



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA – CAP
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

Estudo das variáveis operacionais na otimização de meio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* em Biorreator Coluna de Bolhas.

Maria Joseane Cota

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

Ouro Branco

Junho, 2017

Estudo das variáveis operacionais na otimização de meio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* em Biorreator Coluna de Bolhas.

Maria Joseane Cota

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, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

Ouro Branco

Junho, 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA – CAP
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

Estudo das variáveis operacionais na otimização de meio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* em Biorreator Coluna de Bolhas.

Maria Joseane Cota

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

Prof. Dr. Edson Romano Nucci
Orientador

Alessandra Costa Vilaça
UFSJ/CAP

Mariana Alves de Almeida
UFSJ/CAP

Ouro Branco, ____/____/____

Resumo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo submetida a diferentes condições de cultivo a fim de se obter um melhor crescimento celular e uma maior produção de produtos de interesse. Deste modo, vem sendo utilizada cada vez mais a otimização das condições de cultivo para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja finalidade é de agregar um alto valor comercial. O planejamento experimental e as análises estatísticas surgem como uma ferramenta importante para alcançar modelos otimizados do processo. Esse trabalho teve como objetivo o estudo das variáveis operacionais na otimização de meio de cultivo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* através da metodologia de superfície de resposta utilizando-se um planejamento fatorial 2^2 e duplicata no ponto central. As variáveis independentes foram: concentração inicial de glicose de (3; 5 e 8g/L) e diferentes valores de aerações de (2, 3 e 4 vvm). Com isso, as variáveis respostas foram: concentração celular em massa em diferentes tempos de cultivo. Para determinar uma melhor cinética de crescimento inicial da levedura foi feito dois cultivos de 6 horas cada, utilizando-se 2 e 4 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*. Obteve-se maior crescimento celular ao se utilizar o cultivo com 2g/L de levedura. Para o trabalho em questão analisou-se a concentração celular nos pontos de 4 e 6 horas de cultivo que é onde chega a fase estacionária de cultivo. A partir dos resultados, obteve-se que no ponto de 4 horas não teve significância estatística, no que diz respeito a glicose e aeração. Já no ponto de 6 horas, 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 concentração de glicose. O ponto de maior significância estatística foi o ponto de 6 horas que obteve-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,97807.

Palavras-chaves: Otimização, *Saccharomyces cerevisiae*, Concentração de glicose, Aeração, Concentração Celular.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae yeast has been submitted to different cultivation conditions in order to obtain better cell growth and higher yield of products of interest. In this way, the optimization of the cultivation conditions for the *Saccharomyces cerevisiae* yeast has been increasingly used, whose purpose is to add a high commercial value. Experimental planning and statistical analysis appear as an important tool for achieving optimized process models. The objective of this experiment was to study the operational variables in the optimization of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cultivation using the response surface methodology also using a factorial planning 2^2 and duplicate in the central point. The independent variables were: initial glucose concentration of (3; 5 and 8 g / L) and different values of aerations (2, 3 and 4 vvm). With this, the responses variables were: mass cellular concentration at different cultivation times. To determine a better initial kinetics of yeast growth two cultivations of 6 hours each were made using 2 and 4 g / L *Saccharomyces cerevisiae*. Greater cell growth was obtained by using the cultivation with 2g / L of yeast. For this experiment in question, the cell concentration was analyzed at the 4 and 6 hour cultivations points, which the stationary cultivation stage arrives. From the results was obtained that in the point of 4 hours did not have statistical significance, regarding to glucose and aeration. At the 6-hour point, the glucose concentration was the statistically significant variable, and the highest concentration was obtained when using 8 g / L of glucose concentration. The point of greatest statistical significance was obtained a correlation coefficient (R^2) of 0, 97807 at the point of 6 hours.

Keywords: Optimization, *Saccharomyces cerevisiae*, Glucose Concentration, Aeration, Cell Concentration.

Lista de ilustrações

Figura 1: Células de <i>S. cerevisiae</i> vistas sob microscopia eletrônica.....	13
Figura 2: Curva da cinética de crescimento para microrganismo.	15
Figura 3: Superfície de resposta da otimização do meio de cultura para produção de ácido clavulânico.....	23
Figura 4: Superfície resposta para o processo químico exemplo, em que os fatores são: temperatura (°C) e pressão (psi), representadas pelas variáveis x_1 e x_2 , respectivamente, e a variável resposta é rendimento (η).....	27
Figura 5: Esquema de um reator encamisado, tipo tanque, destacando seus principais componentes, tais como: agitador, motor, entrada da alimentação e o trocador de calor.	28
Figura 6: Esquema de biorreatores airlift com recirculação interna (a) e externa (b).	29
Figura 7: Esquema de um reator coluna de bolhas.	30
Figura 8: Esquema de um reator de mistura, composto por um tanque com agitador, ressaltando os pontos de alimentação e retirada dos produtos.	31
Figura 9: 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 2g/L de levedura e no Experimento 2, utilizou-se 4g/L.	36
Figura 10: 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.	37
Figura 11: Gráfico de Pareto, obtido através do software Statistica 7.0, para as concentração de glicose e aeração e a interação entre elas.....	39
Figura 12: Gráfico de contorno aeração (vvm) <i>versus</i> concentração de glicose (g/L).....	40
Figura 13: Diagrama dos valores preditos.....	40
Figura 14: Gráfico de Pareto, obtido através do software Statistica 7.0, para as concentração de glicose e aeração e a interação entre elas.....	42
Figura 15: Gráfico de contorno aeração(vvm) <i>versus</i> concentração de glicose (g/L) num tempo de cultivo de 6 horas.....	44

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição média da célula de fermento (%).....	13
Tabela 2: Valores dos níveis inferior (-1), superior (+1) e ponto central (0) utilizados para a realização do planejamento experimental.....	33
Tabela 3: Concentrações de glicose (g/L) e aerações (vvm), utilizadas para realização do planejamento experimental.....	34
Tabela 4: Concentração de células, em g/L, para os experimentos 1 e 2, em que utilizou-se 2 g/L para o experimento 1 e 4 g/L para o experimento 2.....	35
Tabela 5: Matriz experimental para os níveis codificados das variáveis independentes "concentração de glicose" e "aeração" e valores da concentração (g/L) no tempo de 4 e 6 horas de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em biorreator Coluna de Bolhas para cada ensaio.....	38
Tabela 6: Estimativa dos efeitos, valores de t e p e erros-padrão.....	38
Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> no tempo de 4 horas de cultivo.....	39
Tabela 8: Estimativa dos efeitos, valores de t e p e erros-padrão.....	41
Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> no ponto de 6 horas de cultivo.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Saccharomyces cerevisiae	12
3.1.1	Características.....	12
3.1.2	Respiração celular.....	14
3.1.3	Cinética de Crescimento	15
3.1.4	Condições de Cultivo	16
3.1.5	Fermentação Alcoólica.	19
3.2	Planejamento Experimental	21
3.2.1	Planejamento com Fator Único	23
3.2.2	Planejamento Fatorial	24
3.2.3	Superfície de Resposta.....	26
3.3	Biorreatores.....	27
3.3.1	Biorreatores em batelada ou descontínuos	28
3.3.2	Biorreatores contínuos.....	30
3.3.3	Biorreatores semicontínuos	31
4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	31
4.1	Microrganismo.....	32
4.2	Condições de cultivo	32
4.3	Cálculo da Concentração Celular	32
4.4	Determinação da concentração inicial de levedura	32
4.4.1	Preparo do meio de cultivo.....	32
4.4.2	Acompanhamento da Concentração Celular	33
4.5	Planejamento Experimental	33
4.5.1	Preparo do meio de cultivo	33
4.5.2	Coleta das amostras	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Determinação da concentração inicial de levedura	35
5.2	Procedimento Experimental	37
6	CONCLUSÃO.....	44

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
----------	---	-----------

1 INTRODUÇÃO

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura aeróbia facultativa, no qual os produtos finais do metabolismo do açúcar dependerão das condições ambientais em que o microrganismo se encontra. Portanto, em aerobiose, o açúcar é metabolizado em CO₂ e água, lesionado de um grande crescimento em biomassa, enquanto que, em anaerobiose, a maioria da fonte de carbono, é convertida em etanol e CO₂, ocasionando na fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001).

A espécie *S. cerevisiae* vem sendo utilizada desde milhares de anos atrás na panificação e produção de bebidas alcoólicas fermentadas. Hoje em dia, ela vem sendo amplamente empregada 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. Devido a essas aplicações, ela também se destaca pelo seu uso como organismo modelo para desenvolvimento de pesquisas laboratoriais, bem como na produção de proteínas heterólogas. São diversas as possibilidades de aplicações dessa levedura, com isso confirma a importância que este organismo possui, tanto para a indústria quanto para a pesquisa (LIMA et al., 2013).

As leveduras possuem características comuns que as tornam atrativas para os 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).

Os microrganismos em geral 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, concebem economia e redução significativa no tempo do processo, além de melhorarem o rendimento em produto (VICENTE; DLUHY; TEIXEIRA, 1999).

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

Devido a necessidade em relação a otimização de produtos e processos com o objetivo de minimizar custos e tempo e ao mesmo tempo maximizar rendimento e qualidade dos produtos, vários autores têm relatado experimentos utilizando a metodologia de superfície de resposta obtida planejamento experimental (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Métodos de superfície de resposta são usados para determinar a relação entre os fatores/parâmetros de um experimento por meio de uma expressão matemática. Um desenho fatorial é usualmente aplicado para determinar os fatores significativos a um experimento, e geralmente mostra uma curvatura na superfície de resposta. Superfícies de resposta são também empregadas para obter as condições operacionais que promovam resultados ótimos em um experimento (KAYMAZ; MCMAHON, 2005; PAVAN et al., 2007).

A técnica de Planejamento Experimental tem sido utilizada muito atualmente, pelo fato dos ótimos resultados obtidos tais como: a 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 valores desejado e redução da variação do processo, sendo que, utiliza-se uma faixa considerável e previamente conhecida de variação dos fatores. Além disso, o planejamento experimental indica o grau de interação entre as variáveis envolvidas no processo, e por fim permite calcular o erro experimental, minimizando o número de experimentos a serem realizados (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Existem várias técnicas de planejamento experimental disponíveis atualmente 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 (MONTGOMERY, 2013; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Com base no exposto, o presente estudo apresenta uma breve revisão sobre a espécie *S. cerevisiae*. Apresenta também uma discussão sobre as técnicas de Planejamento Experimental acessíveis atualmente, destacando suas principais características e diferenças entre cada uma delas e sobre biorreatores, destacando a classificação dos mesmos com base no funcionamento de cada. E 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 crescimento deste microrganismo em diferentes concentrações de glicose e diferentes valores de aerações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica das principais variáveis que influenciam o processo fermentativo;
- Empregar a metodologia de Planejamento Experimental 2^2 para determinar a ação das variáveis concentração de glicose e aeração nas variáveis resposta;
- Determinar a associação entre as variáveis concentração de glicose e aeração;
- Determinar a condição ótima de cultivo de *S. cerevisiae*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.1 Características

As células de levedura apresentam normalmente uma forma oval, com tamanhos compreendidos entre 4-8 μm x 5-18 μm . A caracterização dos componentes celulares compreende mais de doze microestruturas, com destaque para a parede celular, membrana citoplasmática, retículo endoplasmático, mitocôndrias, ribossomo, núcleo, vacúolos e inclusões diversas como glicogênio, lipídeos e pigmentos (FERREIRA, 1995).

Os componentes celulares compreendem mais de doze microestruturas, destacando a parede celular, membrana citoplasmática, retículo endoplasmático, mitocôndrias, ribossomo, núcleo, vacúolos e inclusões diversas como glicogênio, lipídeos e pigmentos (FERREIRA, 1995). A Tabela 1 mostra a composição média da célula de levedura, sendo o teor de água

aproximadamente de 70%. O restante do teor de levedura é constituído de proteínas, carboidratos, lipídeos e cinzas (POSTEN; COONEY, 1991).

Tabela 1: Composição média da célula de fermento (%)

Componente	Proporção (%)
Água	70
Proteína	15
Carboidrato	10,5
Lipídeos	1,5
Cinza	3

Fonte: Fleischmann (2004)

Na Figura 1, pode-se observar células de *S. cerevisiae* vistas sob microscopia eletrônica. As células de *S. cerevisiae* são elípticas e possuem aproximadamente 3 μm de diâmetro, possuem 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, fonte de carbono é convertida em gás carbônico e etanol, através da fermentação alcoólica (LIMA et al., 2013).

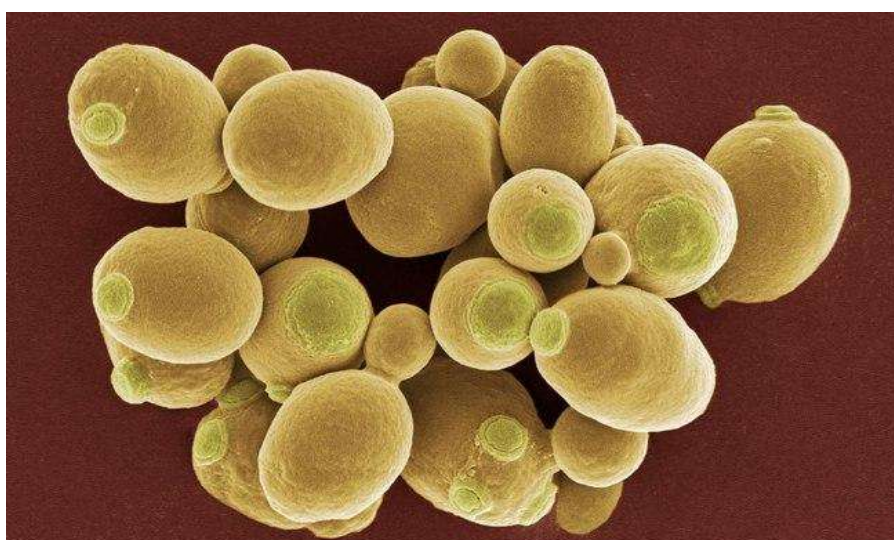


Figura 1: Células de *S. cerevisiae* vistas sob microscopia eletrônica.

Fonte: GREGO (2011).

A levedura *S. cerevisiae* é considerada um microrganismo modelo metabólico, molecular e genético para eucariotos, pelo fato dessa levedura ser de fácil manipulação, são consideradas seguras e pelo fato do seu genoma conhecido, ou seja, sequenciado, com isso, faz com que esse microrganismo seja utilizado no desenvolvimento de novos processos, sendo cultivados em escala industrial. (MIGUEL, 2006).

A *S. cerevisiae* têm gerado, um alto interesse comercial, principalmente na produção de bioetanol, isso porque são capazes de sobreviver em ambientes que apresentem alta concentração deste composto, característica esta que é dificilmente observada em outros microrganismos. Essa levedura pode também ser utilizada na indústria de alimentos, como na panificação e produção de bebidas (vinho, cerveja e cachaça) e na indústria farmacêutica para produção de vacinas e proteínas (ALBUQUERQUE, 2007).

3.1.2 Respiração celular

Para as leveduras obterem energia, utilizam tanto o processo fermentativo, quanto a respiração. A energia obtida está na forma de ATP (trifosfato de adenosina), que ao perder um grupo fosfato se transforma em ADP, que, por sua vez, pode ser re-fosforilado. Com relação ao rendimento energético, a via respiratória que acontece em condições aeróbica, é mais vantajosa para as leveduras, uma vez que, nesta via se produz 19 vezes mais ATP que na via fermentativa, que acontece em condições em anaeróbica (CRUZ, 2015).

A respiração aeróbica é uma etapa essencial no processo de degradação das moléculas orgânicas, mas quando as moléculas orgânicas inicial é reduzida a produtos que praticamente não tem mais energia a liberar. A respiração aeróbica é muito mais eficiente que a fermentação em termos energéticos. Há liberação de 38 moléculas de ATP para cada molécula de glicose degradada, uma quantidade, portanto, dezenove vezes maior que a liberada na fermentação. De acordo com Souza (2009), as reações químicas que representam as vias fermentativa e respiratória podem ser representadas assim:

Via Fermentativa



Via Respiratória



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

Dependendo se um organismo é aeróbio ou anaeróbio, existem dois tipos de respiração. Na respiração aeróbia o aceptor final de elétrons é o oxigênio. Na respiração anaeróbia o aceptor final de elétrons é uma molécula inorgânica que não o oxigênio molecular ou raramente uma molécula orgânica (TORTORA et al., 2005; PEREIRA JR. et al., 2008).

3.1.3 Cinética de Crescimento

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

Após o microrganismo ser inoculado em um meio de cultura favorável ao seu crescimento, sob temperatura controlada e agitação adequada, seu comportamento nos valores de concentração celular variam com o passar do tempo.

O crescimento de microrganismo pode ser representado pela curva de crescimento, apresentada na Figura 2, onde se tem as fases lag, exponencial, estacionária e de morte celular (MACHADO,1999).

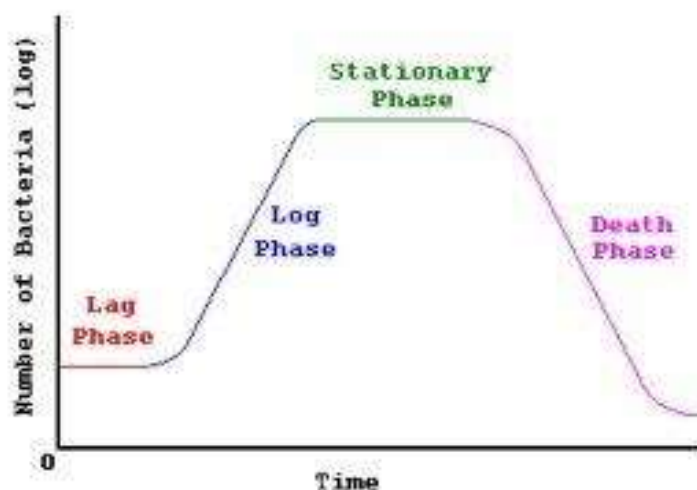


Figura 2: Curva da cinética de crescimento para microrganismo.

Fonte: Adaptado de WHITE, DRUMMOND e FUQUA (2011).

Inicialmente, tem-se a fase lag, que ocorre, normalmente, após as células que estavam em fase estacionária serem transferidas para um novo meio. Esta fase pode ser considerada uma fase de adaptação fisiológica das células antes do seu crescimento, e pode ocorrer por diversos motivos, entre eles: tempo necessário para células se recuperarem 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 ocorrido, 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.

3.1.4 Condições de Cultivo

Para o cultivo de microrganismos devem-se conhecer suas características e propriedades, para isto é necessário determinar seu crescimento e monitorar suas conversões. São utilizados nutrientes como fonte de carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio, vitaminas e sais minerais (PEREIRA JR. et al., 2008).

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, uma vez que, são 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 (PEREIRA; BON; FERRARA, 2008).

Diversos 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)

3.1.4.1 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).

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 consequentemente 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).

3.1.4.2 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 no metabolismo celular, 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 melaço como substrato e em temperatura de 30°C era de 5,5.

3.1.4.3 Agitação e Aeração

A aeração consiste na injeção de gás oxigênio no reator, o que promove, também, 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 a água, participa da reoxidação de coenzimas envolvidas na

glicólise e permite 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 moles 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. Isto porque a agitação elevada pode causar morte celular por rompimento da membrana ou parede da célula.

3.1.4.4 Composição do meio de cultivo

Meios de cultivo devem conter 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 diversas fontes, desde os aminoácidos e amônia até fontes mais complexas, como ácidos nucléicos (MIGUEL, 2006).

O fósforo somente é absorvido na forma de KH_2PO_4^- e participa da composição dos fosfolípidos de membrana e ácidos nucléicos. Já o enxofre é o constituinte de aminoácidos e algumas vitaminas e, geralmente, está presente em meios de cultivo sob a forma de KH_2PO_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 aeróbicas. 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 Crabtree e ocorre, pois, a glicose provoca a inibição da cadeia respiratória e de enzimas envolvidas na via glicolítica, como desidrogenases, provoca 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. Isto ocorre porque 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.

3.1.5 Fermentação Alcoólica

A fermentação pode ser definida como um conjunto de reações controladas por enzimas, onde libera energia através de uma molécula orgânica que é degradada em compostos mais simples. A glicose é uma das substâncias mais empregadas como combustível energético para a fermentação, porém proteínas e gorduras também podem ser utilizadas. Para cada molécula de glicose degradada são liberados 2ATP's. Embora a maioria dos seres vivos utilize a respiração como meio de obtenção de energia, as reações básicas da glicólise estão acopladas ao processo respiratório (SOUZA, 2009).

A *Saccharomyces cerevisiae* cresce em glicose por vias metabólicas diferentes, sendo 3 principais, dependendo das condições do meio de cultura. Quando há alta concentração de glicose ou quando não há oxigênio ocorre a fermentação da glicose ou crescimento fermentativo com produção de etanol e gás carbônico. Esta etapa apresenta um saldo de dois moles de ATP por mol de glicose, sendo pouco eficiente (SOUZA, 2009).

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 por exemplo, 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 carbônico e ATP (CRUZ, 2015).



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

3.1.5.1 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Existem diversos fatores que afetam 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 citar: pH, temperatura e concentração de etanol no meio (SOUZA; MONTEIRO, 2012).

3.1.5.1.1 pH

Quando a fermentação acontece utilizando-se a espécie *S. cerevisiae*, o pH deve estar em torno de 4,5. Uma vez que a maioria dos microrganismo 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 aconteça está entre 4 e 5,5 (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).

3.1.5.1.2 Temperatura

A temperatura ideal 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 enfraquece o surgimento de bactérias e ainda faz com que as leveduras fiquem mais resistentes ao etanol no final do processo (CRUZ, 2015; JUNIOR, 2013).

3.1.5.1.3 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 por exemplo, 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).

3.2 Planejamento Experimental

O método de planejamento fatorial associado a análise por superfície de resposta é uma técnica de otimização que permite tratar grandes números de variáveis com um número mínimo de ensaios, economizando tempo e recursos financeiros. A vantagem de utilizar a metodologia de planejamento experimental reside no fato de tornar possível auferir informações sobre o estado metabólico do cultivo, detectar problemas e permitir ações que busquem as possíveis melhorias para o bioprocessamento em estudo.

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

É essencial que o executor do planejamento tenha conhecimento técnico do processo. Pelo fato de que, para a execução do planejamento experimental deve-se fazer testes, em que as variáveis de entrada, sejam modificadas dentro de uma faixa considerável. Após a obtenção

da resposta, pode-se relacionar qual a influência da variação de determinado fator na resposta de interesse (TAHARA,2008).

Primeiro passo quando se realiza um planejamento experimental, deve-se, determinar os fatores e as respostas de interesse que serão analisados, tal 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).

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 (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

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).

Os planejamentos experimentais podem ser feitos utilizando uma grande gama de delineamentos fatoriais. Wang *et al.*, 2005, utilizou em seus estudos dois desses delineamentos, o delineamento fatorial fracionado e o delineamento central composto

rotacional (DCCR) para otimização de meio de cultura para produção de ácido clavulânico. O objetivo de se trabalhar com um delineamento fracionado precedendo um DCCR foi obter um menor número de experimentos, pois inicialmente o autor contava com um total de seis variáveis, e um delineamento completo, como o DCCR, ocasionaria na realização de no mínimo 2^6 experimentos. Com a utilização do delineamento fracionado, o autor testou as variáveis independentes em dois níveis, baixo (-) e alto (+), em um total de 16 experimentos e obteve como resultado que apenas 3 variáveis apresentavam efeitos significativos. Essas 3 variáveis foram otimizadas utilizando o delineamento completo obtendo superfícies de respostas do modelo de otimização do meio de cultura, como pode ser observado na Figura 3.

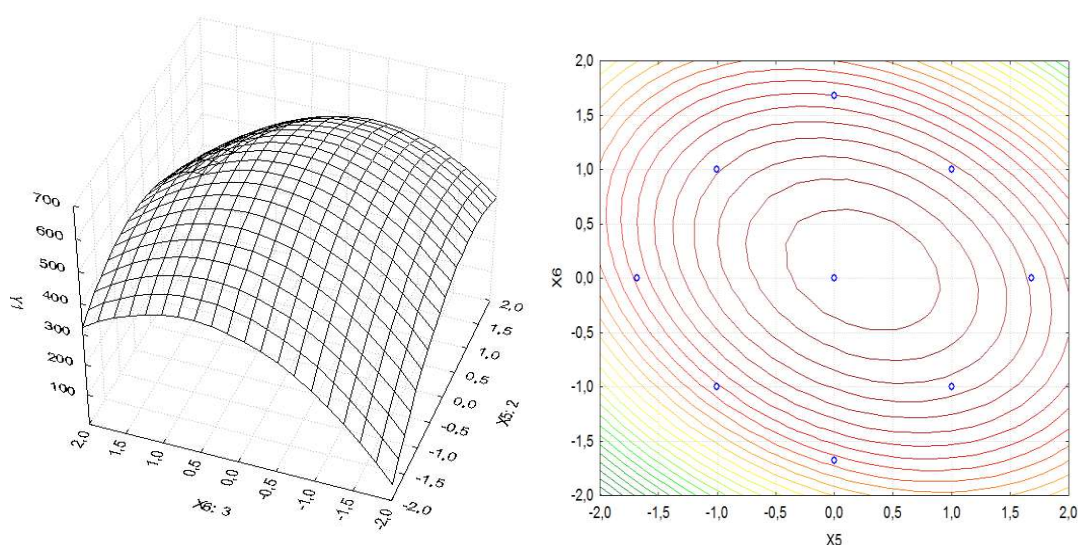


Figura 3: Superfície de resposta da otimização do meio de cultura para produção de ácido clavulânico.

Fonte: (WANG, et al 2003).

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).

3.2.1 Planejamento com Fator Único

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

Além disso, nesse 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 glicose e a variável resposta é concentração celular. Então, ao se analisar a variável pH todas as demais ficarão fixas, ou seja, os níveis do fator pH serão variados enquanto que 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 glicose, apenas determina a influência do fator pH na variável resposta (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005).

3.2.2 Planejamento Fatorial

Neste planejamento, faz-se combinações entre os níveis de dois ou mais fatores. Como por exemplo, tem-se que A e B são fatores e referem-se à concentração celular e pH. As combinações podem ser obtidas da seguinte forma (RODRIGUES; IEMMA, 2009):

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

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 partes, planejamento fatorial completo e planejamento fatorial fracionário (WANG; WAN, 2009).

3.2.2.1 Planejamento Fatorial Completo

Nesse planejamento todas as combinações de níveis de cada fator testada, como por exemplo, K fatores cada qual com N níveis, assim tem o planejamento fatorial completo N^K . Ou seja, neste planejamento analisa-se uma variável sujeita a todas as combinações das demais variáveis. (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 se tem 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 quer 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. 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).

3.2.2.2 Planejamento Fatorial Fracionário

Em um planejamento completo com quatro fatores, o número de ensaios a ser realizados são de $2^4 = 16$. Enquanto no planejamento fatorial fracionário deve-se fazer apenas $2^{4-1} = 2^3 = 8$ experimentos, no qual corresponde á meia-fração do planejamento fatorial completo. Os dois níveis de valores para os fatores são representados pelos sinais (+) e (-), esses sinais representam os valores máximos e mínimos (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Segundo o autor Rodrigues (2009), para planejamento fatoriais fracionários, existe uma regra que deve sempre ser seguida: "O número de experimentos realizados deve ser, no mínimo, igual ao número de variáveis mais quatro".

3.2.2.3 Delineamento Composto Central Rotacional

O modelo de Delineamento Composto Central (DCC) foi introduzido em 1951, por Box e Wilson. E 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.

Existe também o Delineamento Composto Rotacional (DCCR) é recomendado quando se tem 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).

Este tipo de delineamento é chamado rotacional porque as variâncias da resposta dependem unicamente da distância a ponto central. A rotacionalidade proporciona variâncias idênticas para pontos que estão situados a uma mesma distância do centro, independente da direção (MENDONÇA, 2012; CONAGIN, 1982).

É possível encontrar outros tipos de planejamentos experimentais na literatura, tal como, planejamento Box- Behnken .

Planejamento de Box-Behnken desenvolveu um eficiente conjunto de planejamentos de 3 níveis para modelar superfície de resposta de ordem 2. Seus planejamentos se diferem de composição central pelo fato de conter apenas 3 níveis para cada fator e não ter pontos de vértices. O planejamento é feito fixando uma das variáveis em zero e um fatorial 2^2 é executado com as outras duas variáveis. O experimento de Box-Behnken é empregado quando necessita-se utilizar fatores com 3 níveis (baixo, médio e alto), sendo uma boa alternativa para os experimentos de composição central (PORTAL, 2015).

3.2.3 Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta é muito utilizada para otimização de processos através da análise gráfica e para determinar os efeitos de variáveis no crescimento celular. 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).

A superfície de resposta é representada graficamente. Pode-se citar por exemplo, um processo tem-se duas variáveis, temperatura, em °C, e pressão, em psi, representadas por x_1 e x_2 . Estas variáveis influenciam a variável resposta, rendimento, representada por η , de um processo químico. Neste caso, tem-se que rendimento é uma função de temperatura x_1 e pressão x_2 , visto nas equações 2.2 e 2.3 a seguir (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

$$y = f(x_1, x_2) + \epsilon \quad (2.2)$$

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (2.3)$$

Onde que ϵ corresponde ao erro.

Na Figura 4 a seguir representa a superfície de resposta para este caso citado acima, onde pode-se notar a existência de contornos, cada um destes contornos corresponde à uma altura na superfície de resposta (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

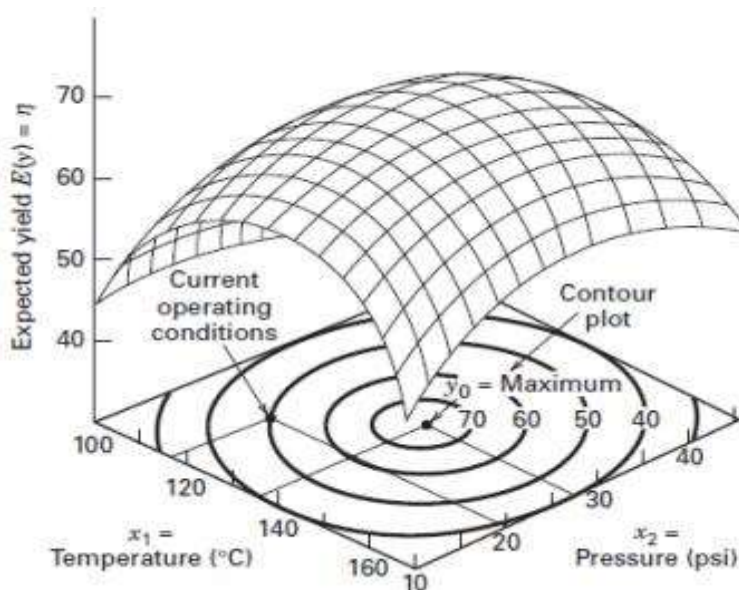


Figura 4: Superfície resposta para o processo químico exemplo, em que os fatores são: temperatura (°C) e pressão (psi), representadas pelas variáveis x_1 e x_2 , respectivamente, e a variável resposta é rendimento (η).

Fonte: MONTGOMERY (2013).

A fim de determinar as variáveis independentes que na maioria das vezes são desconhecidas, deve-se determinar a relação matemática entre as variáveis. Neste caso, pode-se utilizar polinômio, caso se a equação de adequar bem ao modelo e quando está longe do ponto ótimo. O modelo de primeira ordem é apresentado na Equação 2.4 (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2013).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n + \epsilon \quad (2.4)$$

Agora quando se tem uma curvatura no sistema, e uma vez que a região do ponto ótimo foi encontrada, utiliza-se uma equação de segunda ordem ou quadrática, a fim de determinar o ponto ótimo. Utiliza a Equação 2.5 descrita abaixo (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2013).

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \epsilon \quad (2.5)$$

3.3 Biorreatores

De acordo com Díaz (2011), biorreatores são recipientes utilizados para a realização de processos químicos que envolve organismos ou substâncias bioquimicamente ativas derivadas desses organismos. Um biorreator também pode ser um recipiente usado para

crescer células ou tecidos. Podem ser classificados como sistema em batelada, contínuo e semicontínuo. A Figura 5 mostra a configuração de um reator descontínuo, com seus principais componentes.

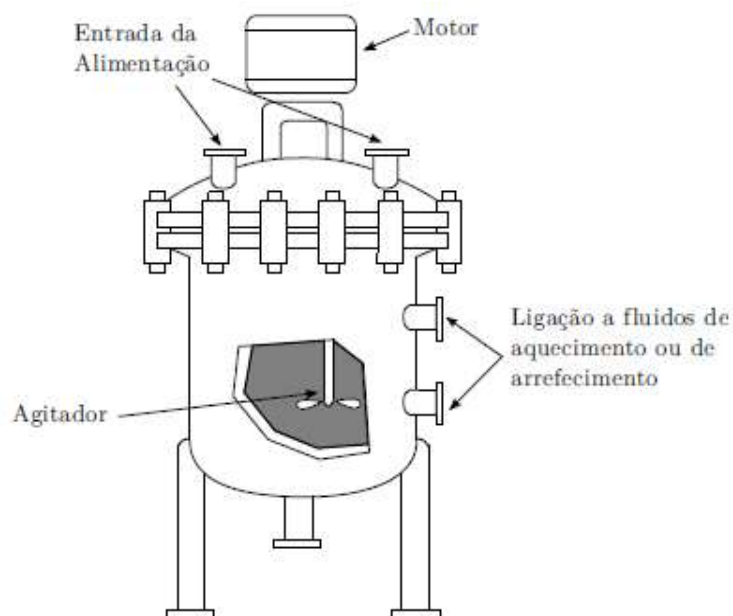


Figura 5: Esquema de um reator encamisado, tipo tanque, destacando seus principais componentes, tais como: agitador, motor, entrada da alimentação e o trocador de calor.

Fonte: Adaptado de GONÇALVES (2014).

Os biorreatores podem ser classificados de acordo com o modo de operação em: sistema em batelada, contínuo e semicontínuo.

3.3.1 Biorreatores em batelada ou descontínuos

É um tipo de reator tanque com agitação mecânica, que não permite a entrada nem a saída de reagentes ou produtos durante o processamento da reação. As variáveis como temperatura e concentração não variam com a posição dentro dele, mas variam com o tempo. É alimentado através de aberturas no topo. Os biorreatores em batelada são utilizados para operações em pequena escala, sendo inviável para grande produção devido ao alto custo de mão de obra por batelada. Eles permitem a obtenção de altas convecções, deixando o reagente no reator por longos períodos de tempo (GONÇALVES, 2014).

Reatores que podem ser utilizados na fermentação em batelada são os reatores do tipo Airlift e Coluna de bolhas (MULLER et al., 2007).

3.3.1.1 Biorreator Airlift

Os biorreatores airlift são reatores pneumáticos, ou seja, a agitação é feita pro meio da aeração. É um sistema no qual as bolhas fazem um movimento específico para que o líquido circule de forma ordenada. . Na Figura 6 mostra um esquema de recirculação do biorreator airlift.

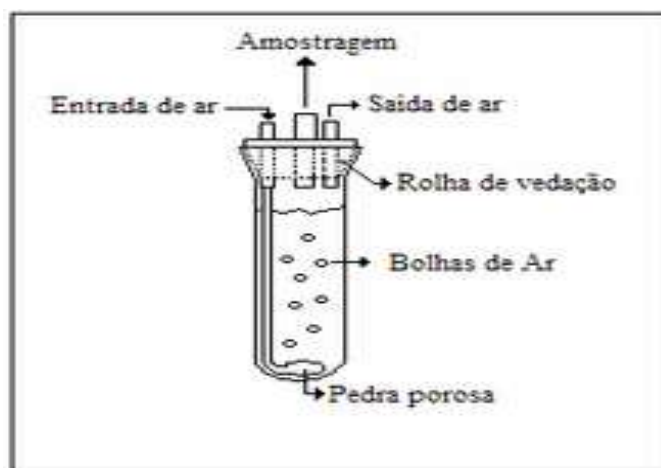


Figura 6: Esquema de biorreatores airlift com recirculação interna

Fonte: Adaptado de Chisti (1989).

O airlift é bastante utilizado em processos industriais em batelada, pois ele promove maior transferência de massa comparado com reatores mecanicamente agitados. Além disso, este tipo de reator confere menor cisalhamento, conservando a integridade das células e tecidos (CHEN, 1990; MULLER et al. 2007). Esse biorreator tem destaque devido à sua simplicidade de construção, assim como facilidade de operação, baixa possibilidade de contaminação e consumo de energia.

3.3.1.2 Coluna de Bolhas

Os reatores coluna de bolhas são tanques cilíndricos que possuem um distribuidor de gás no fundo. Em sua forma, mais simples, é constituído por um cilindro vertical, o gás é injetado pela sua base, conforme pode ser visto na Figura 7.

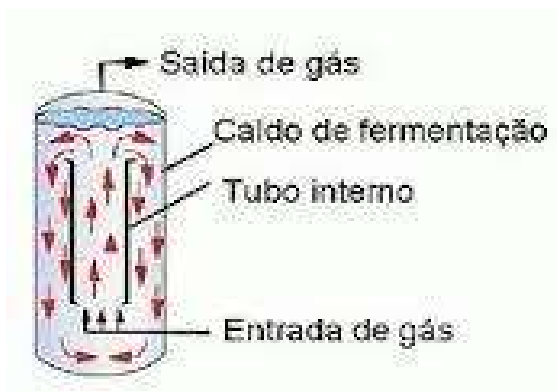


Figura 7: Esquema de um reator coluna de bolhas.

Fonte: Adaptado de Behin (2012).

Estes reatores são bastante utilizados na indústria, em processos biológicos, químicos e petroquímicos (PEREIRA, 2012). Existe inúmeras possibilidades de aplicação, devido pelas suas diversas vantagens oferecidas, tais como: 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 alto tempo de residência, podendo ser utilizados para reações lentas (SHAH et al., 1982).

A principal diferença dos reatores airlift para os colunas de bolhas é que, na coluna de bolhas não há divisão em duas zonas e, no reator airlift uma melhor homogeneidade é alcançada (KOCHEM, 2010).

3.3.2 Biorreatores contínuos

No biorreator contínuo, a alimentação é realizada de forma contínua, assim como a retirada do produto. As principais vantagens desse tipo de operação. Pode-se destacar: cultivo mais longo que a batelada, permite que o cultivo seja acoplado a outras operações, menor necessidade de mão de obra e possibilidade de implantação de sistemas de controle sofisticados (SOUZA, 2009).

Pode-se citar como exemplo de um biorreator com sistema contínuo, o biorreator contínuo de tanque agitado (SÊCO, S.D.).

3.3.2.1 Biorreator contínuo de tanque agitado

O reator contínuo de tanque agitado possui um agitador, que é responsável por misturar os reagentes para 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. Uma das vantagens que se pode destacar ao utilizar

esse tipo de biorreator é que possível se fazer o controle de temperatura de forma eficiente, porém, são necessários altos volumes para que se obtenha altas conversões; menor facilidade no emprego de controles avançados entre outros (FÁBREGA, 2012). A Figura 8, mostra esquematicamente, um biorreator contínuo de tanque agitado.

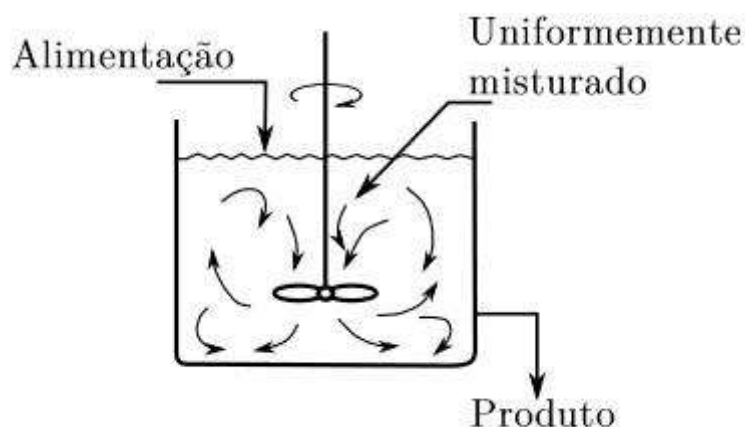


Figura 8: Esquema de um reator de mistura, composto por um tanque com agitador, ressaltando os pontos de alimentação e retirada dos produtos.

Fonte: Adaptado de FÁBREGA (2012)

3.3.3 Biorreatores semicontínuos

O sistema semicontínuo diferencia-se do descontínuo alimentado, pelo fato de se retirar o líquido processado e se proceder o preenchimento do reator a uma vazão muito elevada, de forma a imaginar que o reator esteja sendo preenchido instantaneamente. A principal desvantagem deste tipo de processo é que a chance de contaminação é maior, uma vez que as operações de retiradas são manuais, além disso, há também a chance de mutação dos microrganismos envolvidos no processo, isto porque o tempo de fermentação é maior. No entanto, tem-se como principal vantagem é que não há tempo morto, portanto, não requer muito controle (SOUZA, 2009).

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnológico da Universidade Federal de São João Del Rei.

4.1 Microrganismo

Utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* em forma de fermento biológico seco da marca Fleischmann®.

4.2 Condições de cultivo

Os cultivos foram dirigidos ao um biorreator Coluna de Bolhas com aeração variando entre 2, 3 e 4 vvm (volume de ar por volume de efluente por minuto) com seis horas de duração. O pH utilizado foi 5 e a temperatura foi de 29 °C.

4.3 Cálculo da Concentração Celular

Com o propósito, de se determinar o cálculo da concentração celular foi necessário que definisse a massa seca, para isso, inicialmente pesou-se o tubo falcon vazio e, em seguida, pesou-se o mesmo contendo o pellet, após secagem em estufa. Feito isso, subtraiu-se os valores, obtendo-se a variação da massa (Δm). Então esse valor foi dividido pelo volume de amostra coletado (20 mL = 0,02 L), como pode ser observado na Equação 3.1.

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

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

4.4 Determinação da concentração inicial de levedura

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

4.4.1 Preparo do meio de cultivo

Inicialmente, higienizou-se o biorreator Coluna de Bolhas com álcool 70%. Em seguida preparou-se 4 litros de meio de cultivo para cada experimento. Posteriormente, com o auxílio de uma proveta, adicionou-se 4 litros de água destilada ao biorreator. Pesou-se, em balança analítica, os demais componentes do meio de cultivo: 5 g/L de glicose; 2,5 g/L de extrato de levedura; 1 g/L de KH_2PO_4 e 1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$.

4.4.2 Acompanhamento da Concentração Celular

Depois do preparo do meio, o mesmo foi colocado no biorreator. Posteriormente, 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 houvesse matéria insolúvel, contaminação no meio de cultivo e, o mais importante para determinar a concentração inicial de células. Foram realizadas essas etapas para ambos os experimentos.

Depois disso, retirou-se amostras em ambos os ensaios, de 20 mL cada, do meio de cultivo, primeiramente, retirou-se de meia em meia hora até completar duas horas de procedimento e, posteriormente, de hora em hora.

Em seguida os 20 mL de amostra foram centrifugadas a 5000 rpm ($3854 \times g$) por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após, separou-se o sobrenadante do pellet. O mesmo foi levado para a estufa a 80°C *overnight* para a secagem e posterior pesagem e o sobrenadante foi descartado, uma vez que se objetivava determinar apenas a concentração final de células. Após determinada a massa seca em balança analítica, calculou-se a concentração celular em gráfico. Estas etapas foram repetidas para todos os ensaios.

4.5 Planejamento Experimental

A interferência da concentração de glicose e aeração no crescimento celular de *S. cerevisiae* foi determinada utilizando um planejamento fatorial 2^2 com duplicata no ponto central. O planejamento foi testado variando dois fatores: concentração de glicose (g/L) e aeração (vvm) num total de 6 experimentos. Cada uma das variáveis foi analisada em dois níveis: superior (+) e inferior (-). A Tabela 2 mostra os valores dos níveis inferior, superior e dos pontos centrais, representados por 0, utilizados no experimento.

Tabela 2: Valores dos níveis inferior (-1), superior (+1) e ponto central (0) utilizados para a realização do planejamento experimental.

Variáveis	-1	0	+1
Concentração de glicose (g/L)	3,0	5,0	8,0
Aeração	2,0	2,5	4,0

Fonte: Próprio autor

4.5.1 Preparo do meio de cultivo

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. Variou-se a composição da glicose e a aeração utilizada no

biorreator Coluna de Bolhas. A Tabela 3 apresenta as concentrações utilizadas para os respectivos ensaios.

Tabela 3: Concentrações de glicose (g/L) e aerações (vvm), utilizadas para realização do planejamento experimental.

Ensaio	Concentração de glicose (g/L)	Aeração (vvm)
1	3,0 (-)	2,0 (-)
2	8,0 (+)	2,0 (-)
3	3,0 (-)	4,0 (+)
4	8,0 (+)	4,0 (+)
5	5,0 (0)	3,0 (0)
6	5,0 (0)	3,0 (0)

Fonte: Próprio autor

4.5.2 Coleta das amostras

Após o preparo do meio de cultivo, o mesmo foi adicionado ao biorreator Coluna de Bolhas com aeração controlada. Logo após, retirou-se 20 mL de amostra antes de inocular o microrganismo e logo após a inoculação para verificação se havia sólidos e /ou contaminação do meio e para determinação da concentração inicial de células. Durante as duas primeiras horas de cultivo, retiraram-se amostras a cada 30 minutos. Logo após este período as demais amostras foram retiradas a cada hora até completar as 6 horas de cultivo.

As amostras retiradas foram centrifugadas a 5000 rpm (3854 x g) por 15 minutos, o pellet foi separado do sobrenadante e levado para secagem em estufa a 80°C *overnight* e, posteriormente, as amostras foram pesadas em balança analítica.

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

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da concentração inicial de levedura

Com o propósito de se determinar qual a melhor concentração inicial de levedura, para a realização do planejamento experimental, avaliou-se a cinética de crescimento utilizando-se duas concentrações iniciais de levedura, são elas: uma menor de 2g/L e outra maior 4 g/L. Os valores da concentração celular para a massa seca obtidos são representados na Tabela 4.

Ao se analisar a Tabela 4 e a Figura 8 observa-se que, com o passar do tempo a concentração de células no meio aumentou, conforme era esperado. Logo após 6 horas de cultivo, tempo previamente padronizado, o Experimento 1 apresentou maior aumento de biomassa. Pelo fato, que no Experimento 1, obteve-se uma concentração celular final de 2,52 vezes maior que a concentração inicial, e no Experimento 2 esse aumento foi de 1,39 vezes.

Tabela 4: Concentração de células, em g/L, para os experimentos 1 e 2, em que utilizou-se 2 g/L para o experimento 1 e 4 g/L para o experimento 2.

Amostra	Concentração de células g/L			
	Experimento		Cx/Cx0	Cx/Cx0
	1	Experimento 2	(Experimento 1)	(Experimento 2)
0	1,02	2,62	1,00	1,00
1	1,03	2,82	1,01	1,07
2	1,35	2,83	1,32	1,08
3	1,42	2,91	1,39	1,11
4	1,52	2,99	1,49	1,14
5	1,84	3,24	1,80	1,23
6	2,26	3,43	2,21	1,31
7	2,49	3,54	2,44	1,35
8	2,58	3,65	2,52	1,39

Fonte: Próprio autor

A curva do log da concentração de células *versus* tempo de cultivo, obtida para as duas condições é apresentada na Figura 9.

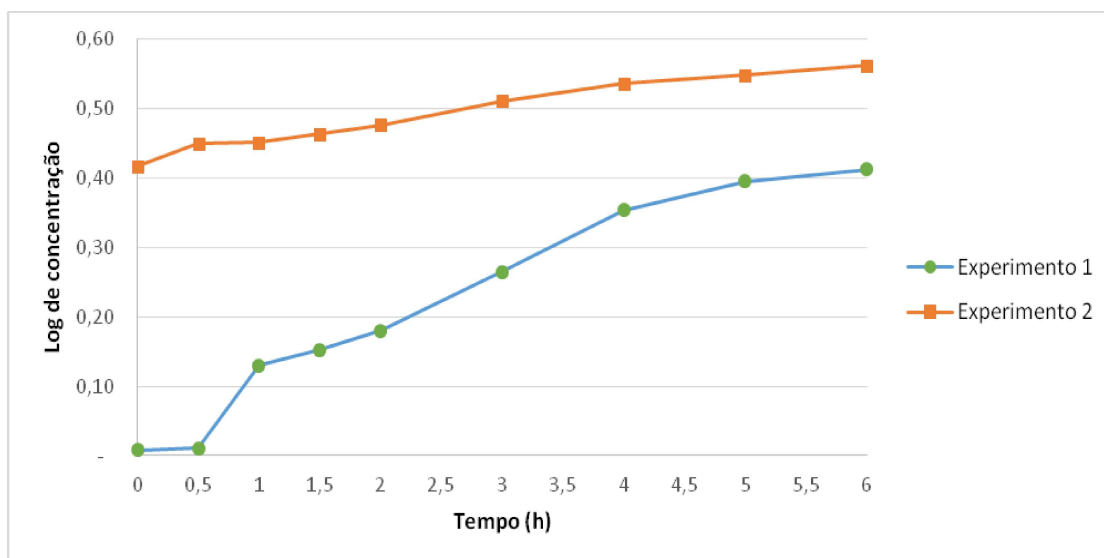


Figura 9: Curvas do log da concentração celular *versus* tempo de cultivo, em horas, para a cinética de crescimento da *S. cerevisiae* para as duas condições, onde no Experimento 1 utilizou-se 2g/L de levedura e no Experimento 2, utilizou-se 4g/L.

Fonte: Próprio autor

Isto pode ser explicado pelo seguinte fato, quanto maior concentração de levedura, maior é a energia de manutenção, ou seja, o consumo de glicose para manter as células vivas também é maior, resultando em uma maior competição das células pelo substrato e nutrientes disponíveis no meio. Visto que, foi utilizada uma mesma concentração de glicose (5 g/L) e a mesma aeração para ambos os experimentos. No Experimento 2 em que se utilizou 4 g/L de *S. cerevisiae* houve uma competição das células pela fonte de carbono, inibindo o crescimento da levedura presente no meio, uma vez que a disponibilidade de nutrientes para este caso foi menor.

A levedura *S.cerevisiae* é um microrganismo que apresenta tempo de geração curto (SHAFAGHAT et.al., 2010). Devido isso, o tempo de cultivo foi escolhido e padronizado como 6 horas pois, para a levedura seca adquirida comercialmente, a fase exponencial encontra-se em torno de 6 a 8 horas, menor que para as leveduras na forma úmida. Isto se explica porque, nestas últimas horas pode haver maior quantidade de contaminantes, inibindo o crescimento celular da levedura através da competição entre as células ou da indução de floculação da levedura (CAMILE, 2010). E além disso, a levedura da marca Fleischmann já se encontra na fase logarítmica de crescimento, não exibindo assim a fase lag ou exibindo uma fase de adaptação muito curta, circunstância que pode ser vista na Figura 8. Esta afirmação foi comprovada pelo fabricante do produto, que diz que o tempo mínimo médio para o início da ação, ou seja, tempo de reativação do microrganismo é de aproximadamente 20 minutos.

Diante dessa situação, a concentração inicial de levedura escolhida para a realização do planejamento experimental foi de 2 g/L.

5.2 Procedimento Experimental

O aumento da concentração celular para os 6 ensaios pode ser observado na Figura 9, 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 execução do planejamento experimental no tempo entre 4 e 6 horas. 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.

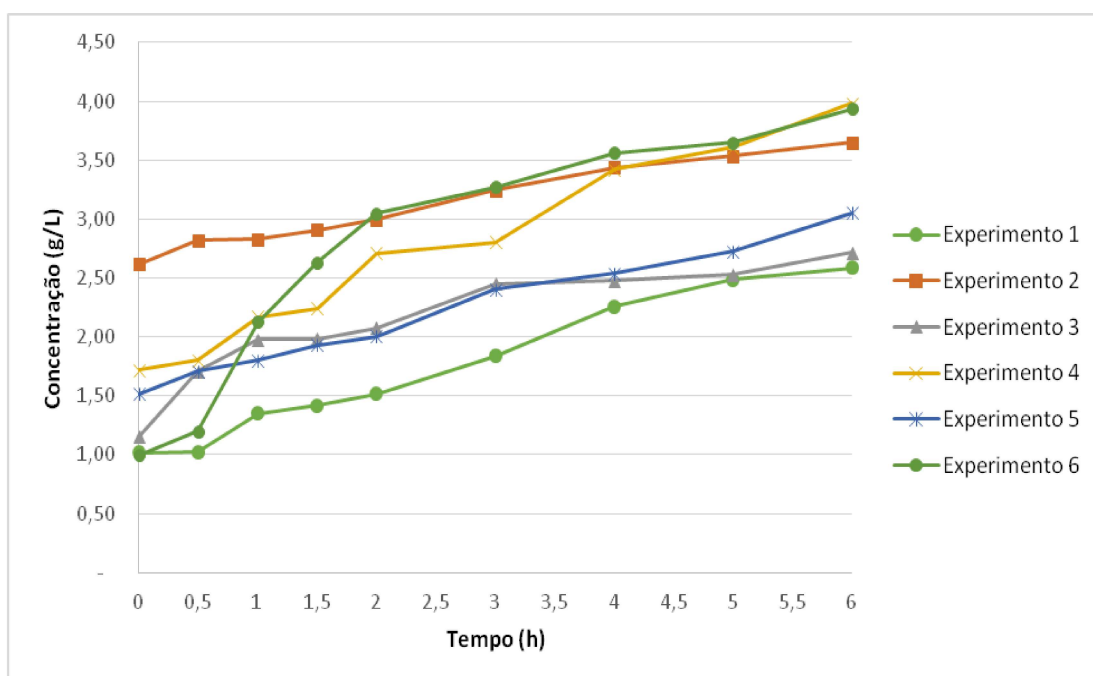


Figura 10: Acompanhamento do crescimento celular de *S. cerevisiae* em biorreator coluna de bolhas para os 6 ensaios do planejamento experimental, em que o tempo de cultivo foi de 6 horas.

O efeito das variáveis concentração de glicose e aeração nas variáveis resposta, foi investigado utilizando-se um planejamento fatorial 2^2 com duas repetições no ponto central, tendo como resultado de análise da concentração celular no tempo de 4 e 6 horas, pois são os pontos de maior interesse conforme apresentado na Figura 10. Deste modo foi realizada a matriz experimental utilizando os valores da concentração no tempo de 4 e 6 horas e a Tabela 5 apresenta estes valores.

Observando-se as concentrações celulares nos tempos de estudo, nota-se que a levedura foi capaz de crescer em todas as condições estudadas. Conforme a concentração de glicose no meio de cultivo aumenta, o crescimento celular também aumenta.

Os maiores valores de concentração para os dois tempos de estudo foram obtidos quando se utilizou uma quantidade a mais de glicose e uma maior aeração, como observado nos ensaios 2 e 4. Já as menores concentrações foram obtidas quando se utilizou uma menor concentração e uma menor aeração.

Tabela 5: Matriz experimental para os níveis codificados das variáveis independentes "concentração de glicose" e "aeração" e valores da concentração (g/L) no tempo de 4 e 6 horas de cultivo de *S. cerevisiae* em biorreator Coluna de Bolhas para cada ensaio.

Ensaio	Glicose	Aeração	Concentração celular (g/L) no tempo de 4h	Concentração celular (g/L) no tempo de 6h
1	-	-	1,84	2,59
2	+	-	3,24	3,65
3	-	+	2,44	2,71
4	+	+	2,80	3,98
5	0	0	2,40	3,06
6	0	0	3,27	3,10

Fonte: Próprio autor

O efeito das variáveis independentes e de suas interações nas variáveis resposta foi analisado utilizando-se o *software* Statística 7.0 e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6, que apresenta os efeitos, a estimativa do erro-padrão, os valores de p e o teste t-Student para o tempo de 4 horas.

Tabela 6: Estimativa dos efeitos, valores de t e p e erros-padrão.

Variáveis	Efeitos	Erro-Padrão	t-Valores	P
Média	2,665	0,1968	13,5360	0,0054
Glicose	0,880	0,4822	1,8247	0,2095
Aeração	0,080	0,4822	0,1658	0,8835
Glicose e Aeração	- 0,520	0,4822	- 1,0782	0,3936

Fonte: Próprio autor

Pela análise da Tabela 6, nota-se que apenas a média foi estatisticamente significativa, pois apresentou um valor de $p < 0,05$. A concentração de glicose e a aeração não possuiu

significância estatística, pois ambos apresentaram um valor de $p > 0,05$ (95% lim confiança), o mesmo foi observado para a interação entre as variáveis concentração de glicose e aeração, onde se obteve-se um valor de $p = 0,3936$. Esta situação pode ser ainda observada pela análise do gráfico de Pareto, representado na Figura 11.

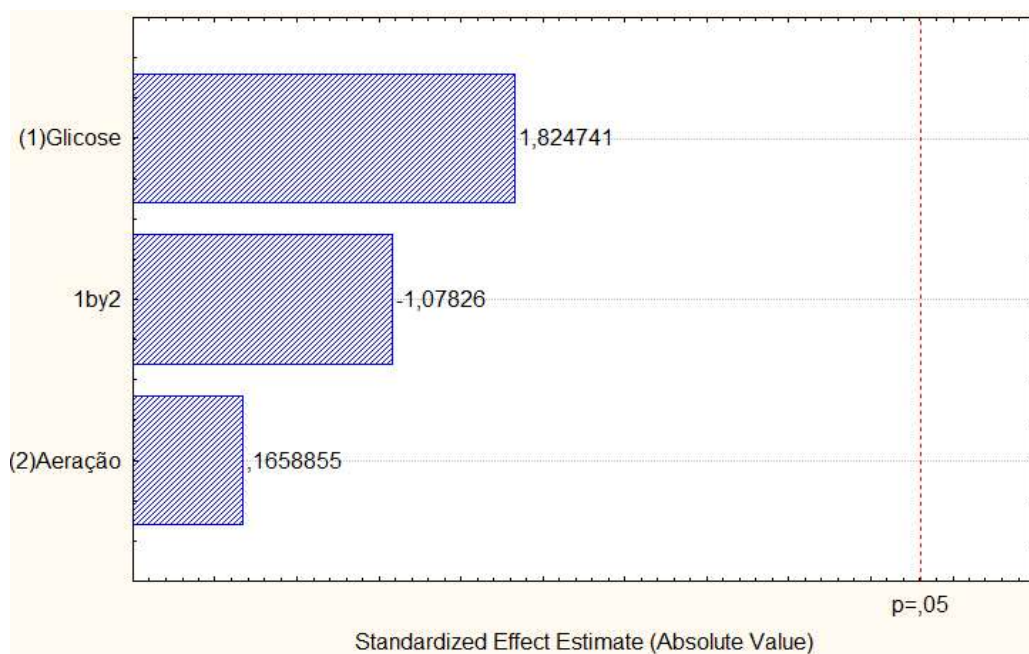


Figura 11: Gráfico de Pareto, obtido através do software Statistica 7.0, para as concentração de glicose e aeração e a interação entre elas.

A validade dos resultados foi comprovada realizando-se a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 7, obtendo-se um coeficiente de correlação (R^2) de 0,69324, o que indica que o modelo possui 69,324 % de variabilidade nos dados. Foi realizado a comparação entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} para verificar a confiabilidade dos dados. A significância dos resultados obtidos também foi confirmada pelo valor do teste $F_{\text{Calculado}}$, que foi de 11,3 e o F_{Tabelado} ($F_{(1;4;0,5)} = 7,71$). Deste modo, observa-se que o $F_{\text{Calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$, apresentando um valor satisfatório garantindo a confiabilidade dos resultados.

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento celular de *S. cerevisiae* no tempo de 4 horas de cultivo.

Variáveis	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Soma Média	F	P
Glicose	0,7744	1	0,7744	3,3296	0,2095
Aeração	0,0064	1	0,0064	0,0275	0,8835
Glicose e Aeração	0,2704	1	0,2704	1,1626	0,3936

Erro	0,4651	2	0,2325
Total	1,5163	5	

Fonte: Próprio autor

O gráfico de contorno e o diagrama dos valores preditos são apresentados nas Figuras 12 e 13.

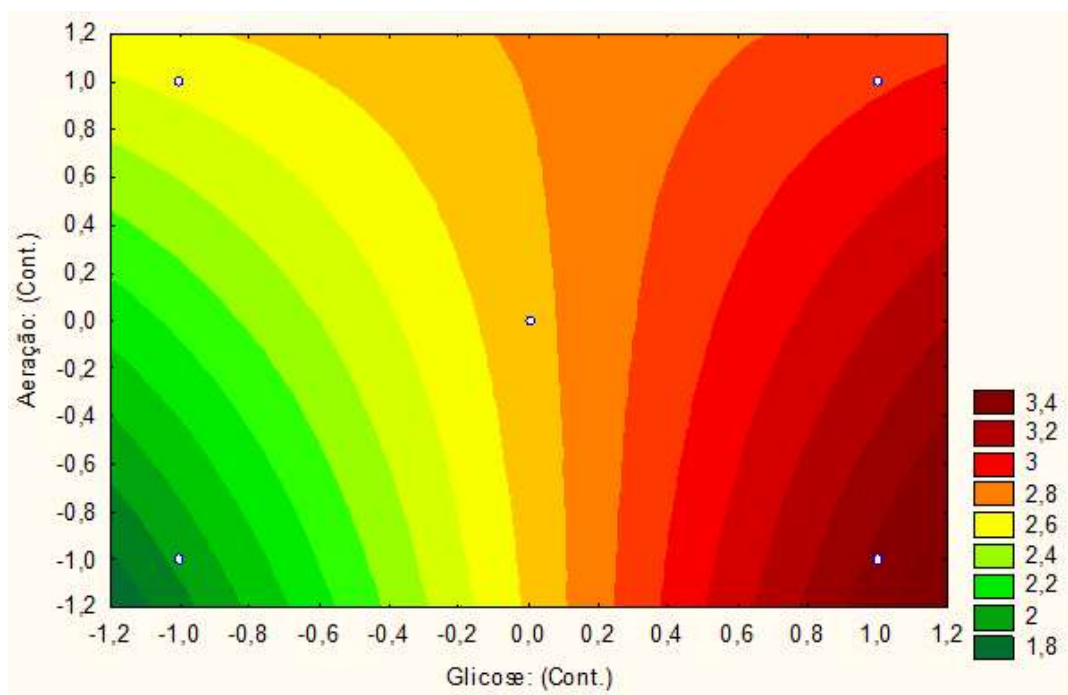


Figura 12: Gráfico de contorno aerção (vvm) *versus* concentração de glicose (g/L)

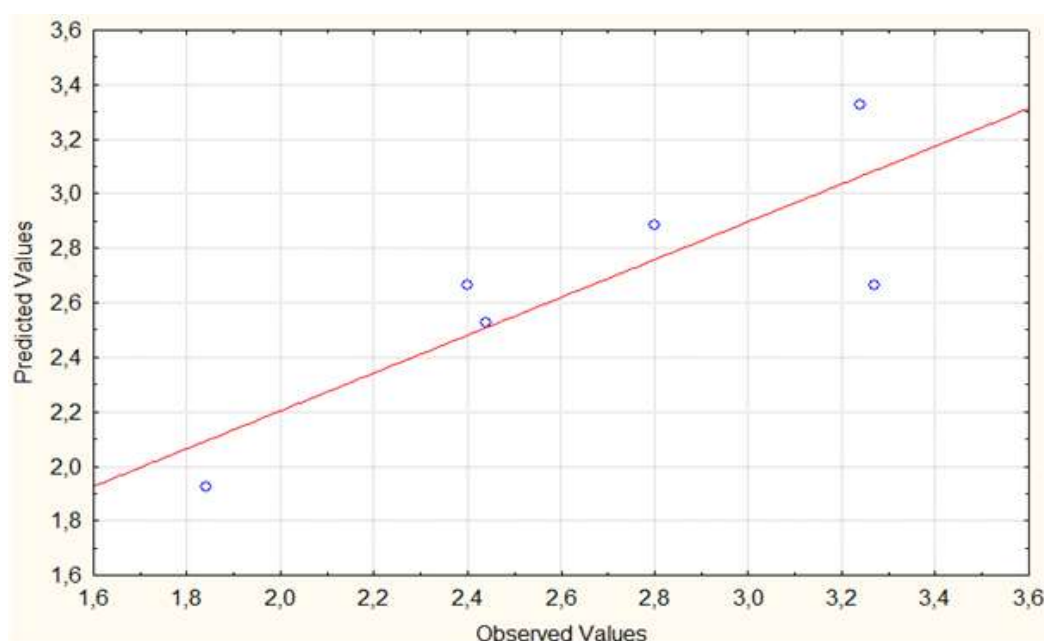


Figura 13: Diagrama dos valores preditos.

Observa-se pela Figura 12 que os maiores valores de concentração celular, considerando um tempo de 4 h de cultivo, foram obtidos quando se utilizou maiores valores

de concentração de glicose. Entretanto, a variável aeração, esta mostrou que independente dos valores utilizados nos experimentos não apresentou significância na variável resposta concentração celular. Já em relação a Figura 13, como discutido anteriormente, o valor de R^2 neste caso foi baixo (aproximadamente 0,70) e os valores observados versus os preditos se distanciaram da curva padrão quando se busca a melhor correlação linear.

Utilizando-se o mesmo raciocínio para o ponto de 6 horas, os mesmos cálculos foram realizados. Na Tabela 8 apresenta os efeitos, a estimativa do erro- padrão, os valores de p e o teste t-Student para o tempo de 6 horas de cultivo.

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

Variáveis	Efeitos	Erro-Padrão	t-Valores	P
Média	3,181	0,0514	61,7980	0,0002
Glicose	1,165	0,1261	9,2378	0,0115
Aeração	0,225	0,1261	1,7841	0,2163
Glicose e Aeração	0,105	0,1261	0,8326	0,4926

Fonte: Próprio autor

Ao analisar a Tabela 8, nota-se que a média e concentração de glicose foi estatisticamente significativa, pois apresentou um valor de $p < 0,05$. A aeração não possuiu significância estatística, uma vez que seu valor de p obtido foi de 0,2163 ($p > 0,05$), sendo o mesmo observado para a interação entre as variáveis concentração de glicose e aeração, onde obteve-se um valor de p igual a 0,4929. Observa-se também que os efeitos das variáveis de estudo foram positivos, ou seja, isso significa que pelos dados obtidos estes indicam que maiores valores de glicose se obtém maiores valores de concentração celular, cujo este o objetivo de estudo.

Essa avaliação pode ser observada também pela análise do gráfico de Pareto, como mostra a Figura 14.

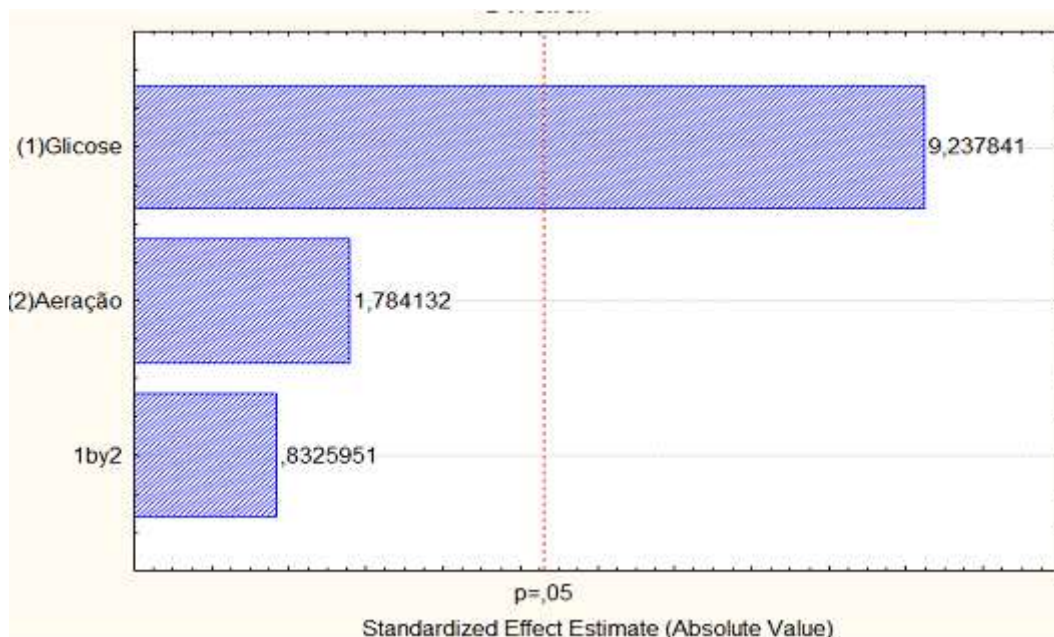


Figura 14: Gráfico de Pareto, obtido através do software Statistica 7.0, para as concentrações de glicose e aeração e a interação entre elas.

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 Wanh (1979), que estudaram o crescimento da levedura comercial *S. cerevisiae*. Este aumento celular quando se tem uma maior concentração de glicose no meio se dá pois a glicose 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.

No que diz respeito aos resultados para a aeração (vvm), obteve-se que essa variável não possui significância estatística para o processo. Ou seja, o fato de se trabalhar com uma maior ou uma menor aeração não afeta diretamente o crescimento da levedura.

Este fato pode ser comprovado observando a Tabela 5 em ambos os pontos, o ensaio 3, utilizou-se uma aeração de 4 (vvm), obteve-se uma concentração celular de 2,44 g/L no ponto de 4 horas e 2,71g/L no ponto de 6 horas. Já no ensaio 2 que utilizou-se uma maior concentração de glicose, obteve-se uma concentração celular de 3,24 g/L no ponto de 4 horas e 3,65 g/L no ponto de 6 horas. Isto quer dizer que para os experimentos utilizando uma maior concentração de glicose obteve-se um aumento da concentração celular de aproximadamente 1,3 vezes. O que mostra que utilizar altas ou baixas aerações praticamente não influenciou no crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

Para comprovar a validade dos resultados foi realizada a análise de variância (ANOVA) como foi feita para o ponto de 4 horas. Na Tabela 9 a seguir, obteve-se o

coeficiente de correlação (R^2) de 0,97807, indicando que o modelo possui aproximadamente 98% de variabilidade nos dados. Devido esse valor de R^2 , pode-se dizer que o modelo matemático é confiável, pois está mais próximo de 1.

Tabela 9: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento celular de *S. cerevisiae* no ponto de 6 horas de cultivo.

Variáveis	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Soma Média	F	P
Glicose	1,3572	1	1,3572	85,3377	0,0115
Aeração	0,0506	1	0,0506	3,1831	0,2163
Glicose e Aeração	0,0110	1	0,0110	0,69321	0,4926
Erro	0,0318	2	0,0159		
Total	1,4506	5			

Foi realizado a comparação entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} para verificar a confiabilidade dos dados. A significância dos resultados obtidos também foi confirmada pelo valor do teste F Calculado, que foi de 66,11 e o F_{Tabelado} ($F_{(1;4;0,5)} = 9,35$). Deste modo, observa-se que o $F_{\text{Calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$, apresentando um valor de 7 vezes maior garantindo assim a confiabilidade dos resultados.

O gráfico de contorno é apresentado na Figura 15. Pela análise, nota-se que uma maior concentração celular é obtida quando se trabalha com maiores concentrações de glicose e de aeração.

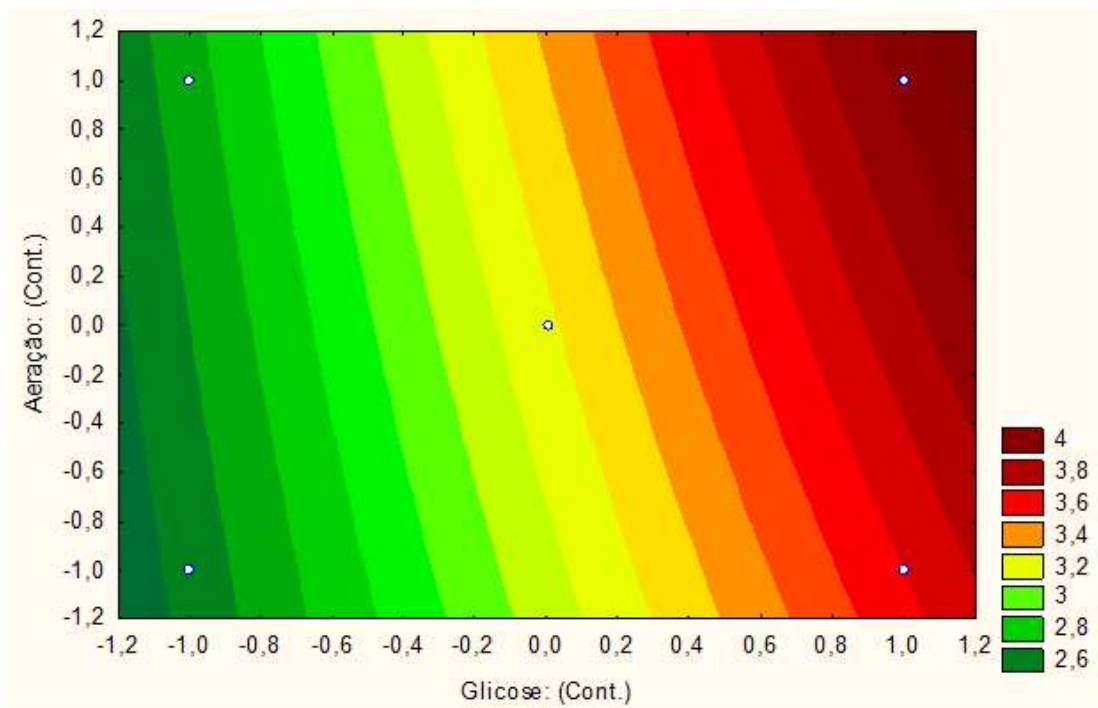


Figura 15: Gráfico de contorno aeração(vvm) *versus* concentração de glicose (g/L) num tempo de cultivo de 6 horas.

Analisando a Figura 15, observa-se que neste caso os maiores valores de concentração celular, considerando um tempo de 6 h de cultivo, foram obtidos quando se utilizou maiores valores de concentração de glicose e aeração. Deste modo, poderia sugerir que as melhores condições de cultivo seriam com concentração de glicose maior que 8 g/L e a aeração de 4 vvm. Para comprovar estes resultados, sugere-se realizar experimentos através de um novo planejamento experimental com valores maiores de glicose e variar uma outra variável, temperatura ou volume inicial de inóculo por exemplo deste cultivo, e comparar os resultados com o deste trabalho.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, objetivou-se avaliar a influência das variáveis concentração de glicose e aeração no crescimento celular de *S.cerecisiae*. Sabe-se que, além destas variáveis, fatores como pH e temperatura também influenciam no processo, o que pode ser temas de trabalhos futuros. Nesse caso, tais fatores foram fixados em: pH 5 e temperatura em torno de 29%, de acordo com os dados encontrados na literatura.

Como resultados, no ponto de 4 horas de cultivo as variáveis concentração de glicose e aeração não apresentou significância estatística na variável resposta concentração celular. Já

no ponto de 6 horas de cultivo, a variável concentração de glicose apresentou significância. A variável aeração não possuiu significância em ambos os processos, observando-se que pode-se trabalhar tanto com aeração maior quanto menor.

A validade dos resultados para os pontos de 4 e 6 horas de cultivo foi comprovado através da análise de variância e do coeficiente de correlação, indicando que o melhor resultado para o crescimento celular da levedura *S.cerevisiae*, foi o tempo de 6 horas de cultivo, pois obteve-se um R^2 igual a 0,97807 e um valor de $F_{\text{Calculado}}$ de 66.11, 7 vezes maior que o valor de F_{tabelado} . Enquanto que no ponto de 4 horas o valor de $F_{\text{Calculado}}$ foi de 1.5 vezes maior que o valor de F_{tabelado} .

7 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.

ARROYO-LOPEZ, 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.

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.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery**. 2a . ed. [S.l.]: Wiley-Interscience New York, 2005.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. [S.l.]: Editora E-papers, 2003.

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.

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.

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.

CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. Airlift reactors: Characteristics, applications and design considerations. **Chemical Engineering Comm.**, v. 60, p. 195 – 242, 1987.

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.

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.

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.

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.

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.

DÍAZ, C. N. **Produção industrial de fármacos obtidos por processos fermentativos e fármacos biotecnológicos**. Universidade do Brasil. 2011.

FÁBREGA, F. M. **Cálculo de Reatores I**. JUNDIAÍ, 2012.

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.

GONÇALVES, A. G. M. **Primeiro estudo dirigido de cinética e reatores: tipos de reatores e suas respectivas equações de balanço**. Manaus, 2014.

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

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.

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.

KOCHEM, L. H. Caracterização de fotobioreator air-lift para cultivo de microalgas. 2010.

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.

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.

MACHADO, R. P. **Produção de etanol a partir de melaço de soja**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) — Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Agosto 1999.

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.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. Dissertação (Magister Scientiae) — Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MERCHUK, J.; CAMACHO, F. G. Bioreactors: airlift reactors. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**, Wiley Online Library, 1999.

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.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8ª . ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2013.

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.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 2ª. ed. Campinas, São Paulo: Grupo A-Bookman, 2001.

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.

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.

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.

PEREIRA, N.; BON, E.; FERRARA, M. Séries em biotecnologia: Tecnologia de bioprocessos. **Esc. Quím./UFRJ, Rio de Janeiro**, p. 26, 2008.

RIBEIRO, J. L. D.; CATEN, C. S. T. Projeto de experimentos. Porto Alegre, 2011.

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.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2^a . ed. Campinas, São Paulo: Casa do Pão, 2009.

RUIZ, L. C.; GUERRA, N. P.; ROSES, R. P. Factors affecting the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture and in solid sate fermentation. **Eletronic Journal of Enviromental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 531 – 542, 2003.

SÊCO, A. M. M. Reactores químicos i. Lisboa, S. D. Disponível em:<http://www.deq.isel.ipl.pt/cp/sebentas/RQI_sebenta.pdf>. Acesso em: 30 de Maio de 2017.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

TAHARA, S. Planejamento de experimentos (doe). Dezembro 2008. Disponível em: <http://www.portaldeconhecimentos.org.br/indez.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Exoerimentos-DOE#eztoc113642_1_13>. Acesso em: 23 de Maio de 2017.

VIANA, T. M. L. **Caracterização bioenergética de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação vinária**. Dissertação (Mestre em Engenharia Alimentar) — Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

VICENTE, A. A.; DLUHY, 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.

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: 3 de Maio de 2017.

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.

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.

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

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.

Disponível em :<<https://sites.google.com/a/dmaria.pt/extremofilos/caracteristicas-morfologicas>>. Acesso em: 16/06/2017.

Disponível em:<<http://www.escolaedti.com.br/planejamento-de-experimentos-entendendo-correlacao-e-cao>>. Acesso em: 16/06/2017.

Disponível em : <<http://wwwo.metalica.com.br/otimizacao-de-multiplos-objetivos-na-soldagem-de-revestimento-de-chapas-de-aco-2>>. Acesso em : 15/06/2017.