

**CIUMARA MARIA EMMENDOERFER NAVARRO**

**OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE**

*Candida utilis* A PARTIR DE GLICEROL

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre.  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia  
Química, Centro Tecnológico,  
Universidade Federal de Santa Catarina.  
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

**FLORIANÓPOLIS**

1996

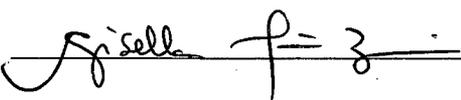
CIUMARA MARIA EMMENDOERFER NAVARRO

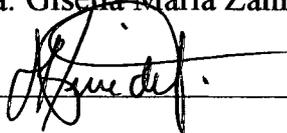
OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE  
*Candida utilis* A PARTIR DE GLICEROL

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela Comissão formada por:

Presidente:   
Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Membro:   
Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Membro:   
Profa. Dra. Gisella Maria Zanin

Membro:   
Prof. Honório Domingos Benedet

Florianópolis, 30 de agosto de 1996.

*AO MEU MARIDO E AOS MEUS PAIS,  
GRANDES INCENTIVADORES NA  
CAMINHADA EM BUSCA DESTE  
OBJETIVO*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow pela orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Agenor Furigo Jr. que acompanhou meu trabalho auxiliando sempre no que foi preciso.

A todos os meus amigos, que de alguma forma, com paciência me incentivaram e ajudaram nesta etapa, especialmente Silvinha, Marcinha, Dê, Caxa, Dadá, Salete e ao sempre prestativo Edevilson.

Ao amigo Dariva, que muito contribuiu na realização deste trabalho, meu eterno agradecimento.

Aos bolsistas Joanir e Graziela pela atenção, pela competência e pelas noites não dormidas, que foram extremamente importantes para a realização deste trabalho.

A CAPES, pelo suporte financeiro concedido durante esta pesquisa.

Ao meu marido, Ronaldo, aos meus pais, Irene e Euclides, ao meu irmão, Dionei, pelo incentivo, compreensão e carinho, meu especial agradecimento.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xvii</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
<b>2.1 - BREVE HISTÓRICO SOBRE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA</b>	<b>5</b>
<b>2.2 - MICRORGANISMO</b>	<b>6</b>
<b>2.3 - PRINCIPAIS VIAS METABÓLICAS</b>	<b>8</b>
<b>2.4 - VALOR NUTRITIVO DE PROTEÍNAS DE LEVEDURAS</b>	<b>10</b>
<b>2.5 - TOXIDEZ E PALATABILIDADE</b>	<b>13</b>
<b>2.6 - REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS</b>	<b>14</b>
<b>2.6.1 - Fonte de carbono</b>	<b>15</b>
<b>2.6.2 - Fonte de nitrogênio</b>	<b>16</b>
<b>2.6.3 - Minerais</b>	<b>17</b>
<b>2.6.4 - Fatores de Crescimento</b>	<b>19</b>
<b>2.6.5 - Oxigênio</b>	<b>20</b>
<b>2.7 - CRESCIMENTO MICROBIANO</b>	<b>21</b>
<b>2.8 - CULTURA BATELADA</b>	<b>22</b>

<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>3.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>
<b>3.2 - MICRORGANISMO</b>	<b>32</b>
<b>3.3 - MEIOS DE CULTURA</b>	<b>33</b>
3.3.1 - Meio YMA ( <i>Yeast Malt Extract Agar</i> )	33
3.3.2- Meio YM ( <i>Yeast Malt Extract</i> )	34
3.3.3 - Meio GSB ( <i>Glicerol-Sais-Biotina</i> )	35
3.3.4 - Meio de Fermentação	36
<b>3.4 - SOLUÇÕES UTILIZADAS</b>	<b>39</b>
3.4.1 - Solução de biotina	39
3.4.2 - Solução de anti-espumante	39
3.4.3 - Solução de hidróxido de sódio	40
<b>3.5 - MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>40</b>
3.5.1 - Amostragem	41
3.5.2 - Determinação da concentração celular	41
3.5.3 - Determinação da concentração de glicerol	43
<b>3.6 - ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO</b>	<b>44</b>
<b>3.7 - METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS CÁLCULOS</b>	<b>47</b>
3.7.1 - Fator de conversão de substrato em células	47
3.7.2 - Consumo específico de substrato	48
3.7.3 - Produtividade em células	48
3.7.4 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) para fermentação batelada	49
<b>3.8 - CRITÉRIO DE FINAL DE FERMENTAÇÃO</b>	<b>50</b>
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>4.1 - CONJUNTO INICIAL DE DADOS</b>	<b>54</b>
<b>4.2 - COMPORTAMENTO CINÉTICO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</b>	<b>60</b>
4.2.1 - Condição experimental 01	61
4.2.2. - Condição experimental 02	63

<i>4.2.3 - Condição experimental 03</i>	65
<i>4.2.4 - Condição experimental 04</i>	67
<i>4.2.5 - Condição experimental 05</i>	69
<i>4.2.6 - Condição experimental 06</i>	71
<i>4.2.7 - Condição experimental 07</i>	74
<i>4.2.8 - Condição experimental 08</i>	76
<i>4.2.9 - Condição experimental 09</i>	78
<b>4.2 - RESUMO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS</b>	<b>80</b>
<b>5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>108</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 - CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA (g/ 16g N) (LICHTFIELD, 1979; BOZE ET AL., 1992) _____	11
TABELA 2.2 - COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE LEVEDURAS SECAS (mg/g) (FIECHTER, 1984; PIRT, 1975). _____	16
TABELA 3.1- DESCRIÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL SATURADO USADO _____	28
TABELA 3.2- COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CONSERVAÇÃO _____	33
TABELA 3.3- COMPOSIÇÃO DO MEIO DE ADAPTAÇÃO _____	34
TABELA 3. 4- COMPOSIÇÃO DO MEIO GSB _____	35
TABELA 3. 5- COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO _____	37
TABELA 3.6- CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO UTILIZADAS NO PROCESSO _____	46
TABELA 4.1- PRODUTIVIDADE EXPERIMENTAL PARA A CONDIÇÃO EXPERIMENTAL ( $P_1$ ), PRODUTIVIDADE EXPERIMENTAL PARA A RÉPLICA ( $P_2$ ), PRODUTIVIDADE MÉDIA E VARIÂNCIA EXPERIMENTAL _____	54
TABELA 4.2- PARÂMETROS DO MODELO LINEAR EMPÍRICO _____	55
TABELA 4.3- PRODUTIVIDADE EXPERIMENTAL OBTIDA E PRODUTIVIDADE CALCULADA PELO MODELO, PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL _____	56
TABELA 4.4- PRODUTIVIDADE EXPERIMENTAL PARA A CONDIÇÃO EXPERIMENTAL ( $P_1$ ), PRODUTIVIDADE EXPERIMENTAL PARA A RÉPLICA ( $P_2$ ), PRODUTIVIDADE MÉDIA E VARIÂNCIA EXPERIMENTAL DO CONJUNTO INICIAL DE DADOS E DA NOVA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL SELECIONADA _____	57
TABELA 4. 5- PARÂMETROS REESTIMADOS _____	57
TABELA 4.6- PRODUTIVIDADE MÉDIA EXPERIMENTAL OBTIDA E PRODUTIVIDADE CALCULADA PELO MODELO, PARA CADA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL E PARA A NOVA CONDIÇÃO EXPERIMENTAL _____	58

TABELA 4.7- COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA OTIMIZADO \_\_\_\_\_ 59

TABELA 4. 8- MÉDIA DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS DAS DIFERENTES CONDIÇÕES  
EXPERIMENTAIS \_\_\_\_\_ 81

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1- PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DE LEVEDURAS. _____	9
FIGURA 3.1- ESQUEMA DA METODOLOGIA DE PLANEJAMENTO SEQUENCIAL UTILIZADA	31
FIGURA 3.2- METODOLOGIA USADA NOS EXPERIMENTOS _____	38
FIGURA 3.3- CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BIOMASSA _____	42
FIGURA 3.4- DESENHO ESQUEMÁTICO DO FERMENTADOR _____	45
FIGURA 3.5- FOTOGRAFIA DO FERMENTADOR UTILIZADO _____	46
FIGURA 3.6- PARÂMETROS CONSIDERADOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEMPO FINAL DO PROCESSO FERMENTATIVO: (A) CRESCIMENTO CELULAR, (B) CONSUMO DE BASE PARA CONTROLE DO pH, (C) pH, (D) CONSUMO DO SUBSTRATO. _____	52
FIGURA 4.1- DESVIOS ENTRE AS PRODUTIVIDADES EXPERIMENTAIS E AS CALCULADAS PELO MODELO _____	60
FIGURA 4.2- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 01 _____	61
FIGURA 4.3- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 01 _____	62
FIGURA 4.4- VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 01 _____	62
FIGURA 4.5- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 02 _____	64
FIGURA 4.6- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 02 _____	64
FIGURA 4.7- VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 02 _____	65
FIGURA 4.8- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 03 _____	66

FIGURA 4.9- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 03	66
FIGURA 4.10- VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 03	67
FIGURA 4.11- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 04	68
FIGURA 4.12- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 04	68
FIGURA 4.13- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 05	70
FIGURA 4.14- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 05	70
FIGURA 4.15- VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 05	71
FIGURA 4.16- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 06	72
FIGURA 4.17- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 06	72
FIGURA 4.18- VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 06	73
FIGURA 4.19- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 07	74
FIGURA 4.20- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 07	75
FIGURA 4.21- VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 07	75
FIGURA 4.22- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 08	76
FIGURA 4.23- LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 08	77

FIGURA 4.24- VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 08	77
FIGURA 4.25- CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 09	78
FIGURA 4.26 - LOGARITMO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 09	79
FIGURA 4.27 - VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O EXPERIMENTO 09	79

## NOMENCLATURA

$\mu$	velocidade específica de crescimento, $h^{-1}$
$X$	concentração de biomassa, g/L
$X_t$	concentração de biomassa, g/L, após um intervalo de tempo t, h
$X_o$	concentração de biomassa inicial, g/L
$\mu_{\text{máx}}$	velocidade específica máxima de crescimento, $h^{-1}$
$S$	concentração de substrato, g/L
$K_s$	constante de saturação
<b>DMA</b>	desvio médio absoluto
$Y_{x/s}$	fator de conversão de substrato em células, g/g
$X_i$	concentração de biomassa no tempo $t_i$ , g/L
$X_f$	concentração de biomassa no final da fermentação, g/L
$S_o$	concentração de glicerol no início da fermentação, g/L
$S_i$	concentração de glicerol no tempo $t_i$ , g/L
$S_f$	concentração de glicerol no final da fermentação, g/L
$Y_{s/x}$	consumo específico de substrato, g/g
$P$	produtividade, g/L.h
$t_f$	tempo de fermentação, h
$F$	função objetivo
$\sigma_y^2$	variância experimental

$\chi^2$	qui-quadrado
<b>ACO</b>	aconitato hidratase
<b>ACS</b>	acetil-CoA sintetase
<b>ADC, ADM, ADR</b>	álcool dehidrogenase
<b>ALD</b>	aldeído dehidrogenase
<b>CIT</b>	citrato sintetase
<b>DAR</b>	dihidroxiacetona-P redutase
<b>ENO</b>	enolase
<b>FBA</b>	frutose-bifosfato aldolase
<b>FBP</b>	frutose bifosfatase
<b>FRD</b>	fumarato redutase
<b>FUM</b>	fumarase
<b>GLD</b>	gliceraldeído-3-P dehidrogenase
<b>GLK</b>	glucoquinase
<b>GND</b>	6-fosfogluconato dehidrogenase
<b>GPO</b>	glicerol fosfato-ubiquinona oxidoreductase
<b>GPM</b>	fosfoglicerato mutase
<b>GPP</b>	glicerol-1-fosfatase
<b>GUT1</b>	glicerol quinase
<b>GUT2</b>	glicerol-3-P dehidrogenase
<b>HXK</b>	hexoquinase
<b>ICD</b>	isocitrato dehidrogenase

<b>KGD</b>	$\alpha$ -cetoglutarato dehidrogenase
<b>LDH</b>	lactato dehidrogenase
<b>MDD</b>	malato dehidrogenase
<b>MLS</b>	malato sintetase
<b>PCK</b>	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
<b>PDC</b>	piruvato decarboxilase
<b>PDH</b>	piruvato dehidrogenase
<b>PFK</b>	fosfofrutoquinase
<b>PGK</b>	fosfoglicerato quinase
<b>PGL</b>	6-fosfogluconolactonase
<b>PML</b>	fosfomanose isomerase
<b>PYC</b>	piruvato carboxilase
<b>PYK</b>	piruvato quinase
<b>RPE</b>	ribulose-5-P 3-epimerase
<b>RPL</b>	ribose 5-fosfato isomerase
<b>SDH</b>	succinato dehidrogenase
<b>SCS</b>	succinil-CoA sintetase
<b>TAL</b>	transaldolase
<b>TKT</b>	transcetolase
<b>TPL</b>	triosefosfato isomerase
<b>ZWF</b>	glicose-6-fosfato dehidrogenase

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a otimização de um meio de cultura para produção de *Candida utilis* IZ-1840, em cultivo descontínuo, contendo glicerol como principal fonte de carbono. A composição do meio de cultura base foi a seguinte:  $K_2HPO_4$  0,49 g/L,  $KH_2PO_4$  1,74 g/L,  $NH_4Cl$  4,00 g/L, ácido cítrico mono hidratado 0,21 g/L,  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$  2,54 g/L,  $Na_2SO_4$  1,63 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  7,00 mg/L, biotina 4,00  $\mu g/L$  e glicerol 10,00 g/L. As condições experimentais, exceto a composição do meio de fermentação, foram as mesmas em todos os ensaios (pH (4,5), temperatura (30 °C), agitação (300 rpm), aeração (3,0 L/min), volume de inóculo (0,4 L), volume de meio (3,6 L). Para a otimização do meio de cultura, visando a maximização da produtividade em células, foi utilizado um planejamento fatorial saturado e uma metodologia de planejamento sequencial. Com seis variáveis ( $[KH_2PO_4]$ ,  $[NH_4Cl]$ , [ácido cítrico mono hidratado],  $[MgCl_2 \cdot 6 H_2O]$ ,  $[Na_2SO_4]$ ,  $[ZnSO_4 \cdot 7 H_2O]$  e dois níveis (20 e 100% da concentração de sais do meio base), oito condições experimentais iniciais foram realizadas. Com o resultado deste conjunto inicial de dados, foram estimados os parâmetros de um modelo linear empírico, feita a validação do mesmo e feita a busca das concentrações de sais que maximizaram a produtividade em células. A produtividade em células do meio otimizado, cuja composição é:  $K_2HPO_4$  0,49 g/L,  $KH_2PO_4$  1,74 g/L,  $NH_4Cl$  3,20 g/L, ácido cítrico mono hidratado 0,17 g/L,  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$  2,03 g/L,  $Na_2SO_4$  1,63 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  7,00 mg/L, glicerol 10,00 g/L e biotina 4,00  $\mu g/L$ , foi 0,87 g/L.h, o fator de conversão de substrato em células foi 0,88 g/g, o consumo específico de glicerol foi 1,12 g/g e a velocidade específica máxima de crescimento foi 0,34  $h^{-1}$ .

## ABSTRACT

The objective of this work was the optimization of a culture medium for production of *Candida utilis* IZ-1840, in batch culture, containing glycerol as the main carbon source. The composition of base culture medium was the following:  $K_2HPO_4$  0.49 g/L,  $KH_2PO_4$  1.74 g/L,  $NH_4Cl$  4.00 g/L, mono hydrated citric acid 0.21 g/L,  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$  2.54 g/L,  $Na_2SO_4$  1.63 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  7.00 mg/L, biotin 4.00  $\mu$ g/L e glycerol 10.00 g/L. The experimental conditions, except the composition of fermentation medium, were the same (pH (4.5), temperature (30 °C), stirrer speed (300 rpm), aeration (3.0 L/min), inoculum volume (0.4 L), medium volume (3.6 L)). For optimization of the culture medium, seeing a maximization of cells productivities, a factorial design and a sequential design technique was used. With six variables ( $[KH_2PO_4]$ ,  $[NH_4Cl]$ , [mono hydrated citric acid],  $[MgCl_2 \cdot 6 H_2O]$ ,  $[Na_2SO_4]$ ,  $[ZnSO_4 \cdot 7 H_2O]$ ) and two levels (20 and 100% of salts concentration of base medium), eight first experimental conditions were performed. With the results of this initial data group, the parameters of empiric linear model were valued, the model validation and the search of optimum salts concentrations que maximizaram the cells productivities. The cells productivities of optimization medium, with the following composition:  $K_2HPO_4$  0.49 g/L,  $KH_2PO_4$  1.74 g/L,  $NH_4Cl$  3.20 g/L, mono hydrated citric acid 0.17 g/L,  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$  2.03 g/L,  $Na_2SO_4$  1.63 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  7.00 mg/L, glycerol 10.00 g/L e biotin 4.00  $\mu$ g/L, was 0.87 g/L.h, the cell yield coefficient was 0.88 g/g, the specific consum of glycerol was 1.12 g/g and the maximum specific growth rate was 0.34  $h^{-1}$ .

## 1 - INTRODUÇÃO

A partir do primeiro choque econômico do petróleo ocorrido em 1973, os países industrializados e os em via de desenvolvimento sofreram um forte impacto com o encarecimento desta matéria-prima no mercado mundial, gerando assim os mais diversos e graves problemas para as nações importadoras. Em meados de 1980, teve lugar um segundo golpe que aumentou novamente os preços deste produto.

Tais acontecimentos incentivaram a criação de programas de substituição e economia dos derivados energéticos de origem fóssil por fontes renováveis. Os governos dos países dependentes do petróleo desde então, têm realizado esforços no sentido de buscar alternativas energéticas a esta evasão de divisas, ou seja, à importação de petróleo.

A título de exemplo, pode-se citar o caso do PRO-ÁLCOOL no Brasil. Em determinados momentos mais de 90% da frota de veículos de passeio utilizavam álcool etílico como combustível (FLORETIN, 1995).

Por outro lado, o setor industrial vem experimentando uma série de procedimentos para diminuir o consumo de óleo combustível. Além da adoção de medidas de conservação de energia, o uso de fontes alternativas, tais como bagaço de cana, carvão ou biogás, têm sido aplicados.

Da mesma forma estão bem adiantados alguns estudos no sentido de utilizar óleos vegetais modificados (transesterificados) como alternativa ao consumo do diesel, grande responsável pela importação do petróleo.

Além do alto poder calorífico, os óleos vegetais detêm qualidades comumente não encontradas em outras formas alternativas de combustíveis como a ausência de enxofre na mistura de glicerídeos cuja produção industrial, por conseguinte, não gera substâncias danosas ao meio ambiente.

Embora os custos de produção e de transformação, calculados com base em culturas oleaginosas tradicionais de ciclo anual, sejam atualmente desfavoráveis em relação aos derivados de petróleo, não há dúvida de que os óleos vegetais extraídos de culturas perenes, pouco ou ainda não exploradas no País, poderão representar uma possibilidade interessante na substituição parcial ou total das frações mais leves do petróleo, principalmente o óleo diesel.

Através do processo de transesterificação, que consiste basicamente em introduzir a carga do óleo vegetal num reator de aço carbono dotado de agitador e com sistema de aquecimento indireto, a banho de óleo ou vapor, onde os glicerídeos são submetidos ao ataque por etanol ou metanol, em excesso, na presença de catalisadores ácidos ou básicos, surge como principal resíduo o glicerol.

Ao se considerar o consumo do óleo diesel do Brasil que em 1990 foi de 21 milhões de toneladas, a substituição gradativa deste combustível pelo óleo vegetal modificado, acarretaria um excedente bem superior ao que poderia ser absorvido pelas indústrias farmacêuticas, bélicas ou de alimentos.

Não se dispõe, no momento, de informações sobre as intenções do Governo Federal em fomentar a implantação de um programa dessa natureza, embora, sob o ponto de vista tecnológico, a proposta seja factível.

BORZANI (1987), em seu “Estudo prospectivo de utilização de glicerina como matéria-prima de processos biotecnológicos”, realizado para a EMPRABA, informa que, através de um levantamento bibliográfico, identificou cerca de trinta materiais que podem ser obtidos por processos biotecnológicos a partir de glicerol como fonte de carbono e energia. Ao final, conclui que dentre as várias aplicações possíveis “... a que nos parece mais indicada, levando-se em conta as quantidades relativamente grandes que se imagina que serão obtidas, é a produção industrial de *Candida utilis* para ser utilizada como suplemento protéico-vitamínico de rações (a partir de 1 tonelada de glicerol é possível obter 500 kg de levedura seca, com teor protéico que pode alcançar 50%). Outros microrganismos, além da *Candida utilis*, poderiam ser considerados, mas esta apresenta duas vantagens, a saber: 1) é uma levedura e, por esse motivo, sua produção industrial é relativamente simples; 2) é um microrganismo bem conhecido como suplemento de rações e também na alimentação do homem”.

Além do uso da levedura propriamente dita, também é bem conhecida a utilização, pela indústria de alimentos, de hidrolisados de *Candida utilis*, dentre os de outras leveduras, como agente realçador de sabor em produtos tais como: sopas, molhos, misturas para tempero, produtos de carne, pratos prontos congelados, produtos dietéticos, aperitivos variados, alimentos para animais de estimação, sobremesas e condimentos como, por exemplo, mostardas e vinagres.

Diante disto, o objetivo principal deste trabalho é apresentar uma contribuição prática aos conhecimentos concernentes à produção de Proteínas de Organismos Unicelulares à partir do glicerol, visto que existem pouquíssimos trabalhos sobre o

assunto em questão. Para isto, irá se otimizar o meio de cultura proposto por TRÍBOLI et al. (1992) visando maximizar a produtividade em células.

No Capítulo 2 deste trabalho foi realizada a revisão bibliográfica apresentando-se algumas características do microrganismo utilizado (*Candida utilis*), bem como as principais vias metabólicas utilizadas por esta levedura. A seguir, noções sobre o valor nutritivo, toxidez e palatabilidade das proteínas de leveduras são apresentados. São citados, também, os requerimentos nutricionais para o crescimento desta levedura.

No Capítulo 3 foram descritos o planejamento experimental, o equipamento, o microrganismo e os meios de cultura utilizados para a realização das fermentações. São relatados, também, os métodos analíticos usados na determinação da concentração de biomassa e de glicerol. Para finalizar o capítulo, os critérios de final de fermentação são expostos.

Os resultados obtidos e a discussão dos mesmos são apresentados no Capítulo 4. No Capítulo 5, as conclusões finais do trabalho e as sugestões para futuros trabalhos são finalmente relatadas.

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 - BREVE HISTÓRICO SOBRE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA**

Microorganismos tem sido usados pelo homem desde os tempos pré-históricos. A primeira utilização foi acidental e então, depois de muitas tentativas e erros, microrganismos foram usados empiricamente na manufatura de bebidas, alimentos, tecidos e antibióticos. Em 1830, CAGNIARD DE LATOUR, KUTZING e SCHWANN descobriram que o crescimento de leveduras e outros protistas causavam o processo fermentativo envolvido na fabricação de produtos, tal como vinho (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

Em 1850, PASTEUR descreveu a um nível fisiológico bactérias e leveduras, introduzindo métodos assépticos e noções de meio mínimo, e definiu requerimentos de nutrientes e oxigênio (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

MONOD em 1949, modelou o crescimento bacteriano, introduzindo idéias de rendimento, velocidade específica de crescimento e concentração de substratos limitantes. O descobrimento dos microrganismos e a compreensão dos mecanismos de crescimento tornaram possível o desenvolvimento de métodos de cultura. Aproximação teórica para

cultura contínua foi feita por MONOD, NOVIK e SZILARD, em 1950 (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

Culturas de microrganismos, por seu valor nutricional, começaram a ser usadas no final da Primeira Guerra Mundial. Os alemães desenvolveram culturas de leveduras para o uso em dietas animais e humanas. Após a Segunda Guerra Mundial, produção de levedura alimentícia usando as pentoses do licor sulfítico foram desenvolvidas nos Estados Unidos (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

O interesse na produção de biomassa microbiana como alimento foi intensificado após 1950 e alcançou o auge em 1977 (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

## 2.2 - MICRORGANISMO

Segundo GHOUL (1985), Candida utilis é o nome comum da levedura que foi mencionado pela primeira vez por HAYDUCK & HAEHN em 1922, como uma levedura mineral. Segundo GHOUL (1985) esta levedura era chamada anteriormente de Torulopsis utilis até que LODDER & KREGER-VAN RIJ em 1952, confirmando pesquisas anteriores verificaram a formação do pseudomicélio. Em vista disso, Torulopsis utilis passou a pertencer ao gênero Candida. Esta levedura, também conhecida como torula, frequentemente cresce como levedura primária e a sua produção está mais voltada para produção de células do que para a produção de outros produtos de fermentação. Candida utilis é geralmente utilizada na produção de biomassa porque apresenta bom

crescimento em substratos como efluentes agro-industriais (melaço de cana, mandioca, etc.), hidrocarbonetos, etanol, resíduos de licor sulfítico e outros.

As leveduras são fungos geralmente unicelulares. Seu tamanho varia bastante, de 1-5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e de 5-30  $\mu\text{m}$  de comprimento. Sua forma também é muito variável, desde elementos esféricos até células elípticas bastante alongadas, quase filamentosas. Suas células apresentam as características dos seres eucarióticos. Têm membrana citoplasmática lipoprotéica, cuja principal função é regular as trocas com o meio ambiente. Possuem, também, uma parede celular rígida, constituída principalmente de dois polissacarídeos: manana e glucana; além disso, contém proteínas e lipídeos. No citoplasma, encontram-se, além dos componentes usuais em solução, um ou mais vacúolos, delimitados por uma membrana; mitocôndria; retículo citoplásmico; ribossomas e, frequentemente, grânulos de material de reserva - carboidratos, gorduras ou proteínas. O núcleo, tipicamente eucariótico, é envolvido por uma membrana nuclear (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

Existe uma grande variedade de trabalhos em que a levedura *Candida utilis* é utilizada. Entretanto, usando glicerol como fonte de carbono poucos foram publicados. Entre eles podemos citar:

\* TRÍBOLI et al. (1992) estudaram a influência da temperatura no cultivo de *Candida utilis* IZ-1840 em um meio sintético contendo glicerol como principal fonte de carbono. Neste estudo, estes autores concluíram que a temperatura ótima para o crescimento desta levedura em meio sintético utilizando glicerol como principal fonte de carbono é 30 °C .

\* Outro estudo realizado com este microrganismo crescendo sob glicerol, foi apresentado por FLORENTIN em 1995. Neste trabalho foi estudado a influência da concentração salina sobre o crescimento celular e a produção de acetato de etila (FLORENTIN; 1995).

### 2.3 - PRINCIPAIS VIAS METABÓLICAS

Glicerol pode também ser utilizado como fonte de carbono, sob condições aeróbias, por muitas espécies de leveduras. A via catabólica envolve difusão passiva através da membrana plasmática, fosforilação pela glicerol quinase e oxidação na mitocôndria pela glicerol fosfato-ubiquinona oxidoredutase (GANCEDO et al., 1968; SPRAGUE e CRONAN, 1977). A permeabilidade do glicerol é muito maior em Candida utilis do que em Saccharomyces cerevisiae. A segunda enzima envolvida no metabolismo é incorretamente chamada por alguns autores, de glicerol-fosfato oxidase ou glicerol-fosfato dehidrogenase, seu nome correto é glicerol fosfato-ubiquinona oxidoredutase (HARRISON, ROSE; 1989).

Ambas glicerol quinase e glicerol fosfato-ubiquinona oxidoredutase são induzidas pelo glicerol em *Candida spp.* mas, em Saccharomyces cerevisiae, o controle principal parece ser a repressão pela glicose já que as enzimas estão presentes após crescimento sobre lactato ou etanol (HARRISON, ROSE; 1989).

Na figura 2.1 estão apresentadas as principais vias do metabolismo intermediário de leveduras.

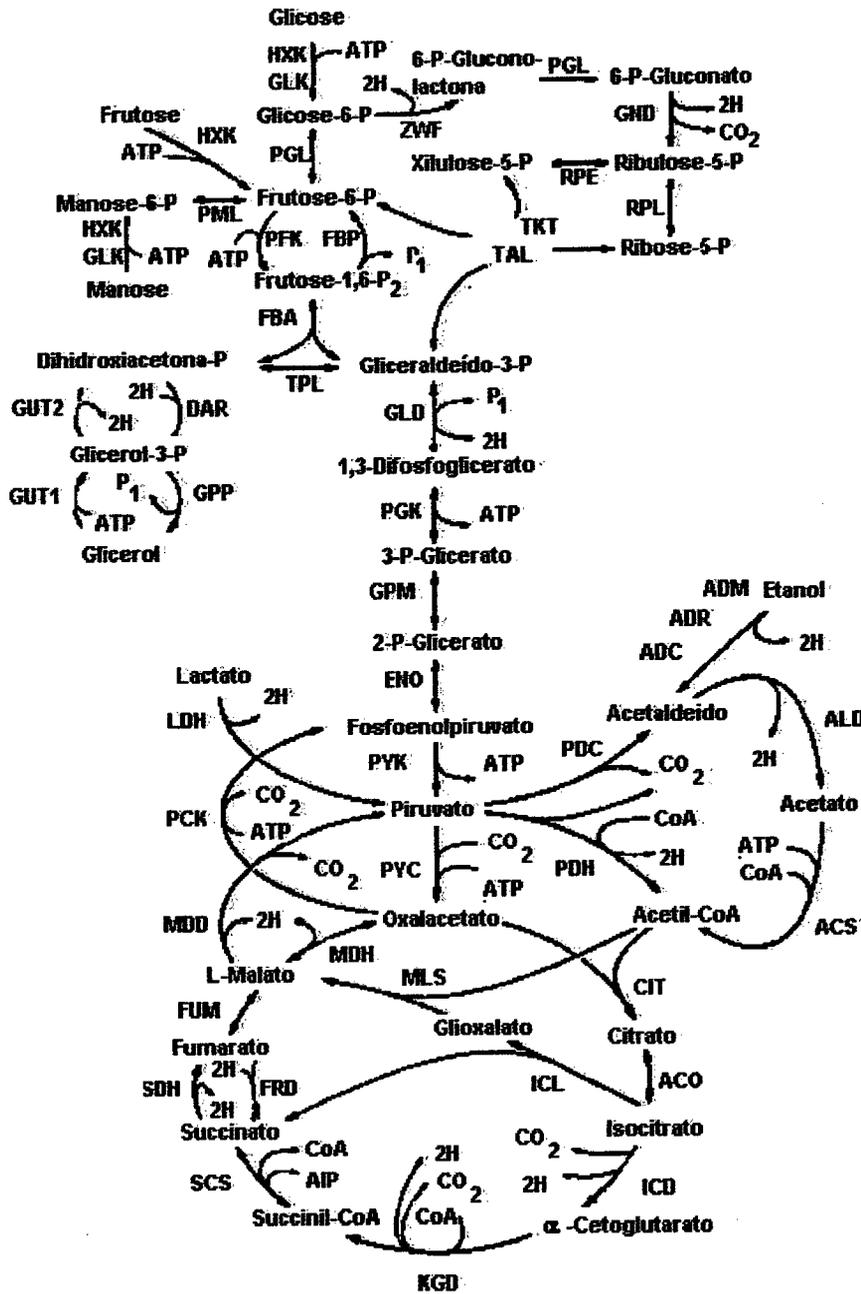


FIGURA 2.1- Principais vias do metabolismo intermediário de leveduras.

## **2.4 - VALOR NUTRITIVO DE PROTEÍNAS DE LEVEDURAS**

Apesar do grande interesse que despertam os microrganismos como fonte de alimento protéico, as informações disponíveis para avaliação de seu valor nutritivo são incompletas, pois são geralmente deduzidas de determinações químicas de sua composição. Além do mais, outros conhecimentos necessários para uma avaliação mais racional das qualidades alimentares desses produtos, tais como os que se referem a sua palatabilidade e eventual toxidez, são extremamente escassos (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

O valor alimentar dos microrganismos está diretamente relacionado com a composição de seus aminoácidos e com o conteúdo de ácido nucleico. Na tabela 2.1 podemos comparar o conteúdo de proteína de diferentes microrganismos cultivados sob diferentes substratos, com o conteúdo de proteína de ovos e soja (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

Proteínas de organismos unicelulares são deficientes em metionina. Mais importante é a evidência de que os aminoácidos de organismos unicelulares complementam a deficiência em lisina e treonina em grãos de cereais (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

**TABELA 2.1 - Conteúdo de aminoácidos essenciais de microrganismos de interesse para produção de biomassa microbiana (g/ 16g N) (LICHTFIELD, 1983; BOZE et al., 1992)**

Fonte de Proteína	Substrato	Cys	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Try	Val
Referência FAO		2,0	4,2	4,8	4,2	2,2	2,8	2,8	1,0	4,2
Soja		0,7	2,2	3,5	2,8	0,6	2,2	1,9	0,6	2,3
Ovos		2,4	6,7	8,9	6,5	5,1	5,8	5,1	1,6	7,3
<i>Candida lipolytica</i>	n- alcanos	1,1	4,5	7,0	7,0	1,8	4,4	4,9	1,4	5,4
<i>Candida utilis</i>	etanol	0,4	4,5	7,1	6,6	1,4	4,1	5,5	1,2	5,7
<i>S. cerevisiae</i>	melaço	1,6	5,5	7,9	8,2	2,5	4,5	4,8	1,2	5,5

\*Onde Cys = cisteína; Ile = isoleucina, Leu = leucina, Lys = lisina, Met= metionina, Phe = fenilalanina, Thr = triptofano, Try = treonina, Val = valina.

Dietas para crescimento rápido de animais que utilizam biomassa microbiana como principal fonte de proteína, podem ser melhoradas tanto pela adição de metionina, como pela incorporação de alguma proteína animal. Para humanos e animais adultos, entretanto, os aminoácidos são similares àqueles da soja e proteína animal, logo suplementação de aminoácidos não é requerida. Quando humanos são alimentados a mais ou a menos de sua necessidade, suplementação de metionina não significa melhora na retenção de proteína (BRESSANI, ELIAS; 1960).

Como para todos os alimentos, tratamento com calor excessivo ou outro processamento inadequado pode reduzir a qualidade da proteína (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

Enquanto proteínas unicelulares forem usadas somente para alimentação animal ou enquanto forem constituintes menores em dietas humanas, seu conteúdo de ácido nucleico é sem significância clínica. Mas, este torna-se fator limitante quando proteínas de organismos unicelulares são propostas como fonte de proteína nas dietas. Em homens o risco começa com a puberdade e em mulheres após a menopausa (SCRIMSHAW, MURRAY; 1995).

Ácido nucleico em elevadas concentrações pode elevar o nível de uréia e de ácido úrico no sangue, com conseqüente precipitação de ureatos nos tecidos e juntas, levando ao aparecimento de problemas de articulação e formação de cálculos renais (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

Para transpor esta limitação, proteínas unicelulares usadas como principal fonte de proteína em dietas humanas, devem ter seu conteúdo de ácido nucleico reduzidos. Os métodos mais empregados para redução de ácidos nucleicos são choque térmico, para liberar a ribonuclease das células, e hidrólise alcalina ou ácida. Isto não é necessário quando proteínas unicelulares são usadas como fonte de proteína em alimentação animal, pois somente humanos tem carência da enzima que quebra o ácido úrico em compostos solúveis (SCRIMSHAW, MURRAY; 1995).

## **2.5 - TOXIDEZ E PALATABILIDADE**

No que se refere aos problemas de toxidez que podem surgir com a utilização de microrganismos como alimentos, dois tipos devem ser considerados: os que resultam em sintomas agudos e os associados com reações crônicas. No primeiro caso, assumem importância os problemas gastrointestinais que, se estiverem apenas condicionados à digestibilidade do produto, podem ser removidos sem grande dificuldade através de processamento adequado. No segundo caso, os problemas que podem surgir pela presença de fatores antinutricionais e fatores alergênicos, os quais são de ocorrência comum em proteínas vegetais, podem constituir-se em um obstáculo à utilização de proteínas microbianas (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

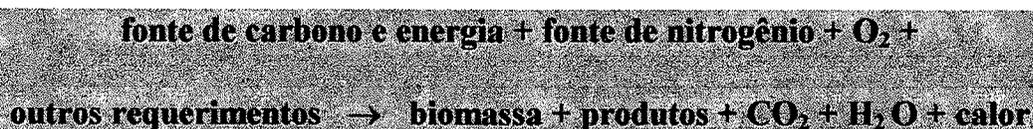
Estudos mostram que uma pequena variação no processamento pode causar diferença significativa no que se refere à segurança e aceitabilidade da proteína para consumo humano. Novos produtos, com proteína microbiana, devem ser testados quanto à alergenicidade, antes de serem usados para consumo humano (SCRIMSHAW, MURRAY; 1995).

Os ensaios concernentes à palatabilidade do material microbiano, a ser utilizado como alimento protéico, devem ser amplamente desenvolvidos, pois não são apenas as qualidades nutricionais que irão permitir sua aceitação, mas também suas características organolépticas e de textura. Por outro lado, a troca dos alimentos usuais por esses novos produtos, ainda que palatáveis, não se constitui em tarefa de menor extensão (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

## 2.6 - REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS

O crescimento de microrganismos está relacionado com a presença de substâncias requeridas para a síntese de material celular e produção de energia nos processos de biossíntese (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

A formulação do meio de cultura para produção de biomassa ou metabólitos, é um estágio essencial no projeto de experimentos de laboratório, no desenvolvimento de escalas piloto e nos processos da indústria. Os constituintes do meio devem satisfazer o requerimento elementar para a produção de biomassa microbiana e metabólitos, e devem ser um suplemento adequado para suprir energia na biossíntese e manutenção celular. O primeiro passo a considerar, é uma equação baseada na estequiometria para o crescimento e formação de produto. Para uma fermentação aeróbia temos a seguinte equação: (STANBURRY, WHITAKER, HALL; 1995)



Dois aspectos da composição do meio devem ser examinados:

- o aspecto qualitativo, para identificar as substâncias requeridas para o crescimento;
- o aspecto quantitativo, para estabelecer as concentrações que são suficientes, mas não inibitórias, para o crescimento ou tipo de metabólito (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

Os requerimentos nutricionais de vários microrganismos podem diferir bastante, mas todos eles requerem fonte de carbono, fonte de nitrogênio, minerais, fatores de crescimento e oxigênio (PRESCOTT, DUNN'S; 1983).

### **2.6.1 - Fonte de carbono**

Compostos de carbono reduzidos são utilizados como fonte de carbono para formação de massa celular e formação de produto, atuando também como fonte de energia. Embora glicose seja frequentemente adicionada como fonte de carbono, existem outros compostos orgânicos (glicerol, lactose, etc.) que podem ser empregados. O nível da fonte de carbono no meio é muito importante (GREASHAM; 1995).

Biomassa tipicamente é constituída de 50% de carbono em base seca. Por isso, carboidratos frequentemente estão presentes no meio de cultura em concentrações maiores que os outros nutrientes (VOGEL; 1983).

A tabela 2.2 apresenta a composição elementar de *Candida* e *Saccharomyces*.

**TABELA 2.2 - Composição elementar de leveduras secas (mg/g) (FIECHTER, 1984; PIRT, 1975).**

<b>ELEMENTO</b>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Candida</i>
<b>C</b>	<b>470</b>	<b>454</b>
<b>H</b>	<b>60</b>	<b>67</b>
<b>N</b>	<b>85</b>	<b>73</b>
<b>O</b>	<b>325</b>	<b>320</b>
<b>P</b>	<b>14,3</b>	<b>16,8</b>
<b>K</b>	<b>17,2</b>	<b>18,8</b>
<b>Mg</b>	<b>2,3</b>	<b>1,3</b>
<b>Na</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1</b>
<b>Fe</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>Zn</b>	<b>0,0387</b>	<b>0,0992</b>
<b>Mn</b>	<b>0,057</b>	<b>0,0387</b>
<b>Ca</b>	<b>1,3</b>	<b>5,7</b>
<b>Co</b>	<b>0,0002</b>	<b>-</b>
<b>Cu</b>	<b>0,033</b>	<b>0,013</b>

### **2.6.2 - Fonte de nitrogênio**

Nitrogênio forma de 10 a 12% do peso da célula seca. Pode ser usado nas formas orgânica (uréia, peptídeos, aminoácidos, purina) e inorgânica (amônia, sais de amônia, nitrato) (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

A habilidade das leveduras para assimilar vários compostos como fonte de nitrogênio varia muito. Entre as fontes inorgânicas de nitrogênio, sulfato de amônio é utilizado realmente por todas leveduras. A maioria dos sais de amônio podem suprir o nitrogênio para o crescimento das leveduras, embora alguns sais sejam mais adequados que outros. A habilidade de usar nitrato é mais restrita e é, de fato, um critério usado para classificação de leveduras. Candida utilis é um exemplo de levedura que utiliza nitrato. Nitrito é utilizado por todas as leveduras que podem utilizar nitrato, embora a toxicidade do íon nitrito varie entre as leveduras e, precaução deve ser tomada para assegurar que uma concentração alta não seja usada (PRESCOTT, DUNN'S; 1983).

Algumas leveduras durante a fermentação e crescimento excretam compostos nitrogenados para o meio. Muitas vezes estes compostos contendo nitrogênio, são reabsorvidos pelas células. Compostos excretados, incluindo aminoácidos, oligopeptídeos e nucleotídeos, podem ser encontrados agrupados intracelularmente nos compostos nitrogenados (PRESCOTT, DUNN'S; 1983).

### **2.6.3 - Minerais**

Todos microrganismos requerem certos elementos minerais para o crescimento e metabolismo (HUGHES, POLLE; 1991). Em muitos meios, magnésio, fósforo, potássio, enxofre, cálcio e cloro são componentes essenciais e por causa da concentração requerida, precisam ser adicionados como componentes distintos. Outros, tais como

cobalto, cobre, ferro, manganês e zinco também são essenciais, mas são adicionados em menores quantidades. Em meios sintéticos, os elementos traços devem ser adicionados deliberadamente (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

*Magnésio:* é um ativador de numerosas enzimas na glicólise. Intensifica a síntese de ácidos graxos e regula o íon, a nível intracelular (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

*Fósforo:* forma aproximadamente 1,5% do peso seco da célula. Normalmente é provido na forma de ácido fosfórico ou sais de fosfato. É incorporado nos ácidos nucleicos, fosfolipídeos e polímeros formando a parede celular. É também importante no metabolismo energético (LAMBRECHTS et al.; 1992).

*Potássio:* é ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica. Representa um papel importante na regulação do transporte de cátions divalentes. A presença de potássio é indispensável para a penetração de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Íons potássio servem também como coenzimas (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

*Enxofre:* é necessário por fazer parte de aminoácidos como cistina e cisteína, e para a síntese de vitaminas como biotina e tiamina (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

A necessidade de enxofre é satisfeita pelos sulfatos inorgânicos e em alguns casos por outros compostos contendo enxofre (PRESCOTT, DUNN'S; 1983).

*Cálcio:* é estabilizador de certas enzimas extracelulares e fator importante na esporulação (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

Sais de cálcio têm uma função importante no meio de fermentação, que é precipitar os fosfatos inorgânicos em excesso (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

*Ferro:* é necessário para a síntese de citocromos e de certos pigmentos (JONES, GREENFIELD; 1984).

A concentração de fosfato no meio é frequentemente maior que os outros componentes minerais. Parte deste fosfato é usado como tampão para minimizar as mudanças de pH, quando controle externo de pH não está sendo usado (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

#### **2.6.4 - Fatores de Crescimento**

São principalmente vitaminas e compostos orgânicos, que não podem ser sintetizados pelas células ou que limitam a cinética de crescimento (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

O requerimento das leveduras para fontes exógenas de vitaminas varia bastante. Algumas leveduras podem sintetizar todas suas vitaminas requeridas, enquanto outras tem

múltiplos requerimentos. O requerimento para uma vitamina particular no meio pode ser qualificado como um requerimento absoluto, isto é, se a vitamina não for regularmente suprida no tempo ou condição de crescimento, as leveduras podem não crescer, ou como um requerimento relativo, significando que a levedura pode crescer pela síntese da vitamina a uma taxa muito reduzida, entretanto se a vitamina for suplementada ao meio as leveduras podem crescer muito mais vigorosamente (PRESCOTT, DUNN'S; 1983).

Biotina é a vitamina mais comumente requerida para ser suplementada ao meio, entretanto riboflavina e ácido fólico são aparentemente sintetizados em quantidade suficiente por todas leveduras (PRESCOTT, DUNN'S; 1983).

### **2.6.5 - Oxigênio**

As vezes é esquecido que oxigênio, embora não seja adicionado ao meio inicial, é contudo um componente muito importante em muitos processos, e sua disponibilidade pode ser extremamente importante no controle da taxa de crescimento e na produção de metabólitos (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

A composição do meio de cultura pode influenciar a disponibilidade de oxigênio de várias maneiras:

- Metabolismo rápido: quando certos substratos são usados em concentrações altas, o crescimento dos microrganismos pode tornar-se limitante de oxigênio.

- Reologia: os componentes individuais do meio podem influenciar a viscosidade do meio final e seu subsequente comportamento com relação a aeração e agitação.

- Anti-espumante: na maioria dos processos microbianos, espuma é um problema. Ela pode ser formada devido a algum componente do meio ou por algum fator produzido pelos microrganismos. O caso mais comum de espuma é devido às proteínas do meio (SCHUGERL; 1985).

Se a espuma não for controlada, numerosas mudanças podem ocorrer e problemas físicos e biológicos podem aparecer. Estes incluem redução do volume de trabalho do fermentador devido à exaustão de oxigênio no sistema, mudança no tamanho das bolhas, menor transferência de massa e calor. Os problemas biológicos incluem depósito de células nas paredes do fermentador e problemas de operação estéril que podem induzir contaminação microbiana (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

Anti-espumantes reduzem a tensão superficial e desestabilizam os filmes de proteína por pontes hidrofóbicas entre duas superfícies, e pelo deslocamento da proteína absorvida (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

## **2.7 - CRESCIMENTO MICROBIANO**

Considera-se como crescimento, em sistemas biológicos, o aumento de massa resultante de um acréscimo ordenado de todos os componentes do protoplasma. Assim, aumentos de tamanho decorrentes de fenômenos como absorção de água ou acúmulo de

material de reserva não podem ser considerados como crescimento. Em microbiologia, embora seja possível estudar o crescimento individual, geralmente o que se mede é o crescimento de uma população, exprimindo-o quer em termos de massa total, quer em função do número de indivíduos (LIMA, AQUARONE, BORZANI; 1975).

## **2.8 - CULTURA BATELADA**

Cultura batelada é o método mais comum de produção de microrganismo industrial. O desenvolvimento de processos contínuos e batelada alimentada sempre começam com cultura batelada. Seja qual for o método subsequente, numerosos parâmetros são primeiro determinados neste tipo de cultura (BOZE, MOULIN, GALZY; 1995).

Cultura batelada é um sistema de cultura fechada que contém no início, quantidade limitada de nutrientes. A cultura inoculada passa por algumas fases: fase lag, fase exponencial ou log, fase de desaceleração, fase estacionária e fase de declínio. Após a inoculação existe um período durante o qual não há crescimento. Este período é a fase lag, podendo ser considerado como um período de adaptação. Em processos comerciais a duração da fase lag deve ser reduzida o quanto possível e isto pode ser conseguido usando-se um inóculo apropriado. O período seguinte durante o qual a taxa de crescimento das células aumenta gradualmente e as células crescem a uma taxa constante e máxima, é a fase exponencial ou log (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

A fase exponencial, para processo batelada a volume constante, pode ser descrita pelas seguintes equações:

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (2.1)$$

onde  $X$  é a concentração de biomassa microbiana, g/L,

$t$  é o tempo, em horas,

$\mu$  é a velocidade específica de crescimento, 1/h.

A integração da equação (2.1) leva a:

$$dX / dt = \mu X \quad (2.2)$$

onde  $X_0$  é a concentração de biomassa inicial, g/L,

$X_t$  é a concentração de biomassa após um intervalo de tempo

$t$ , em horas.

Aplicando logaritmo natural, a equação (2.2) torna-se:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t \quad (2.3)$$

Então, o gráfico do logaritmo natural da concentração da biomassa pelo tempo deve dar uma reta, e a inclinação da mesma é o valor de  $\mu_{\text{máx}}$ . Durante a fase exponencial, nutrientes estão em excesso e o organismo cresce a uma velocidade específica de crescimento máxima,  $\mu_{\text{máx}}$  (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

Na maioria dos casos, a produção de biomassa cessa quando a concentração de substrato limitante é consumida. MONOD (1942) mostrou que a velocidade específica de crescimento, é dada pela seguinte equação em estado estacionário:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (2.4)$$

onde S representa a concentração da substância limitante (g/L)

$K_s$  é a constante de saturação (g/L).

O fator de conversão ( $Y_{x/s}$ ) é a medida da eficiência da conversão de algum substrato em biomassa e pode ser usado para prever a concentração de substrato requerida para produzir uma certa concentração de biomassa. Contudo, é importante apreciar que  $Y_{x/s}$  não é uma constante, ele pode variar de acordo com a velocidade de crescimento, pH, temperatura, substrato limitante e concentração dos substratos em excesso (STANBURY, WHITAKER, HALL; 1995).

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo apresenta-se a descrição do planejamento experimental, a descrição do equipamento e a composição dos meios de cultura utilizados para a realização das fermentações. São citados, também, os métodos analíticos adotados para a determinação das concentrações de glicerol e biomassa.

#### 3.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O estágio inicial para a otimização do meio de cultura foi a definição das variáveis a serem estudadas, e os valores de concentração (níveis) que seriam empregados.

O meio considerado como meio base, o mesmo usado por TRÍBOLI et al. (1992), tem em sua composição sete sais, uma vitamina e glicerol como fonte de carbono e energia. Portanto, para a otimização deste meio teríamos oito variáveis (7 sais + vitamina). Para viabilizar os custos e o número de experimentos, um balanço de componentes foi feito com o objetivo de verificar se alguma destas variáveis estavam quantidades maiores do que aquelas necessárias para o crescimento de uma célula de *Candida utilis*. Os elementos fornecidos pelo  $K_2HPO_4$  e pela vitamina biotina (C, H, O, N e S) encontram-se também nos outros componentes do meio de cultura. Diante disto

$K_2HPO_4$ , biotina e glicerol (fonte de carbono) foram mantidos constantes durante todo o trabalho, e os outros seis sais ( $KH_2PO_4$ ,  $NH_4Cl$ , ácido cítrico mono hidratado,  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ ) foram as variáveis escolhidas para se realizar o planejamento experimental com o intuito de se obter um meio que forneça a maior produtividade, chamado aqui como meio ótimo.

As concentrações que vão ser estudadas foram baseadas no trabalho de FLORENTIN (1995), que usou 20, 40, 60, 80 e 100% da concentração do meio de cultura proposto por TRÍBOLI et al. (1992). Neste trabalho foi usado 20 e 100% da concentração do meio base (meio proposto por TRÍBOLI et al.) que correspondem ao nível mínimo e máximo, respectivamente.

Uma vez definidas as variáveis e os níveis, o próximo passo foi escolher um esquema para planejar os experimentos a serem realizados. Planejar experimentos é definir uma sequência de coleta de dados experimentais para atingir determinados objetivos. As técnicas de planejamento de experimentos podem ser divididas em três grandes grupos: - para desenvolver e discriminar modelos; - para estimação ótima de parâmetros dos modelos; - e para encontrar o grau de dependência entre as variáveis e respostas. Os dois primeiros grupos exigem modelos do processo já estabelecidos (teóricos ou semi-empíricos). O terceiro grupo, que foi utilizado, permite estimar o efeito das variáveis sobre a resposta, utilizando-se para isto um modelo empírico. Dentro deste grupo existem várias metodologias que podem ser empregadas, como por exemplo o planejamento fatorial, completo ou fracionado, entre outros.

O projeto fatorial de experimentos consiste em selecionar um número fixo de níveis (valores) para cada uma das variáveis a serem investigadas (fatores), realizando-se

experimentos em todas as combinações possíveis destes níveis e fatores. Desta maneira, um projeto fatorial  $2^3$  possui dois níveis e três fatores necessitando oito condições experimentais. Dos dados encontrados por este método, pode-se avaliar o efeito de cada variável na resposta e a possível interação entre elas. Este efeito pode ser entendido como a mudança que ocorre na resposta quando se move do nível mínimo para o nível máximo da variável.

O número de condições experimentais obtidas a partir de um projeto fatorial aumenta exponencialmente com o aumento do número de variáveis e níveis empregados. Por exemplo, com seis variáveis e dois níveis tem-se 64 condições experimentais.

No caso do número de variáveis e/ou de níveis a serem estudados ser grande, pode-se usar um projeto fatorial saturado. Neste projeto, não se faz necessário realizar todos os experimentos do planejamento completo, podendo-se efetuar apenas uma fração do teste, o que diminui o número de condições experimentais.

Neste trabalho optou-se por este último tipo de projeto, pois se fosse adotado um planejamento fatorial completo teríamos 64 condições experimentais. Executando um planejamento fatorial saturado, plano de Plackett-Burman, com seis variáveis e dois níveis tem-se oito condições experimentais que são apresentadas na tabela 3.1 (PINTO, 1993).

**TABELA 3.1- Descrição do planejamento fatorial saturado usado**

Condições experimentais	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{NH}_4\text{Cl}$	Ácido cítrico	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
01	1	-1	-1	1	-1	1
02	1	-1	-1	-1	1	-1
03	1	1	1	-1	-1	1
04	-1	1	1	1	-1	-1
05	1	-1	1	1	1	-1
06	-1	1	-1	1	1	1
07	-1	-1	1	-1	1	1
08	-1	-1	-1	-1	-1	-1

É importante ressaltar aqui, que número de experimentos e número de condições experimentais são conceitos diferentes, já que um certo número de réplicas deve ser somado ao número de condições experimentais para fornecer o número de experimentos.

As réplicas de experimentos são de fundamental importância, e servem para determinar o erro experimental na resposta em estudo e/ou a reprodutibilidade do equipamento. Existem várias maneiras de se replicar um experimento, sendo que a escolha de uma abordagem é peculiar a cada experimento.

Neste trabalho optou-se por replicar uma vez todas as condições experimentais; pois desta forma tem-se uma avaliação do erro em cada condição.

Assim sendo, neste trabalho temos 8 condições experimentais (8 de planejamento fatorial saturado) e 16 experimentos (8 planejamento + 8 réplicas).

A partir dos dados obtidos por tal metodologia, avalia-se o efeito de cada variável na resposta, sendo que é comum utilizar um modelo empírico para isto. Para o trabalho

em questão (plano fatorial saturado com 6 variáveis e 2 níveis) o modelo a ser ajustado é apresentado abaixo:

$$Y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_5 + a_6x_6 + a_7$$

onde  $Y$  é a resposta a ser avaliada (produtividade g/L.h);  
 $x_i$   $i = 1,6$  são as variáveis a serem estudadas  
 (concentrações do sais);  
 $a_i$   $i = 1,7$  são os efeitos das variáveis sobre a resposta  
 (parâmetros do modelo).

Para possibilitar a comparação entre os efeitos das variáveis é necessário que se normalize as mesmas, sendo que o método aplicado para a normalização é apresentado a seguir:

$$X_j = \frac{([Z]_j - [Z_{\min}]_j) * 2}{[Z_{\max}]_j - [Z_{\min}]_j} - 1 \quad (3.1)$$

onde  $[Z]_j$  é a concentração do sal;

$X_1 = \text{KH}_2\text{PO}_4$  é a concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  adimensionalizada

$X_2 = \text{NH}_4\text{Cl}$  é a concentração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  adimensionalizada

$X_3 = \text{ácido cítrico mono hidratado}$  é a concentração de ácido cítrico mono

hidratado adimensionalizada

$X_4 = \text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  é a concentração de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  adimensionalizada

$X_5 = \text{Na}_2 \text{SO}_4$  é a concentração de  $\text{Na}_2 \text{SO}_4$  adimensionalizada

$X_6 = \text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  é a concentração de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  adimensionalizada

onde os subscritos min e máx referem-se ao nível inferior e superior das variáveis, respectivamente.

A estimação dos parâmetros do modelo (efeitos) também pode ser realizada de diversas maneiras. A mais usual é definir uma função objetivo e através de métodos numéricos encontrar o mínimo desta função, ou seja, encontrar os parâmetros que possibilitem o melhor ajuste do modelo em relação aos dados experimentais.

Neste trabalho escolheu-se minimizar a função objetivo vinda do método da Máxima Verossimilhança sem erro nas variáveis independentes como apresentado abaixo:

$$F = \sum_{i=1}^{N_{\text{exp}}} \frac{(y_i^{\text{exp}} - y_i^{\text{calc}})^2}{\sigma_i^2} \quad (3.2)$$

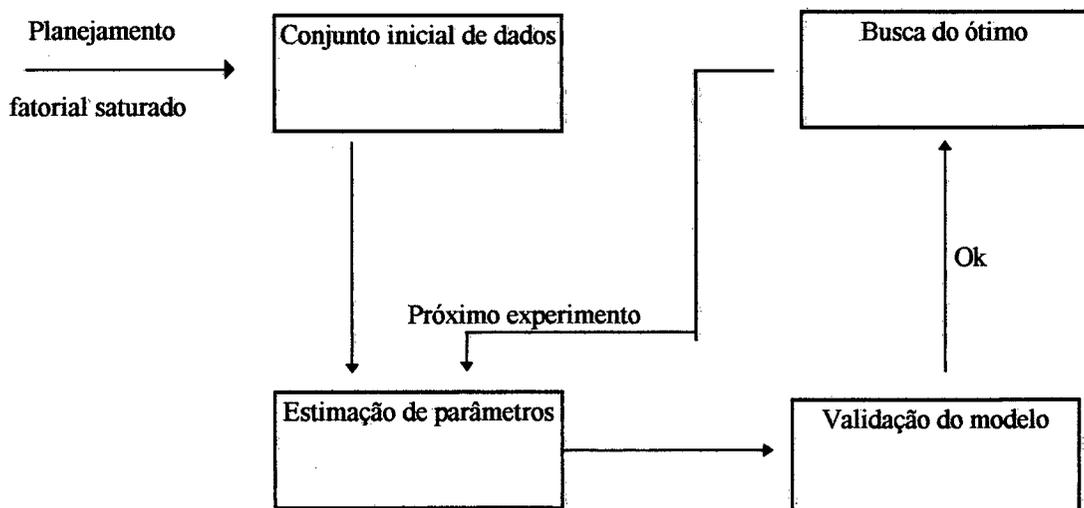
onde  $N_{\text{exp}}$  é o número de experimentos e os superescritos exp e calc são as quantidades experimentais das produtividades e das produtividades calculadas pelo modelo, respectivamente,  $\sigma_i^2$  é a variância de cada condição experimental e , F é a função objetivo.

A função objetivo foi minimizada utilizando o programa MÁXIMA, desenvolvido por NORONHA et al. (1994).

Para a validação do modelo foi utilizado o desvio médio absoluto (equação 3.3) e o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). O  $\chi^2$  do modelo, para este caso, é exatamente o mínimo da função objetivo como definido pela equação (3.2). O  $\chi^2$  do modelo é então comparado com tabelas específicas e, dentro de uma determinada tolerância (para este trabalho 95% de confiança), o teste indica se o modelo é adequado ou não para reproduzir os resultados experimentais. Tal teste é largamente aplicado para este fim, e seu detalhamento pode ser encontrado na maioria dos livros de estatística básica.

$$\text{DMA} = \frac{100}{N_{\text{exp}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{exp}}} \left| \frac{y_i^{\text{exp}} - y_i^{\text{calc}}}{y_i^{\text{exp}}} \right| \quad (3.3)$$

Bem, o objetivo deste trabalho foi encontrar as concentrações de sais, entre os níveis estudados, que maximizem a produtividade. Para isto fez-se uso de uma metodologia de planejamento sequencial, a qual é esquematizada na figura 3.1.



**FIGURA 3.1- Esquema da metodologia de planejamento sequencial utilizada**

As duas primeiras etapas já foram descritas anteriormente. A busca do ponto ótimo consiste em “perguntar ao modelo” qual é o nível de cada variável que proporciona a maior produtividade.

Nota-se a partir da figura 3.1 que o planejamento sequencial é uma maneira mais elaborada de projetar experimentos, pois a nova condição experimental só é determinada após analisar-se o conjunto de dados existentes.

Nestas condições é então realizado um novo experimento e as etapas de estimação de parâmetros e validação do modelo são repetidas até que a condição selecionada já tenha sido realizada. Então o processo é interrompido, e a condição ótima é encontrada.

### **3.2 - MICRORGANISMO**

O microrganismo utilizado para a realização de todos os ensaios fermentativos foi a levedura *Candida utilis* IZ-1840 da coleção do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (USP- Piracicaba- SP). Para sua conservação utilizou-se o meio YMA descrito na tabela 3.2, preparado de acordo com a composição do meio “Yeast Morphology Agar” (DIFCO).

A manutenção da cepa foi feita através de repiques periódicos para meios novos, em intervalos de 2 a 3 meses, sendo a incubação realizada a 30 °C (3 dias). Em seguida, a cultura foi mantida sob refrigeração a uma temperatura de 4 a 7 °C.

### 3.3 - MEIOS DE CULTURA

Neste item serão descritos os meios e soluções utilizados durante os ensaios fermentativos.

#### 3.3.1 - Meio YMA (Yeast Malt Extract Agar)

Este meio foi usado no repique e na conservação da cepa.

**TABELA 3.2- Composição do meio de conservação**

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3,00
Extrato de malte	3,00
Bactopeptona	5,00
Glicose	10,00
Agar	20,00

O pH deste meio foi ajustado em 6,0 com solução de NaOH ou de HCl, conforme o caso. A esterilização do meio foi feita a 121 °C por 15 minutos.

### 3.3.2- Meio YM (Yeast Malt Extract)

Destina-se à adaptação da levedura ao consumo do substrato (glicerol). Difere do meio YMA pela substituição da glicose por glicerol e pelo fato de não conter ágar em sua composição. Foi utilizado na primeira fase de preparo do inóculo. A composição deste meio está descrita na tabela 3.3

**TABELA 3.3- Composição do meio de adaptação**

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3,00
Extrato de malte	3,00
Bactopeptona	5,00
Glicerol	10,00

Após dissolução completa do meio, o pH foi ajustado em 6,2 e o meio foi, então, esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Deixou-se esfriar e, então, inoculou-se com uma alçada da cultura. O meio inoculado ficou em shaker com agitação constante e temperatura de 30 °C por 24 ± 2 horas. No final desta etapa foram transferidos assepticamente 50 mL deste meio para cada um dos três erlenmeyers da segunda fase do inóculo.

### 3.3.3 - Meio GSB (Glicerol-Sais-Biotina)

Utilizado na segunda fase de preparo do inóculo. Destina-se a adaptar a levedura ao meio de fermentação, pois nele as células passam de um meio rico em fontes de carbono para um meio onde a única fonte de carbono e energia é o glicerol. A composição deste meio está descrita na tabela 3.4.

**TABELA 3. 4- Composição do meio GSB.**

Componentes	Concentração
$K_2HPO_4$	0,49 g/L
$KH_2PO_4$	1,74 g/L
$NH_4Cl$	4,00 g/L
Acido citrico mono hidratado	0,21 g/L
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	2,54 g/L
$Na_2SO_4$	1,63 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	7,00 mg/L
Biotina	4,00 $\mu$ g/L
Glicerol	10,00 g/L

Após dissolução completa dos componentes do meio, ajustou-se o pH em 4,5 e esterilizou-se a 121 °C por 15 minutos. Uma vez esterilizado e resfriado, adicionou-se em cada frasco o conteúdo dos frascos da primeira fase do inóculo, colocando-se novamente no shaker, sob as mesmas condições anteriores, por  $18 \pm 2$  horas. No final desta etapa, um volume de 400 mL deste meio serviu como inóculo para a próxima etapa.

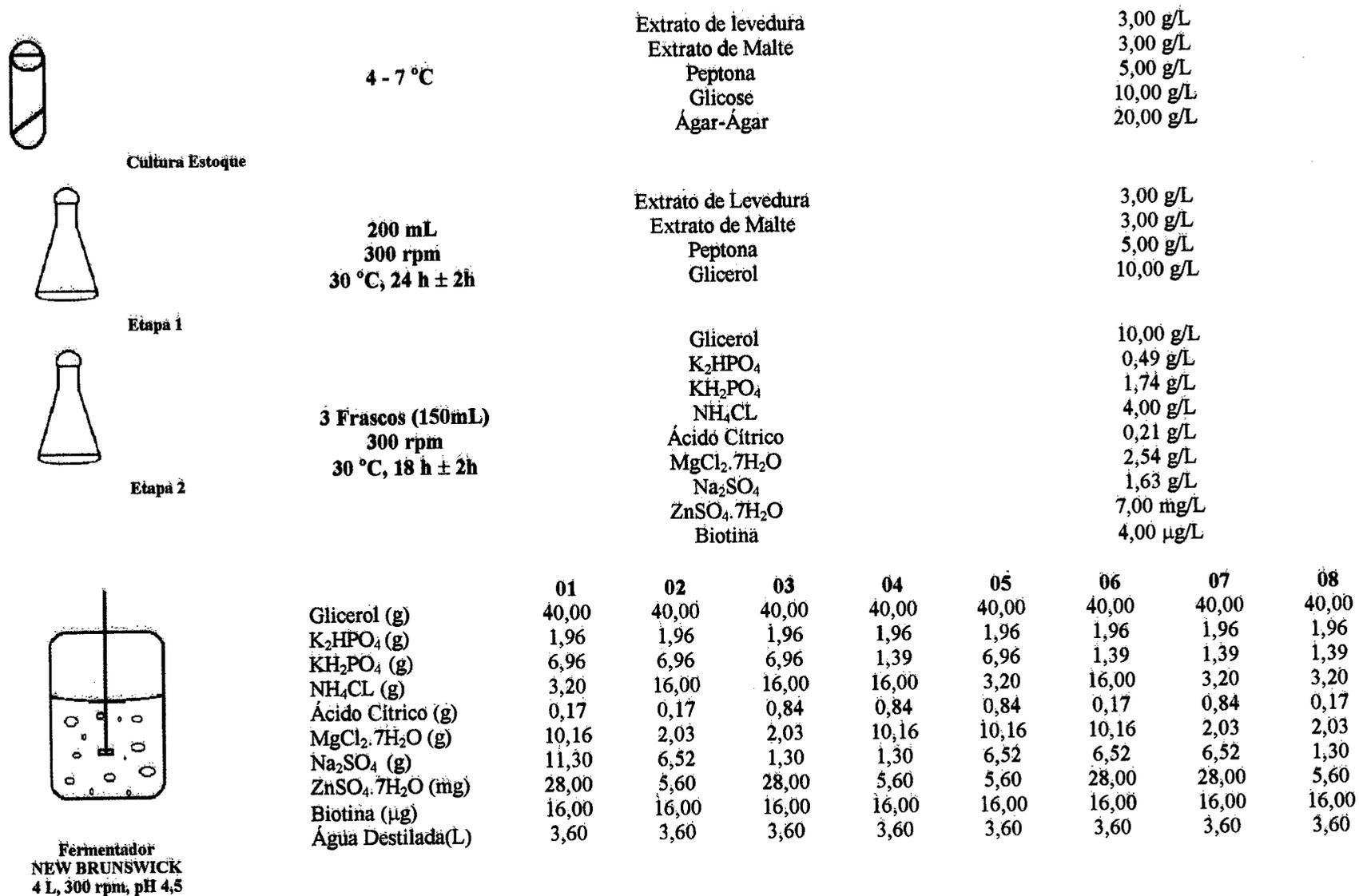
### 3.3.4 - Meio de Fermentação

O meio utilizado nas fermentações foi o mesmo da segunda fase de inóculo, variando-se a concentração de seis sais ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Ácido cítrico mono hidratado,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) segundo planejamento fatorial saturado e mantendo-se a concentração de glicerol e dos outros sais constantes, para todos os ensaios. Cada ensaio teve, no mínimo, uma repetição para confirmação dos resultados.

Na tabela 3.5 a composição dos meios de fermentação pode ser observada. Estes meios foram preparados dissolvendo-se todos os componentes, ajustando-se o pH em 4,5 e esterilizando-se o fermentador, em autoclave, à 121 °C por 15 minutos. O volume final do meio mais o inóculo no fermentador foi de 4 L, ocupando dois terços da sua capacidade total.

A figura 3.2 apresenta um esquema da metodologia usada nos ensaios fermentativos.





**FIGURA 3.2- Metodologia usada nos experimentos**

### **3.4 - SOLUÇÕES UTILIZADAS**

#### **3.4.1 - Solução de biotina**

Para evitar a pesagem sucessiva da biotina e assim diminuir os erros do processo, preparou-se duas soluções de biotina (1 e 2 ), conforme descrito a seguir. As soluções foram conservadas sob refrigeração. Para a solução “1” pesou-se 4,00 mg de biotina, colocou-se num balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água destilada. Desta solução colocou-se 10 mL em um balão volumétrico de 100 mL e completou-se novamente com água destilada tendo assim, a solução “2”.

#### **3.4.2 - Solução de anti-espumante**

Utilizou-se uma solução de anti-espumante com a função de controlar o nível de espuma durante a fermentação. A solução de anti-espumante foi utilizada na menor quantidade possível para não prejudicar a transferência de oxigênio. A solução de anti-espumante era adicionada automaticamente através de uma bomba peristáltica acoplada ao fermentador, que era acionada através de um sensor de nível de espuma.

Para o preparo da solução dissolvia-se 5 g de anti-espumante a base de silicone (silicoplast - Hoechst) em 100 mL de água destilada. A seguir, filtrava-se cerca de 50 mL da suspensão e autoclavava-se o filtrado a 121 °C por 15 minutos.

### **3.4.3 - Solução de hidróxido de sódio**

Preparou-se solução 1N de NaOH, com o objetivo de manter-se o valor do pH constante durante a fermentação. Para o preparo desta solução, pesou-se 20,00 g de NaOH e diluiu-se em 500 mL de água. Da mesma forma que a solução de anti-espumante, a solução de NaOH era adicionada automaticamente pela bomba peristáltica, mantendo-se assim constante o valor do pH durante toda a fermentação.

## **3.5 - MÉTODOS ANALÍTICOS**

Neste item serão descritos os métodos analíticos utilizados para determinação da concentração de biomassa e glicerol, bem como a amostragem utilizada durante a fermentação.

### **3.5.1 - Amostragem**

Durante os ensaios de fermentação, eram retiradas alíquotas de aproximadamente 3 mL de amostra em intervalos de tempo de 2 horas na fase inicial do processo, diminuindo-se, conforme o caso, o intervalo de tempo para 1 hora no final da fermentação.

Após a inoculação, as amostras eram retiradas esterilmente do fermentador, através de um dispositivo acoplado ao fermentador, e devidamente preparadas para a determinação da concentração de biomassa e de glicerol.

### **3.5.2 - Determinação da concentração celular**

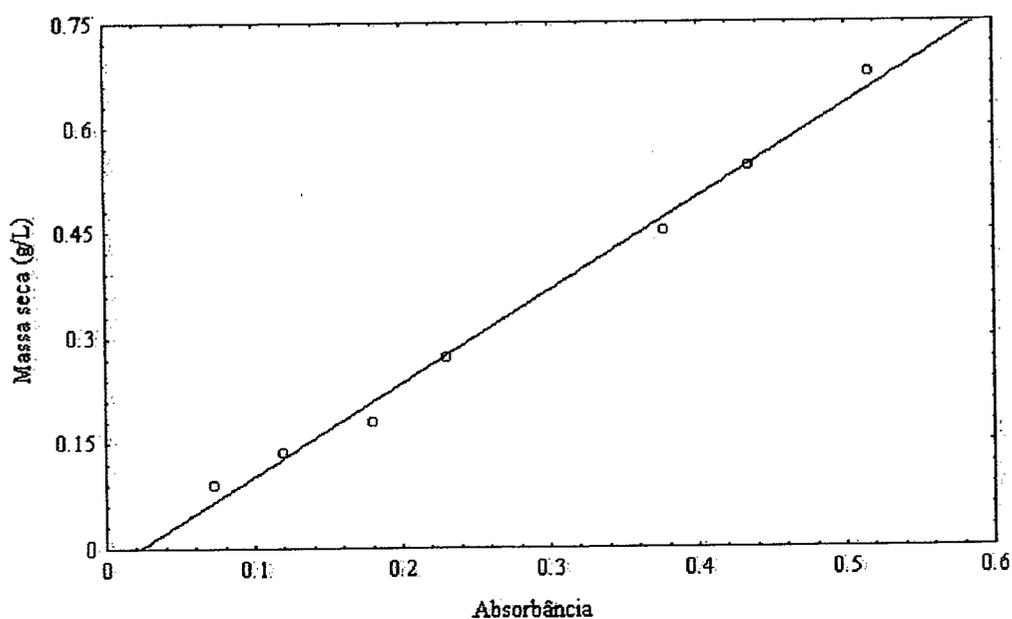
A concentração celular durante as fermentações foi determinada por dois métodos: indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria.

A determinação gravimétrica da concentração celular expressa como massa de material seco por unidade de volume, é uma das formas mais adequadas de se caracterizar uma fermentação, e foi utilizada para confirmar os resultados obtidos pela medida da absorvância.

As medidas de absorvância foram realizadas à 660 nm em espectrofotômetro (modelo E225-D, marca CELM) e convertidas em concentração celular, massa de matéria seca por unidade de volume, através do uso de uma curva de calibração.

O procedimento para a construção desta curva foi o seguinte:

- 50 mL da cultura de *Candida utilis* foram coletados no final da fermentação, filtrados em filtro Millipore com membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e secos em estufa à 105°C até peso constante.
- Outra porção do fermentado foi retirada e realizadas diluições, lendo-se a absorvância em espectrofotômetro.
- O peso da amostra obtido após pesagem da membrana dividido pelo volume de filtrado fornece a concentração celular.
- Fazendo-se o gráfico da absorvância pela concentração celular correspondente obtém-se a curva de calibração da biomassa (Figura 3.3).



**FIGURA 3.3- Curva de calibração da biomassa**

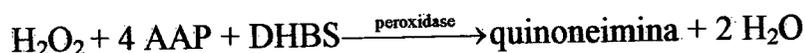
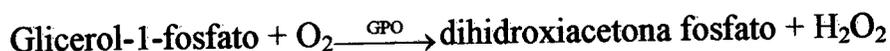
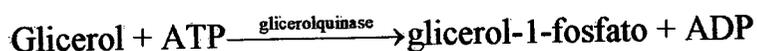
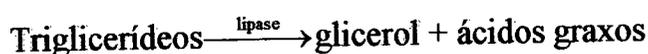
A equação obtida por regressão linear foi a seguinte:

$$\text{Concentração celular (g/L)} = -0,031 + 1,327 \times \text{absorbância} \quad (3.4)$$

Deve-se considerar, para o cálculo da concentração celular, a diluição utilizada em cada leitura, mantendo a absorbância sempre no limite de linearidade.

### 3.5.3 - Determinação da concentração de glicerol

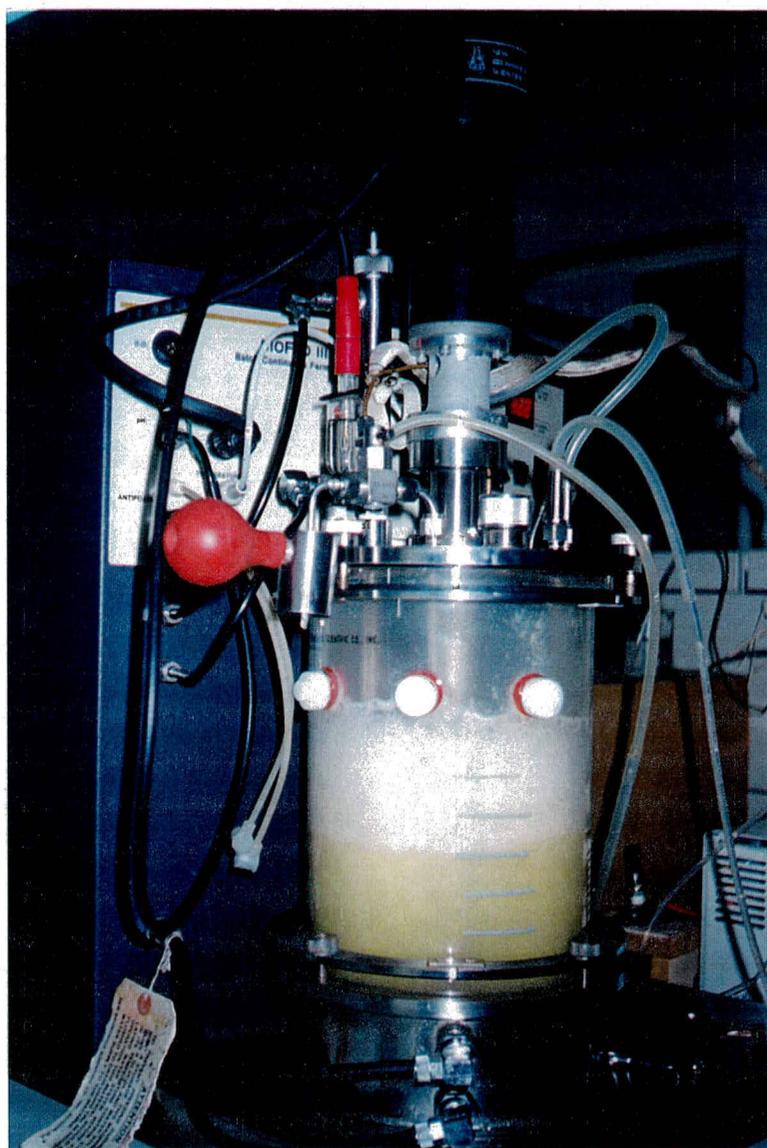
A concentração de glicerol foi determinada através do Kit “Triglicérides GPO TRINDER” da Bio-diagnóstica Indústria Química Clínica Ltda. O princípio do teste enzimático colorimétrico é o seguinte:



A absorbância medida é proporcional à concentração do glicerol total.

**TABELA 3.6- Condições de operação utilizadas no processo**

Parâmetro	Condição utilizada
pH	4,5
Temperatura	30 °C
Agitação	300 rpm
Aeração	3,00 L / min
Volume de inóculo	0,40 L
Volume de meio	3,60 L

**FIGURA 3.5- Fotografia do fermentador utilizado**

Para o procedimento do método, prepara-se um tubo de ensaio com 2 mL do reagente triglicérides enzimático colorimétrico e 20 µL de amostra diluída conforme o caso, em outro tubo o branco, com 2 mL do reagente e, em outro tubo 2 mL do reagente e 20 µL do padrão. Homogeneiza-se suavemente os tubos e incuba-se em banho termostático a 37 °C durante 10 minutos. A leitura é feita em espectrofotômetro à 520 nm.

O cálculo para determinação da concentração do glicerol é o seguinte:

$$\text{Concentração de glicerol (g/L)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 20,8 \times \text{diluição} \times 0,01 \quad (3.5)$$

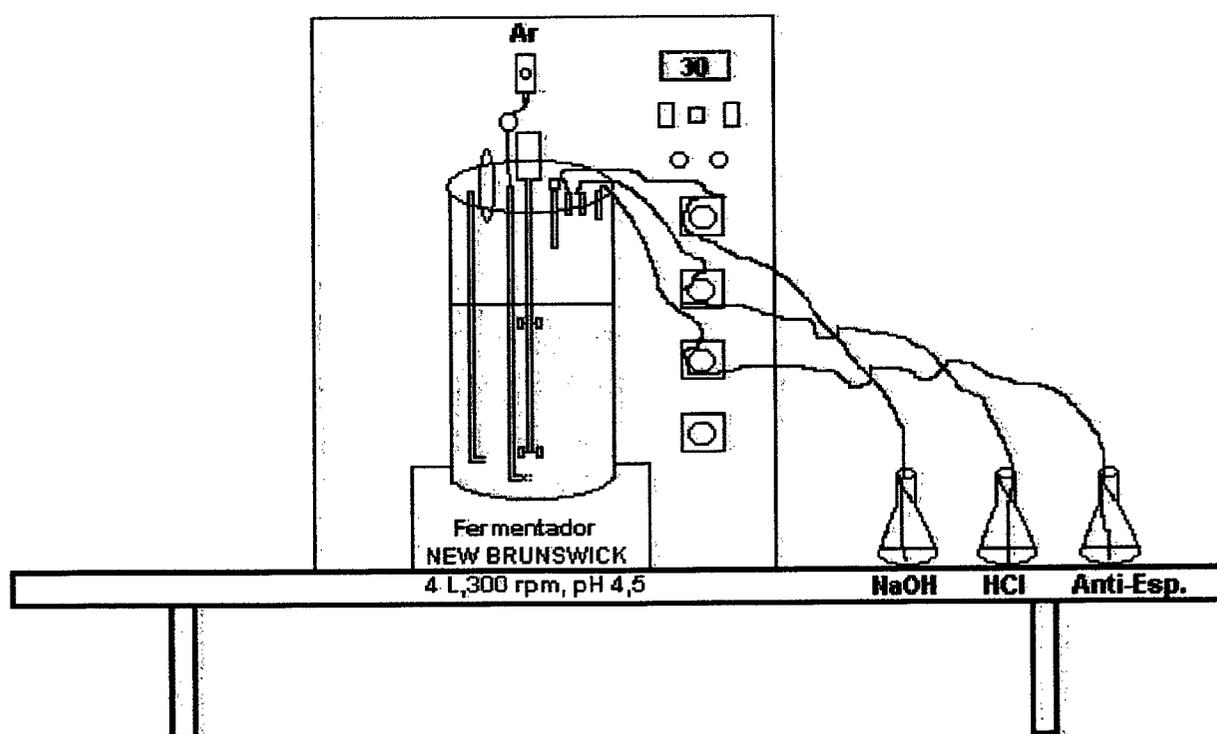
### 3.6 - ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Os ensaios fermentativos foram realizados em um fermentador BIOFLO III da New Brunswick Scientific Co. Inc. com capacidade total de 6,0 litros.

Este fermentador é dotado de sondas automáticas para controle de pH, nível de espuma e sensor de temperatura. Possui também quatro bombas peristálticas que permitem dosar e controlar com facilidade determinados parâmetros importantes do processo, tais como pH, através de soluções ácidas e básicas, e nível de espuma, através da adição de solução anti-espumante. A agitação do processo é realizada por um motor que contém duas turbinas colocadas em dois níveis, uma no centro do meio líquido para

agitar a solução e outra um pouco acima do líquido para quebrar a espuma formada durante o processo, e uma chicana para homogeneizar a solução evitando formação de vórtex que poderia afetar o transporte de oxigênio nas células. Para obtenção da aeração desejada, ar estéril foi introduzido no fundo do reator, proveniente de um compressor de ar cuja vazão era controlada através de um rotâmetro. A figura 3.4 apresenta um desenho esquemático do fermentador, e a figura 3.5 apresenta uma fotografia do mesmo.

As condições utilizadas durante as fermentações são descritas na tabela 3.6.



**FIGURA 3.4- Desenho esquemático do fermentador**

### 3.7 - METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS CÁLCULOS

#### 3.7.1 - Fator de conversão de substrato em células

O fator de conversão de substrato em células foi calculado de duas maneiras. Usando a definição de AIBA et al. (1973), e através do gráfico (So - Si) por (Xi - Xo), cujo coeficiente angular fornece o valor de  $Y_{x/s}$  (g células/ g substrato). Estes gráficos para cada experimento, são apresentados no anexo B.

O fator de conversão de células é definido por AIBA et al. (1973) como:

$$Y_{x/s} \equiv -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (3.6)$$

ou seja,

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f} \quad (3.7)$$

onde,

$Y_{x/s}$  = fator de conversão de substrato em células, g/g

$X_f$  = concentração celular no final da fermentação, g/L

$X_o$  = concentração celular no início da fermentação, g/L

$S_f$  = concentração de glicerol no final da fermentação, g/L

$S_0$  = concentração de glicerol no início da fermentação, g/L

### 3.7.2 - Consumo específico de substrato

É obtido através da seguinte expressão:

$$Y_{s/x} = \frac{1}{Y_{x/s}} \quad (3.8)$$

onde,

$Y_{s/x}$  = consumo específico de substrato, g/g

$Y_{x/s}$  = fator de conversão de substrato em células, g/g

### 3.7.3 - Produtividade em células

A produtividade de um processo fermentativo descontínuo é definida por GADEN (1959) apud LUEDEKING (1967) como a concentração final de produto dividida pelo tempo decorrido desde a inoculação até o final da fermentação. Dimensionalmente, a produtividade é expressa pela massa de produto por unidade de volume e por unidade de

tempo, e representa a velocidade média em que um determinado produto é obtido (LUEDEKING,1967). No caso da produção de biomassa, a concentração final de produto é representada pela variação da concentração celular e a produtividade é estimada através da seguinte expressão:

$$P = \frac{X_f - X_o}{t_f} \quad (3.9)$$

onde,

P = produtividade, g/L.h

X<sub>f</sub> = concentração celular no final da fermentação, g/L

X<sub>o</sub> = concentração celular no início da fermentação, g/L

t<sub>f</sub> = tempo de fermentação, h

### **3.7.4 - Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ )**

#### **para fermentação batelada**

A velocidade específica máxima de crescimento celular foi estimada de duas maneiras. Foi usado o procedimento descrito no ítem 2.8, e o método proposto por LE DUY e ZAJIC (1973).

LE DUY e ZAJIC (1973), propuseram um método rápido para o cálculo da derivada de um ponto experimental. O Método utiliza conceitos da geometria analítica para determinar a circunferência que passa por três pontos no espaço e na obtenção da tangente ao ponto intermediário dessa circunferência. Por meio de um programa desenvolvido com base nestes conceitos, foi obtido esta derivada e a partir daí a velocidade específica de crescimento em cada ponto.

### **3.8 - CRITÉRIO DE FINAL DE FERMENTAÇÃO**

O trabalho concentrou-se no acompanhamento e estudo de duas variáveis: a concentração celular e a concentração de substrato (glicerol).

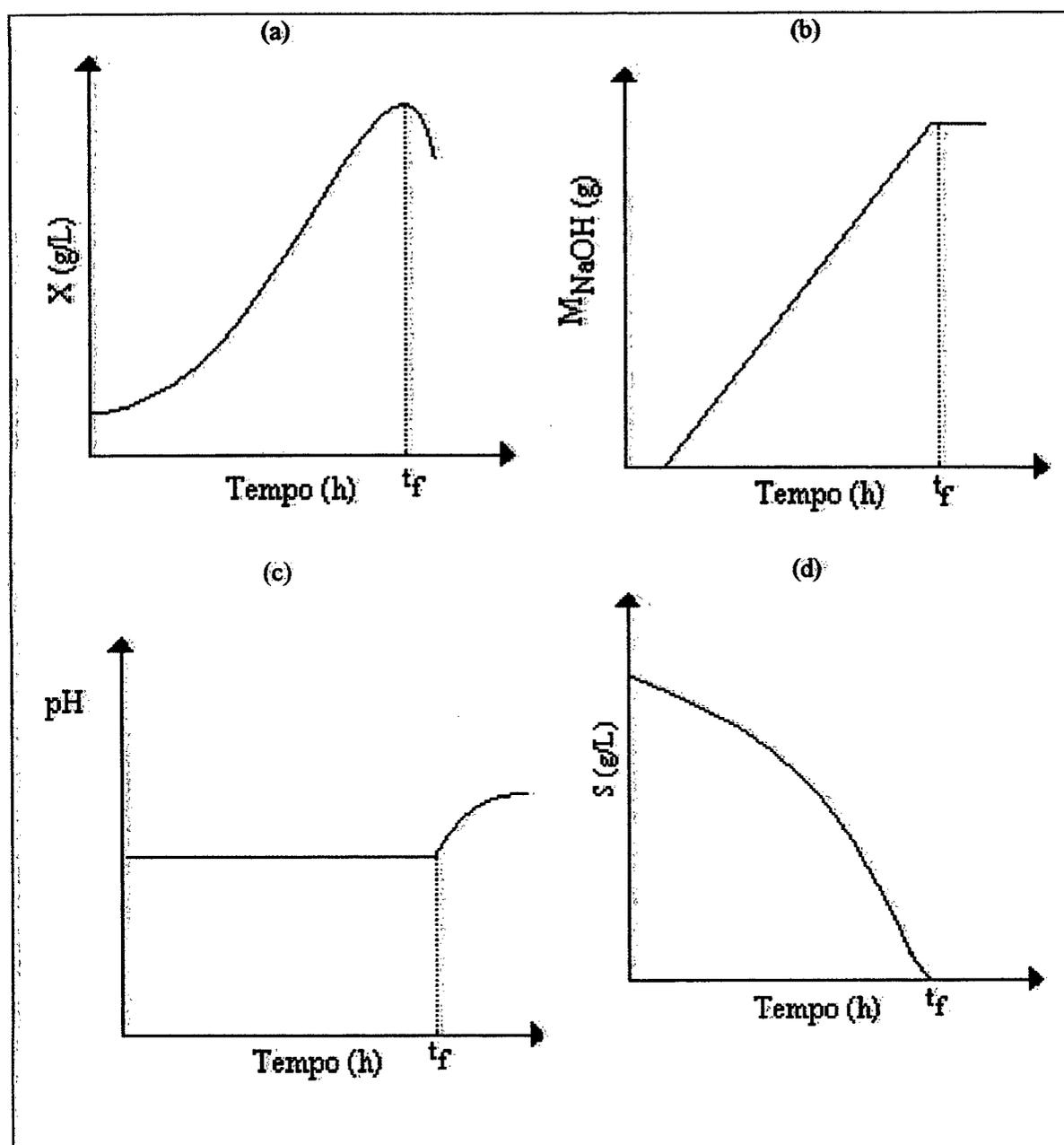
O principal critério adotado para indicar o tempo final dos processos fermentativos foi a observação do crescimento celular em função do tempo. Quando os valores da concentração celular em g/L permaneciam constantes depois de certo tempo de fermentação, considerava-se então que o valor máximo da concentração celular determinava o tempo final do processo.

Além do acompanhamento da concentração celular e do consumo de glicerol, observou-se também o consumo de solução de NaOH utilizada para a manutenção do pH em seu valor desejado. O meio de cultura utilizado tinha em sua composição sais que formam um tampão fosfato-citrato e, como fonte de nitrogênio, o cloreto de amônio. Porém à medida que o nitrogênio era assimilado, o meio começava a ser acidificado, fato

evidenciado pelo consumo da solução de NaOH. A assimilação de nitrogênio é um processo diretamente relacionado com o crescimento celular, o qual, por sua vez, é diretamente relacionado com o consumo de glicerol (fonte de carbono).

Portanto, o consumo da solução de NaOH apresenta-se como um critério de final de fermentação, pois apresenta um valor constante após um determinado tempo de fermentação.

Outro fenômeno também observado no final do processo foi a elevação do valor do pH. Na figura 3.6 podemos ter uma idéia clara dos fatores considerados e adotados como principais critérios para indicar o final do processo fermentativo.



**FIGURA 3.6- Parâmetros considerados para determinação do tempo final do processo fermentativo: (a) crescimento celular, (b) consumo de base para controle do pH, (c) pH, (d) consumo do substrato.**

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizaram-se 16 experimentos iniciais (8 do planejamento fatorial saturado + 8 réplicas) baseados no planejamento fatorial saturado, com o objetivo de se obter o conjunto inicial de dados. Com os resultados destes primeiros experimentos, através de um programa, foram estimados os parâmetros do modelo linear empírico, feita a validação do modelo e então, feita a busca do ótimo.

Na primeira parte deste capítulo serão apresentados os valores da produtividade experimental para cada experimento, a produtividade média e a variância experimental para cada condição experimental. Também será apresentado a estimação dos parâmetros do modelo linear empírico, a validação do modelo e a busca do ponto ótimo.

A seguir, os gráficos das cinéticas de produção celular e de consumo de substrato, os gráficos do logaritmo natural dos valores experimentais da concentração celular, bem como a evolução da velocidade específica de crescimento celular em função do tempo, para cada condição experimental, serão mostrados.

Finalmente um resumo dos principais resultados para cada condição experimental, será apresentado.

Com os resultados do conjunto inicial de dados apresentados na tabela 4.1, os parâmetros do modelo, interpretados como efeito das variáveis, foram estimados de acordo com a metodologia apresentada no item 3.1. A tabela 4.2 apresenta os valores desses parâmetros sobre a produtividade.

**TABELA 4.2- Parâmetros do modelo linear empírico**

PARÂMETRO	VALOR	UNIDADE
a <sub>1</sub> (efeito da variável x <sub>1</sub> )	0,01157	1/h
a <sub>2</sub> (efeito da variável x <sub>2</sub> )	-0,00850	1/h
a <sub>3</sub> (efeito da variável x <sub>3</sub> )	-0,00796	1/h
a <sub>4</sub> (efeito da variável x <sub>4</sub> )	-0,02763	1/h
a <sub>5</sub> (efeito da variável x <sub>5</sub> )	0,02631	1/h
a <sub>6</sub> (efeito da variável x <sub>6</sub> )	0,09896	1/h
a <sub>7</sub>	0,58402	1/h

Os valores das produtividades média experimentais obtidas e os valores das produtividades calculados pelo modelo são mostrados na tabela 4.3. Nesta tabela são também apresentados o desvio médio absoluto, o valor do  $\chi^2$  e a confiança no teste  $\chi^2$  do modelo.

**TABELA 4.3- Produtividade experimental obtida e produtividade calculada pelo modelo, para cada condição experimental**

Condição experimental	Produtividade experimental (g/L.h)	Produtividade calculada (g/L.h)
01	0,494	0,657
02	0,521	0,550
03	0,685	0,679
04	0,345	0,403
05	0,545	0,496
06	0,670	0,669
07	0,725	0,725
08	0,670	0,491

Desvio médio absoluto = 9,21%

Confiança no teste  $\chi^2$  do modelo = 70,2 %

$\chi^2 = 1,08$

A partir da tabela 4.3 observa-se que a confiança do modelo está dentro da estipulada neste trabalho e, portanto, utilizou-se o modelo empírico em questão para a seleção do ponto ótimo, ou seja das concentrações que maximizem a produtividade. Desta maneira uma nova condição experimental foi selecionada pelo modelo, e os valores da produtividade experimental para esta nova condição e o erro experimental encontram-se na tabela 4.4.

**TABELA 4.4- Produtividade experimental para a condição experimental ( $P_1$ ), produtividade experimental para a réplica ( $P_2$ ), produtividade média e variância experimental do conjunto inicial de dados e da nova condição experimental selecionada**

Condição experimental	$P_1$ (g/L.h)	$P_2$ (g/L.h)	$P_{\text{média}}$ (g/L.h)	$\sigma^2$
01	0,303	0,685	0,494	0,073
02	0,602	0,440	0,512	0,013
03	0,720	0,650	0,685	0,0025
04	0,230	0,460	0,345	0,026
05	0,440	0,650	0,545	0,022
06	0,660	0,680	0,670	0,0002
07	0,710	0,740	0,725	0,0004
08	0,470	0,870	0,670	0,080
09	0,770	0,960	0,865	0,018

De posse desta nova condição experimental os parâmetros do modelo são reestimados, sendo que seus valores são mostrados na tabela 4.5

**TABELA 4. 5- Parâmetros reestimados**

PARÂMETRO	VALOR	UNIDADE
$a_1$ (efeito da variável $x_1$ )	0,02344	1/h
$a_2$ (efeito da variável $x_2$ )	-0,02408	1/h
$a_3$ (efeito da variável $x_3$ )	-0,02445	1/h
$a_4$ (efeito da variável $x_4$ )	-0,02867	1/h
$a_5$ (efeito da variável $x_5$ )	0,02234	1/h
$a_6$ (efeito da variável $x_6$ )	0,10630	1/h
$a_7$	0,59272	1/h

Os valores negativos dos parâmetros significam que aumentando-se a concentração do sal de 20% para 100%, gera um efeito negativo na produtividade. Isto não significa contudo, que esta mesma tendência ocorrerá em níveis de concentrações intermediárias, pois a concentração deste sal pode estar inibindo o crescimento.

Quando o parâmetro tem valor positivo, o aumento na concentração do sal de 20 para 100%, gera um efeito positivo sobre a produtividade.

Na tabela 4.6 são apresentados os valores das produtividades médias experimentais do conjunto inicial de dados e da nova condição experimental e as respectivas produtividades calculadas pelo modelo, o desvio médio absoluto, o  $\chi^2$  e a confiança no teste  $\chi^2$  do modelo.

**TABELA 4.6- Produtividade média experimental obtida e produtividade calculada pelo modelo, para cada condição experimental e para a nova condição experimental**

Condição experimental	Produtividade experimental (g/L.h)	Produtividade calculada (g/L.h)
01	0,494	0,720
02	0,521	0,561
03	0,685	0,680
04	0,345	0,363
05	0,545	0,503
06	0,670	0,669
07	0,725	0,726
08	0,670	0,518
09	0,865	0,822

Desvio médio absoluto = 9.51%

$\chi^2 = 1,32$

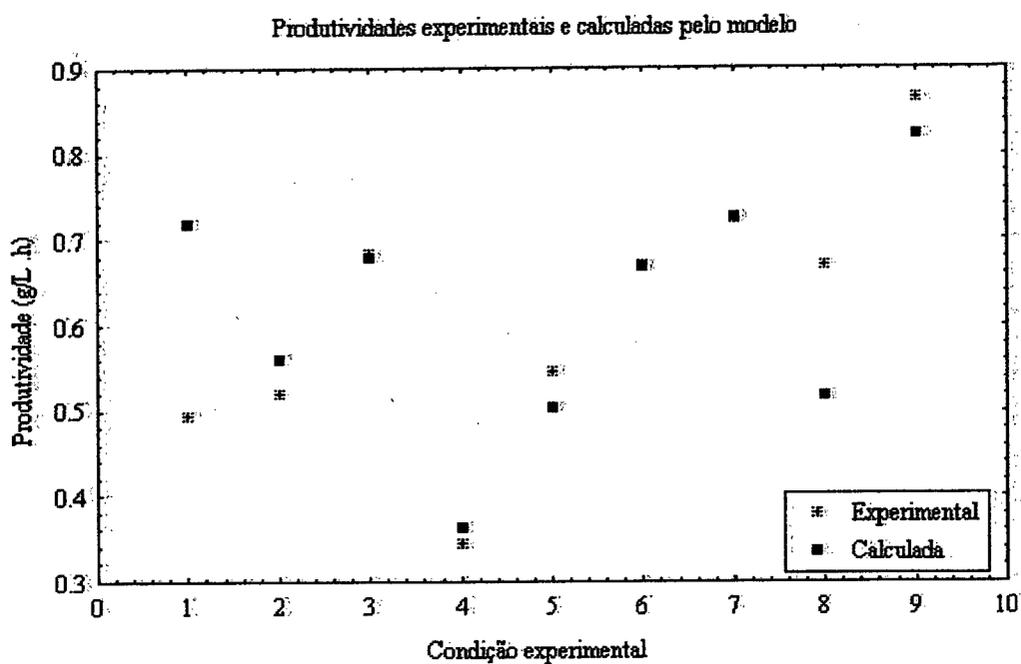
Confiança no teste  $\chi^2$  do modelo = 48.37 %

Novamente a confiança do modelo está dentro da estipulada, e o modelo foi então utilizado para a seleção do novo ponto ótimo. O ponto selecionado foi idêntico ao anterior e portanto esta condição experimental foi considerada a que forneceu a melhor produtividade. A seguir, na tabela 4.7 será apresentada a composição do meio ótimo .

**TABELA 4.7- Composição do meio de cultura otimizado**

Composição do meio de cultura ótimo	
$K_2HPO_4$	0,49 g/L
$KH_2PO_4$ ( $x_1$ )	1,74 g/L
$NH_4Cl$ ( $x_2$ )	3,20 g/L
Ácido cítrico mono hidratado ( $x_3$ )	0,17 g/L
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ ( $x_4$ )	2,03 g/L
$Na_2SO_4$ ( $x_5$ )	1,63 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ ( $x_6$ )	7,00 mg/L
Glicerol	10,00 g/L
Biotina	4,00 $\mu$ g/L

Na figura 4.1 apresenta-se com maior clareza os desvios observados entre o modelo e os dados experimentais.



**FIGURA 4.1- Desvios entre as produtividades experimentais e as calculadas pelo modelo**

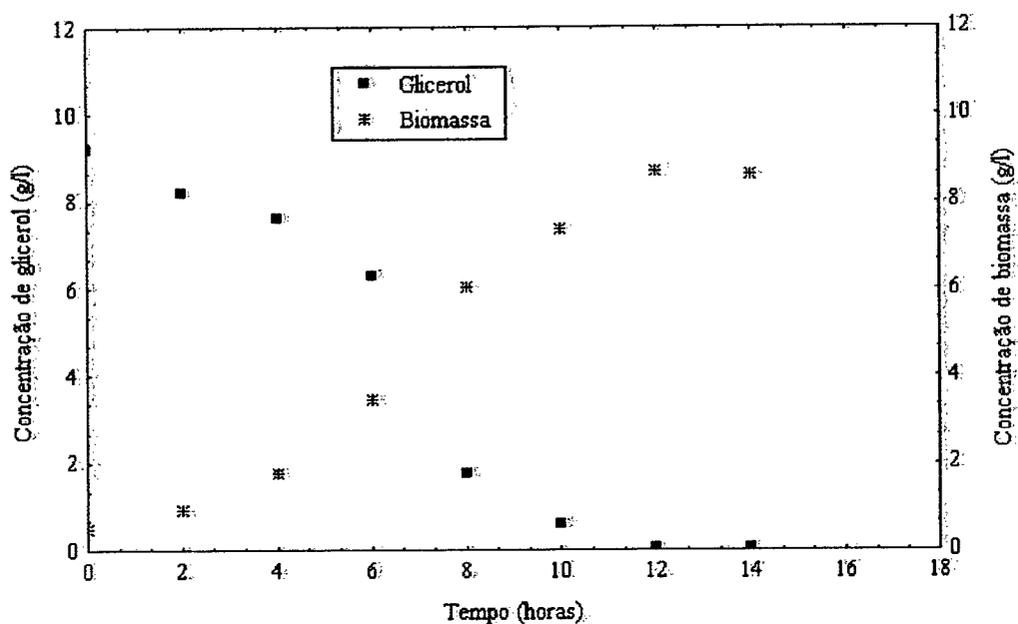
Embora, em alguns pontos o desvio que ocorre entre a produtividade experimental e a calculada seja grande, o modelo representa bem os dados experimentais.

## 4.2 - COMPORTAMENTO CINÉTICO NAS DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

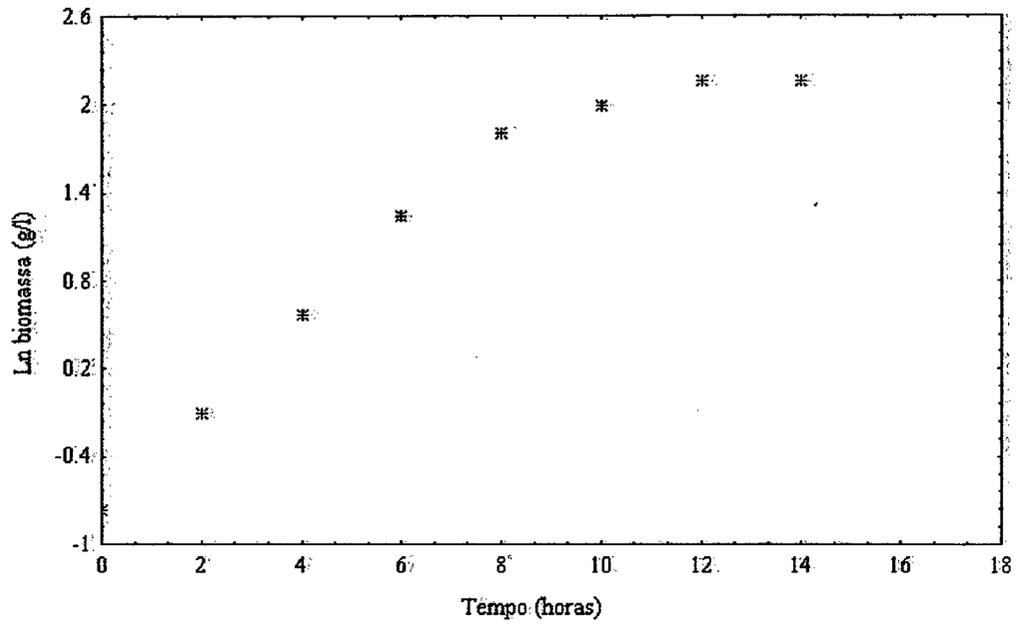
A título de ilustração serão apresentados a seguir, os dados cinéticos de 8 experimentos representando cada uma das condições experimentais.

#### 4.2.1 - Condição experimental 01

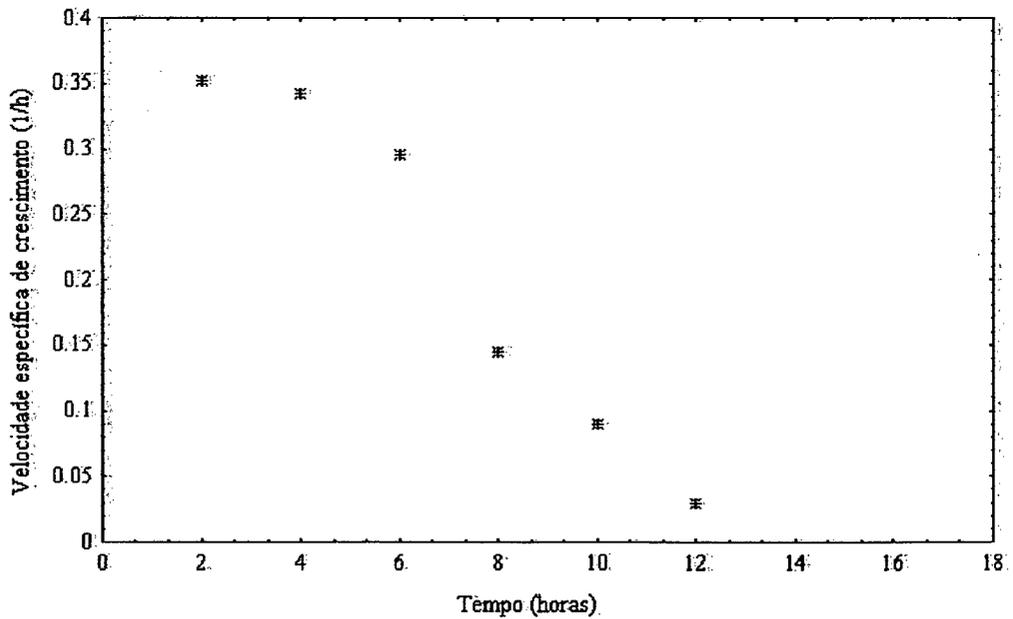
A seguir, o gráfico da concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo, do logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e da velocidade específica de crescimento celular em função do tempo são apresentados.



**FIGURA 4.2- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 01**



**FIGURA 4.3- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 01**



**FIGURA 4.4- Velocidade específica de crescimento celular em função do tempo para o experimento 01**

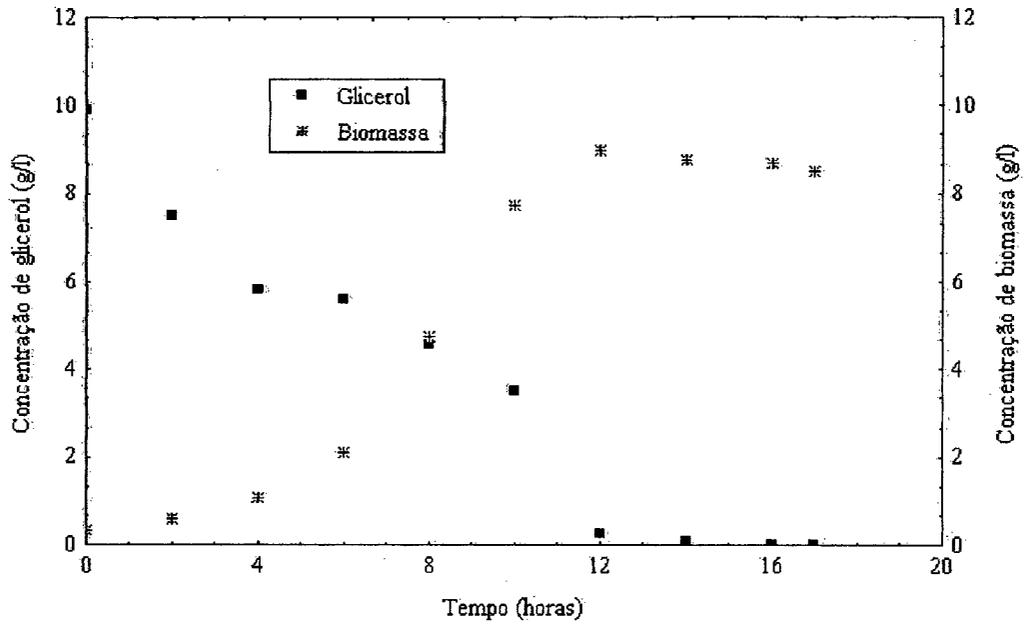
Para esta condição experimental o valor da velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ), calculado pelo método de LE DUY e ZAJIC (1973), foi  $0,35 \text{ h}^{-1}$  e pelo procedimento proposto por STANBURY e WHITAKER (1984) foi  $0,32 \text{ h}^{-1}$ .

O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), calculado pelas equações 3.6 e 3.7 foi  $0,90 \text{ g/g}$ , e o calculado graficamente foi  $0,86 \text{ g/g}$ . A produtividade obtida para este experimento foi  $0,68 \text{ g/L.h}$  e o consumo específico de substrato, calculado segundo a equação 3.8, foi  $1,11 \text{ g/g}$ .

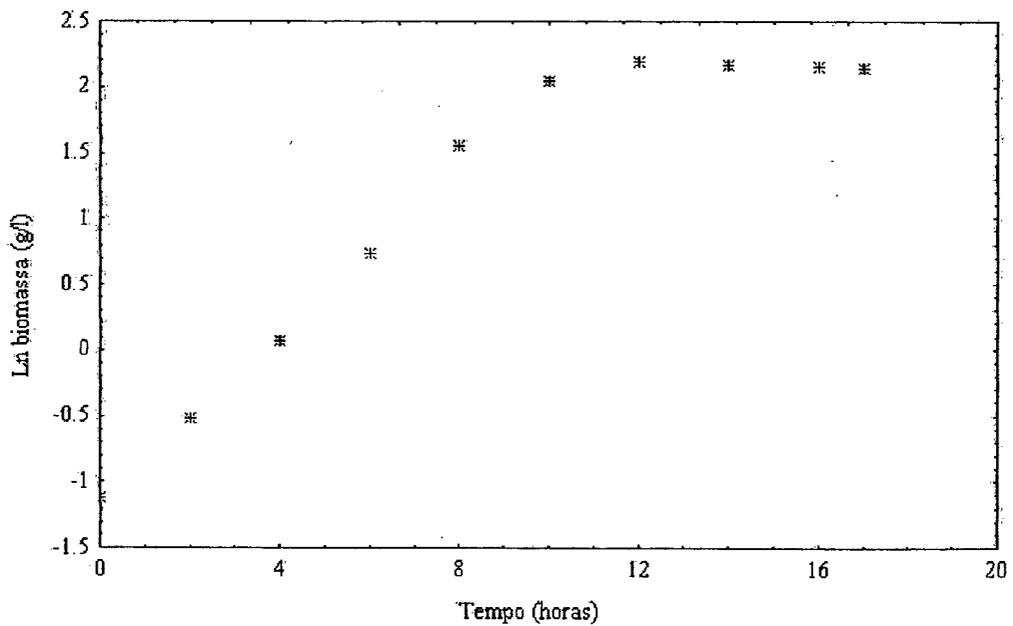
#### **4.2.2. - Condição experimental 02**

Nesta condição experimental obtivemos valores de fator de conversão de substrato em células e de consumo específico de glicerol similares para os dois experimentos. O valor de  $\mu_{\text{máx}}$  variou e conseqüentemente, a produtividade em células também.

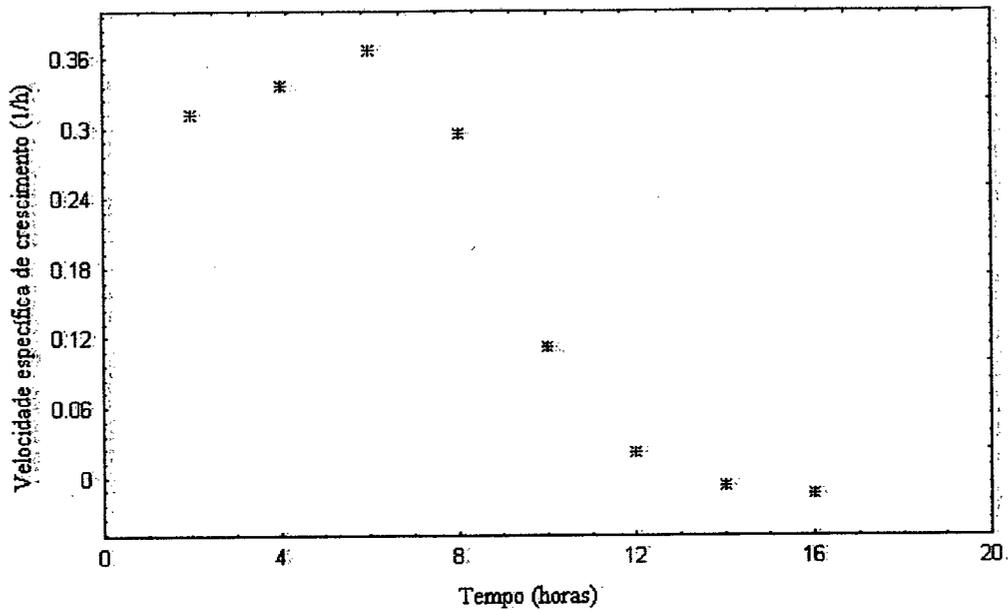
Para o experimento representado pelas figuras 4.5, 4.6 e 4.7, o valor de  $Y_{x/s}$  (AIBA et al.) foi  $0,86 \text{ g/g}$  e o calculado graficamente foi  $0,96 \text{ g/g}$ , o consumo específico de substrato foi  $1,16 \text{ g/g}$ , a velocidade específica máxima de crescimento calculada pelo método de LE DUY e ZAJIC (1973), foi  $0,37 \text{ h}^{-1}$  e a calculada pelo método de STANBURY e WHITAKER (1984) foi  $0,33 \text{ h}^{-1}$  e a produtividade em células foi  $0,60 \text{ g/L.h}$ .



**FIGURA 4.5- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 02**



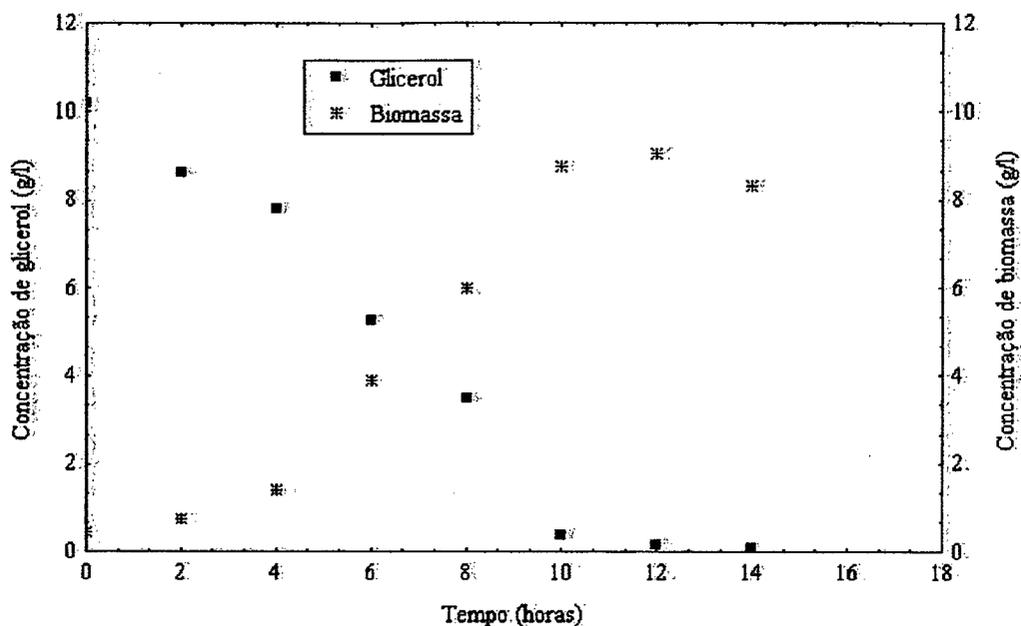
**FIGURA 4.6- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 02**



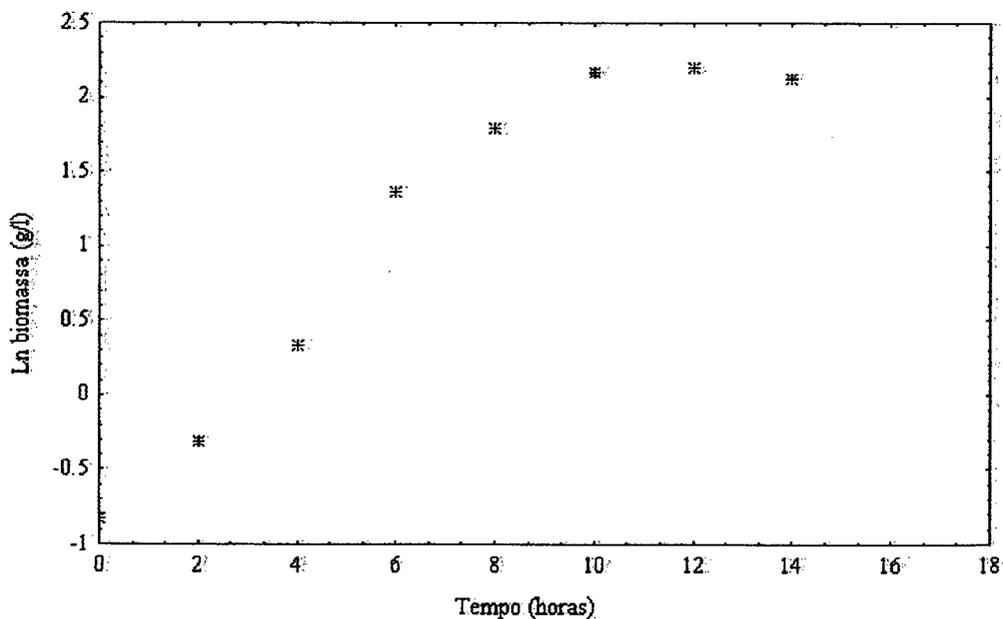
**FIGURA 4.7- Velocidade específica de crescimento celular em função do tempo para o experimento 02**

#### 4.2.3 - Condição experimental 03

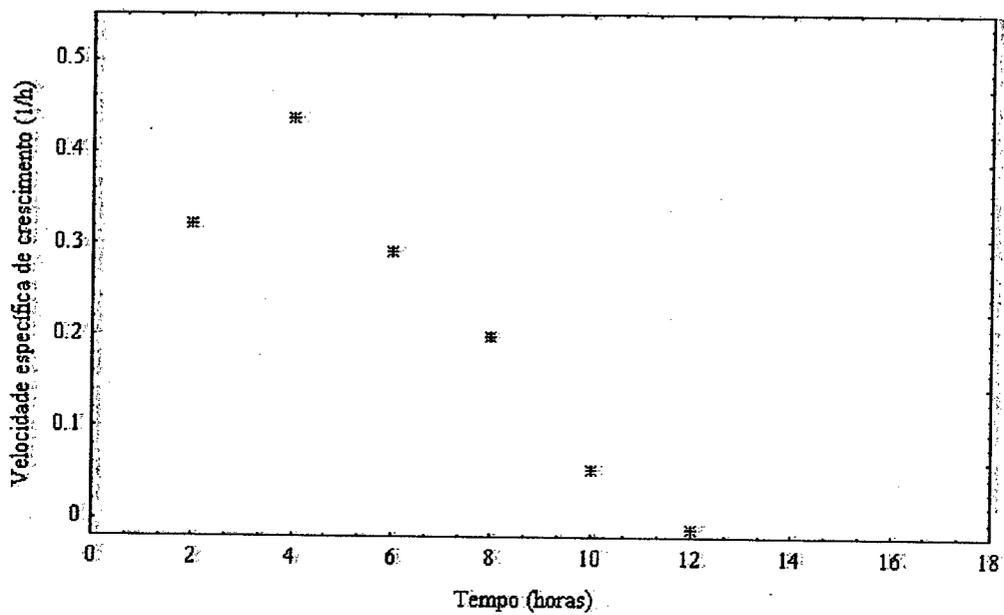
A velocidade específica máxima de crescimento, calculada segundo LE DUY e ZAJIC (1973), para este experimento foi  $0,44 \text{ h}^{-1}$  e segundo STANBURY e WHITAKER (1984) foi  $0,35 \text{ h}^{-1}$ , a produtividade em células foi  $0,72 \text{ g/L.h}$ , o fator de conversão de substrato em células, segundo AIBA et al. (1973) foi de  $0,86 \text{ g/g}$  e o calculado graficamente foi  $0,89 \text{ g/g}$  e o consumo específico de glicerol foi  $1,16 \text{ g/g}$ .



**FIGURA 4.8- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 03**



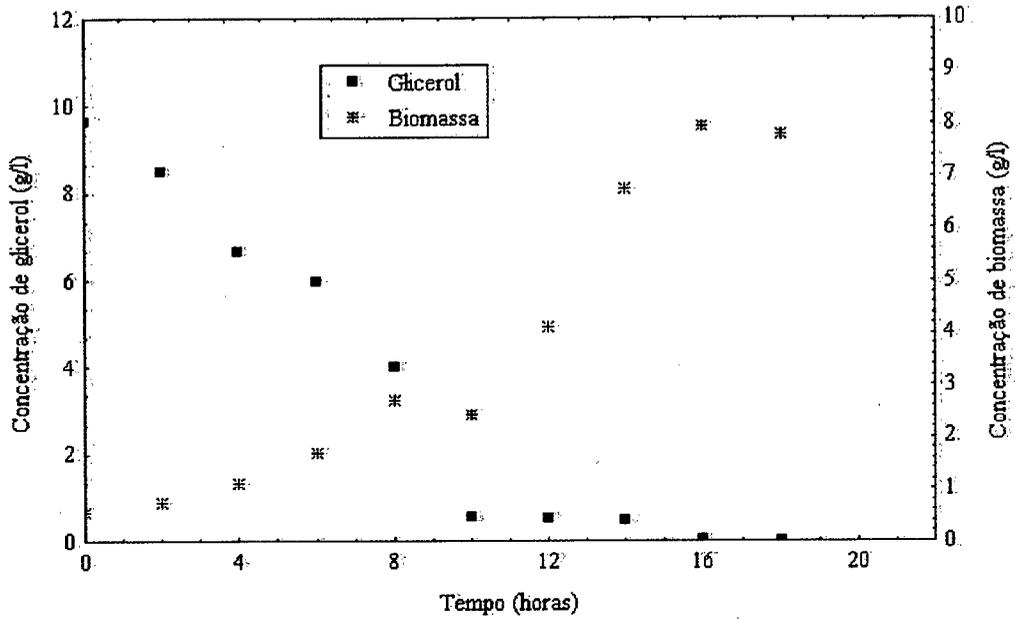
**FIGURA 4.9- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 03**



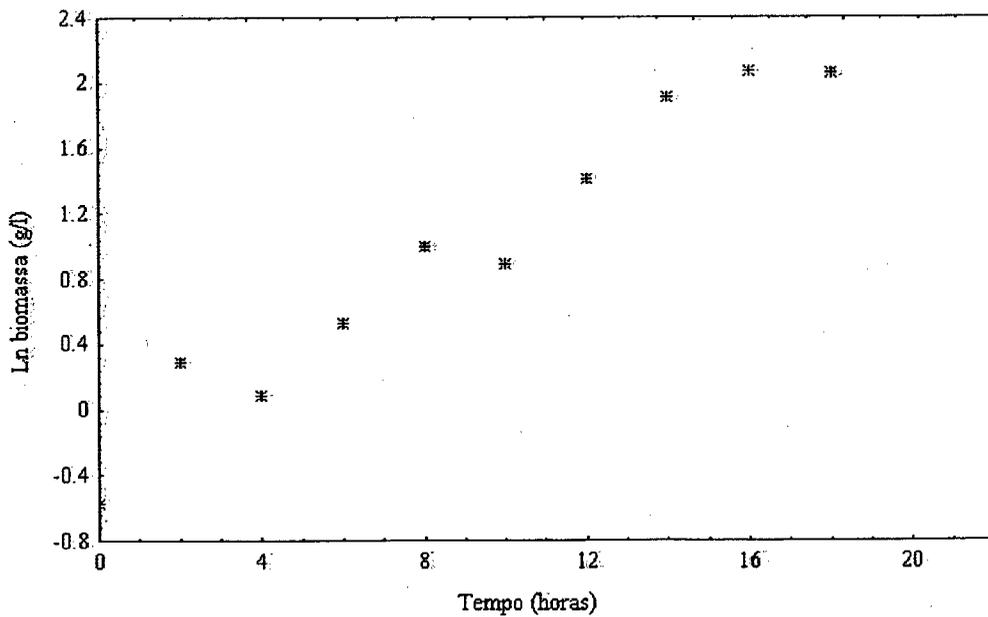
**FIGURA 4.10- Velocidade específica de crescimento celular em função do tempo para o experimento 03**

#### **4.2.4 - Condição experimental 04**

Neste experimento ocorreu um problema operacional onde a sonda de pH foi danificada e por algumas horas o controle de pH não foi efetuado.



**FIGURA 4.11- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 04**

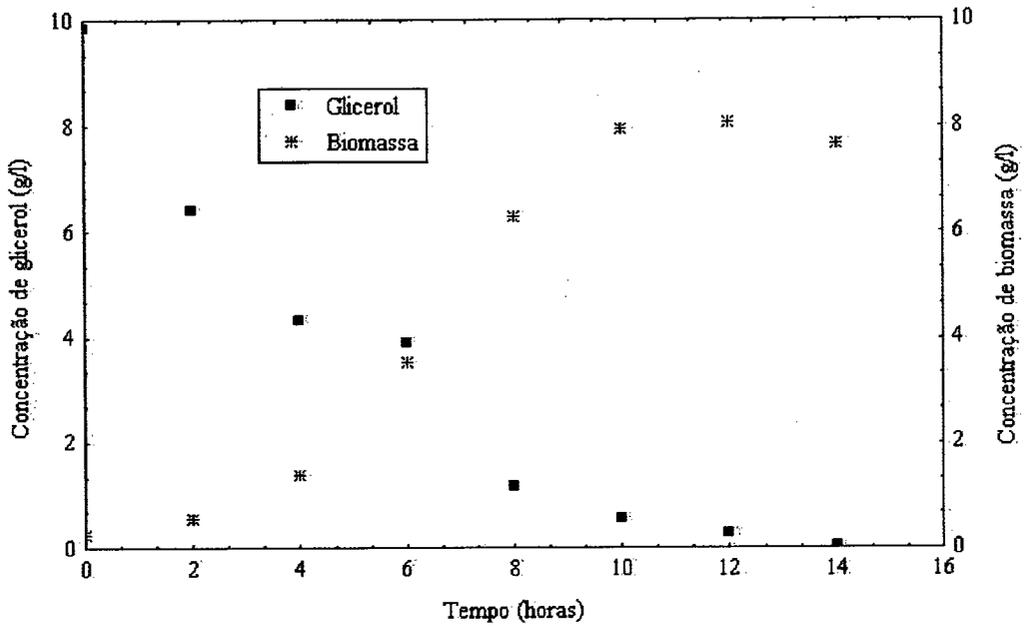


**FIGURA 4.12- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 04**

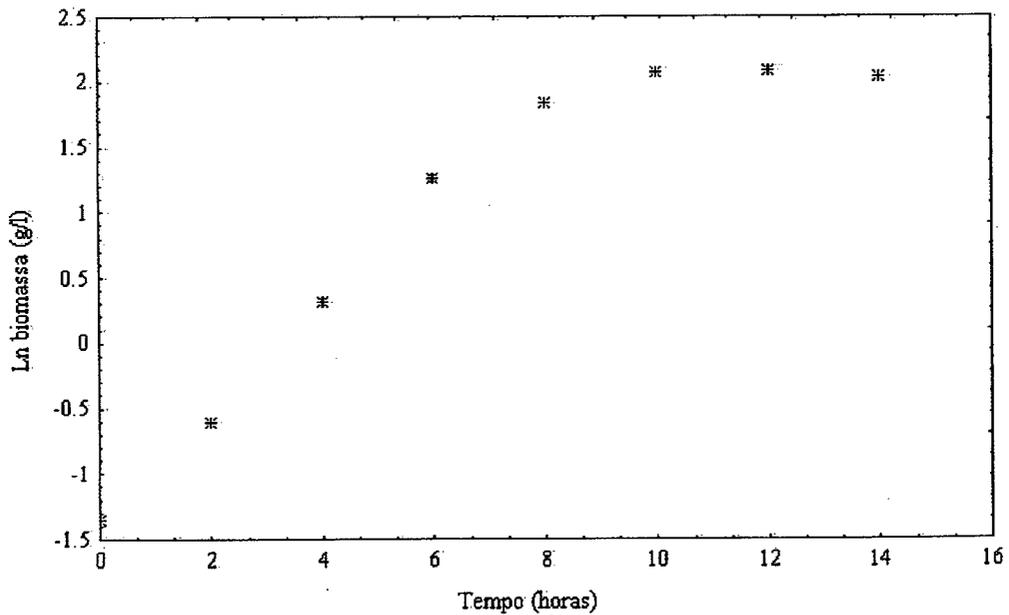
Para este experimento, o fator de conversão de substrato em células, para os dois métodos de cálculo empregados, apresentou o mesmo valor 0,77 g/g. O consumo específico de substrato foi 1,30 g/g e a produtividade em células foi 0,46 g/L.h. A velocidade específica máxima de crescimento, segundo LE DUY e ZAJIC (1973), foi  $0,23 \text{ h}^{-1}$  e segundo STANBURY e WHITAKER (1984) foi  $0,20 \text{ h}^{-1}$ .

#### **4.2.5 - Condição experimental 05**

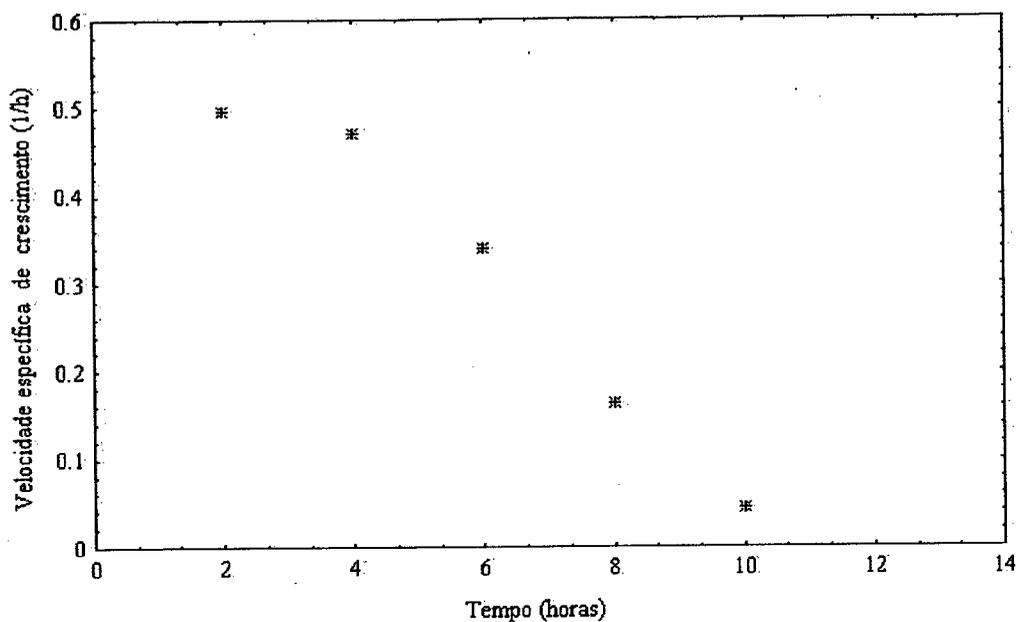
Com a concentração de sais usada neste experimento, a velocidade específica máxima de crescimento celular foi bem superior quando comparada com a observada nos outros experimentos. O valor de  $\mu_{\text{máx}}$  foi  $0,50 \text{ h}^{-1}$  (segundo LE DUY e ZAJIC) e  $0,44 \text{ h}^{-1}$  (segundo STANBURY e WHITAKER). O  $Y_{x/s}$  foi 0,79 g/g (segundo AIBA et al.) e 0,89 g/g (calculado graficamente). O consumo específico de substrato foi 1,25 g/g e a produtividade em células apresentada foi 0,65 g/L.h.



**FIGURA 4.13- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 05**



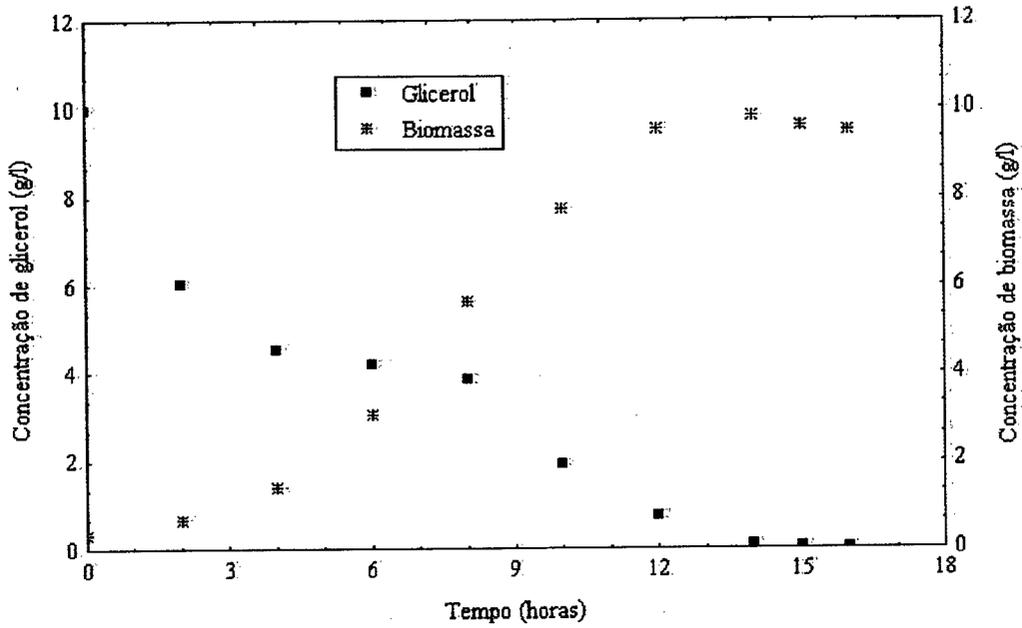
**FIGURA 4.14- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 05**



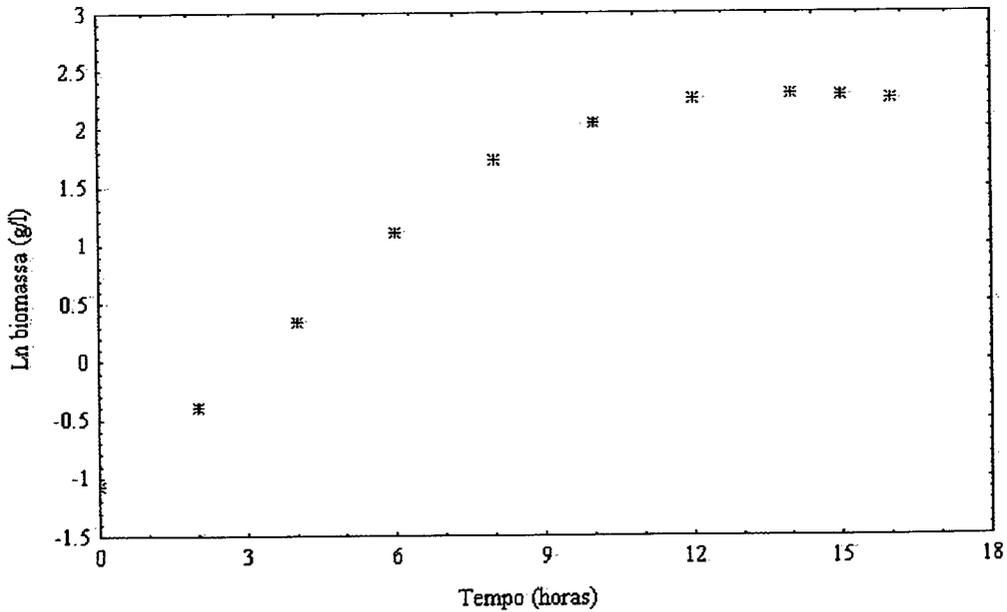
**FIGURA 4.15- Velocidade específica de crescimento celular em função do tempo para o experimento 05**

#### **4.2.6 - Condição experimental 06**

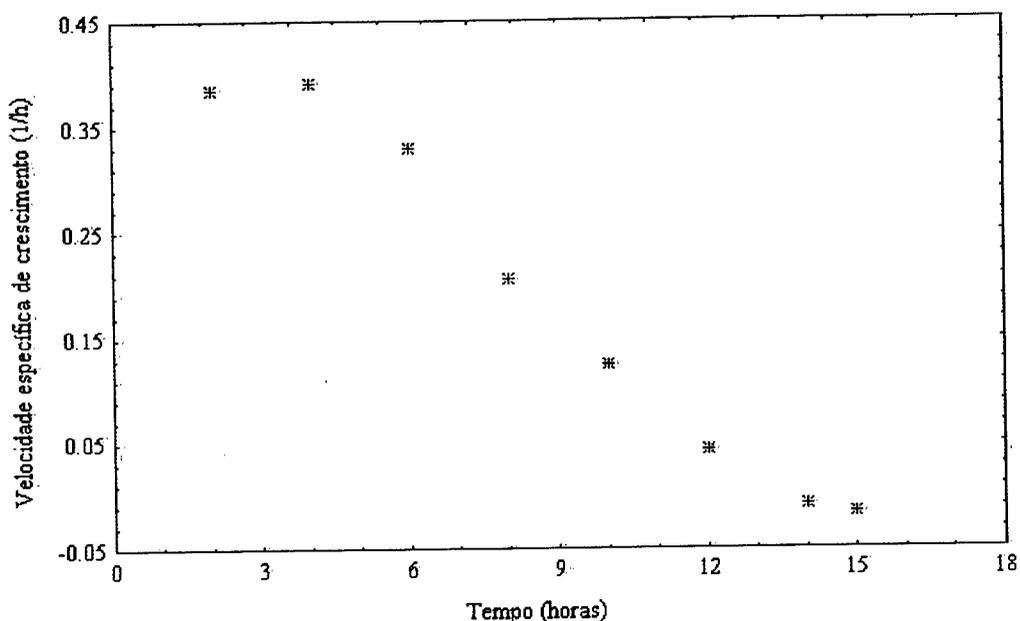
Os gráficos 4.16, 4.17 e 4.18 apresentam os dados obtidos em um dos experimentos da condição experimental 06. Nesta condição experimental obteve-se a menor variância experimental de todos os ensaios ( $\sigma^2 = 0,0002$ ).



**FIGURA 4.16- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 06**



**FIGURA 4.17- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 06**

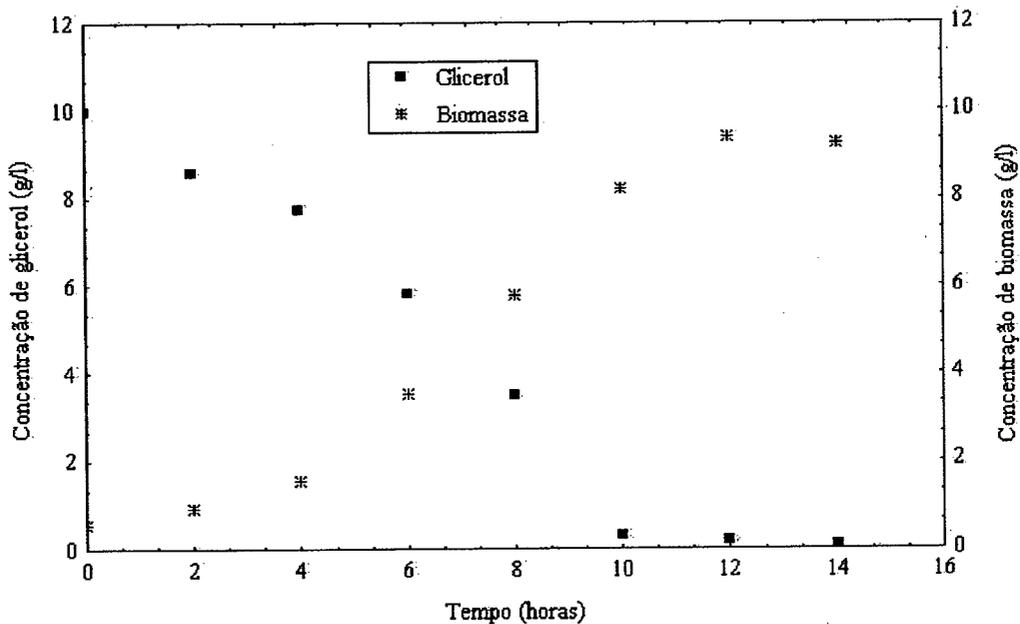


**FIGURA 4.18- Velocidade específica de crescimento em função do tempo para o experimento 06**

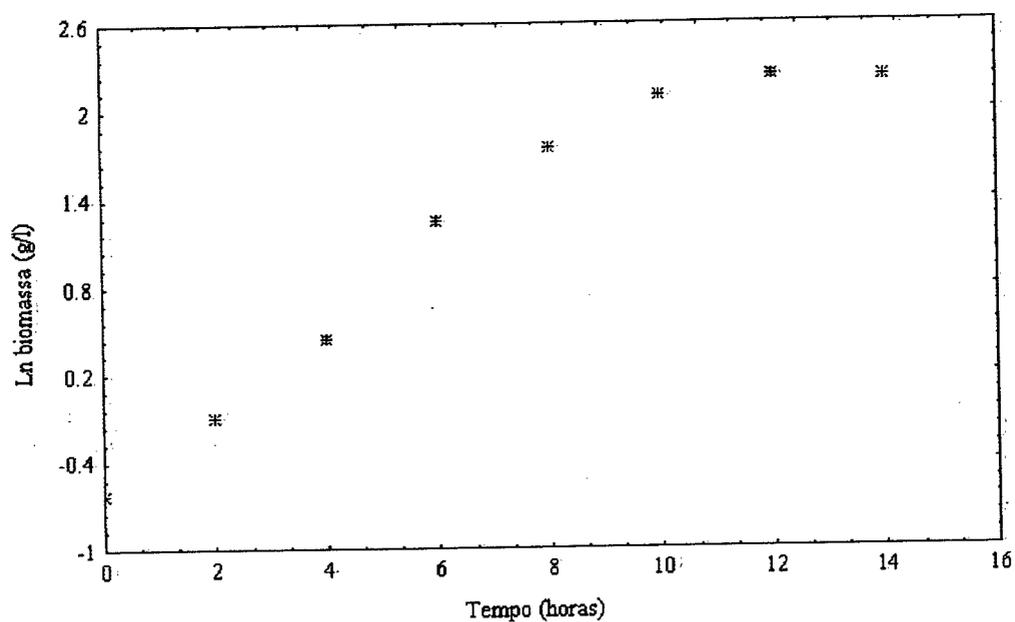
O fator de conversão de substrato em células obtido pelo método de AIBA et al. (1973) foi 0,95 g/g e o obtido graficamente foi 0,92 g/g, tendo-se um ótimo aproveitamento do substrato pelas células. A produtividade em células para este experimento foi de 0,68 g/L.h, a velocidade específica máxima de crescimento foi  $0,39 \text{ h}^{-1}$  (segundo LE DUY e ZAJIC) e  $0,36 \text{ h}^{-1}$  (segundo STANBURY e WHITAKER) e o consumo específico de glicerol foi 1,04 g/g.

#### 4.2.7 - Condição experimental 07

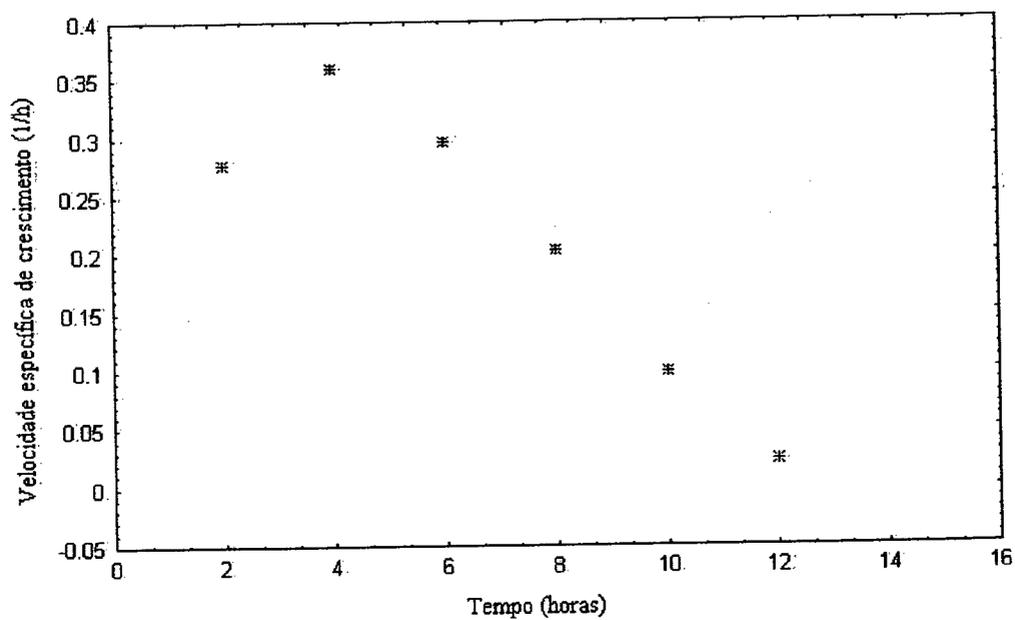
A variância experimental para esta condição experimental também foi pequena,  $\sigma^2 = 0,0004$ . A produtividade em células com esta concentração de sais (condição experimental 07), foi 0,74 g/L.h, o consumo específico de substrato foi 1,11 g/g. O fator de conversão de substrato em células, calculado segundo AIBA et al., foi 0,90 g/g e o calculado graficamente foi 0,92 g/g. A velocidade específica máxima de crescimento foi 0,36 h<sup>-1</sup> (calculada pelo método de LE DUY e ZAJIC (1973)) e a calculada pelo método descrito por STANBURY e WHITAKER (1984) foi 0,31 h<sup>-1</sup>.



**FIGURA 4.19- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 07**



**FIGURA 4.20- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 07**

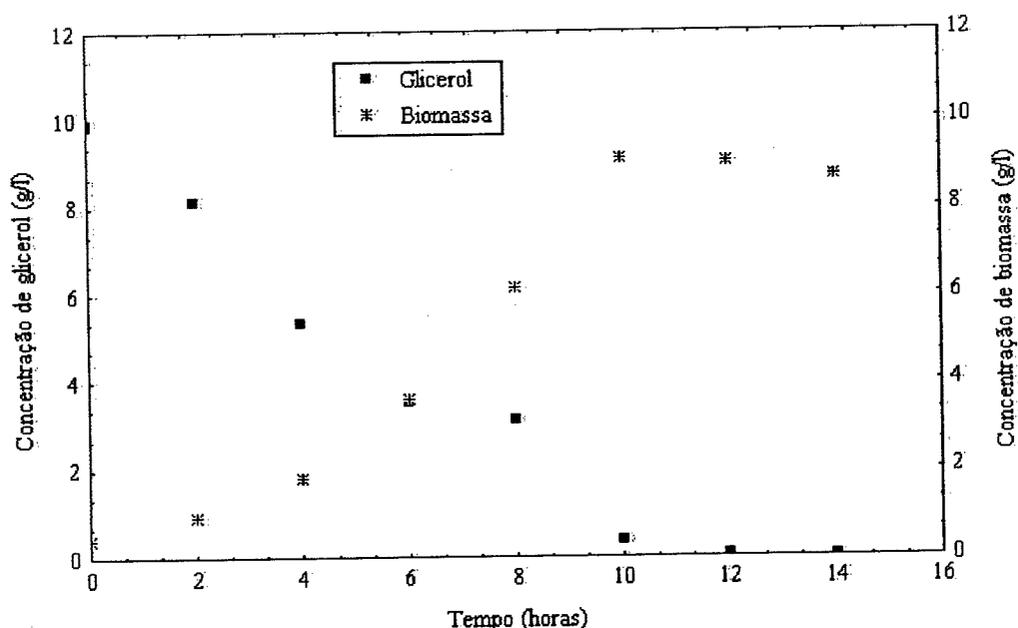


**FIGURA 4.21- Velocidade específica de crescimento em função do tempo para o experimento 07**

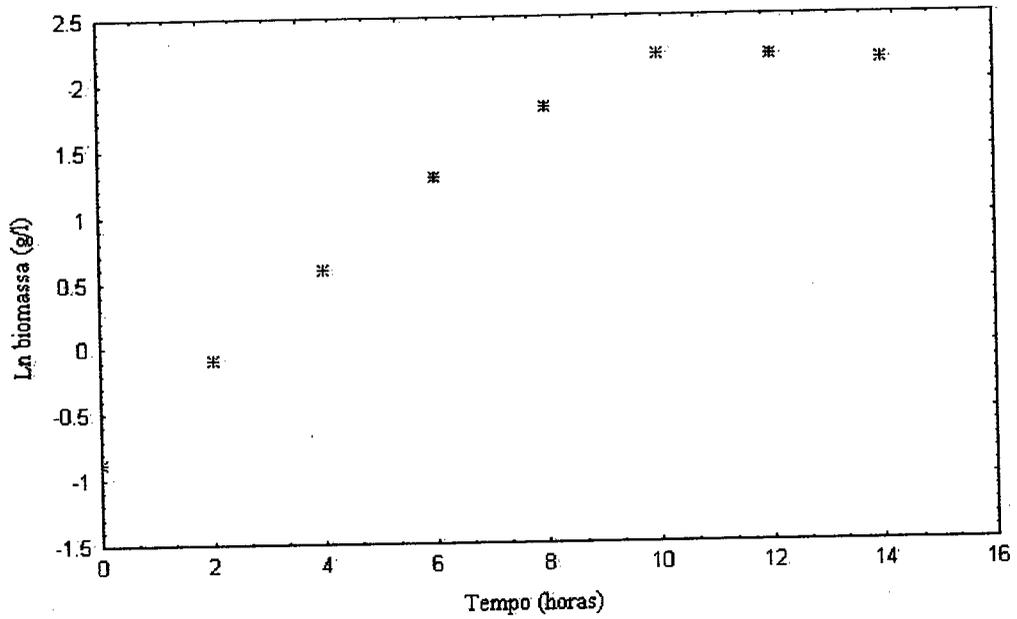
#### 4.2.8 - Condição experimental 08

Como na condição experimental 04, aqui também ocorreu um problema operacional. A falta de energia elétrica por um período de aproximadamente 45 minutos em um dos experimentos, provocou aumento na variância experimental, devido a diferença entre os valores das produtividades dos experimentos.

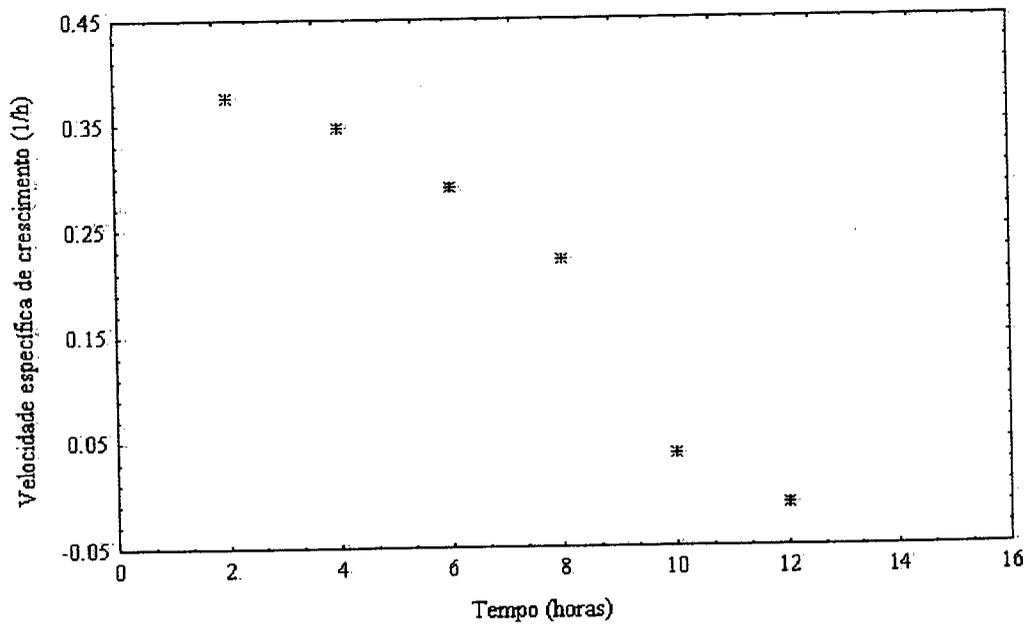
O fator de conversão de substrato em células (segundo AIBA et al.) para este experimento foi 0,91 g/g e o valor calculado graficamente foi 0,84 g/g, o consumo específico de glicerol foi 1,10 g/g, a velocidade específica máxima de crescimento foi 0,38 h<sup>-1</sup> (segundo LE DUY e ZAJIC) e 0,34 h<sup>-1</sup> (segundo STANBURY e WHITAKER) e a produtividade em células foi 0,87 g/L.h.



**FIGURA 4.22- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 08**



**FIGURA 4.23- Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 08**



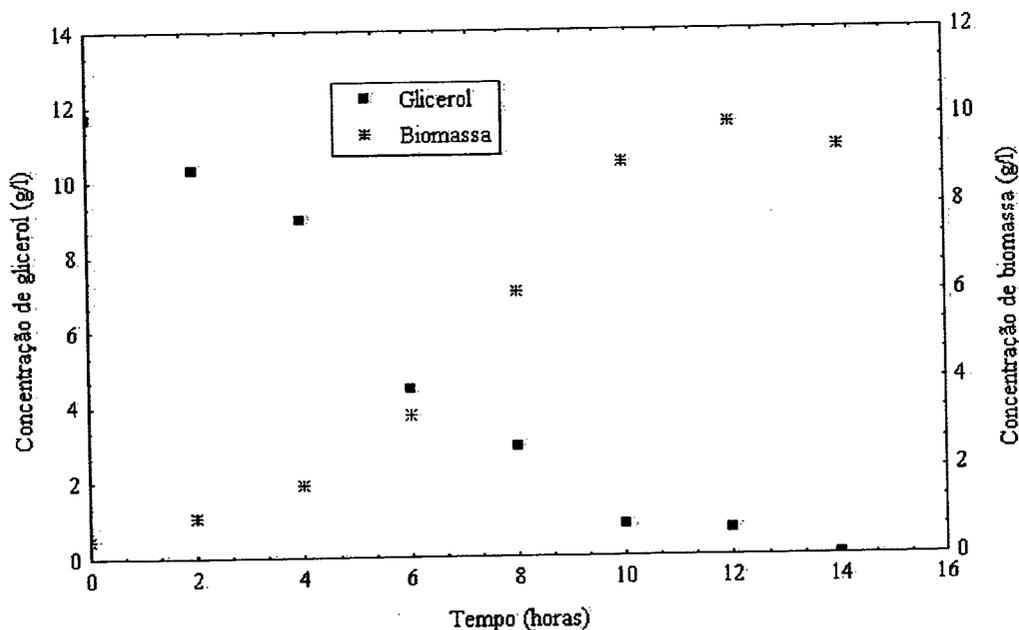
**FIGURA 4.24- Velocidade específica de crescimento em função do tempo para o experimento 08**

#### 4.2.9 - Condição experimental 09

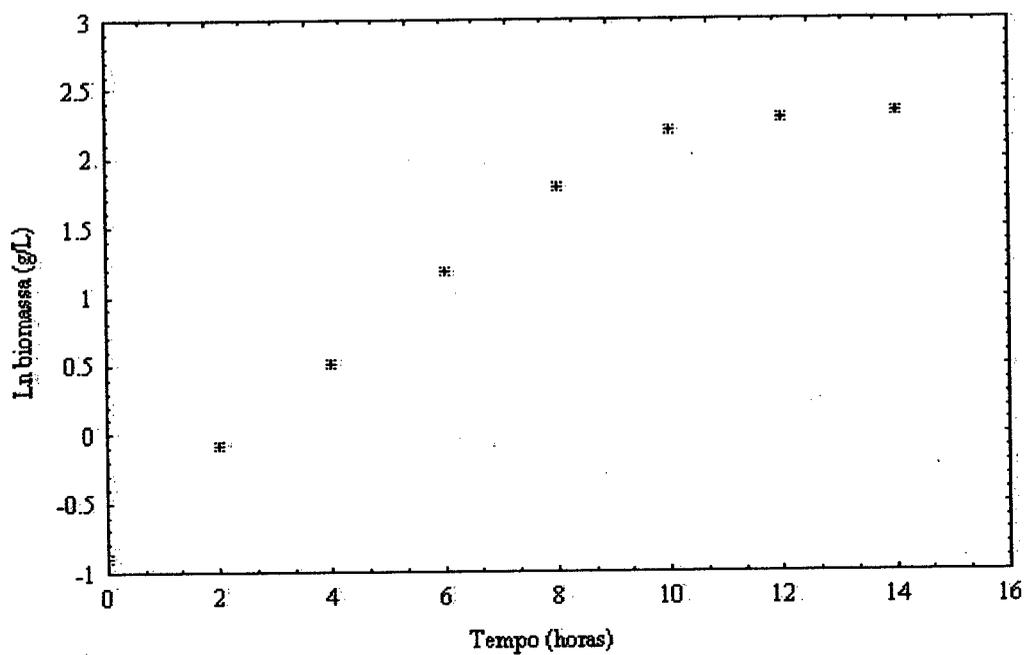
Esta condição experimental foi a selecionada na busca da concentração de sais, dentro dos níveis estudados, para maximizar a produtividade em células.

Como era esperado, neste experimento foi obtido o maior valor de produtividade em células de todo trabalho.

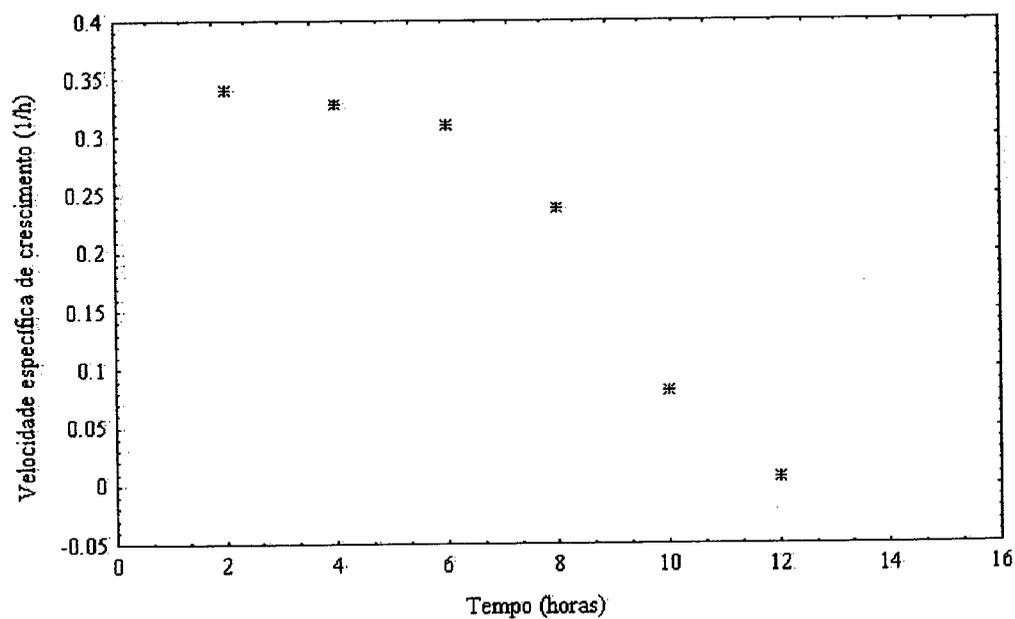
A seguir serão apresentados os gráficos da concentração celular e de glicerol em função do tempo (Figura 4.25), do logaritmo da concentração celular em função do tempo (Figura 4.26) e da velocidade específica de crescimento em função do tempo (Figura 4.27).



**FIGURA 4.25- Concentração celular e concentração de glicerol em função do tempo para o experimento 09**



**FIGURA 4.26 - Logaritmo da concentração celular em função do tempo para o experimento 09**



**FIGURA 4.27 - Velocidade específica de crescimento em função do tempo para o experimento 09**

Para esta condição experimental, o valor da velocidade específica máxima de crescimento celular foi  $0,34 \text{ h}^{-1}$  (segundo LE DUY e ZAJIC) e  $0,33 \text{ h}^{-1}$  (segundo STANBURY e WHITAKER). O valor do fator de conversão de substrato em células, calculado segundo AIBA et al., foi  $0,88 \text{ g/g}$  e o calculado graficamente foi  $0,84 \text{ g/g}$ . O consumo específico de substrato foi  $1,14 \text{ g/g}$  e a produtividade em células foi  $0,96 \text{ g/L.h}$ .

## 4.2 - RESUMO DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS

A tabela 4.8 mostra um resumo geral da média dos resultados em cada uma das condições experimentais.

Observando a tabela 4.8, nota-se que a concentração celular inicial variou muito e a variabilidade desse parâmetro pode ser atribuída a dois fatos:

- a) na técnica de preparo de inóculo existe uma variabilidade inerente ao método de cultivo em frascos agitados (SOLOMONS, 1969);
- b) para a inoculação da pré-cultura foram utilizadas duas alçadas (alça de platina) da levedura em meio de conservação, e desta maneira não se pode garantir que sempre a mesma quantidade de levedura foi adicionada. Por isso, pode-se estimar, de antemão, incertezas da ordem de 10 a 20% nos valores das concentrações celulares iniciais. O uso de material seco (levedura seca) para a inoculação da pré-cultura, provavelmente conduziria a uma maior precisão na determinação da concentração celular inicial.

**TABELA 4.8- Média dos principais parâmetros das diferentes condições experimentais**

Parâmetros (unidade)	Condição Experimental								
	01	02	03	04	05	06	07	08	09
$t_0$ (h)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$t_f$ (h)	14,00	16,00	13,00	16,00	15,00	14,00	13,00	13,00	11,00
$X_0$ (g/L)	0,48	0,33	0,52	0,57	0,40	0,30	0,51	0,29	0,40
$X_f$ (g/L)	7,01	8,51	9,37	7,67	8,27	9,67	9,80	8,41	9,78
$S_0$ (g/L)	9,49	9,54	9,97	9,84	9,77	9,92	10,55	9,53	11,02
$S_f$ (g/L)	0,04	0,04	0,07	0,06	0,15	0,21	0,10	0,23	0,45
$Y_{x/s}$ (g/g) <sup>1</sup>	0,70	0,87	0,90	0,72	0,80	0,96	0,90	0,87	0,88
$Y_{x/s}$ (g/g) <sup>2</sup>	0,66	0,90	0,91	0,72	0,89	0,92	0,92	0,90	0,83
$Y_{s/x}$ (g/g)	1,55	1,16	1,11	1,38	1,23	1,03	1,11	1,15	1,12
$P$ (g/L.h)	0,49	0,52	0,68	0,34	0,54	0,67	0,72	0,67	0,87
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	0,33	0,32	0,32	0,20	0,36	0,35	0,35	0,37	0,32
$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>4</sup>	0,37	0,35	0,38	0,30	0,40	0,39	0,39	0,42	0,34

1- Fator de conversão calculado segundo AIBA et al. (1973)

2- Fator de conversão calculado graficamente

3- Velocidade específica máxima de crescimento calculada segundo STANBURY e WHITAKER (1984)

4- Velocidade específica máxima de crescimento calculada segundo LE DUY e ZAJIC (1973)

A pequena variação nos tempos de fermentação para as diferentes condições experimentais, evidencia que os critérios para determinação do tempo final de fermentação foram eficientes.

Os valores finais da concentração de glicerol sugerem que o mesmo não foi utilizado completamente. Entretanto pode-se considerar que o glicerol tenha sido convertido em subprodutos não metabolizáveis pelas leveduras, e por isso uma pesquisa de subprodutos de fermentação precisaria ser feita. Outro ponto que pode ter influenciado nos valores da concentração de glicerol, é o método utilizado para sua determinação. A variação que ocorreu nos valores da concentração inicial de glicerol pode ser atribuída a pesagem do mesmo, uma vez que este é bastante viscoso dificultando o manuseio.

Os valores de velocidade específica máxima de crescimento celular calculados pelo método proposto por LE DUY e ZAJIC (1973) são bem maiores que os calculados pelo procedimento descrito por STANBURY e WHITAKER (1984). Nota-se que o último método apresenta valores reais para  $\mu_{m\acute{a}x}$ , pois o valor é uma média dos primeiros valores de  $\mu$  calculados pelo método de LE DUY e ZAJIC. Também, observa-se que o método proposto por LE DUY e ZAJIC fornece um ponto de máximo considerando a fase exponencial pontual. Enquanto que pelo método proposto por STANBURY e WHITAKER, a fase exponencial é bem definida por uma reta com coeficiente de correlação próximo de 1.

O fator de conversão de substrato em células é um parâmetro relacionado com o rendimento do processo. Dessa forma, quanto maior o seu valor, melhor o aproveitamento de substrato. Neste trabalho, o fator de conversão de substrato em células

foi melhor que o esperado alcançando 0,96 g/g na condição experimental 06, sugerindo desta forma, que se trabalhou com uma aeração perfeita e que praticamente todo o substrato metabolizado foi convertido em células. Infelizmente não foi encontrado nenhum dado sobre o valor do fator de conversão de glicerol pela *Candida utilis* na literatura, não havendo desta maneira forma de compará-lo.

Apesar de a tabela 4.8 apresentar valores iguais para a média da produtividade em células em duas condições experimentais, observando a tabela 4.1 pode-se verificar que estes valores são diferentes quando a variância experimental é levada em consideração.

## 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Com este trabalho foi possível ressaltar a importância do planejamento experimental no desenvolvimento de processos fermentativos. A partir do conjunto de ensaios realizados nas condições estabelecidas no capítulo 3 foi possível chegar as seguintes conclusões principais:

- a) com o uso do planejamento experimental saturado, o número de experimentos diminuiu consideravelmente e conseqüentemente, o custo para desenvolver esta pesquisa também.
- b) utilizando a metodologia de planejamento sequencial, foi possível encontrar as concentrações de sais que maximizaram a produtividade em células, dentro dos níveis estudados.
- c) a confiança no teste  $\chi^2$  do modelo ( 48,37%) está dentro do limite de confiança estabelecido.
- d) as réplicas dos experimentos são de fundamental importância para a avaliação dos erros experimentais.

- e) os critérios adotados para a determinação do tempo final de fermentação se mostraram eficientes.
- f) os valores de conversão de substrato em células foram bem superiores aos esperados (0,88 g/g), sugerindo que praticamente todo glicerol metabolizado foi convertido em células e que trabalhou-se com um nível de aeração ótimo.

Os resultados observados neste trabalho não esgotam aqui esta pesquisa, ao contrário, indicam uma série de metas que deverão complementar este estudo, como:

- 1) estudo da influência da concentração inicial de glicerol sobre a produtividade.
- 2) empregar esta metodologia de planejamento experimental, para o estudo de mais níveis de concentração salina.
- 3) investigar as interações que ocorrem entre as variáveis (concentrações de sais).

**ANEXOS**

## ANEXO A

As tabelas listadas neste anexo apresentam os resultados experimentais obtidos neste trabalho, utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento.

**TABELA A.1 - Dados experimentais do experimento 1A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,496	9,770	- 0,701	
2	0,835	7,930	- 0,180	0,397
4	1,901	6,960	0,642	0,277
6	2,941	6,750	1,079	0,170
8	3,897	6,410	1,360	0,081
10	4,262	4,280	1,450	0,039
12	4,567	1,970	1,519	0,012
14	4,487	0,413	1,501	0,048
15	4,850	0,130	1,579	0,088
16	5,343	0,040	1,676	0,038
17	5,311	0,020	1,670	- 0,018
18	5,152	0,000	1,639	

**TABELA A.2 - Dados experimentais do experimento 1 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,463	9,202	- 0,771	
2	0,903	8,217	- 0,102	0,352
4	1,760	7,618	0,565	0,342
6	3,472	6,291	1,245	0,296
8	6,053	1,755	1,801	0,144
10	7,355	0,579	1,995	0,089
12	8,683	0,051	2,161	0,029
14	8,610	0,020	2,153	

**TABELA A. 3 - Dados experimentais do experimento 2 A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,325	9,900	- 1,124	
2	0,597	7,510	- 0,516	0,312
4	1,073	5,830	0,070	0,337
6	2,091	5,580	0,738	0,366
8	4,762	4,570	1,560	0,296
10	7,745	3,480	2,047	0,113
12	8,966	0,248	2,193	0,022
14	8,759	0,078	2,170	- 0,008
16	8,687	0,007	2,162	- 0,014
17	8,520	0,000	2,142	

**TABELA A.4 - Dados experimentais do experimento 2 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,345	9,180	- 1,066	
2	0,693	5,649	- 0,366	0,295
4	1,163	5,350	0,151	0,343
6	2,389	4,066	0,871	0,279
8	3,846	3,810	1,347	0,179
10	5,144	2,097	1,638	0,103
12	6,007	0,626	1,793	0,054
14	6,471	0,571	1,867	0,060
16	7,652	0,127	2,035	0,057
18	8,267	0,008	2,112	0,010
20	8,008	0,005	2,080	

**TABELA A.5 - Dados experimentais do experimento 3 A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,436	10,190	- 0,830	
2	0,733	8,600	- 0,310	0,322
4	1,394	7,800	0,332	0,437
6	3,902	5,280	1,361	0,291
8	5,988	3,480	1,790	0,198
10	8,767	0,382	2,171	0,0534
12	9,060	0,131	2,204	- 0,010
14	8,336	0,070	2,120	

**TABELA A.6 - Dados experimentais do experimento 3 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,603	9,761	- 0,505	
2	1,049	8,217	0,048	0,305
4	1,908	6,890	0,646	0,319
6	3,665	5,264	1,299	0,276
8	6,060	3,895	1,802	0,104
10	6,776	0,275	1,913	0,095
12	9,391	0,007	2,240	0,049
14	9,683	0,006	2,270	0,003
16	9,523	0,000	2,254	

**TABELA A.7 - Dados experimentais do experimento 4 A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,585	10,060	- 0,537	
2	0,943	8,340	- 0,057	0,356
4	2,002	6,920	0,694	0,143
6	2,190	5,950	0,784	0,116
8	3,079	5,660	1,125	0,011
10	2,384	5,280	0,869	- 0,110
12	2,013	4,650	0,699	- 0,024
14	2,185	4,650	0,782	0,051
16	2,464	4,320	0,902	- 0,020
18	1,973	4,280	0,679	0,096
20	4,136	3,900	1,420	0,145
22	4,839	2,470	1,577	0,100
24	6,126	0,808	1,813	0,079
26	6,844		1,923	0,028
28	6,928	0,138	1,935	0,020
30	7,421	0,086	2,004	0,005
32	7,103	0,073	1,960	

**TABELA A.8 - Dados experimentais do experimento 4 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,565	9,630	- 0,571	
2	0,748	8,517	- 0,291	0,176
4	1,092	6,676	0,088	0,212
6	1,683	5,949	0,521	0,234
8	2,697	4,023	0,992	0,056
10	2,424	0,556	0,885	0,094
12	4,103	0,534	1,412	0,249
14	6,737	0,488	1,907	0,124
16	7,931	0,041	2,071	0,027
18	7,792	0,007	2,053	

**TABELA A.9 - Dados experimentais para o experimento 5 A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,550	9,690	- 0,607	
2	0,786	7,090	- 0,240	0,304
4	1,535	6,250	0,428	0,305
6	2,692	5,240	0,990	0,297
8	5,096	4,490	1,628	0,230
10	7,389	4,110	2,000	0,051
12	7,486	1,970	2,013	0,007
14	7,592	0,347	2,027	- 0,004
16	7,374	0,262	1,998	0,024
18	8,468	0,021	2,136	0,017
20	8,130	0,005	2,096	

**TABELA A.10 - Dados experimentais do experimento 5 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,258	9,850	- 1,354	
2	0,543	6,420	- 0,609	0,497
4	1,376	4,323	0,319	0,471
6	3,525	3,895	1,260	0,341
8	6,275	1,156	1,836	0,164
10	7,935	0,565	2,071	0,044
12	8,064	0,291	2,087	- 0,008
14	7,666	0,030	2,037	

**TABELA A.11 - Dados experimentais do experimento 6 A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,250	9,860	- 1,385	
2	0,486	7,380	- 0,720	0,327
4	0,887	6,460	- 0,119	0,384
6	1,908	5,950	0,646	0,351
8	3,703	4,860	1,309	0,305
10	6,880	3,310	1,929	0,159
12	8,589	1,130	2,150	0,094
13	9,380	0,964	2,238	0,040
14	9,497	0,349	2,251	- 0,001
15	9,364	0,007	2,237	- 0,047
16	8,196	0,004	2,104	

**TABELA A.12 - Dados experimentais do experimento 6 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,340	9,972	- 1,077	
2	0,672	6,034	- 0,397	0,386
4	1,397	4,537	0,334	0,392
6	3,042	4,194	1,113	0,330
8	5,627	3,852	1,728	0,206
10	7,732	1,926	2,045	0,125
12	9,526	0,727	2,254	0,044
14	9,822	0,077	2,299	- 0,009
15	9,614	0,031	2,285	- 0,017
16	9,503	0,015	2,252	

**TABELA A.13 - Dados experimentais do experimento 7 A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,242	11,127	- 1,419	
2	0,530	7,960	- 0,634	0,412
4	1,126	6,848	0,119	0,416
6	2,527	6,077	0,927	0,361
8	5,118	5,307	1,633	0,200
10	6,803	4,108	1,917	0,110
12	8,150	1,198	2,098	0,101
14	10,210	0,039	2,324	0,026
16	10,000	0,010	2,303	

**TABELA A.14 - Dados experimentais do experimento 7 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,536	9,982	- 0,624	
2	0,911	8,560	- 0,093	0,277
4	1,556	7,746	0,442	0,360
6	3,520	5,820	1,258	0,297
8	5,765	3,509	1,752	0,203
10	8,202	0,291	2,104	0,099
12	9,391	0,169	2,240	0,023
14	9,258	0,076	2,225	

**TABELA A.15 - Dados experimentais do experimento 8 A**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,157	9,202	- 1,849	
2	0,360	7,875	- 1,020	0,457
4	0,821	7,190	- 0,197	0,462
6	1,954	7,019	0,670	0,349
8	3,616	6,591	1,285	0,226
10	5,224	4,793	1,653	0,109
12	6,040	5,436	1,798	0,095
14	7,652	4,674	2,035	0,044
16	7,752	0,109	2,048	0,001
18	7,692	0,004	2,040	

**TABELA A.16 - Dados experimentais do experimento 8 B**

Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,417	9,860	- 0,873	
2	0,911	8,130	- 0,093	0,377
4	1,816	5,350	0,597	0,347
6	3,612	3,550	1,284	0,290
8	6,144	3,120	1,815	0,221
10	9,077	0,353	2,206	0,037
12	9,026	0,032	2,200	- 0,011
14	8,687	0,018	2,162	

**TABELA A.17 - Dados experimentais do experimento 9 A**

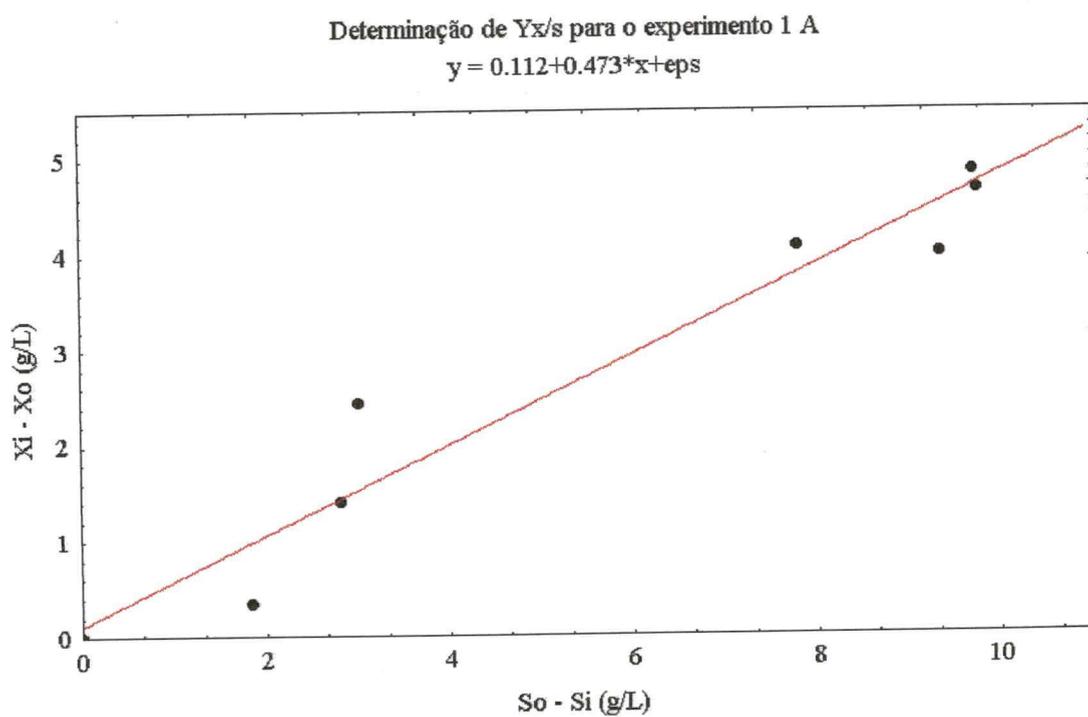
Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,397	10,360	- 0,922	
2	0,760	10,190	- 0,274	0,283
4	1,259	8,860	0,230	0,345
6	2,643	6,030	0,972	0,328
8	4,919	4,280	1,593	0,246
10	7,513	0,483	2,017	0,153
12	9,584	0,113	2,239	0,023
14	9,205	0,019	2,220	

**TABELA A.18 - Dados experimentais do experimento 9 B**

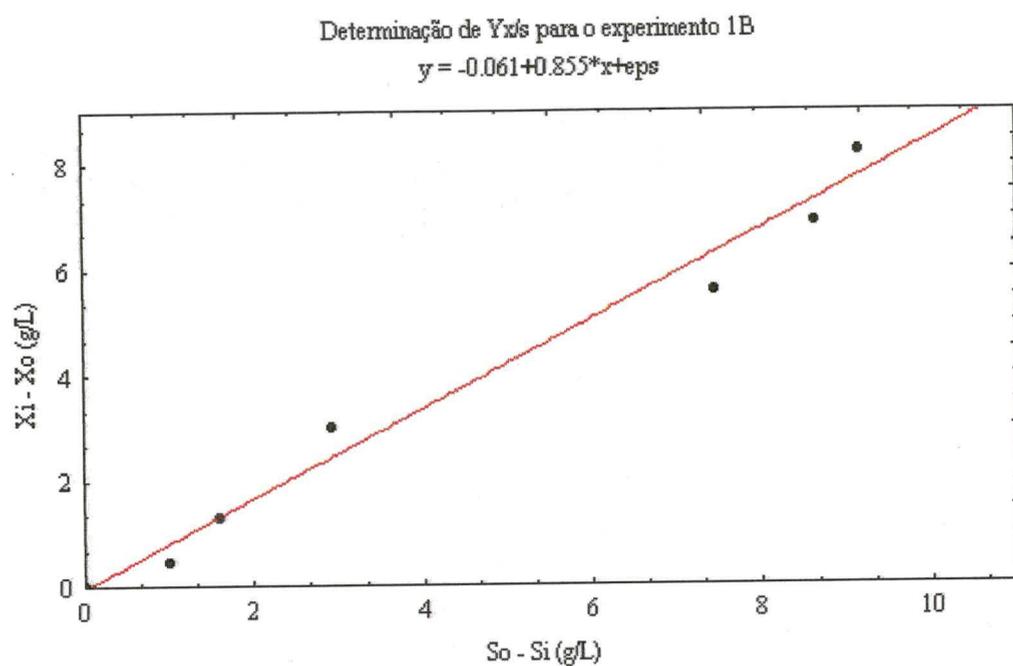
Tempo (horas)	Biomassa (g/L)	Glicerol (g/L)	Ln biomassa (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0,407	11,680	- 0,899	
2	0,914	10,310	- 0,090	0,341
4	1,661	8,990	0,507	0,328
6	3,240	4,450	1,176	0,310
8	6,031	2,910	1,797	0,238
10	8,986	0,800	2,196	0,081
12	9,882	0,680	2,291	0,006
14	9,304	0,015	2,330	

## ANEXO B

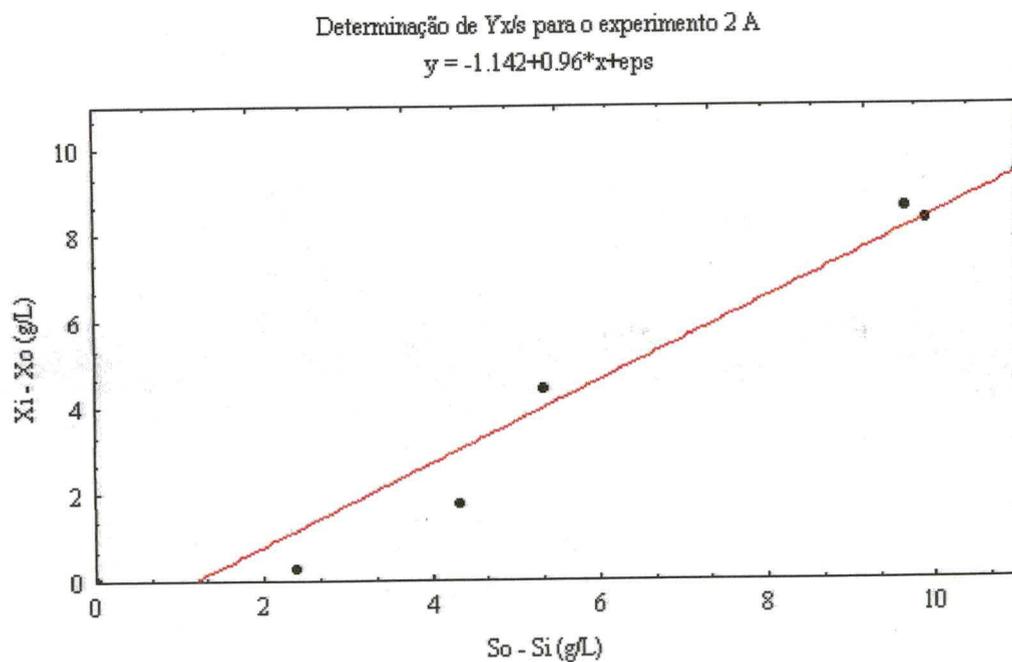
Neste anexo são apresentados os gráficos para determinação do fator de conversão de substrato em células, para todos os experimentos.



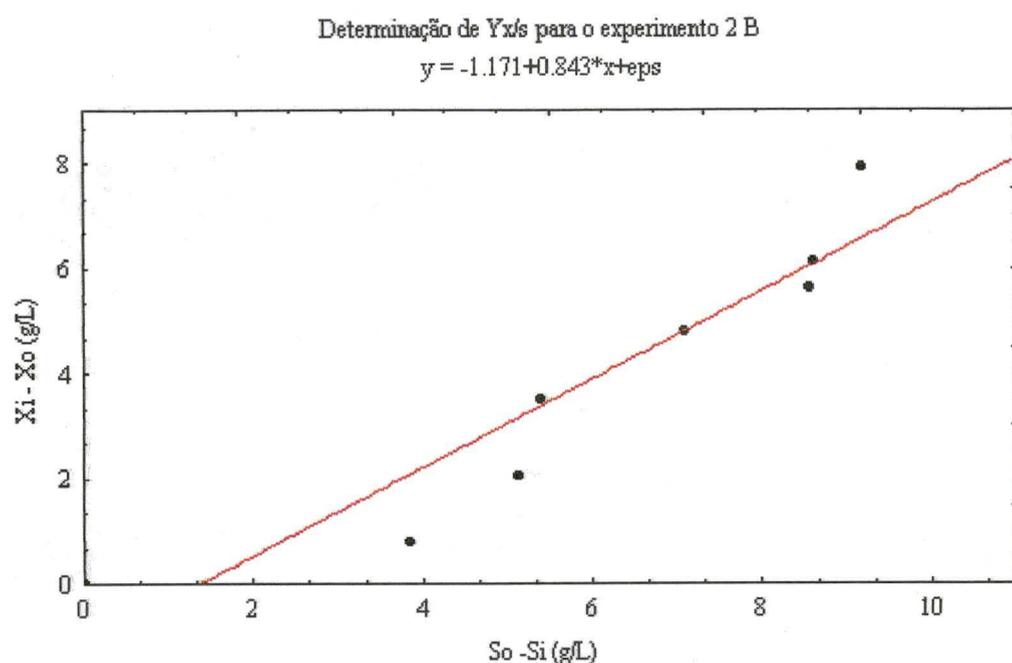
**FIGURA B.1 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 1 A**



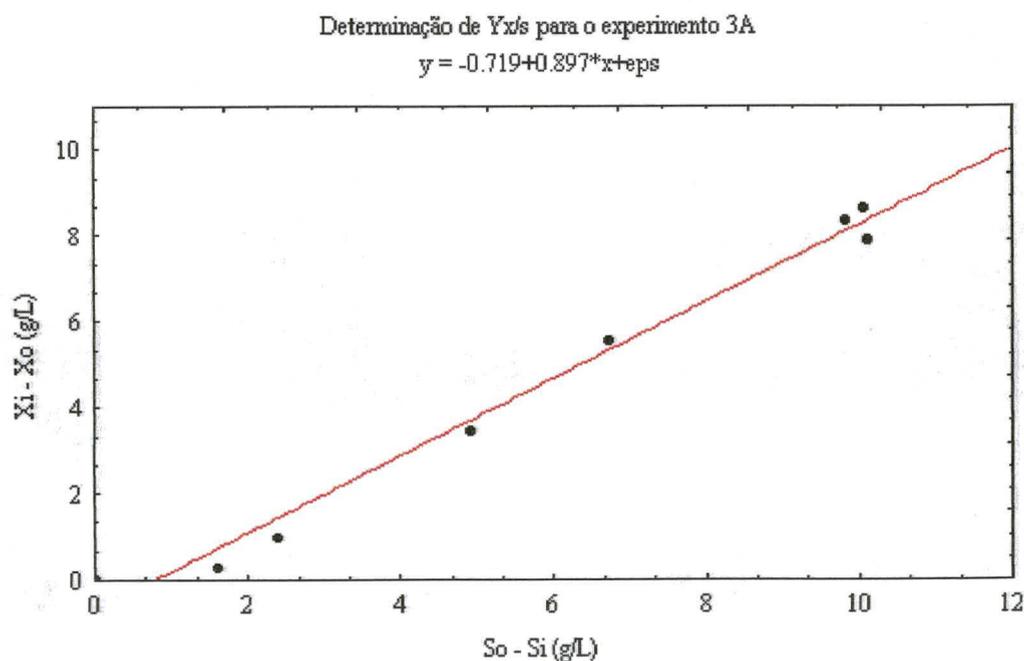
**FIGURA B.2- Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 1 B**



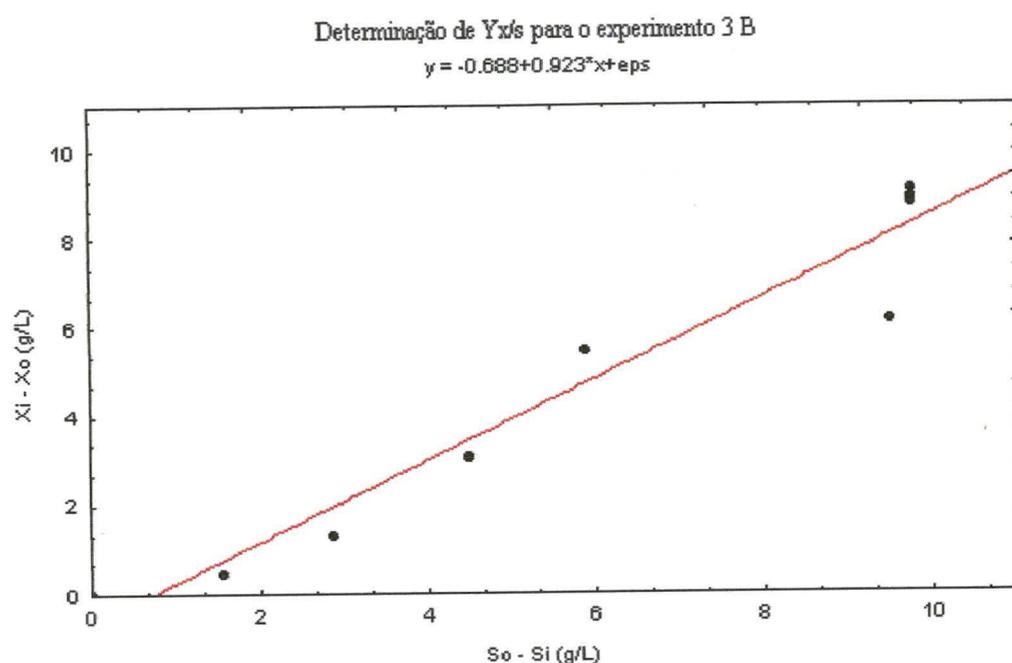
**FIGURA B.3- Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 2 A**



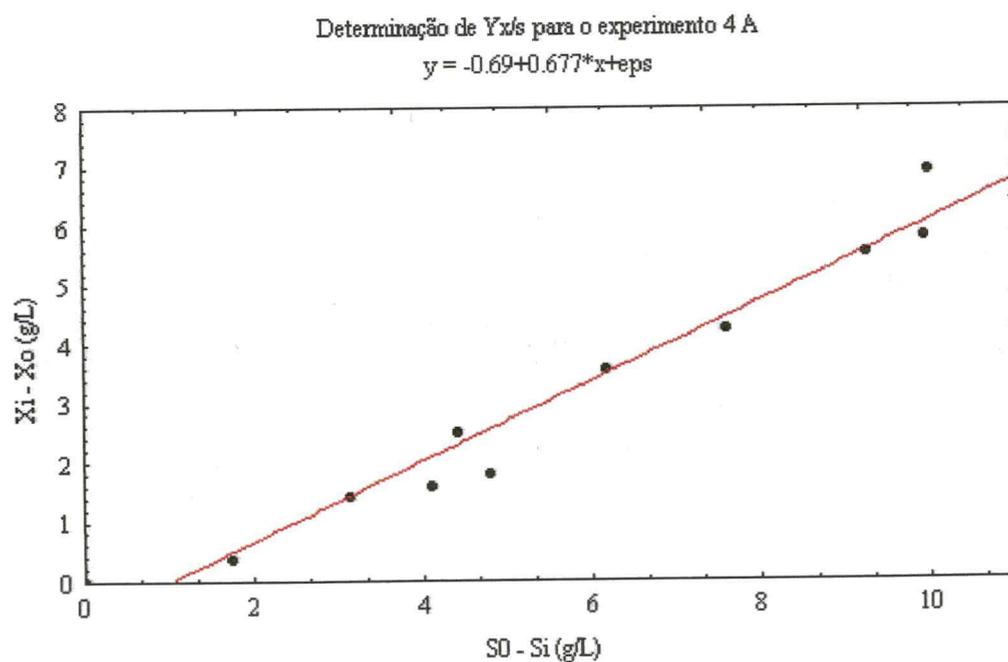
**FIGURA B.4 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 2 B**



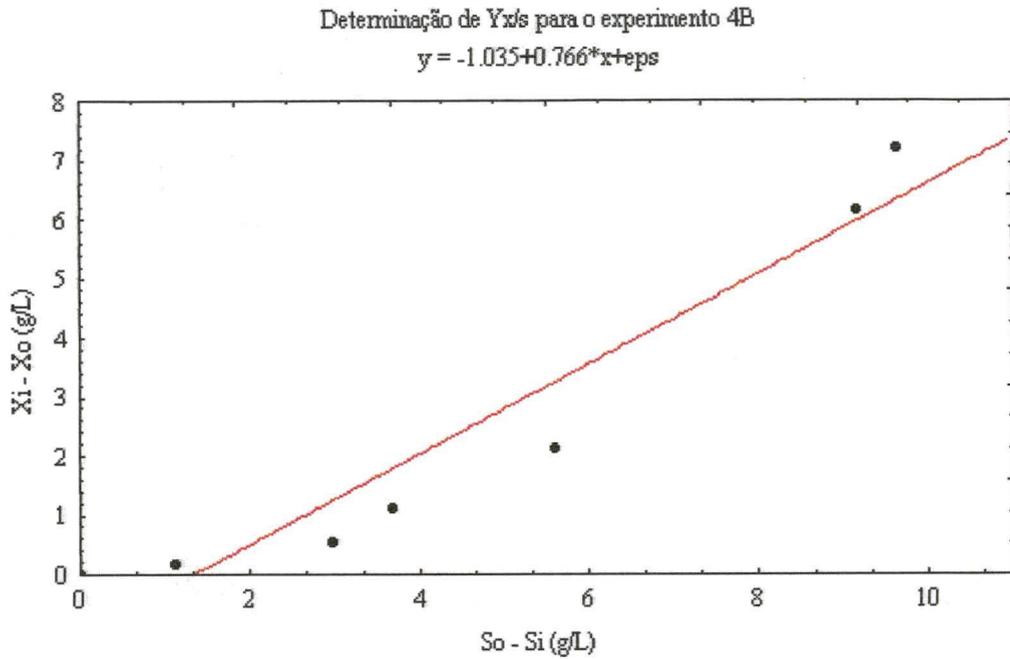
**FIGURA B.5 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 3A**



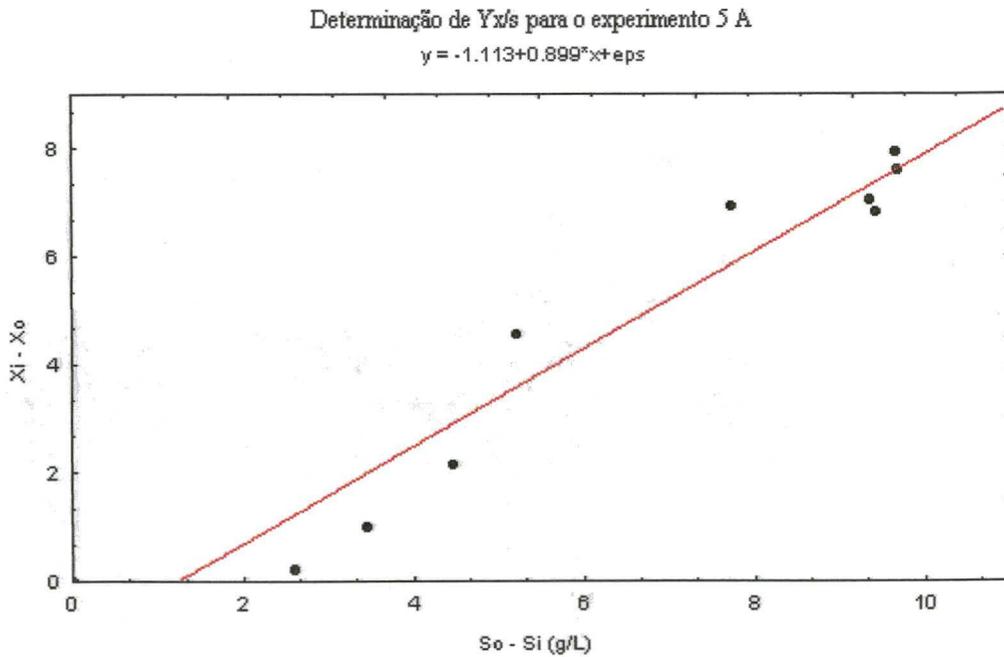
**FIGURA B.6 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 3 B**



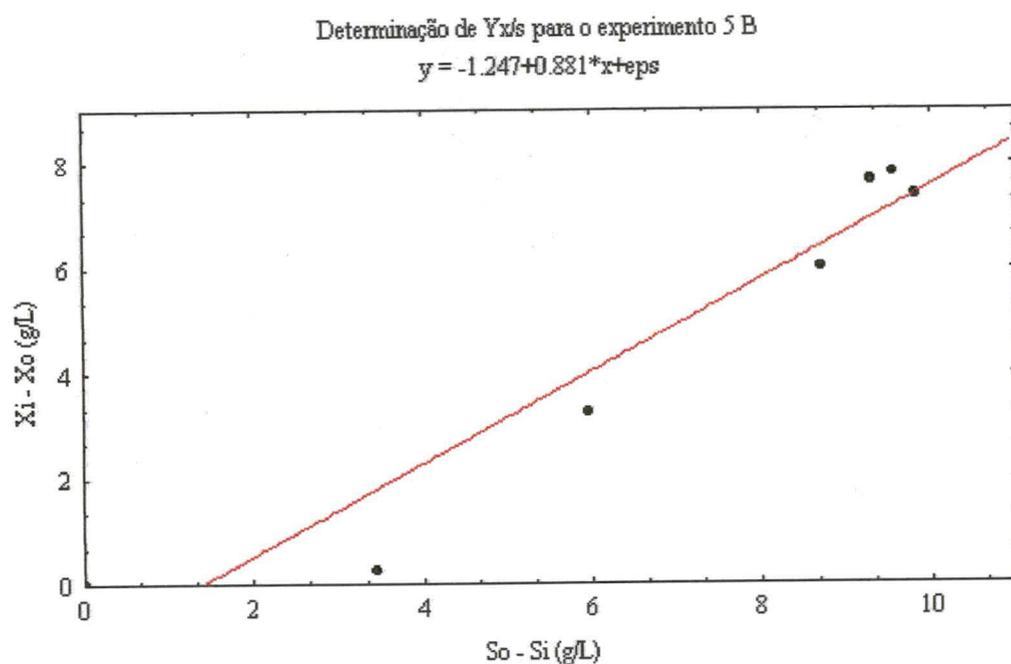
**FIGURA B.7 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 4 A**



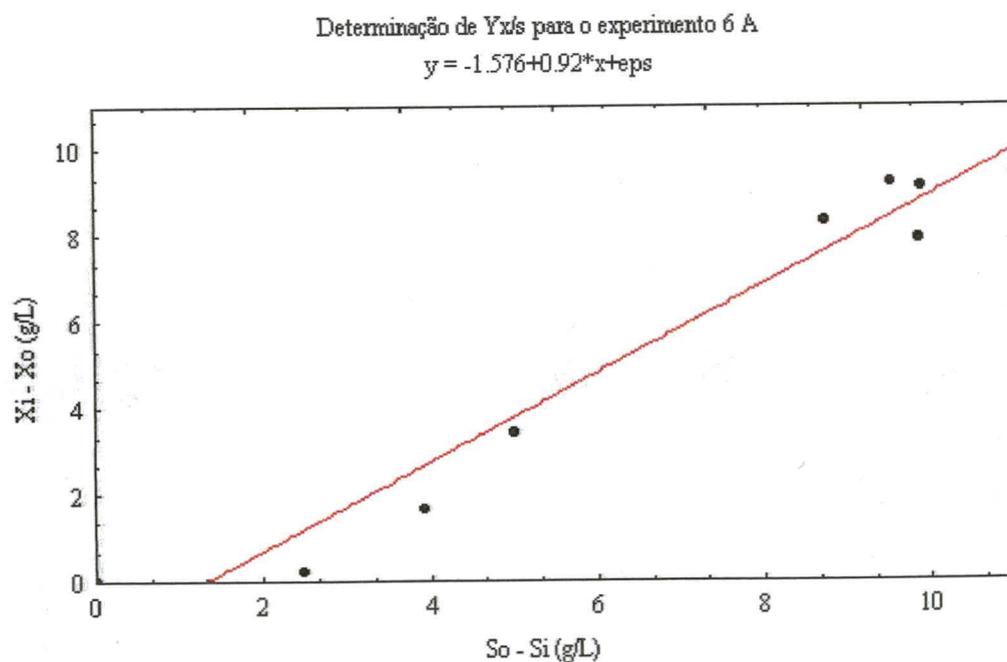
**FIGURA B.8 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 4 B**



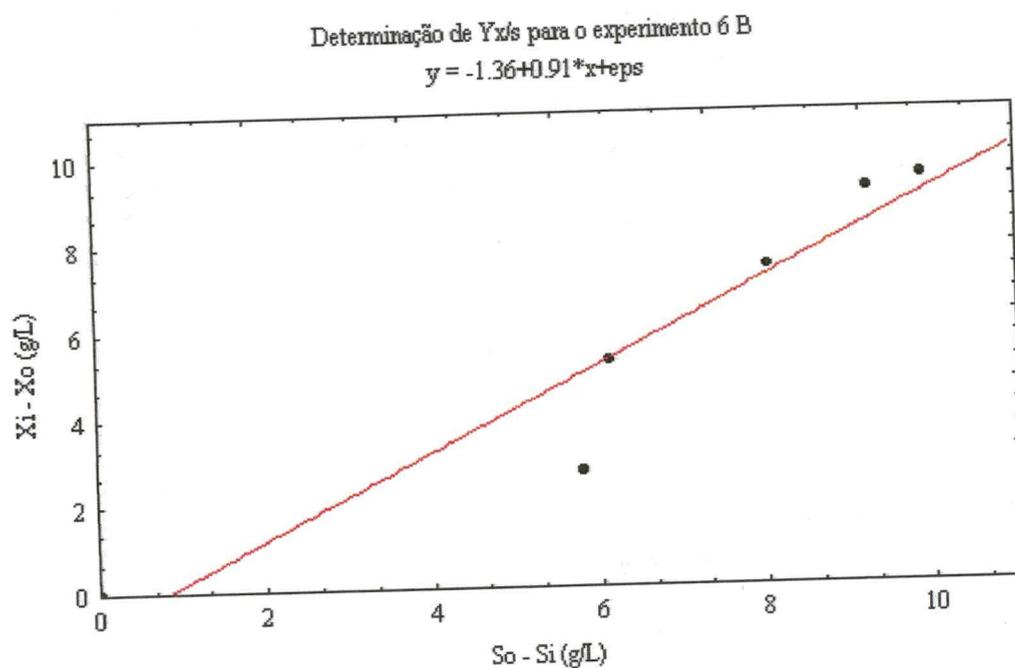
**FIGURA B.9 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 5 A**



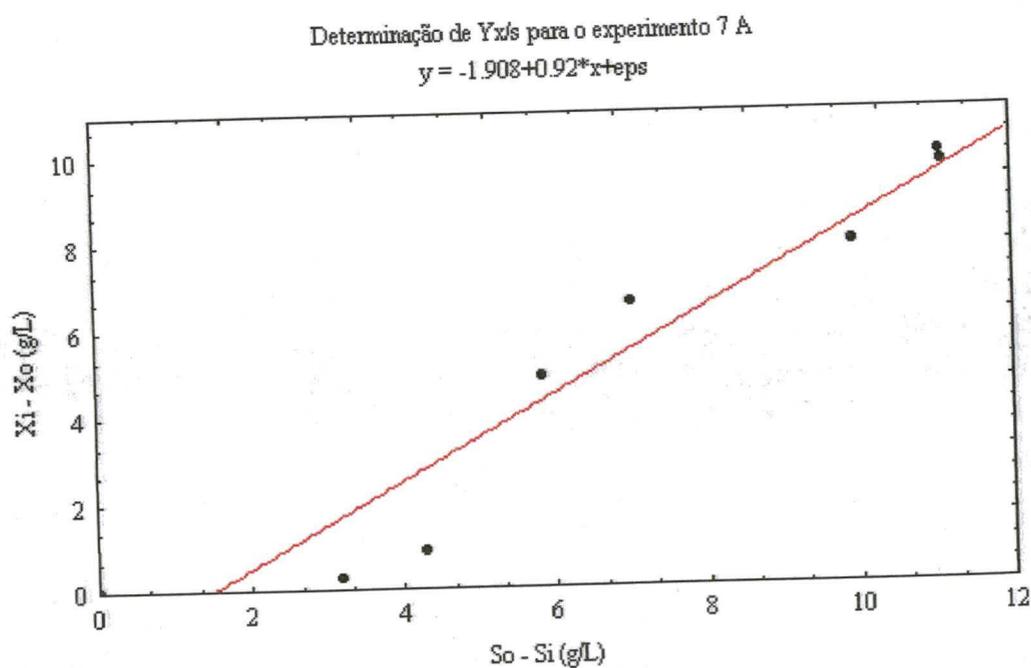
**FIGURA B.10 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 5 B**



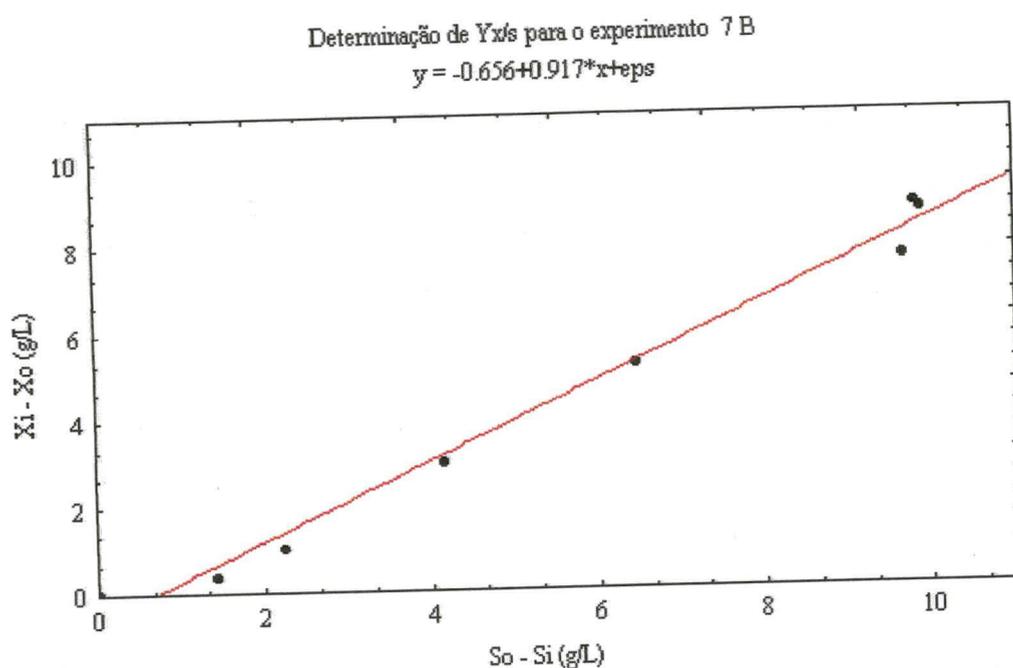
**FIGURA B.11 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 6 A**



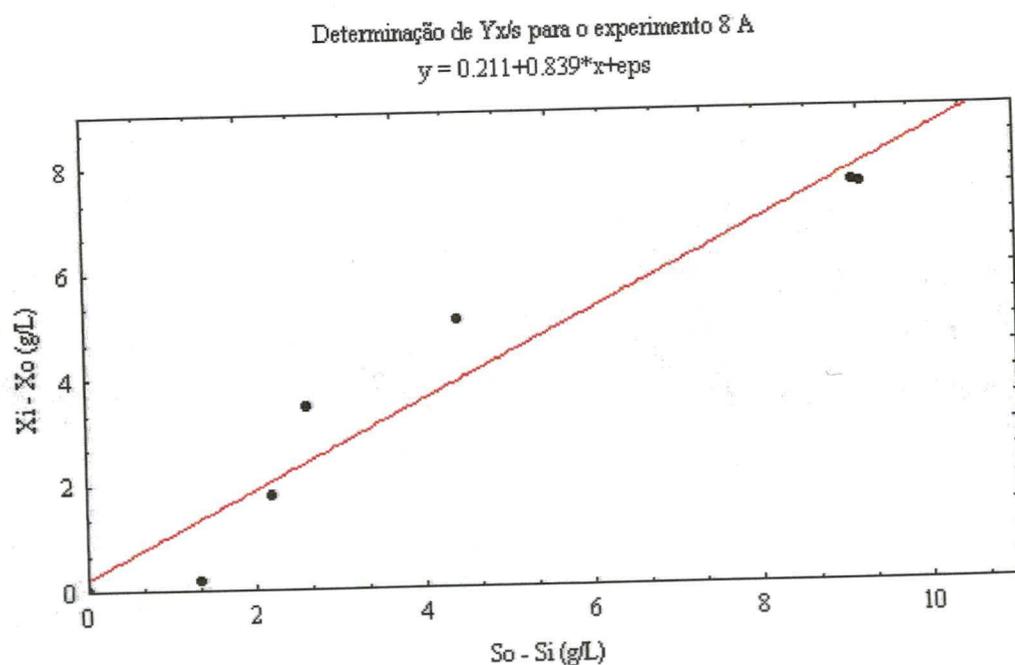
**FIGURA B.12 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 6 B**



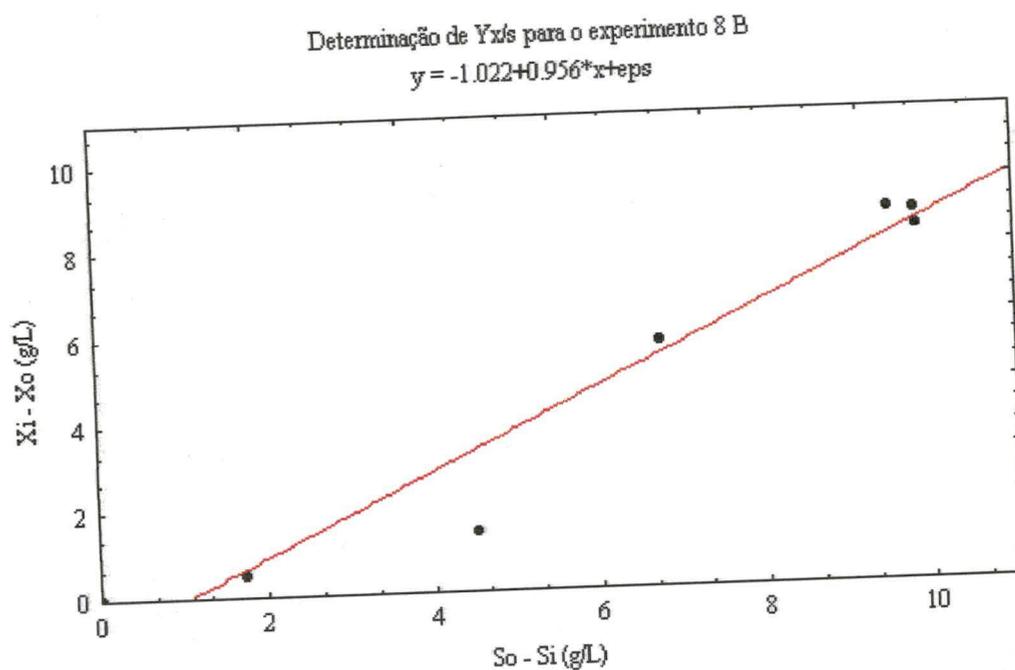
**FIGURA B.13 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 7 A**



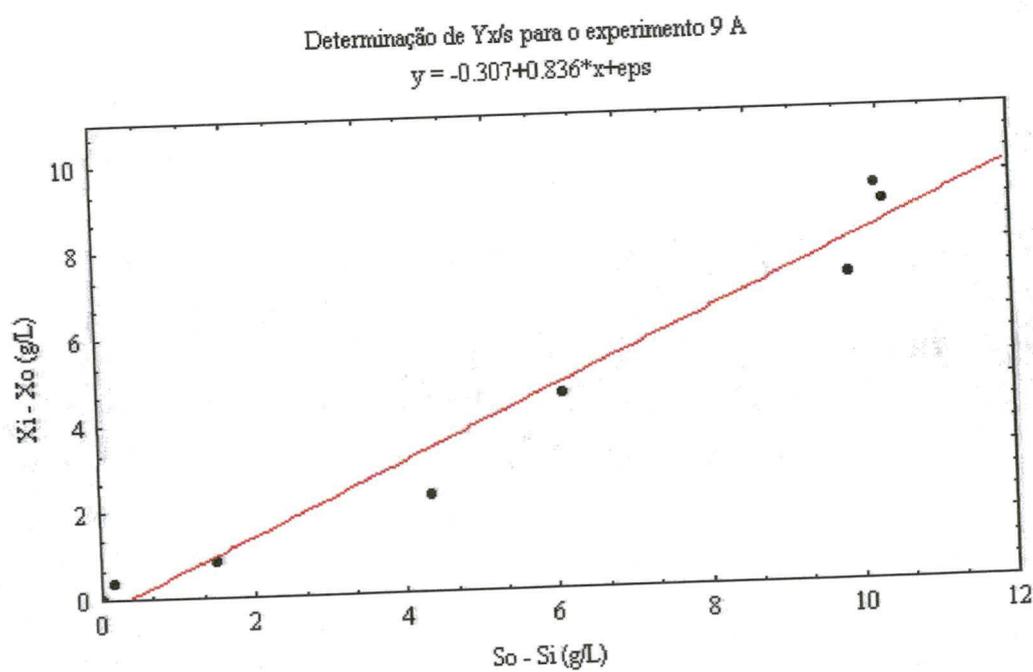
**FIGURA B.14 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 7 B**



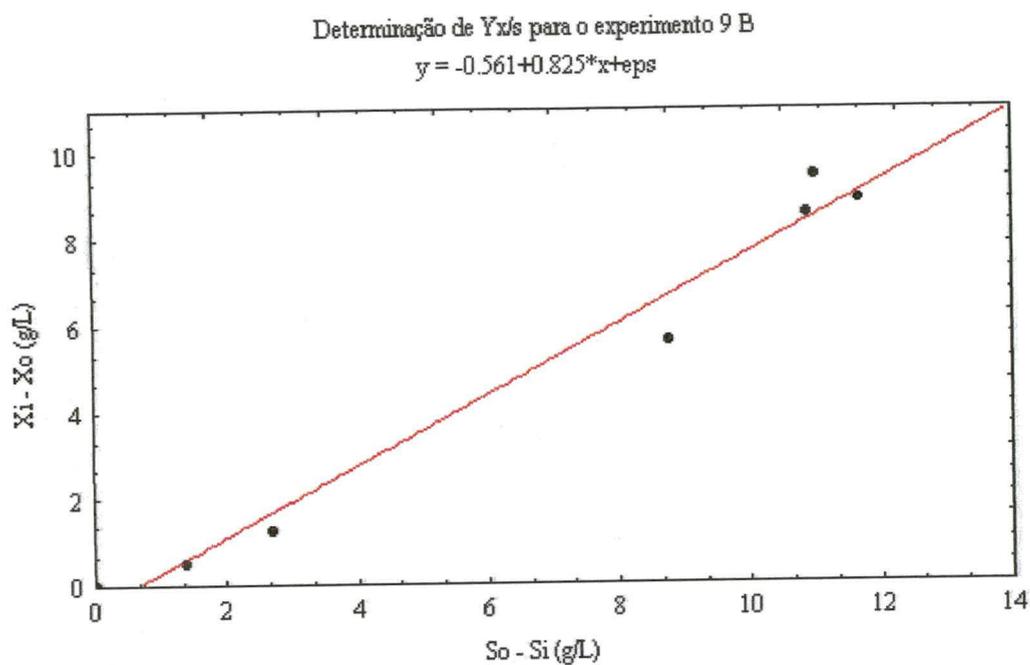
**FIGURA B.15 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 8 A**



**FIGURA B.16 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 8 B**



**FIGURA B.17 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 9 A**



**FIGURA B.18 - Determinação do fator de conversão de substrato em células para o experimento 9 B**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1995, p. 299.
- 2-BORZANI, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Edgard Blücher, 1975. v.3, p. 168-184.
- 3- BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. Productions of Microbial Biomass. In: REHM, H.-J., REED, G. **Biotechnology**. New York: VCH Publishers Inc., 1995. v.9, c.5, p. 170-216.
- 4- BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. Production on food Nd fodder yeast, **Crit. Rev. Biotechnol.** 12, 65-86, 1992.
- 5- BRASIL. Ministério da Indústria e Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília , STI/CIT, 1985. p. 364.

- 6- BRESSANI, R., ELIAS, L.G. The use of yeast in human food. In: MATELES, R.I., TANNENBAUM, S.R. **Single Cell Protein**. Cambridge: The Mit Press., 1960, p.90-121.
- 7-CHISTYAKOVA, T.I., DEDYUKHINA, E.G., EROSHIN, V.K. Influence of zinc and iron on growth and biomass composition of *Candida utilis*. **Microbiology**. v.62, n.4, p.423-427, 1994.
- 8-CLARET, C., SALMON, J.M., ROMIEU, C., BORIES, A. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. **Applied Microbioly and Biotechnology**. v.41, p. 359-365, 1994.
- 9-DIAZ, J.C., CALLIERI, D.A.S., GARRO, O. Determination of the optimal conditions for the continuous culture of *Candida utilis* in sugarcane stillage. **Applied Microbioly and Biotechnology**. v.27, p.100-104, 1987.
- 10- FIECHTER, A. Physical and chemical parameters of microbial growth, **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v.30, p.7-60, 1984.
- 11-FLORETIN, I.R.E. **Produção de biomassa proteica (*C. utilis*) à partir de resíduos agroindustriais (glicerol). Estudo da influência da concentração salina sobre o crescimento celular e produção de acetato de etila.** Universidade Federal de Santa Catarina, 1995, p.89. Tese de mestrado.

- 12-GHOUL, M. **Cinétique, Modélisation, Contrôle et conduite automatique de la fermentation de *Candida utilis***. I.N.P.L., 1985. p.255. Tese de doutorado.
- 13-GREASHAM, R. Media for Microbial Fermentations. In: REHM, H.-J., REED, G. **Biotechnology**. New York: VCH Publishers Inc., 1995. v.3, c.7, p. 127-139.
- 14-HARRISON, J.S., ROSE, A.H. **The Yeast**. 2<sup>a</sup> edição. Academic Press, 1989. v.3, p.205-259.
- 15-JONES, R.P., GREENFIELD, P.F. A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation requirements, **Process Biochem.** April, 48-60, 1984.
- 16-KLIBANSKY, M.M., OTERO, M.A., GONZÁLEZ, L.F. A new function for overall optimization of yeast production. **Biotechnology and Bioengineering**. v.25, p. 2493-2502, 1983.
- 17-LAMBRECHTS, C., BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. Utilization of phytate by some yeasts. **Biotechnol. Lett.** v.14, p. 61-66, 1992.
- 18-LAWFORD, G.R., KLIGERMEN, A., WILLIAMS, T. Production of high-quality edible protein from *Candida* yeast grown in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering**. v.21, p.1163-1174, 1979.

- 19-LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. São Paulo, Edgard Blücher , 1975. V.1, p. 246-283.
- 20-LITCHFIELD, J.H. Single cell protein. **Science**. v.219, p.740-746, 1983.
- 21-LIU, C., LIAO,C. Medium optimization for L-phenylalanine production by a tryptophan auxotroph of *Corynebacterium glutamicum*. **Biotechnology Letters**. v.16, n.8, p.801-806, 1994.
- 22-LUEDEKING, R. Fermentation process kinetics. In: BLAKEBROUGHT, N.,ed. **Biochemical and biological engineering science**. London, Academic Press, 1967. V.1.
- 23-MOSER, A. Kinetic of batch fermentations. In: REHM, H.-J., REED, G. **Biotechnology**. 1ª edição. Weinheim: VCH, 1985. v.2, p. 310-347.
- 24-NORONHA, F.P., PINTO, J.C., MONTEIRO, J.L., LOBÃO, M.W., SANT'ANA, S.G. **Um pacote computacional para estimação de parâmetros e projeto de experimentos**, 1991.
- 25-PINTO, J.C. **Planejamento de Experimentos para Tratamento de Dados e Controle de Qualidade**. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 1993. (Apostila)

- 26-PIRT, S.J. **Principles of Microbe and cell cultivation.** Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1975.
- 27-PRESCOTT, S.C., DUNN, C.G. **Industrial Microbiology.** 4<sup>a</sup> edição. Westport: Avi Publishing Company Inc. 1983, p.883.
- 28-PUNDLE, A.V., SIVARAMAN, H. Medium optimization for the production of penicillin V acylase from *Bacillus sphaericus*. **Biotechnology Letters.** v.16, n.10, p. 1041-1046, 1994.
- 29-ROELS, J.A. **Energetics and kinetics in biotechnology.** Elsevier Biomedical Press, 1983. p.330.
- 30-SARRA, M., REDIN, I., OCHIN, F., GODIA, F., CASAS, C. Application of factorial design to the optimization of medium composition in batch cultures of *Spreptomyces lividans* TK21 producing a hybrid antibiotic. **Biotechnology Letters.** v.15, n.6, p. 559-564, 1993.
- 31-SCHUGERL, K. Foam formation, foam suppression and the effect of foam on growth. **Process Biochem.** v.20, n.4, p. 122-123, 1985.

- 32-SCRIMSHAW, N.S., MURRAY, E.B. Nutritional Value and Safety of "Single Cell Protein". In: REHM, H.-J., REED, G. **Biotechnology**. New York: VCH Publishers Inc., 1995. v.9, c.6, p. 222-237.
- 33-SOLOMON, B.O., ERICKSON, L.E. Utilization of Statistics and Experimental Design in Data Collection and analysis. **Biotechnology and Bioengineering**. v.25, p.2683-2705, 1983.
- 34-SOLOMONS, G.L. **Materials and methods in fermentation**. London, Academic Press, 1969.
- 35-STRATHERN, J.N., JONES, E.W., BROACH, J.R. **Metabolism and Gene Expression**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. c.1, p.01-35.
- 36-TRÍBOLI, E.P.D.R., JURKIEWICZ, C.H., BORZANI, W. Influence of the temperature on batch cultivation of *Candida utilis* IZ-1840 on a synthetic medium containing glycerol as the main carbon source. **Biotechnology Letters**. v.16, n.4, p. 385-388, 1992.
- 37-TRÍBOLI, E.P.D.R. **Influência da temperatura no cultivo descontínuo de *Candida utilis* IZ 1840 utilizando glicerol como principal fonte de carbono**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo-EPUSP, 1992, p.126. Tese de mestrado.