



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO PARA
OTIMIZAÇÃO NA PRODUÇÃO DE LEVEDURA**
Saccharomyces cerevisiae

Isabela Nogarect da Silva Toledo de Souza

Orientador: Prof. Edson R. Nucci

Ouro Branco
Dezembro/2015

**PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO PARA OTIMIZAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisae***

Isabela Nogarect da Silva Toledo de Souza

Monografia apresentada à banca do Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del-Rei como parte dos requisitos necessários à convalidação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Bioprocessos

Orientador: Prof. Edson R. Nucci

**Ouro Branco
Dezembro/2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO PARA OTIMIZAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Isabela Nogarect da Silva Toledo de Souza

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Orientador: Prof. Edson Romano Nucci – DQBIO/CAP

Examinador 1: Profa. Alessandra Costa Vilaça – DQBIO/CAP

Examinador 2: Maria Rita Meyer – PPGEQ/CAP

Ouro Branco, __/__/__

RESUMO

Em bioprocessos um fator importante a ser computado no custo de produção e, portanto, no valor final do produto é o meio de cultura utilizado. Preferencialmente se utiliza compostos de baixo custo em concentrações ótimas. O delineamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta surgem como uma ferramenta estatística importante para alcançar modelos otimizados do processo. Experimentos em câmara rotativa shaker foram realizados, seguindo o planejamento descrito pela técnica do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Foi realizado inicialmente um planejamento $2^2 + 2$ pontos centrais (6 experimentos) para verificar os efeitos dos pontos (+1) e (-1) na produtividade em biomassa. As variáveis estudadas, em diferentes concentrações, foram: glicose e extrato de levedura. Após esta primeira análise, observou-se que os melhores resultados foram obtidos nas maiores concentrações de glicose e nas menores de extrato de levedura. Em seguida, outro planejamento completo DCCR foi realizado num total de 11 ensaios, ou seja, 2^2 experimentos + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais. Os resultados mostraram que as concentrações de glicose e extrato de levedura em torno de 9 g/L e 1,5 g/L apresentaram os melhores resultados, respectivamente. Após a obtenção do meio otimizado, experimentos em triplicatas com o meio padrão e o meio otimizado foram realizados para confirmar os resultados obtidos. As concentrações de biomassa obtidas foram $(4,0 \pm 0,2)$ g/L e $(4,4 \pm 0,3)$ g/L para o meio otimizado (encontrado neste trabalho) e padrão (encontrado na literatura), respectivamente.

Palavras-chave: otimização, biomassa, levedura, bioprocessos, planejamento experimental.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVO.....	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Aspectos biológicos da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
3.2 Aspectos metabólicos da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.2.1. Generalidades do metabolismo	9
3.2.2. Questões Metabólicas no Crescimento da Levedura.....	9
3.2.4. Respiração Celular	10
3.2.5. Glicólise – Via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).....	11
3.2.6. Efeito Diáuxico	12
3.2.7. Efeito Pasteur	13
3.2.8. Efeito Crabtree	13
3.3 Modelos cinéticos do crescimento de micro-organismos	14
3.4 Planejamento Experimental	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Micro-organismo	19
4.2 Fermentação.....	19
4.3 Planejamento Experimental	20
4.4 Experimentos em câmara rotativa shaker	22
4.5 Avaliação da massa seca.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Análise do Planejamento Experimental Preliminar	23
5.2 Análise do Planejamento Experimental.....	24
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

O termo fermentação deriva do verbo latim *fervere*, que significa ferver. Tal termo surge da aparência de efervescência devido à formação de bolhas de gás carbônico causadas pelo catabolismo aeróbio de açúcares presentes no meio de fermentação (STANBURY *et al*, 1999).

Os bioprocessos estão presentes em vários setores industriais como produção de biocombustíveis, antibióticos, alimentos, dentre outros. Como parte de um processo fermentativo, juntamente à matéria prima utilizada, geralmente há a necessidade da presença de outros compostos, formando o meio de cultura. O meio de cultura é um fator importante no valor final do produto, portanto deve-se usar preferencialmente componentes de baixo custo e a composição do meio de cultura deve estar em uma faixa ótima para evitar perdas de eficiência do processo fermentativo ou perdas de matéria prima (Borzani *et al*, 2001).

Para um processo fermentativo o crescimento de micro-organismos requer uma composição de substrato adequada para que se obtenha o máximo de produção da substância desejada. Para isso deve ser estudado o meio de cultura mais econômico para o processo levando-se em conta o custo dos materiais, manutenção de padrões de qualidade bem definidos e facilidade de aquisição (OLIVEIRA, 2006).

Com a crescente busca pela automação dos processos visando a redução de custos e tempo e ao mesmo tempo maximizar rendimento e qualidade dos produtos, a procura de modelos que descrevam o mais precisamente o crescimento dos microrganismos num biorreator é fundamental para que possam ser implementadas estratégias de controle eficazes. A monitoração pode ser entendida de forma simples como a aquisição de dados para melhora da capacidade de acompanhamento das variáveis de um dado sistema produtivo, principalmente acompanhamento das variáveis críticas do processo.

Devido a necessidade em relação a otimização de produtos e processos com o objetivo de minimizar custos e tempo e ao mesmo tempo maximizar rendimento e qualidade dos produtos, vários autores têm relatado experimentos utilizando a metodologia de superfície de resposta obtida por delineamento fatorial (Rodrigues e Iemma, 2009). Neste contexto, torna-se importante o entendimento de tal

metodologia por parte de engenheiros de processos para que esta possa ser estendida para o ambiente industrial em busca de processos cada vez mais rentáveis.

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo a aplicação de delineamentos fatoriais e metodologia da superfície de resposta para avaliação dos componentes do meio de cultura a fim de otimizar a produtividade em biomassa da *Saccharomyces cerevisiae*. Serão testadas diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura, componentes essenciais para o crescimento celular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Será apresentada na revisão bibliográfica uma síntese sobre a descrição das leveduras e seus aspectos biológicos, descrição do processo, estratégias de controle e os principais modelos cinéticos para descrever o crescimento celular.

3.1 Aspectos biológicos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Os fungos são micro-organismos eucariotos, geralmente maiores e mais complexos do que as bactérias que são organismos procariotos. A sua forma é predominantemente unicelular e sua reprodução é assexuada vegetativa por gemulação. As células de levedura apresentam normalmente uma forma oval, com tamanhos compreendidos entre 4-8 μm x 5-18 μm . Os componentes celulares compreende mais de doze microestruturas, destacando a parede celular, membrana citoplasmática, retículo endoplasmático, mitocôndrias, ribossomo, núcleo, vacúolos e inclusões diversas como glicogênio, lipídeos e pigmentos (FERREIRA, 1995).

A reprodução ocorre com a formação de um broto (também chamado de gêmula), representado na Figura 1.

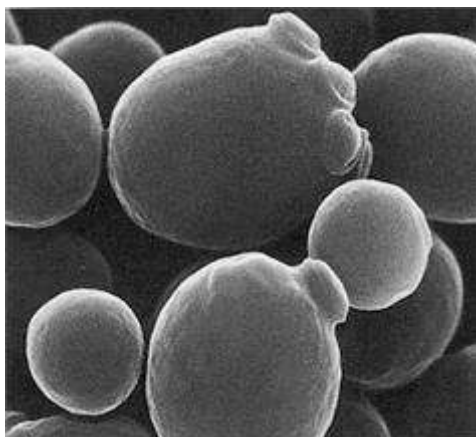


Figura 1. Reprodução assexuada de uma célula de levedura.

A célula mãe origina uma nova célula quando este broto cresce até um certo tamanho e se separa. A cada três horas aproximadamente, ocorre a duplicação de células. Tendo como origem uma única células, nesta velocidade, após três dias de reprodução, chega-se a quase 17 bilhões de células de fermento. Este tipo de reprodução é chamado de brotamento, gemulação ou cissiparidade. Porém, em situações adversas a reprodução pode acontecer de forma sexuada, através de esporulação, e ainda por fissão (POSTEN; COONEY, 1991).

As variáveis da natureza física do meio (temperatura, pH, propriedades mecânicas, atividade da água do meio reacional) influenciam de forma direta ao crescimento dos microrganismos, assim como as de natureza química do meio (nutrientes – fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio dissolvido, gás carbônico e outros). Há diferentes modos de operação que podem ser obtidos com diferentes vantagens em pesquisa e nos processos produtivos, por exemplo, a operação em batelada, batelada alimentada e cultura contínua. Através da contagem direta pelo microscópio, contagem de número de células viáveis ou pelos métodos de massa seca, turbidez, análise por imagem (e outros) podem ser feitas medidas de massa celular.

Os fungos são utilizados nas mais diferentes indústrias, indústria de panificação, farmacêutica, alimentar, cervejaria e de outras bebidas alcoólicas. Os fungos também produzem numerosos metabólitos utilizados pelas indústrias humanas: enzimas, ácidos, inseticidas e fungicidas.

3.2 Aspectos metabólicos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1. Generalidades do metabolismo

No cultivo de leveduras é necessário se conhecer suas características/propriedades, determinar seu crescimento, e também monitorar suas conversões. Um variedade de nutrientes como fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, vitaminas e sais minerais (PEREIRA JR. *et al*, 2008).

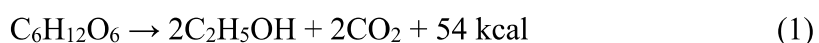
Após procedimento de inoculação, a célula desenvolve seu metabolismo, com o objetivo de produzir energia para suportar suas reações biossintéticas e de manutenção energética. As moléculas-combustíveis (carboidratos, lipídios, proteínas) utilizadas pela célula contêm elevado nível de energia química, devido ao seu alto grau de ordem estrutural, apresentando, relativamente, baixa entropia. Durante o catabolismo, essas substâncias são degradadas a moléculas menores, como dióxido de carbono, água, alcoóis, etc. Como resultado dessa transformação, a molécula-combustível sofre uma perda do seu conteúdo de energia livre (forma de energia capaz de realizar trabalho a temperatura e pressão constantes). A energia livre liberada durante as reações do catabolismo, e por isso chamadas de exoergônicas, é conservada na forma de energia química nas ligações covalentes de certos compostos, como nas moléculas de adenosina tri-fosfato, ATP (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Os processos biossintéticos (anabolismo), transporte ativo através da membrana e mobilidade celular envolvem reações endoergônicas (carentes de energia). As células têm suas necessidades atendidas através da energia produzida durante o catabolismo (PEREIRA JR. *et. al.*, 2008).

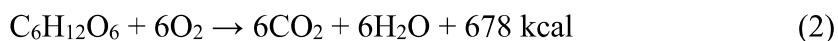
3.2.2. Questões Metabólicas no Crescimento da Levedura

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* cresce em glicose segundo três importantes vias metabólicas, podendo, contudo ocorrer outras vias dependendo das condições do meio de cultura.

Na presença de altas concentrações de glicose (ou na ausência de oxigênio) ocorre a chamada fermentação da glicose ou crescimento fermentativo com produção de etanol e dióxido de carbono. Esta etapa é relativamente pouco eficiente, apresentando um rendimento energético de aproximadamente duas moléculas de ATP (adenosina tri-fosfato) por moléculas de glicose (LIEVENSE, 1984 apud FERREIRA, 1995). A conversão glicose a etanol é descrita pela Equação (1):



A oxidação da glicose é predominante em culturas aeróbias para concentrações de baixas de glicose. É uma via energética mais eficiente que a anterior, apresentando rendimento energético de 38 moléculas de ATP por molécula de glicose oxidada. Esta via oxidativa também conhecida como crescimento respiratório, pode ser representada pela Equação (2) (LIEVENSE, 1984 apud FERREIRA, 1995):



O etanol formado pela via fermentativa é consumido por via oxidativa, como substrato, após a exaustão da glicose.

Para concentrações de glicose superiores ao valor crítico (esse valor pode variar dependendo da cepa) a via respiratória e a fermentativa podem ocorrer paralelamente, caracterizando neste caso um regime respiro-fermentativo. No interior da célula a glicose é metabolizada. Os organismos liberam e armazenam energia de moléculas orgânicas por meio de uma série de reações controladas, ao invés de ocorrer uma única liberação de energia. Para extrair energia de compostos orgânicos e armazenar na forma química, os organismos passam elétrons de um composto a outro por meio de uma série de reações de oxidação e redução (LIDÉN, 1993).

Uma sequencia de reações químicas catalisadas por enzima, ocorrendo em uma célula é chamada de via metabólica. O catabolismo dos carboidratos (especialmente a glicose), quebra da molécula orgânica para produzir energia é, portanto, de grande importância para a compreensão do metabolismo celular (TORTORA *et al.*, 2005).

3.2.4. Respiração Celular

A respiração aeróbia é uma etapa essencial no processo de degradação das moléculas orgânicas, mas quando a moléculas orgânica inicial é reduzida a produtos que praticamente não tem mais energia a liberar. A respiração aeróbia é muito mais eficiente que a fermentação em termos energéticos. Há liberação de 38 moléculas de ATP para cada molécula de glicose degradada, uma quantidade, portanto, dezenove vezes maior que a liberada na fermentação.

A respiração aeróbia é um processo muito mais complexo que a fermentação. A degradação da glicose na respiração celular ocorre em três etapas fundamentais: glicólise, ciclo de Krebs, cadeia respiratória.

Dependendo se um organismo é aeróbio ou anaeróbio, existem dois tipos de respiração. Na respiração aeróbia o aceptor final de elétrons é o oxigênio. Na respiração anaeróbia o aceptor final de elétrons é uma molécula inorgânica que não o oxigênio

molecular ou raramente uma molécula orgânica (TORTORA *et al.*, 2005; PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

3.2.5. Glicólise – Via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

A glicólise é a via de degradação mais comum entre os organismos quimioheterotróficos (PELCZAR *et al.*, 1996). Dentro da célula inicia-se o processo com a ativação da glicose, que recebe em reações sucessivas, dois fosfatos energéticos, fornecidos por duas moléculas de ATP, que se transformam em ADP. Esta oxidação da glicose é geralmente a primeira etapa no catabolismo dos carboidratos. A palavra glicólise significa quebra do açúcar e é exatamente o que ocorre. As enzimas de glicólise quebram a molécula da glicose. A glicose se transforma na molécula de frutose 1,6-difosfato que em seguida é quebrada em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato. Os gliceraldeídos 1,3-difosfato são formados pela adição de mais um fosfato, o que é viável pela sua baixa energia. Os quatro fosfatos energéticos são, em seguida, transferidos a quatro moléculas de ADP, produzindo quatro moléculas de ATP (PELCZAR *et al.*, 1996; TORTORA *et al.*, 2005).

Ao final destas reações cada gliceraldeído se transforma em ácido pirúvico. Em resumo, na etapa de glicólise, uma molécula de glicose é degradada formando duas moléculas de ácido pirúvico, com rendimento líquido energético de dois ATP's. Neste processo são liberados quatro hidrogênios, que se combinam dois a dois com o receptor de hidrogênios NAD. Ao receber hidrogênios, cada molécula de NAD se transforma em NADH₂ e a energia liberada é suficiente para a formação dos dois ATP's (PELCZAR *et al.*, 1996).

A maior parte da glicose é convertida então a piruvato em um processo de vários estágios catalisado por enzimas: a via metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) algumas vezes também chamada de via hexose difosfato ou simplesmente de glicólise (TORTORA *et al.*, 2005).

O ácido pirúvico formado ao final da glicólise pode seguir três destinos catabólicos.

➤ Ciclo de Krebs ou Ciclo do Ácido Tri-Carboxílico

O ácido pirúvico produzido na etapa de glicólise penetra no interior das mitocôndrias da *S. cerevisiae* pirúvico reage com uma molécula da substância conhecida como coenzima A originando três produtos: a hidrogênios são captados por uma molécula de NAD formando NADH cada molécula de acetil coenzima A reage

com uma molécula de ácido oxalacético, resultando em ácido cítrico e coenzima A. A coenzima A é restaurada neste passo, ou seja, ela funciona como um anexador do grupo acetil coenzima A ao ácido oxalacético, sintetizando o ácido cítrico.

Cada ácido cítrico passa por uma via metabólica cíclica denominada ciclo do Ácido Cítrico (TCA) ou ciclo de Krebs, durante o qual se transforma em outros compostos. Os oito hidrogênios liberados pelo ciclo de Krebs reagem com duas substâncias aceptoras de hidrogênio, o NAD e o FAD, que os conduzirão até a cadeia respiratória, onde fornecerão energia para a síntese de ATP. No próprio ciclo ocorre, para cada acetil que reage, a formação de uma molécula de ATP.

➤ Cadeia Respiratória

Os hidrogênios liberados na glicólise e no ciclo de Krebs são os responsáveis diretos pela obtenção de energia na cadeia respiratória. Durante a glicólise foram liberados quatro hidrogênios, formando duas moléculas de NADH_2 e na reação de cada ácido pirúvico com a coenzima A formam-se mais duas moléculas de NADH_2 .

No ciclo de Krebs, dos oito hidrogênios liberados, seis se combinam com três moléculas de NAD e formam três NADH_2 e dois se combinam com o outro aceptor, o FAD, formando uma molécula de FADH_2 . Os hidrogênios percorrem uma longa trajetória, na qual se combinam sucessivamente com diversas substâncias aceptoras intermediárias, até encontrar o aceptor final. Esse conjunto de reações tem-se o nome de cadeia respiratória. Sabe-se hoje, através de métodos bioquímicos que os hidrogênios capturados pelos aceptores se combinam com átomos de oxigênios, resultando em moléculas de água.

3.2.6. Efeito Diáuxico

Em uma cultura aeróbia conduzida na forma de batelada, quando existem duas fontes de carbono diferentes, e pode ocorrer um crescimento em duas fases, em que há o consumo de dois tipos de substratos diferentes, sendo que a célula consome preferencialmente a fonte de carbono de assimilação mais fácil. Este tipo de efeito é chamado de diauxia. Para a levedura, a glicose é inicialmente consumida com formação de etanol, biomassa, dióxido de carbono e outros subprodutos. Ao final do consumo de glicose, o etanol formado passa a ser consumido e então a biomassa e dióxido de carbonos são formados (LIDÉN, 1993).

A primeira fase é caracterizada por uma alta velocidade de crescimento e um baixo rendimento em biomassa ao passo que durante a fase de consumo de etanol a velocidade de crescimento é pequena e o rendimento em biomassa é maior. A primeira fase é denominada respiro-fermentativa (ou de oxi-redução) e o crescimento em etanol é denominado respiração (via oxidativa).

3.2.7. Efeito Pasteur

O efeito Pasteur é definido como a inibição da glicólise pela respiração, mas poderia ser definido também como um decréscimo na velocidade específica de respiração na presença de oxigênio. Pasteur, durante seus estudos, verificou uma diminuição da eficiência da fermentação na presença de ar (oxigênio). E o efeito Pasteur só faz sentido para organismos capazes de produzir etanol em condições aeróbicas (LIDÉN, 1993).

Este efeito tem relação com o crescimento anaeróbio da levedura: a fermentação é inibida pela respiração e concomitantemente a glicose é menos utilizada que na situação de crescimento anaeróbio. Pasteur descobriu que a velocidade de fermentação (e a quantidade total de glicose por ela consumida) é muito maior em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas. O rendimento em ATP da glicólise sob condições anaeróbicas é muito menor do que o obtido na oxidação completa da glicose sob condições aeróbicas. Portanto, para produzir a mesma quantidade de ATP é necessário consumir 19 vezes mais glicose em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas (LEHNINGER, *et al.*, 2002).

3.2.8. Efeito Crabtree

O efeito Crabtree é sempre colocado como explicação para as duas fases de crescimento observadas em uma cultura em batelada de *Saccharomyces cerevisiae*. O efeito Crabtree é usado no sentido de explicar a produção de etanol sob condições aeróbicas.

A diminuição da capacidade de oxidação (capacidade de respiração) provoca uma alteração no metabolismo, resultando na formação de etanol, mesmo na presença de oxigênio. Este efeito é também conhecido como efeito glicolítico apesar deste efeito repressivo ter sido observado também em meios contendo outros tipos de açúcares (CROCOMO e GUTIERREZ, 1975; LIDÉN, 1993).

3.3 Modelos cinéticos do crescimento de micro-organismos

O estudo do crescimento de micro-organismos consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Os componentes do sistema são constituídos pelos micro-organismos (biomassa), produtos de metabolismo (metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultivo (HISS, 2001).

Após o micro-organismo ser inoculado em um meio de cultura favorável ao seu desenvolvimento, sob temperatura controlada e agitação adequada, seu comportamento nos valores de concentração celular pode ser descrito conforme a Figura 2.

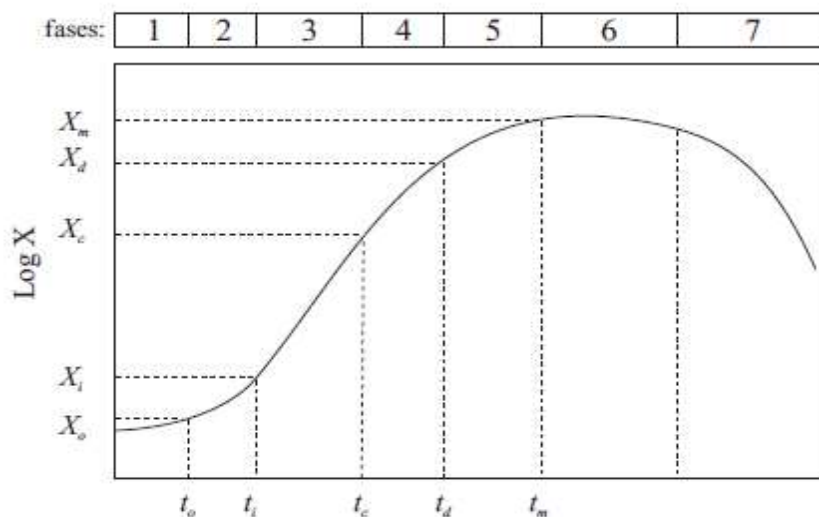


Figura 2: Curva de crescimento de micro-organismos vivos em 7 fases.
Fonte: Borzani *et al.* (1975)

Este comportamento pode ser analisado por etapas, contendo sete fases:

- Fase 1: conhecida como fase “lag” ou fase de latência, que segue imediatamente após a inoculação do meio com o micro-organismo. É um período de adaptação em que a célula não se reproduz e sintetiza as enzimas necessárias do metabolismo dos componentes presentes no meio. Sua duração depende da concentração do inóculo, da idade do micro-organismo e com o seu estado fisiológico.

- Fase 2: conhecida como fase de transição onde pode-se observar o início da reprodução microbiana. Há um aumento gradual na velocidade de reprodução e na velocidade específica de crescimento. No fim desta fase, a população inteira começa a se dividir em intervalo regular médio de tempo.

- Fase 3: conhecida como fase logarítmica ou exponencial, onde a velocidade específica de crescimento é constante e máxima. Podendo ser possível dizer que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração celular, conforme mostra a Equação (3), sendo C_x a concentração celular (g/L), t o tempo e μ a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}).

$$\frac{1}{C_x} \frac{dC_x}{dt} = \mu \quad (3)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} C_x \therefore \ln\left(\frac{C_x}{C_{x_0}}\right) = \mu_{max} \cdot t \quad (4)$$

O objetivo geral de um processo biotecnológico com crescimento microbiano é minimizar a duração da fase de latência e maximizar a velocidade de crescimento e a duração da fase exponencial. Para a produção de leveduras deseja-se obter o máximo de crescimento para uma dada população ao final do crescimento celular.

- Fase 4: apresenta velocidade de reprodução constante, conhecida como fase linear de crescimento. Contrariamente à fase exponencial a velocidade específica de crescimento não é constante na fase linear.

- Fase 5: conhecida como fase de desaceleração. Devido ao esgotamento de nutrientes do meio de cultura e também ao acúmulo de metabólitos inibidores, as velocidades de crescimento e específica diminuem até se anularem.

- Fase 6: fase estacionária onde a concentração celular assume seu valor máximo e constante.

- Fase 7: fase de declínio. A concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas (apud BAILEY; OLLIS, 1986).

Diversos fatores afetam a velocidade específica de crescimento (μ), como a concentração de substrato, temperatura, fornecimento de oxigênio, pH e outros. A Tabela 1 apresenta valores de μ para diferentes temperaturas relatadas por White (apud CHEN; CHIGER, 1985).

Tabela 1: Velocidade específica de crescimento celular a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	(h ⁻¹)
20,0	0,149
24,5	0,207
30,0	0,311
32,5	0,324
40,0	0,094

A formação de produtos da *Saccharomyces cerevisiae* está associada à fase de crescimento (metabolismo primário). São obtidos geralmente grandes rendimentos e apresentam baixo valor comercial, como etanol, ácido lático e biomassa.

3.4 Planejamento Experimental

A utilização do método de delineamento fatorial em estudos que abrangem muitas variáveis é importante, pois torna possível a realização de maneira organizada de uma quantidade mínima necessária de experimentos, economizando tempo e recursos financeiros. A vantagem de utilizar a metodologia de planejamento experimental reside no fato de tornar possível auferir informações sobre o estado metabólico do cultivo, detectar problemas e permitir ações que busquem as possíveis melhorias para o bioprocessamento em estudo.

A metodologia do delineamento fatorial juntamente com a análise de superfície de resposta é uma ferramenta estatística proposta por Box na década de 50, sendo capaz de fornecer informações seguras sobre o processo (Rodrigues e Iemma, 2009). Essa ferramenta estatística é amplamente utilizada na otimização de meios de culturas em bioprocessos.

Este tipo de metodologia representa um conjunto de ensaios estabelecido com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Esse objetivo maior pode ser dividido em outros objetivos de acordo com o propósito dos ensaios:

- Determinar quais variáveis são mais influentes nos resultados;
- Atribuir valores às variáveis influentes de modo a otimizar os resultados;
- Atribuir valores às variáveis influentes de modo a minimizar a variabilidade dos resultados;

- Atribuir valores às variáveis influentes de modo a minimizar a influência de variáveis incontroláveis;

A seguir, destacam-se alguns benefícios da utilização das técnicas estatísticas de planejamento experimental:

- ✓ Redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação;
- ✓ Estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;
- ✓ Determinação da confiabilidade dos resultados;
- ✓ Realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- ✓ Seleção das variáveis que influem num processo com número reduzido de ensaios;
- ✓ Representação do processo estudado através de expressões matemáticas;
- ✓ Elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

O planejamento experimental é uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novos processos e no aprimoramento de processos em utilização. Um planejamento adequado permite, além do aprimoramento de processos, a redução da variabilidade de resultados, a redução de tempos de análise e dos custos envolvidos. No que se refere ao projeto de produtos, o planejamento experimental permite a avaliação e comparação de configurações (projetos) distintas, avaliação do uso de materiais diversos, a escolha de parâmetros de projeto adequados a uma ampla faixa de utilização do produto e à otimização de seu desempenho. Mais detalhes sobre planejamento de experimentos podem ser encontrados em RODRIGUES e IEMMA (2005).

Os planejamentos experimentais podem ser feitos utilizando uma grande gama de delineamentos fatoriais. Wang *et al.*, 2005, utilizou em seus estudos dois desses delineamentos, o delineamento fatorial fracionado e o delineamento central composto rotacional (DCCR) para otimização de meio de cultura para produção de ácido clavulânico. O objetivo de se trabalhar com um delineamento fracionado precedendo um DCCR foi obter um menor número de experimentos, pois inicialmente o autor contava com um total de seis variáveis, e um delineamento completo, como o DCCR, ocasionaria na realização de no mínimo 2^6 experimentos. Com a utilização do delineamento fracionado, o autor testou as variáveis independentes em dois níveis, baixo (-) e alto (+), em um total de 16 experimentos e obteve como resultado que

apenas 3 variáveis apresentavam efeitos significativos. Então, essas três variáveis foram otimizadas utilizando o delineamento completo obtendo superfícies de respostas do modelo de otimização do meio de cultura (Figura 3).

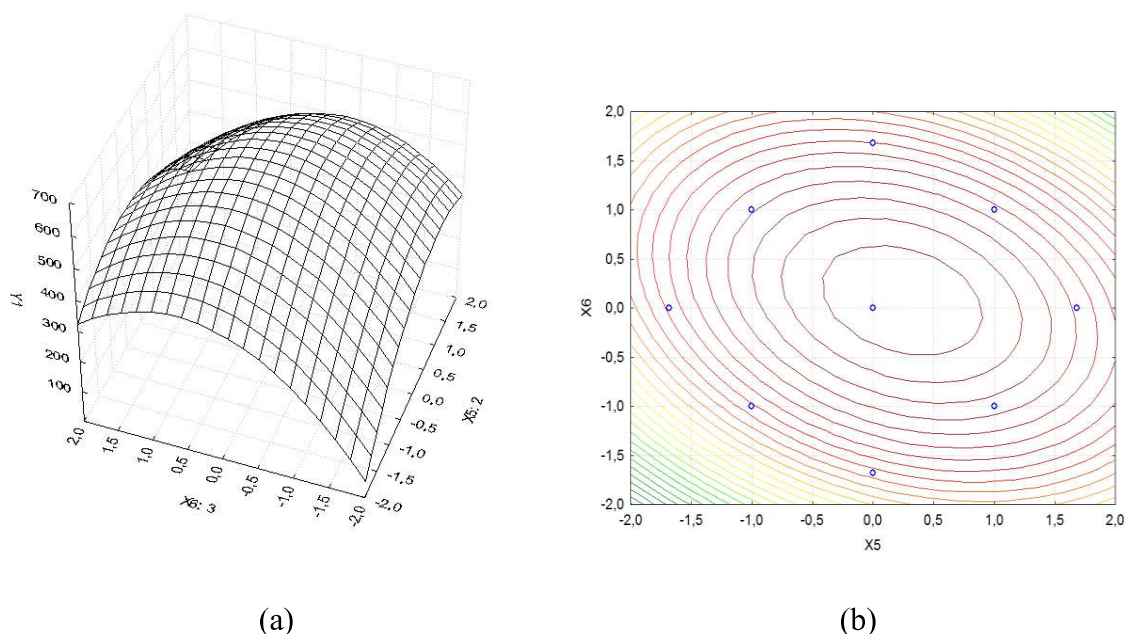


Figura 3. Superfície de resposta da otimização do meio de cultura para produção de ácido clavulânico. (Wang, *et al* 2003).

Gosh *et al*, 2010 utilizou a metodologia da superfície de resposta para otimização de parâmetros do processo para produção de hidrogênio por uma cepa geneticamente modificada de *E. coli*. Em seu trabalho, o autor utilizou um modelo denominado Box-Behnken para otimizar os parâmetros chave do processo. Neste delineamento, diferentemente do fatorial fracionado onde as variáveis independentes são testadas em dois níveis- as variáveis independentes são testadas em três níveis, os níveis baixo (-) e alto (+) e um nível intermediário ou central (0). O total de 15 experimentos foram utilizados pelo autor para a otimização dos parâmetros. A figura 4 fornece a superfície de resposta do rendimento da produção de hidrogênio em função do pH e da glicose mantendo a temperatura em 35°C.

Os experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores. Quando todas as combinações possíveis entre os níveis de cada fator estão presentes no experimento, então o delineamento fatorial é dito completo, por exemplo, o DCCR.

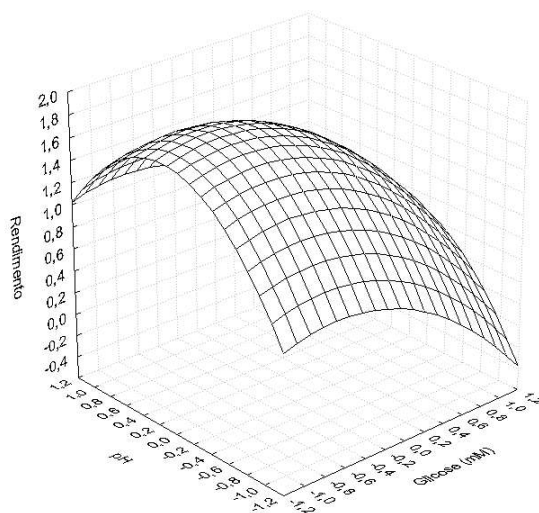


Figura 4. Produção de hidrogênio em função do pH e glicose com temperatura de 35°C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia experimental, ensaios em Shaker e meios de cultura utilizados foram seguidas de Oliveira (2006). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório Biotecnológico do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (DQBIO) da Universidade Federal de São João Del-Rei.

4.1 Micro-organismo

Para a realização deste trabalho utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comprada comercialmente da marca Fleischmann®.

4.2 Fermentação

Para a fermentação, foi utilizado um inóculo na concentração inicial de 0,5 g/L e o meio de cultura com as composições dos componentes apresentadas na Tabela 2. Os reagentes foram solubilizados em água destilada e o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Tabela 2. Composição do meio de Fermentação.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	10,0
(KH₂PO₄)	5,0
(NH₄)₂.SO₄	4,5
MgSO₄.7H₂O	0,5
Extrato de levedura	4,5

As fermentações foram feitas em dois erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura cada. Ambos os erlenmeyer foram esterilizados e deixados a temperatura ambiente para que se resfriassem. Após o resfriamento, os mesmos foram levados ao fluxo laminar, com o objetivo que não haver contaminação, e adicionou-se a levedura na concentração inicial de 0,5 g/L. A fermentação aconteceu com o auxílio da câmara rotativa shaker a uma temperatura de 30°C, com agitação de 150 rpm por um período *overnight*.

Foram preparados onze experimentos em erlenmeyer de 250 mL com volume de 25 mL seguindo as concentrações dos substratos presentes no meio de cultura (Tabela 3 e 4).

Depois que todos os nutrientes foram adicionados ao erlenmeyer, foi necessário solubilizá-los com 22,5 mL de água destilada e o meio de cultura então, foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. Os onze ensaios ficaram por um período *overnight* em cima da bancada. Após os inóculos serem retirados da câmara rotativa shaker, na câmara de fluxo laminar juntou-se os dois erlenmeyer e transferiu-se 2,5 mL do mesmo para cada frasco do planejamento experimental.

4.3 Planejamento Experimental

Foi utilizado inicialmente um planejamento experimental fatorial 2² com duplicata no ponto central a fim de avaliar os efeitos dos componentes do meio de cultura na produtividade em biomassa. O planejamento foi testado em dois níveis (-1 e +1) variando dois fatores: concentração de glicose (g/L) e extrato de levedura (g/L). Os outros três reagentes também utilizados no meio de fermentação (fosfato monopotássico (KH₂PO₄), sulfato de magnésio hepta hidratado (MgSO₄.7H₂O) e sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄)) tiveram suas massas mantidas constantes em todos os

erlenmeyer. Na tabela 3, estão representadas as condições em cada um dos 6 experimentos.

Tabela 3. Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com duplicata no ponto central para avaliação dos efeitos dos componentes na produtividade em biomassa.

Experimentos	Extrato de levedura	Glicose
1	-1 (1,5 g/L)	-1 (7,0 g/L)
2	+1 (2,5 g/L)	-1 (7,0 g/L)
3	-1 (1,5g/L)	+1 (9,0 g/L)
4	+1 (2,5 g/L)	+1 (9,0 g/L)
5	0 (2,0 g/L)	0 (8,0 g/L)
6	0 (2,0 g/L)	0 (8,0 g/L)

Depois de feita a avaliação preliminar dos componentes críticos do meio de cultura, foi utilizado o método da superfície de resposta para avaliar os resultados visando uma maior produtividade em biomassa. Esses resultados serão discutidos posteriormente.

Em seguida, foi utilizado um delineamento central composto rotacional (DCCR) com dois fatores, sendo estes, concentração de glicose (g/L) e concentração do extrato de levedura (g/L). Para tal planejamento foi utilizado 11 experimentos. Vale ressaltar que através dos resultados obtidos no planejamento preliminar, as concentrações das variáveis estudadas foram reajustadas para maiores e menores valores de concentração como pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4. Valores utilizados no DCCR para avaliação dos parâmetros da fermentação.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Glicose	7,6 g/L	8 g/L	9 g/L	10 g/L	10,4 g/L
Extrato de levedura	0,8 g/L	1,0 g/L	1,5 g/L	2,0 g/L	2,2 g/L

4.4 Experimentos em câmara rotativa shaker

Diferentes nutrientes foram testados na composição dos meios de cultivo em frascos agitados de 250 mL com volume útil de 25 mL incubados em câmara rotativa shaker a 30°C e 150 rpm durante 4 horas de cultivo. Foram feitos estudos preliminares que observaram que o micro-organismo começa a entrar na fase estacionária de crescimento depois de 4 horas de cultivo nestas condições (Oliveira, 2013).



Figura 5. Câmara rotativa shaker com os 11 erlenmeyer inoculados.

4.5 Avaliação da massa seca

Após o período de 4 horas de fermentação, foi retirado uma alíquota de 10 mL de meio fermentado de cada erlenmeyer e transferidos para tubos Falcon® de 15 mL previamente secos e tarados. Esta etapa foi realizada em duplicata. O caldo de fermentação foi centrifugado por 15 minutos a 5500 rpm. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ficou por um período *overnight* em estufa a 70°C. Após este período, pesou-se todos os tubos e através da equação foi possível calcular a massa seca.

$$Massa\ seca = \frac{tubo\ com\ massa\ seca\ (g) - tubo\ vazio\ (g)}{volume\ da\ alíquota\ (L)}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o entendimento da metodologia de planejamento experimental, segue os resultados da avaliação dos efeitos dos componentes do meio de cultura cujo objetivo foi obtenção de maior produtividade em biomassa.

5.1 Análise do Planejamento Experimental Preliminar

Os valores da biomassa obtidos em cada experimento para o planejamento fatorial preliminar encontra-se na Tabela 5, onde duas variáveis foram avaliadas: concentração de glicose (g/L) e concentração do extrato de levedura (g/L).

Tabela 5. Matriz do planejamento experimental fatorial 2^2 com duplicata no ponto central para avaliação dos efeitos dos componentes na produtividade em biomassa.

Experimentos	Extrato de levedura	Glicose	Biomassa
1	-1	-1	1,82
2	+1	-1	3,01
3	-1	+1	1,765
4	+1	+1	3,48
5	0	0	3,00
6	0	0	3,40

As Figuras 6 A-B ilustram os resultados obtidos no planejamento experimental fatorial 2^2 em duplicata no ponto central. Pode-se observar pela superfície de resposta que o extrato de levedura apresentou efeito significativo nos valores finais de biomassa, assim como a glicose. A Figura 6 B que representa a curva de contorno para biomassa quando utilizou-se a glicose e o extrato de levedura, mostrou que houve uma maior concentração celular (Cx) em concentrações de glicose em torno de 9 g/L e de extrato de levedura em torno de 2,5 g/L.

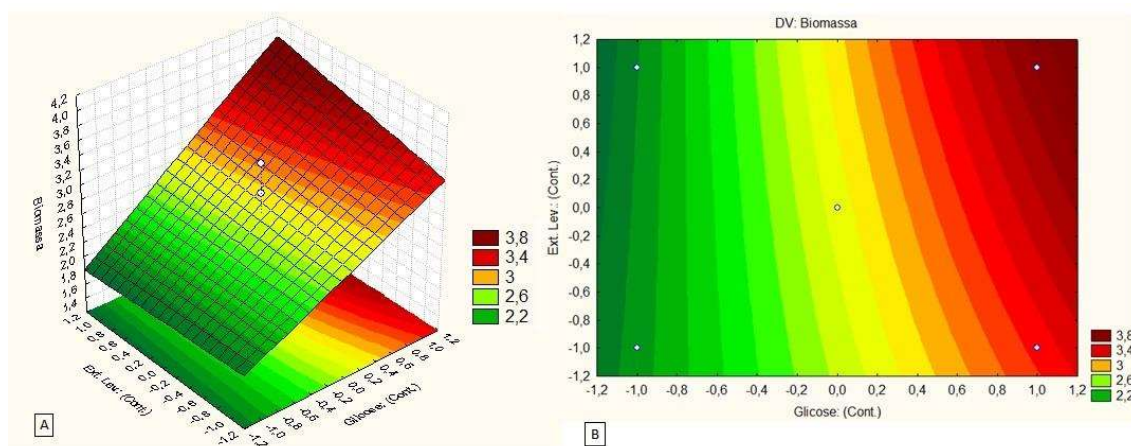


Figura 6. (A) Superfície de Resposta para biomassa utilizando Glicose x Ext. Levedura; (B) Curva de Contorno para biomassa utilizando Glicose x Ext. Levedura.

5.2 Análise do Planejamento Experimental

A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento experimental feito a partir do estudo preliminar realizado, tendo como variáveis independentes a concentração de glicose e a concentração do extrato de levedura, feito com 11 experimentos.

Tabela 6. Matriz do planejamento experimental fatorial e valores de biomassa.

Experimentos	Extrato de levedura	Glicose	Biomassa
1	-1	-1	3,18
2	-1	+1	3,005
3	+1	-1	2,67
4	+1	+1	2,875
5	-1,41	0	2,66
6	1,41	0	2,905
7	0	-1,41	2,85
8	0	1,41	3,085
9	0	0	2,895
10	0	0	3,25
11	0	0	3,08

Pode-se observar através da Tabela 6 que o maior valor de biomassa obtido foi no ponto central, em que a concentração de glicose foi em torno de 9 g/L e o extrato de levedura em torno de 1,5 g/L.

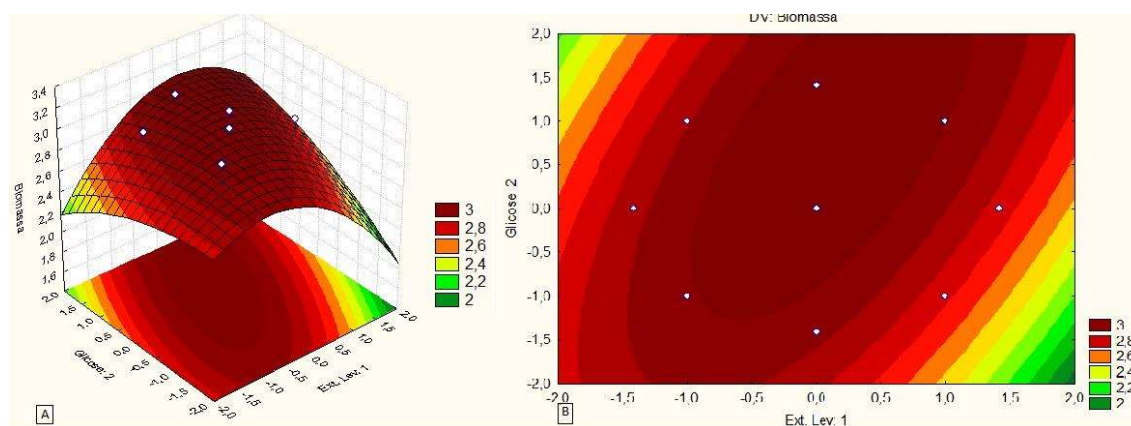


Figura 7. (A) superfície de resposta das variáveis Glicose vs Extrato de Levedura tendo com resposta a Biomassa; (B) curva de contorno Glicose vs Extrato de Levedura

As Figuras 7 A-B ilustram as superfícies de resposta obtidas a partir dos dados da Tabela 6, em que a glicose e o extrato de levedura apresentaram valores finais de biomassa mais significativos. Os melhores resultados foram encontrados quando as concentrações de glicose e extrato de levedura estavam presentes no ponto central do planejamento de experimentos. A Tabela 7 apresenta os efeitos da regressão para a resposta da Biomassa.

Tabela 7. Efeitos da regressão para a resposta da Biomassa

Fatores	Efeitos de Regressão	Erro padrão	t(5)	p	Limite Inferior	Limite Superior
Média	3,075000	0,116256	26,45023	0,000001	2,776154	3,373846
Ext.Levedura (L)	-0,073379	0,142384	-0,51536	0,628268	-0,439389	0,292630
Ext.Levedura (Q)	-0,263750	0,169471	-1,55631	0,180361	-1,44872	0,171889
Glicose (L)	0,090585	0,142384	0,63620	0,552623	0,49408	0,456595
Glicose (Q)	-0,078750	0,169471	-0,46468	0,661692	-2,04747	0,356889

A Tabela 8 apresenta a ANOVA onde os cálculos foram realizados com o auxílio do software Statistica®. Pode-se observar que os efeitos de regressão para o extrato de levedura foram negativos. Isso significa que a medida que passa do ponto (-1) para o ponto (+1) há uma perda de biomassa, não sendo interessante trabalharmos na região de maior valor. Entretanto, para a concentração de glicose, observa-se valores muito próximos a “zero”, indicando que a melhor concentração encontra-se no ponto central.

Tabela 8. Análise de variância da produtividade em biomassa (DCCR).

Fatores	SS	df	MS	F	p
Ext.Levedura (L)	0,010769	1	0,010769	0,265599	0,628268
Ext.Levedura (Q)	0,098208	1	0,098208	2,422115	0,180361
Glicose (L)	0,016411	1	0,016411	0,404753	0,552623
Glicose (Q)	0,008755	1	0,008755	0,215929	0,661692
Erro	0,202732	5	0,040546	-	-
Total	0,364223	10	-	-	-

A partir dos dados obtidos pela ANOVA foi possível realizar através de cálculos o teste F, com o objetivo de garantir estatisticamente os dados obtidos com nível de confiança de 95%. O teste F é calculado a partir da divisão entre os quadrados médios da regressão e os quadrados médios residuais, apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Análise de variância da produtividade em biomassa (DCCR).

	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	2	0,161491	0,0807455	4,779442
Resíduo	12	0,202732	0,0168943	-
Total	10	0,364223	-	-

$F_{(2;12;0,05)}=3,74$.

De acordo com a literatura, o F tabelado para os resultados obtidos é de 3,74, já o F calculado, através dos dados obtidos neste trabalho, foi de aproximadamente 4,78. Portanto, apresentou um valor satisfatório garantindo a confiabilidade dos resultados.

A Tabela 10 apresenta as concentrações de cada componente utilizados para o meio padrão (literatura) e o meio otimizado neste trabalho e a economia obtida com os planejamentos utilizados. Deve-se ressaltar que a comparação para o meio otimizado foi a partir do melhor resultado para os 11 experimentos já citado anteriormente, sendo o experimento número 10 com ambas as concentrações no ponto central, como mostrou a Tabela 6, em que se obteve um valor final de biomassa com uma concentração de 3,25 g/L.

Tabela 10. Concentração dos componentes para o meio padrão e o meio otimizado.

Nutriente	Meio padrão(g/L)	Meio otimizado (g/L)	Redução (%)
Glicose	10,0	9,0	10
Extrato de Levedura	4,5	1,5	67
(NH₄)₂SO₄	4,5	2,5	44
KH₂PO₄	5,0	3,0	40
MgSO₄.7H₂O	0,5	0,5	-

Através do meio otimizado, experimentos em triplicata foram realizado seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente e obteve-se uma concentração celular de $(4,0 \pm 0,2)$ g/L enquanto que com o meio padrão (descrito por OLIVEIRA, 2006) obteve-se uma biomassa final de $(4,4 \pm 0,3)$ g/L. Considerando-se os desvios padrões pode-se considerar que obtiveram concentrações muito próximas, sendo possível reduzir as concentrações dos componentes nutricionais.

6. CONCLUSÃO

Pela aplicação da técnica de planejamento experimental utilizando o delineamento fatorial e as superfícies de resposta na otimização do crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae*, obteve-se como resultado após dois planejamentos sequenciais que a biomassa é maior quando as concentrações de Glicose ficam em torno de 9,0 g/L e a concentração de extrato de levedura em torno de 1,5 g/L. Portanto, mostrou-se eficiente visto que foi possível verificar a redução de cada um dos componentes comparando-se os meios padrão e otimizado.

O planejamento experimental obteve garantia dos resultados através do F calculado, aproximadamente 4,78, que foi maior que o F tabelado com 95% de confiança.

Através da validação dos resultados obtidos, onde experimentos em triplicata foram realizados com o objetivo de comparar o padrão e o meio otimizados, observou que as concentrações obtidas foram na ordem de $(4,0 \pm 0,2)$ g/L e $(4,4 \pm 0,3)$ g/L, respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R., 1996, *Biologia das células*. São Paulo: Moderna.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1986. 984 p.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONI, E. Biotecnologia Industrial, Vol. 1, 2, 3 e 4, Edgard Blücher, 2001.
- CHEN, S. L.; CHIGER, M. Production of baker's yeast. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products. Oxford: Pergamon Press, 1985, (Comprehensive Biotechnology, v. 3). cap. 20, p. 429–461.
- CROCOMO, O. J.; GUTIERREZ, L. E. Caminhos metabólicos. In: BORZANI, W.; IMA, U. de A.; AQUARONE, E. (Ed.). Engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. p. 300.
- FERREIRA, E. M. de F. C. Identificação e Controle Adaptativo de Processos Biotecnológicos. 1995. 276 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) — Faculdade de Engenharia - Universidade do Porto, Porto.
- GOSH, D.; HELLENBECK, P. C.; Response surface methodology for process parameter optimization of hydrogen yield by the metabolically engineered strain *Escherichia coli* DJT135. *Biosource Technology*, v. 101, p. 1820-1825, 2010.
- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: BORZANI, W. et al. (Ed.). *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.
- LIDÉN, G. On-Line Monitoring Techniques for the Study of Yeast Physiology. Some Studies on the Yeasts *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. 1993. 236 p. Tese (Doutorado) — Department of Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Göteborg, Denmark.
- LIEVENSE, J. C., 1984, *An investigation of the aerobic, glucose-limited growth and dynamics of Saccharomyces cerevisiae*. 384 p. Tese (Doutorado) — Purdue University, Indiana.
- OLIVEIRA, J.A. Modelagem matemática do processo de produção de leveduras de panificação-Um estudo de caso. Dissertação – UFSCar, p, 103, 2006.
- OLIVEIRA, A.R.M. Metodologia de superfície de resposta para otimização de meio de cultura. Trabalho de Conclusão de Curso, Engenharia de Bioprocessos, UFSJ, 2013.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A., 2008, *Tecnologia de Bioprocessos*, Escola de Química/UFRJ.

POSTEN, C. H.; COONEY, C. L. Growth of microorganisms. In: REHNM, H. J. et al. (Ed.).2. ed. Weinheim: VCH Verlag, 1991, (Biotechnology - A Multi-Volume Comprehensive Treatise, v. 1).

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2º Ed, Campinas, SP, Cáritas Editora, 2009.

STANBURY, P.F, WHITAKER, A. and HALL, S. J., Principles of Fermentation Technology, Butterworth-Heinermann, Second Edition, 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

WANG, Y. H., YANG, B., REN, J., DONG, M. L., LIANG, D., XU A. L.: Optimization of médium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biotechnology*, v. 40, p, 1161-1166, 2005.

WHITE, J. Yeast Technology. London: Chapman and Hall, 1954.