UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

***CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO CRESCIMENTO DE
Candida utilis IZ-1840 EM GLICEROL, ADAPTAÇÃO DE
UM MODELO DE INIBIÇÃO POR SUBSTRATO.***

DANTE AUGUSTO MORAES

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE**

Orientador: *Prof. Titular*
EUGÊNIO AQUARONE

SÃO PAULO
1994

Dante Augusto Moraes

Título da Dissertação:

"Contribuição ao estudo do crescimento de *Candida utilis* IZ-1840 em glicerol, adaptação de um modelo de inibição por substrato."

Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Comissão Julgadora:

Prof. Tit. Eugênio Aquarone
Presidente e Orientador

Prof. Dra. Claudete Rodrigues Paula
1º. Examinador

Prof. Assoc. Sunao Sato
2º. Examinador

São Paulo, 19 de abril de 1994.

À Ana Luiza , pelo amor e pela força espiritual.
Aos meus pais pela compreensão.
Aos meus irmãos, pela paciência com o meu gênio.

Agradecimentos

- Ao Professor Eugênio Aquarone, responsável pela minha entrada na Universidade, pela amizade e orientação.
- Ao Professor Walter Borzani, pelas oportunas discussões sobre o trabalho.
- Ao Professor Sunao Sato, pelo companheirismo ao longo destes anos.
- Ao Professor Milton L. Brazzach, pelo auxílio e críticas.
- À Professora Thereza Christina Vessoni Penna, pela amizade e incentivo.
- Ao Professor João Carlos Monteiro de Carvalho pela amizade e companheirismo durante os trabalhos no laboratório.
- Ao Professor Orlando Zancannaro pelas idéias práticas.
- Ao Professor Edson Triboli, pela cessão da cepa do microrganismo e pelas idéias iniciais sobre o trabalho.
- Aos amigos Nilton Bloisi, Kleber Almeida, Magno Marmo, Candida Maciel e Irene Ferreira pelo auxílio no laboratório.
- Aos colegas da secretaria Juarez V. Souza, Maria do Rosário P. Chamon e Rosemary Colombo pela colaboração com a papelada.
- À Moema Rodrigues dos Santos pelo auxílio na revisão bibliográfica.
- Ao amigo Rafael Camacho, pelo apoio psicológico quando me deixava vencê-lo no xadrez.
- Aos colegas do curso de pós-graduação.(Um recado, não desistam!).
- À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a execução desse trabalho
- À tantos que conheci e cujas lembranças me faz perceber o quanto somos frágeis.

"What is new and significant must
always be connected with old
roots, the truly vital roots that
are chosen with great care from
the ones that merely survive."

Bela Bartok

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de símbolos e abreviaturas

Capítulos:

1. Resumo e "Abstract"	1
2. Introdução.....	3
2.1 Produção de SCP.....	3
2.2 O glicerol.....	6
2.3 O modelo de inibição	7
3. Dados da literatura	10
3.1 Introdução	10
3.2 As equações de inibição	10
4. Materiais e métodos.....	14
4.1 O microrganismo	14
4.2 Meios de cultivo e fermentação	14
4.2.1 Meios de cultivo	14
a - Meio I.....	14
b - Meio II	15
c - Meio III.....	15
4.2.2 Meios de fermentação	16
d - Meio IV.....	16
4.3 Equipamentos utilizados.....	17
4.4 Planejamento do trabalho	17
4.5 Definição das condições experimentais.....	18
4.6 Metodologia analítica.....	19
4.7 Tratamento das amostras	20
4.8 Descrição de um ensaio típico	21
4.8.1 Preparação do inóculo.....	21
4.8.2 Preparo da fermentação.....	21
4.8.3 Acompanhamento e amostragem.....	22
a - Determinação de pH	22
b- Determinação da porcentagem celular volumétrica.....	23
c - Determinação da concentração celular: turbidimetria.....	24
d- Determinação da concentração celular: gravimetria.....	25
e - Determinação da concentração de glicerol	26
4.9 Métodos de cálculo.....	27
a - Fator de conversão do substrato em células.....	27
b - Produtividade em células	28
c - Consumo específico de substrato	28
d - Cálculo de μ_{MAX}	28
e - Cálculo dos parâmetros da equação de inibição	29

5. Resultados.....	32
5.1 Apresentação	32
5.2 Resultados experimentais e dados calculados.....	33
6. Discussão	83
6.1 Ítems da discussão	83
6.1.1 Ensaios de preparo de inóculo	84
6.1.2 Obtenção dos dados de μ_{MAX} , produtividade e $Y_{x/s}$	85
6.1.3 Análise do perfil decrescente de $Y_{x/s}$	88
6.1.4 Análise do perfil decrescente de μ_{MAX}	90
6.1.5 Análise do comportamento do valor do pH	92
6.1.6 Esterilidade do meio.....	94
6.1.7 Ajuste da equação representativa do modelo	95
7. Conclusões	106
8. Referências Bibliográficas	
Segundo as normas ABNT.....	108
9. Anexos	116
A.1 Esquema da dorna de fermentação	117
A.2 Tabelas e curvas referentes à calibração do método gravimétrico de determinação de concentração celular	118
A.3 Tabelas e curvas referentes à calibração do método espectrofotométrico de determinação de concentração de glicerol.....	121
A.4 Procedimento para utilização do pacote estatístico "Statgraphics TM , versão 2.7 - regressão não linear	124

Lista de figuras.

Capítulo 4:

Figura 4.1 -Esquema de tratamento das amostras.....	20
Figura 4.2 - Resumo dos procedimentos dados aos resultados experimentais para obtenção dos parâmetros do processo	31

Capítulo 5:

Figura 5.1 - Ensaio 15a; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	35
Figura 5.2 - Ensaio 15a; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	35
Figura 5.3 - Ensaio 15a; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX}	36
Figura 5.4 - Ensaio 15a; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	36
Figura 5.5 - Ensaio 15b; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	38
Figura 5.6 - Ensaio 15b; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	38
Figura 5.7 - Ensaio 15b; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX}	39
Figura 5.8 - Ensaio 15b; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	39
Figura 5.9 - Ensaio 25a; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	41
Figura 5.10- Ensaio 25a; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	41
Figura 5.11- Ensaio 25a; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX}	42
Figura 5.12- Ensaio 25a; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	42
Figura 5.13- Ensaio 25b; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	44
Figura 5.14- Ensaio 25b; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	44
Figura 5.15- Ensaio 25b; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX}	45
Figura 5.16- Ensaio 25b; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	45
Figura 5.17- Ensaio 35a; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	47
Figura 5.18- Ensaio 35a; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	47
Figura 5.19- Ensaio 35a; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX}	48
Figura 5.20- Ensaio 35a; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	48
Figura 5.21- Ensaio 35b; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	50
Figura 5.22- Ensaio 35b; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	50
Figura 5.23- Ensaio 35b; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX}	51

Figura 5.24- Ensaio 35b; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	51
Figura 5.25- Ensaio 45a; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	53
Figura 5.26- Ensaio 45a; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h).....	53
Figura 5.27- Ensaio 45a; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μMAX	54
Figura 5.28- Ensaio 45a; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	54
Figura 5.29- Ensaio 45b; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	56
Figura 5.30- Ensaio 45b; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	56
Figura 5.31- Ensaio 45b; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μMAX	57
Figura 5.32- Ensaio 45b; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	57
Figura 5.33- Ensaio 55a; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	59
Figura 5.34- Ensaio 55a; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h).....	59
Figura 5.35- Ensaio 55a; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μMAX	60
Figura 5.36- Ensaio 55a; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	60
Figura 5.37- Ensaio 55b; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	62
Figura 5.38- Ensaio 55b; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	62
Figura 5.39- Ensaio 55b; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μMAX	63
Figura 5.40- Ensaio 55b; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	63
Figura 5.41- Ensaio 65a; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	65
Figura 5.42- Ensaio 65a; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h).....	65
Figura 5.43- Ensaio 65a; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μMAX	66
Figura 5.44- Ensaio 65a; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	66
Figura 5.45- Ensaio 65b; Concentração celular (X) em função do tempo (h).....	68
Figura 5.46- Ensaio 65b; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	68
Figura 5.47- Ensaio 65b; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μMAX	69
Figura 5.48- Ensaio 65b; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	69
Figura 5.49- Ensaio 75a; Concentração celular (X) em função do tempo (h)	71
Figura 5.50- Ensaio 75a; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h).....	71
Figura 5.51- Ensaio 75a; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μMAX	72
Figura 5.52- Ensaio 75a; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	72
Figura 5.53- Ensaio 75b; Concentração celular (X) em função do tempo (h).....	74
Figura 5.54- Ensaio 75b; Concentração glicerol (S) em função do tempo (h)	74

Figura 5.55- Ensaio 75b; Logaritmo natural da concentração celular em função do tempo e segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX}	75
Figura 5.56- Ensaio 75b; Perfil do valor do pH em função do tempo (h)	75
Figura 5.57-Ensaio do grupo 15 ao 75; Velocidades específicas máximas de crescimento celular em função da concentração inicial de substrato	76
Figura 5.58 - Ensaio do grupo 15 ao 75; Fatores de conversão substrato em células em função da concentração inicial de substrato	76
Figura 5.59- Ensaio do grupo 15 ao 75; Fatores de conversão substrato em células calculados e obtidos por regressão linear em função da concentração inicial de substrato	77
Figura 5.60- Produtividade média em células obtidas para os ensaios do grupo 15 ao 75	78
 Capítulo 6:	
Figura 6.1 - Correlação entre os valores de Y_x/s e Y_x/s' para os ensaios do grupo 15 ao 75	88
Figura 6.2 - Dados gerados pela equação do modelo ($n>1$) e os dados experimentais de velocidade específica máxima de crescimento celular para os ensaios dos grupos 15 ao 75	97
Figura 6.3 - Dados gerados pela equação do modelo ($n=1$) e os dados experimentais de velocidade específica máxima de crescimento celular para os ensaios dos grupos 15 ao 75	104
Anexos	116
Anexo1: Figura A.1.1 - Esquema da dorna do fermentador marca New Brunswick Sci. Co. utilizado nos ensaios do grupo 15 ao 75	117
Anexo2: Figura A.2.1 - 1a. curva de calibração para os dados de absorbância aparente em função (A') em função da concentração celular obtidos por técnica gravimétrica.	119
Figura A.2.2- 2a. curva de calibração para os dados de Absorbância aparente em função (A') em função da concentração celular obtidos por técnica gravimétrica	120
Anexo3: Figura A.3.1 -1a. curva de calibração para os dados de absorbância (A) em função da concentração de glicerol	122
Figura A.3.2 -2a. curva de calibração para os dados de absorbância (A) em função da concentração de glicerol.....	123
Anexo4: Sequência para o procedimento de utilização do programa Statgraphics v.2.7 para realização de regressão não linear	124

Lista de tabelas.

Capítulo 2:

Composição típica da biomassa de <i>Candida utilis</i>	5
--	---

Capítulo 4:

Tabela 4.1 - Condições experimentais	18
Tabela 4.2 - Metodologia analítica	19

Capítulo 5:

Tabela 5.1 - Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 15a	34
Tabela 5.2 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 15a	34
Tabela 5.3 - Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 15b	37
Tabela 5.4 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 15b	37
Tabela 5.5 - Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 25a	40
Tabela 5.6 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 25a	40
Tabela 5.7 - Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 25b	43
Tabela 5.8 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 25b	40
Tabela 5.8 - Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 35a	46
Tabela 5.10- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 35a	46
Tabela 5.11- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 35b	49
Tabela 5.12- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 35b	59
Tabela 5.13- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 45a	52
Tabela 5.14- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 45a	52
Tabela 5.15- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 45b	55
Tabela 5.16- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 45b	55
Tabela 5.17- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 55a	58
Tabela 5.18- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 55a	68
Tabela 5.19- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 55b	61
Tabela 5.20- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 55b	61
Tabela 5.21- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 65a	64
Tabela 5.22- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 65a	64
Tabela 5.23- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 65b	67
Tabela 5.24- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 65b	67
Tabela 5.25- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 75a	70
Tabela 5.26- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 75a	70
Tabela 5.27- Resultados (T,X,S e pH) referentes ao ensaio 75b	73
Tabela 5.28- Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 75b	73
Tabela 5.29- Resumo geral dos dados calculados e respectivas médias	77
Tabela 5.30- Diferença percentual entre os dados obtidos em duplicata para os ensaios de concentração de glicerol de 15 g/L	79
Tabela 5.31- Diferença percentual entre os dados obtidos em duplicata para os ensaios de concentração de glicerol de 25 g/L	79
Tabela 5.32- Diferença percentual entre os dados obtidos em duplicata para	

os ensaios de concentração de glicerol de 35 g/L.....	80
Tabela 5.33- Diferença percentual entre os dados obtidos em duplicata para os ensaios de concentração de glicerol de 45 g/L.....	80
Tabela 5.34- Diferença percentual entre os dados obtidos em duplicata para os ensaios de concentração de glicerol de 55 g/L.....	81
Tabela 5.35- Diferença percentual entre os dados obtidos em duplicata para os ensaios de concentração de glicerol de 65 g/L.....	81
Tabela 5.36- Diferença percentual entre os dados obtidos em duplicata para os ensaios de concentração de glicerol de 75 g/L.....	82
Tabela 5.37- Valores de produtividade média em células obtidos para os ensaios do grupo 15 ao 75	78
 Capítulo 6.	
Tabela 6.1 - Concentração inicial de células, ensaios do grupo 15 ao 75.....	84
Tabela 6.2 - Valores de Y_x/s e Y_x/s' para os ensaios do grupo 15 ao 75	87
Tabela 6.3 - Valores médios de pH durante os ensaios do grupo 15 ao 75 e seus respectivos desvios-padrão	93
Tabela 6.4 - Dados gerados pela equação do modelo ($n>1$) e os dados experimentais de velocidade para os ensaios do grupo 15 ao 75	96
Tabela 6.5 - Parâmetros gerados pelo algoritmo de Marquardt ($n>1$)	98
Tabela 6.6 - Dados estatísticos fornecidos pelo programa "Statgraphics" versão 2.7, referente o modelo estimado pelo algoritmo de Marquardt ($n>1$)	98
Tabela 6.7 - Dados estatísticos fornecidos pelo programa "Statgraphics" versão 2.7, referente o modelo estimado pelo algoritmo de Marquardt ($n=1$)	
Tabela 6.8 Dados gerados pela equação do modelo ($n=1$) e os dados experimentais de velocidade para os ensaios do grupo 15 ao 75	102
 Anexos.	
Anexo2: - Tabela A.2.1 - Dados referentes à 1a. curva de calibração; absorbância aparente e concentração celular obtidos por técnica gravimétrica	112
- Tabela A.2.2 - Dados referentes à 2a. curva de calibração; absorbância aparente e concentração celular obtidos por técnica gravimétrica	112
Anexo3: - Figura A.3.1 - Dados referentes à 1a. curva de calibração; absorbância (A) e concentração de glicerol.....	114
- Figura A.3.2 - Dados referentes à 2a. curva de calibração; absorbância (A) em função da concentração de glicerol.....	114

Lista de símbolos e abreviaturas.

A	Absorbância, U.A. (unidades de absorbância)
A'	Absorbância aparente (para suspensão de células), U.A.
C	Concentração de células para técnica espectrofotométrica, g/L.
e	Base dos logaritmos naturais.
F	Fator de diluição para o método da antrona.
K _i	Constante de inibição, g/L.
K _s	Constante da equação de Monod, g/L.
M	Concentração molar, n moles/L.
n	Coefficiente adimensional da equação do modelo de inibição, adimensional.
N	Concentração Normal, n equivalentes/L.
P	Concentração de produto (somente na equação 3.7), g/L.
P	Produtividade em células média, g/L.h
PCV	Porcentagem celular volumétrica, %
r	Coefficiente de correlação linear ou coeficiente de Pearson.
RPM	Rotações por minuto, 1/min.
S	Concentração de substrato glicerol, g/L.
S ₀	Concentração inicial de substrato, g/L.
S _f	Concentração final de substrato, g/L.
S*	Concentração de substrato que leva à velocidade específica máxima de crescimento celular, g/L.
S _m	Concentração de substrato limite acima da qual o crescimento é bloqueado, g/L.
T	Tempo, h.
T _i	Tempo decorrido até i horas, h.
T ₀	Tempo inicial, h.
T _f	Tempo final, h.
TF	Tempo de fermentação, h.
V	Volume, L.
V _a	Volume de amostra, mL.
V ₀	Volume inicial, L.
V _f	Volume final, L.
V _s	Volume de sedimento, mL.
V _t	Volume total no tubo de centrifugação, mL.
X	Concentração celular (expresso como matéria seca), g/L.
X ₀	Concentração celular seca inicial, g/L.
X _f	Concentração celular seca final, g/L.
Y _{s/x}	Consumo específico de substrato, g/g.
Y _{s/x'}	Consumo específico de substrato estimado por regressão linear, g/g.
Y _{x/s}	Fator de conversão do substrato em células, g/g.
Y _{x/s'}	Fator de conversão do substrato em células estimado por regressão linear, g/g.
μ	Velocidade específica de crescimento celular, 1/h.
μ _{MAX}	Velocidade específica máxima de crescimento celular, 1/h.
σ	Força iônica do meio

1. RESUMO E "ABSTRACT"

1.1 Resumo

Estudou-se a influência da concentração inicial de substrato no cultivo em fermentador para produção de biomassa de *Candida utilis* IZ-1840 em meio sintético tamponado contendo glicerol (1,2,3-propanotriol) como fonte exclusiva de carbono nas seguintes concentrações: 15, 25, 35, 45, 55, 65 e 75 g/L com ensaios em duplicata.

Observou-se um comportamento cinético característico de fenômeno de inibição por substrato, tendo-se então ajustada uma equação de modelo de inibição baseada na literatura para os dados de velocidade específica máxima de crescimento celular em função da concentração inicial de substrato.

A partir de tal equação determinou-se o valor da concentração inicial de substrato onde não ocorre inibição, definido como S^* ($S^*=17,511$ g/L) e o valor teórico acima do qual a inibição é máxima definido como S_m , ($S_m=175,4$ g/L).

O valor teórico de velocidade específica máxima de crescimento celular, definido como μ^* correspondente ao valor S^* como concentração de substrato inicial foi calculada em 0,225 1/h.

1.2 "Abstract"

The influence of initial substrate concentration in the growth of *Candida utilis* IZ-1840 in a buffered synthetic medium was studied utilizing glycerol (1,2,3-propanetriol) as an exclusive carbon source, in the following concentrations: 15, 25, 35, 45, 55, 65 and 75 g/L in double assays.

Characteristic kinetic behavior of substrate inhibition was detected, then one model equation of inhibition based on literature was adjusted for the maximum specific growth rate in function of the initial substrate concentration.

From this equation it was possible to determine the value of the initial substrate concentration that do not occur growth inhibition, defined as S^* ($S^* = 17,511$ g/L).and the theoretical value of limit concentration where above this the growth inhibition becomes maximum which was defined as S_m ($S_m = 175,4$ g/L).

The theoretical value for maximum specific growth rate, defined as μ^* corresponding to determined S^* as initial substrate concentration was calculated in 0,225 1/h.

2.INTRODUÇÃO

2.1 Produção de "SCP":

O termo "Proteína Unicelular", ou em inglês "Single-Cell Protein" (SCP) é utilizado para designar toda biomassa de origem microbiana utilizada como alimento ou em aditivos alimentares.

A produção mundial de alimentos que é efetivamente utilizada, após uma série de perdas iniciais, nos processos de colheita, armazenamento e transporte é considerada atualmente como insuficiente para as necessidades humanas, estima-se que cerca de 2/3 da população mundial sofra de algum tipo de carência alimentar, ou seja, ao considerarmos a população mundial em cerca de 5 bilhões de pessoas, teremos em torno de 3 bilhões de seres vivos necessitando de melhorar suas fontes nutricionais em vários aspectos, principalmente em relação a fontes de proteína de boa qualidade, vitaminas e carboidratos.

Tal estado de carência alimentar contribui, em paralelo a outros fatores, com a manutenção dos níveis de baixa produtividade no trabalho e péssima saúde da população do chamado terceiro mundo.

Desde épocas bíblicas vem o homem fazendo uso de micróbios para sua alimentação, embora desconhecendo a microbiologia e, nos primórdios, nem suspeitando da existência destes seres microscópicos. Com efeito, os produtos da panificação, as bebidas alcoólicas e outros alimentos fermentados foram usados por muitos povos antigos, em todas os tempos.

Entretanto o uso de massa celular microbiana, ou "SCP", com finalidade alimentar, foi somente produzida em escala ponderável pela primeira vez na Alemanha durante a 1ª. Guerra

Mundial; naquela ocasião cultivou-se a levedura *Candida utilis* em resíduos industriais e domésticos aproveitando-se as massas celulares assim obtidas para alimentação humana.

O processo tecnológico aperfeiçoou-se, sendo empregado novamente durante a 2^a. Guerra Mundial, quando de novo viu-se a Alemanha desprovida de alimentos convencionais.

Recentes progressos em Microbiologia, Bioquímica e Biotecnologia permitiram resolver os problemas desde o cultivo até o processamento dos microrganismos sendo que hoje sabe-se que o processo de obtenção de biomassa microbiana pode ser dividido em cultura, fermentação, separação e secagem das células.

Depois de secas as células podem sofrer algum tratamento para melhoria de suas propriedades nutricionais e características organolépticas, porém em geral, isto encarece o processo, um ponto crítico para produção de leveduras é o tratamento para diminuição do conteúdo excessivo de ácidos nucleicos. (OHTA e TANNENBAUM, 1970 e MAYLIN e col. 1984).

Os microrganismos, em particular as leveduras oferecem muitas vantagens em cultivo industrial quando se visa o seu emprego como ração humana ou animal pois apresentam uma alta velocidade de multiplicação, um elevado valor protéico (30-60%) na matéria seca e ainda podem ser cultivadas em processos descontínuos ou contínuos "indoor" e independentemente das condições sazonais.

Além disto tais microrganismos são passíveis de manipulação, adaptação e melhoramento genético de maneira a se melhorar a composição química, se alterar o tipo do substrato utilizado para o crescimento e o valor nutritivo da biomassa obtida.

A levedura *Candida utilis* já é conhecida há muitas décadas com sendo possuidora de uma excelente fonte de biomassa protéica e vitamínica. (tab. 2.1) com a vantagem de apresentar características toxicológicas consideradas seguras para a alimentação humana. (SERZEDELLO, 1986)

Sua biomassa é muito utilizada como suplemento protéico em rações animais e na indústria de alimentos como aditivo.

Esse microrganismo apresenta possibilidades de utilizar para assimilação: metanol, etanol (COOPER e col. 1975 e KANAZAWA, 1975), glicose, sacarose, glicerol entre outros substratos. (PEPPLER, 1968 e LODDER, 1971)

Composição (%)		Vitaminas (mg/100g)		Minerais (mg/100g)	
Proteína	52	Tiamina	0,80	Fósforo	2100
Carboidrato	22	Riboflavina	4,50	Potássio	2000
Minerais	08	Niacina	55,00	Magnésio	300
Gordura	07	Ac.Fólico	0,40	Enxofre	200
Umidade	06	Piridoxina	8,30	Sódio	100
Fibra crua	05	Ac.Pantotênico	9,40	Cálcio	15
		Biotina	0,08	Ferro	9,5
		PABA	1,40	Zinco	9,3
		Colina	780,00	Fluoreto	1,2
		Inositol	460,00	Manganês	0,7
		Vitamina B12	0,0004		

Tabela 1. Composição típica da levedura *Candida utilis* (SERZEDELLO, 1986)

Estima-se que a fonte de carbono represente cerca de 40% do custo industrial de manufatura de biomassa protéica microbiana: o segundo fator no custo do produto é a energia elétrica utilizada para aeração, remoção do excesso de calor e para secagem das células.

A fonte de carbono utilizada normalmente encarece o produto tornando o processo muitas vezes inviável do ponto de vista econômico. Uma maneira de se contornar tal problema é a utilização de resíduos de processos industriais ricos em carbono para o suprimento desta fonte. Dentre as possibilidades já utilizadas estão: n-parafinas, liquor sulfítico e resíduos da indústria de alimentos e de destilarias entre outros. (COOPER e col., 1975; WILEY e col., 1950; SILVARAMAN e col., 1984 e SANT'ANNA e col., 1985).

2.2 O glicerol:

Em paralelo ao tema de utilização de resíduos anteriormente exposto, existe um estudo realizado pela Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério da Indústria e do Comércio (BRASIL, 1985) que demonstra interesse por parte do governo brasileiro de, a exemplo do "Pro-Álcool", substituir uma parcela do consumo de óleo diesel pelo produto da transesterificação de óleos vegetais - denominado "Biodiesel" (ZANETTI, 1992) , tal produto seria uma alternativa renovável de combustível que, devido às grandes quantidades disponíveis de óleos vegetais no Brasil, poderia se tornar economicamente viável. Baseados em tal projeto, ainda em fase de estudos, ao considerarmos apenas a substituição de 1% do consumo anual (23 milhões de toneladas, base 1990) de óleo diesel, teríamos a produção de cerca de 23 mil toneladas de um dos resíduos do processo de transesterificação, o glicerol (BRASIL, 1991).

BORZANI (1987), em seu "Estudo prospectivo de utilização de glicerina como matéria-prima de processos biotecnológicos", realizado para a EMBRAPA, descreveu a possibilidade de se produzir, cerca de 30 substâncias diferentes por processos biotecnológicos utilizando glicerol como substrato, por cerca de 140 espécies de microrganismos. Conclui nessa publicação que, dentre as várias aplicações possíveis, estaria a produção de biomassa protéica de *Candida utilis*.

Neste contexto esse trabalho destaca a possibilidade de se utilizar este resíduo, o glicerol, como alternativa para fonte de carbono na produção de *Candida utilis*. Sabe-se que tal substância apresenta no comércio um custo relativamente alto, no entanto existem projeções,

caso o governo brasileiro leve adiante estes planos de implementação da utilização de óleos vegetais transesterificados como fonte do chamado "Biodiesel", de que então grandes quantidades de glicerol estarão disponíveis na forma de resíduo, tornando-o atraente do ponto de vista econômico e para sua conversão em biomassa, além disso teremos o tratamento de tal resíduo diminuindo o impacto ambiental decorrente de sua deposição.

2.3 O modelo de inibição:

O estudo do crescimento de microrganismos engloba fenômenos muito complexos dos pontos de vista bioquímico e fisiológico. Até a década de 60 o trabalho de otimização de um processo biotecnológico implicava no estudo de condições ótimas e para tanto estudava-se o maior número possível de variáveis (componentes do meio e variáveis externas), isto demandava muito tempo, era dispendioso e de certa maneira, aleatório. Ademais as interações entre as variáveis eram negligenciadas.

Propor um modelo para explicar um certo fenômeno significa quantificar através de uma ou várias equações matemáticas a interferência de certos fatores, intrínsecos e extrínsecos, no desempenho da atividade celular, que é o objeto de interesse (HARDER e ROELS, 1982).

Existem várias abordagens para modelar processos biológicos celulares, a mais simples é a que compara as células como um conjunto não discernível (modelo não-agregado) e que não se preocupa com fenômenos internos às células, mas apenas com o comportamento global da resposta a certos estímulos (DHURJART e LEOPOLD, 1990). Neste caso diz-se tratar-se de um modelo não-estruturado ou fenomenológico. A maioria dos modelos deste tipo, baseiam-se em variantes da equação de Monod e se apresentam como adequados nas condições de trabalho usuais; muitas indústrias da área farmacêutica, por exemplo SKF&F e E.MERCK contam com plantas automatizadas para otimização de processos fermentativos usando como base modelos para controlar suas operações. Uma das possibilidades do controle trata se manter um perfil de adição de substrato ótimo para um dado processo, neste caso existe um equipamento dotado de

sensores para o substrato, que controla a adição do mesmo, por exemplo num processo tipo batelada alimentada devemos manter a velocidade de produção em taxa máxima, ou com metabólitos tóxicos num certo limite, etc. Tal controle se baseia em uma equação matemática que simula as condições supostamente mais importantes ao processo de maneira a prever quais as condições mais interessantes do ponto de vista do aumento da produtividade e da qualidade do produto.

Tais modelos de natureza empírica são testados comparando-se os dados previstos com os obtidos experimentalmente. Deve-se notar que somente uma boa alocação dos pontos não significa que se trata de um bom modelo, deve-se testar o mesmo nas faixas usuais de trabalho e em condições de extremo. Muitas equações de modelo podem satisfazer os mesmos dados experimentais, o que significa que existem muitas soluções matemáticas para um mesmo problema no campo biológico; devemos então preferencialmente trabalhar com modelos que levem em consideração termos com significação biológica ou baseados em analogias. No entanto o que ocorre na prática é que muitas vezes tais termos tornam o sistema muito complexo tornando-o inadequado para o controle do processo propriamente dito, daí a abordagem fenomenológica.

O modelo de inibição proposto neste trabalho foi estudado por LUONG (1987) para adequar dados cinéticos do crescimento de várias espécies de *Candida* em função da concentração de substrato utilizada, tratando-se de uma modificação da equação de Monod; que considera o fenômeno de inibição como derivado da ação de um segundo fator na equação que contém o parâmetro S_m (definido como a concentração máxima de substrato acima da qual não ocorre crescimento). A equação de Luong é uma derivação da equação de cinética de inibição por produto proposta por LEVENSPIEL (1980), inicialmente utilizada para estimar taxas de velocidade de formação de produto em fermentação alcoólica.

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} [S] (1 - [S])^n}{K_s + [S] S_m} \quad (2.1)$$

Onde:

μ é a velocidade de crescimento estimada pela equação, 1/h.

μ_{MAX} é a velocidade específica máxima de crescimento celular, 1/h.

K_s é uma constante similar a da equação de Monod, g.

S_m é definido como a concentração de substrato limite além da qual o crescimento é totalmente inibido, g/L.

n é um expoente adimensional, sem valor biológico, relacionado com a concavidade da curva de inibição, para $n < 1$ teremos concavidade negativa, ou seja a velocidades decresce rapidamente com o aumento da concentração de substrato (geralmente ocorrendo com substratos relativamente tóxicos, por exemplo metanol), para $n = 1$ teremos um trecho de decréscimo linear e para $n > 1$ teremos concavidade positiva, ou seja as velocidades decrescem mais lentamente com o aumento da concentração de substrato.

Verificamos a partir da equação 2.1, que quando a concentração de substrato tende ao valor de S_m , então o 2º termo torna-se menor que a unidade na magnitude de n , quando a concentração de substrato atingir o valor de S_m temos inibição total.

Concluindo esta introdução, o trabalho tem por finalidade contribuir para o entendimento do fenômeno de inibição por substrato para *Candida utilis* crescendo em glicerol, dando subsídios para futuros trabalhos em processo tipo batelada alimentada e processos contínuos onde, a partir da faixa de substrato não inibitória, será possível controlar o processo com o crescimento em sua taxa máxima. Além do mais fornecer dados para a tecnologia da produção de *Candida utilis* em processo tipo batelada utilizando uréia como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte principal de carbono em meio tamponado.

3. DADOS DA LITERATURA

3.1 Introdução.

O crescimento dos microrganismos pode ser inibido por diversos fatores, agentes físicos como temperatura e radiação ou químicos como a presença de substâncias do tipo benzeno, antibióticos, fenóis entre outras; a presença destas no meio de cultivo podem inibir o crescimento distorcendo o metabolismo do microrganismo bloqueando o crescimento ou provocando a morte celular. Outros fatores inibitórios são conhecidos como o próprio produto e/ou substrato onde aumentos nas concentrações de substrato e de produto levam a diminuição gradativa do crescimento celular até o bloqueio total.

Muitos autores estudaram o fenômeno de inibição do crescimento celular em função da concentração de substrato e como resultado foram propostas algumas equações para quantificar o fenômeno de inibição:

3.2 As equações de inibição:

Muitos modelos que utilizam equações matemáticas foram desenvolvidos na tentativa de quantificar os efeitos da concentração de substrato na velocidade de crescimento, estes são geralmente derivados de analogias a equações de inibição por substrato em reações enzimáticas.

ANDREWS (1968) propôs que o efeito da concentração de substrato na velocidade específica de crescimento celular poderia ser governado pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{(K_s + S)(1 + S/K_i)} \quad (3.1)$$

Onde **K_i** é uma constante de inibição

A equação 3.1 foi utilizada por HALDANE (1965) para descrever inibição enzimática pela formação de um complexo inativo da enzima com duas moléculas de substrato.

BOOM e LAUDELOUT (1962) encontraram que a equação 3.1 era aplicável para adequar dados experimentais de crescimento de *Nitrobacter sp*

A equação de Haldane foi considerada por muitos pesquisadores como apropriada para adequar pontos de velocidade de crescimento em função da concentração de substrato; note-se que quando K_i tende a um valor muito grande, a equação tende a um hipérbole retangular, ou seja à familiar equação de Monod.

EDWARDS (1970) acrescentou mais duas equações utilizadas no entendimento do fenômeno de inibição:

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S (1 + S/K)}{K_s + S + S^2/K_i} \quad (3.2)$$

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{K_s + S + (S^2/K_i) + (1 + S/K)} \quad (3.3)$$

Edwards concluiu que a equação 3.1 levava a resultados semelhantes aos das equações 3.2 e 3.3.

HINSHELWOOD (1946) estudando a redução da velocidade de crescimento de *Bacterium lactis aerogenes* por álcoois propôs a seguinte relação:

$$\mu = \mu_{MAX} - a P \quad (3.4)$$

Onde **P** é a concentração de produto e **a** é uma constante. A equação 3.4 foi utilizada por muitos pesquisadores para explicar inibição por produto em fermentação alcoólica (HOLZBERG e STEINKRAUS, 1967 ; GHOSE e TYAGY, 1979).

WEBB (1963) propõe a seguinte relação que considera a ação da força iônica do meio:

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{S}{S + K_s (1 + \sigma / K_{i,s})} e^{1,17 \sigma} \quad (3.5)$$

Onde $k_{i,s}$ é uma constante de inibição e σ é a força iônica do meio.

WAIMAN e TSENG (1976) utilizaram as seguintes equações para correlacionar dados de velocidade de crescimento de *Candida utilis*, *Candida lipolytica* e *Arthrobacter* AK:

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{K_s + S} \quad \text{quando } S < S^* \quad (3.6)$$

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S - i (S - S^*)}{K_s + S} \quad \text{quando } S > S^* \quad (3.7)$$

Onde S^* é o valor limite de concentração de substrato abaixo da qual o microrganismo cresce aparentemente sem inibição.

AIBA e NAGATANI (1968) propuseram a seguinte equação para correlacionar dados de inibição por produto em fermentação alcoólica:

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S e^{-P/K_i}}{K_s + S} \quad (3.8)$$

EDWARDS (1970) utilizando uma analogia da equação de Aiba, propôs um modelo de inibição exponencial para substrato:

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S e^{-S/K_i}}{K_s + S} \quad (3.9)$$

O mesmo autor utilizando o conceito de difusão controlada de substrato propôs a seguinte relação:

$$\mu = \mu_{MAX} (1 - e^{-S/K_i} - e^{-S/K_s}) \quad (3.10)$$

K_i e K_s são constantes.

LEVENSPIEL (1980) propôs uma equação não linear para quantificar a influência da produção de etanol na taxa de formação de produto:

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S (1 - P/P_m)^n}{K_s + S} \quad (3.11)$$

LUONG (1987) utilizando uma analogia propôs uma relação parecida à equação de Levenspiel, para adequar dados de inibição por substrato.

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S (1 - S/S_m)^n}{K_s + S} \quad (3.12)$$

A partir da equação 3.12 é possível determinar-se o valor de substrato onde devemos ter inibição total do processo de crescimento (S_m) ; note-se que as relações anteriores não forneciam esse valor diretamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 O microrganismo.

Os experimentos foram realizados com a levedura *Candida utilis* IZ 1840 da coleção do Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo.

A cultura foi mantida em meio semi-sólido por repicagem periódica (a cada 3 meses). Nesta técnica o tubo guardado sob refrigeração (4 a 6 °C) era retirado da geladeira e transferido com auxílio de uma alça de platina para tubos com meio YM ("Yeast Morfology Agar") estéreis, em seguida eram incubados por 3 dias em estufa a 30 °C. (KIRSOP,1984) Denominado neste trabalho por Meio I.

4.2 Meios de cultivo e de fermentação.

4.2.1 Meios utilizados para cultivo:

a) Meio I: meio semi-sólido utilizado para conservação do microrganismo, tem como composição:

-extrato de leveduras.....	3g
-extrato de malte.....	3g
-peptona.....	5g
-glicose.....	10g
-água destilada q.s.....	1000ml

O meio I é preparado dissolvendo-se os componentes separadamente com água destilada e ao adicionar-se o ágar, proceder a aquecimento brando para facilitar a dissolução. Ajustar o pH em 6,2 (com HCl 0,1 N) e transferir a quente cerca de 10 mL do meio para tubos de ensaio marca "PYREX^R" (1,2 cm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento), esterilizar em

autoclave a 121 °C por 15 minutos (PELCZAR e col., 1981), aguardar o resfriamento do equipamento, retirar e inclinar numa prancha de madeira (aproximadamente 30°).

b) Meio II: utiliza como fonte principal de carbono o glicerol, e é utilizado como uma primeira adaptação do microrganismo ao consumo deste. Composição:

-extrato de leveduras.....	3g
-extrato de malte	3g
-peptona.....	5g
-glicerol	10g
-água destilada q.s.....	1000ml

O meio II é preparado dissolvendo-se todos os componentes em água destilada e reunindo-os em um recipiente único, completar o volume com água destilada e acertar pH em 6,2 (com HCl 0,1 N). Colocar aproximadamente 40 mL em frascos tipo "Erlenmeyer" de 250 mL e esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

c) Meio III: é o meio utilizado na 2ª fase de preparo de inóculo, sofreu duas modificações em relação a literatura consultada (TRÍBOLI,1992); a primeira foi relativa a mudança da fonte de nitrogênio para uréia, e a segunda foi a inclusão de constituintes tamponantes citrato/ácido cítrico). Assim sua composição ficou:

-glicerol	10g
-K ₂ HPO ₄	0,49g
-KH ₂ PO ₄	0,19g
-Uréia	2,51g
-MgSO ₄ .7H ₂ O	3g
-Na ₂ SO ₄	1,63g

-ZnSO ₄	7mg
-Biotina.HCl	0,004mg

Tampão citrato/ácido cítrico: dissolver 33 g de ácido cítrico monidratado em 800 mL de H₂O, adicionar 320 mL de NaOH 1M. Ajustar, se necessário o valor em pH=4,5.

O meio III é preparado dissolvendo-se os componentes (exceto a uréia) um a um na solução tampão, completar o volume e verificar o valor do pH que deve estar em 4,5. Esterilizar por 121 °C por 15 minutos. A uréia por ser termolábil é dissolvida em separado em 100 mL de tampão e esterilizada a frio por filtração em membrana Millipore^R de diâmetro 0,45 µm. Após o resfriamento do meio a uréia é adicionada. O meio III deve ser armazenado sob refrigeração.

4.2.2 Meio utilizado para fermentação:

a) Meio IV: trata-se do meio utilizado no fermentador, foi calculada a relação estequiométrica entre o a proporção nitrogênio meio original utilizado por Tríboli e col. (TRÍBOLI, 1992) de maneira que a quantidade de uréia não fosse limitante no processo.

Adicionou-se também os componentes tamponantes já citados no item anterior.

O meio ficou com a seguinte constituição:

-glicerol	15 a 75g
-K ₂ HPO ₄	1,42g
-KH ₂ PO ₄	0,49g
-Uréia	2,51g
-MgSO ₄ .7H ₂ O	4,50g
-Na ₂ SO ₄	0,52g
-ZnSO ₄	42mg
-Biotina.HCl	0,004mg

Dissolver em tampão citrato/ácido cítrico os componentes (exceto a uréia) um a um, em seguida completar o volume e verificar o valor do pH para 4,5. Adicionar o meio na dorna do

fermentador e esterilizar por 121 °C por 15 minutos. A uréia por ser termolábil é dissolvida em separado em 100 mL de tampão e esterilizada a frio por filtração em membrana Millipore^R de diâmetro 0,45 µm. Após o resfriamento do meio a uréia é adicionada .

4.3 Equipamentos utilizados

Todos os ensaios de crescimento foram realizados em fermentador marca New Brunswick Scientific Co., modelo FS314 com dornas de vidro de capacidade nominal de 10 litros. A geometria do tanque é vista na anexo 1, procurou-se manter a disposição interna das chicanas e das turbinas aproximadamente iguais em todos os ensaios.

Os ensaios para preparo de inóculo foram realizados em frascos tipo "erlenmeyer" de 500 mL em "shaker" incubadora marca New Brunswick Scientific Co. Os demais equipamentos e aparelhos utilizados serão descritos a medida que forem citados decorrer deste capítulo.

4.4 Planejamento do trabalho.

A proposta deste trabalho de dissertação foi o de se encontrar a faixa de concentração inicial de substrato que o efeito de inibição fosse mínimo ao crescimento do microrganismo *Candida utilis* em glicerol e ajustar-se uma equação que pudesse prever, numa certa faixa de valores, a velocidade específica máxima de crescimento celular, para tanto foram planejados 14 ensaios (7X2) e coletados os dados de velocidade para cada um dos seguintes valores de concentração de substrato inicial:

15 25 35 45 55 65 75 (g/L)

Os ensaios foram previstos em duplicata, sendo que os dados obtidos foram armazenados para posterior análise e montagem da equação.

A denominação de cada ensaio é dada pelo número (valor de S_0) seguido das letras a e b (repetições)

exemplos: ensaio 15a (So= 15 g/L)
 ensaio 15b (So= 15 g/L, repetição)
 ensaio 45b (So= 45 g/L, repetição) etc.

4.5 Definição das condições experimentais.

A tabela 4.1 resume as condições experimentais utilizadas nos ensaios:

Equipamento	NBS
Volume útil	10 L
Volume de meio	04 L
Volume de inóculo	0,3 L
Microorganismo	<i>Candida utilis</i> IZ-1840
Preparo de inóculo	2 fases em "Shaker"
Meio de fermentação	IV (descrito no item 4.2.2)
pH	4,5 +/- 0,3
Freq. Agitação	400 RPM
Vazão específica de ar	1,0 VVM
Antiespumante	UCON estéril
Controle de pH	Por adição de H ₂ SO ₄ 6N ou NaOH 6N
Volume da amostra	de 30 a 40 mL

Tabela 4.1 - Condições experimentais.

4.6 Metodologia analítica

Durante os ensaios de crescimento acompanhou-se uma série de variáveis ao processo que são resumidas abaixo:

Variável do processo	Acompanhamento
pH	Potenciometria
% volume de células	Centrifugação
Absorção da suspensão	Turbidimetria
Concentração celular	Gravimetria em membrana
Concentração glicérol	Método da Antrona (PONS e Col., 1981)

Tabela 4.2 Metodologia Analítica*

*Obs. A sequência da metodologia analítica está esquematizada na figura 4.1

4.7 Tratamento das amostras.

O esquema da figura 4.2 resume o tratamento dado às amostras no decorrer de um ensaio típico.

Figura 4.1 - Esquema de tratamento das amostras.

A cada amostragem eram conferidas as seguintes variáveis: pH, vazão de ar, frequência de agitação, temperatura do banho do fermentador e presença de excesso de espuma; neste último caso eram adicionados 3 ou 4 gotas de agente antiespumante (UCON[®])

4.8 Descrição de um ensaio típico.

Tal descrição pode ser realizada dividindo-se os trabalhos em 3 blocos:

1- Preparo de Inóculo

2- Preparo da Fermentação

3- Acompanhamento e amostragem

4.8.1- Preparo de Inóculo

Foi realizado em 2 fases; na primeira uma pequena quantidade de células provenientes do tubo de conservação (meio I) de *Candida utilis* foram transferidas em condições estéreis (com alça de platina em fluxo laminar) para um erlenmeyer que continha 50 mL do meio II (descrito no item 4.2.1b), incubando-se então em "Shaker" recíproco por 24 horas a 30 °C e 200 RPM.

Na segunda fase de preparo de inóculo, cerca de 15 ml do meio II foram adicionados a um erlenmeyer de 500 mL previamente esterilizado contendo 85 ml de meio III (descrito no item 4.2.1.c), que foram transferidos para o "Shaker" recíproco por 24 horas a 30 °C e 300 RPM.

Após este período, os frascos contendo o meio III (inóculo final) foram adicionados ao meio de crescimento no fermentador (300 mL = 3 frascos), com auxílio de um bico de bunsen com função de flambar a região de entrada da dorna e garantir a esterilidade da transferência.

2- Preparo da Fermentação

Consiste no preparo da dorna de fermentação e dos equipamentos anexos. Procedeu-se à montagem e esterilização do filtro de ar, assim como das soluções que serão utilizadas para os controles do pH e do excesso de espuma. Preparam-se também pipetas estéreis, erlenmeyers, bequeres e outros materiais necessários.

Um volume de 4 L de meio de fermentação (meio IV, descrito em 4.2.1d) foi transferido para a dorna de fermentação e ambos foram esterilizados numa autoclave vertical marca Fanem a 121 °C, por 15 minutos, em seguida à retirada da dorna e ao resfriamento, adicionou-se a solução de uréia previamente esterilizada.

Com o acerto das variáveis pH, vazão de ar, frequência do agitador e temperatura nos respectivos níveis de controle procedeu-se a inoculação e marcou-se o tempo 0, ou início da fermentação, quando era retirada a amostra 0.

3- Acompanhamento e amostragem

Como foi citado anteriormente, o acompanhamento do processo previa verificar a cada amostragem os valores de pH, vazão de ar, frequência do agitador e temperatura, caso houvesse desvios dos valores fixados (tabela 4.1), procedia-se ao acerto.

A amostra era retirada com o auxílio de uma pipeta graduada estéril e um bico de bunsen aceso, que ao flambar a região de retirada de amostra, além do efeito do fluxo de saída de ar (devido à aeração), fornecia boas condições de esterilidade neste procedimento.

Na figura 4.1 tem-se a sequência dos procedimentos para a análise após a amostragem.

É essa sequência que iremos seguir para explicar cada passo do processo fermentativo.

a-Determinação do pH

Foi realizada diretamente em um potenciômetro marca Procyon dotado de eletrodo de membrana de vidro com uma alíquota de 10 mL da amostra, e o desvio do valor 4,5 era corrigido com adição de volume apropriado de H₂SO₄ 6N estéril (ou mais esporadicamente NaOH 6N), o volume adicionado foi extrapolado para o volume de meio no fermentador (aproximadamente 4 L), considerando-se desprezíveis essas variações de volumétricas.

b-Determinação de Porcentagem Celular Volumétrica (PCV)

O procedimento realizado foi o seguinte: 10 mL da amostra foi medido em pipeta volumétrica e adicionados em 2 tubos de fundo cônico graduados de 12 mL. Os tubos foram colocados em centrífuga refrigerada (5 °C) e a mesma era ligada a 3000 RPM por 30 minutos. Em seguida anotaram-se os valores do volume de sedimento nos dois tubos, o sobrenadante livre de células foi separado para análise posterior do substrato glicérol.

O resultado é expresso por $PCV = (V_s/10) \cdot 100$ onde V_s é o volume em mL do sedimento no fundo do tubo após a centrifugação.

Considerações sobre a técnica:

A metodologia da determinação do PCV tem algumas restrições que devem ser avaliadas ao se tentar utilizá-la como recurso de acompanhamento do processo de crescimento.

Primeiramente o método consiste na centrifugação de uma amostra de volume conhecido, que contém uma suspensão de células. Ao término da sedimentação temos então a compactação do material celular no fundo do tubo (de formato cônico e graduado). A relação entre o valor medido do volume do sedimento e o volume total adicionado ao tubo, fornecerá a porcentagem volumétrica celular. O método se torna problemático quando a fração celular ainda é muito pequena fugindo da sensibilidade da escala do tubo ou quando o metabolismo celular provocar a liberação de gases, alterando o volume celular real. Para diminuir este último efeito utilizam-se centrífugas refrigeradas, com bons resultados.

Apesar destes detalhes, a técnica de centrifugação é de grande valia para o acompanhamento do processo fermentativo, em termos qualitativos. Existe uma evidente correlação entre PCV e concentração celular expressa como matéria seca por volume, no entanto devido a dispersões inerentes à metodologia, a quantificação da concentração celular através da medida do PCV se torna pouco confiável servindo principalmente como parâmetro qualitativo de acompanhamento.

c-Determinação da concentração celular: medida da turbidez (absorbância aparente)

A turbidez, leitura do valor do espalhamento da luz provocado pelas células, ou absorbância aparente, foi realizada em um espectrofotômetro marca Procyon modelo SC(90), com cubetas de vidro com 11 mm de diâmetro interno.

A técnica consiste em ressuspender o sedimento do tubo de centrifugação com 5 mL de solução salina com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, e transferir quantitativamente para um balão volumétrico. Considera-se agora a diluição adequada para qual a leitura de absorbância fique entre 0,2 e 0,5 unidades de absorbância. Finalmente homogeneiza-se a suspensão com agitação vigorosa e faz-se a leitura no espectrofotômetro (Procyon SC90), em comprimento de onda=610 nm, usando solução salina como branco. A leitura da turbidez (A') é então substituída na equação de reta da curva de calibração e o resultado multiplicado pela diluição utilizada. Neste trabalho foram realizadas várias calibrações de curva, que relacionavam absorbância aparente (A') em função da concentração celular expressa como massa seca; duas curvas e os dados obtidos estão descritos no anexo 2.

Considerações sobre a técnica:

As técnicas ópticas para a medida da concentração celular (turbidez) são baseadas no efeito do espalhamento da luz provocado por partículas (microrganismos) em suspensão, (ONKEN e col.,1985). Quando a luz passa através de uma suspensão de partículas não absorventes, a mesma é espalhada anisotropicamente do caminho original e a intensidade de luz atenuada na direção do feixe de origem que decresce proporcionalmente em relação a quantidade de partículas; assim A' é proporcional à concentração de células (C) numa certa faixa de leitura (geralmente de 0,2 a 0,6 U.A.). Fatores que podem alterar a relação linear entre A' e C são:

- mudanças na absorção do meio durante o processo de crescimento
- agregação celular e sedimentação
- interferência de compostos insolúveis no meio
- presença de microbolhas

- células mortas fragmentadas

d-Determinação da concentração celular: gravimetria

A medida do pêso seco foi realizada tomando-se uma alíquota de 10 mL do meio de cultura que era centrifugado segundo o descrito anteriormente no item 2, em seguida lavando-se a parte superior da camada de células sedimentadas com 5 ml de solução salina isotônica. Suspendeu-se a camada de sedimento do tubo de centrífuga com 10 ml de solução salina isotônica e transfere-se esta massa quantitativamente para um conjunto de filtração sob pressão dotado com membrana Millipore^R 1,2 um previamente tarada, repetiu-se a lavagem do tubo e em seguida lavar as células com 20 mL de solução salina isotônica. Procedeu-se a filtração e a membrana foi então removida do conjunto, colocada num vidro de relógio e transferida para uma estufa com temperatura controlada em 105 °C por período não menor a 4 horas.

O resultado é expresso por:

$$X(g/L) = (M_2 - M_1)/V_a$$

onde X= concentração celular (material seco), g/L

M_1 = massa da membrana, g

M_2 = massa da membrana + massa material seco, g

V_a = volume de amostra, L

Considerações sobre a técnica:

A técnica da medida da concentração celular obtida desta maneira está sujeita a uma série de restrições tais como:

-não há como diferenciar células mortas ou não viáveis das vivas

-pode existir material suspenso não solúvel originário do meio de cultivo

-os erros devido a imprecisões da balança analítica, em particular para pequenas concentrações podem distorcer apreciavelmente o resultado.

MALLETTE (1969) considera a técnica gravimétrica de obtenção do peso sêco muito útil para o trabalho no laboratório biotecnológico , apesar dos desvios da metodologia.

Esta foi a técnica de escolha para padronização dos resultados em nosso trabalho para a obtenção dos valores de concentração celular e os outros dela derivados tais como os dados cinéticos e de produtividade do processo.

e-Determinação da concentração de glicerol

A concentração de glicerol foi determinada utilizando-se o Método da Antrona (PONS e col. 1982). O método se baseia na reação entre o glicerol e o reagente antrona (antrona 0,75% (m/m) em H₂SO₄ 84% (m/v)) em pH=0,9 e temperatura elevada (100 °C).

O produto de tal reação é um cromógeno com absorção máxima em comprimento de onda =510 nm.

O procedimento da análise consiste em tomar uma alíquota de 5 mL do sobrenadante da centrifugação da amostra e proceder a uma etapa de desproteinização, adicionando-se 0,35 mL de acetona e aguardando-se 5 a 10 minutos, evaporar a acetona em banho-maria à 40 °C por 20 minutos, a amostra é então diluída para a faixa de sensibilidade do método (0-1,5 mg glicerol/ 0,5 ml de alíquota da amostra, equivalente a 0-3 g/L na amostra).

A estimativa da diluição do sobrenadante é feita com auxílio da leitura da absorbância aparente da suspensão de células, como segue:

Temos que para $S_i = S_0/F$ quando $A'_i = A'_0 \times F$ onde F é um fator aproximado que relaciona o consumo de substrato como uma relação direta para produção de células.

S_i é a concentração estimada de substrato na hora i .

A_i é a medida de absorbância aparente na hora i .

O índice 0 indica a leitura inicial (Hora 0)

Calcula-se então o fator F e estima-se a faixa aproximada de concentração de substrato na hora i , dispondo deste dado pode-se realizar as diluições necessárias para se atingir a sensibilidade do método.

Toma-se uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante desproteinizado e diluído, que é colocado num tubo de ensaio juntamente com 5,0 ml do reagente antrona, homogeneiza-se vigorosamente com um agitador de tubos e aquece-se a 100 °C por 10 minutos exatos, interrompendo a reação com um banho de gelo e faz-se em seguida a leitura em espectrofotômetro (Procyon SC90) em comprimento de onda= 510 nm, os dados de absorbância lidos são relacionados com uma curva de calibração previamente preparada. (duas curvas deste trabalho estão descritas no anexo 3)

O valor interpolado na curva de calibração multiplicado pela diluição utilizada nos dá o valor da concentração de glicerol, expressa em g/L.

4.9 Métodos de Cálculo

Considerou-se para efeito de cálculo que não houve alteração significativa de volume na dorna devido à diluição quando da adição de solução ácida para o controle do pH, pois não se atingiram valores maiores que 3%.

a-Cálculo do fator de conversão substrato em células ($Y_{x/s}$)

Tal fator é definido por: $Y_{x/s} = (X_f - X_0) / (S_0 - S_f)$, onde:

X_0 = concentração inicial de células, expressa como peso seco, g/L.

X_f = concentração final de células, expressa como peso seco, g/L.

S_0 = concentração inicial de substrato, expresso em g/L.

S_f = concentração final de substrato, expresso em g/L.

A unidade do fator de conversão substrato em células é g/g.

STOUTHAMER (1969) propõe o cálculo de $Y_{x/s}$ através da regressão dos pares S,X no decorrer do processo fermentativo: a inclinação da reta obtida seria o valor mais exato de $Y_{x/s}$ e não apenas o baseado nos pontos extremos. Em nosso trabalho optamos por realizar os cálculos pelos dois métodos.

b-Produtividade média em células (P)

É definido por $P = (X_f - X_0)/TF$ onde:

P= produtividade, g/L.h

X_f = concentração final de células, expressa como peso seco, g/L.

X_0 = concentração inicial de células, expressa como peso seco, g/L.

TF= tempo de fermentação, h.

TF é avaliado através da análise da curva de crescimento do microorganismo (ordenadas= concentração celular, abcissas= tempo), em seguida ao término da fase de crescimento logaritmico, observa-se um patamar de crescimento cujo início levado ao eixo das abcissas (tempo) dá o valor de uma estimativa do tempo de fermentação.

c-Consumo específico de substrato ($Y_{s/x}$)

É obtido por: $Y_{s/x} = (Y_{x/s})^{-1}$

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

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

d-Método de cálculo de μ_{MAX} (velocidade específica máxima de crescimento)

Foi calculado matematicamente (por técnica de regressão linear) pelo método dos mínimos quadrados. Para um crescimento de microrganismos em fase exponencial e que não ocorre variação de volume temos :

$$dX/dT = \mu X \quad (4.1)$$

onde dX é uma fração infinitesimal da variação da concentração celular no tempo dT, μ é uma taxa de variação (velocidade específica de crescimento) e X é a concentração de microorganismo.

Integrando a expressão acima tem-se:

$$\ln X_f = \ln X_0 + \mu T \quad (4.2)$$

Verificamos que o coeficiente angular da equação (4.2) fornece diretamente o valor de μ , se o crescimento estiver em fase exponencial o valor de μ será o de μ_{MAX} .

Portanto para se calcular μ_{MAX} procede-se à regressão dos pares $\ln X, T$ durante a fase exponencial da curva de crescimento, obtém-se então o valor da inclinação da curva obtida que é o da μ_{MAX} calculada.

e-Cálculo dos parâmetros do modelo de inibição

Como descrito no capítulo introdutório, uma proposta deste trabalho foi a de delimitar a faixa de substrato inicial para o crescimento do microrganismo que não se atinjam valores inibitórios, variando-se para tanto a concentração de substrato conforme o descrito no item 4.4.

De posse dos dados de μ_{MAX} para cada concentração de substrato inicial utilizado, alocou-se uma curva de μ_{MAX} em função de S_0 conforme abaixo:

Verificamos que ao colocarmos cada ponto μ_{MAX} em função de S_0 obtemos uma curva onde temos diminuição da velocidade específica máxima de crescimento com o aumento do substrato inicial de substrato

O modelo de inibição (LUONG, 1987) foi proposto como sendo uma generalização da equação de Monod e, tratando-se de um modelo não estruturado, seus parâmetros biocinéticos foram calculados por regressão não linear multiparamétrica, utilizando o pacote estatístico computacional "Statgraphics" versão 2.7 (STATGRAPHICS USER GUIDE, 1989)

Alguns passos para facilitar a utilização desse recurso computacional através do programa "Statgraphics" v.2.7 estão no anexo 4.

A equação proposta é a seguinte:

$$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{K_s + S} (1 - S/S_m)^n \quad (4.3)$$

Onde temos como parâmetros biocinéticos do modelo não estruturado.

S = concentração de substrato inicial, g/L.

μ = velocidade de crescimento estimada pelo modelo, 1/h.

K_s = analogia à constante da equação de Monod, g.

S_m = valor limite de concentração acima do qual o crescimento é totalmente inibido, g.

μ_{MAX} = velocidade específica máxima de crescimento celular, 1/h

n = constante adimensional sem valor biológico.

De posse dos valores de K_s , S_m , μ_{MAX} e n , para que se possa testar a validade do modelo de inibição os mesmos são substituídos na equação (4.3) e rodados simulando velocidades máximas de crescimento para substratos na faixa de 15 a 75 g/L. Os resultados de tal simulação são comparados estatisticamente aos valores de μ_{MAX} obtidos experimentalmente. Tal análise está no capítulo de Discussão deste trabalho.

Finalizando a figura 4.2 resume o tratamento dado aos resultados experimentais.

Fig. 4.2 - Resumo dos procedimentos dados aos resultados experimentais para obtenção dos parâmetros do processo.

5. RESULTADOS

5.1 Apresentação

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos ensaios referentes ao crescimento de *Candida utilis* em concentrações iniciais de substrato de 15, 25, 35, 45, 55, 65 e 75 g/L.

Os principais resultados serão tabelados e os dados de consumo de substrato, aumento da concentração de células, perfil do valor de pH em função do tempo, demonstrados na forma de gráficos.

Para cada ensaio será mostrada uma curva de crescimento em fase exponencial, cujo gráfico logarítmico fornece uma reta que tem inclinação numericamente igual a velocidade específica máxima de crescimento, que é o principal parâmetro comparativo entre os diferentes ensaios realizados.

Ainda neste capítulo serão apresentados gráficos de μ_{MAX} (velocidade específica máxima de crescimento celular), $Y_{x/s}$ (fator de conversão substrato em células) em função das diversas concentrações de substrato utilizadas e da produtividade em células para cada grupo de ensaios além de um conjunto de tabelas e gráficos contendo os principais resultados calculados para cada grupo de ensaios.

5.2 Resultados experimentais e calculados:

A seguir são apresentados os resultados experimentais coletados durante os ensaios e os dados calculados (conforme item 4.9)

Lembrando alguns símbolos utilizados:

X = Concentração celular, g/L.

S = Concentração de Substrato (glicerol), g/L.

P = Produtividade média, (g/L.h)

$\ln X$ = Logaritmo natural da concentração celular.

μ_{MAX} = Velocidade específica máxima de crescimento celular, 1/h.

TF = Tempo de processo fermentativo, h.

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

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

r = coeficiente de correlação linear dos dados estimados por regressão.

Índices:

o = inicial

f = final

$'$ = calculado por técnica de regressão linear.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,33	14,40	4,55	-1,1239
3	0,70	14,00	4,55	-0,3567
6	1,10	13,20	4,70	0,0953
9	2,90	10,50	4,50	1,0647
12	5,35	6,50	4,70	1,6771
15	8,15	5,10	4,30	2,0980
18	12,00	3,50	4,50	2,4849
21	12,70	1,80	4,50	2,5416
24	13,15	1,61	4,30	2,5764
27	13,00	1,45	4,30	2,5649

Tabela 5.1 - Resultados referentes ao ensaio 15a.

S0=	14,40	g/L
Sf=	1,45	g/L
X0=	0,325	g/L
Xf=	13,00	g/L
uMAX=	0,221	1/h
r=	0,9894	
Faixa	0 - 15	h
TF=	24	h
Yx/s=	0,9788	g/g
P=	0,5281	g/L.h
Yx/s'	1,0086	g/g
r=	0,9642	

Tabela 5.2 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 15a.

Fig. 5.1. - Ensaio 15a; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.2 - Ensaio 15a; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.3 - Ensaio 15a; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.4 - Ensaio 15a; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,450	14,90	4,50	-0,7985
3	0,825	14,00	4,50	-0,1924
6	1,575	12,90	4,70	0,4543
9	3,400	10,50	4,80	1,2238
12	7,250	5,80	4,55	1,9810
15	10,200	3,60	4,45	2,3224
18	11,500	2,50	4,40	2,4423
21	12,650	2,00	4,50	2,5377
24	12,200	1,81	4,50	2,5014
27	12,000	1,43	4,55	2,4849

Tabela 5.3 - Resultados referentes ao ensaio 15b.

S0=	14,90	g/L
Sf=	1,43	g/L
X0=	0,45	g/L
Xf=	12,00	g/L
uMAX=	0,218	1/h
r=	0,9923	
Faixa=	0 - 15	h
TF=	24	h
Yx/s=	0,8575	g/g
P=	0,4813	g/L.h
Yx/s'=	0,9247	g/g
r=	0,9888	

Tabela 5.4 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 15b.

Fig. 5.5. - Ensaio 15b; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.6 - Ensaio 15b; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.7 - Ensaio 15b; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de u_{MAX} .

Fig. 5.8 - Ensaio 15b; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,380	24,90	4,55	-0,9676
3	0,800	23,50	4,55	-0,2231
6	1,450	21,70	4,75	0,3716
9	3,000	20,90	4,90	1,0986
12	7,300	16,90	4,60	1,9879
15	11,700	10,10	4,60	2,4596
18	16,600	6,50	4,40	2,8094
21	18,600	5,80	4,40	2,9232
24	19,900	3,40	4,50	2,9907
27	20,400	3,24	4,70	3,0155
30	20,300	3,20	4,70	3,0106

Tabela 5.5 - Resultados referentes ao ensaio 25a.

S0=	24,90	g/L
Sf=	3,200	g/L
X0=	0,38	g/L
Xf=	20,30	g/L
uMAX=	0,233	1/h
r=	0,9958	
Faixa=	0 - 15	h
TF=	27	h
Yx/s=	0,9180	g/g
P=	0,7378	g/L.h
Yx/s'=	0,9563	g/g
r=	0,9910	

Tabela 5.6 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 25a.

Fig. 5.9. - Ensaio 25a; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.10- Ensaio 25a; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.11- Ensaio 25a; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de u_{MAX} .

Fig. 5.12- Ensaio 25a; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,45	24,90	4,55	-0,7985
3	0,85	23,50	4,55	-0,1625
6	2,10	21,70	4,75	0,7419
9	4,30	20,90	4,90	1,4586
12	8,40	16,90	4,60	2,1282
15	11,15	10,10	4,60	2,4114
18	16,70	6,50	4,40	2,8154
21	18,50	5,80	4,40	2,9178
24	18,80	3,40	4,50	2,9339
27	20,00	3,24	4,70	2,9957

Tabela 5.7 - Resultados referentes ao ensaio 25b.

S0=	24,900	g/L
Sf=	3,240	g/L
X0=	0,450	g/L
Xf=	20,000	g/L
uMAX=	0,249	1/h
r=	0,9831	
Faixa=	0 - 12	h
TF=	27	h
Yx/s=	0,9026	g/g
P=	0,7241	g/L.h
Yx/s'=	0,8993	g/g
r=	0,9826	

Tabela 5.8 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 25b.

Fig. 5.13 - Ensaio 25b; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.14- Ensaio 25b; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.15- Ensaio 25b; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.16- Ensaio 25b; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,49	34,30	4,60	-0,7133
3	0,80	33,10	4,60	-0,2231
6	1,50	30,30	4,60	0,4055
9	3,25	24,30	4,80	1,1787
12	7,00	20,70	4,50	1,9459
15	11,00	18,00	4,45	2,3979
18	16,10	14,40	4,30	2,7788
21	19,10	9,90	4,40	2,9497
24	20,00	8,10	4,50	2,9957
27	21,50	6,30	4,60	3,0681
30	21,50	6,70	4,70	3,0681

Tabela 5.9 - Resultados referentes ao ensaio 35a.

S0=	34,30	g/L
Sf=	6,70	g/L
X0=	0,49	g/L
Xf=	21,50	g/L
uMAX=	0,205	1/h
r=	0,9900	
Faixa=	0 - 18	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,7612	g/g
P=	0,7003	g/L.h
Yx/s'=	0,8138	g/g
r=	0,9647	

Tabela 5.10 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 35a.

Fig. 5.17 - Ensaio 35a; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.18- Ensaio 35a; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.19- Ensaio 35a; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.20- Ensaio 35a; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,40	34,50	4,50	-0,9163
4	0,80	33,10	4,50	-0,2231
8	1,95	29,00	4,60	0,6678
12	4,75	20,00	4,50	1,5581
16	8,25	14,50	4,30	2,1102
20	11,20	11,20	4,50	2,4159
24	15,70	7,90	4,50	2,7537
28	16,90	7,10	4,30	2,8273
32	18,00	6,20	4,30	2,8904
36	18,30	5,40	4,50	2,9069

Tabela 5.11 - Resultados referentes ao ensaio 35b.

S0=	34,50	g/L
Sf=	5,40	g/L
X0=	0,40	g/L
Xf=	18,30	g/L
uMAX=	0,196	l/h
r=	0,9944	
Faixa=	0 - 16	h
TF=	32	h
Yx/s=	0,6151	g/g
P=	0,5594	g/L.h
Yx/s=	0,6171	
r=	0,9336	

Tabela 5.12 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 35b.

Fig. 5.21 - Ensaio 35b; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.22- Ensaio 35b; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.23- Ensaio 35b; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.24- Ensaio 35b; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,45	43,30	4,50	-0,7985
3	0,86	40,60	4,55	-0,1508
6	1,55	38,80	4,70	0,4383
9	2,80	37,00	4,50	1,0296
12	4,90	31,60	4,40	1,5892
15	7,50	24,30	4,50	2,0149
18	10,40	19,80	4,40	2,3418
21	13,10	15,30	4,50	2,5726
24	16,30	11,70	4,50	2,7912
27	18,10	10,80	4,50	2,8959
30	19,60	9,90	4,40	2,9755
33	19,30	9,80	4,30	2,9601

Tabela 5.13 - Resultados referentes ao ensaio 45a.

S0=	43,30	g/L
Sf=	9,80	g/L
X0=	0,45	g/L
Xf=	19,30	g/L
uMAX=	0,177	1/h
r=	0,9901	
Faixa=	0 - 18	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,5627	g/g
P=	0,6283	g/L.h
Yx/s'=	0,5612	g/g
r=	0,9681	

Tabela 5.14 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 45a.

Fig. 5.25 - Ensaio 45a; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.26- Ensaio 45a; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.27- Ensaio 45a; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.28- Ensaio 45a; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,55	44,10	4,50	-0,5978
4	1,00	43,30	4,50	0,0000
8	2,50	37,50	4,60	0,9163
12	5,30	25,10	4,50	1,6677
16	8,55	18,30	4,40	2,1459
20	14,10	15,50	4,60	2,6462
24	17,10	14,90	4,50	2,8391
28	19,30	13,20	4,60	2,9601
32	19,80	13,50	4,50	2,9857
36	20,10	13,40	4,50	3,0007

Tabela 5.15 - Resultados referentes ao ensaio 45b.

S0=	44,10	g/L
Sf=	13,40	g/L
X0=	0,55	g/L
Xf=	20,10	g/L
uMAX=	0,167	1/h
r=	0,9874	
Faixa=	0 - 20	h
TF=	32	h
Yx/s=	0,6368	g/g
P=	0,6109	g/L.h
Yx/s'=	0,5857	g/g
r=	0,9561	

Tabela 5.16 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 45b.

Fig. 5.29 - Ensaio 45b; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.30- Ensaio 45b; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.31- Ensaio 45b; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.32- Ensaio 45b; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,55	53,30	4,60	-0,5978
3	0,94	50,10	4,65	-0,0619
6	1,35	46,90	4,80	0,3001
9	2,40	40,60	4,40	0,8755
12	4,50	36,10	4,40	1,5041
15	6,50	33,40	4,50	1,8718
18	10,40	25,30	4,40	2,3418
21	14,50	22,10	4,30	2,6741
24	18,00	20,30	4,50	2,8904
27	21,15	17,60	4,50	3,0516
30	22,60	16,70	4,60	3,1179
33	23,00	16,50	4,50	3,1355

Tabela 5.17 - Resultados referentes ao ensaio 55a.

S0=	53,30	g/L
Sf=	16,50	g/L
X0=	0,55	g/L
Xf=	23,00	g/L
uMAX=	0,165	1/h
r=	0,9962	
Faixa=	0 - 18	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,6101	g/g
P=	0,7483	g/L.h
Yx/s'=	0,6228	g/g
r=	0,9060	

Tabela 5.18 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 55a.

Fig. 5.33 - Ensaio 55a; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.34- Ensaio 55a; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.35- Ensaio 55a; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.36- Ensaio 55a; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,61	54,09	4,60	-0,4943
4	1,25	52,30	4,65	0,2231
8	2,55	48,70	4,80	0,9361
12	5,15	41,60	4,40	1,6390
16	9,00	37,45	4,40	2,1972
20	14,15	30,23	4,50	2,6497
24	16,70	26,10	4,40	2,8154
28	20,30	22,56	4,30	3,0106
32	22,50	20,33	4,50	3,1135
36	22,70	19,90	4,50	3,1224

Tabela 5.19 - Resultados referentes ao ensaio 55b.

S0=	54,09	g/L
Sf=	16,50	g/L
X0=	0,61	g/L
Xf=	23,00	g/L
uMAX=	0,160	1/h
r=	0,9930	
Faixa=	0 - 20	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,5956	g/g
P=	0,7463	g/L.h
Yx/s'=	0,6593	g/g
r=	0,9817	

Tabela 5.20 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 55b.

Fig. 5.37 - Ensaio 55b; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.38- Ensaio 55b; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.39- Ensaio 55b; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de u_{MAX} .

Fig. 5.40- Ensaio 55b; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,52	66,85	4,70	-0,6539
4	0,75	65,10	4,70	-0,2877
8	1,60	61,80	4,60	0,4700
12	3,20	56,50	4,50	1,1632
16	5,40	51,40	4,60	1,6864
20	9,40	42,90	4,50	2,2407
24	16,50	33,10	4,50	2,8034
28	19,00	25,40	4,50	2,9444
32	19,80	23,00	4,60	2,9857
36	20,00	21,70	4,70	2,9957
40	20,50	20,55	4,80	3,0204

Tabela 5.21 - Resultados referentes ao ensaio 65a.

S0=	66,85	g/L
Sf=	20,50	g/L
X0=	0,52	g/L
Xf=	20,50	g/L
uMAX=	0,151	1/h
r=	0,9937	
Faixa=	0 - 20	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,4311	g/g
P=	0,6660	g/L.h
Yx/s'=	0,4621	g/g
r=	0,9897	

Tabela 5.22 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 65a.

Fig. 5.41 - Ensaio 65a; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.42- Ensaio 65a; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.43- Ensaio 65a; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.44- Ensaio 65a; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,48	62,50	4,55	-0,7340
4	0,81	58,90	4,55	-0,2107
8	1,85	52,30	4,70	0,6152
12	3,40	43,10	4,50	1,2238
16	6,10	35,30	4,70	1,8083
20	9,45	29,30	4,30	2,2460
24	15,50	24,10	4,50	2,7408
28	17,30	21,20	4,50	2,8507
32	17,90	19,70	4,30	2,8848
36	18,30	18,30	4,50	2,9069
40	18,50	18,50	4,50	2,9178

Tabela 5.23 - Resultados referentes ao ensaio 65b.

S0=	62,50	g/L
Sf=	18,50	g/L
X0=	0,48	g/L
Xf=	18,50	g/L
uMAX=	0,154	1/h
r=	0,9928	
Faixa=	0 - 20	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,4095	g/g
P=	0,6007	g/L.h
Yx/s=	0,4379	g/g
r=	0,9198	

Tabela 5.24 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 65b.

Fig. 5.45 - Ensaio 65b; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.46- Ensaio 65b; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.47- Ensaio 65b; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.48- Ensaio 65b; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,95	75,91	4,60	-0,0513
4	1,25	73,20	4,70	0,2231
8	2,10	71,00	4,80	0,7419
12	4,15	65,40	4,50	1,4231
16	6,30	56,90	4,70	1,8405
20	8,90	45,30	4,50	2,1861
24	14,00	41,40	4,60	2,6391
28	16,60	36,00	4,60	2,8094
32	18,50	30,00	4,65	2,9178
36	18,80	27,00	4,60	2,9339
40	18,70	26,50	4,70	2,9285

Tabela 5.25 - Resultados referentes ao ensaio 75a.

S0=	75,91	g/L
Sf=	26,50	g/L
X0=	0,95	g/L
Xf=	18,70	g/L
uMAX=	0,119	1/h
r=	0,9872	
Faixa=	0 - 20	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,3592	g/g
P=	0,5917	g/L.h
Yx/s=	0,3822	g/g
r=	0,9763	

Tabela 5.26 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 75a.

Fig. 5.49 - Ensaio 75a; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.50- Ensaio 75a; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.51- Ensaio 75a; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.52- Ensaio 75a; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	pH	ln X
0	0,65	76,00	4,50	-0,4308
4	1,05	75,10	4,60	0,0488
8	1,85	72,50	4,70	0,6152
12	3,10	68,40	4,50	1,1314
16	4,60	60,15	4,50	1,5261
20	8,00	54,20	4,60	2,0794
24	12,40	46,18	4,50	2,5177
28	15,00	33,45	4,65	2,7081
32	19,50	28,70	4,70	2,9704
36	19,80	25,40	4,70	2,9857
40	19,50	24,40	4,80	2,9704

Tabela 5.27 - Resultados referentes ao ensaio 75b.

S0=	76,00	g/L
Sf=	24,40	g/L
X0=	0,65	g/L
Xf=	19,50	g/L
uMAX=	0,123	1/h
r=	0,9986	
Faixa=	0 - 24	h
TF=	30	h
Yx/s=	0,3653	g/g
P=	0,6283	g/L.h
Yx/s'=	0,3793	g/g
r=	0,9870	

Tabela 5.28 - Resumo dos dados obtidos a partir do ensaio 75b.

Fig. 5.53 - Ensaio 75b; Concentração celular em função do tempo.

Fig. 5.54- Ensaio 75b; Concentração de glicerol em função do tempo.

Fig. 5.55- Ensaio 75b; Logaritmo da concentração celular em função do tempo, com segmento de reta ajustado para estimativa de μ_{MAX} .

Fig. 5.56- Ensaio 75b; Perfil do valor do pH em função do tempo.

Fig. 5.57. - Ensaio do grupo 15 ao 75; Velocidades específicas máximas de crescimento celular em função da concentração inicial de substrato.

Fig. 5.58 - Ensaio do grupo 15 ao 75; Fatores de conversão substrato em células em função da concentração inicial de substrato.

S (g/L)	uMAX (1/h)			P (g/L.h)			Yx/s (g/g)		
	a	b	média	a	b	média	a	b	média
15	0,221	0,218	0,2195	0,5280	0,4830	0,5055	0,978	0,857	0,9175
25	0,233	0,249	0,2410	0,7378	0,7241	0,7310	0,918	0,903	0,9105
35	0,205	0,196	0,2005	0,7003	0,5590	0,6297	0,761	0,615	0,6880
45	0,177	0,167	0,1720	0,6280	0,6110	0,6195	0,563	0,637	0,6000
55	0,165	0,160	0,1625	0,7480	0,7460	0,7470	0,610	0,596	0,6030
65	0,151	0,154	0,1525	0,6680	0,6010	0,6345	0,432	0,410	0,4210
75	0,123	0,119	0,1210	0,6280	0,5920	0,6100	0,365	0,359	0,3620

Tab. 5.29 - Resumo geral dos dados calculados e respectivas médias.

Figura 5.59 - Ensaio do grupo 15 ao 75 - Fatores de conversão substrato em células calculados e obtidos por regressão linear em função da concentração de substrato inicial (valores médios)

Fig. 5.60 - Dados de produtividade média em células para os ensaios do grupo 15 ao 75

S (g/L)	P (g/L.h)		
	ensaio a	ensaio b	média
15	0,528	0,483	0,506
25	0,738	0,724	0,731
35	0,700	0,559	0,630
45	0,628	0,611	0,620
55	0,748	0,746	0,747
65	0,668	0,601	0,635
75	0,628	0,592	0,610

Tab. 5.37 - Valores de produtividade média em células para os ensaios do grupo 15 ao 75

Ensaio do grupo 15

Parâmetro	15a	15b	Diferença (%)
μ_{MAX} (1/h)	0,221	0,218	1,38
P (g/L.h)	0,528	0,481	9,77
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,978	0,857	14,12
$Y_{s/x}$ (g/g)	1,022	1,167	-12,43
$Y_{x/s'}$ (g/g)	1,009	0,925	9,08
$Y_{s/x'}$ (g/g)	0,991	1,081	-8,33

Tab 5.30 - Diferença percentual entre os dados obtidos da duplicata de ensaios com concentração inicial de glicerol de 15 g/L.

Ensaio do grupo 25

Parâmetro	25a	25b	Diferença (%)
μ_{MAX} (1/h)	0,233	0,249	-6,43
P (g/L.h)	0,738	0,724	1,93
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,918	0,903	1,66
$Y_{s/x}$ (g/g)	1,089	1,107	-1,63
$Y_{x/s'}$ (g/g)	0,956	0,899	6,34
$Y_{s/x'}$ (g/g)	1,046	1,112	-5,94

Tab5.31- Diferença percentual entre os dados obtidos da duplicata de ensaios com concentração inicial de glicerol de 25 g/L.

Ensaaios do grupo 35

Parâmetro	35a	35b	Diferença (%)
uMAX (1/h)	0,205	0,196	4,59
P (g/L.h)	0,701	0,623	12,52
Yx/s (g/g)	0,761	0,615	23,74
Ys/x (g/g)	1,314	1,626	-19,19
Yx/s' (g/g)	0,814	0,617	31,93
Ys/x' (g/g)	1,228	1,621	-24,24

Tab 5.32 - Diferença percentual entre os dados obtidos da duplicata de ensaios com concentração inicial de glicerol de 35 g/L.

Ensaaios do grupo 45

Parâmetro	45a	45b	Diferença (%)
uMAX (1/h)	0,177	0,167	5,99
P (g/L.h)	0,628	0,611	2,78
Yx/s (g/g)	0,563	0,637	-11,62
Ys/x (g/g)	1,776	1,57	13,12
Yx/s' (g/g)	0,561	0,586	-4,27
Ys/x' (g/g)	1,783	1,706	4,51

Tab 5.33 - Diferença percentual entre os dados obtidos da duplicata de ensaios com concentração inicial de glicerol de 45 g/L.

Ensaaios do grupo 55

Parâmetro	55a	55b	Diferença (%)
uMAX (1/h)	0,165	0,16	3,03
P (g/L.h)	0,748	0,746	0,27
Yx/s (g/g)	0,61	0,596	2,30
Ys/x (g/g)	1,639	1,678	-2,38
Yx/s' (g/g)	0,623	0,659	-5,78
Ys/x' (g/g)	1,605	1,517	5,48

Tab 5.34 - Diferença percentual entre os dados obtidos da duplicata de ensaios com concentração inicial de glicerol de 55 g/L.

Ensaaios do grupo 65

Parâmetro	65a	65b	Diferença (%)
uMAX (1/h)	0,151	0,154	-1,99
P (g/L.h)	0,668	0,601	10,03
Yx/s (g/g)	0,432	0,41	5,09
Ys/x (g/g)	2,315	2,439	-5,36
Yx/s' (g/g)	0,462	0,438	5,19
Ys/x' (g/g)	2,164	2,283	-5,50

Tab 5.35 - Diferença percentual entre os dados obtidos da duplicata de ensaios com concentração inicial de glicerol de 65 g/L.

Ensaaios do grupo 75.

Parâmetro	75a	75b	Diferença (%)
μ_{MAX} (1/h)	0,123	0,119	3,36
P (g/L.h)	0,628	0,592	6,08
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,365	0,359	1,67
$Y_{s/x}$ (g/g)	2,739	2,785	-1,65
$Y_{x/s'}$ (g/g)	0,382	0,379	0,79
$Y_{s/x'}$ (g/g)	2,618	2,638	-0,76

Tab 5.36 - Diferença percentual entre os dados obtidos da duplicata de ensaios com concentração inicial de glicerol de 75 g/L.

6. DISCUSSÃO

6.1 Os itens da discussão:

Neste capítulo discutiremos os seguintes itens desta dissertação:

Os ensaios de preparo de inóculo e sua variabilidade;

As técnicas para obtenção dos dados de μ_{MAX} , produtividade média em células e $Y_{x/s}$;

A tendência de um perfil decrescente de $Y_{x/s}$ com o aumento da concentração inicial de substrato;

O perfil decrescente da velocidade específica máxima de crescimento celular com o aumento da concentração inicial de substrato;

Uma análise da variação do pH durante o processo;

As condições de esterilidade do processo e;

O ajuste das equações representativas do fenômeno de inibição por substrato.

6.1.1 Ensaios de Preparo de Inóculo.

O inóculo para cada ensaio de crescimento de *Candida utilis* em glicerol foi preparado em duas fases em "shaker" segundo descrito no item 4.8.1

A tabela 6.1 fornece o valor de cada concentração inicial de células para os ensaios do grupo 15 ao 75.

Ensaio	X inicial (g/L)
15a	0,33
15b	0,45
25a	0,38
25b	0,45
35a	0,49
35b	0,45
45a	0,55
45b	0,55
55a	0,55
55b	0,61
65a	0,52
65b	0,52
75a	0,48
75b	0,95

Tabela 6.1- Concentração inicial de células, ensaios do grupo 15 a 75.

A análise da tabela 6.1 nos indica que, exceptuando-se os pontos referentes aos ensaios 15a e 75b, houve boa reprodutibilidade nos ensaios de preparo de inóculo, para a concentração inicial de células de 0,5 g/L proposta, tivemos como valor médio dos valores de X_0 igual a 0,511 g/L com desvio padrão de 0,08 g/L.

Deve-se salientar que, segundo TRIBOLI (1992), as concentrações celulares das amostras iniciais por serem muito diluídas estão sujeitas a incertezas da ordem de 10 a 20% devido a imprecisões da medida de massa com a balança analítica; isto poderia explicar os valores discrepantes dos X_0 nos ensaios 15a e 75b.

A partir da análise das figuras de crescimento celular em função do tempo no capítulo 5, verificamos que o final da fase de preparo de inóculo as células se encontram adaptadas ao meio e ao substrato e já iniciam o crescimento no fermentador em fase de crescimento exponencial, o que é verificado com as retas traçadas nos gráficos logarítmicos de crescimento, onde o início do trecho linear em todas curvas é na hora 0.

6.1.2 Obtenção dos dados de μ_{MAX} , produtividade média e $Y_{x/s}$.

As tabelas 5.30 até 5.36 demonstram as diferenças percentuais entre os diversos parâmetros relativos aos ensaios do grupo 15 ao 75.

A análise destas tabelas mostra que tivemos diferenças percentuais da ordem 12% para os ensaios em duplicata, valores de diferença maiores (15-30%) ocorreram principalmente para os dados $Y_{x/s}$ (fator de conversão substrato em células e de $Y_{s/x}$ (consumo específico de substrato) para os ensaios do grupo 35, poderiam ser

explicadas devido ao cálculo de $Y_{x/s}$ depender de medidas de concentração de massa celular final e inicial (erros analíticos da técnica gravimétrica) e também à variabilidade do ensaio duplicata 35b cujo valor de X_f ficou abaixo do esperado. Cabe notar que os demais resultados calculados de $Y_{x/s}$ e $Y_{s/x}$ tiveram valores de diferença da ordem de 12% para ensaios dos demais grupos

Como foi anteriormente colocado, os dados de velocidade específica máxima de crescimento celular eram importantes para a proposta do trabalho, e por serem obtidos por regressão dos pares $\ln X, T$ (conforme descrito no item 4.9d), durante o crescimento exponencial do microrganismo sofreram uma variabilidade menor, isto pode ser explicado por envolver-se a análise de regressão do conjunto de dados durante a fase exponencial de crescimento celular portanto atenuando os erros analíticos, como resultado para os ensaios em duplicata, como consequência os valores de diferença entre os μ_{MAX} obtidos, ficaram em menos de 6,0 %.

A tabela 5.37 mostra os valores de produtividade média para o conjunto de ensaios realizados, o parâmetro teve variações máximas da ordem de 10 % de diferença para a maioria dos ensaios entre os valores em duplicata exceptuando-se o grupo 35 que teve diferença de 12,5%, à exemplo da oscilação de $Y_{x/s}$, esta também foi provavelmente devida aos erros analíticos para obtenção das concentrações celulares iniciais e finais.

O ensaio 35b como citado anteriormente, apresentou um valor médio de concentração final de células abaixo do esperado sendo que o mesmo alterou o valor da produtividade média calculada.

A figura 5.60 mostra a tendência pouco clara do comportamento da produtividade para os ensaios com S_0 diferentes, sendo que o valor ficou entre 0,6 a 0,7 g/l.h para o conjunto de ensaios.

Grupo	$Y_{x/s}$	$Y_{x/s'}$
15	0,917	0,963
25	0,731	0,927
35	0,688	0,715
45	0,601	0,573
55	0,603	0,641
65	0,421	0,450
75	0,362	0,380

Tabela 6.2 - Valores de $Y_{x/s}$ e $Y_{x/s'}$ para os ensaios dos grupos 15 ao 75.

Figura 6.1 Correlação entre os valores de $Y_{x/s}$ e $Y_{x/s'}$ para os ensaios do grupo 15 ao 75.

6.1.3 Análise do perfil decrescente de $Y_{x/s}$.

A fig 5.58 mostra a tendência do fator de conversão substrato em células de diminuir em função do aumento da concentração de substrato de modo aproximadamente linear. Lembrando que o fator de conversão substrato em células nos dá uma estimativa do rendimento da conversão do substrato em células, é de certa maneira natural que, com o aumento do processo inibitório o mesmo tenda a diminuir. Isto pode ser devido ao fato de que o valor de $Y_{x/s}$ ser calculado em função dos pares X,S durante todo o processo fermentativo, e como se observa para

os ensaios com S_0 acima de 35g/L, diminui-se os valores de concentrações finais de células ao mesmo tempo que acumulam o substrato glicerol no fase estacionária, resumindo: $Y_{x/s}$ tende a diminuir com o aumento da concentração de substrato porque produz-se menos células, com conseqüente desperdício de substrato no final do processo.

Pode-se a partir dos dados da figura 5.58 calcular a seguinte equação de reta para estimar o decréscimo de $Y_{x/s}$ em função da concentração inicial de glicerol $[S_0]$.

$$Y_{x/s} = 1,0822 - 0,0098 [S] \quad r = 0,9749 \quad (6.1)$$

Podemos constatar que as diferenças entre os valores de $Y_{x/s}$ e $Y_{x/s}'$ (estimados por regressão dos pares S,X) permaneceram em torno de 5 a 7%, O que indica que ambas técnicas de obtenção do fator de conversão substrato em células e seu recíproco, consumo específico de substrato ($Y_{s/x}$) poderiam ser utilizadas.

Isto pode ser melhor observado a partir da fig. 5.59 que mostra $Y_{x/s}$ e $Y_{x/s}'$ em função dos diversos valores de S_0

A figura 6.1 e tabela 6.2 mostra a correlação entre os dados de $Y_{x/s}$ e $Y_{x/s}'$ Ao fazermos uma análise de regressão linear (exceptuando-se os dados referentes ao grupo 25), obtemos:

$$Y_{x/s} = 0,0104 + 0,9493 Y_{x/s}' \quad (r=0,9928) \quad (6.2)$$

Tal valor de coeficiente de correlação linear nos indica que o conjunto de valores de Y_x/s comparados ao Y_x/s' é muito parecido, sendo verificada a maior oscilação nos ensaios do grupo 25.

6.1.4 Análise do perfil decrescente da velocidade específica máxima de crescimento celular.

Verificamos a partir da figura 5.57 a tendência do declínio das velocidades com o aumento da concentração de substrato inicial, tal decréscimo de velocidades foi um indicativo do fenômeno de inibição; cabe aqui discutirmos alguns dos fatores intrínsecos e extrínsecos à célula que poderiam contribuir no fenômeno global da inibição do crescimento celular.

I. Fatores intrínsecos:

- Pressão osmótica do meio de cultivo: o glicerol em concentrações elevadas, somado às quantidades apreciáveis de sais e componentes tamponantes do meio provocam o aumento da pressão osmótica levando a gastos de energia (transporte) do microrganismo que necessitam de energia para prover uma concentração salina interna adequada às células de *Candida utilis*.

Por outro lado, muitos microrganismos utilizam glicerol como agente retentor de água no interior celular, porém em concentrações bem menores do que as utilizadas neste trabalho. Não foram encontradas referências na literatura que descrevesse o efeito em concentrações maiores de glicerol em células de levedura especificamente

- Regulação enzimática; a penetração do glicerol na célula ocorre por difusão facilitada em eucariotos (LIN e col. 1976) tais como *Candida utilis*, GANCEDO e col. (1968) detectaram que a taxa de entrada do glicerol através da membrana de *Candida utilis* é cerca de 10^5 vezes maior do que em *Saccharomyces cerevisiae*, por conseguinte as células se tornam muito susceptíveis à altas concentrações de glicerol do meio de cultivo, necessitando de mecanismos de controle para diminuir o possível efeito da saturação enzimática provocado pelo substrato.

Há dois mecanismos de assimilação de glicerol para os microrganismos; no primeiro glicerol atua no metabolismo da célula sendo convertido a dihidroxiacetona por ação da enzima glicerol-desidrogenase NAD-dependente e em seguida convertida a gliceraldeído 3-P pela dihidroxiacetona-quinase, sendo direcionado para o ciclo das pentoses onde fornecerá energia para o crescimento celular, (DOUIX e col., 1986), a dihidroxiacetona-quinase e a glicerol-desidrogenase são descritas como sítios de regulação em estudos com bactérias *Cellulomonas sp* inibidas por retroregulação (NISHISE e col., 1985) com o aumento da concentração do substrato e também por ação de certas substâncias tais como acetóis e metilglioxal, tal assimilação pode ocorrer em anaerobiose, no segundo mecanismo que ocorre nas leveduras *Candida utilis*, *Hansenula polymorfa* e outras é um processo estritamente aeróbico (GANCEDO e col., 1968, TANI e YAMADA, 1987) onde temos ação da glicerol-quinase e da glicerofosfato-desidrogenase, a presença de AMP inibe fortemente a ação da glicerol-quinase sendo um possível sítio de regulação nessas leveduras.

II. Fatores extrínsecos:

- Transferência de oxigênio:

O aumento da viscosidade e da pressão osmótica do meio de cultura provoca sensível diminuição na transferência de oxigênio dissolvido em função de pelo menos dois fatores: aumento da resistência na transferência entre as fases líquido/gás e diminuição da solubilidade do oxigênio no meio (CRUEGER & CRUEGER, 1989); como o crescimento celular é predominantemente um processo aeróbico, tais fatores diminuem a eficácia dos processos que requerem energia para multiplicação celular. Como citado no item anterior, o crescimento de *Candida utilis* é estritamente aeróbico sendo portanto a disponibilidade de oxigênio um fator limitante.

6.1.5 Análise do comportamento do valor do pH durante o processo.

Um ponto crítico para o nosso trabalho foi testarmos a validade do meio tamponante proposto; verificamos a partir da tabela 6.3 nos valores médios de pH, durante os ensaios dos grupos 15 ao 75 e seus respectivos desvios, que houve um bom controle de pH devido à constituição tamponante do meio de cultivo, isto é muito interessante pois ao não necessitarmos do controle automático de pH, o custos de equipamento do processo e sua viabilidade econômica tornam-se maiores.

As mudanças excessivas de pH no meio são principalmente devidas ao metabolismo do nitrogênio e em menor escala à produção de metabólitos. Ao mudarmos a fonte de nitrogênio do meio original (TRÍBOLI, 1992) que utilizava cloreto de amônio, para o meio proposto contendo uréia, conseguimos conter a excessiva tendência de diminuição do pH com o decorrer do processo.

Uma outra questão importante é que, caso utilizemos uréia como fonte de nitrogênio ocorreria encarecimento do processo em função da mesma necessitar de esterilização à frio por filtração em membrana tipo Millipore, veremos no tópico seguinte que tal problema pode ser contornado dependendo de qual a finalidade da produção da biomassa.

Grupo	pH médio	Desvio padrão
15	4,5175	0,1350
25	4,6000	0,1492
35	4,5024	0,1327
45	4,4977	0,0852
55	4,5091	0,1368
65	4,5619	0,1274
75	4,6227	0,0096

Tab. 6.3 - Valores médios de pH durante os ensaios dos grupos 15 ao 75 e seus respectivos desvios-padrão.

6.1.6 Esterilidade do meio.

Como anteriormente abordado (capítulo 4), todo o preparo do processo, o crescimento do microrganismo, o acompanhamento e a amostragem eram realizados em condições estéreis, não se verificando presença de contaminantes durante o processo; no entanto para o crescimento em escala industrial a esterilidade pode ser um fator economicamente inviável, e para tanto cabe discutirmos alguns fatores:

O meio contendo glicerol como fonte exclusiva de carbono é relativamente seletivo para algumas espécies de leveduras adaptadas sendo que na prática os riscos de contaminação ocorrem quase que exclusivamente para bactérias: *Acetobacter oxidans* e *Acetobacter suboxidans*, a forte carga salina e o valor de pH de controle (pH=4,5) restringiu bastante a possibilidade de contaminação por outras bactérias.

Outro fator que auxiliou na manutenção da esterilidade é a utilização de grandes culturas de inóculo de levedura, atingindo-se altas concentrações e inibindo o crescimento de espécies diferentes. Conclui-se que industrialmente os cuidados com esterilidade poderiam se restringir à presença de bactérias acéticas no meio de fermentação.

No caso de produção de biomassa para ração animal, poder-se-ia utilizar antibióticos tais como penicilina G (BORZANI e AQUARONE, 1957) e outros antibióticos (AQUARONE, 1960) para controle bacteriano; no caso de produção de biomassa unicelular para consumo humano a legislação não permite utilização de antibióticos devendo o controle de esterilidade ser realizado por outros meios.

6.1.7 Ajuste da equação representativa do fenômeno de inibição por substrato.

Conforme foi citado no item 4.9e, (materiais e métodos), foi utilizada técnica de regressão não linear multiparamétrica para obtenção dos parâmetros da equação que representa o decréscimo da velocidade específica máxima de crescimento celular em função do aumento da concentração de substrato inicial.

Nesta discussão convém lembrar as vantagens decorrentes do ajuste de uma equação a valores experimentais:

Possibilidade de realizar derivações e interpolações e utilização dos parâmetros biocinéticos obtidos em estudos de otimização do processo.

A equação obtida podendo ser linearizada é factível de uma análise de significância que permite constatar a validade da regressão que leva a equação de ajuste.

A equação utilizada para o ajuste foi inicialmente utilizada por LEVENSPIEL (1980) para adequar dados de velocidade ao fenômeno de inibição por produto no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente Luong e colaboradores (LUONG, 1987) utilizou a mesma equação para ajustar dados de velocidade ao crescimento de diversas espécies de *Candida* em função de várias concentrações de metanol como substrato inibitório.

So (g/L)	μ_{MAX} ' (1/h)	μ_{MAX} experimental (1/h)			
5	0,17465				
10	0,21369				
15	0,22435	0,2195			
20	0,22457				
25	0,21991	0,2341			
30	0,21267				
35	0,20396	0,2005			
40	0,19440				
45	0,18436	0,1720			
50	0,17406				
55	0,16367	0,1625			
60	0,15328				n
65	0,14297	0,1525	$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{K_s + S} \left(1 - \frac{S}{S_m}\right)^n$		
70	0,13281				
75	0,12284	0,1210			
80	0,11310				
85	0,10361				
95	0,08549				
105	0,06865				
110	0,06076	μ_{MAX}	0,33043	1/h	
120	0,04611	K_s	4,01076	g/L	
130	0,03309	S_m	175,4	g/L	
150	0,01252	n	1,6802		
160	0,00541				
170	0,00093				

Tabela 6.4 - Dados gerados pela equação do modelo e os dados experimentais de velocidade para os ensaios do grupo 15 ao 75 (n>1).

Na Tabela 6.4 mostra-se os parâmetros obtidos pela regressão não linear multiparamétrica, que utiliza o algoritmo de Marquardt (MARQUARDT, 1963), os dados estimados pela equação e os dados experimentais de velocidade referentes aos ensaios do grupo 15 ao 75.

Fig. 6.2 - Dados gerados pela equação do modelo ($n > 1$) e os dados experimentais de velocidade de crescimento para os ensaios do grupo 15 ao 75.

A fig. 6.2 mostra a posição dos pontos experimentais em relação à curva interpolada, isto pode ser melhor avaliado pela tabela 6.6 a qual fornece dados estatísticos da regressão dos pontos, nesta verificamos uma análise de variância contendo soma dos quadrados dos desvios, o número de graus de liberdade da curva interpolada e o valor do coeficiente de correlação linear.

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{MAX}	0,330427	1/h
Ks	4,010764	g/L
Sm	175,4001	g/L
n	1,680198	adimensional

Tab. 6.5 - Parâmetros obtidos pelo algoritmo de Marquardt.

Origem	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado dos desvios
Modelo	0,23659	4	0,05915
Erro	0,004851	3	0,001213
r=	0,9986		

Tab. 6.6 - Dados estatísticos fornecido pelo programa "Statgraphics - versão 2.7, referente ao modelo estimado pelo algoritmo de Marquardt ($n > 1$).

Os parâmetros da tabela 6.5 permitem que se estime a seguinte equação:

$$\mu = \frac{0,3304 [S] (1 - [S])}{4,0108 + [S]} \frac{1,680}{175,40} \quad (6.3)$$

Como citado no item 4.8.e, a derivação da equação 6.1 nos permite calcular o valor da concentração de substrato [S] correspondente ao ponto de máximo da curva referente a fig 6.5; tal valor de substrato (S*) é calculado a partir da anulação da 1ª. derivada da equação 6.1.(modificado de LUONG e col., 1987)

$$S^* = 1/2 \{ [(((n+1)/n)^2 K_s^2 + 4K_s S_m/n)]^{1/2} - ((n+1)/n) K_s \} \quad (6.2)$$

Substituindo com os valores da tab. 6.5:

$$S^* = 1/2 \{ [(1,5952)^2 16,0857 + 1674,78]^{1/2} - ((1,5952) 4,0107) \}$$

Obtemos para valor de S* = 17,511 g/L

e

E para $\mu^* = 0,225 \text{ 1/h}$

Para o cálculo de μ^* , temos que o ponto de máximo da curva de velocidades (fig. 6.2) extrapolado ao eixo das abcissas (concentração de substrato inicial), fornecerá o valor de substrato S^* inicial que leva ao maior valor de velocidade específica máxima de crescimento celular estimado pela equação 6.3 (nas condições estudadas), o valor de S^* substituído na equação 6.3 fornece o valor de $\mu^* = 0,225$ 1/h, que é o valor de velocidade máxima procurada.

Substituindo os valores da tab. 6.5 na equação 6.3, e calculando o valor de substrato, achamos para S^* o valor 17,511 g/L.

Obtemos o valor de S_m equivalente a 175,4 g/L, tal valor de concentração de substrato leva teoricamente a inibição total do crescimento do microrganismo segundo a equação 6.1.

Analisando os dados da fig. 6.4 verificamos que para concentrações de substrato na ordem de 130 g/L a velocidade de crescimento é muito baixa (em torno de 0,03 1/h), supondo-se que na prática este valor de velocidade não é viável para a produção da biomassa, pode-se então se admitir que o valor correspondente para S_m será de 130 g/L, Tal distorção ocorre em função da curva tender ao zero muito lentamente por causa de sua concavidade ser positiva (voltada para cima) com o valor de $n > 1$, tornando o valor de S_m teórico relativamente alto, tal valor de n , constante na tabela 6.4, foi referente ao melhor conjunto de parâmetros para adequar-se os dados experimentais de velocidade, que levava ao maior coeficiente de correlação da curva, porém sem considerações práticas.

Se no entanto impormos o valor de $n=1$, ou seja a forma da curva na fase de decréscimo (fig. 6.3) ser adequada à uma reta e fazendo a regressão não linear teríamos como parâmetros:

$$K_s = 2,7383 \text{ g/L}$$

$$\mu_{MAX} = 0,3006 \text{ g/L}$$

$$S_m = 129,50 \text{ g/L}$$

$$n = 1$$

Tal regressão apresenta os seguintes dados estatísticos:

Origem	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado dos desvios
Modelo	0,23654	3	0,07885
Erro	0,005261	4	0,001315
$r =$	0,9973		

Tab. 6.7 - Dados estatísticos fornecido pelo programa "Statgraphics - versão 2.7, referente ao modelo estimado pelo algoritmo de Marquardt ($n=1$).

S0 (g/L)	μ_{MAX}' (1/h)	μ_{MAX} experimental (1/h)			
5	0,18714				
10	0,21796				
15	0,22483	0,2195			
20	0,22358				
25	0,21860	0,2341			
30	0,21160				
35	0,20339	0,2005			
40	0,19439				
45	0,18484	0,1720			
50	0,17491				
55	0,16470	0,1625			
60	0,15426				n
65	0,14366	0,1525	$\mu = \frac{\mu_{MAX} S}{K_s + S} \frac{(1 - S)}{S_m}$		
70	0,13292				
75	0,12207	0,1210			
80	0,11113				
85	0,10012				
95	0,07793		μ_{MAX}	0,30023	1/h
105	0,05555		K_s	2,7119	g/L
110	0,04431		S_m	129,6	g/L
120	0,02175		n	1	
129,6	0,00000				

Tab. 6.8 - Dados gerados pela equação do modelo (n=1) e os dados experimentais de velocidade de crescimento para os ensaios do grupo 15 ao 75.

Substituindo tais valores na equação 6.2, com $n=1$ temos:

$$S^* = K_s[(1 + S_m/K_s)^{1/2} - 1]$$

$$\text{ou } S^* = 2,7383 [(1 + 129,50/2,7383 - 1)]^{1/2}$$

Obtemos para S^* o valor de 16,291 g/L.

e para $\mu^* = 0,22496$ 1/h

Tal comparação significa dizer que ambas as equações satisfazem bem o conjunto de pontos, tanto fazendo $n>1$ ou com $n=1$, sendo que os valores obtidos de S_m (130 g/L para $n>1$ e 129,5 g/L para $n=1$), S^* (17,511 para $n>1$ e 16,291 para $n=1$) e μ^* (0,2252 1/h para $n>1$ e 0,22496 1/h para $n=1$) são bastante próximos.

Fig. 6.8 - Dados gerados pela equação do modelo ($n=1$) e os dados experimentais de velocidade de crescimento para os ensaios do grupo 15 ao 75.

Cabe neste ponto uma breve discussão sobre a validade dos parâmetros obtidos, devendo-se lembrar que se esta equação adequada se refere a um modelo não-estruturado da literatura, os parâmetros cinéticos obtidos não tem significação biológica, o que se observa nos valores de K_s experimentais para leveduras que são da ordem de 0,05 até 0,6 g/L; que comparados ao obtido pelo modelo; 4,01 g/L ($n>1$) e 2,738 g/L ($n=1$) demonstram que não devem confundir-se pois são de natureza diferente, outros trabalhos com modelos apresentam valores para K_s também nessa ordem de grandeza tais como o de ABOUTBOUL (1984).

Os parâmetros da equação 6.3 se apresentam como adequados apenas a este processo e nestas condições particulares permitindo interpolações restritas. Note-se que o valor de substrato estimado pelo modelo como sendo o que leva à maior velocidade ($S^*=17,511$ g/L), não é necessariamente coincidente com o valor de máximo da tabela de velocidades obtidas experimentalmente isso é interessante pois ilustra que o valor estimado por este tipo de análise é fruto da pressão exercida por todo o conjunto de pontos experimentais, não ficando restrita a dados de uma pequena faixa experimental nem às suas incertezas, o que torna o valor obtido estatisticamente mais confiável.

O modelo de inibição com sua equação assim proposta é baseada em condições reais e feito por analogias, neste caso com a equação de Monod , somando-se um 2º. termo que contém o componente inibitório do crescimento explicando o fenômeno tanto na estimulação do crescimento em baixas concentrações ($S<S^*$) quanto na inibição para concentrações de substrato acima de S^* . ($S^*<S<S_m$).

Neste tipo de abordagem não temos como meta impor uma solução matemática para o conjunto de dados experimentais, mas sim utilizar uma analogia baseada em equações empíricas para fornecer parâmetros que podem ser importantes para um determinado sistema e, de posse de tais dados, otimizar o processo.

Devemos no entanto tomar cuidado com o uso destas informações, por exemplo não é possível extrapolações para condições experimentais diferentes das utilizadas, nem fazer uso das constantes biocinéticas obtidas do modelo não estruturado em outros sistemas.

7. CONCLUSÕES

7.1 Os dados apresentados nesta dissertação permitem as seguintes conclusões:

a) O novo meio sintético proposto contendo glicerol como fonte de carbono, sais nutrientes, componentes tamponantes e uréia como fonte de nitrogênio pode ser utilizado para produção de biomassa unicelular.

b) Obteve-se uma curva de velocidades, característica de fenômeno de cinética de inibição por substrato cuja amplitude pôde ser quantificada através de uma equação de ajuste.

c) Com a análise desta equação pôde-se obter os seguintes parâmetros:

I. A Concentração inicial de substrato (S^*) que leva à velocidade máxima de crescimento celular com valor igual a 17,511 g/L, correspondente a um valor de $\mu^* = 0,225$ 1/h

II. A concentração de substrato limite acima da qual ocorre bloqueio do crescimento de valor igual a 175,4 g/L (ou em termos prático cerca de 130 g/L).

Tais parâmetros serão úteis em futuros trabalhos de otimização de processos tipo batelada e batelada alimentada para o crescimento de *Candida utilis.*, em glicerol.

d) A utilização do algoritmo de Marquardt para obtenção dos parâmetros da equação que quantifica o fenômeno de inibição se mostrou útil e prático, sendo bem aplicável em modelos não-estruturados.

e) Obteve-se uma curva aproximadamente linear de decrescimento de Y_x/s com o aumento da concentração inicial de substrato para os ensaios de 15 a 75 g/L.

f) O modelo cinético proposto aparenta ser útil para representar a cinética de inibição por substrato; o mesmo representa tanto o estímulo do crescimento em baixas concentrações de substrato inicial quanto o efeito inibitório em concentrações maiores.

g) Em termos práticos as duas equações relatadas são equivalentes, a que considera a fase de declínio das velocidades máximas de crescimento um trecho linear ($n=1$) e aquela que considera a fase de declínio das velocidades máximas uma curva com concavidade positiva, que tende mais lentamente ao zero. ($n>1$).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

*De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o padrão do CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI, 1990).

ABOUTBOUL, H., KERZNER,A.L., SCHMIDELL,W Modelo matemático para fermentação alcoólica - análise de parâmetros. **Publicação ACIESP** n.51, p.382-442, São Paulo, 1986 (Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo,11.)

AIBA,S., SHODA, M.,NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition of alcohol fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v10 , p 845-87, 1968.

ANDREWS, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizaing inhibitory substrates. **Biotechnol Bioeng.**, New York, v.10 , p.707-23, 1968.

AQUARONE,E. - Penicillin and tetraciclín as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar molasses. **Appl. Microbiol.**, Baltimore, v.8, p. 263-8, 1960

- BUCKLAND,B.C, OMSTEAD,D.R eds. In: **Computer control of fermentation processes: The application of computer control to improve fermentation processes**, Florida, CRC Press, 1990. cap. 10
- BOOM,B. & LAUDELOUT,H. Kinetics of nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradski*. **Biochem. J.**, London, v.85, p. 440-6 ,1962.
- BOUIX,M & LEVEAU,J.Y. - In: **Biotecnologia,:** Cinéticas microbianas Scriban,R. ed. São Paulo, Editora Manole, p.103-207,1984.
- BORZANI,W. **Estudo prospectivo da utilização de glicerina como matéria prima de processos biotecnológicos**, São Paulo: EMBRAPA, 1987.
- BORZANI,W., AQUARONE, E. Emprego de antibióticos como desinfetantes em fermentações industriais. **An. Farm. Quim. São Paulo**, São Paulo, v.8, n.3-4, p.5-11, 1957.
- BRASIL (a), Ministério da Infra Estrutura. **Balanço energético nacional**, 1991. Brasília, 1991.
- BRASIL (b), Ministério da Indústria e Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Óleos vegetais: experiência de uso automotivo desenvolvido pelo Programa OVEG-I** , Brasília, 1985 (Série Documentos, nº 21)

COOPER,P.G., SILVER,R.S., BOYLE,J.P. Semicomercial studies of a petroprotein based on n-parafins. In: Tannenbaum, S.R., Wang, D.I.C, eds **Single Cell Protein II**, Cambridge, MIT Press, 1975 p.454-59

CRUEGER,W. CRUEGER,A. **Biotechnology, a textbook of industrial microbiology**, 2. Ed., Munich, Verlag Oldenbourg Gmbh, 1989.

DHURJART, P.S, LEOPOLD, R.J. In: OMSTEAD, D.R., ed. **Computer control of fermentation processes: Biological Modeling**, , Florida, CRC Press, 1990. cap 8

DIFCO LABORATORIES. **Difco manual** : dehidrated culture media and reagents for microbiology. 10.ed. Detroit, 1984.

EDWARDS, V.H. - The influence of high substrate concentration on microbial kinetics. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v12, p. 679-712, 1970.

GANCEDO,C. , GANCEDO, J.M., e SOLS,A. Glycerol metabolism in yeasts **European J. Bioch.**, v.5, n.2, p.165-72, 1968.

GHOSE,T.K., TYAGY, R.D. Rapid ethanol fermentation of celular hidrolisate. II Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.21, n8..p. 1401-20 ,1979.

HALDANE, J.B.S. - **Enzymes**, , Cambridge, MIT Press ,1965.

HARDER,A., ROELS,J.A. Application of simple structured models in bioengineering. In: A. Fiechter, ed **Adv Biochem Eng**, .Berlin, v.21, p.55-107, 1982.

HINSHELWOOD, C.N. - **The chemical kinetics of the bacterial cells**, London: Oxford University Press, 1946.

HOLZBERG,R., FINN, K., STENKRAUS, K.H,. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.9, p.413, 1967.

KANAZAWA, M. The production of yeast from n-parafins. In: TANNENBAUM, S.R., WANG, D.I.C, eds. **Single cell protein II**, Cambridge, MIT Press, 1975. p.427

KIRSOP, B.E. Maintenance of yeasts. In: KIRSOP, B.E., SNELL, J.J.S., eds. **Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods**. London, Academic Press, 1984.

LEVENSPIEL,O. The Monod equation: a revisit and a generalization of product inhibition situations **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.22, n.4, p. 1671-87, 1980.

- LIN,E.C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** v.30, Palo Alto, n.2, p.535-78, 1976.
- LODDER,J. ed. **The yeasts: a taxonomic study.** Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1971, p.1604-6.
- LUONG, J.H.H, Generalization on Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.29, p. 242-248, 1987.
- MALLETTE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: NORRIS, J.R., RIBBONS, D.W. **Methods in microbiology.** London, Academic Press, 1969. v.1
- MARQUARDT, D.W. An algorithm for least squares stimation of nonlinear parameters. **J. Soc. Ind. Appl. Math.**, Philadelphia, v.2 p. 231-441, 1962.
- MAY,J.W., SLOAN,J. Glicerol utilization in *Schizosaccharomyces pombe*: dehidrogenation in the initial step. **J. Gen. Microbiol.**, Colchester, v.23, n.1, p. 183-5, 1981.
- MAYLIN,A., CERVANTES,A., BEAMES,R. Evaluation with rats of yeast and garbage swill protein. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa v.64, n.6, p.643-746, 1984.
- NISHISE,H., OGAWA,A., TANI,Y., YAMADA.H. Glycerol-desydrogenase and glycerol dissimilation in *Cellulomonas sp* **Agric. Biol. Chem.**, Tokio, v.3 , n.49, p.629-38, 1985.

- OHTA,S., SINSKEY,A., TANNENBAUM, S.R. Characterization of a heat shock process for reduction of the nucleic acid of *Candida utilis*. **Appl. Microbiol.**, v.22, n.3, p. 415-21, 1971.
- ONKEN, U., BUCKHOLZ,R., SITTIG,W. Measurement and Instrumentation. In: Brauer,H., ed., **Biotechnology**, Weinhein: Verlag Chemie, 1985. v.2, cap. 29.
- PELCZAR, M., REID,R., CHAN,E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Mac Graw-Hill , 1981, v.1-2.
- PEPPLER, H.J., Industrial production of single cell protein from carbohidrates, In: MATELLES.I., TANNENBAUM, S.R., eds. **Single Cell Protein**, Cambridge , MIT Press, ,1968 p.229.
- PONS,A., ROCA,C., AGUILÓ,F.J., GARCIA,M.A., PALOU.A.,. A Method for the simultaneous determination of total carbohidrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v4, p.227-231, 1981.
- PRESCOTT,S.C., DUNN, C.G. **Industrial microbiology**, New York, Mac Graw-Hill Book Company, Inc. 1982.
- REHM H.-J., REED, G., ed. **Biotechnology: a comprehensive treatise** Weinhein, Verlag Chemie, 1981. v.1-3

- SANT'ANNA, E.S., AQUARONE,E. Crescimento de *Candida utilis* em liquor sulfítico (liquor negro): experimento em fermentador, **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.16, n.4, p.305-8, 1985.
- SERZEDELLO,A. Biomassas microbianas e algumas de suas aplicações **Publicação ACIESP** , São Paulo, n.51, p.273-89, 1986 (Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo,11)
- SILVARAMAN, H., PUNDLE,A.U., PRABLUNE, A.A. Growth of *Candida utilis* on distillery effluent. **Biotechnol. Lett.** , Manchester, v.6, n.11, p.752-62, 1984.
- STATGRAPHICS, USER GUIDE, - **Nonlinear Regression**, versão 5, pag. N1-19 Statistics Graphics Corporation, 1985.
- STOUTHAMER,A. Determination and significance of molar growth yields, In: NORRIS, J.R., RIBBONS,D.W.eds., **Methods in microbiology.** London, Academic Press, 1969. v.1.
- TANI, Y. , YAMADA, K. Glycerol metabolism in methylotrophic yeasts **Agric. Biol. Chem.**, Tokio, v.5 , n.51, p.1927-33, 1987.

TRÍBOLI, E.P.R. -**Influência da temperatura no cultivo descontínuo de *Candida utilis* IZ-1840 utilizando glicerol como principal fonte de carbono.** São Paulo, 1992. - Dissertação de Mestrado - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

WAYMAN, M., TSENG, M.C. Inhibition-threshold substrate concentrations **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.18, n.3, p. 383-7, 1976.

WEBB, J.L. **Enzyme and metabolic inhibitors**, New York, Academic Press, 1963. v.1.

WILEY, A.J., DUBEY, G.A., LUECK, B., HUGHES, L.P. *Torula* yeast grown on spent sulfite liquor. **Ind. Eng. Chem.**, Washington v42, n.1 p.1830-9, 1950.

ZANETTI, R. ed. Bio-Diesel process convert soybean oil, **Chem. eng.** n.5, p.21, 1992.

9. Anexos

A seguir são apresentados os anexos citados no texto:

Anexo 1 - Esquema da dorna de fermentação

Legenda

- A- Saída de amostra
- B- Entrada de ar comprimido
- C- Chicana
- D- Chicana
- E- Turbina superior de 6 pás ("quebra-espuma")
- F- Turbina inferior de 6 pás
- G- Dispersor de ar

Cotas:
a - 200 mm
b - 75 mm
c - 80 mm
d - 230 mm
e - 440 mm

Figura A.1.1 - Esquema da dorna de fermentação utilizada.

Anexo 2- Absorbância aparente (A') em função da concentração celular

A1	A2	média	X (g/L)
0,13	0,12	0,125	0,150
0,24	0,23	0,235	0,315
0,29	0,29	0,290	0,394
0,36	0,36	0,360	0,473
0,50	0,52	0,510	0,630
0,60	0,58	0,590	0,788
0,95	0,93	0,940	1,250

Tabela A.2.1 - Dados da 1a. curva de calibração:

Absorbância aparente (A') em função da concentração celular.

$$C \text{ (g/L)} = -0,0087 + 1,3314 A' \quad (r=0,9986)$$

A1	A2	média	X (g/L)
0,12	0,11	0,115	0,150
0,20	0,23	0,215	0,315
0,27	0,29	0,280	0,394
0,35	0,39	0,370	0,473
0,48	0,51	0,495	0,630
0,59	0,57	0,580	0,788
0,89	0,92	0,905	1,250

Tabela A.2.2 - Dados da 2a. curva de calibração:

Absorbância aparente (A') em função da concentração celular.

$$C \text{ (g/L)} = -0,0067 + 1,3671 A' \quad (r=0,9976)$$

Figura A.2.1 - 1a. curva de calibração para os dados de absorbância aparente (A') em função da concentração celular obtida por técnica gravimétrica.

Figura A.2.2 - 2a. curva de calibração para os dados de absorbância aparente (A') em função da concentração celular obtida por técnica gravimétrica.

**Anexo 3- Absorbância (A) em função
em função da concentração de glicerol**

A1	A2	média	Glicerol (g/L)
0,050	0,050	0,05	0,30
0,105	0,100	0,1025	0,40
0,210	0,200	0,205	0,75
0,230	0,240	0,235	0,90
0,400	0,400	0,400	1,35
0,480	0,470	0,475	1,80
0,930	0,950	0,940	3,00

Tabela A.3.1 - Dados da 1a. curva de calibração:

Absorbância (A) em função da concentração de glicerol.
 $C \text{ (g/L)} = 0,1461 + 3,1060 A$ (r=0,9959)

A1	A2	média	Glicerol (g/L)
0,065	0,070	0,0675	0,30
0,110	0,100	0,105	0,40
0,220	0,200	0,210	0,75
0,250	0,240	0,245	0,90
0,420	0,430	0,425	1,35
0,480	0,480	0,480	1,80
0,900	0,930	0,915	3,00

Tabela A.3.2 - Dados da 2a. curva de calibração:

Absorbância (A) em função da concentração de glicerol.
 $C \text{ (g/L)} = 0,0873 + 3,2234 A$ (r=0,9961)

Figura A.3.1 - 1a. curva de calibração para os dados de absorbância (A) em função da concentração de glicerol obtida pelo método da antrona.

Figura A.3.2 - 2a. curva de calibração para os dados de absorbância (A) em função da concentração de glicerol obtida pelo método da antrona.

Anexo 4 - Procedimento para utilização do pacote estatístico StatgraphicsTM, v 2.7

O programa estatístico utilizado: Statgraphics versão 2.7, foi cedido pelo CCE-USP (Centro de Computação Eletrônica, USP), segue nesse anexo algumas indicações para utilização do mesmo, para maiores detalhes consultar o manual do usuário (STATGRAPHICS, USER GUIDE, 1985) pode ser encontrado na biblioteca do CCE

1. Acionar o programa com o comando STATGRAF,
2. Montar 2 arquivos contendo os dados experimentais, no submenu FILE
3. Escolher a opção NONLIN do menu de regressão
4. Entrar com os nomes dos arquivos que contém os dados experimentais
5. Entrar com o número mínimo de iterações (25 é o padrão)
6. Entrar com as sementes (valores iniciais para estimativa)
7. Entrar com a equação para estimativa:

$$((\text{PARM}[1]*\text{ARQ})/(\text{PARM}[2]+\text{ARQ})) * ((1-(\text{ARQ}/\text{PARM}[3]))^{(\text{PARM}[4])})$$

Onde PARM de 1 a 4 equivale aos parâmetros estimados pelo regressor.
ARQ é o nome do arquivo de dados

Após alguns minutos o programa gerará uma equação com os 4 parâmetros fornecendo dados estatísticos sobre a regressão, caberá ao usuário verificar se a solução é compatível com o sistema experimental (físico ou biológico), cabe lembrar que os valores das "sementes" são críticos para que o método consiga convergência para valores adequados ao modelo, sendo necessárias várias tentativas para que se consiga a melhor solução.

Figura A.4.1 - Sequência para utilização do pacote estatístico Statgraphics, versão 2.7 para regressão não linear multiparamétrica.