



Universidade Federal de São João Del Rei

Campus Alto Paraopeba

Engenharia de Bioprocessos

**Aplicação da metodologia de Superfície de
Resposta para otimização de meio de cultivo
para *Saccharomyces cerevisiae* em Biorreator
Coluna de Bolhas**

Waleska Stephanie da Cruz

Ouro Branco, MG

Dezembro, 2016

Waleska Stephanie da Cruz

**Aplicação da metodologia de Superfície de Resposta para
otimização de meio de cultivo para
Saccharomyces cerevisiae em Biorreator Coluna de Bolhas**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del Rei,
como requisito parcial para obtenção do Tí-
tulo de Bacharel em Engenharia de Biopro-
cessos.

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

Ouro Branco, MG

Dezembro, 2016

Resumo

A otimização das condições de cultivo tem sido amplamente explorada ultimamente com o objetivo de se obter condições ótimas tanto para o crescimento celular e microbiano quanto para a produção de substâncias de valor comercial. A *Saccharomyces cerevisiae* é um exemplo de organismo cuja otimização do meio de cultura promove uma maior produção de enzimas ou produtos de interesse, dentre eles pode-se citar: bioetanol e proteínas heterólogas de alto valor agregado. Assim, este trabalho objetivou a otimização da condição de cultivo da levedura *S. cerevisiae* através da metodologia de superfície de resposta utilizando-se um planejamento fatorial 2^2 , sendo as variáveis independentes concentração inicial de glicose (fonte de carbono) de 2; 5 e 8 g/L e de extrato de levedura (principal fonte de nitrogênio) de 1; 2,5 e 4 g/L. As variáveis resposta foram: concentração celular, em massa seca e razão da concentração final pela concentração inicial. A fim de se determinar a melhor concentração inicial de levedura fez-se dois cultivos de 6 horas cada, utilizando-se 2 e 4 g/L de *S. cerevisiae*, obtendo-se maior crescimento ao se utilizar 2 g/L de levedura. A partir da análise dos resultados, obteve-se que a concentração de glicose foi a variável estatisticamente significativa, sendo que a maior concentração celular obtida foi ao se utilizar 8 g/L de glicose e que a concentração de extrato de levedura não possuiu significado estatístico. Para o trabalho em questão obteve-se um R^2 de 0,92738.

Palavras-chaves: Otimização, *S. cerevisiae*, Superfície de Resposta, Concentração de glicose, Concentração de extrato de levedura, Concentração celular.

Abstract

The optimization of culture conditions has been widely explored recently in order to obtain optimum conditions for both cellular and microbial growth and for the production of substances of commercial value. *Saccharomyces cerevisiae* is an example of an organism whose optimization of the culture medium promotes a greater production of enzymes or products of interest, among them we can mention bioethanol and heterologous proteins of high added value. Thus, this work aimed to optimize the culture condition of *S. cerevisiae* yeast through the response surface methodology using a 2^2 factorial design, with the independent variables being the initial glucose concentration (carbon source) of 2; 5 and 8 g/L and of yeast extract (main source of nitrogen) of 1; 2,5 and 4 g/L. The response variable was cell concentration in dry weight and the ratio of final cell concentration by the initial concentration. In order to determine the best initial concentration of yeast, two experiments of 6 hours each were prepared using 2 and 4 g/L of *S. cerevisiae*, obtaining higher growth when using 2 g/L of yeast. From the analysis of the results, it was obtained that the concentration of glucose was the statistically significant variable, being that the highest cellular concentration obtained was when using 8 g/L of glucose and that the yeast extract concentration had no statistical significance. For the present work, obtained a correlation coefficient of 0,92738.

Keywords: Optimization, *S. cerevisiae*, Response Surface, Glucose Concentration, Yeast Extract Concentration, Cell Concentration.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Integração entre bom senso, conhecimento do processo e uso de ferramentas estatísticas para a definição de um planejamento adequado e eficaz.	11
Figura 2 – Superfície resposta para a relação entre as variáveis temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pressão (psi) e rendimento.	17
Figura 3 – Células de <i>S. cerevisiae</i> vistas sob microscopia eletrônica.	18
Figura 4 – Curva da cinética de crescimento para microrganismos.	20
Figura 5 – Rota metabólica da fermentação alcoólica em <i>S. cerevisiae</i>	25
Figura 6 – Esquema de um reator encamisado, tipo tanque, ressaltando os componentes do mesmo, tais como: agitador, motor, que é utilizado para movimentar o agitador, a entrada da alimentação e o trocador de calor.	27
Figura 7 – Esquema do reator airlift.	28
Figura 8 – Esquema de um reator coluna de bolhas.	29
Figura 9 – Esquema de um reator de mistura, CSTR, composto por um tanque com agitador, ressaltando os pontos de alimentação e retirada dos produtos.	30
Figura 10 – Curvas do log da concentração celular <i>versus</i> tempo de cultivo, em horas, para a cinética de crescimento da <i>S. cerevisiae</i> para as duas condições, onde no Experimento 1 utilizou-se 2 g/L de levedura e no Experimento 2, 4 g/L.	35
Figura 11 – Acompanhamento do crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> em biorreator coluna de bolhas para os 6 ensaios do planejamento experimental, em que o tempo de cultivo foi de 6 horas. Onde G é a concentração de glicose (g/L) e EL é a concentração de extrato de levedura (g/L).	36
Figura 12 – Gráfico de Pareto, obtido através do software Statistica 7.0, para as concentrações de glicose e de extrato de levedura e a interação entre elas.	38
Figura 13 – Superfície de resposta para a concentração celular da levedura <i>S. cerevisiae</i> (C_x), concentração de glicose e de extrato de levedura, em g/L, descrita pelo modelo matemático da Equação 4.1	41
Figura 14 – Gráfico de contorno para a concentração de glicose e concentração de extrato de levedura, em g/L, obtido a partir do m modelo matemático descrito pela Equação 4.1.	42
Figura 15 – Diagrama dos valores preditos pelo modelo apresentado na Equação 4.1, em que o nível superior (+) corresponde à 8 g/L de glicose e 4 g/L de extrato de levedura e o nível inferior (–) corresponde à 2 g/L de glicose e 1 g/L de extrato de levedura.	42

Lista de tabelas

Tabela 1 – Número de ensaios para alguns esquemas de planejamentos fatoriais completos.	14
Tabela 2 – Alguns valores que α pode assumir em Delineamentos Compostos Centrais.	15
Tabela 3 – Composição do meio quimicamente definido para cultivo de <i>S. cerevisiae</i> .	21
Tabela 4 – Valores dos níveis inferior (-1), superior (+1) e ponto central (0) utilizados para execução do planejamento experimental.	32
Tabela 5 – Concentrações de glicose e extrato de levedura, em g/L, utilizadas para execução do planejamento experimental.	33
Tabela 6 – Concentração de células, em g/L, para os experimentos 1 e 2, em que utilizou-se, respectivamente, 2 g/L e 4 g/L de levedura.	34
Tabela 7 – Matriz experimental para os níveis codificados das variáveis independentes "concentração de glicose" e "concentração de extrato de levedura" e valores da concentração inicial (g/L) para cada ensaio, bem como os valores obtidos para a concentração celular final após 6 horas de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em biorreator Coluna de Bolhas.	37
Tabela 8 – Estimativa dos efeitos, valores de t e p e erros-padrão.	37
Tabela 9 – Análise de variância (ANOVA) para o crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> em cultivo de 6 horas em biorreator Coluna de Bolhas.	40

Sumário

	Sumário	6
1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Objetivos	10
1.1.1	Objetivo Geral	10
1.1.2	Objetivos Específicos	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Planejamento Experimental	11
2.1.1	Planejamento com Fator Único	12
2.1.2	Planejamento Fatorial	13
2.1.2.1	Planejamento Fatorial Completo	13
2.1.2.2	Planejamento Fatorial Fracionário	14
2.1.2.2.1	Delineamento Composto Central Rotacional	15
2.1.3	Superfície de Resposta	16
2.2	Saccharomyces cerevisiae	18
2.2.1	Características	18
2.2.2	Cinética de Crescimento	19
2.2.3	Condições de Cultivo	20
2.2.3.1	Temperatura	21
2.2.3.2	pH	22
2.2.3.3	Agitação e Aeração	22
2.2.3.4	Composição do meio de cultivo	22
2.2.4	Fermentação alcoólica	23
2.2.4.1	Fatores que afetam a Fermentação alcoólica	25
2.2.4.1.1	pH	26
2.2.4.1.2	Temperatura	26
2.2.4.1.3	Concentração de etanol no meio	26
2.3	Biorreatores	27
2.3.1	Biorreatores em batelada ou descontínuos	27
2.3.1.1	Biorreator Airlift e Coluna de Bolhas	28
2.3.2	Biorreatores contínuos	29
2.3.2.1	Biorreator contínuo de tanque agitado	29
2.3.3	Biorreatores semicontínuos	30
3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	31

3.1	Microrganismo	31
3.2	Condições de cultivo	31
3.3	Cálculo da Concentração Celular	31
3.4	Determinação da concentração inicial de levedura	31
3.4.1	Preparo do meio	31
3.4.2	Monitoramento da Concentração Celular	32
3.5	Planejamento Experimental	32
3.5.1	Preparo do meio	32
3.5.2	Coleta das amostras	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Determinação da concentração inicial de levedura	34
4.2	Planejamento Experimental	35
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 Introdução

As leveduras possuem características comuns que as tornam interessantes para processos industriais, dentre tais características pode-se citar: fácil obtenção e cultivo; crescimento rápido; utilização de nutrientes nas suas formas mais simples e utilização de meios de cultivo baratos e facilmente obtidos (RIO, 2004).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada desde milhares de anos atrás na panificação e produção de bebidas alcoólicas fermentadas. Atualmente, ela tem sido empregada vastamente na produção de bioetanol. A manipulação genética de cepas de levedura permite a obtenção de cepas específicas para a produção de substâncias de alto valor comercial. Além destas aplicações, destaca-se também seu uso como organismo modelo para desenvolvimento de pesquisas laboratoriais, bem como na produção de proteínas heterólogas. Esta vasta possibilidade de aplicações demonstra a importância que este organismo leveduriforme possui, tanto para a indústria quanto para a pesquisa (LIMA et al., 2013).

Microrganismos possuem uma faixa de valores de determinadas variáveis (pH, temperatura) em que seu desenvolvimento e produção de substâncias, como proteínas, é otimizado. Diante disso, técnicas de otimização de meio de cultivo de *S. cerevisiae* utilizando a metodologia de planejamento experimental são importantes, pois geram economia e redução significativa no tempo do processo, além de melhorarem o rendimento em produto (VICENTE; DLUHÝ; TEIXEIRA, 1999).

Inúmeros estudos de otimização de condições de cultivo para favorecer o crescimento celular da levedura bem como a produção de compostos como etanol e enzimas de interesse são desenvolvidos continuamente. Arroyo-López et al. (2009), por exemplo, estudou a influência dos parâmetros temperatura, pH e concentração de açúcares no crescimento de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* por meio da análise de superfície de resposta utilizando delineamento composto central. Já Kalathenos et al. (1995) avaliou os efeitos do pH, concentração de etanol e de frutose no meio durante o crescimento de *S. cerevisiae* através da metodologia de superfície de resposta.

Proposta por Box na década de 50, a técnica de planejamento experimental e a análise de superfícies de resposta são metodologias baseadas em fundamentos estatísticos que permitem um melhor conhecimento do processo, minimizando os custos e o tempo e maximizando o rendimento (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

O uso das técnicas de Planejamento Experimental tem ganho grande visibilidade atualmente. Ao se utilizar o planejamento experimental, tem-se como resultados: redução no tempo total do processo, com consequente redução no custo; melhoria no rendimento e na qualidade do produto final; melhor concordância entre os valores obtidos e os valores

pretendidos e redução da variação do processo, uma vez que utiliza-se uma faixa aceitável e previamente conhecida de variação dos fatores. Além disso, o planejamento experimental mostra o grau de interação entre as variáveis envolvidas no processo, permite calcular o erro experimental, bem como diminui o número de experimentos a serem realizados (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Existem inúmeras técnicas de planejamento experimental disponíveis e a escolha de qual técnica utilizar depende do processo a ser monitorado. Por exemplo, quando tem-se 2 ou 3 variáveis a serem controladas e dois níveis, recomenda-se o uso do delineamento composto central rotacional (DCCR). Este método de planejamento é um dos mais populares para modelos de até segunda ordem e é utilizado para o estudo de superfícies de resposta. O delineamento composto central rotacional é constituído por três partes: axial, fatorial e pontos centrais. Uma vantagem que esta metodologia de planejamento apresenta é um menor número de experimentos a serem realizados quando comparada aos métodos de planejamento completo. Além disso, este tipo de planejamento pode ser realizado sequencialmente, ou seja, inicialmente, realiza-se um fatorial fracionário (por exemplo, 2^{4-1}) e, em seguida, após determinados os principais fatores que exercem efeito na variável resposta, pode-se realizar um DCCR para 2 ou 3 fatores (MONTGOMERY, 2013; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A metodologia de superfície de resposta é utilizada para otimização de processos através da análise gráfica. Esta metodologia consiste na obtenção de um modelo, que pode ser de primeira (modelo linear) ou de segunda ordem (modelo quadrático), e que é capaz de descrever a superfície obtida (RIBEIRO; CATEN, 2011). Esta metodologia tem sido amplamente utilizada para determinar os efeitos de variáveis no crescimento celular, como no estudo realizado por D'Amato et al. (2006), onde a influência das variáveis temperatura, concentração de glicose e de amônia no crescimento celular foi analisada.

Este trabalho apresenta uma discussão sobre as técnicas de planejamento experimental disponíveis, destacando as características e diferenças principais de cada uma delas. Apresenta, ainda, uma revisão sobre a espécie *S. cerevisiae*, destacando seu metabolismo aeróbio e anaeróbio. Uma breve revisão sobre biorreatores também é apresentada, destacando a classificação dos mesmos com base no modo de operação. Por fim, apresenta-se a metodologia utilizada e os resultados obtidos para a otimização de meio de cultivo em biorreator Coluna de Bolhas para a levedura *S. cerevisiae* ao se analisar o efeito da concentração de glicose e de extrato de levedura no crescimento deste microrganismo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Utilizar a técnica de Planejamento Experimental para otimização das condições de cultivo de *S. cerevisiae* em biorreator Coluna de Bolhas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Utilizar a metodologia de Planejamento Experimental 2^2 para determinar a influência das variáveis concentração de glicose e concentração de extrato de levedura nas variáveis resposta;
- Determinar a relação entre as variáveis concentração de glicose e concentração de extrato de levedura;
- Determinar a condição ótima de cultivo de *S. cerevisiae*, utilizando a metodologia de Superfície de Resposta.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Planejamento Experimental

O planejamento de experimentos (do Inglês, *Design of Experiments*, DOE) é uma técnica de engenharia utilizada para definir os efeitos que determinadas variáveis tem em uma resposta de interesse. No contexto industrial, é uma ferramenta de extrema importância e que tem ganho, cada vez mais, a atenção de pesquisadores, uma vez que o emprego desta ferramenta permite a obtenção de resultados mais confiáveis e com custo reduzido. Vale ressaltar que, o bom senso do experimentador, a experiência e o conhecimento técnico do processo a ser desenvolvido, combinado à técnica de planejamento, são determinantes para a obtenção de resultados com base estatística significativa (TAHARA, 2008). A Figura 1 mostra, esquematicamente, a integração entre as três condições necessárias para que o uso da metodologia de planejamento experimental seja feita de maneira eficaz (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

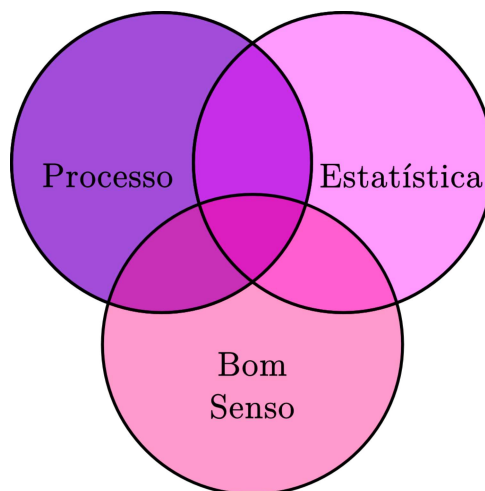


Figura 1 – Integração entre bom senso, conhecimento do processo e uso de ferramentas estatísticas para a definição de um planejamento adequado e eficaz. Fonte: Adaptado de Rodrigues e Iemma (2009).

É importante que o executor do planejamento tenha conhecimento técnico do processo. Isto porque para a execução do planejamento experimental faz-se testes em que variáveis de entrada, também chamadas de fatores, são modificadas dentro de uma faixa aceitável. Após a obtenção da resposta, pode-se relacionar qual a influência da variação de determinado fator na resposta de interesse (TAHARA, 2008).

Ao se realizar um planejamento experimental, deve-se, inicialmente, determinar os fatores e as respostas de interesse que serão analisados, bem como a faixa de variação dos mesmos. Estes fatores, por sua vez, podem ser quantitativos, como temperatura, pH,

concentração e pressão, ou qualitativos, como tipo de equipamento, tipo de catalisador e operador que está realizando o experimento (CALADO; MONTGOMERY, 2003; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Em seguida, deve-se determinar os objetivos que se deseja alcançar, para que o planejamento que mais se enquadra nas necessidades possa ser escolhido (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A metodologia de planejamento experimental possui três princípios básicos, que são: replicação, aleatoriedade e blocagem. O primeiro consiste em, durante a realização do experimento, se realizar réplicas. A realização de experimentos com réplicas é importante para a determinação do erro experimental. A aleatoriedade é importante para o desenvolvimento de métodos estatísticos, uma vez que, a partir deste princípio, pode-se determinar todas as relações de maneira equilibrada dos fatores que não foram considerados. Como por exemplo, ao se estudar o efeito de determinadas variáveis no acabamento de uma peça, fatores como temperatura ambiente e lote de matéria-prima podem não ser considerados e influenciar a variável resposta, o que influenciará a variabilidade entre os erros. O último princípio é a blocagem, que é utilizada, por exemplo, quando mais de uma pessoa realizou uma determinada medida experimental, quando o processo foi realizado em bateladas diferentes ou quando existem fatores que interferem na resposta mas que não se tem interesse de estudá-los, o que pode causar uma não homogeneidade dos dados (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

A realização das técnicas de planejamento experimental requer a execução de uma grande quantidade de cálculos, o que torna necessário o uso de ferramentas computacionais de análise estatística que facilitem o desenvolvimento desta técnica. Para isto, existem softwares que realizam todas as análises estatísticas necessárias para o desenvolvimento do planejamento experimental, podendo-se citar: *Minitab Statistical Software*, *Software Statistica e Design Expert*. Estes softwares realizam tarefas de estatística básica, como testes de hipóteses e intervalos de confiança; fazem cálculos de regressão linear e análise de variância, gráficos de superfície de resposta, planejamento fatorial, dentre outros (TAHARA, 2008).

De acordo com o número de fatores a serem analisados, o planejamento de experimentos pode ser classificado como: planejamento com um único fator ou de fator simples e planejamento fatorial ou de múltiplos fatores (WANG; WAN, 2009).

2.1.1 Planejamento com Fator Único

Neste método de planejamento experimental, os fatores são variados um de cada vez e os demais permanecem constantes. Como por exemplo, tem-se três fatores a serem considerados no experimento: pH, temperatura e concentração de açúcar e a variável resposta é concentração celular. No planejamento com um fator único, ao se analisar a variável pH todas as demais ficarão fixas, ou seja, os níveis do fator pH serão variados,

enquanto os níveis dos demais fatores permanecerão constantes, e não haverá correlação de uma variável com outra. Encontrado o valor ótimo da variável pH, esta é fixada e os demais fatores são analisados. Assim, este método não determina, por exemplo, a interação dos fatores pH e concentração de açúcar, apenas determina a influência do fator pH na variável resposta (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

O planejamento com um fator único possui como vantagem a facilidade de operação e análise dos resultados, uma vez que, analisa-se apenas um fator por vez. Porém, ele não leva em consideração a relação entre os fatores, o que pode gerar respostas que não representam a condição ótima, uma vez que a interação entre as variáveis independentes pode influenciar na variável resposta. Vale ressaltar também que este é um método demorado e trabalhoso, pois é necessário um grande número de experimentos, principalmente, quando a quantidade de variáveis é grande (WANG; WAN, 2009).

2.1.2 Planejamento Fatorial

No planejamento fatorial, faz-se combinações entre os níveis de dois ou mais fatores. Lembrando que, considera-se fatores as variáveis a serem controladas e níveis os possíveis valores que uma variável pode assumir. Como exemplo, tem-se que A e B são fatores e referem-se a concentração celular e pH, respectivamente, e 1 e 2 são os níveis dos fatores A e B. As combinações a seguir podem ser obtidas (RODRIGUES; IEMMA, 2009):

$$\begin{array}{cc} A_1B_1 & A_1B_2 \\ A_2B_1 & A_2B_2 \end{array}$$

Por promover a combinação de diferentes níveis, com o planejamento fatorial é possível descrever a interação entre os diferentes fatores, além de ser mais fácil de executar quando se tem grande número de variáveis de entrada, quando comparado com o planejamento de um fator único (WANG; WAN, 2009).

O planejamento fatorial pode ser dividido em duas categorias: planejamento fatorial completo e planejamento fatorial fracionário (WANG; WAN, 2009).

2.1.2.1 Planejamento Fatorial Completo

No planejamento fatorial completo, todas as combinações de níveis de cada fator são testadas. Assim, quando tem-se, K fatores, cada qual com N níveis, o planejamento fatorial completo é N^K . Ou seja, neste planejamento analisa-se uma variável sujeita a todas as combinações das demais variáveis. Algumas vezes utiliza-se modelos polinomiais para descrever a relação entre as variáveis controláveis e a variável resposta (RODRIGUES; IEMMA, 2009; CALADO; MONTGOMERY, 2003; WANG; WAN, 2009).

O planejamento fatorial completo mais utilizado é aquele que possui dois níveis, sendo escrito como 2^K , quando tem-se três níveis, escreve-se 3^K , e assim por diante (WANG;

WAN, 2009; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Planejamentos com mais de três níveis tornam-se inviáveis pelo aumento na quantidade de dados experimentais, o que se deseja evitar ao se fazer planejamentos experimentais (CALADO; MONTGOMERY, 2003; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O número de experimentos a serem realizados em um planejamento fatorial completo aumenta exponencialmente com o aumento do número de fatores, o que torna o planejamento fatorial completo inviável quando se tem mais de seis fatores para dois níveis ou mais de quatro fatores para três níveis, como pode ser observado na Tabela 1. Isto porque, este aumento no número de experimentos gera aumento do tempo gasto para a execução do processo, bem como, aumento no custo (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 1 – Número de ensaios para alguns esquemas de planejamentos fatoriais completos.

Níveis	Fatores							
	$k = 2$	$k = 3$	$k = 4$	$k = 5$	$k = 6$	$k = 7$	$\dots$	$k = K$
2	$2^2 = 4$	$2^3 = 8$	$2^4 = 16$	$2^5 = 32$	$2^6 = 64$	$2^7 = 128$	$\dots$	2^k
3	$3^2 = 9$	$3^3 = 27$	$3^4 = 81$	$3^5 = 243$	$3^6 = 729$	$3^7 = 2187$	$\dots$	3^k
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$
N	N^2	N^3	N^4	N^5	N^6	N^7	$\dots$	N^k

Fonte: Rodrigues e Iemma (2009).

2.1.2.2 Planejamento Fatorial Fracionário

Quando se tem um número de fatores muito grande, a quantidade de experimentos a serem realizados, será, também, muito alta. Como por exemplo, se o número de fatores para um dado experimento é 7, para um planejamento fatorial completo, seria necessário $2^7 = 128$ experimentos. Tais experimentos devem ser feitos em replicatas, a fim de se obter o erro experimental associado aos valores obtidos, o que tornaria o processo ainda mais demorado e mais caro. Em tais casos, em que o número de fatores é muito alto, pode-se fazer um número menor de experimentos que corresponda a uma fração do número total dos experimentos do planejamento fatorial completo (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Por exemplo, em um planejamento completo com quatro fatores, o número de ensaios a ser realizados é, sem contar com as réplicas, $2^4 = 16$ experimentos. Já no planejamento fatorial fracionário deve-se fazer apenas $2^{4-1} = 2^3 = 8$ experimentos, o que corresponde à meia-fração do planejamento fatorial completo. Os dois níveis de valores para os fatores são representados pelos sinais (+) e (-), que representam os valores máximos e mínimos, respectivamente. Quando tem-se três níveis, a representação torna-se (+), (0) e (-) (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Para planejamentos fatoriais fracionários, há uma regra que deve sempre ser seguida: *”O número de experimentos realizados deve ser, no mínimo, igual ao número de variáveis mais quatro.”* (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Um tipo de planejamento fatorial fracionário muito utilizado é o Delineamento Composto Central Rotacional (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

2.1.2.2.1 Delineamento Composto Central Rotacional

O modelo de Delineamento Composto Central (DCC) foi introduzido em 1951, por Box e Wilson. É um dos delineamentos para modelos de até segunda ordem mais utilizados atualmente e foi proposto para o estudo de superfícies de resposta. Este modelo é composto pelas partes: axial (α), central e cúbica (fatorial). O total de combinações possíveis é dado pela Equação 2.1. Como exemplo, tem-se um processo com dois fatores, A e B, a partir da equação 2.1, obtém-se que o número de tratamentos necessários será igual a nove ($2^2 + 2 \times 2 + 1 = 9$) (MENDONÇA, 2012).

$$Y = k^2 + 2k + 1 \quad (2.1)$$

Onde Y é o número de ensaios e k é o número de fatores.

Ensaio no ponto central são realizados para se estimar os efeitos quadráticos, bem como estimar o erro e viabilizar o cálculo dos resíduos. O ponto cúbico é responsável pela determinação da estimativa dos efeitos das interações. Já os pontos axiais (α), que estão a uma distância de $+\alpha$ ou $-\alpha$ da origem, contribuem para a estimativa dos termos quadráticos para o modelo de segunda ordem (MENDONÇA, 2012; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A grande possibilidade de escolha do valor de α faz com que o DCC seja uma metodologia flexível e usada em diversas regiões de interesse experimental (MENDONÇA, 2012). A tabela 2 apresenta diferentes valores que α pode assumir (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 2 – Alguns valores que α pode assumir em Delineamentos Compostos Centrais.

K	2	3	4	5	6
α	$\pm 1,4142$	$\pm 1,6818$	$\pm 2,0000$	$\pm 2,3784$	$\pm 2,8284$

Fonte: Rodrigues e Iemma (2009).

Quando α assume o valor descrito pela Equação 2.2, o Delineamento é dito Composto Central Rotacional (DCCR). Este tipo de delineamento é dito rotacional porque as variâncias da resposta dependem unicamente da distância ao ponto central. A rotacio-

nalidade proporciona variâncias idênticas para pontos que estão situados à uma mesma distância do centro, independente da direção (MENDONÇA, 2012; CONAGIN, 1982).

$$\alpha = \pm(2^k)^{1/4} \quad (2.2)$$

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é recomendado quando tem-se de dois a três fatores. Quando o número de fatores é igual a quatro, pode-se fazer primeiro um planejamento fracionário (2^{4-1}) para investigação da relação entre as variáveis independentes e a resposta e, em seguida, um DCCR com três ou dois fatores. Já para cinco variáveis seria necessária a realização de, pelo menos, 45 experimentos ($2^5 + 2 \times 5 + 3 = 45$), o que é um número significativamente alto e torna o DCCR inviável (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Na literatura é possível encontrar, ainda, outros tipos de planejamento experimental, dentre eles pode-se citar o planejamento Box-Behnken e Plackett-Burman. Maiores descrições sobre estes planejamentos podem ser encontradas em Rodrigues e Iemma (2009).

2.1.3 Superfície de Resposta

A técnica de superfície de resposta (do Inglês *Response Surface Methodology*, *RSM*) é utilizada quando objetiva-se a otimização da variável resposta (MONTGOMERY, 2013). Esta metodologia tem sido utilizada em vários processos industriais para análise de experimentos planejados. Ao se construir modelos para a resposta do processo, deseja-se determinar o ponto ótimo, por isso diz-se que a metodologia de superfície de resposta é um método de otimização (RIBEIRO; CATEN, 2011).

A superfície de resposta, normalmente, é representada graficamente. Supondo-se que em um processo há duas variáveis, temperatura ($^{\circ}\text{C}$), e pressão (psi), representadas por x_1 e x_2 , respectivamente. Estas variáveis influenciam a variável resposta rendimento, representada por η , de um processo químico. Então, tem-se que rendimento é uma função de temperatura x_1 e pressão x_2 , como pode ser visto nas Equações 2.3 e 2.4 (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

$$y = f(x_1, x_2) + \epsilon \quad (2.3)$$

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (2.4)$$

Em que ϵ corresponde ao erro.

A superfície de resposta obtida para este caso é apresentada na Figura 2, onde pode-se notar a existência de contornos, em que cada um destes contornos corresponde à uma altura na superfície de resposta (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

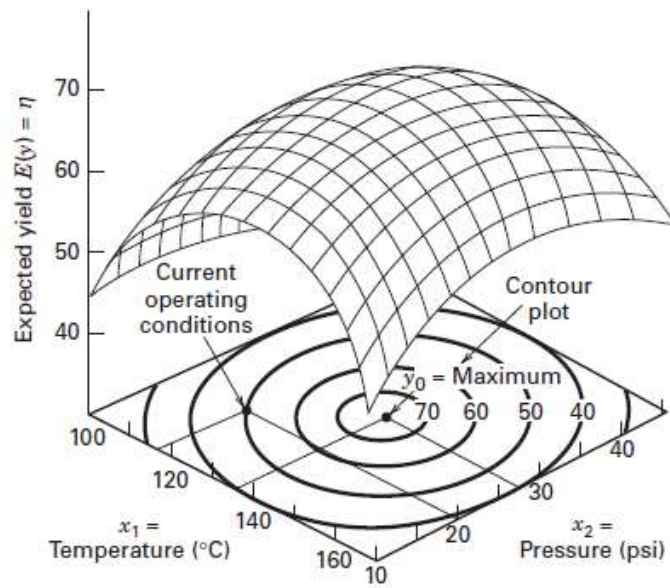


Figura 2 – Superfície resposta para o processo químico exemplo, em que os fatores são: temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pressão (psi), representadas pelas variáveis x_1 e x_2 , respectivamente, e a variável resposta é rendimento (η). Fonte: MONTGOMERY (2013).

Na maioria dos problemas de superfície de resposta, a relação entre a variável resposta e as variáveis independentes é desconhecida. Assim, a primeira coisa a se fazer é determinar a relação matemática entre tais variáveis. Se uma equação de primeira ordem se ajustar bem ao modelo, então este polinômio poderá ser utilizado. O modelo de primeira ordem é apresentado na Equação 2.5 (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2013).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n + \epsilon \quad (2.5)$$

Por outro lado, quando tem-se uma curvatura no sistema, deve-se utilizar uma equação de segunda ordem ou quadrática, expressa pela Equação 2.6 (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2013).

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \epsilon \quad (2.6)$$

Na maioria dos casos, utiliza-se um destes modelos ou ambos, visto que para regiões pequenas eles funcionam bem. Normalmente, quando se está longe do ponto ótimo e o sistema possui uma pequena curvatura, o modelo de primeira ordem se ajusta bem e é apropriado para este caso. Uma vez que a região do ponto ótimo foi encontrada, um modelo mais elaborado, como o de segunda ordem pode ser empregado a fim de se determinar o ponto ótimo. Por este motivo diz-se que a metodologia de superfície de resposta é um modelo sequencial (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2013).

Para determinação da localização do ponto ótimo, pode-se utilizar o método do gradiente ascendente ou descendente. No modelo ascendente move-se sequencialmente em direção ao máximo aumento da resposta. Já no modelo descendente, move-se em direção a minimizar a resposta (MONTGOMERY, 2013). Então, quando a região do ponto ótimo encontra-se distante, está sendo utilizado um modelo sequencial de primeira ordem. O caminho a ser seguido em direção ao ponto ótimo pode ser ascendente ou descendente e, este caminho continua até que o modelo de primeira ordem não mais se ajuste ao sistema, neste ponto, então, deve-se utilizar um modelo mais elaborado, como o de segunda ordem (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 Características

A espécie *S. cerevisiae*, pertencente ao reino Fungi, é uma levedura unicelular eucariótica mesofílica, ou seja, sobrevive em temperaturas entre 25 e 40° C (SILVA, 2009; SOUZA, 2009). Na Figura 3, pode-se observar células de *S. cerevisiae* vistas sob microscopia eletrônica.



Figura 3 – Células de *S. cerevisiae* vistas sob microscopia eletrônica. Fonte: VIEIRA e FERNANDES (2012).

As células de *S. cerevisiae* são elípticas e possuem aproximadamente 3 μm de diâmetro, apresentam alta velocidade de crescimento (em condições nutricionais normais, uma célula é capaz de se dividir a cada 90 minutos) e são anaeróbias facultativas, isto é, são capazes de se adaptarem tanto a condições de aerobiose, quanto de anaerobiose (SILVA, 2009). Em condições aeróbias, a fonte de carbono, normalmente glicose, é convertida em água e gás carbônico, ou seja, transformada em biomassa. Já em condições anaeróbias, a

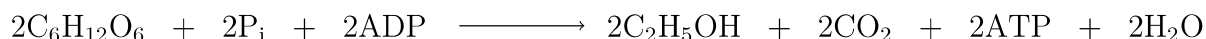
fonte de carbono é convertida em gás carbônico e etanol, através da fermentação alcoólica (LIMA et al., 2013).

A levedura *S. cerevisiae* é considerada um microrganismo modelo metabólico, molecular e genético para eucariotos, assim como a *Escherichia coli* é considerada para procariotos. Isto porque estas leveduras são de fácil manipulação, são consideradas seguras e o conhecimento do seu genoma, que já foi completamente sequenciado, faz com que estes microrganismos sejam utilizados no desenvolvimento de novos processos, sendo cultivados em escala industrial (MIGUEL, 2006).

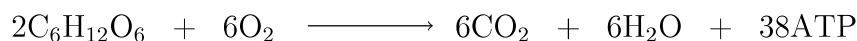
Esses microrganismos têm gerado, atualmente, alto interesse comercial no que diz respeito à produção de bioetanol, principalmente porque são capazes de sobreviver em ambientes que contenham alta concentração deste composto, característica esta que é dificilmente observada em outros microrganismos. Esta espécie pode ainda ser utilizada na indústria de alimentos, como na panificação e produção de bebidas, como vinho, cerveja e cachaça e na indústria farmacêutica para produção de vacinas e proteínas (ALBUQUERQUE, 2007).

A fim de obterem energia, as leveduras utilizam tanto o processo fermentativo, que se dá em anaerobiose, quanto a respiração, que acontece em condições de aerobiose. A energia obtida está na forma de ATP, adenosina trifosfato, que ao perder um grupo fosfato se transforma em ADP, este, por sua vez, pode ser re-fosforilado. Com relação ao rendimento energético, a via respiratória é mais vantajosa para as leveduras, uma vez que nesta via se produz 19 vezes mais ATP que na via fermentativa (CRUZ, 2015). De acordo com Souza (2009), as reações químicas que representam as vias fermentativa e respiratória podem ser vistas a seguir:

Via Fermentativa



Via Respiratória



2.2.2 Cinética de Crescimento

O crescimento de microrganismos pode ser representado pela curva de crescimento, apresentada na Figura 4, onde tem-se as fases lag, exponencial, estacionária e de morte (MACHADO, 1999).

Primeiramente, tem-se a fase lag, a qual ocorre, normalmente, após as células que se encontravam em fase estacionária terem sido transferidas para um meio novo. Esta pode ser considerada uma fase de adaptação fisiológica das células antes do seu crescimento, e pode ocorrer por diversos motivos, tais como: tempo necessário para células se recuperarem

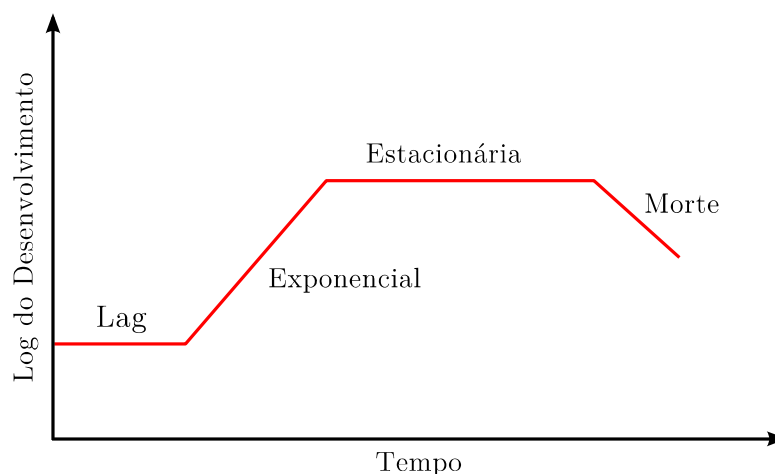


Figura 4 – Curva da cinética de crescimento para microrganismos. Fonte: Adaptado de WHITE, DRUMMOND e FUQUA (2011).

da presença de produtos tóxicos (ácidos, bases ou álcoois) e tempo necessário para síntese de enzimas e coenzimas importantes para o metabolismo. A fase lag pode ser evitada se o inóculo for transferido para um meio de cultivo novo e com mesma composição durante a fase exponencial (WHITE; DRUMMOND; FUQUA, 2011).

Após a fase lag, tem-se a fase exponencial ou log, em que ocorre a divisão e o aumento da massa celular. Ao final desta fase, mesmo após o crescimento já ter cessado, as células continuam a se dividir, porém elas se tornam menores. A velocidade de crescimento durante esta fase permanece constante (MACHADO, 1999).

Já na fase estacionária, as células param de crescer em função do esgotamento de nutrientes, baixa concentração de oxigênio ou do acúmulo de produtos tóxicos no meio. Por fim, tem-se a fase de declínio, onde acontece a morte celular devido à falta de energia celular ou ação de enzimas autodestrutivas (WHITE; DRUMMOND; FUQUA, 2011).

Segundo Shafaghat et al. (2010), a fase lag do crescimento da levedura *S. cerevisiae* (PTCC 24860) situa-se em torno do tempo de 2 horas, a fase exponencial de 2 a 14 horas, fase estacionária de 14 a 24 horas e a fase de morte acontece após 24 horas de cultivo.

2.2.3 Condições de Cultivo

Os meios de cultivo podem ser classificados em complexos ou quimicamente definidos. Os meios complexos são aqueles cuja formulação é complexa e variável. Como exemplos de meios de cultivo complexos, pode-se citar: melaço, extrato de levedura, vinhoto, farinha de soja, milhocina, etc. Estes meios são ideais para a escala industrial, por serem mais baratos. Já os meios quimicamente definidos possuem sua formulação conhecida e reproduzível, utilizando compostos puros como, por exemplo, glicose, sulfato de amônio e fosfato. Por isso, os mesmos são muito utilizados em pesquisas. Os meios quimicamente definidos possuem fontes de cada nutriente essencial para o crescimento do microrganismo, ao passo

que, os meios complexos podem requerer a adição de alguns elementos, como magnésio, fósforo ou enxofre. A Tabela 3 mostra a composição de um meio quimicamente definido utilizado para o cultivo de *S. cerevisiae* (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008).

Tabela 3 – Composição do meio quimicamente definido para cultivo de *S. cerevisiae*.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	18,0
$(NH_4)_2SO_4$	3,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,39
KH_2PO_4	0,68
$NaCl$	0,008
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,002
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,003
$CaCl_2$	0,028
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0002

Fonte: Pereira, Bon e Ferrara (2008).

Inúmeros meios de cultura podem ser utilizados para cultivar microrganismos, porém, todos devem conter os nutrientes necessários para o crescimento e propagação celular. Dentre esses nutrientes pode-se citar: fonte de carbono e nitrogênio, coenzimas e cofatores, vitaminas, fósforo, enxofre, cobalto e zinco. Além disso, fatores como pH, temperatura e agitação devem ser controlados a fim de que o metabolismo dos microrganismos seja favorecido (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008).

2.2.3.1 Temperatura

Considerando-se que a *S. cerevisiae* é uma levedura mesofílica, sua temperatura ótima de crescimento está compreendida entre 25 e 40° C (JUNIOR, 2013). Utilizando a faixa de temperatura de 25 a 35°C, Parada e Acevedo (1983) estudaram a influência da temperatura no crescimento de *S. cerevisiae* e determinaram que o crescimento ótimo foi obtido em 30°C e que, após este valor de temperatura, a taxa de crescimento decaía. Este mesmo resultado foi obtido por Win, Impoolsup e Noomhorm (1996), que estudaram as mudanças no crescimento de *S. cerevisiae* ao longo de um intervalo de temperatura de 20 a 40°C (pH 4,5) utilizando melaço e xarope de glicose como substrato e obtiveram crescimento ótimo em 30°C.

Temperaturas superiores a 40°C provocam o enfraquecimento da levedura, isto porque, em temperaturas elevadas, a fluidez da membrana aumenta, o que faz com que substâncias contaminantes sejam mais facilmente transportadas para o meio intracelular. Além disso, temperaturas elevadas favorecem o crescimento de bactérias contaminantes, que podem vir a competir com as leveduras pela fonte de carbono, diminuindo, assim, a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento da levedura. Temperaturas

inferiores a 25°C provocam a diminuição da atividade da levedura, principalmente por meio da inativação de enzimas (SOUZA; MONTEIRO, 2012; CRUZ, 2015; JUNIOR, 2013).

2.2.3.2 pH

A faixa de pH ótima para o crescimento leveduriforme está compreendida entre 4 e 6,5, dependendo da temperatura e substrato utilizado (JAY, 2012). Variações drásticas no pH causam alterações na estrutura da membrana celular, além de alterar as cargas de proteínas envolvidas em seu metabolismo, o que causa uma mudança na estrutura das mesmas, fazendo com que estas tenham sua atividade catalítica reduzida ou até mesmo perdida (NEVES, 2003).

Win, Impoolsup e Noomhorm (1996), determinaram, também, que o pH ótimo para o crescimento de *S. cerevisiae* utilizando-se xarope de glicose e melão como substrato e em temperatura de 30°C era de 5,5.

2.2.3.3 Agitação e Aeração

A aeração consiste na injeção de gás oxigênio no reator, o que promove, a agitação do meio, bem como melhora a transferência de calor e de massa (SOUZA; MONTEIRO, 2012).

Em organismos facultativos como a *S. cerevisiae*, o oxigênio é necessário para o crescimento do microrganismo, participando, assim, da geração de energia através da cadeia respiratória, uma vez que este gás é o aceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons e, quando reduzido à água, participa da reoxidação de coenzimas envolvidas na glicólise, permitindo a estocagem de energia através de moléculas de ATP (NEVES, 2003; SOUZA; MONTEIRO, 2012).

Para que haja a oxidação de um mol de glicose são necessários seis mols de gás oxigênio, o que mostra a importância de se agitar e aerar processos fermentativos aeróbicos (NEVES, 2003). Além do mais, a agitação mantém as células em suspensão, diminuindo a sedimentação das mesmas, aumentando, assim, o contato delas com o substrato (CAMILI, 2010).

Ao estudar os efeitos que as variáveis açúcar total, nitrogênio e taxa de agitação possuem sob a produção de biomassa de *S. cerevisiae*, Ruiz, Guerra e Roses (2003) notaram que o crescimento celular aumenta com o aumento da agitação, porém taxas de agitação muito elevadas podem causar perda de viabilidade celular. Devido a agitação elevada poder causar morte celular por rompimento da membrana ou parede da célula.

2.2.3.4 Composição do meio de cultivo

Meios de cultivo, conforme citado previamente, devem possuir todos os componentes necessários para o crescimento do microrganismo. A presença de fontes de açúcar (glicose)

é importante para a formação de biomassa e síntese de carboidratos, que servirão como reserva energética para as células. O nitrogênio, assim como o carbono, pode ser proveniente de inúmeras fontes, desde os aminoácidos e amônia até fontes mais complexas, como ácidos nucleicos (MIGUEL, 2006). O fósforo somente é absorvido na forma de KH_2PO_4^- e participa da composição dos fosfolipídeos de membrana e ácidos nucleicos. Já o enxofre é o constituinte de aminoácidos e algumas vitaminas e, geralmente, está presente em meios de cultivo sob a forma de K_2SO_4^- ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os íons metálicos, como zinco e ferro, são importantes para a atividade enzimática, estando presentes, principalmente, no sítio ativo de enzimas ou atuando como cofatores (MACHADO, 1999; CRUZ, 2015).

A levedura *S. cerevisiae* utiliza a glicose preferencialmente a qualquer outra fonte de carbono. Assim, mais do que uma fonte de carbono, a glicose atua como repressor catabólico do metabolismo de crescimento celular. Isto quer dizer que, na presença deste açúcar, a síntese de enzimas responsáveis por degradar outros açúcares é inibida (NEVES, 2003; ALBUQUERQUE, 2007).

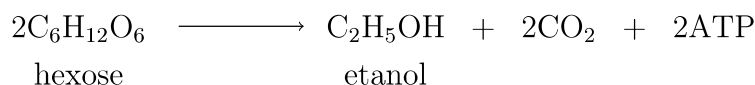
Quando a concentração de glicose no meio é baixa, ocorre o aumento de biomassa, ou seja, o crescimento é predominantemente oxidativo. Já quando a concentração de glicose no meio aumenta, o processo fermentativo passa a predominar, mesmo em condições aeróbias. Isto porque, durante a fermentação há a produção de 2 moléculas de ATP, enquanto que na respiração são produzidas 38 moléculas, assim para obter energia suficiente para seu metabolismo a levedura, durante a fermentação, precisa hidrolisar muito mais glicose que durante a respiração. Este fenômeno é chamado de *Cabtree* e ocorre pois a glicose provoca a inibição da cadeia respiratória e de enzimas envolvidas na via glicolítica, como desidrogenases, acarretando a indução de transportadores de glicose e repressão de transportadores e enzimas necessárias para o metabolismo de outros açúcares (ALBUQUERQUE, 2007; LUCERO; MORENO; LAGUNAS, 2002).

Segundo Lucero, Moreno e Lagunas (2002), a limitação ou ausência de fontes de nitrogênio no meio de cultivo causa a inativação de transportadores de açúcares. Este fato ocorre pois na ausência deste composto inúmeras proteínas são degradadas. Além disso, a presença de nitrogênio no meio de cultivo promove o aumento de meia vida da levedura. Muitas vezes, no cultivo de leveduras adiciona-se extrato de levedura, pois este composto fornece uma fonte extra de nitrogênio.

2.2.4 Fermentação alcoólica

A fermentação ocorre para que os microrganismos obtenham energia necessária para sua sobrevivência. Por meio da fermentação alcoólica, a espécie *S. cerevisiae* oxida o açúcar a fim de liberar energia necessária para a manutenção de suas atividades metabólicas, como multiplicação e crescimento (SOUZA, 2009). A reação a seguir representa a fermentação alcoólica, onde uma hexose, que pode ser glicose ou frutose, é convertida em etanol, gás

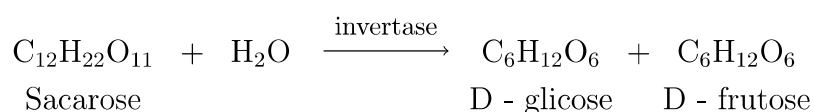
carônico e ATP (CRUZ, 2015).



Durante a fermentação alcoólica, açúcares fermentescíveis, como a glicose, são convertidos em etanol, produzindo, além deste composto, outras substâncias, como acetoína, glicerol, álcoois superiores, ácidos orgânicos, butilenoglicol e ésteres (SOUZA; MONTEIRO, 2012; VIANA, 2009).

O processo de produção de etanol se dá por duas etapas. A primeira etapa, chamada de glicólise, consiste na conversão de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato. Nesta etapa há a produção de duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH por molécula de glicose. Posteriormente, na segunda etapa, conhecida como fermentação alcoólica, o piruvato é convertido em etanol e gás carbônico pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, em que ocorre, ainda, a reoxidação das duas moléculas de NADH que foram produzidas na glicólise. Neste passo, há geração de duas moléculas de ATP. A Figura 5 ilustra, esquematicamente, a rota metabólica da fermentação alcoólica em *S. cerevisiae* a partir de uma molécula de glicose, apresentando todas as enzimas envolvidas no processo, como hexoquinases, fosfofrutoquinases e piruvato quinases (CASTANHEIRA, 2013; SOUZA, 2009; VIANA, 2009).

A maior parte da matéria-prima utilizada para a fermentação e produção de etanol é fonte de sacarose, entretanto, a fermentação alcoólica somente acontece se a fonte de carbono for um monossacarídeo, o carboidrato sacarose deve ser, então, catabolizado. O fungo leveduriforme *S. cerevisiae* sintetiza a enzima invertase, responsável por oxidar a molécula de sacarose, convertendo-a em D-glicose e D-frutose. A reação a seguir mostra a reação de inversão, onde, uma molécula de sacarose é catabolizada, formando glicose e frutose (SOUZA, 2009).



A sacarose pode ser metabolizada por meio de duas vias, a via extracelular e a via intracelular. Na via extracelular, esse carboidrato é hidrolisado no espaço periplasmático pela enzima invertase, formando glicose e frutose, conforme visto na reação de inversão. Já na via intracelular, a sacarose é primeiramente transportada para o interior das células através da membrana plasmática, onde é então metabolizada. Tal transporte se dá por meio do transporte de íons H^+ e, para que o pH intracelular seja mantido, deve haver o bombeamento de prótons para o meio extracelular. Este bombeamento é feito pelas enzimas H^+ -ATPases (BASSO, 2011).

H^+ -ATPases são as enzimas mais abundantes na membrana plasmática de fungos. Elas possuem uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de, aproximadamente,

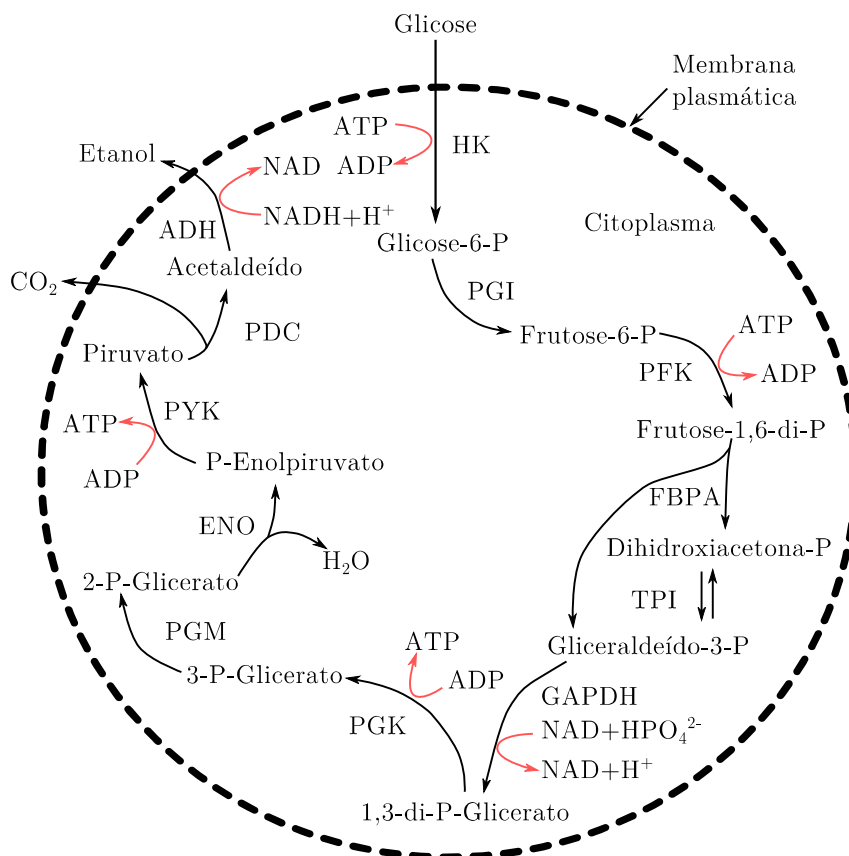


Figura 5 – Rota metabólica da fermentação alcoólica em *S. cerevisiae*, em que uma molécula de glicose é convertida em etanol e CO_2 . Abreviações: HK corresponde à enzima hexoquinase; PGI: fosfoglicoisomerase; PFK: fosfofrutoquinase; FBPA: frutose bifosfato aldolase; TPI: triose fosfato isomerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK: fosfoglicerato quinase; PGM: fosfogliceromutase; ENO: enolase; PYK: piruvato quinase; PDC: piruvato descarboxilase; ADH: álcool desidrogenase. Fonte: Adaptado de CASTANHEIRA (2013).

100 kDa e estão ancoradas na bicamada lipídica da membrana plasmática. O bombeamento de prótons H^+ para o meio extracelular é feito por meio da quebra de uma molécula de ATP, gerando a formação de um gradiente eletroquímico. Tais enzimas são responsáveis por bombear prótons H^+ para o meio extracelular por meio da quebra de uma molécula de ATP, promovendo a formação de um gradiente eletroquímico de prótons, importante para a manutenção do pH intracelular (BASSO, 2011; CASTANHEIRA, 2013).

2.2.4.1 Fatores que afetam a Fermentação alcoólica

Inúmeros fatores influenciam a fermentação alcoólica, podendo diminuir o rendimento da fermentação pela interferência na atividade biológica da levedura, bem como na sua estrutura celular. Dentre esses fatores, pode-se destacar: pH, temperatura e concentração de etanol no meio (SOUZA; MONTEIRO, 2012).

2.2.4.1.1 pH

Uma vez que a maioria dos microrganismos possuem uma faixa estreita de pH, onde seu crescimento e formação de produtos são favorecidos, a faixa de pH ótima para que a fermentação alcoólica ocorra está entre 4 e 5,5. Quando a fermentação ocorre utilizando-se a espécie *S. cerevisiae*, o pH deve estar em torno de 4,5 (SOUZA; MONTEIRO, 2012). Maiores rendimentos de etanol são obtidos em meios mais ácidos. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, em pH ácido, o aumento de biomassa da levedura é inibido, isto porque elas irão gastar mais energia para manter seu pH interno, que deve estar entre 5,8 e 6,9. A contaminação bacteriana também é inibida quando a fermentação se dá em meios mais ácidos (CRUZ, 2015; SOUZA, 2009).

2.2.4.1.2 Temperatura

A temperatura ótima para a produção de etanol utilizando-se a levedura *S. cerevisiae* é na faixa de 28 a 34° C. Durante a fermentação alcoólica, quanto maior for a temperatura, maior é a velocidade de fermentação, porém, temperaturas acima de 35° C podem causar perda de etanol por evaporação, propiciar o crescimento de bactérias contaminantes e enfraquecer as leveduras (SOUZA; MONTEIRO, 2012; CRUZ, 2015).

Temperaturas inferiores a 25° C provocam a diminuição da atividade da levedura, fazendo com que a fermentação seja mais lenta. Fermentações conduzidas em temperaturas baixas enfraquecem o surgimento de bactérias e ainda faz com que as leveduras fiquem mais resistentes ao etanol no final do processo, visto que as células são expostas a menores condições de estresse (CRUZ, 2015; JUNIOR, 2013).

2.2.4.1.3 Concentração de etanol no meio

Conforme a fermentação vai ocorrendo, o teor alcoólico do meio vai aumentando, o que pode inibir a levedura fermentativa. Normalmente, a fermentação para quando a concentração de etanol atinge a porcentagem de 11 - 12% (CAMILI, 2010). Este metabólito secundário afeta a membrana plasmática e causa a inibição de enzimas envolvidas na fermentação alcoólica, como hexoquinases e desidrogenases (NEVES, 2003).

Um dos principais alvos do etanol nas células de levedura durante a fermentação alcoólica é a membrana plasmática. Este composto interage com a região hidrofóbica da membrana, o que aumenta a polaridade da mesma e enfraquece as interações hidrofóbicas. Isso aumenta a fluidez e afeta o posicionamento das proteínas na membrana, com consequente aumento da permeabilidade a íons e outros compostos existentes no meio. Além do mais, com a perda da integridade da membrana plasmática, o gradiente de concentração através da membrana é prejudicado (VIANA, 2009).

2.3 Biorreatores

Biorreatores são equipamentos utilizados desde a década de 1940 para produção de enzimas, antibióticos e tratamento de efluentes. Nestes equipamentos ocorre uma reação química envolvendo agentes biológicos, como bactérias e leveduras, células animais e vegetais ou enzimas. Eles podem ser classificados de acordo com o modo de operação em: sistema em batelada, contínuo e semicontínuo (SILVEIRA, 2006; FÁBREGA, 2012). A Figura 6 mostra a configuração de um reator, com seus principais componentes: agitador, motor, sensores e trocadores de calor.

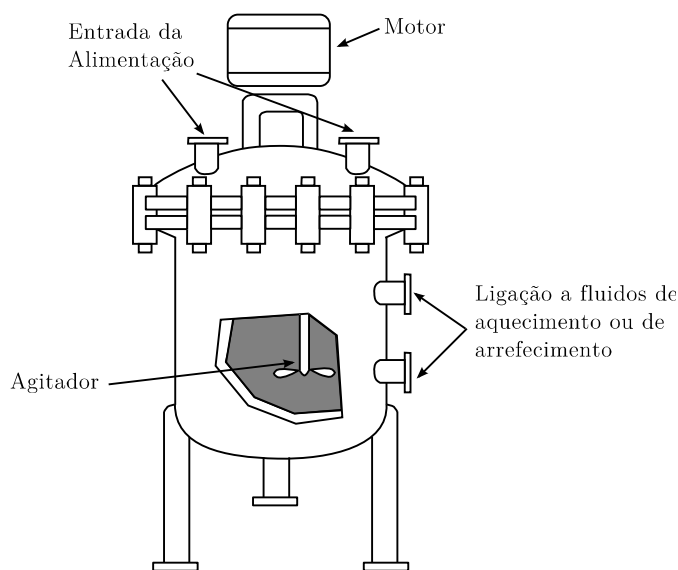


Figura 6 – Esquema de um reator encamisado, tipo tanque, ressaltando os componentes do mesmo, tais como: agitador, motor, que é utilizado para movimentar o agitador, a entrada da alimentação e o trocador de calor. Fonte: Adaptado de GONÇALVES (2014).

2.3.1 Biorreatores em batelada ou descontínuos

Também conhecidos como *Batch Reactor*, os reatores tipo tanque com agitadores, onde não possuem retirada de produtos e nem entrada de reagentes enquanto a reação está acontecendo, ou seja, os reagentes são inseridos no reator de uma só vez, onde a reação irá ocorrer e, ao final do processo, os produtos são retirados, também de uma só vez. Neste tipo de biorreator, há variação da concentração e da temperatura com o tempo, porém não com a posição. Reatores em batelada são utilizados, principalmente, para operações em pequena escala ou para testes experimentais e para desenvolvimento de novos produtos ou processos. O uso deste reator em larga escala torna-se inviável pelo gasto de tempo com processos de limpeza e esvaziamento do reator ao final de cada batelada (GONÇALVES, 2014). Reatores que podem ser usados na fermentação em batelada são os reatores do tipo Airlift e Coluna de bolhas (MULLER et al., 2007).

2.3.1.1 Biorreator Airlift e Coluna de Bolhas

Os biorreatores Airlift (ARL) e Coluna de Bolhas são reatores pneumáticos, ou seja, a agitação é feita por meio da aeração. Os biorreatores Airlift são compostos por duas zonas, chamadas de *riser* e *downcomer*, sendo que em uma delas há dispersão de gás. Como demonstrado na Figura 7, a movimentação do fluido neste tipo de biorreator se dá pela diferença de densidade causada pela injeção de ar na zona *riser* quando comparada com a densidade da zona *downcomer* (KOCHEM, 2010).

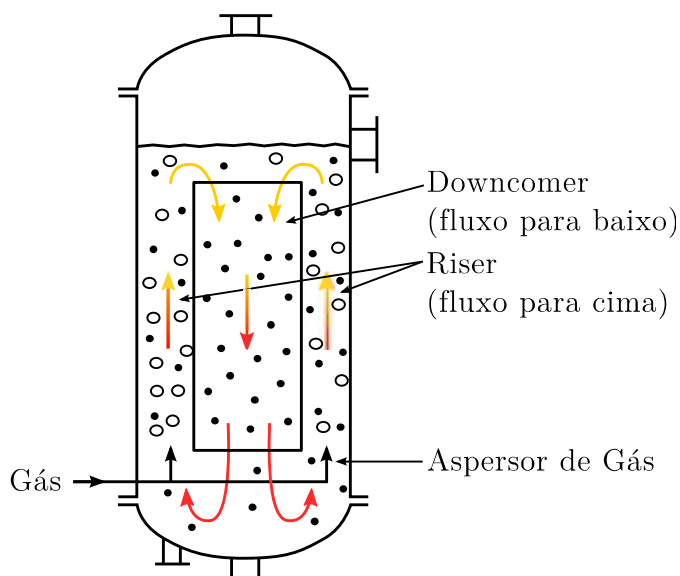


Figura 7 – Esquema de um reator airlift. Fonte: Adaptado de CHISTI e MOO-YOUNG (1987).

Este reator é vastamente utilizado em processos industriais em batelada, uma vez que ele promove maior transferência de massa comparado com reatores mecanicamente agitados. Além disso, este tipo de reator confere menor cisalhamento, preservando a integridade das células e tecidos e possui manutenção fácil, barata e construção simples (CHEN, 1990; MULLER et al., 2007). A movimentação do fluido no reator airlift se dá pela passagem das bolhas de gás, ou seja, pela aeração, o que faz com que se elimine o gasto de energia com agitação (KOCHEM, 2010).

Os reatores coluna de bolhas são tanques cilíndricos que possuem um distribuidor de gás no fundo, conforme pode ser visto na Figura 8. Estes reatores são vastamente utilizados na indústria, em processos biológicos, químicos e petroquímicos (PEREIRA, 2012). Esta vasta possibilidade de aplicações se dá pelas inúmeras vantagens oferecidas por este tipo de biorreator, dentre elas destaca-se: baixo custo de operação, pois estes biorreatores não possuem partes removíveis; apresentam boa característica de transferência de calor e de massa; pode-se usar sólidos sem que haja problemas com erosão ou entupimento; possuem elevado tempo de residência, podendo ser utilizados para reações lentas (SHAH et al., 1982).

A principal vantagem dos reatores pneumáticos quando comparados com os reatores

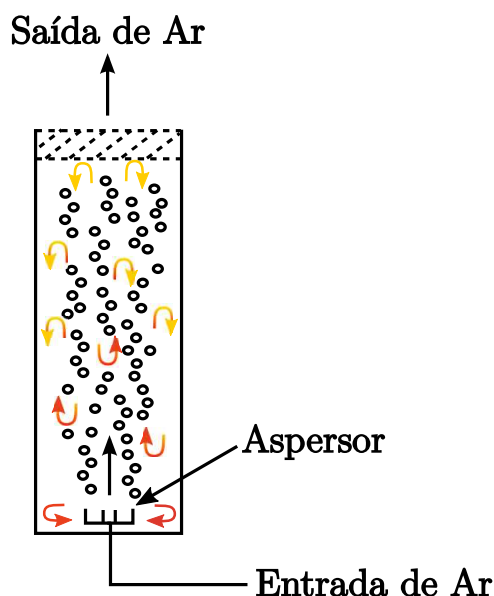


Figura 8 – Esquema de um reator coluna de bolhas. Fonte: Adaptado de Behin (2012).

de tanque agitado é que para estes últimos, a energia para a movimentação do fluido é, prevalentemente, mecânica, ou seja, fornecida através das pás agitadoras. Por este motivo, neste tipo de reator a tensão de cisalhamento é maior, principalmente próximo dos agitadores. Essa diferença de cisalhamento expõe as células a diferentes condições dentro do reator, o que pode causar danos na célula ou mudança no metabolismo da mesma (MERCHUK; CAMACHO, 1999).

A grande diferença dos reatores airlift para os reatores coluna de bolhas é que, neste último, não há a divisão em duas zonas e, no reator airlift uma melhor homogeneidade é alcançada (KOCHER, 2010).

2.3.2 Biorreatores contínuos

Neste tipo de biorreator, a alimentação é inserida continuamente no reator, ao passo que o produto é retirado, também continuamente. As principais vantagens deste tipo de operação são: redução do tempo morto, ou seja, redução no tempo utilizado para limpeza e descarga do reator; possibilidade de associação da fermentação com outras operações unitárias, como colunas cromatográficas e destiladores; menor necessidade de mão de obra e possibilidade de implantação de sistemas de controle mais sofisticados (SOUZA, 2009). Como exemplo de biorreator com sistema contínuo pode-se citar o biorreator contínuo de tanque agitado (SÊCO, S. D.).

2.3.2.1 Biorreator contínuo de tanque agitado

No reator contínuo de tanque agitado, CSTR (do Inglês, *Continuous Stirred Tank Reactor*), também chamado de reator de mistura, as variáveis temperatura e concentração

são as mesmas na saída do reator, bem como em qualquer outro ponto dentro do mesmo (GONÇALVES, 2014). O reator possui um agitador, que é responsável por misturar os reagentes para que a homogeneização seja atingida. Para este tipo de configuração de biorreator, normalmente, utiliza-se reatores em série, a fim de proporcionar altas taxas de conversão de reagentes em produtos. A vantagem deste tipo de reator é a possibilidade de se fazer o controle de temperatura de forma eficiente, porém, são necessários altos volumes para que se obtenha altas conversões (FÁBREGA, 2012). A Figura 9 mostra, esquematicamente, um biorreator CSTR.

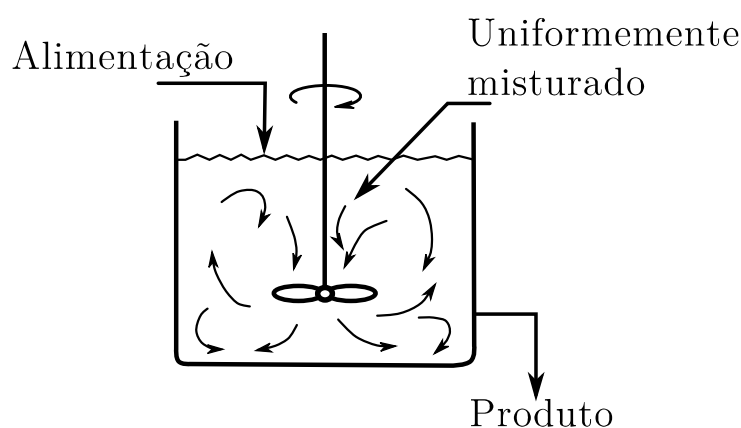


Figura 9 – Esquema de um reator de mistura, CSTR, composto por um tanque com agitador, ressaltando os pontos de alimentação e retirada dos produtos. Fonte: Adaptado de FÁBREGA (2012).

2.3.3 Biorreatores semicontínuos

No processo semicontínuo, uma parte da cultura microbiana é retirada em intervalos de tempo determinados e adiciona-se meio fresco ao sistema. A principal desvantagem deste tipo de processo é que a chance de contaminação é maior, uma vez que as operações de retirada são manuais. Além disso, há também a chance de mutação dos microrganismos envolvidos no processo, já que o tempo de fermentação é maior. Porém, como vantagem principal, tem-se que não há tempo morto e não se requer muito controle (SOUZA, 2009).

3 Metodologia Experimental

3.1 Microrganismo

Utilizou-se *S. cerevisiae* (fermento biológico seco) da marca Fleischmann.

3.2 Condições de cultivo

Os cultivos foram conduzidos em biorreator Coluna de Bolhas com aeração mantida em 4 vvm durante seis horas. A temperatura utilizada foi de 29°C e o pH 5.

3.3 Cálculo da Concentração Celular

Para o cálculo da concentração celular foi necessário que se determinasse a massa seca, para isso pesou-se o tubo falcon vazio e, em seguida, pesou-se o mesmo contendo o pellet, após secagem em estufa. Subtraiu-se os valores, obtendo-se a variação da massa (Δm). Esse valor foi então dividido pelo volume de amostra coletado (20 mL = 0,02 L), conforme pode ser visto na Equação 3.1.

$$C(g/L) = \frac{m_p - m_0}{Volume(L)} = \frac{\Delta m}{0,02L} \quad (3.1)$$

Onde C é a concentração em g/L, m_p e m_0 são as massas do tubo falcon com o pellet e vazio, respectivamente, em g e Δm é a variação das massas, também em g.

3.4 Determinação da concentração inicial de levedura

A fim de se determinar a melhor concentração inicial de levedura, a cinética de crescimento da *S. cerevisiae* em biorreator Coluna de Bolhas foi feita em duas condições: a primeira utilizando-se a concentração inicial de 2 g/L de levedura e a segunda utilizando-se 4 g/L.

3.4.1 Preparo do meio

Preparou-se 4 litros de meio de cultivo para cada experimento. Inicialmente, higienizou-se o biorreator com álcool 70%. Em seguida, com o auxílio de uma proveta, adicionou-se 4 litros de água destilada ao biorreator. Pesou-se, em balança analítica, os demais constituintes do meio de cultivo: 5 g/L de glicose; 2,5 g/L de extrato de levedura

(NaCl 0,5%, Nitrogênio amino 4,5 - 5,8%, Nitrogênio total 10,0 - 11,8%, pH 6,8 - 7,2 e material seco mínimo 94%); 1 g/L de KH_2PO_4 e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.4.2 Monitoramento da Concentração Celular

Após preparado o meio, o mesmo foi colocado no biorreator. No tempo zero, retirou-se 20 mL do meio de cultivo antes de inocular o microrganismo e, mais 20 mL logo após a inoculação. Isto foi feito para garantir que não havia matéria insolúvel e possível contaminação no meio de cultivo e, também, para determinar a concentração inicial de células. Estas etapas foram as mesmas para ambos os experimentos.

Em ambos os ensaios, retirou-se amostras, de 20 mL cada, do meio do cultivo, inicialmente de meia em meia hora até a segunda hora e, em seguida, de hora em hora.

Após retirados os 20 mL de amostra, esta foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos. Separou-se o sobrenadante do pellet. Este último foi para a estufa a 80°C *overnight* para secagem e posterior pesagem. O sobrenadante foi descartado, pois objetivava-se determinar apenas a concentração final de células. Após determinada a massa seca em balança analítica, calculou-se a concentração celular, que foi plotada em gráfico do logaritmo da concentração *versus* o tempo de cultivo. Estas etapas foram repetidas para os dois ensaios.

3.5 Planejamento Experimental

A influência da concentração de glicose e de extrato de levedura no crescimento celular de *S. cerevisiae* foi determinada utilizando-se um planejamento 2^2 com duas repetições no ponto central. Para tal, foram realizados 6 experimentos.

Cada uma das variáveis foi analisada em dois níveis: superior (+) e inferior (-). A Tabela 4 mostra os valores dos níveis inferior, superior e dos pontos centrais, representados por 0, utilizados no experimento.

Tabela 4 – Valores dos níveis inferior (-1), superior (+1) e ponto central (0) utilizados para execução do planejamento experimental.

Variáveis	-1	0	+1
Concentração de glicose (g/L)	2,0	5,0	8,0
Concentração de extrato de levedura (g/L)	1,0	2,5	4,0

3.5.1 Preparo do meio

Preparou-se 4 litros de meio de cultivo, composto por: 1 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2 g/L de levedura. Além destes componentes, o meio era, ainda, composto por glicose e extrato de levedura (NaCl 0,5%, Nitrogênio amino 4,5-5,8%, Nitrogênio total

10,0-11,8%, pH 6,8-7,2 e material seco mínimo 94%), porém em composição variável. A Tabela 5 apresenta as concentrações utilizadas destes componentes para os respectivos ensaios.

Tabela 5 – Concentrações de glicose e extrato de levedura, em g/L, utilizadas para execução do planejamento experimental.

Ensaio	Concentração (g/L)	
	Glicose	Extrato de levedura
1	2,0 (–)	1,0 (–)
2	8,0 (+)	1,0 (–)
3	2,0 (–)	4,0 (+)
4	8,0 (+)	4,0 (+)
5	5,0 (0)	2,5 (0)
6	5,0 (0)	2,5 (0)

3.5.2 Coleta das amostras

Após o meio ser acrescentado ao biorreator Coluna de Bolhas, retirou-se 20 mL de amostra antes de inocular o microrganismo e logo após a inoculação para verificar se havia sólidos e/ou contaminação do meio e para determinação da concentração inicial de células. Durante as duas primeiras horas de cultivo, retirou-se amostras de meia em meia hora. Passadas as duas horas iniciais, as amostras foram retiradas de hora em hora até completar 6 horas de cultivo.

As amostras retiradas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos e o pellet foi separado do sobrenadante e levado para secagem em estufa a 80°C *overnight* para posterior pesagem.

Calculou-se, então, a concentração final de células e os dados obtidos foram utilizados para o planejamento experimental.

Os experimentos foram realizados de maneira aleatória e, a análise das condições ótimas, bem como a obtenção da superfície de resposta foi feita utilizando-se o *software* Statistica 7.0.

4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação da concentração inicial de levedura

Sabe-se que maiores concentrações de levedura permitem maiores taxas de fermentação e maior controle sobre microrganismos contaminantes, porém, dependendo das condições operacionais existe uma concentração ótima de levedura que permite maior rendimento, seja em produto ou em concentração celular (CAMILI, 2010).

A fim de se determinar qual a melhor concentração inicial de levedura para a realização do planejamento experimental, comparou-se a cinética de crescimento utilizando-se duas concentrações iniciais de levedura: uma menor (2 g/L) e outra maior (4 g/L). Os valores da concentração celular para a massa seca obtidos são apresentados na Tabela 6. A curva do log da concentração de células *versus* tempo de cultivo, obtida para as duas condições é apresentada na Figura 10.

Tabela 6 – Concentração de células, em g/L, para os experimentos 1 e 2, em que utilizou-se, respectivamente, 2 g/L e 4 g/L de levedura.

Tempo (h)	Concentração de células (g/L)	
	Experimento 1	Experimento 2
0	1,02	2,62
0,5	1,03	2,82
1	1,35	2,83
1,5	1,42	2,91
2	1,52	2,99
3	1,84	3,24
4	2,26	3,43
5	2,49	3,54
6	2,58	3,65

Pela análise da Tabela 6 e da Figura 10, nota-se que, com o passar do tempo a concentração de células no meio aumentou, conforme era esperado.

Após 6 horas de cultivo, tempo previamente padronizado, o Experimento 1 apresentou maior aumento de biomassa. Isto porque, neste experimento, obteve-se uma concentração celular final 2,53 vezes maior que a concentração inicial, ao passo que no Experimento 2 esse aumento foi de 1,39 vezes.

Isto pode ser explicado pois, em concentrações maiores de levedura, a energia de manutenção é maior, ou seja, o consumo de glicose para manter as células vivas é maior, isto resulta em maior competição das células pelo substrato e nutrientes do meio. Visto que uma mesma concentração de glicose foi usada para ambos os experimentos (5 g/L), sendo assim, para o experimento 2, em que utilizou-se 4 g/L de *S. cerevisiae* houve competição

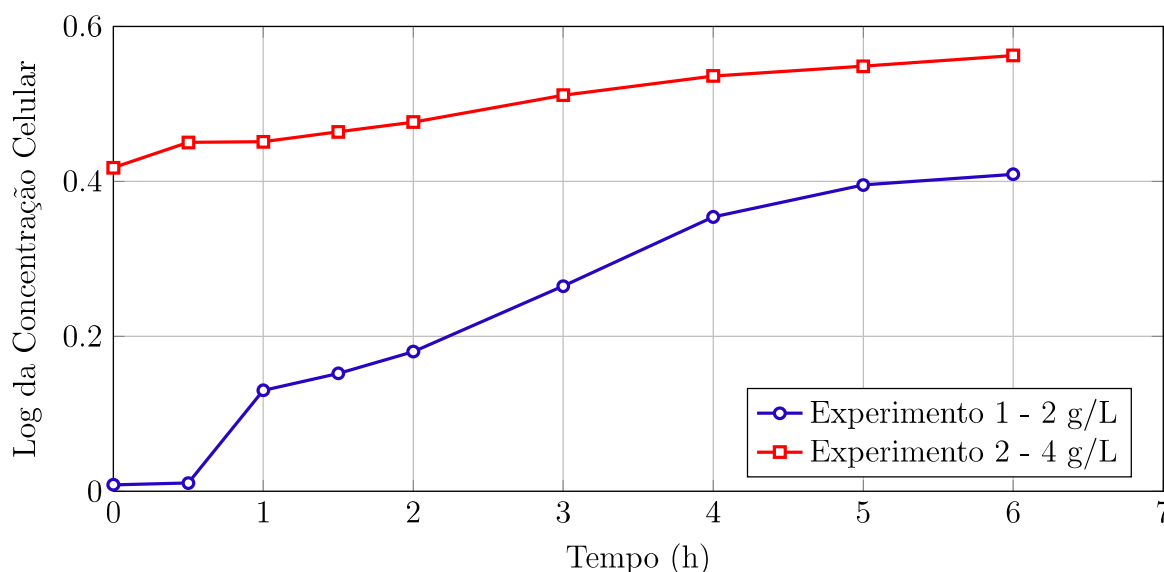


Figura 10 – Curvas do log da concentração celular *versus* tempo de cultivo, em horas, para a cinética de crescimento da *S. cerevisiae* para as duas condições, onde no Experimento 1 utilizou-se 2 g/L de levedura e no Experimento 2, 4 g/L.

das células pela fonte de carbono, o que causou repressão do crescimento da levedura presente no meio, uma vez que a disponibilidade de nutrientes para este caso era menor.

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo que possui tempo de geração curto (SHAFAGHAT et al., 2010). Diante disso, o tempo de cultivo foi escolhido e padronizado como 6 horas pois, para a levedura seca adquirida comercialmente, a fase exponencial situa-se em torno de 6 a 8 horas, menor que para as leveduras na forma úmida (fermento fresco). Isto porque nestas últimas há uma maior quantidade de contaminantes, como *Lactobacillus* sp., o que pode reprimir o crescimento celular leveduriforme através da competição entre as células ou através da indução de floculação da levedura (CAMILI, 2010). Além do mais, a levedura da marca Fleischmann já estava na fase logarítmica de crescimento, não exibindo a fase lag ou exibindo uma fase de adaptação muito curta, situação que pode ser vista na Figura 10. Esta condição foi comprovada pelo fabricante do produto, o qual diz que o tempo mínimo médio para o início da ação, ou seja, tempo de reativação do microrganismo é de aproximadamente 20 minutos.

Diante disso, a concentração inicial de levedura escolhida e utilizada para a realização do planejamento experimental foi de 2 g/L.

4.2 Planejamento Experimental

O acompanhamento do aumento da concentração celular para os 6 ensaios pode ser visto na Figura 11, onde observa-se que a concentração celular aumentou com o passar do tempo e, a maior concentração celular, em g/L, obtida foi para o tempo de 6 horas de cultivo. Por este motivo, utilizou-se as concentrações deste tempo para a execução

do planejamento experimental. Porém, nota-se que, de 5 para 6 horas o aumento da concentração celular foi pouco expressivo, mostrando que, provavelmente, a levedura já estava entrando na fase estacionária, condição causada pelo esgotamento dos nutrientes no meio de cultivo.

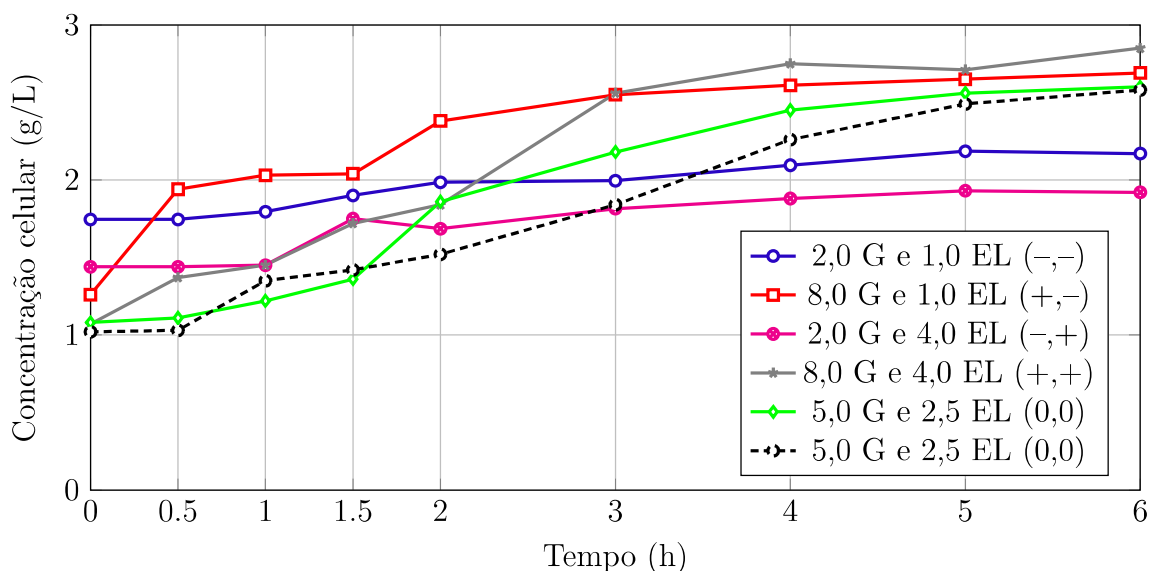


Figura 11 – Acompanhamento do crescimento celular de *S. cerevisiae* em biorreator coluna de bolhas para os 6 ensaios do planejamento experimental, em que o tempo de cultivo foi de 6 horas. Onde G é a concentração de glicose (g/L) e EL é a concentração de extrato de levedura (g/L).

Pela análise da Figura 11, nota-se que alguns experimentos possuíam concentração celular inicial baixa, porém atingiram uma maior concentração final após as 6 horas de cultivo, como pode ser visto para o caso dos experimentos 4 e 5, por exemplo. Ao passo que alguns experimentos tiveram uma concentração inicial maior, porém a concentração final não apresentou um aumento tão grande, como é o caso do experimento 1. Diante disso, utilizou-se além da concentração final de células, a razão da concentração final pela inicial como variável resposta.

O efeito das variáveis concentração de glicose e concentração de extrato de levedura nas variáveis resposta, concentração celular (massa seca), e razão da concentração final e inicial, foi investigado utilizando-se um planejamento fatorial 2^2 com duas repetições no ponto central, conforme pode ser observado na matriz experimental mostrada na Tabela 7. Observando-se as concentrações iniciais e finais de levedura, nota-se que a levedura foi capaz de crescer em todas as condições estudadas.

As concentrações celulares finais variaram entre 1,92 a 2,85 g/L, com aumento de concentração de 1,33 e 2,66 vezes, respectivamente. Os maiores valores de concentração celular final foram obtidos quando utilizou-se um excesso de glicose (ensaios 2 e 4). Já as menores concentrações foram obtidas quando utilizou-se uma menor concentração inicial de glicose, independente de se utilizar maior ou menor concentração de extrato de levedura

Tabela 7 – Matriz experimental para os níveis codificados das variáveis independentes "concentração de glicose" e "concentração de extrato de levedura" e valores da concentração inicial (g/L) para cada ensaio, bem como os valores obtidos para a concentração celular final após 6 horas de cultivo de *S. cerevisiae* em biorreator Coluna de Bolhas.

Ensaio	Glicose	Extrato de Levedura	Concentração Inicial (g/L)	Concentração Final (g/L)	C_x/C_{x0}
1	–	–	1,44	1,92	1,33
2	+	–	1,26	2,69	2,13
3	–	+	1,75	2,17	1,24
4	+	+	1,07	2,85	2,66
5	0	0	1,02	2,58	2,53
6	0	0	1,08	2,60	2,41

Onde C_x/C_{x0} representa a razão da concentração final de levedura, em massa seca, pela concentração inicial.

(ensaio 1 e 3). O mesmo pode ser observado analisando-se a razão da concentração final pela concentração inicial de levedura, onde pela análise da Tabela 7, nota-se que a maior razão foi para o excesso de glicose, ao passo que, a menor razão foi para a menor concentração de glicose.

O efeito das variáveis independentes e de suas interações nas variáveis resposta foi analisado utilizando-se o *software* Statistica 7.0 e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 8, que apresenta os efeitos, a estimativa do erro-padrão, os valores de p e o teste t-Student.

Tabela 8 – Estimativa dos efeitos, valores de t e p e erros-padrão.

Variáveis	Efeitos	Erro-Padrão	t-Valores	p
Média	2,468	0,0609	40,484	0,00061
Glicose	0,725	0,1493	4,855	0,0399
Extrato de Levedura	0,205	0,1493	1,373	0,3035
Glicose e Extrato de Levedura	-0,045	0,1493	-0,301	0,7916

Pela análise da Tabela 8, nota-se que apenas a concentração de glicose foi estatisticamente significativa, pois apresentou um valor de $p < 0,05$. A concentração de extrato de levedura não possuiu significância estatística, uma vez que seu valor de p obtido foi de 0,3035 ($p > 0,05$), o mesmo foi observado para a interação entre as variáveis concentração de glicose e de extrato de levedura, onde obteve-se um valor de p igual a 0,7916. Esta situação pode ser ainda observada pela análise do gráfico de Pareto, apresentado na Figura 12.

Conforme a concentração de glicose no meio de cultivo aumenta, o crescimento celular também aumenta, resultado este que está de acordo com os resultados obtidos por Wang, Cooney e Wang (1979), que estudaram o crescimento da levedura comercial *S.*

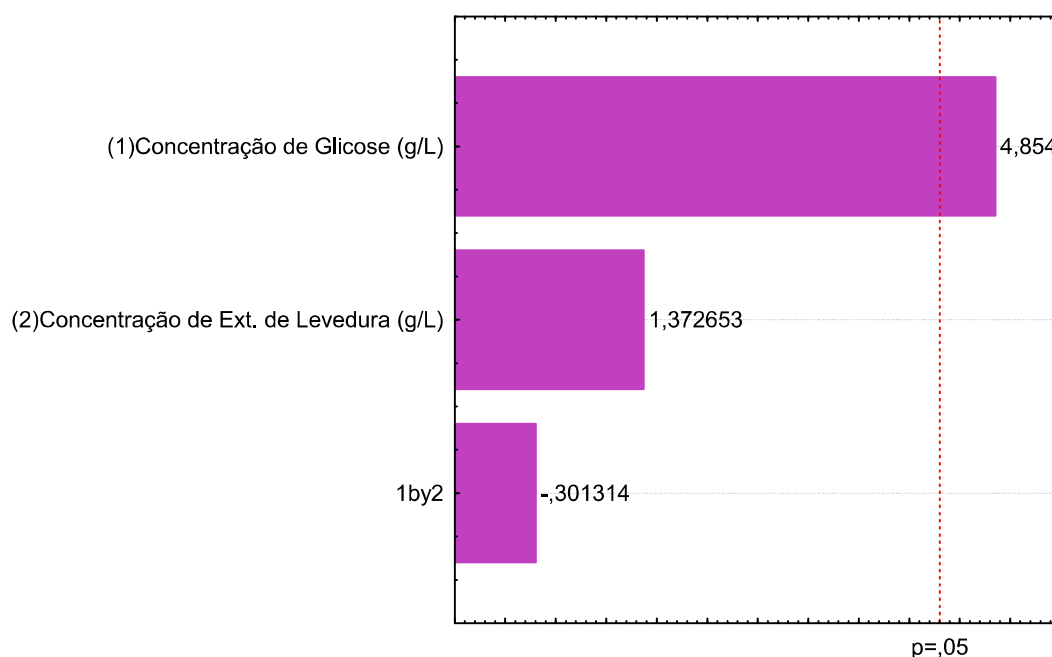


Figura 12 – Gráfico de Pareto, obtido através do software Statistica 7.0, para as concentrações de glicose e de extrato de levedura e a interação entre elas.

cerevisiae utilizando um sistema de controle por computador. Este aumento celular se dá quando tem-se uma maior concentração de glicose no meio, pois esta é a principal fonte de carbono para o microrganismo. O carbono, por sua vez, é o constituinte do esqueleto molecular de inúmeros compostos orgânicos, como proteínas, lipídeos e carboidratos, moléculas essenciais para o desenvolvimento celular.

Wang, Cooney e Wang (1979) ressaltam ainda a importância de se manter a concentração de açúcar alta o suficiente para promover o aumento de biomassa e baixa o suficiente para evitar o efeito *Crabtree*, em que, mesmo em condições de aerobiose, o metabolismo da levedura passa a ser fermentativo, pois a glicose em altas concentrações inibe a síntese das enzimas envolvidas na via glicolítica. Esta concentração ideal de açúcar para o aumento de biomassa e para a produção de etanol é alcançada, na maioria das vezes, de maneira empírica, uma vez que fatores como a linhagem da levedura utilizada influencia no processo. Neste contexto, Coppella e Dhurjati (1989), afirmam que em fermentações em batelada a concentração inicial de glicose deve estar em torno de 10 e 30 g/L.

Um aumento no crescimento celular de *S. cerevisiae* ao se aumentar a concentração de glicose (de 15 para 35 g/L), também foi obtido por Shafaghat et al. (2010), onde o crescimento máximo observado foi ao se utilizar a maior concentração de açúcar (35 g/L).

Este aumento de biomassa pode ser explicado pois, o catabolismo de moléculas de glicose em aerobiose (via respiratória) produz 38 moléculas de ATP, molécula de

armazenamento de energia. A conversão de moléculas de ATP em ADP e P_i (fosfato inorgânico) provoca a liberação de energia para as atividades metabólicas celulares, como por exemplo, a síntese de proteínas e de lipídeos, multiplicação celular e eliminação de compostos tóxicos pelas células.

No que diz respeito ao resultado para a concentração de extrato de levedura, obteve-se que este composto não possuiu significância estatística para o processo. Isto quer dizer que, o fato de se trabalhar com uma maior ou uma menor concentração deste composto não afeta diretamente o crescimento da *S. cerevisiae*. Extrato de levedura foi a principal fonte de nitrogênio para o microrganismo, uma vez que a concentração de $(NH_4)_2SO_4$ permaneceu constante para todos os ensaios.

Mendes-Ferreira, Mendes-Faia e Leão (2004) observaram que o aumento na concentração inicial de nitrogênio não afetava o crescimento da *S. cerevisiae*, o que está em consonância com o resultado obtido. Porém, ao compararem a cinética do consumo de glicose com a de nitrogênio, eles notaram que a capacidade da levedura de quebrar açúcares aumenta quando há nitrogênio disponível no meio de cultura. Este estudo comprovou, então, que a existência de uma fonte de nitrogênio no meio de cultivo é necessária. Uma hipótese para isso está baseada na ideia de que na ausência de nitrogênio muitas proteínas são degradadas, dentre elas destaca-se as transportadoras de glicose, assim, menos glicose é transportada para o meio intracelular, logo, menos moléculas deste composto serão degradadas (LUCERO; MORENO; LAGUNAS, 2002).

D'Amato et al. (2006) ao estudar o efeito da concentração de glicose, temperatura e amônia como fonte de nitrogênio, observaram que as maiores taxas de crescimento celular foram em menores concentrações de nitrogênio.

Já Denchev, Shopova e Pepeliasheva (1998) por sua vez observaram que, quando a concentração de nitrogênio era igual a 1 g/L havia aumento de biomassa, porém, quando essa concentração foi aumentada para 1,5 g/L não observou-se aumento de biomassa celular significativo quando comparado com a condição inicial.

Pode-se, portanto, inferir que o nitrogênio embora seja necessário para o crescimento celular, principalmente porque ele é constituinte de proteínas e nucleotídeos, ele não é considerado um substrato que limita o crescimento, ou seja, é necessário que este componente esteja presente no meio de cultivo, mas o fato de ele estar em alta ou baixa concentração não influenciará diretamente o crescimento microbiano.

Este fato pode ser comprovado observando-se a Tabela 7, onde para o ensaio 1, em que a concentração de extrato de levedura foi a menor (1 g/L), obteve-se um menor crescimento celular (1,92 g/L). Porém, no ensaio 3, em que utilizou-se 4 g/L de extrato de levedura obteve-se um aumento na concentração celular (2,17 g/L). Isto quer dizer que para o experimento 1 obteve-se um aumento da concentração celular de 1,3 vezes e no experimento 3 esse aumento foi 1,24 vezes, o que mostra que utilizar concentrações altas ou

baixas de extrato de levedura praticamente não influenciou no crescimento leveduriforme.

O modelo matemático de primeira ordem obtido para a concentração celular, considerando todos os termos analisados (concentração celular, concentração de glicose, de extrato de levedura e a interação entre essas últimas) é apresentado na Equação 4.1.

$$Z = 2,4683 + 0,3625x + 0,1025y - 0,0225xy \quad (4.1)$$

Onde Z é a concentração celular (g/L) e x e y representam, respectivamente, a concentração de glicose e de extrato de levedura (g/L).

A validade dos resultados foi comprovada realizando-se a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 9, obtendo-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,92738, o que indica que o modelo possui 92,738% de variabilidade nos dados. Com este valor de R^2 , pode-se dizer que o modelo matemático é confiável. Quanto mais próximo de 1 for o valor de R^2 , melhor o modelo se adequa aos dados experimentais e menor é a distância entre os valores preditos e observados. A significância dos resultados obtidos também foi confirmada pelo valor do teste F calculado, que foi 19,156, que é aproximadamente 2 vezes maior que o valor de F tabelado ($F_{(2,3)} = 9,55$), com intervalo de confiança de 5%.

Tabela 9 – Análise de variância (ANOVA) para o crescimento celular de *S. cerevisiae* em cultivo de 6 horas em biorreator Coluna de Bolhas.

Variáveis	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Soma Média	F	P
Glicose	0,5256	1	0,5256	23,5662	0,0399
Extrato de Levedura	0,0420	1	0,0420	1,8842	0,3035
Glicose e Extrato de Levedura	0,0020	1	0,0020	0,0908	0,7916
Erro	0,0446	2	0,0223		
Total	0,6143	5			

A superfície de resposta, o gráfico de contorno e o diagrama dos valores preditos pelo modelo são apresentados nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente. Pela análise destas Figuras, nota-se que uma maior concentração celular é obtida quando se trabalha com maiores concentrações de glicose (8 g/L) e de extrato de levedura (4 g/L).

Porém, ao se utilizar uma menor concentração de extrato de levedura obteve-se pouco aumento na concentração final de células, o que indica que, a concentração desta substância não tem influência significativa no processo e que, desde que se trabalhe com altas concentrações de glicose, a concentração de extrato de levedura não influenciará o crescimento celular. Isto pode ser observado analisando-se o diagrama dos valores preditos, Figura 15, em que o maior valor obtido foi de 2,911 na condição de (+,+), porém, na condição de (+,-) obteve-se um valor apenas 0,16 vezes menor, o que representa um aumento pouco significativo.

Este fato pode ser comprovado quando se analisa trabalhos realizados por outros autores, como Ghorbani et al. (2008), Vicente, Dluhý e Teixeira (1999) e Shafaghat et al. (2010), em que a concentração de extrato de levedura utilizada no meio de cultivo para crescimento e aumento de biomassa da levedura *S. cerevisiae* foi padronizado como sendo 1 g/L.

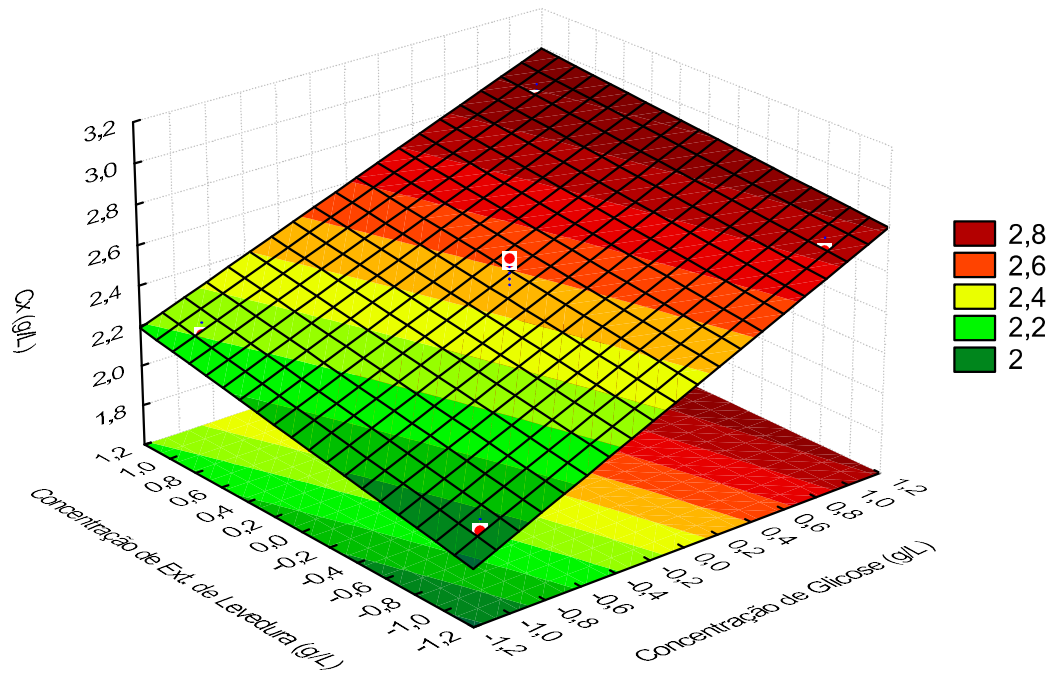


Figura 13 – Superfície de resposta para a concentração celular da levedura *S. cerevisiae* (C_x), concentração de glicose e de extrato de levedura, em g/L, descrita pelo modelo matemático da Equação 4.1.

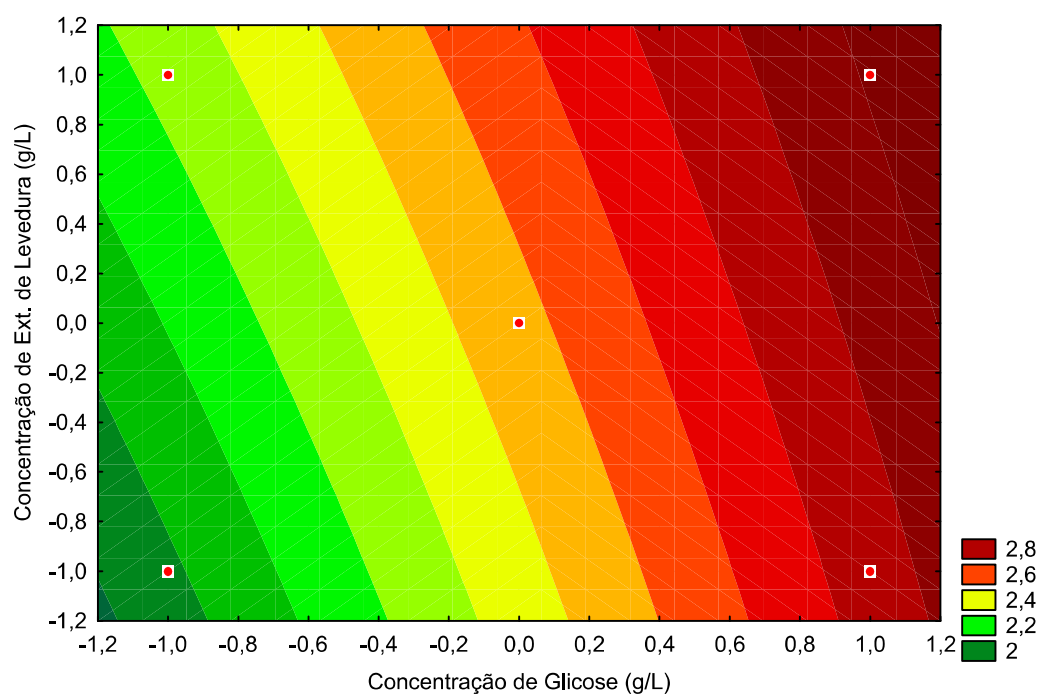


Figura 14 – Gráfico de contorno para a concentração de glicose e concentração de extrato de levedura, em g/L, obtido a partir do m modelo matemático descrito pela Equação 4.1.

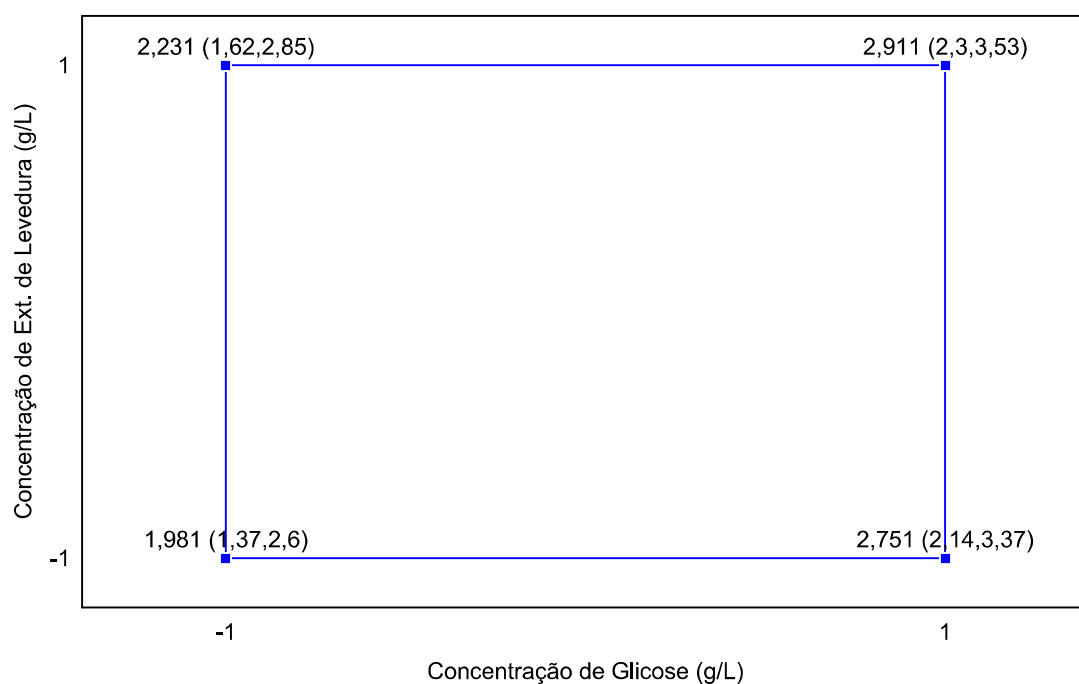


Figura 15 – Diagrama dos valores preditos pelo modelo apresentado na Equação 4.1, em que o nível superior (+) corresponde à 8 g/L de glicose e 4 g/L de extrato de levedura e o nível inferior (-) corresponde à 2 g/L de glicose e 1 g/L de extrato de levedura.

5 Considerações Finais

Neste estudo, objetivou-se avaliar a influência das variáveis concentração de glicose e concentração de extrato de levedura no crescimento celular de *S. cerevisiae*. Sabe-se que, além destas variáveis, fatores como pH, temperatura e aeração também influenciam no processo, o que pode ser tema para trabalhos futuros. Diante disso, tais fatores foram fixados em: pH 5, temperatura em torno de 29°C e aeração de 4 vvm, de acordo com dados encontrados na literatura.

Como resultados, obteve-se que uma maior concentração de glicose (8 g/L) favorece um maior aumento de biomassa, isto porque a glicose é a principal fonte de carbono e sua quebra gera energia para as atividades metabólicas. Já a variável concentração de extrato de levedura (principal fonte de nitrogênio) não possuiu significância estatística no processo, observando-se que pode-se trabalhar tanto na região de mais quanto na região de menos. Tais resultados obtidos estão em consonância com dados apresentados na literatura.

A validade dos resultados foi comprovada através da análise de variância e do coeficiente de correlação, em que obteve-se um valor de R^2 igual a 0,92738 e um valor de F de 19,156, 2 vezes maior que o valor de F tabelado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, P. M. **Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na redução de substratos carbonílicos.** Tese (Doutorado em Química Orgânica) — Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Maio 2007. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 23.
- ARROYO-LÓPEZ, F. N.; ORLIC, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. **International journal of food microbiology**, Elsevier, v. 131, n. 2, p. 120–127, 2009. Citado na página 8.
- BASSO, T. I. **Melhoramento da fermentação alcoólica em *Saccharomyces cerevisiae* por engenharia evolutiva.** Tese (Doutor em Biotecnologia) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25.
- BEHIN, J. Deinking in bubble column and airlift reactors: Influence of wastewater of merox unit as pulping liquor. **Chemical Engineering Research and Design**, Elsevier, v. 90, n. 8, p. 1045–1051, 2012. Citado na página 29.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery.** 2^a. ed. [S.l.]: Wiley-Interscience New York, 2005. Citado na página 13.
- CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica.** [S.l.]: Editora E-papers, 2003. Citado 7 vezes nas páginas 9, 12, 13, 14, 16, 17 e 18.
- CAMILI, E. A. **Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca.** Tese (Doutor em Agronomia) — Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Setembro 2010. Citado 4 vezes nas páginas 22, 26, 34 e 35.
- CASTANHEIRA, D. D. **Estudos sobre a produção de etanol em células de *Saccharomyces cerevisiae* com maior atividade da enzima H^+ - ATPase de membrana citoplasmática.** Dissertação (Mestre em Biotecnologia) — Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25.
- CHEN, N. The design of airlift fermenters for use in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Taylor & Francis, v. 8, n. 1, p. 379–396, 1990. Citado na página 28.
- CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. Airlift reactors: Characteristics, applications and design considerations. **Chemical Engineering Comm.**, v. 60, p. 195 – 242, 1987. Citado na página 28.
- CONAGIN, A. Delineamentos "compostos centrais ortogonais, rotacionais e divisíveis em blocos.". **Revista Científica do Instituto Agrônômico**, v. 41, n. 5, p. 49 – 56, Março 1982. Citado na página 16.
- COPPELLA, S. J.; DHURJATI, P. A detailed analysis of *Saccharomyces cerevisiae* growth kinetics in batch, fed-batch, and hollow-fiber bioreactors. **The Chemical Engineering Journal**, Elsevier, v. 41, n. 2, p. B27–B35, 1989. Citado na página 38.

CRUZ, M. L. **Avaliação das condições de processo na residência da levedura ao teor final de Etanol na fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) — Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. Citado 5 vezes nas páginas 19, 22, 23, 24 e 26.

D'AMATO, D.; CORBO, M. R.; NOBILE, M. A. D.; SINIGAGLIA, M. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. **International journal of food science & technology**, Wiley Online Library, v. 41, n. 10, p. 1152–1157, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 39.

DENCHEV, D.; SHOPOVA, B.; PEPELIASHEVA, V. Growth and baker's properties of *Saccharomyces cerevisiae* depending on nitrogen and phosphorus concentration in the starch hydrolizate containing medium. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Taylor & Francis, v. 12, n. 2, p. 91–93, 1998. Citado na página 39.

FÁBREGA, F. M. **Cálculo de Reatores I**. JUNDIAÍ, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 30.

GHORBANI, F. et al. Application of response surface methodology for optimization of cadmium biosorption in an aqueous solution by *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemical Engineering Journal**, Elsevier, v. 145, n. 2, p. 267–275, 2008. Citado na página 41.

GONÇALVES, A. G. M. **Primeiro estudo dirigido de cinética e reatores: tipos de reatores e suas respectivas equações de balanço**. Manaus, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 30.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2012. Citado na página 22.

JUNIOR, E. F. S. **Perfil de expressão proteica de leveduras comerciais do gênero *Saccharomyces* e o papel das proteínas na seleção de Espécies com potencial biotecnológico**. Dissertação (Mestre) — Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013. Citado 3 vezes nas páginas 21, 22 e 26.

KALATHENOS, P.; BARANYI, J.; SUTHERLAND, J. P.; ROBERTS, T. A. A response surface study on the role of some environmental factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **International journal of food microbiology**, Elsevier, v. 25, n. 1, p. 63–74, 1995. Citado na página 8.

KOCHEM, L. H. Caracterização de fotobioreator air-lift para cultivo de microalgas. 2010. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

LIMA, D. A.; LUNA, R. L. N. L.; ROCHA, J. M. T. S.; SILVA, P. M. P.; GOUVEIA, E. R. Efeito de diferentes formas de preparo do inóculo e de concentrações dos nutrientes na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **I Congresso Internacional de Ciências Biológicas**, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 19.

LUCERO, P.; MORENO, E.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source. **FEMS yeast research**, The Oxford University Press, v. 1, n. 4, p. 307–314, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 39.

- MACHADO, R. P. **Produção de etanol a partir de melão de soja**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Agosto 1999. Citado 3 vezes nas páginas 19, 20 e 23.
- MENDES-FERREIRA, A.; MENDES-FAIA, A.; LEÃO, C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Journal of Applied Microbiology**, Wiley Online Library, v. 97, n. 3, p. 540–545, 2004. Citado na página 39.
- MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. Dissertação (*Magister Scientiae*) — Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 16.
- MERCHUK, J.; CAMACHO, F. G. Bioreactors: airlift reactors. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**, Wiley Online Library, 1999. Citado na página 29.
- MIGUEL, A. S. M. **Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada através de processo descontínuo alimentado**. Tese (Doutor) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 23.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8^a. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013. Citado 4 vezes nas páginas 9, 16, 17 e 18.
- MULLER, J. L. et al. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 4, p. 688–693, 2007. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 2^a. ed. Campinas, São Paulo: Grupo A-Bookman, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 14.
- NEVES, L. C. M. D. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181**. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Citado 3 vezes nas páginas 22, 23 e 26.
- PARADA, G.; ACEVEDO, F. On the relation of temperature and rna content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, Wiley Online Library, v. 25, n. 11, p. 2785–2788, 1983. Citado na página 21.
- PEREIRA, G. I. M. **Transferência de massa em colunas de bolhas.: Estudo da influência de propriedades físicas do líquido e de partículas sólidas**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) — Universidade do Porto, Julho 2012. Citado na página 28.
- PEREIRA, N.; BON, E.; FERRARA, M. Séries em biotecnologia: Tecnologia de bioprocessos. **Esc. Quím./UFRJ, Rio de Janeiro**, p. 26, 2008. Citado na página 21.
- RIBEIRO, J. L. D.; CATEN, C. S. T. Projeto de experimentos. Porto Alegre, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 16.

- RIO, D. T. D. **Biossorção de cádmio por leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestre em Agronomia) — Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Maio 2004. Citado na página 8.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2ª. ed. Campinas, São Paulo: Casa do Pão, 2009. Citado 7 vezes nas páginas 8, 9, 11, 13, 14, 15 e 16.
- RUIZ, L. C.; GUERRA, N. P.; ROSES, R. P. Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid state fermentation. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 531 – 542, 2003. Citado na página 22.
- SÊCO, A. M. M. Reactores químicos i. Lisboa, S. D. Disponível em: <<http://www.deq.isel.ipl.pt/cp/sebentas/RQLsebenta.pdf>>. Acesso em: 20 de Setembro de 2016. Citado na página 29.
- SHAFAGHAT, H.; NAJAFPOUR, G. D.; REZAEI, S. P.; SHARIFZADEH, M. Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (ptcc 24860) on pretreated molasses for the ethanol production: the application of the response surface methodology. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ**, v. 16, n. 2, p. 199–206, 2010. Citado 4 vezes nas páginas 20, 35, 38 e 41.
- SHAH, Y.; KELKAR, B. G.; GODBOLE, S.; DECKWER, W.-D. Design parameters estimations for bubble column reactors. **AIChE Journal**, Wiley Online Library, v. 28, n. 3, p. 353–379, 1982. Citado na página 28.
- SILVA, A. F. D. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambique da Bahia**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) — Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009. Citado na página 18.
- SILVEIRA, R. F. **Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo**. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Abril 2006. Citado na página 27.
- SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. Tese (Doutor em Biotecnologia) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Citado 7 vezes nas páginas 18, 19, 23, 24, 26, 29 e 30.
- SOUZA, J. L. U. D.; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **Fazu em revista**, n. 08, 2012. ISSN 1806-1699. Citado 4 vezes nas páginas 22, 24, 25 e 26.
- TAHARA, S. Planejamento de experimentos (doe). Dezembro 2008. Disponível em: <http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Experimentos-D0E#eztoc113642_1_13>. Acesso em: 15 de Setembro de 2016. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 12.
- VIANA, T. M. L. **Caracterização bioenergética de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação vinária**. Dissertação (Mestre em Engenharia Alimentar) — Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 26.

VICENTE, A. A.; DLUHÝ, M.; TEIXEIRA, J. A. Increase of ethanol productivity in an airlift reactor with a modified draught tube. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, Wiley Online Library, v. 77, n. 3, p. 497–502, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 41.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. Microbiologia aplicada. Santa Maria, 2012. Disponível em: <http://redeetec.mec.gov.br/images/stories/pdf/eixo_prd_industr/tec_acucar_alcool/161012_microb_aplic.pdf>. Acesso em: 12 de Setembro de 2016. Citado na página 18.

WANG, H. Y.; COONEY, C. L.; WANG, D. I. Computer control of bakers' yeast production. **Biotechnology and Bioengineering**, Wiley Online Library, v. 21, n. 6, p. 975–995, 1979. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 38.

WANG, J.; WAN, W. Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 1, p. 235 – 244, 2009. Citado 3 vezes nas páginas 12, 13 e 14.

WHITE, D.; DRUMMOND, J. T.; FUQUA, C. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 4. ed. [S.l.]: Oxford University Press New York, 2011. ISBN 978-0195393040. Citado na página 20.

WIN, S.; IMPOOLSUP, A.; NOOMHORM, A. Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fedbatch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. **Journal of industrial microbiology**, Springer, v. 16, n. 2, p. 117–123, 1996. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22.