



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

BRENDA FONTINELE ALVES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CMIAT
170-L7K ANTAGÔNICA A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

FORTALEZA

2017

BRENDA FONTINELE ALVES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CMIAT
170-L7K ANTAGÔNICA A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Monografia apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.

Coorientador: Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F77p Fontinele Alves, Brenda.
Produção de biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CMIAT 170-L7k antagônica a fungos fitopatogênicos / Brenda Fontinele Alves. – 2017.
45 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo.
Coorientação: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.
1. Processos fermentativos. 2. Biomassa. 3. Planejamento fatorial. I. Título.

CDD 661

BRENDA FONTINELE ALVES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* CMIAT
170-L7K ANTAGÔNICA A FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Monografia apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márjory Lima Holanda Araújo. (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto. (Coorientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Ma. Edna Maria Silva Cordeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, irmãos, familiares e
amigos.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Agricultura e Agropecuária, pela oportunidade profissional que oferece aos estudantes.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de fazer o curso.

À Coordenação do curso em Bacharelado em Biotecnologia, pela dedicação com os alunos.

Ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, pela orientação e confiança no meu trabalho.

À Profa. Dra. Marjory Holanda Lima Araújo, pela orientação para ajudar no desenvolvimento desse trabalho e ao Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas pelo minicurso de estatística.

À Ma. Edna Maria Silva Cordeiro, por ter aceitado participar da banca examinadora e pela companhia no Laboratório de Tecnologia da Biomassa.

À Natalia Moura, pela amizade, extrema dedicação e suporte para que esse trabalho fosse realizado.

Ao meu pai, Francisco de Assis Araújo Alves, por todo amor, carinho e apoio durante minha vida pessoal, profissional e acadêmica.

À minha mãe, Alzair dos Santos Fontinele Alves, por toda dedicação, esforço, carinho e especialmente pela paciência em ir comigo realizar as coletas das minhas amostras durante o período da noite.

Aos meus irmãos, Moara Fontinele Alves e Victor Fontinele Alves, pela união e por todas as conversas de apoio.

Ao André Vitoriano Lins por todo companheirismo, apoio, ajuda e pela compreensão de ir comigo realizar também as coletas das minhas amostras durante o período da noite.

Aos amigos que fiz na graduação, Dayane, Larisse, Letícia, Éwerton, Mateus Farias, Matheus Soares, Joao Pedro, Jackson, Lucas e Luca, pela amizade, ajuda, conversas e saídas para esquecer um pouco a pressão que temos na vida pessoal e acadêmica.

Aos meus amigos, Douglas, Felipy, Ícaro e Milena, por todo apoio, amizade e companhia nas saídas de final de semana.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Isabel, Rachel, Misrael e Rayanne e Profa. Dra. Cristina Paiva, por toda ajuda e amizade durante minha etapa acadêmica.

A todos os amigos do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical: Natália, Dayane, Genilton, Gerusa, Milena e Josifrance, pela ajuda diária nos experimentos e aos integrantes do Laboratório de Tecnologia da Biomassa.

“Não há saber mais ou saber menos, há
saberes diferentes”.

(Paulo Freire)

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae tem uma importância biotecnológica mundial, seja na panificação, na produção de bebidas alcoólicas e etanol combustível, como fonte de proteína animal e humano e no controle biológico. A linhagem de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K isolada da microbiota natural de frutos tropicais pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina/PE) possui atividade antagonista contra fitopatógenos de podridão pós-colheita causada por *Apergillus niger* em uva de mesa. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um processo fermentativo para a produção de biomassa da levedura *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K que apresenta um potencial antagonista a fitopatógenos. Assim, 20 mL do pré-inóculo com 24 horas de cultivo da cultura ativada em meio YM, foi injetado em um biorreator BioFlo 115 com dorna de 2L de volume útil, que continha um meio de cultura YM2. Inicialmente, conduziram-se as fermentações em processo descontínuo como controle: agitação 150 rpm, aeração 8 L_{ar}/min e temperatura 30 ± 1°C em fermentador, com dois impelidores do tipo Rushton. Em seguida, foi estudado o processo de alimentação com uma solução concentrada contendo 200 g/L de açúcar hidrolisado. A alimentação foi iniciada com 16 horas de processo e as vazões de alimentação foram testadas 12,5, 15, 20 mL/h. Em um terceiro experimento, foi realizado um planejamento experimental de fatorial 2³ sob a influência das variáveis taxas de aeração (8, 9, 10 L_{ar}/min), agitação (150, 200 e 300 rpm) e vazão de alimentação (15, 17,5 e 20 mL/h). Amostras de todas as fermentações foram retiradas a intervalos regulares e centrifugadas. No sobrenadante, foi determinada a concentração de açúcares redutores, pelo método de DNS. O pellet foi re-suspendido em água destilada para a quantificação da concentração de biomassa por espectrofotometria a 600nm. No processo descontínuo, a produção de biomassa foi de 7,65 g/L após 24 horas de cultivo. Para o processo descontínuo alimentado 12,5 a 20 mL/h de taxa de alimentação a biomassa final foi ligeiramente superior a 14 g/L após 40 horas de cultivo. No planejamento experimental verificou-se que a maior produção de biomassa de levedura após 40 horas de fermentação foi 15,65g/L. Conclui-se o ensaio com todas as variáveis no nível máximo com parâmetros: vazão de alimentação em 20 mL/h, taxa de aeração de 10 L_{ar}/min e taxa de agitação de 200 rpm, foram os parâmetros para uma produção de maior concentração de biomassa desta estirpe de *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: Processos fermentativos. Biomassa. Planejamento fatorial.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae has a worldwide biotechnological importance, whether in baking, in the production of alcoholic beverages and ethanol, as a source of protein for humans and animals and in biological control. The *S. cerevisiae* strain CMIAT 170-L7K isolated from tropical fruits natural microbiota by Embrapa Semi-Arid (Petrolina/PE) has antagonistic activity to phytopathogens of post-harvesting rot caused by *Apergillus niger* in table grape. The aim of the present work was to establish a fermentative process for biomass production of yeast *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K that present an antagonistic potential against phytopathogens. Therefore, 20 mL of the pre-inoculum with 24 hours of cultivation of the culture activated in YM medium was injected in a bioreactor BioFlo 115 with a 2 L useful volume fermentation vat, which contained YM2 culture medium. Initially, discontinuous process fermentations were conducted as a control: agitation 150 rpm, aeration 8 L_{air}/min and temperature 30 ± 1°C in fermenter, with two impellers Ruston. Then, the feeding process was studied with a concentrated solution containing 200 g/L of hydrolysed sugar. The feeding was initiated with 16 hours of fermentation process and the feeding rates were 12,5, 15, 20 mL/h. In a third experiment, it was performed an experimental design of factorial 2³ under the influence of the variables aeration rate (8, 9, 10 L_{air}/min), agitation (150, 200 e 300 rpm), and feeding rate (15, 17,5 e 20 mL/h). Samples of all fermentations were taken at regular intervals and centrifuged. In the supernatant, the concentration of reducing sugars was determined by the DNS method. The pellet was resuspended in distilled water for the quantification of the biomass concentration by spectrophotometry at 600 nm. In the discontinuous process, the biomass production was 7,65 g/L after 24 hours of cultivation. For the fed discontinuous process with the feeding rate of 12,5 a 20 mL/h, the final biomass production was slightly higher than 14 g/L after 40 hours of cultivation. In the experimental design, it was verified that increase in the production of biomass after 40 hours of fermentation to 15.65g / L. It was concluded that all variables at the maximum level with feeding rate at 20 mL / h, aeration of 10 L. ar / min and agitation rate of 200 rpm were the parameters for the production of higher biomass concentration of this *S. cerevisiae* strain.

Keywords: Fermentative processes. Biomass. Factorial planning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do metabolismo da glucose em <i>S. cerevisiae</i> . (1) representa a via aeróbica CTE e (2) representa a via anaeróbica.	16
Figura 2 – Cinética do processo fermentativo descontínuo para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT 170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, taxa de aeração 8 L_{ar}/min e taxa de agitação 150 rpm.	25
Figura 3 – Cinética do processo fermentativo descontínuo alimentado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, vazão de alimentação 12,5 mL/h, taxa de aeração 8 L_{ar}/min e taxa de agitação 150 rpm. ↓: Início da alimentação.	27
Figura 4 – Cinética do processo fermentativo descontínuo alimentado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, vazão de alimentação 15,0 mL/h, taxa de aeração 8 L_{ar}/min e taxa de agitação 150 rpm. ↓: Início da alimentação.	28
Figura 5 – Cinética do processo fermentativo descontínuo alimentado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, vazão de alimentação 20 mL/h, taxa de aeração 8 L_{ar}/min e taxa de agitação 150 rpm. ↓: Início da alimentação.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores das variáveis segundo o delineamento composto central.	22
Tabela 2 – Planejamento experimental para avaliação dos efeitos das vazões de alimentação, taxa aeração e agitação sobre a produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT 170-L7K pelo processo fermentativo descontínuo alimentado.	22
Tabela 3 – Comparação do $Y_{x/s}$ e produtividade entre as vazões de alimentação 12,5; 15,0; 20 mL/h no processo descontínuo alimentado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT 170-L7K com taxa de aeração 8 L/min e taxa agitação 150 rpm.....	29
Tabela 4 – Comparação dos resultados entre processo descontínuo (controle) e processo descontínuo alimentado.....	32
Tabela 5 – Efeito das diferentes vazões de alimentação, aeração, agitação sobre as variáveis dependentes biomassa, açúcar residual, rendimento e produtividade.	34
Tabela 6 – Efeitos estimados das variáveis independentes no planejamento experimental para produção de biomassa.....	35
Tabela 7 – Análise de variância para a produção de biomassa de levedura.	36
Tabela 8 – Efeitos estimados das variáveis independentes no planejamento experimental para o $Y_{x/s}$	36
Tabela 9 – Análise de variância para a resposta $Y_{x/s}$	37
Tabela 10 – Efeitos estimados das variáveis independentes no planejamento experimental para produtividade.	38
Tabela 11 – Análise de variância para produtividade.	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como agente de controle biológico antagônico a fungos fitopatogênicos	12
1.2 Produção de biomassa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1.2.1 Efeito Crabtree	17
1.2.2 Processos fermentativos para produção de biomassa	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Microrganismo	20
3.2 Ativação do microrganismo e preparo do pré-inóculo	20
3.3 Meios de cultura utilizados nos processos fermentativos	20
3.4 Processos fermentativos descontínuo e descontínuo alimentado	21
3.5 Planejamento experimental	21
3.6 Determinação da concentração de biomassa celular	22
3.7 Determinação de açúcares redutores totais (ART)	23
3.8 Análise de pH	23
3.9. Parâmetros cinéticos	23
3.10 Análise estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1 Produção de Biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT 170-L7K por processo descontínuo.	25
4.2 Efeito da vazão de alimentação sobre a produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT 170-L7K por processo descontínuo alimentado.	26
4.3 Planejamento experimental para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT 170-L7K por processo descontínuo alimentado	33
4.4 Análise de efeitos e variância do modelo do planejamento experimental para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> CMIAT 170-L7K por processo descontínuo alimentado.	34
5 CONCLUSÃO	39
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* como agente de controle biológico antagônico a fungos fitopatogênicos

O controle biológico pode ser analisado como um método natural para controle de pragas, a fim de manter um controle populacional no ecossistema (ROSA, 2009).

Muitos microrganismos podem ser utilizados no controle biológico, como fungos miceliais, bactérias e leveduras com atividade antagonista. O uso de leveduras é vantajoso devido a sua atividade antagonista geralmente não produzir esporos alergênicos, micotoxinas ou antibióticos como são produzidos pelos outros microrganismos citados (PARAFATI *et al.*, 2015, ALOUI *et al.*, 2015).

Na literatura algumas pesquisas foram realizadas testando o controle biológico com leveduras em diversos frutos: uva (NALLY *et al.*, 2013), laranja (PLATANIA *et al.*, 2012), maçã (BENCHEQROUN *et al.*, 2017), abacate (CAMPOS - MARTÍNEZ *et al.*, 2016) e entre outros.

Platania *et al.* (2012) estudaram o caráter antagônico de uma suspensão de células com concentração de 10^9 UFC/mL da levedura *S. cerevisiae* em laranjas infectadas com *Penicillium digitatum*. A levedura foi capaz de inibir o crescimento do fungo até três dias de infecção através de um mecanismo de ação associado ao fator “killer” presente nessa cepa.

Essa toxina pode ser uma proteína ou glicoproteína que quando ligada a membrana da célula sensível forma um canal catiônico resistente a várias tensões, aumentando a permeabilidade da membrana para prótons, provocando a morte dessas células por meio da desestabilidade eletroquímica da membrana (OLIVEIRA, 2009; MARTINAC *et al.*, 1990). Mas além desse mecanismo de ação associado ao fator killer, existem outros mecanismos contra fungos fitopatogênicos como: competição de nutrientes e espaço, produção de enzimas hidrolíticas, micoparasitismo e produção de compostos orgânicos voláteis (LIU *et al.*, 2013).

Muitas espécies de leveduras são antagônicas a fungos fitopatogênicos. De acordo com Nally *et al.* (2013), uma suspensão de levedura com concentração de 10^6 UFC/mL no estudo com 234 leveduras, 43 delas (9 *Candida*, 2 *Debaryomyces*, 2 *Dekkera*, 1 *Issatchenkia*, 2 *Kluyveromyces*, 2 *Pichia*, 16

Saccharomyces, 1 *Sporobolomyces* e 8 *Torulaspota*) conseguiram reduzir significativamente 60% o crescimento de, pelo menos, um fungo fitopatogênico isolado de uvas danificadas por podridão.

Existem produtos mundiais sendo comercializados, contudo não existe ainda um produto sendo *S.cerevisiae* como antagonista. Alguns exemplos de produtos são: O Norbac 84-C; Agtrol; Galtrol; Diegal que apresentam ação contra *Agrobacterium tumefaciens* sendo o antagonista *Agrobacterium radiobacter* (MICHEREFF; MARIANO, 1993).

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura classificada no Reino *Fungi*, Domínio *Eukaryota* e Filo *Ascomycota* (DA SILVA, 2009) aeróbica facultativa, que converte carboidratos em biomassa, CO₂ e água na presença de O₂, e em etanol e CO₂ na ausência de oxigênio, processo conhecido como fermentação alcoólica (LIMA ; BASSO; AMORIM, 2001).

É um microrganismo de importância biotecnológica mundial, seja na panificação, na produção de bebidas alcoólicas e etanol combustível (GUIMARÃES, 2005), como fonte de proteína animal e humano (CABALLERO-CÓRDOBA *et al.*, 1997) e no controle biológico (PARAFATI *et al.*, 2015, ALOUI *et al.*, 2015). Devido ao uso seguro com uma vasta aplicação industrial, *S. cerevisiae* é classificada pela *Food and Drug Administration* como um microrganismo **Generally Recognized As Safe** (GRAS) (KURTZMAN, 2011). Em 1996, tornou-se o primeiro eucarioto a ter o genoma completamente sequenciado, resultando em um microrganismo modelo em genética e biologia molecular (ALDHOUS, 2000 *apud* KURTZMAN, 2011).

A linhagem de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K, isolada da microbiota natural de frutos tropicais pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina/PE), possui atividade antagônica contra os fitopatógenos de podridão pós-colheita causada por *Apergillus niger* em uva de mesa. A podridão pós-colheita nos frutos é causada principalmente por fungos devido ao fornecimento de condições nutricionais ótimas para a tal proliferação (COELHO; LEITE; YOKO, 2003). Assim, para reduzir as podridões pós-colheita, o agricultor faz uso de controle químico (fungicidas), controle biológico (antagonistas), controle físico (refrigeração) e indução de resistência (BARKAI-COLAN, 2001).

Apesar do uso de agrotóxicos (controle químico) ser o método mais utilizado, simples e barato para o controle de doenças, o controle biológico tem chamado a atenção de pesquisadores uma vez que a presença de agrotóxicos no

meio ambiente tem causado diversos problemas ambientais e sociais, como contaminação de rios e de solos, intoxicação de trabalhadores rurais e de animais e uma possível resistência de pragas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Assim, a aplicação de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K, desse trabalho, como agente de controle biológico da podridão pós-colheita em uvas, causada por fitopatógenos, apresentou uma inibição do processo de degradação dos frutos superior a 50%, observado no sétimo dia de experimento quando utilizada uma concentração de 10^5 .cels.ml⁻¹. Em seguida, um segundo experimento foi realizado avaliando diferentes concentrações celulares (10^4 a 10^8 céls.ml⁻¹) do agente de controle e foi observada uma incidência inferior a 20 % nas uvas no oitavo dia (PEREIRA *et al.*, 2011). Esse experimento afirma que a levedura *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K tem um carácter antagônico a fungos fitopatogênicos, aumentando o interesse em desenvolver um processo fermentativo para produção de biomassa celular dessa levedura.

1.2 Produção de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*

Apesar de o uso da levedura *S. cerevisiae* ser bastante antigo para diversas aplicações pela humanidade, até hoje é necessário um estudo do seu metabolismo para que os processos fermentativos atinjam seus objetivos de produção (CHOPDA; RATHORE; GOMES, 2015). Pois, devido *S. cerevisiae* exigir condições ótimas para produção de biomassa celular, a sua otimização acaba sendo um problema para uma produção industrial (ATASOY; YUCCER; BERBER, 2013).

A execução do processo fermentativo para a produção de biomassa de *S. cerevisiae* exige o controle de diversos fatores que influenciam os parâmetros cinéticos e a produtividade do processo, como temperatura, pH, concentração de nutrientes, aeração e agitação, (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Com relação à temperatura, de acordo com Torija *et al.* (2003) as cepas de *S. cerevisiae* podem apresentar crescimentos celulares diferentes com a mudança de temperatura, pois nas temperaturas de 25°C e 30°C obteve-se uma população máxima de $1,73 \times 10^8$ e $1,95 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹, respectivamente, superior quando cultivadas nas temperaturas de 15, 20 e 35 °C ($1,18 \times 10^8$, $1,46 \times 10^8$ e $0,97 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹, respectivamente).

O pH é outro fator muito importante para as fermentações devido a sua

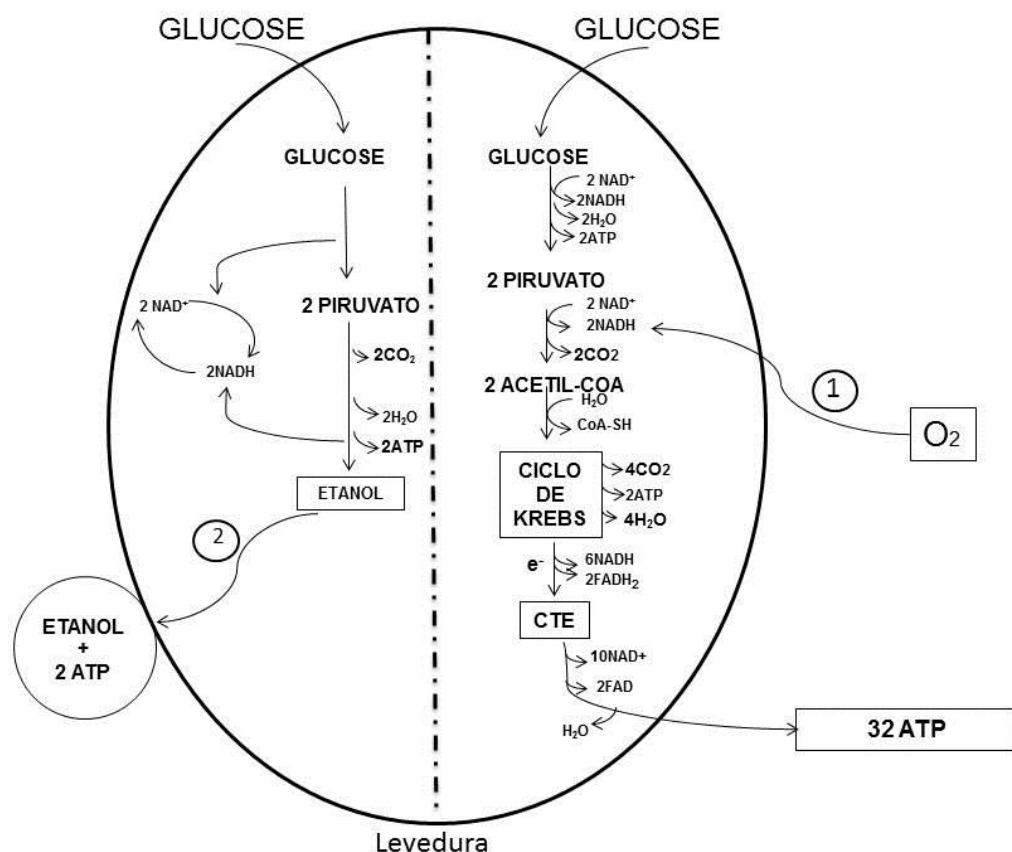
capacidade de controlar a contaminação bacteriana e também de influenciar o crescimento da levedura (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). De acordo com Amaral (2009) para um boa viabilidade celular no processo fermentativo com *S. cerevisiae*, a faixa de pH ideal é entre 3,2 a 4,3.

Além desses fatores, a principal fonte de carbono utilizada pela *S. cerevisiae* e outras leveduras é a glicose (monossacarídeo), devido seu transporte intercelular ser por difusão facilitada, ou seja, sem gasto de energia (MACHADO, 1998). No entanto, quando é utilizado um dissacarídeo, como a sacarose, a membrana celular não permite um livre transporte desse composto dificultando seu consumo (FLORES *et al.*, 2000), assim necessita-se de pré-tratamento que incluem hidrólises química e/ou enzimática, para tornar a glicose disponível ao microrganismo (FLORES *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2000). As desvantagens da hidrólise química é que muitas vezes esse método provoca alterações de cor, formação de subprodutos tóxicos (hidroximetilfurfural) que dependendo da concentração causam inibição na fermentação (WANDERLEY, 2012; TREVELYAN; HARRISON, 1952; DE ÁVILA, 2007).

Diante disso, a via metabólica mais importante envolvida no metabolismo das leveduras é a via glicolítica. Como *S. cerevisiae* é uma levedura aeróbica facultativa, essa via pode ocorrer em condições anaeróbicas e aeróbicas. Na figura 1 está demonstrado o metabolismo da *S. cerevisiae*. Em aerobiose, representada pela via (1), processo que se inicia com a via glicolítica, segue para o ciclo de Krebs e termina na cadeia transportadora de elétrons (CTE). Na via glicolítica, a glicose, gera duas moléculas de piruvato e conserva energia em duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH. Na presença de oxigênio cada piruvato é oxidado perdendo grupo carboxil na forma de CO₂, gerando dois NADH e dois acetil-coenzima A que serão condensados formando o citrato para iniciar o ciclo de Krebs na mitocôndria. Assim, durante o ciclo há um ganho de energia de seis NADH, dois FADH₂ e dois ATP. Na cadeia transportadora de elétrons (CTE), também na mitocôndria, os transportadores de elétrons, total de 10 NADH e 2 FADH₂ irão doar os elétrons, gerando uma diferença de potencial, que serão conduzidos até o oxigênio, formando água e reoxidando o NADH e FADH₂ em NAD⁺ e FAD que serão aceptores de elétrons para um novo ciclo. No final do metabolismo há um balanço energético de 32 moléculas de ATP (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011). Em anaerobiose, representada pela via (2), processo que ocorre apenas a via glicolítica

na ausência de oxigênio. Assim, o NADH gerado na glicólise não é reoxidado pelo oxigênio, esse problema da regeneração do NAD⁺ deixa a célula sem um receptor de elétrons, sendo necessário ser regenerado de outra forma. Então, os microrganismos desenvolveram uma via alternativa que regeneram o NAD⁺ continuamente durante a glicólise pela transferência de elétrons do NADH, mantendo constante as concentrações de NAD⁺ e NADH. Portanto, a glucose é convertida à piruvato, regenerando o NAD⁺ pela transferência de elétrons do NADH em um ciclo, liberando etanol, CO₂ e duas moléculas de ATP (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

Figura 1 – Representação do metabolismo da glucose em *S. cerevisiae*. (1) representa a via aeróbica CTE e (2) representa a via anaeróbica.



Fonte: autoria própria (2017).

Analisando essa questão da ocorrência de duas vias metabólicas, Venturini Filho *et al.* (2014) concluíram que as leveduras *S. cerevisiae* catabolizam o açúcar preferencialmente pelo metabolismo anaeróbico, pois para que ocorra o metabolismo aeróbico é necessário uma eficiente concentração de oxigênio

dissolvido no meio.

Além glucose, as variáveis aeração e agitação são importantes também para uma eficiente produção de biomassa, porque além do oxigênio ser pouco solúvel em meio aquoso exigindo uma agitação do meio (SURESH; SRIVASTAVA; MISHRA, 2009), a aeração é importante, pois o oxigênio na respiração é essencial para drenar os elétrons gerados na glicólise e ciclo de Krebs até a cadeia transportadora de elétrons, gerando 32 moléculas de ATP que serão usadas nas reações enzimáticas para multiplicação de biomassa microbiana (SCHIMIDELL, 2001).

1.2.1 Efeito *Crabtree*

A glucose e o oxigênio são efetores extracelulares que tem atividades regulatórias nas vias metabólicas das leveduras (KÄPPELI; FIECHTER, 1982).

Uma desvantagem do metabolismo da *S. cerevisiae* é que segundo Spiegelman e John *et al.* (1957) as enzimas envolvidas na glicólise, ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons sofrem repressão de síntese pela alta concentração de glucose no meio, mesmo na presença de oxigênio. Essa repressão catabólica é denominada efeito Crabtree, em que a fermentação alcóolica supera a respiração, na presença de oxigênio e em altas concentrações de fonte carbono. Dessa forma a levedura *S. cerevisiae* é uma levedura Crabtree positiva.

O efeito Crabtree pode ser explicado por competição entre a glicólise e a fosforilação oxidativa para o ADP, onde a ocorrência de déficit respiratório se aumenta a disponibilidade em glucose; o aumento da produção de ácido láctico que conseqüente provoca o decréscimo do pH citoplasmático seguido pela inibição dos enzimas oxidativos; a ocorrência de mecanismos que envolvem alterações na razão ATP/ADP na atividade enzimática da glucose 6 –fosfato e no pH citoplasmático, , capazes de regular o referido efeito (PIRES, 2007); fluxo elevado de glucose com o conseqüente aumento na concentração de piruvato e a saturação da piruvato-desidrogenase (FERNANDES, 2008).

1.2.2 Processos fermentativos para produção de biomassa

A fermentação descontínua alimentada, também conhecida como processo por batelada alimentada em processos aerados é o método de condução mais utilizado para obtenção de altas densidades celulares de *S. cerevisiae*, uma vez que controla a adição de nutrientes no biorreator e diminui a possibilidade do efeito Crabtree (ATASOY; YUCCER; BERBER, 2013). Tem por finalidade estender o período de fermentação, mantendo níveis de concentração de substrato no reator adequados para que as células continuem com atividade fermentativa direcionada para a formação do produto desejado (SCHIMIDELL, 2001).

A fermentação descontínua, ao contrário da fermentação descontínua alimentada, no decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos (na forma de ar), a desvantagem é que como substrato é adicionado de uma só vez no início da fermentação, pode ser que, dependendo da concentração, ocorra o efeito *Crabtree* (CRUEGER; CRUEGER, 1984) e como a levedura *S. cerevisiae* não suporta uma concentração de glucose muito superior que 20 g/L no momento que se inicia o processo fermentativo é indicado o processo descontínuo alimentado para repor a fonte de carbono no meio e maximizar a produtividade (VALENTINOTTI *et al.*, 2003).

Chociai *et al.* (2002) estudaram a levedura *Phaffia rhodozyma* que também sofre repressão com concentrações da fonte de carbono superiores a 20 g/L. O processo foi conduzido em batelada alimentada para evitar a inibição pelo substrato (efeito *Crabtree*). O uso do processo descontínuo alimentado duplicou a produção de biomassa final em comparação ao processo descontínuo.

Biener, Steinkämper, e Horn (2015) conseguiram uma produção de 110 g/L de biomassa de *S. cerevisiae* com 32 horas de fermentação, iniciando o processo descontínuo alimentado com 8 horas de fermentação quando a concentração de glucose estava em 3 g/L.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um processo fermentativo para produção de elevada concentração de biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CMIAT 170-L7K.

2.2 Específicos

- a) Analisar a influência dos parâmetros fonte de carbono, aeração e agitação para produção da biomassa no meio definido através de processo fermentativo descontínuo;
- b) Analisar a influência dos parâmetros vazão de alimentação, aeração e agitação para produção da biomassa no meio definido através de processo fermentativo descontínuo alimentado;
- c) Analisar o efeito dos parâmetros escolhidos sobre a concentração de açúcar residual, fator de conversão de substrato em biomassa e produtividade processo fermentativo descontínuo e alimentado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi uma linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* CMIAT 170-L7K pertencente à coleção de culturas da Embrapa, isolada da microbiota natural de frutos tropicais pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina/PE).

3.2 Ativação do microrganismo e preparo do pré-inóculo

A cultura foi ativada em tubos de ensaio rosqueados, contendo 10 mL de meio YM inclinado, constituído de 3,0 g/L de extrato de levedura, 3,0 g/L de extrato de malte, 5,0 g/L de peptona, 10,0 g/L de dextrose e 20,0 g/L de ágar, a 30 °C por 24 horas. Após esse período de crescimento da cultura, foi preparado o pré-inóculo utilizando uma alça estéril sob condições assépticas (câmara de fluxo laminar), transferindo o inóculo para erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio YM líquido, em seguida, foram incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, a 150 rpm, em agitador orbital, por 24 horas.

3.3 Meios de cultura utilizados nos processos fermentativos

O meio de cultura definido, caldo YM2, é uma modificação do meio de cultura YM, sendo composto por 3,0 g/L de extrato de levedura; 3,0 g/L de extrato de malte; 5,0 g/L de peptona, 20,0 g/L de açúcar invertido e 0,3% de antiespumante Sigma (*Antifoam 204, mixture of organic dispersions*). O meio de cultura de alimentação, YM2 concentrado, utilizado na fermentação em batelada alimentada foi composto de 200,0 g/L de açúcar invertido, 12,5 g/L de peptona, 7,5 g/L de extrato de malte, 7,5 g/L de extrato de levedura. O açúcar invertido foi produzido por meio da hidrólise ácida da sacarose dissolvida em um litro de água destilada, reduzindo o pH da solução para 1,5 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 3,0 M seguido de manutenção em banho-maria a 80°C por 40 min. O pH final de ambos meios de cultura já compostos com todos os nutrientes citados anteriormente foi aferido para 4,5 com hidróxido de sódio (NaOH) 50%.

3.4 Processos fermentativos descontínuo e descontínuo alimentado

Para esse estudo foi utilizado um biorreator New Brunswinck Scientific Co., do modelo BioFlo/CelliGen[®] 115, com dorna de 2,0 L de volume útil e dois impelidores do tipo Rushton, constituídos por seis pás.

O meio YM2 foi transferido para a dorna do biorreator de bancada e o meio de cultura YM2 concentrado foi mantido em frascos de vidro. Em seguida, os meios foram autoclavados a 111°C por 30 minutos. Inicialmente foram conduzidas fermentações em batelada simples, como um processo controle, com 1980 mL de meio YM2 e 20 mL do pré-inóculo, agitação de 150 rpm, aeração de 8,0 L_{ar}/min e temperatura de 30 ± 1°C, por um período de 30 h. Alíquotas de 20 mL foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9, 24, 27 e 30 h de processo e foram acondicionadas em em tubos falcon.

O processo em batelada alimentada foi iniciado com 1680 mL de meio YM2 na dorna adicionado de 20 mL do pré-inóculo e vazão de alimentação 12,5, 15, e 20 mL/h de meio de cultura YM2 concentrado, iniciando a alimentação com 16 horas de fermentação. Os parâmetros de agitação e aeração foram de 150 rpm e 8,0 L_{ar}/min, respectivamente e temperatura de 30 ± 1°C, por 40 h. Alíquotas de 20 mL foram retiradas nos tempos 0, 4, 8, 16, 20, 24, 28, 32, e 40 h de processo e acondicionadas em tubos falcon. Todas as fermentações foram realizadas com repetições.

Ao final da fermentação a dorna e todo material utilizado (seringa, pré-inóculo e frascos de alimentação) foram autoclavados a 121°C por 30 minutos e lavados para uso posterior.

3.5 Planejamento experimental

Visando avaliar o efeito dos parâmetros vazão de alimentação, taxa de aeração e de agitação sobre a obtenção de alta densidade de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K por processo fermentativo em batelada alimentada utilizou-se o delineamento experimental fatorial 2³, adicionado de três ensaios no ponto central, resultando em onze ensaios.

As variáveis foram taxa de aeração (8,0, 9,0 e 10,0 L_{ar}/min), taxa de agitação (150, 175 e 200 rpm) e vazão de alimentação (15, 17,5 e 20 mL/h) (Tabela 1 e Tabela 2). Todos os processos foram realizados com repetições.

Tabela 1 – Valores das variáveis segundo o delineamento composto central.

Níveis	-1	0	+1
Variáveis			
Vazão de alimentação (mL/h)	15	17,5	20
Aeração (L_{ar}/min)	8	9	10
Agitação (rpm)	150	175	200

Fonte: dados da pesquisa (2017).

Tabela 2 – Planejamento experimental para avaliação dos efeitos das vazões de alimentação, taxa aeração e agitação sobre a produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K pelo processo fermentativo descontínuo alimentado.

Ensaio	Vazão de alimentação	Taxa de aeração	Taxa de agitação
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Fonte: dados da pesquisa (2017).

3.6 Determinação da concentração de biomassa celular

Os tubos falcon contendo as alíquotas, foram centrifugados a 3500 rpm, a 30°C por 15 min. e em seguida o sobrenadante foi separado da massa celular. Foram adicionados 10 mL de água de osmose nos tubos, em seguida, agitados no vórtex e depois centrifugados novamente nas mesmas condições já descritas. A massa celular foi então diluída novamente com água destilada e 1,0 mL de cada foi transferida para balões volumétricos de 5 mL, 10 mL e 100 mL. A densidade ótica foi

medida a 600 nm em espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50 Conc) e com o auxílio de uma curva-padrão de peso seco já estabelecida as concentrações de biomassa em g/L foram determinadas.

3.7 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

As análises para a determinação do teor de açúcares redutores totais foram realizadas pelo método 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), descrito segundo (Miller, 1959). Então, 1,0 mL do sobrenadante, foi diluído em balões volumétricos de 10 mL e 25 mL, sendo transferidos 0,5 mL da diluição para tubos de ensaios e adicionado 0,5 mL do reagente (DNS). Os tubos foram agitados no vórtex e colocados em água fervente por 15 minutos. Decorrido esse tempo, foi realizado o choque térmico até a temperatura ambiente, depois foi adicionado 4,0 mL de água destilada em cada tubo, seguida de agitação no vórtex. A absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50 Conc).

3.8 Análise de pH

Os sobrenadantes das alíquotas foram submetidos à análise de pH no pHmetro de bancada (Hanna Instruments, modelo HI 2221).

3.9. Parâmetros cinéticos

O fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foi calculado segundo a Equação 1 para o processo descontínuo:

$$Y_{x/s} = \frac{-(X_0 - X_f)}{(S_0 - S_f)} \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que: X_0 e X_f representam concentração celular (g/L) no início e no final do processo e S_0 e S_f representam concentração de substrato (g/L), respectivamente.

O fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) foi calculado segundo a Equação 2 para o processo descontínuo alimentado:

$$Y_{X/S} = \frac{-(X_0 - X_f) \times V_u}{(S_0 \times V_0 + S_{AD} \times V_{AD}) - S_f} \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que: X_0 e X_f representam concentração celular (g/L) no início e no final do processo, respectivamente. S_0 concentração de substrato inicial (g/L), S_f concentração de substrato final, V_0 é o volume de meio (L) adicionado no biorreator, S_{AD} é a concentração do meio de alimentação, V_{AD} é o volume de meio (L) adicionado no biorreator (vazão x tempo de alimentação) e V_u é o volume útil do biorreator (L).

A produtividade em biomassa foi calculada segundo a Equação 3 em todos os processos fermentativos:

$$P = \frac{(X_f - X_0)}{t_f} \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que: X_0 e X_f representam a concentração celular (g/L) no início e no final do processo, respectivamente; t_f representa o tempo de fermentação (h).

3.10 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de efeitos e de variância (ANOVA) com as médias dos tratamentos comparados ao nível de 90% de probabilidade, utilizando o programa Statistica, versão 10.

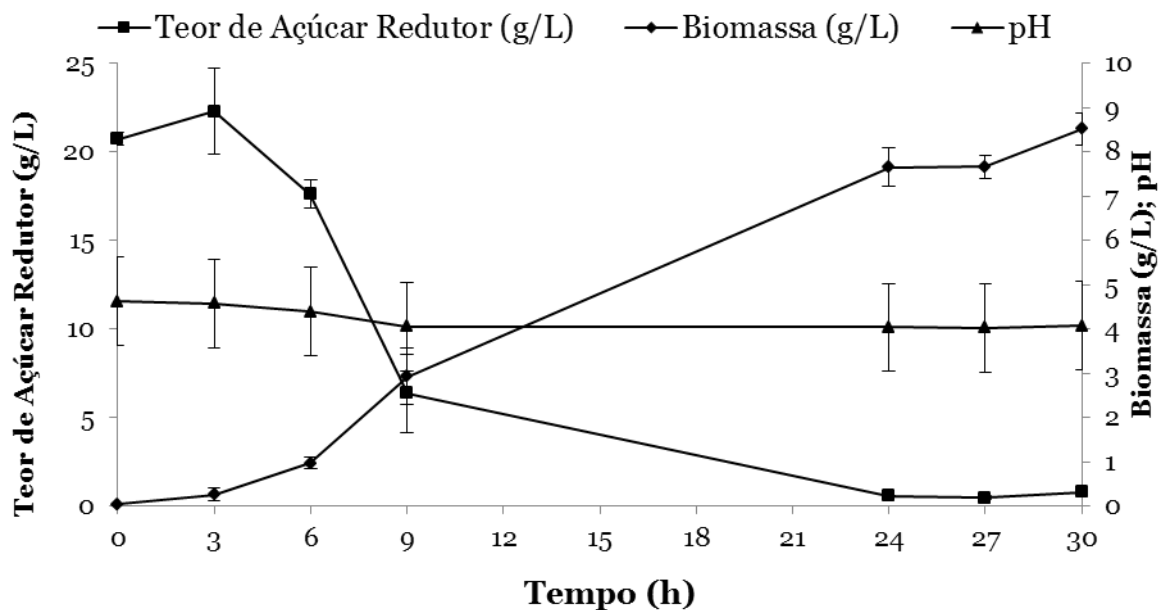
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Produção de Biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K por processo descontínuo.

O processo descontínuo foi realizado como controle. Durante 9 horas até 24 horas, houve um aumento de produção de biomassa de 2,92 g/L para 7,65 g/L e um consumo de 97,3% de açúcares. Entre 24 horas e 27 horas observa-se a que não houve produção de biomassa, no entanto com 30 horas houve um pequeno aumento de produção de biomassa, mas isso pode ter sido devido a algum erro de processo ou a levedura consumiu outros metabólitos, já que o açúcar redutor estava em baixa concentração no meio. Portanto, considerando o momento de pico do crescimento com 24 horas, as condições de fermentação estabelecidas apresentou um $Y_{x/s}$ de 0,42 g/g e P_x de 0,328 (g/L. h⁻¹) (Figura 2).

Os resultados indicaram que houve uma pequena diminuição do pH de 4,62 para 4,39 com 9 horas de processo, mantendo-se constante até o final do processo fermentativo.

Figura 2 – Cinética do processo fermentativo descontínuo para produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, taxa de aeração 8 Lar/min e taxa de agitação 150 rpm.



Fonte: dados da pesquisa (2017).

A fonte de carbono, sacarose hidrolisada, foi quase totalmente consumida pelo microrganismo e à medida que houve crescimento microbiano, reduziu-se a concentração de açúcares redutores no meio.

Um trabalho realizado por Mendes *et al.* (2013) para produção de biomassa de levedura de *S. cerevisiae* em um propagador aerado obteve um $Y_{x/s}$ de 0,41 g/g de biomassa de levedura de *S. cerevisiae* em um processo descontínuo, suplementado com 30 g/L de glucose com 24 horas de fermentação e taxa de aeração 10L/min, sem agitação. Assim, comparando o $Y_{x/s}$ desse trabalho com a com a *S. cerevisiae* CMIAT L7K/170, Mendes *et al.* (2007) obteve um $Y_{x/s}$ próximo.

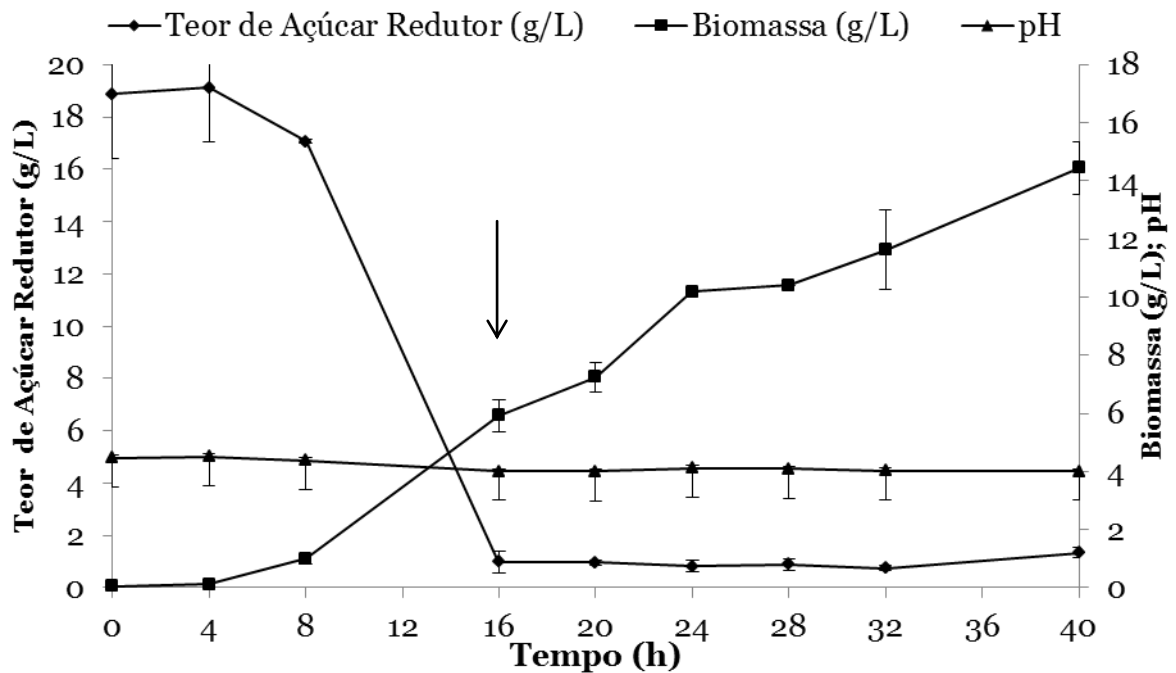
O $Y_{x/s}$ no processo descontínuo apresentou um valor próximo proposto por Reed e Nagodawithana (1991 *apud* MENDES *et al.*, 2013) que em condições estritamente aeróbicas e com todos os parâmetros controlados (com temperatura, oxigênio dissolvido, formação de etanol e consumo de açúcar), o melhor fator de conversão ($Y_{x/s}$) é 0,54 g/g.

4.2 Efeito da vazão de alimentação sobre a produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K por processo descontínuo alimentado.

Inicialmente, foram avaliados os efeitos das diferentes vazões de alimentação (12,5; 15; 20 mL/h) sobre a produção de biomassa e foram obtidas as concentrações de 14,44 g/L, 14,0 g/L e 14,23 g/L, respectivamente, com 40 horas de fermentação.

O processo descontínuo permaneceu até às 16 horas com uma concentração de biomassa de 5,9 g/L . A partir desse tempo iniciou-se o processo descontínuo alimentado com vazão de alimentação 12,5 mL/h. A concentração de biomassa foi de 14,44 g/L com 40 horas de processo, triplicando a concentração de biomassa final e duas vezes maior que o processo descontínuo anteriormente citado (controle) na figura 2. A concentração final de açúcares redutores totais foi de 1,33 g/L, superior ao controle. Os resultados indicaram que houve uma diminuição do pH de 4,4 para 4,0 com o consumo de açúcares até as 16 horas, mantendo-se constante nessa faixa até o final do processo fermentativo. As condições de fermentação estabelecidas apresentou um $Y_{x/s}$ de 0,316 g/g e P_x de 0,355 (g/L. h⁻¹) (Figura 3).

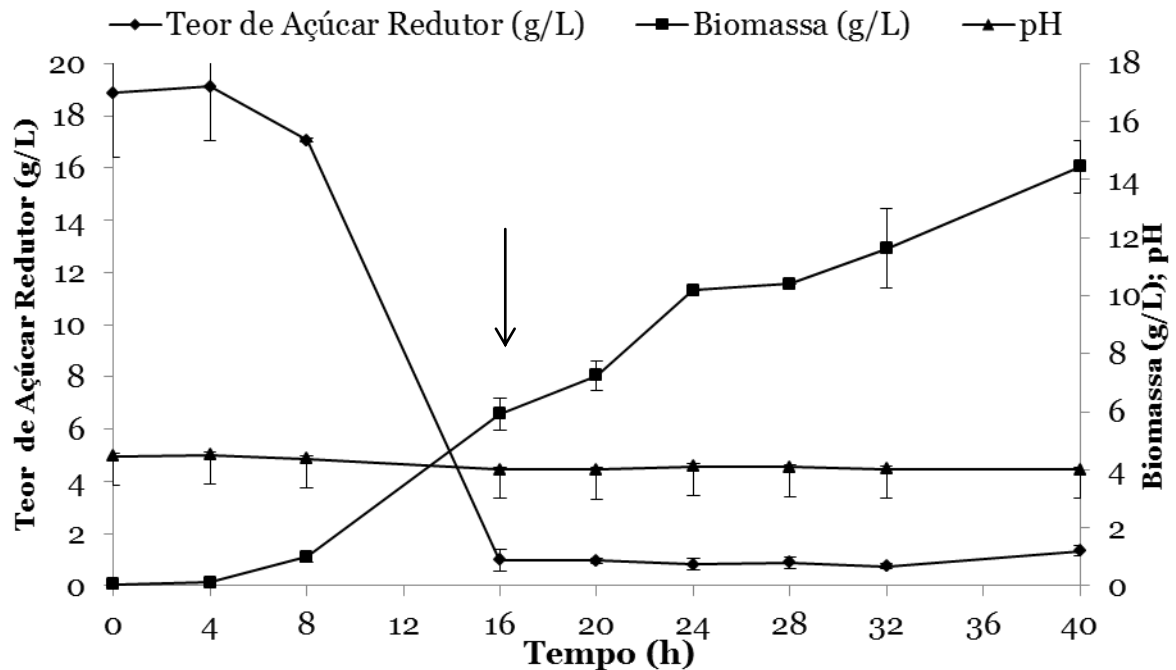
Figura 3 – Cinética do processo fermentativo descontínuo alimentado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, vazão de alimentação 12,5 mL/h, taxa de aeração 8 L_{at}/min e taxa de agitação 150 rpm. ↓: Início da alimentação.



Fonte: dados da pesquisa.

Em seguida foi avaliada uma vazão de alimentação 15mL/h. O processo descontínuo permaneceu até às 16 horas com uma concentração de biomassa de 5,8 g/L . A partir desse tempo iniciou-se o processo descontínuo alimentado com vazão de alimentação 15,0 mL/h. A concentração de biomassa foi de 14,0 g/L com 40 horas de processo, aumentando quase três vezes a concentração de biomassa final e duas vezes maior que o processo descontínuo anteriormente citado (controle) na figura 2. A concentração final de açúcares redutores totais foi de 1,19 g/L, superior ao controle e menor que processo descontínuo alimentado com vazão 12,5 mL/h. Os resultados indicaram que houve uma diminuição do pH de 4,4 para 3,7 com o consumo de açúcares até as 16 horas, mantendo-se constante nessa faixa até o final do processo fermentativo. As condições de fermentação estabelecidas apresentou um $Y_{x/s}$ de 0,278 g/g e P_x de 0, 0,348 (g/L. h⁻¹) (Figura 4).

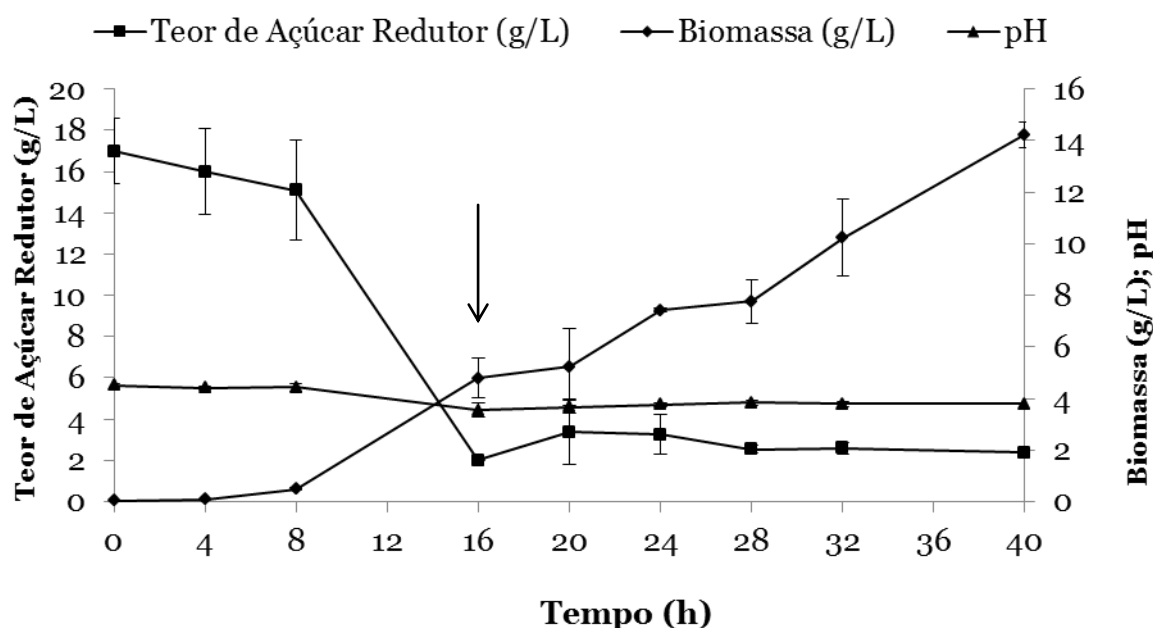
Figura 4 – Cinética do processo fermentativo descontínuo alimentado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, vazão de alimentação 15,0 mL/h, taxa de aeração 8 L_{ar}/min e taxa de agitação 150 rpm. ↓: Início da alimentação.



Fonte: dados da pesquisa.

Em seguida fora avaliada uma vazão de alimentação 20mL/h. O processo descontínuo permaneceu até às 16 horas com uma concentração de biomassa de 4,79 g/L . A partir desse tempo iniciou-se o processo descontínuo alimentado com vazão de alimentação 20,0 mL/h. A concentração de biomassa foi de 14,23 g/L com 40 horas de processo, triplicando a concentração de biomassa final e duas vezes maior que o processo descontínuo anteriormente citado (controle), sendo menor que processo descontínuo alimentado com vazão 12,5 mL/h e maior que a vazão de 15 mL/h. A concentração final de açúcares redutores totais foi de 2,36 g/L, a qual foi superior a vazão de alimentação 12,5 mL/h, 15 mL/h e do controle. Os resultados indicaram que houve uma diminuição do pH de 4,4 para 3,5 com o consumo de açúcares até as 16 horas, mantendo-se constante nessa faixa até o final do processo fermentativo. As condições de fermentação estabelecidas apresentou um $Y_{x/s}$ de 0,232 g/g e P_x de 0, 0,353 (g/L. h⁻¹) (Figura 5).

Figura 5 – Cinética do processo fermentativo descontínuo alimentado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT170-L7K com 20g/L de açúcar hidrolisado, vazão de alimentação 20 mL/h, taxa de aeração 8 L_{ar}/min e taxa de agitação 150 rpm. ↓: Início da alimentação.



Fonte: dados da pesquisa.

Todas as vazões de alimentação se mostraram favoráveis por ter aumentado a concentração de biomassa final, mesmo com a um concentração de açúcares redutores menor que 3 g/L. Além disso, constata-se que quanto maior a vazão de alimentação, menor foi o $Y_{x/s}$, pois aumentou o fator de diluição, mas não houve um aumento significativo de biomassa de levedura entre as vazões de alimentação (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação do $Y_{x/s}$ e produtividade entre as vazões de alimentação 12,5; 15,0; 20 mL/h no processo descontínuo alimentado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K com taxa de aeração 8 L/min e taxa agitação 150 rpm.

Vazão de alimentação (mL/h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Produtividade (g/L. h-1)
12,5	0,316	0,355
15	0,278	0,348
20	0,232	0,353

Fonte: dados da pesquisa.

Na literatura outros trabalhos que seguiram o processo descontínuo alimentado para aumentar a produção de biomassa obteram resultados semelhantes. CHOCIAI *et al* (2002) estudaram a levedura *Phaffia rhodozyma*,

produtora de astaxantina. O processo foi conduzido em batelada alimentada adicionando um meio de cultura concentrado com 100 g/L, assim, conseguiu duplicar a produção de biomassa final e a produtividade em comparação ao processo descontínuo.

CHANG *et al* (2013) avaliaram a influencia do processo descontínuo e do processo descontínuo alimentado em leveduras *Cryptococcus* sp, em meio de cultura suplementado com hidrolisado de sementes de milho. O processo descontínuo com 20 g/L de glucose atingiu uma concentração de biomassa de 4,0 g/L até 24 horas de fermentação. Em seguida, processo descontínuo alimentado, iniciando a alimentação quando a concentração de açúcares redutores estava com 5 g/L, com uma adição de 20 g/L glucose, resultou em uma concentração de biomassa de 8,3 g /L .

Mesmo se tratando de leveduras de outro gênero, é visto que o processo descontínuo alimentado tem realmente a capacidade de aumentar a produtividade do processo.

Todos os processos descontínuos alimentados começaram acima da concentração crítica de glucose e segundo Chopda, Rathore e Gomes (2015) para poder atingir altas densidades celulares, deve-se manter a concentração de açúcar no valor crítico durante o processo alimentado para prevenir a formação de subprodutos inibitórios do crescimento, sendo a concentração crítica de glucose entre 0,04 até 1g/L.

Biener, Steinkämper, e Horn (2015) testaram a influência da concentração crítica de glucose nos processos fermentativos. Em um biorreator de 20 litros, começaram um processo descontínuo com 24 g/L de glucose, com taxa de agitação em 1450 rpm e taxa de aeração mantendo 25% de oxigênio saturado. Em um primeiro experimento, o processo descontínuo ficou até 10 horas de fermentação, pois a concentração de glucose já estava bem crítica (0,1 g /L), obtendo uma concentração de biomassa de 5 g/L. Após 10 horas, o processo descontínuo alimentado com meio de alimentação concentrado com 500 g/L glucose e alterações de vazões de alimentação até 3L/h para manter a concentração de glucose no meio em 0,5 g/L até o final da fermentação. Em um segundo experimento, o processo descontínuo ficou até 8 horas de fermentação antes que houvesse uma concentração crítica de glucose e estava com concentração de glucose residual entre 1 e 3 g/L as 8 horas de fermentação. Assim, com a mudança do início da

alimentação, obteve-se um $Y_{x/s}$ três vezes maior que o primeiro experimento descontinuo alimentado a partir das 10 horas.

Nesse trabalho não seria vantajoso começar o processo descontinuo alimentado entre quatro e oito, pois ocorreria um risco de diminuir a faixa de segurança da concentração máxima de glucose que a levedura suporta (20 g/L), devido a nesses tempos as concentrações de celulares serem baixas, 0,106 g/L e 0,682 g/L, respectivamente, não sendo viável fornecer glucose se ainda há uma concentração suficiente para crescimento celular. Então com o objetivo de reduzir custos e manter a segurança, esperou-se uma condição mais baixa de açúcar para começar a alimentação com maior concentração de células. Por isso começou-se o processo descontinuo alimentado com 16 horas. Mas, poderia-se fazer um teste no processo alimentado desse trabalho, começando a alimentação entre 8 e 16 horas de fermentação, em um tempo com uma concentração de açúcar redutor maior, mas o horário para tal início seria complicado por ser na madrugada.

Além disso, teoricamente o ideal seria manter a concentração de açúcar redutor em 20 g/L, mas nesse trabalho durante os processos descontínuos alimentados o teor de açúcares redutores ficaram até 2 g/L. Isso é devido o biorreator utilizado nesse trabalho não ter essa capacidade de manter em 20 g/L, pois seria necessário um sensor on-line de glucose e de um sistema operando em resposta contínua, por exemplo, a medida que a concentração de glucose fosse maior que 20 g/L o sistema não adicionaria glucose, mas poderia alterar aeração e agitação e quando a concentração de glucose fosse menor que 20 g/L o sistema adicionaria glucose e poderia alterar aeração e agitação.

Chopda, Rathore e Gomes (2015) levaram em consideração essa questão da dinâmica da concentração de glicose e de oxigênio dissolvido para aumentar a produção de biomassa. Desenvolveram um estudo utilizando um sistema de controles no biorreator de 5 litros, iniciando o processo descontínuo com 3 g/L de glucose e quando atingia-se um valor crítico de glucose (0,5 g/L) com 4 horas de fermentação e concentração de biomassa em 7 g/L, iniciou-se o processo descontínuo alimentado com um meio de 150 g/L, alterando a vazão para manter a concentração de glucose em 0,5 g/L, ao mesmo tempo alterava-se a taxa de aeração para manter a concentração de oxigênio dissolvido em 60%, dessa forma a produção de biomassa final foi 14 g/L com oito horas de fermentação.

Então, devido ao processo descontínuo alimentado desse trabalho ter

sido realizado por uma metodologia fixa total, não alterando vazão de alimentação de alimentação, agitação e aeração durante o processo, isso causou uma perda de eficiência do processo devido uma falta de controle em tempo real.

Comparando os resultados do controle e processo descontínuo alimentado desse trabalho, foi possível aumentar a produtividade, mas apresentou um menor $Y_{x/s}$ devido o meio de alimentação ser bastante concentrado, sendo necessária uma grande produção de biomassa para ter um valor maior (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação dos resultados entre processo descontínuo (controle) e processo descontínuo alimentado.

Variável	Processo descontínuo (controle)	Processo descontínuo alimentado
Biomassa (g/L)	7,65	14,22
Tempo (h)	24	40
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,42	0,274
Produtividade- P_x (g/L. h ⁻¹)	0,282	0,352

Fonte: dados da pesquisa.

Segundo Venturini Filho *et al*, 2014 concluíram que *S. cerevisiae* é capaz de catabolizar o açúcar presente no meio por um metabolismo aeróbio e, preferencialmente, pelo metabolismo anaeróbio e em processos com deficiência na aeração a levedura pode alterar sua rota metabólica para produzir etanol, reduzindo o $Y_{x/s}$ do processo.

Como no trabalho não foi feita a análise de etanol não é possível afirmar a quantidade de açúcar redutor consumido pela levedura pra a produção de etanol em vez de biomassa e justificar $Y_{x/s}$ baixo no processo descontínuo alimentado.

No entanto, alguns trabalhos na literatura quantificaram e fora encontrado $Y_{x/s}$ com valores aproximados. Anane, Rensburg e Görgens (2013) estudaram a influência da taxa de crescimento *Saccharomyces cerevisiae* recombinante MH1000pbk10D-glu no processo descontínuo alimentado, dando inicio a alimetação quanto a concentraçãode açúcar redutor estava esgotado e mantendo na faixa crítica de glucose. O $Y_{x/s}$ manteve-se constante em 0,4 g/g, sem produção de etanol, mas quando o rendimento de etanol em relação à substrato ($Y_{P/S}$) foi 0,08 g/g, houve uma diminuição de $Y_{x/s}$ para 0,24 g/g e produção de biomassa em 19,48 g/L.

Então, é muito importante analisar a influências das outras variáveis

envolvidas no processo como agitação, aeração, concentração de etanol, concentração crítica de glucose e etc. Assim, o planejamento experimental foi realizado para avaliar a influencia das vazões de alimentação, alterando-se também a aeração e agitação no processo.

4.3 Planejamento experimental para produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K por processo descontínuo alimentado.

Para o planejamento experimental foi escolhida as vazões de alimentação com maior fator de diluição, 15 mL/h e 20 mL/h com um ponto central de 17,5 mL/h. Os níveis para as variáveis independentes e as respostas para a produção de biomassa, açúcar redutor, $Y_{x/s}$ e produtividade são apresentados na tabela 5.

Observando a tabela 5, o ensaio oito obteve uma maior produção de biomassa (15,61 g/L), onde todas as variáveis estão no nível máximo (20 mL/h, 10 $L_{ar/min}$ e 200 rpm), porém a concentração de açúcar redutor foi a mais alta (4,35 g/L), com um $Y_{x/s}$ de 0,244 g/g e P_x de 0,390 g/L.h⁻¹.

O ensaio três obteve uma menor produção de biomassa (11,83 g/L), onde a vazão de alimentação no nível mínimo (15 mL/h), aeração no nível máximo (10 $L_{ar/min}$) e agitação no nível mínimo (150 rpm). A concentração de açúcar redutor foi 3,34 g/L, com um $Y_{x/s}$ de 0,229 g/g e P_x de 0,295 g/L.h⁻¹ (Tabela 5).

Analisando os ensaios três e quatro uma maior aeração e menor agitação houve uma redução na produção de biomassa, 11,83 g/L e 13,34 g/L, respectivamente. Mas nos ensaios cinco e seis quando diminuiu a aeração e aumentou a agitação aumentou a produção de biomassa, 12,08 g/L e 14, 14 g/L (Tabela 5). Assim, nos ensaios três e quatro pode ser que tenha ocorrido o efeito da película da bolha, segundo Teixeira e Fonseca, (2007) afirmam que o aumento da velocidade de agitação reduz a espessura do filme de líquido estagnado, assim como o tamanho das bolhas, causando um aumento na transferência de oxigênio.

Dessa forma, um processo fermentativo com agitação e aeração eficientes permite uma maior produção de biomassa em processos aeróbicos, pois segundo Doran *et al.* (1995) a agitação no meio pelo impelidor contribui para uma maior dispersão das bolhas, que conseqüentemente aumenta a concentração de oxigênio no meio, o qual é necessário para processos fermentativos aeróbicos. Porque na mitocôndria, o oxigênio será receptor final dos elétrons gerados na

glicólise e ciclo de Krebs que produzirá energia na forma de ATP, cujas reações para multiplicação de biomassa microbiana dependem dessa molécula (SCHIMIDELL, 2001).

Tabela 5 – Efeito das diferentes vazões de alimentação, aeração, agitação sobre as variáveis dependentes biomassa, açúcar residual, rendimento e produtividade.

Ensaio	Vazão de alimentação (mL/h)	Aeração (L _{ar} /min)	Agitação (rpm)	Biomassa (g/L)	Açúcar residual (g/L)	Y _{x/s} (g/g)	P _x (g/L.h)
1	-1	-1	-1	13,99 ± 1,2	1,19 ± 0,1	0,280	0,349
2	+1	-1	-1	14,23 ± 0,6	2,36 ± 0,2	0,232	0,353
3	-1	+1	-1	11,83 ± 1,2	3,34 ± 1,0	0,229	0,295
4	+1	+1	-1	13,34 ± 0,7	2,45 ± 0,3	0,208	0,333
5	-1	-1	+1	12,08 ± 2,2	1,55 ± 0,7	0,232	0,302
6	+1	-1	+1	14,14 ± 2,0	2,06 ± 1,9	0,230	0,353
7	-1	+1	+1	12,84 ± 0,4	2,32 ± 1,6	0,236	0,321
8	+1	+1	+1	15,61 ± 1,2	4,35 ± 1,9	0,244	0,390
9	0	0	0	12,67 ± 0,9	2,71 ± 0,2	0,224	0,316
10	0	0	0	13,15 ± 0,7	2,46 ± 0,8	0,234	0,328
11	0	0	0	13,23 ± 0,5	3,49 ± 0,2	0,230	0,330

Fonte: dados da pesquisa.

4.4 Análise de efeitos e variância do modelo do planejamento experimental para produção de biomassa de *S. cerevisiae* CMIAT 170-L7K por processo descontínuo alimentado.

Utilizando o “Software Statistica 10.0” foi feita a análise de efeitos e análise de variância do modelo de cada variável independente, com valores codificados, em relação à produção de biomassa de levedura, rendimento e produtividade.

Os efeitos, erro padrão, valores de t e p-valor de cada variável independente para a produção de biomassa de levedura encontram-se na tabela 9.

Nesse planejamento, as variáveis aeração e agitação mostraram um efeito não significativo ao nível de confiança de 90% para produção de biomassa, mas a vazão de alimentação, vazão de alimentação x agitação e aeração x agitação foram significativas, interferindo positivamente na produção de biomassa, pois

tiveram um p-valor $\leq 0,10$ (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeitos estimados das variáveis independentes no planejamento experimental para produção de biomassa.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(2)	P
Média	13,01667	0,174865	74,43836	0,000180
Vazão de alimentação (L)	1,62000	0,214165	7,56426	0,017032
Vazão de alimentação (Q)	0,95667	0,41009	2,3327	0,14486
Aeração	-0,18000	0,214165	-0,84047	0,489109
Agitação	0,34500	0,214165	1,61091	0,248504
Vazão de alimentação x Aeração	0,52000	0,214165	2,42803	0,135890
Vazão de alimentação x Agitação	0,79500	0,214165	3,71209	0,065519
Aeração x Agitação	1,29500	0,214165	6,04674	0,026277

Nível de confiança = 90%; p-valor $\leq 0,10$; $R^2 = 0,97922$

Fonte: dados da pesquisa.

Observou-se que o coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,97$) foi altamente significativo, mostrando que o uso de uma maior vazão de alimentação no processo descontínuo alimentado permitiu uma melhor resposta na produção de biomassa. E a variável vazão de alimentação teve um efeito mais significativo que a interação vazão de alimentação x agitação e aeração x agitação na resposta de produção de biomassa.

A interação entre vazão de alimentação x agitação demonstrou que para aumentar a produção de biomassa de levedura, fazendo uso de alta vazão de alimentação, é necessária a aplicação de altas taxas de agitação. E o efeito positivo da interação aeração x agitação evidenciou que o uso de altas taxas dessas variáveis promove um aumento da transferência de oxigênio, pois isso favorece a produção de biomassa aumentando a concentração de oxigênio dissolvido no meio, visto que obteve um efeito mais significativo que a interação vazão de alimentação x agitação.

A análise de variância na tabela 7 mostrou que o $F_{\text{calculado}} = 138,69$ para a regressão foi altamente significativo, sendo maior, aproximadamente, 27 vezes que o valor de $F_{\text{tabelado}} = 5,26$, com um $R^2 = 0,9792$, mostrando que 97,9 % dos resultados podem ser explicados pelo modelo. Além disso, o modelo pode ser considerado

preditivo, pois o $F_{\text{calculado}} = 0,59$ da falta de ajuste foi inferior ao $F_{\text{tabelado}} = 8,52$.

Tabela 7 – Análise de variância para a produção de biomassa de levedura.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	11,20976	7	11	138,69	5,2661
Resíduos	0,23792	3	0,07931		
Falta de ajuste	0,05445	1	0,054450	0,5935	8,5263
Erro puro	0,18347	2	0,091733		
Total	11,44767	10			

$R^2 = 0,97922$

Fonte: dados da pesquisa.

Assim, o modelo seguido foi proposto por Box e Wetz (1973) que para uma regressão ser significativa estatisticamente e para fins preditivos, o valor do $F_{\text{calculado}}$ para a regressão deve ser no mínimo quatro vezes maior que o F_{tabelado} e para a falta de ajuste em relação ao erro puro deve apresentar o menor valor possível, porque um $F_{\text{calculado}}$ muito grande indica falta de ajuste dos dados ao modelo obtido.

Os efeitos estimados, erro padrão, valores de t e p-valor para $Y_{x/s}$ encontram-se na tabela 8.

Nesse planejamento, a variável vazão de alimentação, aeração, interação vazão de alimentação x agitação e aeração x agitação obtiveram um p-valor $\leq 0,10$, mostrando um efeito significativo ao nível de confiança de 90% para o $Y_{x/s}$, sendo que a vazão de alimentação e aeração interferiram negativamente.

Tabela 8 – Efeitos estimados das variáveis independentes no planejamento experimental para o $Y_{x/s}$.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(2)	p
Média	0,229333	0,002906	78,91901	0,000161
Vazão de alimentação (L)	-0,015750	0,003559	-4,42537	0,047457
Vazão de alimentação (Q)	0,014083	0,006815	2,06652	0,174745
Aeração	-0,014250	0,003559	-4,00390	0,057089
Agitação	-0,001750	0,003559	-0,49171	0,671594
Vazão de alimentação x Aeração	0,009250	0,003559	2,59903	0,121617
Vazão de alimentação x Agitação	0,018750	0,003559	5,26830	0,034192
Aeração x Agitação	0,023250	0,003559	6,53269	0,022640

Nível de confiança = 90%; p-valor $\leq 0,10$; $R^2 = 0,971$

Fonte: dados da pesquisa.

Observou-se que o coeficiente de correlação obtido ($R^2 = 0,97$) foi altamente significativo, mostrando que o uso de uma menor vazão de alimentação e aeração no processo descontínuo alimentado permite uma melhor resposta para $Y_{x/s}$. A variável vazão de alimentação teve um efeito maior que a aeração e menor que a interação vazão de alimentação x agitação e aeração x agitação na resposta produção de biomassa.

A interação entre vazão de alimentação x agitação demonstra que para aumentar a produção de biomassa de levedura fazendo uso de baixa vazão de alimentação e baixa taxa de agitação permitiu um efeito positivo para $Y_{x/s}$. A interação aeração x agitação com valores negativos foi favorável quando se usou uma menor vazão de alimentação, resultando um efeito significativo positivo para $Y_{x/s}$.

Como já foi discutido anteriormente, quanto maior a vazão de alimentação, menor o $Y_{x/s}$, pois aumentou o fator de diluição, mas não houve um aumento significativo de biomassa de levedura entre as vazões de alimentação.

A análise de variância na tabela 9 mostrou que o $F_{\text{calculado}} = 75,0$ para a regressão foi altamente significativo, sendo maior que o valor de $F_{\text{tabelado}} = 5,26$, aproximadamente 15 vezes, com $R^2 = 0,97$, mostrando que 97,% dos resultados podem ser explicados pelo modelo. Além disso, o modelo pode ser considerado preditivo, pois o $F_{\text{calculado}} = 1,44$ da falta de ajuste foi inferior ao $F_{\text{tabelado}} = 8,52$. Seguindo também o que foi proposto por Box e Wetz (1973).

Tabela 9 – Análise de variância para a resposta $Y_{x/s}$.

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
Regressão	0,002972	7	0,002972	102	5,2661
Resíduos	0,000087	3	0,000029		
Falta de ajuste	0,000036	1	0,000036	1,44	8,52632
Erro puro	0,000051	2	0,000025		
Total	0,003059	10			

$R^2 = 0,971$

Fonte: dados da pesquisa.

Os efeitos estimados, erro padrão, valores de t e p-valor para produtividade encontram-se na tabela 10. Como era esperado a produtividade se

comportou como as análises para produção de biomassa.

Tabela 10 – Efeitos estimados das variáveis independentes no planejamento experimental para produtividade.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t(2)	p
Média	0,324667	0,004372	74,26680	0,000181
Vazão de alimentação (L)	0,040500	0,005354	7,56426	0,017032
Vazão de alimentação (Q)	0,024667	0,010252	2,40595	0,137901
Aeração	-0,004500	0,005354	-0,84047	0,489109
Agitação	0,009000	0,005354	1,68095	0,234793
Vazão de alimentação x Aeração	0,013000	0,005354	2,42803	0,135890
Vazão de alimentação x Agitação	0,019500	0,005354	3,64205	0,067810
Aeração x Agitação	0,032500	0,005354	6,07008	0,026083

Nível de confiança = 90%; p-valor ≤ 0,10; R² = R²= 0,979

Fonte: dados da pesquisa.

A análise de variância na tabela 11 mostrou que o $F_{\text{calculado}} = 143$ para a regressão foi altamente significativo, sendo maior, aproximadamente, 27 vezes que o valor de $F_{\text{tabelado}} = 5,26$, com um $R^2=0,979$, mostrando que 97,9 % dos resultados podem ser explicados pelo modelo. Seguindo também o que foi proposto por Box e Wetz (1973).

Tabela 11 – Análise de variância para produtividade.

Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Regressão	0,007026	7	0,007026	143	5,2661
Resíduos	0,000147	3	0,000049		
Falta de ajuste	0,000032	1	0,000032	0,5614	8,526
Erro puro	0,000115	2	0,000057		
Total	0,007319	10			

Nível de confiança = 90%; p-valor ≤ 0,10; R² = R²= 0,979

Fonte: dados da pesquisa.

5 CONCLUSÃO

O processo descontínuo alimentado é o regime mais adequado para produção de maiores concentrações de biomassa desta linhagem *Saccharomyces cerevisiae*, sendo os parâmetros que alcançaram uma maior produção de biomassa (15,61 g/L) foram: vazão de alimentação de 20 mL/h, taxa de aeração de 10 L_{ar}/min e taxa de agitação de 200 rpm.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Seria interessante avaliar o crescimento da levedura um processo descontínuo alimentado com uma alimentação um pouco antes das 16 horas, quantificar a produção de etanol nos processos fermentativos, utilizar baixas vazões de alimentação, mas tentando controlar quando possível a concentração de oxigênio dissolvido durante o processo fermentativo com auxílio de um sensor de DO e realizar experimentos com suspensões células viáveis da levedura em frutos pós-colheita para impedir o crescimento dos fitopatógenos.

REFERÊNCIAS

- ALLOUI, H. *et al.* Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. **Food Microbiol.**, v. 20, p. 22–30, maio, 2015
- AMARAL, F. S. **Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias), Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
- ANANE, E.; RENSBURG, E. V.; GÖRGENS, J. F. Optimisation and scale-up of glucuronidase production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic fed-batch culture with constant growth rate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 1–7, maio, 2013.
- ATASOY, I.; YUCCER, M.; BERBER, R. Optimisation of operating conditions in fed-batch baker's yeast fermentation. **Chemical and Process Engineering**, v. 34, n.1, p. 175-186, mar, 2013
- BARKAI-GOLAN, R. **Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control**. Amsterdam: Elsevier, 2001, p.108
- BENCHEQROUN, S. K. *et al.* In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. **Postharvest Biol. Technol**, v. 46, p. 128–135, jan, 2007.
- BETTIOL, W.; M., Marcelo. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectiva**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, p. 341, 2009.
- BIENER, R.; STEINKÄMPER, A.; HORN, T.. Calorimetric control of the specific growth rate during fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology** v.160, p, 195–201, mar, 2012
- BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function**. University of Wisconsin Technical Report, Madison, n. 9, 1973.
- CABALLERO-CÓRDOBA; Glenys M. *et al.* Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces sp.*) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Food Science and Technology**, Campinas, v.17, n. 2, p. 102-106, ago, 1997.
- CAMPOS - MARTÍNEZ, A *et al.* Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. **Crop Protection**, v.89, p 101- 104, nov, 2016.
- CHANG, Y. H. *et al.* A comparative study on batch and fed-batch cultures of

oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corn cob hydrolysate for microbial oil production. **Fuel**, n.105, p.711–717, 2013.

CHOCIAI, M. B. et al . Cultivo da *levedura Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous)* em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 38, n. 4, p. 457-462, dez. 2002 .

CHOPDA, V; R.; RATHORE A. S; GOMES J.. Maximizing biomass concentration in baker's yeast process by using a decoupled geometric controller for substrate and dissolved oxygen. **Bioresource Technology**, v.196 , p.160–168, 2015.

COELHO, A. R.; LEITE, F. H.; YOKO, E. H. Biocontrole de doenças pós-colheita de frutas por leveduras: perspectivas de aplicação e segurança alimentar. **Semina: Ciências Agrárias** , v. 24, n. 2, p. 337-358, jul./dez. 2003.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Fermentação descontínua alimentada. *In*: SCHIMIDELL W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2, Engenharia Bioquímica, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001, p. 277-329.

DA SILVA, A. F. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambique da bahia**. 2009, 115f. Dissertação(Mestrado em Biotecnologia), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia,2009.

DE ÁVILA, F. R. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana**. 2007, 160f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. London: Academic Press, 1995, p. 439.

FERNANDES, A.P.F.V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-Atpase da membrana plasmática**. 2008. 201f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Programa Pós – Graduação em Biologia, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2008.

FLORES, CL *et al.* Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507-529, out, 2000.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HOCALAR, A.; TÜRKER, M. Model based control of minimal overflow metabolite in technicalscale fed-batch yeast fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 64–71, abril, 2010.

KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Growth of *Trichosporon cutaneum* under oxygen limitation: kinetics of oxygen uptake. **Biotechnology and bioengineering**, vol.24. n.11, p. 2519-2526, nov, 1982.

KURTZMAN, C. P. **The yeasts, a taxonomic study**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 4 ed., 2011, p. 111–121.

LIMA, U. A.; BASSO, C. L.; AMORIM, H. V. **Produção de etanol**. In: LIMA, U.A et al. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, 2001, p.1-43.

LIU, Y. *et al.* Isolation, identification and in vitro screening of *Chongqing orangery* yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. **Biological Control**, v.110, p.18–24, abril, 2013

MACHADO, Ubiratan Fabres. Transportadores de glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v. 42, n. 6, p. 413-421, dez. 1998 .

MARTINAC, B. *et al.* Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 16, p. 6228-6232, ago, 1990.

MENDES, T. A. O. *et al.* Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Food Technol.**, Campinas , v. 16, n. 2, p. 81-89, jun, 2013.

MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. De L. R. Controle biológico de doenças de plantas. **Periódicos existentes no Brasil e onde encontrá-los-Guia Básico**. Recife. Imprensa Universitária-UFRPE , 16p.,1993.

NALLY, M.C. *et al.* Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. **Postharvest Biology and Technology**, v86 ,p.456–462,jul, 2013

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **A glicose e o catabolismo das hexoses**. Princípio de Bioquímica de LEHNINGER, 5 ed. São Paulo: Sarvier , 2011, p.572-707.

OLIVEIRA, B. M. **Comportamento killer em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto da cana de açúcar de produtores de cachaça de Alambique da Bahia**. 2009, 123f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) , Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia, Universidade da Feira de Santana da Bahia, Feira de Santana, 2009.

PARAFATI, L. *et al.* Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente, University of Catania, Catania, Italy. **Food Microbiology**, v.47 p.85 – 92, maio, 2015

PEREIRA, C. A. *et al.* Prospecção de leveduras para o controle de podridão pós-

colheita causada por *Aspergillus niger* em uva de mesa. **Anais XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2011, Bento Gonçalves RS, Resumo, Bento Gonçalves RS, Tropical Plant Pathology, 2011.

PIRES, J. M. C. **Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio**. 2017, 184f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Programa de Pós – Graduação em Bioquímica, Universidade de Évora, Évora, 2017.

PLATANIA, C. *et al.* Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). **Food Microbiol.**, v. 30 p. 219–225, maio, 2012.

RODRIGUES, M. V.N. *et al.* Produção de xarope de açúcar invertido obtido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** . v 20. n1, p. 103-109, abril, 2000.

ROSA, M. M. **Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos**. 2009. 151f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista . Rio Claro. 2009

SCHIMIDELL, W. **Agitação e Aeração e biorreatores**. *In:_____ Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Volume 2, Engenharia Bioquímica, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 277-329, 2001.

SCHIMIDELL, W. **Fermentação descontínua alimentada**. *In:_____ Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Volume 2, Engenharia Bioquímica, Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, p. 205-216, 2001.

SPIEGELMAN, S., e JOHN, R. M. The formation and stabilization of an adaptive enzyme in the absence of its substrate. **The Journal of general physiology** ,v.31, n.2, p.175-193, 1947.

SURESH, S.; SRIVASTAVA, V.C.; MISHRA, I.M. Techniques for oxygen transfer measurement in bioreactors: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 84, n.8, p.1091-1103, mar, 2009.

TEIXEIRA, J. Á.; FONSECA, M.. M. **Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações**. Portugal:Lidel - Edições Técnicas, Lda, 2007.

TORIJA, M. J. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiol**, vol.80, n.1,p. 47-53, jan, 2003.

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, T. S. Dosagem de glicídeos totais pelo método de antrona. **J. Biochem**, vol. 50, p.292, 1952.

VALENTINOTTI, S. *et al.* Optimal operation of fed-batch fermentations via adaptive control of overflow metabolite. **Control Engineering Practice**, v. 11, p.665–674, jul, 2003.

VENTURINI FILHO, W. G. *et al.* Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e aneróbio de levedura alcoólica. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 227-236, jun, 2014.

WANDERLEY, M. C. A. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processoS SHF.** 2012. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2012.