets” presentes neste inóculo, obtidos em 24 horas de cultivo em incubador rotativo.

5.2 A utilização de uma concentração muito alta de esporos no preparo do inóculo ($1,8 \times 10^7$ esp/mL) conduziu a um crescimento, em 24 horas de cultivo em incubador rotativo, na forma filamentosa com a presença de muitos aglomerados de esporos não germinados.

5.3 O aumento da concentração de esporos no preparo do inóculo também conduziu a um aumento na atividade da glicoamilase, em 24 horas de cultivo em incubador rotativo.

5.4 A produção de glicoamilase foi maior, em incubador rotativo, quando o crescimento ocorreu na forma de “pellets” pequenos do que quando este crescimento ocorreu na forma de “pellets” maiores.

5.5 A utilização de inóculos preparados com concentrações de esporos entre $9,5 \times 10^3$ esp/mL e $9,5 \times 10^5$ esp/mL não influenciou a morfologia obtida em fermentador, a qual foi predominantemente filamentosa durante todo o cultivo, nem a produção de glicoamilase.

5.6 A utilização de um inóculo preparado com concentração muito alta de esporos ($1,8 \times 10^7$ esp/mL) e, por essa razão, contendo aglomerados de esporos não germinados, provocou a formação de “pellets” no cultivo em fermentador, conduzindo a um crescimento celular maior e resultando em uma produção de glicoamilase menor, em fermentador.

5.7 Devido à influência da concentração de esporos utilizada no preparo do inóculo sobre a morfologia e sobre a produção de glicoamilase em fermentador, é de fundamental importância a padronização deste inóculo.

Os resultados obtidos na segunda parte do trabalho, na qual foram analisadas algumas formas de preparo do inóculo, permitem concluir que:

5.8 O pH mostrou ser um fator importante na aglomeração de esporos durante a germinação e na morfologia obtida em incubador rotativo. A utilização de pH 2,5 durante a germinação conduziu a uma dispersão de esporos e a um crescimento na forma filamentosa, em incubador rotativo. A utilização de pH 5,5 durante a germinação conduziu à formação de aglomerados de esporos e a um crescimento na

forma de “pellets”, em incubador rotativo.

5.9 A forma de preparo do inóculo que levou a melhores resultados em fermentador foi o cultivo de esporos em incubador rotativo por 7 horas a pH 2,5. Com essa forma de preparo, o inóculo consistiu de uma suspensão de esporos isolados, no início da germinação, sem a presença de aglomerados, conduzindo a um crescimento na forma filamentosa e a uma alta produção de glicoamilase, em fermentador. Por outro lado, o inóculo cultivado em incubador rotativo por 7 horas a pH 5,5 apresentou-se na forma de aglomerados de esporos, conduzindo a um crescimento na forma de “pellets”, em fermentador, e a uma produção de glicoamilase mais baixa.

5.10 As características reológicas do caldo de fermentação mostraram-se dependentes da morfologia. O crescimento na forma filamentosa levou a valores de K (índice de consistência do caldo) bem maiores do que os obtidos com o crescimento na forma de “pellets”.

5.11 A análise morfológica realizada nos ensaios mostrou algumas imprecisões, principalmente em relação às medições dos diâmetros de “pellets”, o que poderia ser sensivelmente melhorado com a utilização de técnicas de análise de imagens.

Como conclusões gerais da presente Dissertação, pode-se destacar que:

5.12 O crescimento na forma filamentosa mostrou ser mais adequado para a produção de glicoamilase do que o crescimento na forma de “pellets” confirmando, para este caso, a preferência da forma filamentosa para a produção de um metabólito primário (produção associada ao crescimento celular).

5.13 O inóculo ótimo para o processo de produção de glicoamilase não deve apresentar aglomerados de esporos, que conduzem à formação de “pellets” em fermentador. As condições de preparo do inóculo devem evitar a formação de “pellets” em fermentador, conduzindo a um crescimento na forma filamentosa.

5.14 Uma condição de cisalhamento alto, em fermentador, é importante para a obtenção da forma filamentosa de crescimento. Em incubador rotativo, a obtenção de “pellets” é mais fácil devido ao cisalhamento mais baixo.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, H.L.; THOMAS, C.R. The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* , v.32, p.707-712, 1988.
- AGUERO, J.M.Z. Estudo da estabilidade da glicoamilase durante a etapa fermentativa. Influência da concentração de fosfatos na produção da enzima por *Aspergillus awamori* em cultivo submerso. São Paulo, 1997. 85p. Exame de Qualificação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas , Universidade de São Paulo.
- AGUERO, J.M.Z. Influência do pH e da concentração inicial de substrato na síntese de glicoamilase por *Aspergillus* em cultivo submerso. São Paulo, 1987. 256p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- ALI, S.; HOSSAIN, Z.; MAHMOOD, S.; ALAM, R. Induction of glucoamylase production by non-starchy carbohydrates in *Aspergillus terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , v.6, n.1, p.19-22, 1990.
- ANDERSON, J.G.; SMITH, J.E. The effects of elevated temperatures on spore swelling and germination in *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology* , v.18, p.289-297, 1972.
- ARBIGE, M.V.; PITCHER, W.H. Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends in Biotechnology* , v.7, p.330-335, 1989.
- AUNSTRUP, K. Production, isolation, and economics of extracelullar enzymes. In: WINGARD, L.B.Jr; KATCHALSKY-KATZIR, E.;GOLDSTEIN, L. *Applied Biochemistry and Bioengineering, Enzyme Technology*. Academic Press, N.Y., v.2, 1979, p.27-69.
- AYNSLEY, M.; WARD, A.C.; WRIGHT, A.R. A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture. *Biotechnology and Bioengineering* , v.35, p.820-830, 1990.
- BADINO JR, A.C.; QUEIROZ, M.C.R.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Construção e operação de dispositivo para medidas reológicas contínuas "on line" de caldos não newtonianos ao longo de bioprocessos. In: Sinaferm - Simpósio Nacional de Fermentações, 11. , São Carlos/SP, 1996. Anais. São Carlos/SP. Universidade Federal de São Carlos, 1996. v.1, p.186-191.

- BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* , v.97, p.142-145, 1972.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; MARTÍNEZ, C.; AGUILERA, A.; RAIMBAULT, M. Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* , v.11, n.8, p.551-554, 1989.
- BELMAR-BEINY, M.T.; THOMAS, C.R. Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* , v.37, p.456-462, 1991.
- BOSCH, A.; MARONNA, R.A.; YANTORNO, O.M. A simple descriptive model of filamentous fungi spore germination. *Process Biochemistry* , v.30, n.7, p.599-606, 1995.
- BRAUN, S.; VECHT-LIFSHITZ, S.E. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology* , v.9, n.2, p.63-68, 1991.
- BROWN, D.E.; ZAINUDEEN, M.A. Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnology and Bioengineering* , v.20, p.1045-1061, 1978.
- BYRNE, G.S.; WARD, O.P. Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering* , v.33, p.912-914, 1989.
- CALAM, C.T. Starting investigational and production cultures. *Process Biochemistry* , v.11, n.3, p.7-12, 1976.
- CARLSEN, M.; SPOHR, A.B.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, v.49, p.266-276, 1996.
- CHIQUETTO, M.L.; FACCIOTTI, M.C.R.; KILIKIAN, B.V.; SCHMIDELL, W. Influence of carbon and nitrogen sources on glucoamylase production by *Aspergillus* in batch cultures. *Biotechnology Letters* , v.14, n.6, p.465-470, 1992.
- CORBETT, K. Production of antibiotics. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. *Basic Biotechnology* , Academic Press, 1987, p.425-448.
- COX, P.W.; THOMAS, C.R. Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnology and Bioengineering* , v.39, p.945-952, 1992.

- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. Practical Haematology . 4.ed. London, 1970, p.19-31.
- DOMINGUES, C.M.; PERALTA, R.M. Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus* Fresenius). Canadian Journal of Microbiology , v.39, n.7, p.681-685, 1993.
- DVADTSATOVA, E.A.; VORONTOVA, N.N.; KOMAROVA, G.I.; BURTSEVA, E.I.; VORONOVA, L.I. Influence of age and amount of inoculum on glucoamylase biosynthesis by the mutant *Aspergillus awamori* T. Applied Biochemistry and Microbiology , v.13, n.1, p.24-26, 1977.
- FACCIOTTI, M.C.R. Produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa - Estudo do processo semicontínuo e da influência da concentração inicial de polissacarídeo no processo descontínuo. São Paulo, 1986. 245p. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica - Universidade de São Paulo.
- FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W.; AGUERO, J.M.Z. Glucoamylase production by semicontinuous cultivation of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Arquivos de Biologia e Tecnologia , v.33, n.4, p.797-809, 1990.
- FACCIOTTI, M.C.R.; WUHSTRACK, G.H.; TONSO, A.; CHIQUETTO, M.L.; SCHMIDELL, W. Effect of yeast extract on glucoamylase synthesis by *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Biotechnology Letters, v.13, n.8, p.547-552, 1991.
- FACHINI, E.R. Síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em cultura submersa: Influência das condições de transferência de oxigênio e da velocidade de respiração. São Paulo, 1988. 237p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- FOSTER, J.W. Chemical activities of fungi , Academic Press, New York, 1949, p.27-75.
- FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II-trihydrate. Applied Microbiology and Biotechnology, v.33, n.4, p.377-381, 1990.
- GBEWONYO, K.; HUNT, G.; BUCKLAND, B. Interactions of cell morphology and transport processes in the lovastatin fermentation. Bioprocess Engineering , v.8, n.1-2, p.1-7, 1992.

- GHOSH, A.; CHATTERJEE, B.; DAS, A. Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *Journal of General Microbiology* , v.136, pt.7, p.1307-1311, 1990.
- GOMEZ, R.; SCHNABEL, I.; GARRIDO, J. Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. *Enzyme Microbiology and Technology* , v.10, n.3, p.188-191, 1988.
- HEADON, D.R.; WALSH, G. The industrial production of enzymes. *Biotechnology Advances* , v.12, n.4, p.635-646, 1994.
- HOTOP, S.; MÖLLER, J.; NIEHOFF, J.; SCHÜGERL, K. Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivations. *Process Biochemistry* , v.28, p.99-104, 1993.
- HUNT, G.R.; STIEBER, R.W. Inoculum development. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N.A., ed. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* , American Society of Microbiology, Washington, 1986, p.32-40.
- IMAI, Y.; SUZUKI, M.; MASAMOTO, M.; NAGAYASU, K. Development of an on-line glucoamylase monitoring system. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , v.77, n.4, p.448-449, 1994.
- JEENES, D.J.; MACKENZIE, D.A.; ROBERTS, I.N.; ARCHER, D.B. Heterologous protein production by filamentous fungi. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* , v.9, p.327-367, 1991.
- JONES, P.; MOORE, D.; TRINCI, A.P.J. Effects of junlon and hostacerin on the Electrokinetic properties of spores of *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Geotrichum candidum*. *Journal of General Microbiology* , v.134, p.235-240, 1988.
- JURKIEWICZ, C.H. Síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em cultivo submerso: Influência do pH e das condições de transferência de oxigênio. São Paulo, 1994, 207p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- JÜSTEN, P.; PAUL, G.C.; NIENOW, A.W.; THOMAS, C.R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering* , v.52, n.6, p.672-684, 1996.
- KILIKIAN, B.V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. *Revista de Microbiologia* , v.27, p.137-141, 1996.

- LAWTON, P.; WHITAKER, A.; ODELL, D.; STOWELL, J.D. Actinomycete morphology in shaken culture. *Canadian Journal of Microbiology* , v.35, p.881-889, 1989.
- LESSMANN, W.F. Estudo do processo descontínuo alimentado para a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 para concentrações de polissacarídeo de 40 e 80 g/L. São Paulo, 1993. 131p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- LILLY, M.D. Production of intracellular microbial enzymes. In: WINGARD, L.B.Jr; KATCHALSKY-KATZIR, E.; GOLDSTEIN, L. *Applied Biochemistry and Bioengineering, Enzyme Technology*. Academic Press, N.Y., v.2, 1979, p.1-26.
- LIMA, L.P.C. Elementos de microbiologia. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. *Tecnologia das fermentações* , v.1, Edgard Blücher, São Paulo, 1975, p.1-18.
- LINKO, P.; ZHU, Y. Neural network modelling for real-time variable estimation and prediction in the control of glucoamylase fermentation. *Process Biochemistry* , v.27, n.5, p.275-283, 1992.
- MACEDO, G.R. Influência do pH e da temperatura na produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 337. São Paulo, 1982. 111p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- MAGALHÃES, A.P. Enzimas: Situação de mercado e tendências. *Revista Brasileira de Engenharia Química* , v.3, p.22-25, maio, 1989.
- MAIORANO, A.E. Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus oryzae* em meio semi-sólido. São Paulo, 1982. 144p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- McINTOSH, A.F.; MEYRATH, J. Size of inoculum and nitrogen metabolism in *Aspergillus oryzae*. *Journal of General Microbiology* , v.33, p.57-62, 1963.
- MEGEE, R.D.; KINOSHITA, S.; FREDRICKSON, A.G.; TSUCHIYA, H.M. Differentiation and product formation in molds. *Biotechnology and Bioengineering* , v.12, p.771-801, 1970.
- METZ, B.; BRUIJN, E.W.; SUIJDAM, J.C. Method for quantitative representation of the morphology of molds. *Biotechnology and Bioengineering* , v.23, p.149-162, 1981.

- METZ, B.; KOSSEN, N.W.F. The growth of molds in the form of pellets - a literature review. *Biotechnology and Bioengineering* , v.19, p.781-799, 1977.
- MEYERHOFF, J.; BELLGARDT, K.H. Two mathematical models for the development of a single microbial pellet. Part II: Simulation of the pellet growth of *Penicillium chrysogenum* by a fast method equivalent to a morphological detailed description. *Bioprocess Engineering*, v.12, n.6, p.315-322, 1995.
- MEYERHOFF, J.; TILLER, V.; BELLGARDT, K.H. Two mathematical models for the development of a single microbial pellet. Part I: Detailed morphological model based on the description of individual hyphae. *Bioprocess Engineering*, v.12, n.6, p.305-313, 1995.
- MEYRATH, J. Size of inoculum and growth kinetics of moulds. *Experientia* , v.18, n.1, p. 41-42, 1962.
- MEYRATH, J.; McINTOSH, A.F. Size of inoculum and carbon metabolism in some *Aspergillus* species. *Journal of General Microbiology* , v.33, p.47-56, 1963.
- MEYRATH, J.; SUCHANEK, G. Inoculation techniques - Effects due to quality and quantity of inoculum. *Methods in Microbiology*, v.7B, p.159-209, 1972.
- MITARD, A.; RIBA, J.P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnology and Bioengineering* , v.32, p.835-840, 1988.
- MITARD, A.; RIBA, J.P. Rheological properties of *Aspergillus niger* pellet suspensions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.25, n.3, p.245-249, 1986.
- NIELSEN, J. Modelling the growth of filamentous fungi. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* , v.46, p.187-223, 1992.
- NIELSEN, J.; KRABBEN, P. Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged cultures. *Biotechnology and Bioengineering* , v.46, n.6, p.588-598, 1995.
- ONIONS, A.H.S. Preservation of fungi. *Methods in Microbiology* , v.4, p.113-151, 1971.
- PACKER, H.L.; THOMAS, C.R. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnology and Bioengineering* , v.35, p.870-881, 1990.

- PAMBOUKIAN, C.R.D.; FACCIOTTI, M.C.R.; OLIVO, J.E.; SCHMIDELL, W. Influência da densidade de inóculo e da morfologia dos "pellets" na produção de glicoamilase por *Aspergillus*. In: CICTE - Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia, 13. , São Carlos/SP, 1994. Anais. São Carlos/SP - Universidade de São Paulo, 1994. p.446.
- PARK, Y.K. Produção de enzimas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. Tecnologia das fermentações , v.1, Edgard Blücher, São Paulo, 1975. p.182-211.
- PARTON, C.; WILLIS, P. Strain preservation, inoculum preparation and development. In: McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Fermentation: a practical approach , IRL Press, Oxford, 1990, p.39-64.
- PAZUR, J.H.; LIU, B.; MISKIEL, F.J. Comparison of the properties of glucoamylases from *Rhizopus niveus* and *Aspergillus niger*. Biotechnology and Applied Biochemistry , v.12, p.63-78, 1990.
- PEDERSEN, A.G.; BUNDGAARD-NIELSEN, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; HASSAGER, O. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. Biotechnology and Bioengineering , v.41, p.162-164, 1993.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia , v.1, McGraw-Hill, São Paulo, 1980, p.315-344.
- PIRT, S.J.; CALLOW, D.S. Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. Nature, v.184, p.307-310, 1959.
- PROSSER, J.I.; TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. Critical Reviews in Biotechnology , v.10, n.4, p. 253-274, 1991.
- QUEIROZ, M.C.R. Caracterização reológica do caldo durante cultivos de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 para a síntese de amiloglicosidase . São Paulo, 1996. 193p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- QUEIROZ, M.C.R.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Rheological changes of *Aspergillus awamori* broth during amyloglicosidase production. Biotechnology Letters , v.19, n.2, p.167-170, 1997.
- RAMOS, A.C.; SUAZO, C.A.T.; MUCHERONI, M.L. Análise das características morfológicas de fungos em bioprocessos através de técnicas de análise de imagens. In: Sinaferm - Simpósio Nacional de Fermentações, 11. , São Carlos/SP , 1996. Anais. São Carlos/SP. Universidade Federal de São Carlos, 1996. v.1, p.243-248.

- RAO, D.S.; PANDA, T. Comparative analysis of calcium gluconate and sodium gluconate techniques for the production of gluconic acid by *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering* , v.8, n.5-6, p.203-207, 1993.
- RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. The genus *Aspergillus* . The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1965, p.56-67.
- RATLEDGE, C. Secondary products and fungal biochemistry. In: Extended Summaries Biotechnology Group Meeting Recent Developments in Fungal Bioprocessing. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* , v.56, p.203-222, 1993.
- RATUSZNEI, S.M.; SUAZO, C.A.T. Inducing controlled growth of *Penicillium chrysogenum* in pelletized form. In: GALINDO, E.; RAMIREZ, O.T., ed. *Advances in Bioprocess Engineering* , Kluwer Academic Publishers, 1994, p.203-206.
- REICHL, U.; KING, R.; GILLES, E.D. Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnology and Bioengineering* , v.39, p.164-170, 1992.
- REISMAN, H.B. Economic analysis of fermentation processes, CRC Press, 1988, p.14-35.
- ROUSSET, S.; SCHLICH, P. Amylase production in submerged culture using principal component analysis. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , v.68, n.5, p.339-343, 1989.
- RUOHANG, W.; WEBB, C. Effect of cell concentration on the rheology of glucoamylase fermentation broth. *Biotechnology Techniques* , v.9, n.1, p.55-58, 1995.
- SCHMIDELL, W. Estudo do processo fermentativo contínuo de produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 337 - Comparação com o processo descontínuo. São Paulo, 1986. 216p. Tese (Livre Docência) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- SCHMIDELL, W; FACCIOTTI, M.C.R. Glucoamylase production in continuous steady state cultures. *Biotecnologia* , v.4, n.2, p.35-42, 1994a.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Studies on continuous glucoamylase production in a bioreactor operating with polysaccharide pulses in the reactor. *Biotecnologia* , v.4, n.2, p.43-47, 1994b.

- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R.; KILIKIAN, B.V; ABOUTBOUL, H. Development of glucoamylase synthesis studies in a Biochemical Engineering Laboratory. *International Industrial Biotechnology* , v.9, n.1, p.15-17, 1989.
- SCHMIDELL, W.; FERNANDES, M.V. Comparação entre hidrólise ácida e enzimática de amido para determinação de açúcares redutores totais. *Revista de Microbiologia* , v.8, n.3, p.98-101, 1977.
- SCHMIDELL, W.; MENEZES, J.R.G. Influência da glicose na determinação da atividade da amiloglicosidase. *Revista de Microbiologia* , v.17, n.3, p.194-200, 1986.
- SHAH, D.N.; SHAH, N.K.; KOTHARI, R.M. Isolation of a transglucosidase-nonproducing mutant of *Aspergillus awamori* yielding improved quality and production of amyloglicosidase preparations. *Journal of Industrial Microbiology* , v.2, n.3, p. 175-180, 1987.
- SHAH, N.K.; SHAH, D.N.; UPADHYAY, C.M.; NEHETE, P.N.; KOTHARI, R.M.; HEGDE, M.V. An economical, upgraded, stabilized and efficient preparation of amyloglicosidase. *Journal of Biotechnology* , v.10, p.267-275, 1989.
- SHARMA, A.; PADWAL-DESAI, S.R. On the relationship between pellet size and aflatoxin yield in *Aspergillus parasiticus*. *Biotechnology and Bioengineering* , v.27, p.1577-1580, 1985.
- SIMÕES, D.A. Logiciel de Lissage , 1994. (Software)
- SMITH, G.M.; CALAM, C.T. Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnology Letters* , v.2, n.6, p.261-266, 1980.
- SMITH, J.J.; LILLY, M.D.; FOX, R.I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering* , v.35, p.1011-1023, 1990.
- STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. *Biotechnology Letters* , v.5, n.2, p.135-140, 1983.
- SZTEJNBERG, A.; GALPER, S.; LISKER, N. Conditions of pycnidial production and spore formation by *Ampelomyces quisqualis*. *Canadian Journal of Microbiology* , v.36, n.3, p.193-198, 1990.
- THOMAS, C.R. Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. *Trends in Biotechnology* , v.10, p.343-348, 1992.

- TONSO, A. Estudo do processo descontínuo alimentado (fed-batch) para a síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112. São Paulo, 1994. 143p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- TOUGH, A.J.; PULHAM, J.; PROSSER, J.I. A mathematical model for the growth of mycelial pellet populations. *Biotechnology and Bioengineering* , v.46, p.561-572, 1995.
- TRÄGER, M.; QAZI, G.N.; ONKEN, U.; CHOPRA, C.L. Comparison of airlift and stirred reactors for fermentation with *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , v.68, n.2, p.112-116, 1989.
- TUCKER, K.G.; KELLY, T.; DELGRAZIA, P.; THOMAS, C.R. Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnology Progress* , v.8, p.353-359, 1992.
- VECHT-LIFSHITZ, S.E.; MAGDASSI, S.; BRAUN, S. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnology and Bioengineering* , v.35, p.890-896, 1990.
- VENOSA, C.M.S.; LESER, E.W.; MARTINS, V.M.N.C.; SCHMIDELL, W. Cultivo de microrganismos em meios contendo farinha de mandioca como principal fonte de carbono. I. Influência de condições experimentais no cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 337 em frascos agitados. *Revista Brasileira de Tecnologia*, v.6, n.2, p.117-124, 1975.
- VILAÇA, P.R. Caracterização e operação de diferentes biorreatores para a produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori* . São Paulo, 1997. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; LÓPEZ-ISUNZA, F.; FAVELA-TORRES, E.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotechnology and Bioengineering* , v. 42, p.1-10, 1993.
- VINING, L.C. Secondary metabolism. In: REHM, H.J.; REED, G. , ed. *Biotechnology* , v.4 - Microbial Products II, 1986, p.19-38.
- WAINWRIGHT, M.P.; TRINCI, A.P.J.; MOORE, D. Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process. *Mycological Research* , v.97, n.7, p.801-806, 1993.

WEBB, C.; KAMAT, S.P. Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , v.9, n.3, p.308-312, 1993.

WHITAKER, A.; LONG, P.A. Fungal pelleting. *Process Biochemistry* , v.8, p.27-31, 1973.

WITTLER, R.; BAUMGARTL, H.; LÜBBERS, D.W.; SCHÜGERL, K. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnology and Bioengineering* , v.28, p.1024-1036, 1986.

Apêndice

Neste apêndice são apresentados todos os resultados experimentais obtidos nos ensaios realizados, bem como as velocidades específicas determinadas através do “software Logiciel de Lissage” e os valores dos parâmetros reológicos (K e n) obtidos nos ensaios do grupo G e nos ensaios F40-4, F40-5, F40-6.

Tabela A1 Resultados experimentais do ensaio I-1.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)	pH	D (mm)
0	0,2	19,0	0	0,01	5,00	---
12	0,1	20,1	0	0,09	4,90	---
16	0,2	20,0	6	0,12	4,85	1,02
20	11,1	17,7	13	0,77	3,70	1,15
24	11,6	14,7	166	1,47	3,10	0,84
28	9,6	13,2	199	2,50	2,60	1,10
32	9,6	12,2	213	3,86	2,50	0,84
36	8,8	10,7	210	4,29	2,50	1,18
40	6,9	8,5	115	4,36	2,45	1,12
48	0,0	3,5	52	7,09	2,15	1,18
52	0,0	0,3	173	8,07	1,95	0,93
56	0,0	0,1	233	7,26	2,00	0,95
64	0,0	0,1	98	7,80	2,00	0,90

Tabela A2 Resultados experimentais do ensaio I-2.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)	pH	D (mm)
0	0,2	19,0	0	0,05	5,00	---
12	0,1	19,4	0	0,29	4,75	0,65
16	4,1	17,5	11	0,82	3,50	0,84
20	9,7	14,2	79	2,10	2,80	0,98
24	12,7	12,4	173	3,22	2,65	0,96
28	10,2	10,7	248	4,65	2,45	0,92
32	8,1	9,3	231	5,07	2,35	1,18
36	6,3	7,8	146	5,46	2,30	1,44
40	4,5	4,8	112	6,34	2,25	1,45
48	0,0	0,7	98	7,56	2,05	1,29
52	0,0	0,8	112	6,88	2,05	1,49
56	0,0	0,1	111	7,05	2,10	1,27
64	0,0	0,0	169	7,17	2,00	1,58

Tabela A3 Resultados experimentais do ensaio I-3.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)	pH	D (mm)
0	0,2	19,0	0	0,08	5,00	---
12	2,9	14,3	7	0,84	3,40	0,59
16	8,5	11,7	48	2,09	2,75	0,59
20	7,9	10,1	158	3,19	2,40	0,78
24	6,2	6,8	299	4,86	2,30	1,04
28	5,2	5,9	321	5,47	2,25	0,92
32	3,7	3,9	246	6,79	2,15	0,93
36	1,6	1,9	195	8,36	2,10	0,90
40	0,2	0,5	119	9,46	2,00	1,17
48	0,0	0,3	155	8,80	1,95	1,02
52	0,0	0,2	224	8,76	1,90	1,08
56	0,0	0,1	291	8,98	2,05	0,84

Tabela A4 Resultados experimentais do ensaio F20-1.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	2,1	18,5	6	0,01
3	6,4	17,4	11	0,12
6	10,7	15,6	25	0,44
9	13,3	15,8	56	0,74
12	12,9	15,6	144	1,53
15	9,9	11,5	258	2,99
18	5,5	5,9	435	4,68
21	1,1	2,1	435	6,41
24	0,0	0,9	436	6,55
27	0,0	0,9	438	7,14

Tabela A5 Resultados experimentais do ensaio F20-2.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	2,4	22,5	12	0,07
3	8,1	21,7	14	0,12
6	11,5	20,6	25	0,29
9	13,3	18,8	48	0,67
12	13,6	18,6	118	1,45
15	11,1	13,3	251	2,66
18	7,1	9,0	395	4,56
21	2,3	4,1	459	5,29
24	0,0	1,4	479	6,39
27	0,0	1,3	534	6,31

Tabela A6 Resultados experimentais do ensaio F20-3.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	2,5	21,0	31	0,40
3	11,9	20,0	32	0,50
6	13,6	19,9	42	0,93
9	13,9	18,6	86	1,43
12	10,4	17,4	166	2,58
15	8,1	11,0	300	4,50
18	3,0	4,2	420	6,44
21	0,0	1,4	462	6,93
24	0,0	1,3	498	7,11
27	0,0	1,3	509	6,82

Tabela A7 Resultados experimentais do ensaio F40-1.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	2,6	43,4	8	0,07
3	6,4	40,6	12	0,23
6	11,5	37,7	18	0,41
9	18,8	31,5	43	0,59
12	24,0	30,6	104	1,21
15	25,9	28,9	291	2,65
18	23,0	24,4	447	4,34
21	14,8	17,5	949	6,95
24	9,5	10,1	1209	9,28
27	6,0	4,8	1606	11,11
30	0,6	0,7	1792	11,62
33	0,0	0,0	2098	11,28
36	0,0	0,0	1613	11,74

Tabela A8 Resultados experimentais do ensaio F40-2.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	3,0	41,0	17	0,20
3	9,7	38,8	20	0,33
6	16,6	36,8	31	0,51
9	22,9	31,3	68	0,93
12	25,6	30,1	156	2,04
15	24,6	27,2	420	3,87
18	19,2	20,4	635	6,40
21	10,3	11,5	1137	9,66
24	3,2	3,8	1441	10,83
27	0,0	0,1	1499	11,79
30	0,0	0,1	1839	12,32
33	0,0	0,0	2006	11,96
36	0,0	0,0	2264	12,05

Tabela A9 Resultados experimentais do ensaio F40-3.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	3,8	40,5	32	0,36
3	14,7	37,7	33	0,50
6	21,7	34,0	50	0,76
9	26,1	30,7	108	1,40
12	26,6	29,1	221	2,56
15	22,7	24,5	563	4,80
18	16,4	17,4	798	7,37
21	10,2	10,2	1317	7,92
24	5,3	5,8	1473	9,29
27	1,3	1,5	1507	11,18
30	0,0	0,0	2039	11,19
33	0,0	0,0	2140	11,28
36	0,0	0,0	1872	11,08

Tabela A10 Resultados experimentais do ensaio F40-4.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	3,70	41,0	26	0,20
4	12,9	40,6	34	0,32
8	23,6	38,1	74	0,74
12	26,5	32,0	172	1,80
16	31,6	32,2	491	3,80
20	20,2	20,9	845	7,53
24	5,1	5,1	1540	10,89
28	0,1	0,2	1738	12,80
32	0,0	0,0	2215	12,39
36	0,0	0,0	2091	12,40

Tabela A11 Resultados experimentais do ensaio F40-5.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	4,20	37,3	38	0,50
4	18,3	37,6	54	0,69
8	28,3	31,9	119	1,38
12	31,8	31,8	253	2,78
16	27,4	28,2	678	5,87
20	19,3	18,6	1013	8,64
24	4,6	4,6	1410	10,51
28	1,3	1,3	1954	11,95
32	0,0	0,0	2270	11,15
36	0,0	0,0	2274	11,96

Tabela A12 Resultados experimentais do ensaio F40-6.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	2,90	40,5	24	0,52
4	15,4	37,1	60	0,85
8	25,7	33,5	89	1,72
12	27,9	32,1	234	3,55
16	22,1	22,4	716	7,65
20	8,1	10,0	1277	11,34
24	0,0	0,0	1592	13,39
28	0,0	0,0	1515	13,28
32	0,0	0,0	1510	12,34
36	0,0	0,0	1491	13,06

Tabela A13 Resultados experimentais do ensaio G-1.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	0,5	21,4	0	0,08
4	0,5	22,3	0	0,23
8	5,0	19,5	13	0,61
12	13,9	14,6	88	1,55
16	12,3	11,5	300	2,28
20	4,4	4,5	464	5,64
24	0,0	0,0	733	6,97
28	0,0	0,0	565	7,15

Tabela A14 Resultados experimentais do ensaio G-2.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	0,5	21,4	0	0,05
4	0,5	21,9	0	0,13
8	2,2	20,7	5	0,50
12	12,4	15,7	60	1,27
16	13,2	13,5	263	2,66
20	5,1	4,9	608	5,92
24	0,0	0,0	812	7,73
28	0,0	0,0	689	7,84

Tabela A15 Resultados experimentais do ensaio G-3.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	0,5	21,4	0	0,10
4	0,4	21,4	0	0,15
8	2,3	20,5	6	0,35
12	12,8	15,1	58	0,94
16	13,2	12,3	235	1,78
20	5,1	5,2	594	5,10
24	0,0	0,0	670	7,56
28	0,0	0,0	668	7,37

Tabela A16 Resultados experimentais do ensaio G-4.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	5,10	21,6	49	0,50
3	15,3	19,3	56	0,44
6	18,0	19,1	77	0,66
9	18,5	18,5	141	1,33
12	16,1	16,5	289	2,51
15	11,0	11,0	546	5,46
18	2,9	2,9	735	7,24
21	0,0	0,0	913	8,40
24	0,0	0,0	1019	8,56
27	0,0	0,0	857	7,99

Tabela A17 Resultados experimentais do ensaio G-5.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	0,5	23,2	0	0,13
3	0,6	22,7	0	0,07
6	0,6	22,5	0	0,26
9	3,6	20,1	15	0,68
12	12,6	16,3	79	1,32
15	14,1	14,5	253	3,09
18	9,3	9,4	456	5,38
21	0,7	0,6	864	9,46
24	0,0	0,0	1221	9,24
27	0,0	0,0	1272	8,82

Tabela A18 Resultados experimentais do ensaio G-6.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	0,5	22,4	0	0,09
3	0,5	22,4	0	0,12
6	0,6	22,7	0	0,22
9	3,4	19,9	14	0,58
12	13,0	16,8	68	1,11
15	14,4	15,4	201	2,24
18	11,5	11,7	445	3,26
21	4,0	3,8	760	7,74
24	0,0	0,0	855	8,99
27	0,0	0,0	945	9,48

Tabela A19 Resultados experimentais do ensaio G-7.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	3,10	22,3	22	0,34
4	13,0	18,9	33	0,67
8	16,7	17,3	107	1,64
12	14,0	13,3	382	4,06
16	5,4	5,0	554	7,38
20	0,0	0,0	857	7,68
24	0,0	0,0	1120	8,09
28	0,0	0,0	938	7,60

Tabela A20 Resultados experimentais do ensaio G-8.

Tempo (h)	AR (g/L)	ART (g/L)	A (U/L)	X (g/L)
0	1,8	22,5	0	0,12
4	4,8	21,9	3	0,23
8	11,0	17,0	38	0,77
12	15,5	16,2	181	1,98
16	12,3	12,3	487	4,28
20	2,7	2,5	686	7,60
24	0,0	0,0	916	8,21
28	0,0	0,0	887	8,46

Tabela A21 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio I-1.

t (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	0,00	0,00	0,00
6	0,02	0,00	0,00
7	0,02	0,00	0,00
8	0,02	0,02	0,00
9	0,03	0,06	0,00
10	0,04	0,11	0,00
11	0,05	0,17	0,84
12	0,06	0,24	1,99
13	0,07	0,33	3,31
14	0,09	0,42	4,74
15	0,11	0,51	6,23
16	0,12	0,59	7,75
17	0,13	0,67	9,42
18	0,14	0,74	11,14
19	0,15	0,78	12,62
20	0,15	0,79	13,72
21	0,15	0,73	14,68
22	0,16	0,64	15,42
23	0,15	0,52	15,63
24	0,15	0,41	15,21
25	0,14	0,31	13,73
26	0,13	0,23	11,40
27	0,12	0,17	8,80
28	0,11	0,12	6,29
29	0,10	0,09	4,24
30	0,09	0,08	2,74
31	0,08	0,07	1,60
32	0,08	0,07	0,68

t (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
33	0,07	0,08	-0,23
34	0,07	0,08	-1,19
35	0,06	0,09	-2,13
36	0,06	0,10	-2,98
37	0,05	0,10	-3,59
38	0,05	0,10	-3,89
39	0,05	0,10	-3,95
40	0,05	0,10	-3,79
41	0,04	0,10	-3,41
42	0,04	0,10	-2,80
43	0,03	0,10	-2,05
44	0,03	0,10	-1,22
45	0,03	0,11	-0,35
46	0,03	0,10	0,50
47	0,02	0,10	1,30
48	0,02	0,10	2,01
49	0,02	0,09	2,55
50	0,02	0,08	2,88
51	0,02	0,07	3,03
52	0,01	0,05	3,01
53	0,01	0,03	2,83
54	0,01	0,02	2,51
55	0,00	0,00	2,07
56	0,00	0,00	1,50
57	0,00	0,00	0,82
58	0,00	0,00	0,03
59	0,00	0,00	-0,87
60	0,00	0,00	-1,88
61	0,00	0,00	-3,00
62	0,00	0,00	-4,24
63	0,00	0,00	-5,61
64	0,00	0,00	-7,12

Tabela A22 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio I-2.

t (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	0,05	0,21	0,00
7	0,06	0,28	0,00
8	0,07	0,35	0,00
9	0,09	0,41	0,00
10	0,11	0,47	0,00
11	0,14	0,51	0,00
12	0,16	0,54	0,62
13	0,17	0,57	2,57
14	0,17	0,61	5,06
15	0,18	0,63	7,42
16	0,17	0,63	9,30
17	0,17	0,59	10,54
18	0,16	0,51	11,15
19	0,16	0,42	11,26
20	0,15	0,34	10,98
21	0,14	0,27	10,38
22	0,12	0,22	9,56
23	0,11	0,17	8,59
24	0,10	0,14	7,54
25	0,09	0,12	6,30
26	0,08	0,10	4,90
27	0,07	0,09	3,44
28	0,06	0,08	2,00
29	0,06	0,07	0,60
30	0,05	0,07	-0,70
31	0,05	0,06	-1,84
32	0,04	0,06	-2,78

t (h)	μ_x (h ⁻¹)	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
33	0,04	0,06	-3,35
34	0,03	0,07	-3,49
35	0,03	0,08	-3,32
36	0,03	0,09	-2,92
37	0,02	0,10	-2,45
38	0,02	0,11	-2,01
39	0,02	0,11	-1,59
40	0,01	0,11	-1,20
41	0,01	0,10	-0,84
42	0,01	0,10	-0,53
43	0,01	0,09	-0,25
44	0,01	0,08	-0,01
45	0,00	0,06	0,20
46	0,00	0,05	0,36
47	0,00	0,04	0,48
48	0,00	0,03	0,56
49	0,00	0,02	0,57
50	0,00	0,01	0,52
51	0,00	0,01	0,41
52	0,00	0,01	0,27
53	0,00	0,01	0,13
54	0,00	0,01	0,00
55	0,00	0,02	-0,11
56	0,00	0,00	-0,15
57	0,00	0,00	-0,12
58	0,00	0,00	0,00
59	0,00	0,00	0,24
60	0,00	0,00	0,61
61	0,00	0,00	1,13
62	0,00	0,00	1,83
63	0,00	0,00	2,71
64	0,00	0,00	3,80

Tabela A23 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio I-3.

t (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	---	---	---
3	---	---	---
4	---	---	---
5	---	---	---
6	0,10	0,57	0,67
7	0,11	0,66	0,99
8	0,13	0,73	1,35
9	0,14	0,78	1,80
10	0,15	0,78	2,38
11	0,16	0,76	3,07
12	0,16	0,70	3,86
13	0,15	0,62	4,93
14	0,14	0,52	6,23
15	0,13	0,42	7,50
16	0,12	0,33	8,61
17	0,11	0,26	9,54
18	0,11	0,22	10,26
19	0,10	0,19	10,65
20	0,09	0,17	10,66
21	0,09	0,15	10,02
22	0,08	0,13	8,75
23	0,08	0,11	7,11
24	0,07	0,10	5,30
25	0,07	0,09	3,45
26	0,06	0,08	1,67
27	0,06	0,07	0,04
28	0,06	0,07	-1,34
29	0,05	0,07	-2,27
30	0,05	0,07	-2,69

t (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
31	0,05	0,07	-2,78
32	0,04	0,07	-2,64
33	0,04	0,07	-2,45
34	0,04	0,06	-2,32
35	0,03	0,06	-2,21
36	0,03	0,05	-2,11
37	0,02	0,05	-1,96
38	0,02	0,04	-1,74
39	0,01	0,03	-1,45
40	0,01	0,03	-1,12
41	0,01	0,02	-0,76
42	0,00	0,01	-0,39
43	0,00	0,01	-0,01
44	0,00	0,00	0,38
45	0,00	0,00	0,75
46	0,00	0,00	1,11
47	0,00	0,00	1,44
48	0,00	0,00	1,74
49	0,00	0,00	1,99
50	0,00	0,00	2,17
51	0,00	0,00	2,27
52	0,00	0,00	2,27
53	0,00	0,00	2,16
54	0,00	0,00	1,94
55	0,00	0,00	1,58
56	0,00	0,00	1,08

Tabela A24 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio F20-1.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,12	0,17	---
3	0,15	0,31	5,28
4	0,17	0,38	8,21
5	0,19	0,40	11,51
6	0,20	0,43	14,68
7	0,21	0,50	17,52
8	0,22	0,61	19,80
9	0,22	0,70	21,35
10	0,22	0,71	22,54
11	0,22	0,67	23,18
12	0,21	0,61	22,91
13	0,20	0,55	21,89
14	0,19	0,50	20,22
15	0,18	0,46	17,90
16	0,16	0,41	14,33
17	0,15	0,36	9,95
18	0,13	0,31	5,80
19	0,11	0,25	2,74
20	0,08	0,20	0,85
21	0,05	0,14	0,00
22	0,02	0,09	0,00
23	0,00	0,05	0,00
24	0,00	0,01	0,00
25	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00

Tabela A25 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio F20-2.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,10	0,47	0,23
3	0,16	0,71	3,55
4	0,19	0,94	6,51
5	0,21	1,13	9,11
6	0,23	1,25	11,70
7	0,24	1,25	14,63
8	0,25	1,17	17,44
9	0,25	1,04	19,52
10	0,25	0,91	21,21
11	0,24	0,80	22,28
12	0,23	0,69	22,34
13	0,22	0,61	21,41
14	0,20	0,54	19,67
15	0,18	0,48	17,43
16	0,16	0,43	14,56
17	0,14	0,40	11,38
18	0,11	0,36	8,38
19	0,09	0,32	5,75
20	0,07	0,28	3,58
21	0,06	0,23	1,96
22	0,04	0,18	0,95
23	0,03	0,13	0,66
24	0,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00

Tabela A26 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio F20-3.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,07	0,00	0,42
3	0,10	0,00	1,55
4	0,13	0,00	3,59
5	0,16	0,04	6,43
6	0,18	0,08	9,17
7	0,19	0,12	11,17
8	0,19	0,18	12,39
9	0,19	0,25	13,05
10	0,19	0,35	13,58
11	0,19	0,44	13,87
12	0,19	0,52	13,66
13	0,18	0,55	12,84
14	0,17	0,54	11,55
15	0,15	0,51	10,03
16	0,13	0,45	8,22
17	0,10	0,37	6,27
18	0,07	0,28	4,47
19	0,04	0,20	3,11
20	0,03	0,12	2,24
21	0,01	0,06	1,68
22	0,00	0,01	1,32
23	0,00	0,00	1,05
24	0,00	0,00	0,80
25	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00

Tabela A27 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio F40-1.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	---	---	---
3	0,08	0,00	5,26
4	0,11	0,17	5,97
5	0,13	0,79	7,73
6	0,15	1,35	9,98
7	0,17	1,70	12,15
8	0,18	1,82	14,09
9	0,20	1,78	15,94
10	0,21	1,59	18,10
11	0,21	1,33	20,43
12	0,21	1,07	22,42
13	0,21	0,87	24,27
14	0,20	0,72	25,75
15	0,20	0,62	26,43
16	0,18	0,54	26,28
17	0,17	0,47	25,46
18	0,16	0,42	24,12
19	0,14	0,37	22,11
20	0,13	0,33	19,68
21	0,12	0,30	17,26
22	0,10	0,27	15,28
23	0,09	0,24	13,78
24	0,08	0,21	12,58
25	0,07	0,19	11,46
26	0,05	0,17	10,36
27	0,04	0,15	9,35
28	0,02	0,13	8,47
29	0,01	0,10	7,76
30	0,00	0,07	7,24
31	0,00	0,04	6,94
32	0,00	0,01	6,91
33	0,00	0,00	0,00
34	0,00	0,00	---
35	0,00	0,00	---
36	0,00	0,00	---

Tabela A28 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio F40-2.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,06	0,42	---
3	0,09	0,78	0,00
4	0,13	1,20	2,28
5	0,16	1,58	4,88
6	0,19	1,79	7,29
7	0,21	1,76	9,66
8	0,22	1,54	11,92
9	0,22	1,27	13,92
10	0,22	1,01	15,89
11	0,22	0,80	17,64
12	0,21	0,64	18,88
13	0,20	0,53	19,94
14	0,18	0,47	20,80
15	0,17	0,42	21,23
16	0,15	0,40	21,20
17	0,14	0,38	20,69
18	0,13	0,36	19,73
19	0,12	0,34	18,14
20	0,10	0,31	16,11
21	0,08	0,27	13,95
22	0,06	0,24	11,95
23	0,05	0,20	10,18
24	0,04	0,16	8,63
25	0,03	0,13	7,27
26	0,02	0,08	6,11
27	0,02	0,05	5,16
28	0,01	0,02	4,44
29	0,01	0,00	4,01
30	0,00	0,00	3,90
31	0,00	0,00	4,16
32	0,00	0,00	4,83
33	0,00	0,00	---
34	0,00	0,00	---
35	0,00	0,00	---
36	0,00	0,00	---

Tabela A29 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio F40-3.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,02	0,41	2,01
3	0,05	0,73	4,28
4	0,08	1,01	7,07
5	0,13	1,23	10,36
6	0,17	1,33	13,61
7	0,19	1,30	16,92
8	0,21	1,18	20,07
9	0,22	1,02	22,52
10	0,22	0,86	24,15
11	0,22	0,70	24,86
12	0,22	0,58	24,70
13	0,21	0,49	23,93
14	0,19	0,44	22,81
15	0,17	0,41	21,53
16	0,15	0,38	20,18
17	0,13	0,35	18,84
18	0,11	0,31	17,57
19	0,09	0,28	16,33
20	0,07	0,24	15,08
21	0,06	0,20	13,84
22	0,05	0,17	12,62
23	0,04	0,15	11,42
24	0,03	0,14	10,24
25	0,02	0,13	9,08
26	0,01	0,11	7,94
27	0,01	0,09	6,82
28	0,00	0,06	5,72
29	0,00	0,04	4,64
30	0,00	0,02	3,61
31	0,00	0,00	2,65
32	0,00	0,00	1,77
33	0,00	0,00	1,02
34	0,00	0,00	0,40
35	0,00	0,00	---
36	0,00	0,00	---

Tabela A30 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio F40-4.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,03	0,17	0,00
3	0,08	0,44	0,00
4	0,12	0,62	0,18
5	0,15	0,77	3,33
6	0,18	0,90	7,61
7	0,20	1,00	12,14
8	0,22	1,05	16,38
9	0,23	1,04	20,29
10	0,23	0,97	23,57
11	0,23	0,87	25,81
12	0,22	0,78	26,97
13	0,22	0,69	27,13
14	0,21	0,62	26,44
15	0,21	0,56	25,16
16	0,20	0,51	23,58
17	0,18	0,47	21,96
18	0,16	0,44	20,45
19	0,15	0,41	19,06
20	0,13	0,40	17,77
21	0,11	0,37	16,49
22	0,09	0,33	15,22
23	0,08	0,28	13,99
24	0,06	0,24	12,79
25	0,05	0,19	11,57
26	0,03	0,14	10,30
27	0,02	0,09	8,99
28	0,01	0,05	7,65
29	0,00	0,01	6,28
30	0,00	0,00	4,89
31	0,00	0,00	3,49
32	0,00	0,00	2,11
33	0,00	0,00	0,79
34	0,00	0,00	---
35	0,00	0,00	---
36	0,00	0,00	---

Tabela A31 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio F40-5.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,06	0,04	0,00
3	0,10	0,10	1,17
4	0,12	0,18	2,99
5	0,14	0,27	5,40
6	0,15	0,35	8,39
7	0,16	0,41	11,33
8	0,16	0,44	13,84
9	0,17	0,46	15,66
10	0,16	0,46	16,77
11	0,16	0,45	17,37
12	0,16	0,43	17,61
13	0,15	0,41	17,73
14	0,14	0,37	17,81
15	0,14	0,34	17,77
16	0,13	0,31	17,56
17	0,11	0,29	17,12
18	0,10	0,30	16,50
19	0,09	0,30	15,73
20	0,08	0,31	14,91
21	0,07	0,30	14,08
22	0,06	0,28	13,24
23	0,05	0,25	12,39
24	0,04	0,21	11,53
25	0,03	0,17	10,65
26	0,03	0,13	9,75
27	0,02	0,09	8,83
28	0,01	0,06	7,89
29	0,01	0,03	6,91
30	0,00	0,01	5,89
31	0,00	0,00	4,82
32	0,00	0,00	3,69
33	0,00	0,00	2,50
34	0,00	0,00	1,25
35	0,00	0,00	---
36	0,00	0,00	---

Tabela A32 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio F40-6.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	---	---	---
3	0,09	0,33	---
4	0,11	0,44	0,28
5	0,14	0,49	1,67
6	0,15	0,52	3,77
7	0,16	0,52	6,21
8	0,17	0,50	8,72
9	0,18	0,47	11,57
10	0,19	0,44	14,49
11	0,19	0,41	16,83
12	0,19	0,38	18,36
13	0,18	0,36	19,11
14	0,16	0,33	19,20
15	0,14	0,31	18,78
16	0,13	0,30	17,93
17	0,11	0,28	16,42
18	0,09	0,28	14,30
19	0,08	0,27	11,94
20	0,07	0,26	9,54
21	0,05	0,24	7,32
22	0,04	0,21	5,35
23	0,03	0,16	3,64
24	0,02	0,11	2,16
25	0,01	0,07	1,02
26	0,00	0,04	0,26
27	0,00	0,01	0,00
28	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00
31	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,00
33	0,00	0,00	0,00
34	0,00	0,00	0,00
35	0,00	0,00	0,00
36	0,00	0,00	0,00

Tabela A33 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio G-1.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,02	0,00	0,00
3	0,05	0,51	0,57
4	0,09	0,76	2,02
5	0,13	1,12	5,35
6	0,16	1,51	10,10
7	0,19	1,80	14,93
8	0,20	1,96	19,08
9	0,21	1,94	22,12
10	0,22	1,79	24,03
11	0,22	1,59	25,03
12	0,22	1,37	25,32
13	0,23	1,17	25,49
14	0,23	1,00	25,45
15	0,23	0,85	24,78
16	0,22	0,71	23,34
17	0,20	0,58	21,19
18	0,17	0,46	18,50
19	0,14	0,36	15,79
20	0,11	0,28	13,57
21	0,09	0,23	11,78
22	0,07	0,18	10,24
23	0,05	0,14	8,71
24	0,03	0,10	6,93
25	0,01	0,06	4,61
26	0,00	0,00	1,49
27	0,00	0,00	---
28	0,00	0,00	---

Tabela A34 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio G-2.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	--	---	---
1	---	---	---
2	---	0,28	---
3	0,00	0,38	0,00
4	0,05	0,47	0,00
5	0,10	0,61	0,80
6	0,15	0,79	2,12
7	0,18	0,94	4,13
8	0,21	1,04	6,87
9	0,22	1,06	11,00
10	0,22	1,00	15,90
11	0,21	0,91	20,24
12	0,21	0,81	23,43
13	0,21	0,73	25,36
14	0,22	0,66	25,95
15	0,22	0,60	25,37
16	0,21	0,54	23,98
17	0,19	0,47	21,86
18	0,17	0,41	19,27
19	0,14	0,35	16,60
20	0,12	0,29	13,96
21	0,10	0,24	11,34
22	0,08	0,19	8,72
23	0,06	0,15	6,01
24	0,04	0,10	3,14
25	0,02	0,05	0,00
26	0,00	0,00	---
27	0,00	0,00	---
28	0,00	0,00	---

Tabela A35 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio G-3.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,02	0,20	0,00
3	0,02	0,25	0,00
4	0,03	0,42	0,20
5	0,05	0,68	4,40
6	0,07	0,97	10,95
7	0,09	1,22	17,55
8	0,12	1,38	23,06
9	0,15	1,45	26,84
10	0,18	1,44	29,09
11	0,20	1,37	30,28
12	0,21	1,28	30,69
13	0,23	1,16	29,83
14	0,23	1,04	28,78
15	0,23	0,92	29,09
16	0,22	0,79	29,57
17	0,21	0,67	27,53
18	0,19	0,54	23,10
19	0,17	0,44	18,23
20	0,15	0,35	13,83
21	0,12	0,28	10,12
22	0,10	0,22	7,07
23	0,08	0,16	4,59
24	0,06	0,11	2,56
25	0,03	0,06	0,89
26	0,00	0,01	---
27	0,00	0,00	---
28	0,00	0,00	---

Tabela A36 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio G-4.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,01	0,20	---
3	0,04	0,37	6,25
4	0,08	0,51	10,00
5	0,13	0,62	14,16
6	0,18	0,68	18,06
7	0,22	0,68	21,41
8	0,24	0,64	23,80
9	0,25	0,59	25,03
10	0,25	0,53	26,04
11	0,25	0,48	26,58
12	0,25	0,44	25,61
13	0,24	0,42	22,38
14	0,21	0,41	18,10
15	0,17	0,41	14,39
16	0,12	0,38	11,74
17	0,09	0,33	9,89
18	0,06	0,27	8,50
19	0,05	0,19	7,38
20	0,03	0,10	6,42
21	0,02	0,03	5,53
22	0,01	0,00	4,68
23	0,00	0,00	3,84
24	0,00	0,00	2,97
25	0,00	0,00	2,06
26	0,00	0,00	---
27	0,00	0,00	---

Tabela A37 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio G-5.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,01	0,00	0,00
3	0,05	0,02	0,00
4	0,08	0,19	0,50
5	0,11	0,43	1,05
6	0,14	0,65	2,03
7	0,18	0,83	5,40
8	0,21	0,96	9,47
9	0,24	1,02	13,62
10	0,26	0,97	18,14
11	0,27	0,85	22,24
12	0,26	0,73	24,88
13	0,24	0,65	25,37
14	0,22	0,58	24,14
15	0,20	0,51	22,32
16	0,18	0,47	20,97
17	0,18	0,40	20,18
18	0,19	0,38	19,26
19	0,18	0,33	17,93
20	0,13	0,26	16,52
21	0,09	0,18	14,99
22	0,04	0,10	12,64
23	0,00	0,04	9,47
24	0,00	0,00	6,06
25	0,00	0,00	2,97
26	0,00	0,00	---
27	0,00	0,00	---

Tabela A38 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio G-6.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	---	---	---
3	0,06	0,00	0,00
4	0,07	0,15	0,00
5	0,09	0,55	0,00
6	0,11	0,92	2,12
7	0,14	1,15	7,11
8	0,17	1,25	12,20
9	0,20	1,25	16,96
10	0,21	1,17	21,34
11	0,22	1,04	24,99
12	0,23	0,91	27,56
13	0,23	0,78	29,19
14	0,22	0,66	29,92
15	0,22	0,57	29,70
16	0,23	0,53	29,14
17	0,23	0,51	28,07
18	0,23	0,48	25,49
19	0,20	0,41	20,99
20	0,16	0,34	16,06
21	0,12	0,27	11,73
22	0,08	0,20	8,13
23	0,05	0,14	5,24
24	0,03	0,09	3,00
25	0,01	0,03	1,47
26	0,00	0,00	---
27	0,00	0,00	---

Tabela A39 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicoamilase (μ_p) durante o ensaio G-7.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,10	0,21	0,47
3	0,14	0,35	6,69
4	0,17	0,55	10,77
5	0,19	0,69	14,81
6	0,22	0,74	18,92
7	0,23	0,72	22,02
8	0,24	0,68	23,66
9	0,24	0,63	23,55
10	0,23	0,58	22,06
11	0,21	0,53	19,80
12	0,19	0,47	17,36
13	0,16	0,41	15,12
14	0,12	0,35	13,34
15	0,09	0,31	11,98
16	0,06	0,26	10,95
17	0,04	0,22	10,25
18	0,03	0,18	9,75
19	0,01	0,13	9,29
20	0,01	0,08	8,70
21	0,00	0,04	7,86
22	0,00	0,01	6,62
23	0,00	0,00	4,84
24	0,00	0,00	2,39
25	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	---
27	0,00	0,00	---
28	0,00	0,00	---

Tabela A40 Velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de glicamilase (μ_p) durante o ensaio G-8.

tempo (h)	μ_x (h^{-1})	μ_s (g/(g.h))	μ_p (U/(g.h))
0	---	---	---
1	---	---	---
2	0,04	0,59	0,00
3	0,09	0,78	0,00
4	0,12	0,87	0,58
5	0,16	0,90	5,00
6	0,19	0,89	11,09
7	0,21	0,85	16,99
8	0,22	0,80	21,76
9	0,23	0,74	25,63
10	0,23	0,67	28,46
11	0,23	0,61	29,66
12	0,22	0,56	29,24
13	0,21	0,51	27,18
14	0,20	0,48	24,01
15	0,19	0,46	20,54
16	0,17	0,43	17,23
17	0,15	0,38	14,29
18	0,12	0,32	11,81
19	0,10	0,26	9,75
20	0,07	0,20	8,01
21	0,05	0,15	6,48
22	0,03	0,10	5,10
23	0,01	0,06	3,79
24	0,00	0,03	2,51
25	0,00	0,00	1,22
26	0,00	0,00	---
27	0,00	0,00	---
28	0,00	0,00	---

Tabela A41 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio F40-4.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	2	0,96
2	2	0,96
6	2	0,98
10	7	0,76
14	128	0,46
22	2464	0,29
26	5212	0,24
30	6070	0,23

Tabela A42 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio F40-5.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
2	6	0,77
6	28	0,52
10	147	0,23
14	211	0,39
22	3295	0,25
26	4239	0,22
30	3528	0,26

Tabela A43 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio F40-6.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
2	4	0,84
6	8	0,75
10	8	0,79
14	104	0,54
22	3366	0,23
26	3401	0,29
30	2010	0,41

Tabela A44 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-1.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
2	1	1
6	21	1
10	171	0,17
14	258	0,69
18	177	0,55
22	479	0,46
26	175	0,57

Tabela A45 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-2.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
2	1	1
6	2	0,93
10	32	0,45
14	160	0,38
18	176	0,46
22	531	0,46
26	222	0,59

Tabela A46 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-3.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
2	1	1
6	1	1
10	20	0,56
14	150	0,50
18	200	0,40
22	314	0,50
26	201	0,38

Tabela A47 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-4.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
3	4	0,86
6	32	0,50
9	11	0,69
12	194	0,30
15	693	0,29
18	1082	0,32
21	1186	0,35
25	648	0,48

Tabela A48 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-5.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
3	1	0,95
6	4	0,77
9	196	0,12
12	426	0,25
15	1627	0,32
18	---	---
21	2784	0,22
25	1606	0,33

Tabela A49 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-6.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
3	2	0,82
6	4	0,69
9	23	0,48
12	80	0,28
15	511	0,31
18	621	0,40
21	764	0,37
25	390	0,55

Tabela A50 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-7.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
6	21	0,6
10	427	0,11
14	1450	0,18
18	2669	0,22
22	652	0,49
24	611	0,50

Tabela A51 Índice de consistência do caldo (K) e índice de comportamento do escoamento (n) obtidos no ensaio G-8.

tempo (h)	K (cP.s ⁿ⁻¹)	n
0	1	1
6	46	0,33
10	171	0,14
14	223	0,27
18	362	0,46
22	463	0,49
24	424	0,55