



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

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* EM UM  
BIORREATOR DO TIPO "AIRLIFT" A PARTIR DE DIFERENTES CONDIÇÕES  
EXPERIMENTAIS**

**Francianny Neves de Almeida Neto**

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

**Ouro Branco**  
**Dezembro/ 2017**

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* EM UM  
BIORREATOR DO TIPO “AIRLIFT” A PARTIR DE DIFERENTES CONDIÇÕES  
EXPERIMENTAIS**

**Francianny Neves de Almeida Neto**

Trabalho de Conclusão de  
Curso apresentado em cumprimento  
às exigências do Curso de  
Bacharelado em Engenharia de  
Bioprocessos da Universidade  
Federal de São João Del Rei.

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

**Ouro Branco  
Dezembro/ 2017**

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* EM UM  
BIORREATOR DO TIPO “AIRLIFT” A PARTIR DE DIFERENTES CONDIÇÕES  
EXPERIMENTAIS**

**Francianny Neves de Almeida Neto**

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

---

Edson Romano Nucci

---

Alessandra Costa Vilaça

---

Maria Rita Meyer Ferraz da Costa

Ouro Branco, 19/12/2017

## RESUMO

Os bioprocessos podem ser definidos como sendo processos de natureza biológica, que se utilizam de organismos vivos, ou parte deles, para obtenção de produtos e serviços, utilizando desde processos fermentativos até manipulação genética. O planejamento experimental e a tecnologia aplicada aos bioprocessos são desafios para a biotecnologia, uma vez que para produção de diferentes produtos são necessárias várias etapas que podem ser consideradas complexas do ponto de vista físico-químico e biológico. Na modelagem de processos biológicos existe uma enorme dificuldade na determinação de quais parâmetros são confiáveis para descrever o processo de forma adequada sendo, na maioria das vezes, preciso obter informações de maneira empírica. Por esse motivo, o objetivo desse trabalho foi testar diferentes condições experimentais para verificar qual das condições seria considerada a mais favorável para aplicação em um processo que tinha como produto o crescimento da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram realizados no total 5 experimentos que cultivaram as leveduras em um biorreator do tipo "Airlift", tendo diferentes condições testadas como: adição de inóculo, a composição do meio de cultivo, para melhor ativação das leveduras, a avaliação da temperatura e pH e a definição da quantidade de volume retirado para amostragem do crescimento celular. Para avaliação do crescimento celular utilizou-se a diferença das massas obtidas das amostras retiradas ao longo do processo de fermentação. Como resultado, pode-se observar que a ativação prévia do inóculo, utilizando glicose e extrato de levedura, como componentes do meio de cultivo, em uma concentração de 8 g/L, tendo uma temperatura próxima de 36°C e um pH em torno de 4,5 no decorrer de todo o cultivo configura uma condição experimental considerada como favorável para aplicação em um processo que tenho como produto o crescimento da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: Bioprocessos, Planejamento experimental, inóculo, pH, meio de cultivo.

## SUMÁRIO

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                               | 8  |
| 2. Objetivos.....                                                | 9  |
| 2.1. Objetivos Específicos .....                                 | 9  |
| 3. Revisão Bibliográfica .....                                   | 9  |
| 3.1. Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....              | 9  |
| 3.2. Fases do crescimento celular.....                           | 10 |
| 3.3. Processos fermentativos para crescimento de leveduras ..... | 11 |
| 3.4. Biorreatores.....                                           | 12 |
| 3.5. Parâmetros que interferem no processo fermentativo.....     | 15 |
| 3.5.1. Influência da Temperatura .....                           | 15 |
| 3.5.2. Influência do pH.....                                     | 15 |
| 3.5.3. Influência do Meio de Cultura.....                        | 15 |
| 3.5.4. Influência da Agitação e Aeração.....                     | 16 |
| 4. Material e Métodos.....                                       | 17 |
| 5. Resultados e Discussão.....                                   | 21 |
| 6. Conclusão.....                                                | 28 |
| 7. Referências Bibliográficas.....                               | 30 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Curva de crescimento das leveduras .....                                                                                      | 10 |
| Figura 2 - Esquema geral de um processo fermentativo. ....                                                                               | 12 |
| Figura 3 - Classificação geral dos biorreatores.....                                                                                     | 13 |
| Figura 4 - Desenho esquemático do biorreator tipo tanque agitado e aerado.....                                                           | 14 |
| Figura 5 - Desenho esquemático dos biorreatores pneumáticos Coluna de bolhas e “Airlift”, respectivamente.....                           | 14 |
| Figura 6 - Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFLA (CA -11).....                                                                   | 17 |
| Figura 7 - Inóculo devidamente preparado. a) Antes da ativação e b) Ativado.....                                                         | 19 |
| Figura 8 - a) Biorreator “Airlift” em funcionamento. b) Medidor de vazão de ar fixado em 5 Kgf/cm <sup>2</sup> .....                     | 19 |
| Figura 9 - Display da Estufa apontando a temperatura de 50°C.....                                                                        | 20 |
| Figura 10 - Centrífuga Refrigerada SL 701, usada para acelerar o processo de sedimentação do material celular gerado no experimento..... | 20 |
| Figura 11 - Valores de pH e temperatura obtidos ao longo do experimento 1.....                                                           | 22 |
| Figura 12 - Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 1.....                                            | 23 |
| Figura 13 - Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 2.....                                            | 24 |
| Figura 14 - Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 3.....                                            | 25 |
| Figura 15 - Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 4.....                                            | 26 |
| Figura 16 - Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 5.....                                            | 28 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Composição do meio de cultivo usado no biorreator.....   | 18 |
| Tabela 2: Condições experimentais dos experimentos realizados..... | 21 |

## 1. Introdução

Os bioprocessos podem ser definidos como sendo processos de natureza biológica, que se utilizam de organismos vivos, ou parte deles, para obtenção de produtos e serviços, utilizando desde processos fermentativos até manipulação genética (PEREIRA Jr., 2008).

O planejamento experimental e a tecnologia aplicada aos bioprocessos são desafios para a biotecnologia, uma vez que para produção de diferentes produtos são necessárias várias etapas que podem ser consideradas complexas do ponto de vista físico-químico e biológico. Por esse motivo, ferramentas biotecnológicas que envolvam modelagem e simulação, bem como o controle são “peças-chaves” na otimização desses bioprocessos (PEREIRA Jr., 2008).

Conforme BONOMI e SCHMIDELL (2001) a modelagem matemática de processos fermentativos é definida como sendo uma tentativa de representar, por meio de equações matemáticas, os balanços de massa realizados para cada componente de um biorreator, associados às diferentes transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações acontecem.

Na modelagem de processos biológicos existe uma enorme dificuldade para determinar quais parâmetros são confiáveis para descrever o processo de forma adequada sendo, na maioria das vezes, preciso obter informações de maneira empírica (SODRÉ, 2017).

Por esse motivo, é necessário planejar como os experimentos precisam ser realizados, definindo quais dados, em que quantidade e em que condições devem ser coletados buscando, basicamente, satisfazer dois grandes objetivos: a maior precisão estatística possível na resposta e o menor custo.

Um experimento planejado pode ser considerado um teste, ou uma série de testes, no qual são feitas mudanças propositalmente nas variáveis de entrada, de modo que seja possível observar e identificar mudanças correspondentes na resposta.

O cultivo de leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, em biorreatores, pode ser conduzido, sob diferentes condições, para avaliação da cinética de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato, na tentativa de aperfeiçoar e agregar mais rentabilidade ao processo.

Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo testar diferentes

condições experimentais para avaliação do crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivos realizados em um biorreator do tipo “Airlift”, comparando os resultados encontrados.

## **2. Objetivos**

Testar diferentes condições experimentais para avaliação do crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em um biorreator do tipo “Airlift”.

### **2.1 Objetivos Específicos:**

- Realizar experimentos em Biorreator do tipo “Airlift” com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar a influência da utilização do inóculo no crescimento celular;
- Avaliar a importância do controle e correção do pH do meio de cultivo;
- Verificar qual o volume deve ser retirado de amostra para melhor avaliação do crescimento celular;

## **3. Revisão Bibliográfica**

### **3.1 Levedura *Saccharomyces cerevisiae***

As leveduras são pertencentes ao Reino Fungi, classificadas como eucariontes e predominantemente unicelulares. Esse tipo de microrganismo consegue metabolizar, de maneira eficiente, diferentes açúcares fermentáveis presentes em um meio (NEVES, 2003).

Elas são capazes de se desenvolver em uma faixa de temperatura entre 5°C e 43°C e preferem um pH ácido, sendo o ideal 5,0-5,2. Os elementos essenciais para que ocorra o crescimento das leveduras em um meio incluem: água, uma fonte de carbono (carboidratos fermentescíveis) como fonte energética, oxigênio, fonte de nitrogênio, vitaminas como fatores de crescimento e íons inorgânicos – importantes para o metabolismo celular (RUSSELL, 2003). O oxigênio, em baixas concentrações, é exigido por leveduras *Saccharomyces* para a síntese de esteróis e

ácidos graxos insaturados, ambos críticos para a função e integridade das membranas das células de levedura (INGLEDEW, 1999).

Quando uma levedura é transferida para um meio adequado sua propagação pode ocorrer em múltiplos estágios. Nesta etapa, é ideal que seja mantida a condição aeróbica, para maximizar o aumento da concentração celular no processo (RUSSELL, 2003).

A levedura mais utilizada em processos de fermentação é a do gênero *Saccharomyces*, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* uma das espécies mais utilizadas comercialmente nas indústrias de produção de etanol, cervejas, vinhos e panificação. Sua aplicação industrial está ligada aos processos fermentativos, devido a sua capacidade (quando na fase anaeróbica) de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico (NEVES, 2003).

Por ser fundamental na fermentação, é extremamente importante que a cultura da levedura seja a mais pura possível estando isenta de microrganismos contaminantes como bactérias e outros tipos de leveduras (RUSSELL, 2003).

### 3.2 Fases do crescimento celular

Existem diferentes fases que caracterizam o crescimento celular das leveduras, conforme pode ser observado na figura 1.

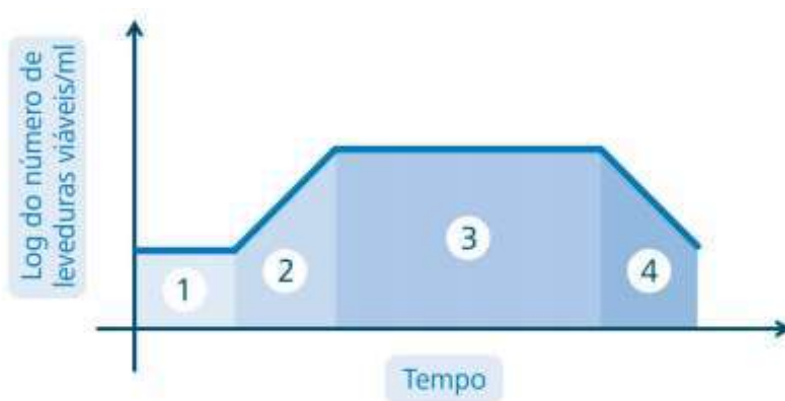


Figura 1 - Curva de crescimento das leveduras.

Fonte: CTISM.

Essas fases foram divididas, principalmente, em:

- **(1) Fase lag:** quando ocorre a adaptação dos microrganismos ao meio de cultivo que se encontram. Nessa fase o metabolismo é altíssimo, mas sem divisão celular, ocorre a reconstituição enzimática, degradação macromolecular, etc. (LOPES, 2017);
- **(2) Fase exponencial:** quando atinge um aumento exponencial do número de células (cada célula se divide a intervalos constantes de tempo). Nessa fase o metabolismo celular é intenso, produzindo uma grande quantidade de produtos de excreção. A duração desta fase é controlada pela composição e estado físico do meio, pelo número de células por unidade de volume, pelo acúmulo de metabólicos e pelos produtos finais que podem ser considerados inibidores;
- **(3) Fase estacionária:** nessa fase o número de células permanece quase que constante por um período de tempo. Ela é caracterizada pelo baixo consumo de energia, uma vez que os nutrientes do meio de cultura já se encontram reduzidos e já existe um acúmulo de produtos finais que podem ser tóxicos aos microrganismos (LOPES, 2017);
- **(4) Fase de declínio:** durante essa fase o número de células que morrem excede o número de novas células, devido a composição (esgotamento do meio, acúmulo de produtos finais) e condições físicas e químicas do meio (pH, temperatura, etc.) (LOPES, 2017).

Segundo OLIVEIRA (2013), embora a quantidade de inóculo usado não influencie a duração da fase exponencial, ela retarda a fase de multiplicação celular.

### 3.3 Processos fermentativos para crescimento de leveduras

A fermentação é um processo que utiliza a ação de microrganismos para transformar a matéria orgânica presente em um meio em produtos, sendo essa transformação catalisada pela ação das enzimas. Esses processos fermentativos já são utilizados desde a antiguidade quando os egípcios usavam a fermentação da cevada para fabricar um tipo de cerveja, e a levedura da cerveja já era utilizada para a panificação. Hoje, diversos produtos são desenvolvidos por processos fermentativos, inclusive os biocombustíveis, tais como o etanol (NEVES, 2003).

A figura 2 apresenta um esquema geral de um processo fermentativo industrial.

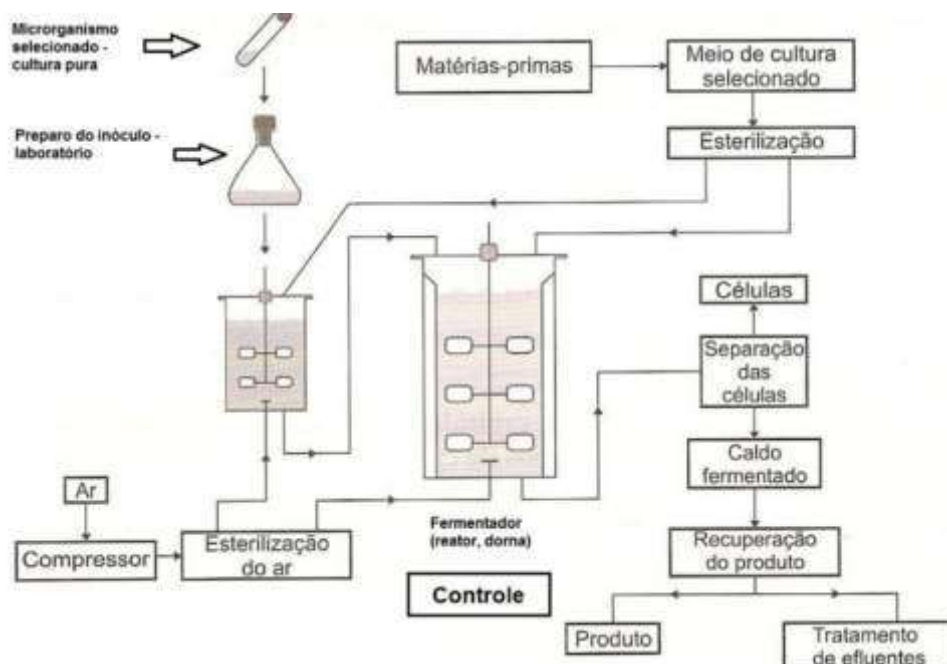


Figura 2 - Esquema geral de um processo fermentativo industrial.

Fonte: [http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Microbiol/eqb353\\_aula\\_09.pdf](http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Microbiol/eqb353_aula_09.pdf)

O processo de fermentação pode ser de dois tipos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em meio semissólido ou estado sólido (FMSS ou FES). A fermentação submersa ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis. Já a FMSS é definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos. Nestes casos, a matéria-prima funciona como um suporte do microrganismo, dos substratos, do produto e da água adicionada para umedecer o suporte.

### 3.4 Biorreatores

De um modo geral, os biorreatores podem ser definidos como equipamentos que possuem um ambiente confinado, no qual substratos são transformados em produtos de interesse através da ação de microrganismos, células animais, vegetais ou enzimas. Para conseguir essa conversão é preciso que parâmetros como: temperatura, pH, substratos e oxigênio estejam em condições ideais para o tipo de célula ou enzima utilizada.

A transferência do oxigênio, por exemplo, é um dos fatores mais críticos na operação de um biorreator em processos aeróbicos, isso se deve a baixa solubilidade do oxigênio no meio de cultura, fazendo com que esse seja o fator limitante do processo (CERRI, 2009).

Na literatura existem várias formas possíveis de classificar esses biorreatores, levando em consideração diferentes critérios (tipo de biocatalisador, configuração do biocatalisador (células/enzimas livres ou imobilizadas), forma de agitação), por esse motivo foi proposta uma classificação geral dos biorreatores, conforme apresentado na figura 3.



Figura 3 - Classificação geral dos biorreatores.

Fonte: Adaptado de (CERRI, 2009)

Quanto ao tipo de agitação, os biorreatores podem ser classificados, principalmente, em: biorreatores com agitação mecânica e biorreatores de agitação pneumática.

Em um biorreator agitado mecanicamente a agitação é promovida por impelidores conectados a um eixo giratório e a aeração é feita pela parte inferior do equipamento. A busca pela otimização das condições dos reatores levou ao desenvolvimento de impelidores, sendo o mais utilizado a turbina de seis pás planas, com aspensor de gás localizado bem abaixo do impelidor (CERRI, 2009).

O biorreator convencional ainda é o mais utilizado no meio industrial. A Figura 4 apresenta o desenho esquemático do biorreator tipo tanque agitado e aerado.

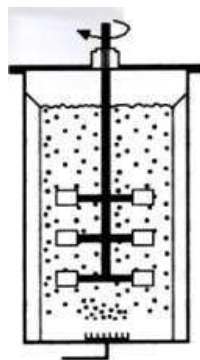


Figura 4 - Desenho esquemático do biorreator tipo tanque agitado e aerado.

Fonte: Adaptado de (CERRI, 2009).

Já os biorreatores agitados de maneira pneumática se caracterizam, basicamente, pela ausência de agitador mecânico, sendo o líquido agitado pelo borbulhamento de gás (normalmente ar). Esse tipo de biorreator vem ganhando espaço na biotecnologia devido a suas altas transferências de oxigênio, menor consumo de energia, facilidade de construção e aumento de escala desse tipo de equipamento, quando comparado aos modelos convencionais de tanque agitado e aerado (CERRI, 2009).

Os tipos principais de biorreatores pneumáticos são os tipos coluna de bolhas e “Airlift” (figura 5).

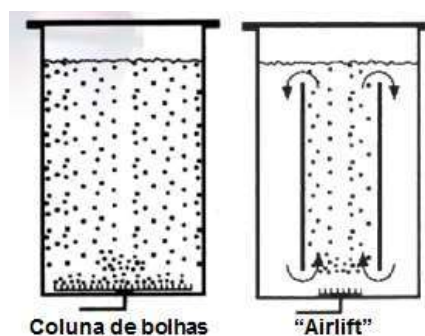


Figura 5 - Desenho esquemático dos biorreatores pneumáticos Coluna de bolhas e “Airlift” respectivamente.

Fonte: Adaptado de (CERRI, 2009).

A diferença básica entre o reator coluna de bolhas e “Airlift”, é que este último tem movimentação cíclica do líquido (bem ordenado) e o primeiro apresenta movimentação aleatória.

### **3.5 Parâmetros que interferem no processo fermentativo**

#### **3.5.1 Influência da Temperatura**

Como as leveduras são, na sua maioria, classificadas como microrganismos mesófilos, em geral, as temperaturas ótimas para sua utilização em processos industriais irão se situar na faixa entre 25 a 37°C. Entre 23 e 33°C o coeficiente de manutenção das leveduras é considerado constante e com o aumento da temperatura de 33°C para 35°C, há uma sensível alteração nesse coeficiente, porém não implica em grande variação no fator de conversão de substrato em célula. Uma explicação para essa faixa de temperatura de 25 a 35°C ser considerada ideal está no fato de que, em temperaturas elevadas, ocorre inibição da síntese de ácidos graxos e esteróis (NEVES, 2003).

#### **3.5.2 Influência do pH**

O pH pode alterar as cargas dos grupos químicos localizados na lateral das cadeias de proteínas provocando uma modificação na rede de cargas em toda estrutura da macromolécula. Uma enzima, por exemplo, pode ter sua capacidade catalítica reduzida ou mesmo perdida devido a essa alteração (NEVES, 2003).

Além disso, a influência do pH está diretamente ligada ao tempo de incubação. A *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de produzir ácidos orgânicos, porém um período longo de incubação pode levar a concentrações mais altas de ácidos, reduzindo, assim, o pH médio e isso gera um impacto negativo no crescimento celular. Por esta razão, para processos com longos períodos de incubação, é recomendado começar com um pH médio mais alto, podendo variar de 4,4 a 5,6 dependendo do tempo de incubação (HODA, GHASEN, *et al.*, 2010).

#### **3.5.3 Influência do Meio de Cultura**

Fontes de carbono e de nitrogênio são muito importantes no cultivo de microrganismos. O modo de aplicação e seleção de fontes de carbono é um dos fatores críticos dos processos fermentativos, pois muitos compostos, especialmente açúcares, podem causar intensa repressão catabólica da síntese de várias enzimas,

além da redução da velocidade de crescimento de determinados microrganismos (NEVES, 2003).

Segundo (SCHIMIDELL, LIMA, *et al.*, 1983) um meio de cultura deve possuir as seguintes características:

- ser o mais barato possível;
- atender as necessidades nutricionais do microrganismo;
- auxiliar no controle do processo, como é o caso de ser ligeiramente tamponado (evitando variações drásticas de pH);
- evitar uma excessiva formação de espuma;
- não provocar problemas na recuperação do produto;
- devem permitir um certo tempo de armazenagem;
- ter uma composição razoavelmente fixa e;
- não causar dificuldades no tratamento do efluente.

Os meios podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Os meios naturais são tecidos ou sumo de plantas ou animais em seu estado nativo, enquanto que os meios sintéticos são preparados com açúcar puro e compostos orgânicos e inorgânicos quimicamente puros. Nos meios sintéticos, a composição química é qualitativa e quantitativamente bem definida (NEVES, 2003).

Um meio de cultura para crescimento microbiano deve conter a proporção correta dos elementos básicos para o crescimento de uma célula (SCHIMIDELL, LIMA, *et al.*, 1983). A ausência ou limitação de fontes de nitrogênio, por exemplo, é o principal fator de influência na inativação dos transportadores de açúcares devido a diversos fatores que terminam por estimular a degradação de proteínas. (NEVES, 2003).

#### **3.5.4 Influência da Agitação e Aeração**

O principal objetivo da agitação em um biorreator é manter a mistura homogeneizada dentro do reator. De forma geral a agitação fornece movimentação ao líquido no auxílio ao processamento físico, químico e a taxa de transporte (SILVA, 2008).

No biorreator “Airlift” a agitação é feita de forma pneumática, proporcionando além da homogeneização, a aeração do ambiente, através da dispersão de bolhas de ar que proporcionam o suprimento de oxigênio aos organismos, o aumento da transferência de calor e massa no meio e a manutenção das células em suspensão (NEVES, 2003).

Para a *Saccharomyces cerevisiae*, o oxigênio tem uma função especial em todo metabolismo, através da cadeia de respiração dentro da mitocôndria ele participa da geração de energia, que influencia no crescimento celular (NEVES, 2003).

O percurso para o transporte do oxigênio desde a bolha de ar até a célula é longo, sendo afetado por uma série de resistências, porém quando é proporcionada uma aeração ideal no reator consegue-se minimizar essas resistências ao transporte do oxigênio através do meio de cultura (SCHIMIDELL, LIMA, *et al.*, 1983).

#### 4. Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório Biotecnológico do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João Del-Rei – *Campus* Alto Paraopeba, localizado na cidade de Ouro Branco/MG.

No total foram feitos cinco experimentos, todos utilizando a levedura liofilizada *Saccharomyces Cerevisiae* UFLA CA-11.



Figura 6 – Levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFLA (CA-11).

Fonte: Arquivo Pessoal

Em cada experimento realizado houve a modificação de determinadas condições experimentais para avaliação do comportamento do crescimento celular das leveduras em diferentes condições de cultivo.

Em todos os experimentos o volume de trabalho do biorreator foi de 4,5 litros e as amostras foram recolhidas, nas primeiras 3 horas, de 30 em 30 minutos e posteriormente, de hora em hora. As amostras foram retiradas com o auxílio de uma pipeta graduada e uma pêra.

Os nutrientes essenciais presentes no meio de cultura, bem como a referência dos valores de concentrações foram usados com base na literatura e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do meio de cultivo usado no biorreator.

| <b>Composição</b>                                                                          | <b>Peso Molecular</b> | <b>Concentração mássica (g/L)</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| <b>D-Glicose anidra (Dextrose) P.A. – A.C.S (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)</b> | 180,16                | 7,0                               |
| <b>Extrato de Levedura Puríssima</b>                                                       | Não possui            | 2,5                               |
| <b>Sulfato de Amônia (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub></b>                       | 132,14                | 4,5                               |
| <b>Fosfato de Potássio Monobásico anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>                | 136,09                | 5,0                               |
| <b>Sulfato de Magnésio MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>                                | 246,48                | 0,25                              |

Os meios de cultivo para os inóculos dos experimentos 2 e 3 foram preparados juntamente. Foi produzido 1 litro de meio, devidamente autoclavado e posteriormente refrigerado. Já os meios de cultivo dos experimentos 4 e 5 foram realizados no mesmo dia do experimento, não sendo autoclavados, nem refrigerados.

Para preparação do inóculo, usado no experimento 2, (figura 7) retirou-se 300 mL do meio de cultura produzido previamente (após 24 horas de preparo), adicionando 1 g/L de levedura. Para ativação desse inóculo, aguardou um período de 2 horas.



Figura 7 – Inóculo devidamente preparado. a) Antes da ativação e b) Ativado.

Fonte: Arquivo Pessoal

Para preparação do inóculo usado no experimento 3 retirou-se, também, 300 mL do meio de cultura, estando preparado há 48 horas, adicionando 1g/L de levedura. Para ativação desse inóculo, aguardou, também, um período de 2 horas.

Todos os experimentos foram realizados em um biorreator do tipo “Airlift” (figura 8a), sendo o fluxo de ar gerado por um compressor que mantinha a pressão a um valor constante de 5 Kgf/cm<sup>2</sup> (figura 8b).



Figura 8 – a) Biorreator “Airlift” em funcionamento. b) Medidor de vazão de ar fixado em 5 Kgf/cm<sup>2</sup>.

Fonte: Arquivo Pessoal

O reator também possuía uma jaqueta conectada a um banho-maria que permitia controlar a temperatura do meio. O banho-maria foi ajustado para 36°C durante os experimentos.

Para determinação da concentração celular foi realizado a comparação das massas secas obtidas das amostras retiradas ao longo do experimento. Utilizou-se tubos de centrifugação tipo Falcon para pesagem dessas massas. Esses tubos foram previamente secos em uma estufa, a 50°C (figura 9).



Figura 9 – Display da Estufa apontando a temperatura de 50°C.

Fonte: Arquivo Pessoal

No decorrer do experimento esses tubos eram pesados, em uma balança analítica, e recebiam uma marcação referente ao horário retirado da amostra. Depois de receberem o volume da amostra retirada estes eram resfriados a 4°C e posteriormente, levados para uma centrífuga que operava a 5000 rpm, por 20 minutos (figura 10).



Figura 10 – Centrífuga Refrigerada SL 701, usada para acelerar o processo de sedimentação do material celular gerado no experimento.

Fonte: Arquivo Pessoal

O objetivo de centrifugar a amostra era acelerar o processo de sedimentação das células, sendo possível retirar a parte sólida, contendo a massa celular, da parte líquida (sobrenadante), contendo o substrato. Os tubos Falcon, contendo somente a parte sólida, foram colocados novamente na estufa a 50°C, por uma semana. Ao final desse período, esses tubos foram retirados da estufa e novamente pesados, em uma balança analítica, sendo anotadas as massas obtidas. A diferença da massa inicial e final de cada tubo seria entendida como a massa celular obtida no decorrer do experimento, sendo, dessa forma, possível construir gráficos do crescimento celular, em gramas, pelo tempo.

## 5. Resultados e Discussão

No intuito de avaliar qual seria a melhor condição experimental para realizar o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados 5 experimentos com diferentes condições de cultivo, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Condições experimentais dos experimentos realizados.

| Experimento | Adição de inóculo | Correção de pH | Monitoramento (pH e Temperatura) | Amostra retirada para avaliação |
|-------------|-------------------|----------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1           | Não               | Não            | Sim                              | 15 mL                           |
| 2           | Sim               | Não            | Não                              | 15 mL                           |
| 3           | Sim               | Não            | Não                              | 15 mL                           |
| 4           | Sim               | Não            | Não                              | 25 mL                           |
| 5           | Sim               | Sim            | Somente pH                       | 25 mL                           |

Conforme descrito na Tabela 2, o experimento 1 foi realizado sem a ativação prévia do inóculo, tendo a adição da levedura sendo realizada juntamente com o meio de cultivo preparado para o biorreator. Houve o monitoramento do pH e temperatura ao longo de todo crescimento e os valores obtidos foram plotados em um gráfico, conforme apresentado na figura 11.

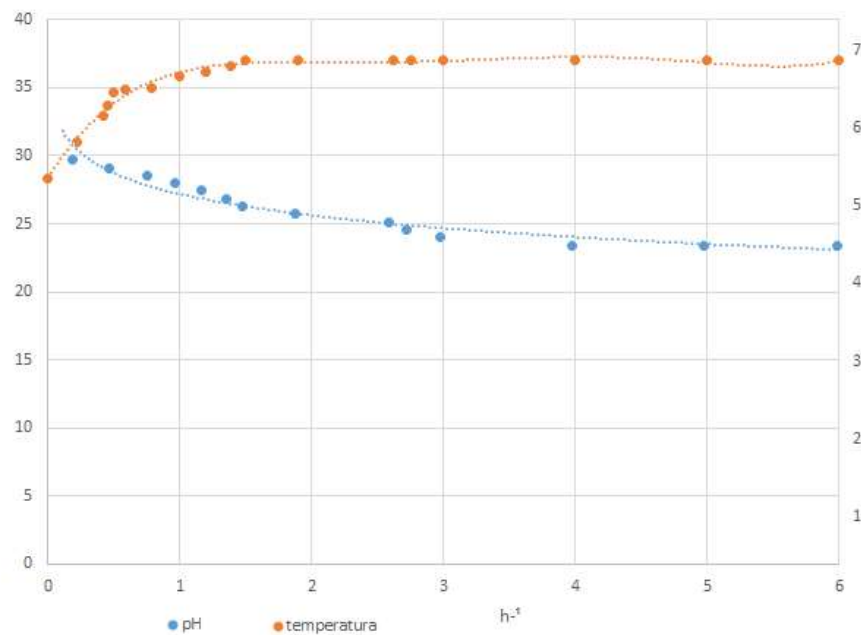


Figura 11 – Valores de pH e temperatura obtidos ao longo do experimento 1.

Como pode se observar a temperatura se manteve em 36°C a partir de 1 hora de cultivo, e como a *S. cerevisiae* é considerada uma levedura mesófila essa temperatura é considerada ótima para seu crescimento.

Ao analisar os valores de pH percebe-se que no início do experimento o cultivo se apresentava com um pH próximo à neutralidade (pH 6) e de acordo com a literatura as leveduras possuem um pH considerado como ótimo em torno de 4,0 a 6,5, sendo que quanto mais ácido, melhor o seu crescimento (TORTORA *et al.*, 2003).

De acordo com o gráfico o pH foi sofrendo variações no decorrer do experimento, se tornando mais ácido e próximo de 4,5 a partir de 2 horas de cultivo, permanecendo nessa faixa até o final do processo. Como não foi realizada nenhuma correção externa do pH, pode-se dizer que essa variação foi ocasionada pelos produtos extracelulares produzidos pelas próprias leveduras, para que as mesmas se adaptassem ao meio.

O gráfico relativo ao crescimento celular versus tempo, obtido do experimento 1 pode ser visualizado na figura 12.

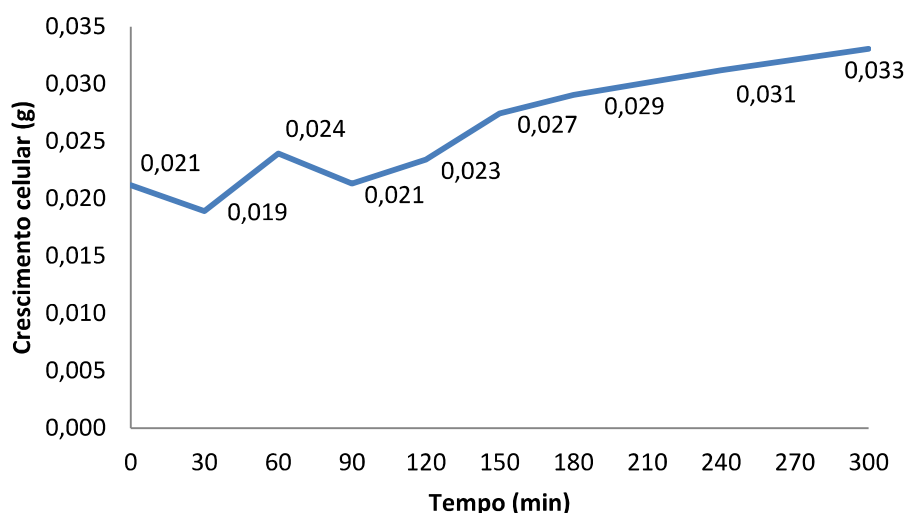


Figura 12 – Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 1.

É possível verificar que nas primeiras 2 horas de experimento o crescimento celular das leveduras estava oscilando, na tentativa de se adaptarem ao meio onde foram adicionadas. Esse comportamento é típico da fase lag, quando ocorre a adaptação dos microrganismos ao meio de cultivo que se encontram.

Após 2 horas e meia de cultivo observa-se que as leveduras possuem um crescimento celular gradativo, porém em quantidades relativamente baixas, não demonstrando um crescimento exponencial esperado para a segunda fase de crescimento.

A partir desse comportamento observado no crescimento celular das leveduras pode-se dizer que realizar um cultivo, sem a preparação prévia de um inóculo, pode onerar o processo produtivo, uma vez que para atingir uma quantidade específica de células seria preciso um maior tempo de cultivo.

Além disso, esse resultado ratifica a importância do preparo do inóculo, uma vez que as leveduras, previamente ativadas, já chegam ao biorreator devidamente adaptadas ao meio de cultivo, podendo alcançar a fase exponencial de crescimento logo no início do processo.

Por verificar a importância do uso do inóculo, o experimento 2 já teve o preparo prévio do inóculo, esperando um tempo de 2 horas para ativação das leveduras. O meio de cultivo usado para o inóculo continha a mesma composição do meio de cultivo do biorreator, sendo as proporções utilizadas conforme descrito na literatura e apresentado na tabela 1.

Como foi observado no experimento 1 que a temperatura se mantinha próxima aos 36°C e que as próprias leveduras corrigiam o pH do meio, optou-se por não acompanhar esses parâmetros no experimento 2.

O gráfico obtido no experimento 2 referente ao crescimento celular versus tempo pode ser visualizado na figura 13.

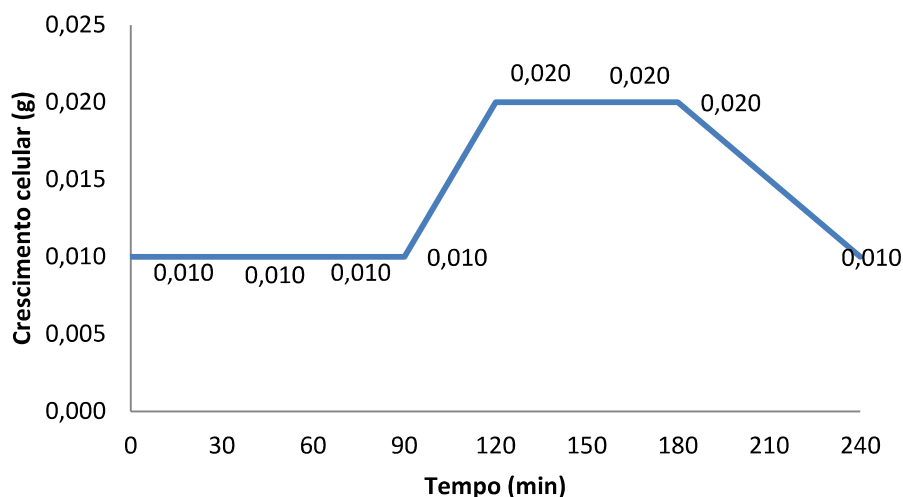


Figura 13 – Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 2.

Ao avaliar a figura 13 percebe-se que o gráfico representou o crescimento das leveduras nas diferentes fases que caracterizam o seu crescimento celular: fase lag, exponencial, estacionária e de declínio, porém com valores baixos de crescimento celular.

Uma hipótese a ser considerada para esses baixos valores é a quantidade de volume retirado para avaliação estar insuficiente. Estavam sendo pipetados 15 mL do meio de cultivo para avaliação, e essas amostras podiam conter pequenas concentrações de células por volume, não demonstrando, assim, o crescimento celular de maneira efetiva.

As leveduras permaneceram na fase lag nas primeiras 1 hora e meia de cultivo. Como as leveduras tinham sido ativadas previamente, esperava-se que esses microrganismos, ao serem introduzidos no biorreator, já tivessem adaptados ao meio, uma vez que o meio de cultivo do inóculo e do biorreator eram os mesmos, porém isso não aconteceu.

A fase de crescimento exponencial foi representada entre 1 hora e meia e 2

horas de cultivo e após esse período, os microrganismos se mantiveram na fase estacionária, até completarem 3 horas de cultivo. Após esse tempo o cultivo entrou na fase de declínio, caracterizada pela diminuição do número de células devido ao esgotamento de nutrientes presentes no meio.

Embora os microrganismos tenham conseguido apresentar todas as fases do crescimento no experimento 2, o tempo gasto na fase lag não foi conforme esperado, uma vez que tinha sido preparado o inóculo previamente.

Por esse motivo, optou-se por repetir, no experimento 3, as mesmas condições de cultivo do experimento 2 para uma nova avaliação do tempo gasto, na fase lag, com introdução do inóculo. Foi usado o mesmo meio de cultivo do biorreator, conforme a proporção seguida da literatura, porém com o meio autoclavado e resfriado após 48 horas do seu preparo. Esse meio foi levado para um banho-maria com o intuito de aumentar a sua temperatura e adicionado 1 g/L de leveduras para que ocorresse a ativação prévia desses microrganismos.

O resultado do crescimento celular alcançado no experimento 3 pode ser observado na figura 14.

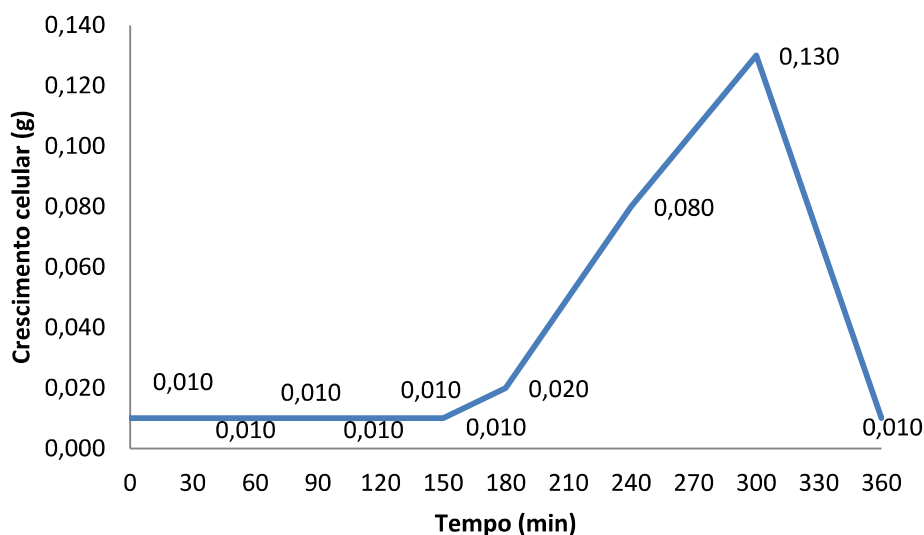


Figura 14 – Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 3.

Pelo gráfico pode-se observar que a fase lag, durou 2 horas e meia nesse experimento, tendo um aumento de 1 hora quando comparado ao experimento 2. Esse comportamento não era o previsto, sugerindo, como hipótese, que o preparo

do inóculo não estava sendo realizado de maneira adequada para obtenção dos resultados esperados (uma diminuição ou ausência de fase lag no crescimento avaliado no biorreator). Além disso, o gráfico demonstrou um crescimento de células, que seria correspondente à fase exponencial, maior que do experimento 2, não tendo fase estacionária e atingindo a fase de declínio, logo após o crescimento máximo pelas células.

Ao avaliar a etapa considerada como fase exponencial, as células tiveram um crescimento importante no período entre 3 e 5 horas de cultivo. Esse resultado pode ser considerado como sendo bom para avaliação de crescimento celular, mas não o suficiente para se obter um rendimento estimado como ótimo.

Por esse motivo, no experimento 4, optou-se por modificar o meio de cultivo do inóculo, utilizando apenas glicose e extrato de levedura como componentes do meio, mantendo as proporções de cada componente de acordo com a descrição da referência usada na literatura, e aumentando a concentração de leveduras de 1 g/L para 16 g/L. Além disso, o volume da amostra retirada para avaliação do crescimento celular passou de 15 mL para 25 mL.

Com as modificações realizadas no experimento 4, conseguiu-se atingir os resultados conforme apresentados na figura 15.

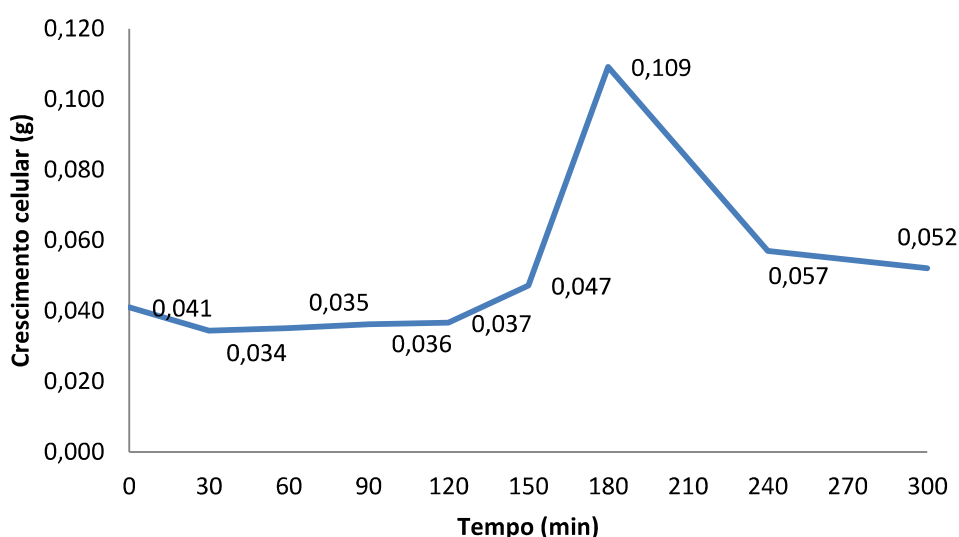


Figura 15 – Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 4.

Pelo gráfico é possível verificar que a fase lag durou em torno de 2 horas, conseguindo diminuir em 30 minutos o tempo dessa fase, quando comparado ao experimento 3.

A fase de crescimento celular, que pode ser comparada à fase exponencial, foi iniciada após 2 horas de cultivo, porém tendo como duração apenas 1 hora, sendo que logo após houve o decréscimo das células. Isso pode ter sido ocasionado devido a alta quantidade de leveduras presentes no inóculo (16 g/L), que degradou muito rapidamente o substrato presente no meio, não representando um cenário positivo que se espera para um crescimento celular.

Além disso, utilizou-se uma quantidade maior de inóculo e não conseguiu atingir um valor, em gramas, igual ou maior de massa de crescimento celular quando comparado ao experimento 3, pelo contrário, o valor obtido foi inferior ao experimento anterior.

Na tentativa de conseguir atingir uma condição favorável para o crescimento da *S. cerevisiae*, utilizou-se no experimento 5 a mesma composição do meio de cultivo (glicose e extrato de levedura) usada no experimento 4, porém com uma concentração menor de inóculo, 8 g/L. Além disso, optou-se por corrigir o pH do meio de cultivo do biorreator, na tentativa de tornar as condições do meio ideais para o crescimento das leveduras. Para corrigir o pH adicionou-se 0,1 mL de Ácido Sulfídrico 98% ( $H_2S$ ) por litro de meio, tornando-o próximo de 4,5, que é o pH considerado ótimo para as leveduras. Optou-se pelo uso desse ácido, pois o  $H_2S$  dissolvido em água comporta-se como um ácido inorgânico fraco, formado pela ionização do  $H_2S$  em água.

Os valores obtidos no experimento 5 estão demonstrados na figura 16.

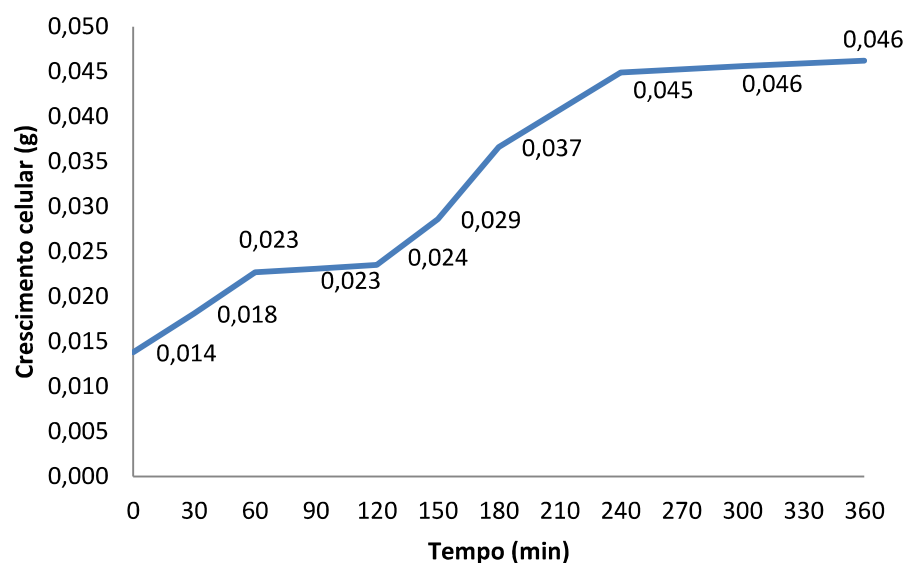


Figura 16 – Gráfico do crescimento celular versus tempo obtido a partir do experimento 5.

Pelos resultados obtidos no gráfico, pode-se observar um crescimento celular das leveduras logo no início do processo, sugerindo que a fase lag, que seria necessária para uma adaptação dos microrganismos ao meio não foi necessária, e esse resultado era o que se desejava.

Além disso, no decorrer de todo o processo percebe-se um aumento gradual da quantidade de células, podendo ser comparado a fase exponencial de crescimento, sendo que após 5 horas de cultivo o crescimento atingiu a fase considerada como estacionária, permanecendo nela até o final do cultivo.

Com os resultados apresentados, pode-se dizer que, sob essas condições experimentais aplicadas ao experimento 5, é possível conseguir um crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* considerado como favorável, podendo ter uma boa rentabilidade ao processo produtivo.

## 6. Conclusão

O intuito do trabalho foi analisar diferentes condições experimentais de cultivo, de forma empírica, para verificar qual das condições testadas seria considerada a mais favorável para aplicação em um processo que tinha como produto o crescimento da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ao avaliar se a temperatura influenciou o processo, pode-se dizer que os

experimentos foram realizados a uma temperatura próxima de 36°C, estando essa temperatura dentro da faixa considerada como ótima para o crescimento das leveduras.

Ao realizar a avaliação da influência do pH do meio de cultivo percebeu-se que as próprias leveduras corrigiam o pH, fazendo com que ele se aproximasse de uma condição ótima para seu crescimento (pH próximo de 4,5). Porém, quando se realizou uma correção externa com o uso do Ácido Sulfídrico, as leveduras já encontraram um meio de cultura considerado ideal, não precisando, portanto, se adaptarem ao meio. Com isso, o cultivo se iniciou na fase considerada como exponencial, e essa condição é muito favorável para um processo que tenha como produto a biomassa.

O uso do inóculo também se mostrou como uma opção positiva, uma vez que a ativação prévia dos microrganismos reduz o tempo gasto para adaptação ao meio de cultivo. Foi importante considerar, também, qual a concentração de microrganismos que deve ser usada no inóculo e qual os componentes do meio de cultura deverão ser usados. No caso do presente trabalho, chegou-se a conclusão que um meio contendo glicose e extrato de leveduras já é o suficiente para se alcançar uma boa ativação das leveduras, sendo a concentração de 8 g/L de microrganismos no inóculo considerada satisfatória.

Sabe-se que a transferência de oxigênio para o meio é considerada como um dos fatores mais críticos na operação de um biorreator, em processos aeróbios, porém no caso desse experimento esse parâmetro não foi avaliado, sendo o valor de 5 Kgf/cm<sup>2</sup> o valor usado em todos os experimentos.

Por fim, ao realizar os diferentes experimentos, observou-se que um cultivo de leveduras, realizado em 6 horas, utilizando um inóculo para ativação prévia dos microrganismos, tendo uma temperatura próxima à 36°C e um pH do meio de cultura corrigido para 4,5, com uma taxa de transferência de oxigênio em torno de 5 Kgf/cm<sup>2</sup> pode ser considerada uma condição experimental positiva quando se deseja trabalhar com uma cultura de leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, tendo como produto o acúmulo de biomassa.

## 7. Referências Bibliográficas

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.) **Biotecnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2. p. 123-178, 2001.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. UFSCAR. São Carlos, p. 6 a 8. 2009.

HODA, S. et al. Optimal growth of *Saccharomyces Cerevisiae* (PTCC24860) on pretreated molasses for the ethanol production: the application of the response surface methodology. **Scientific Paper CI&CEQ**, 199 a 206, 2010.

INGLEDEW, W. M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: (Ed.). The alcohol textbook. 3rd. ed: UK: Nottingham University Press. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, 1999.

LOPES, J. J. C. Centro de Ciências Agrárias UFSCar. **UFSCar**, 2017. Disponível em: <[www.cca.ufscar/~vico/2%20monitoramento/3%20LEVEDURAS.pdf](http://www.cca.ufscar/~vico/2%20monitoramento/3%20LEVEDURAS.pdf)>. Acesso em: 05 de Dezembro de 2017.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando “*saccharomyces cerevisiae*”**. USP. São Paulo. 2003.

OLIVEIRA, A. R. M. **Aplicação de delineamentos fatoriais e metodologia da superfície de resposta para otimização de meio de cultura**. UFSJ. Ouro Branco. 2013.

PEREIRA Jr., N. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, Séries em Biotecnologia, v. 1, 436 p. 2008.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: (Ed.). THE ALCOHOL TEXTBOOK. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries: UK: Nottingham University Press. Understanding yeast fundamentals, 2003.

SCHIMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., v. II, 1983.

SILVA, R. G. **Operações unitárias**: transporte de fluidos. São Carlos: UFSCar, 2008.

SODRÉ, U. **Modelos matemáticos**. UEL – Londrina, 2007. Disponível em: <http://www.uel.br/projetos/matessencial/superior/pdfs/modelos.pdf>. Acesso: 05 de dezembro de 2017.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 827p, 2003.