



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

DAYANE LIMA GUERRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO DA LEVEDURA *Candida
pseudointermedia* CMIAT 168 – L10 POR FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA
SIMPLES**

FORTALEZA

2017

DAYANE LIMA GUERRA

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO DA LEVEDURA *Candida pseudointermedia*
CMIAT 168 – L10 POR FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA SIMPLES

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

Orientador: Profa. Dra. Márjory Lima Holanda.
Coorientador: Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G963o Guerra, Dayane Lima.
Otimização do processo produtivo da levedura *Candida pseudointermedia* CMIAT 168 – L10 por fermentação descontínua simples / Dayane Lima Guerra. – 2017.
47 f. : il. color.

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. Levedura. 2. Condições do processo. 3. Batelada simple. I. Título.

CDD 661

DAYANE LIMA GUERRA

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO DA LEVEDURA *Candida pseudointermedia*
CMIAT 168 – L10 POR FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA SIMPLES

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da 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 (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Coorientador)
EMBRAPA Agroindústria Tropical

Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, por ter me permitido essa caminhada.
Aos meus amados pais, Diógenes e Jacqueline
e meu irmão Darlan.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele não teria alcançado essas conquistas.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical, por ter me dado a chance de trabalhar com os seus equipamentos, laboratórios, profissionais e grande estrutura.

À Universidade Federal do Ceará e a Coordenação de Biotecnologia, por ter me dado toda uma estrutura e orientação para conclusão desse curso.

Ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, por ter me dado essa oportunidade e ter me apresentado a essa área do Bioprocessos e por ter me orientado nesse projeto e transmitido tantos ensinamentos.

À Dra. Márjory Lima Holanda, por ter me orientado na monografia e no projeto e ter dividido um pouco da sua imensa sabedoria.

À Dra. Maria Valdez Rocha por ter aceitado o convite e ter contribuído com todo os seus conhecimentos para a melhora desse trabalho.

À minha família, meu pai, Diógenes Guerra Mendes, minha mãe, Jacqueline Lima Dos Santos Guerra e meu irmão, Darlan Lima Guerra, por ter me dado toda força, amor e carinho para que eu conseguisse sonhar alto e ter a capacidade de correr atrás desses sonhos em todas as fases da minha vida. Se hoje sou essa pessoa é graças a eles.

À essas duas pessoas fundamentais nessa etapa da minha vida Viviane De Oliveira Thomaz Lemos e João Vitor Martins de Oliveira, pois me deram muita força, carinho e amor nos momentos de estresse e medo.

À Brenda Fontinele Alves, por ter sido minha parceira e amiga no desenvolvimento desse projeto e em toda a graduação.

À Natália Moura, por ter sido tão carinhosa e amiga e ter ensinado todo o funcionamento do laboratório, as técnicas e a manipulação dos equipamentos. Além de sempre estar à disposição quando precisei.

Aos meus amigos de faculdade Larisse, Letícia, Farias, Matheus, João Pedro, Jackson e Lucas, por ser minha base para concluir essa graduação, seja com ajuda nos trabalho e estudos para provas, ou com uma simples palavra de incentivo.

Aos colegas de trabalho do Bioprocessos e BioAP, que me ajudaram de alguma forma.

À todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desse projeto.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda humanidade.”

(Marie Currie)

RESUMO

A levedura *Candida pseudointermedia* CMIAT 168-L10 foi isolada da microbiota natural de frutos tropicais pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina/PE), apresentando uma atividade antagônica contra os fitopatógenos pós-colheita. O desenvolvimento de um processo de produção da biomassa desta levedura possibilitará estudos em escala de campo, e futuramente sua utilização como agente de controle biológico. Desta forma, este trabalho tem como objetivo definir condições do processo fermentativo de melhor produção de biomassa. Primeiramente, a levedura foi ativada em meio YM contendo 3g/L de extrato de levedura e de malte, 2g/L de peptona e 4g/L de dextrose em 100mL de meio por 24h. O crescimento de *C. pseudointermedia* foi realizado em batelada simples, com o meio de cultura YM modificado, diferindo a fonte de carbono, constituído de 5g/L de peptona, 3g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte e sacarose comercial invertida, pH corrigido a 4,5. Três diferentes concentrações de sacarose foram avaliadas 20, 30 e 40 g/L. As condições de processo foram: temperatura 30 °C, agitação a 150 rpm e aeração 8 L_{ar}/min. Em seguida, foi traçado um delineamento experimental com três variáveis independentes: concentração de sacarose (25, 30 e 35 g/L), taxa de aeração (8, 9 e 10 L_{ar}/min) e taxa de agitação (150, 175 e 200 rpm). Para a análise do processo de fermentação, foram retiradas amostras com intervalos de tempo de 3 horas, as quais foram submetidas à análise de biomassa por densidade óptica, análise de açúcares totais pelo método do 3,5-dinitrosalicílico. Todas as fermentações foram conduzidas em duplicata. O máximo de produção dos processos com concentração inicial de açúcar a 20, 30 e 40 g/L foram após 24 horas de cultivo. Como resultados foram obtidos concentrações de biomassa de 13,1, 18,56 e 17,53 g/L e açúcares residuais de 0,392, 0,523 e 0,967 g/L, obtendo uma produtividade de 0,434, 0,695, 0,647 g/L.h e fator de conversão de substrato em biomassa de 0,646, 0,621, 0,486 g/g nas fermentações com 20, 30 e 40 g/L de sacarose, respectivamente. Os resultados mostraram que o crescimento da levedura manteve-se linear com o aumento da concentração de açúcar, porém essa ao atingir concentrações altas no meio, como no processo com uma concentração de sacarose de 40 g/L, aeração de 8 L_{ar}/min e agitação de 150 rpm, casou a repressão da respiração celular, devido à falta de fornecimento de oxigênio adequado para a metabolização dessa glicose no meio. Com relação ao delineamento, foi observado que dos ensaios o que produziu mais biomassa foi o ensaio 5. Dessa forma, concluiu-se que a melhor condição para o processo foi com 25 g/L de sacarose, 8 L_{ar}/min de aeração e 200 rpm de agitação.

Palavras-chave: Levedura. Condições do processo. Batelada simples.

ABSTRACT

The yeast *Candida pseudointermedia* CMIAT 168-L10 was isolated from the natural tropical fruit microbiota by Embrapa Semi-Arid (Petrolina / PE), presenting an antagonistic activity against post-harvest phytopathogens. The development of a process of biomass production of this yeast will make possible field scale studies, and future use as a biological control agent. In this way, this work aims to define conditions of the fermentation process of greater production of biomass. First, the yeast was activated in YM medium containing 3 g/L of yeast and malt extract, 2 g/L of peptone and 4 g/L of dextrose in 100 mL of medium per 24h. The growth of *C. pseudointermedia* was carried out in a single batch, with the modified YM culture medium, differing the carbon source, consisting of 5g/L peptone, 3g/L yeast extract, 3g/L malt extract and inverted commercial sucrose, pH corrected to 4.5. Three different concentrations of sucrose were evaluated at 20, 30 and 40 g/L. The process conditions were: temperature 30 °C, agitation at 150 rpm and aeration 8 L_{ar}/min. Then, an experimental design was drawn with three independent variables: sucrose concentration (25, 30 and 35 g/L), aeration rate (8, 9 and 10 L_{ar}/min) and agitation rate (150, 175 and 200 rpm). For the analysis of the fermentation process, samples with 3-hour time intervals were taken, which were submitted to the analysis of biomass by optical density, analysis of total sugars by the 3,5-dinitrosalicylic method. All fermentations were conducted in duplicate. The maximum yield of the processes with initial sugar concentration at 20, 30 and 40 g/L were after 24 hours of cultivation. As results, biomass concentrations of 13.1, 18.56 and 17.53 g / L and residual sugars of 0.392, 0.523 and 0,967 g/L were obtained and productivity of 0.434, 0.695, 0.647 g/L/h and the biomass yield of 0.646, 0.621, 0.486 g/g in fermentations with 20, 30 and 40 g/L of sucrose, respectively. The results showed that the growth of the yeast remained linear with the increase of the sugar concentration, but this when reaching high concentrations in the medium, as in the process with a sucrose concentration at 40 g/L, aeration 8 L_{ar}/min and agitation 150 rpm, caused the repression of cellular respiration, due to the lack of adequate oxygen supply for the metabolization of this glucose in the medium. Regarding the design, it was observed that of the assays that produced more biomass was the test 5. Thus, it was concluded that the best condition for the process was with 25 g/L sucrose, 8 L_{ar}/min aeration and 200 rpm agitation.

Keywords: Yeast. Process conditions. Simple batch.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Respiração celular com a via glicolítica, ciclo de Krebs e Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) em leveduras em meio contendo adequadas concentrações de oxigênio e glicose 21
- Figura 2 – Fermentação alcoólica em leveduras sobre condições anaeróbicas ou sobre altas concentrações de glicose 22
- Figura 3 – Coloração de Gram da biomassa de *C. pseudointermedia* presente no processo fermentativo em batelada simples com teores de sacarose de 40g/L (A) após 27 horas, a 30g/L (B) após 6 horas e a 20 g/L após 9 horas 35

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Efeito da concentração de sacarose hidrolisada sobre o crescimento de *C. pseudointermedia* em processo fermentativo em batelada simples com meio YM2, taxa de aeração de 8 L_{ar}/min e agitação de 150 rpm 32
- Gráfico 2 – Efeito da concentração de sacarose hidrolisada sobre a produtividade de biomassa de *C. Pseudointermedia* e Y_x/s em processo fermentativo em batelada simples com meio YM2, taxa de aeração de 8 L_{ar}/min e agitação 150 rpm 33
- Gráfico 3 – Análise de pH durante os processos fermentativos com 20, 30 e 40 g/L de sacarose 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Delineamento experimental fatorial com as combinações dos níveis reais (e codificados) das variáveis independentes concentração de sacarose, taxa de aeração e taxa de agitação	30
Tabela 2	– Resultados obtidos das variáveis dependentes biomassa, Y_x/s e produtividade dos ensaios do Delineamento Experimental	36
Tabela 3	– Valores de t e p-valor e efeitos estimados de biomassa, gerado no <i>software</i> STATISTICA® versão 10	37
Tabela 4	– Análise de Variância para a produção de biomassa da levedura	39
Tabela 5	– Valores de t e p-valor e efeitos estimados de produtividade em biomassa, gerado no <i>software</i> STATISTICA® versão 10	39
Tabela 6	– Análise de Variância para a produtividade em biomassa da levedura	40
Tabela 7	– Valores de t e p-valor e efeitos estimados de Y_x/s , gerados no <i>software</i> STATISTICA® versão 10	40
Tabela 8	– Análise de Variância para fator de conversão de substrato em biomassa	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A levedura da espécie <i>Candida pseudointermedia</i>	14
1.2	Podridão pós-colheita de frutos e os impactos na economia brasileira	15
1.3	Mecanismos de agentes de controle biológico	17
1.4	Processos Fermentativos para a produção de biomassa celular	18
1.5	Fonte de carbono, agitação e aeração no processo de fermentação para produção de biomassa celular	20
2	OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Levedura <i>Candida pseudointermedia</i>	26
3.2	Manutenção da levedura	26
3.3	Meio de Ativação da Levedura e Preparo do Pré-Inóculo	26
3.4	Preparo do meio para o Processo Fermentativo	27
3.5	Efeito da Concentração de Sacarose sobre a Produção de Biomassa Celular por processo Fermentativo em Batelada Simples	27
3.6	Monitoramento de Contaminantes	28
3.7	Determinação da concentração de Biomassa celular e Análise de pH	28
3.8	Determinação do teor de Açúcares Redutores (AR)	29
3.9	Otimização da produção da levedura <i>C. pseudointermedia</i> em processo fermentativo em batelada simples	29
3.10	Fator de Conversão de Substrato em Biomassa ($Y_{x/s}$) e Produtividade de Biomassa Celular	30
3.11	Análise Estatística	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1	Efeito da Concentração de Sacarose sobre a Produção de Biomassa Celular por Processo Fermentativo em Batelada Simples	32
4.2	Efeito das taxas de aeração, agitação e concentração de sacarose sobre a biomassa da levedura, $Y_{x/s}$ e produtividade em biomassa	36
5	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. A levedura da espécie *Candida pseudointermedia*

Uma nova levedura, *Candida pseudointermedia*, foi isolada de "Kamaboko", um produto de pasta de peixe tradicional no Japão (NAKASE; KOMAGATA; FUKAZAWA, 1976). A levedura foi classificada dentro do filo ascomiceto, subfilo *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae*. Ascomicetos, são fungos formadores de ascos, que são estruturas reprodutivas, dentre as quais são produzidos esporos meióticos, chamados de ascósporos, incluindo leveduras, que são unicelulares, como as *Saccharomyces sp.* (COSTA, 2009). As leveduras desse tipo fazem parte de um grupo de fungos de importância econômica e ambiental. Em *Saccharomycetales* durante a reprodução sexual os ascos não são incluídos em ascoma (corpos frutíferos). Muitas leveduras desse grupo podem possuir um extenso micélio (BLACKWELL *et al.*, 2009). As células de *C. pseudointermedia* apresentaram na forma de subglobosa a ovóide, ocorrendo isoladas ou em pares e apresentou uma velocidade específica de crescimento máximo na faixa de temperatura de 30 a 37 °C, utilizando como fontes de carbonos: glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose, produzindo baixas concentrações de ácidos durante o processo fermentativo. *C. pseudointermedia* tem estreita semelhança com a espécie *C. intermedia* (NAKASE; KOMAGATA; FUKAZAWA, 1976).

Alguns microrganismos como as leveduras são encontrados em uma associação benéfica com flores e frutos, sendo uma fonte de substâncias bioativas como enzimas e metabólitos de interesse em processos industriais (MOREIRA, 2014). Algumas das cepas de *C. pseudointermedia* foram isoladas de frutos ou flores de espécies vegetais em um trabalho realizado no Instituto de Biociências na Universidade Estadual Paulista, que isolou uma cepa dessa espécie das águas que se acumulam em brácteas e entre folhas de *Heliconia velloziana* (RUIVO, 2005).

A linhagem de *C. pseudointermedia* CMIAT 168 L-10, isolada da epiderme de uva vinífera Cabernet Sauvignon pelo Centro Nacional de Pesquisa do Semi Árido da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) localizado em Petrolina Pernambuco, foi depositada na coleção de culturas da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, no estado do Ceará. Ressaltando que as espécies de uvas foram obtidas na Fazenda Ouro Verde na cidade de Casa Nova, no estado da Bahia. Essa linhagem de levedura apresentou uma atividade antagonista a fitopatógenos, sendo relatado pelo estudo em que *C. pseudointermedia* diminuiu

em mais de 80% as áreas lesionadas em frutos de manga infectados por *Lasiodiplodia theobromae*, fungo causador da podridão pós-colheita (PEREIRA *et al.*, 2011).

1.2. Podridão pós-colheita de frutos e os impactos na economia brasileira

O Brasil é um dos maiores produtores de frutos do mundo, ficando atrás apenas da China e Índia, demonstrando a importância desse setor para a economia do país (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2015). Por sua ampla diversidade de espécies produzidas em diferentes climas em toda a extensão do território brasileiro, e as diversas estratégias para o aumento da produção, bem como, as formas de apresentação e industrialização colocam os frutos em destaque no agronegócio (BELING, 2015). As doenças pós-colheita são um dos causadores de grandes perdas de produtos agrícolas durante as etapas de comercialização no Brasil. As perdas de produtividade, ocasionada pelas doenças ficam entre 10% e 50% dependendo do clima, da localidade e da metodologia de manejo empregada (LACERDA, 2005).

As doenças pós-colheita normalmente são aquelas, em que os seus agentes causadores infectam os frutos depois de suas colheitas, sendo geralmente através de um ferimento, que servirá de “porta” para a entrada desses agentes (PARISI; HENRIQUE; PRATI, 2015). As doenças pós-colheita possuem dois tipos de infecções: quiescente, ou latente, e imediata (CHOUDHURY, [20--]). A infecção imediata é caracterizada pela constatação dos sintomas da doença logo após a contaminação pelo fungo (CIA, 2002). Já a infecção quiescente não causa sintomas visíveis logo após a contaminação, uma vez que a penetração do patógeno no hospedeiro ocorre no campo onde tem início os seus estágios de infecção sem provocar quaisquer sintomas de decaimento (BARKAI-GOLAN, 2001). A resistência dos frutos imaturos à infecção pelos agentes causadores de podridão deve-se a presença de alguns compostos tóxicos como fenóis e taninos, e de substâncias complexas, que não são ideais para suprir as necessidades nutricionais dos patógenos (TERAO *et al.*, 2008).

Existem dois mecanismos de defesa das plantas, entre eles estão: os estruturais e bioquímicos, ambos podendo ser desencadeados pré e/ou pós a tentativa de infecção do patógeno (STANGARLIN *et al.*, 2010). Alguns fatores estruturais da planta servem como barreiras físicas a entrada e disseminação do patógeno na planta. Por outro lado, algumas reações bioquímicas são estimuladas em células e tecidos da planta após a infecção para produzirem substâncias que ou são tóxicas para o patógeno, ou criam condições para inibir o seu desenvolvimento (TEIXEIRA, 2011).

Os principais agentes causadores das doenças pós-colheita em frutos são os fungos, devido a sua grande variedade de espécies e diversidade, além de possuírem um eficiente mecanismo de penetração no hospedeiro (TERAO *et al.*, 2008). Alguns gêneros fúngicos são predominantes na causa da podridão pós-colheita em frutos e hortaliças, entre eles estão *Alternaria*, *Botrytis*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus* e *Sclerotinia* (PARISI; HENRIQUE; PRATI, 2015).

Como exemplo desses fungos fitopatógenos pode ser citado *Lasiodiplodia theobromae*, causador de grandes problemas para a agricultura, uma vez que é um fungo cosmopolita que infecta mais de 500 espécies de plantas em regiões tropicais e subtropicais (PUNITHALINGAM, 1980). Esse fungo tem a característica de colonizar as plantas sem o surgimento de sintomas perceptíveis (CARDOSO, 2009). Temperaturas elevadas, variando em torno de 28°C, alta umidade relativa, próxima de 60% e alta precipitação pluviométrica de, aproximadamente, 15 mm favorecem a infecção e o seu desenvolvimento (TAVARES, 2002).

Essa espécie possui uma variedade de hospedeiros naturais relatados até hoje como: o abacateiro, citros, coqueiro, eucalipto argentino, jaqueira, mandioca, ficus ornamental, meloeiro, figueira, mangueira, oiticica, goiabeira, mamoeiro, roseira, sapotizeiro e videira (OLIVEIRA, 2013). Devido sua capacidade de infectar frutos está entre os mais eficientes patógenos, que infectam através de sementes e causam doenças de podridão pós-colheita (FREIRE *et al.*, 2004). A doença causada apresenta sintomas como tombamento de plântulas, podridão-radicular, murcha e queima-foliar, cancro, gomose, podridão-de-frutos e sementes, morte-descendente e envassouramento, além de apodrecimento de madeira (VIANA; CARDOSO; FREIRE, [20--]).

Devido ao seu grande impacto na agricultura, diversas pesquisas visam encontrar formas mais eficientes de controle desse fungo por meio de procedimentos operacionais padrões de manejo, controle químico e controle biológico. A melhor forma de combater as doenças causadas por esse fungo é utilizando uma adequada metodologia de manejo, afim de evitar predispor a planta ao agente causador da doença e desfavorecendo a reprodução do patógeno nas áreas de cultivo, associando essa estratégia com o controle químico obtém-se uma eficácia maior no controle desse patógeno (BATISTA *et al.*, 2010). Para o controle químico são utilizados fungicidas, que podem ser classificados como preventivos, curativos e erradicativos (HEWITT, 1998). Os fungicidas preventivos atuam protegendo a planta contra a pré-penetração do patógeno, já os fungicidas curativos têm sua ação na pós-infecção e no caso dos fungicidas erradicativos os efeitos do produto químico atuam no estágio pós-sintoma (REIS; BRESOLIN, 2007). Por outro lado, o controle biológico se baseia no emprego de um organismo, que pode

agir como um predador ou parasita ou patógeno de um determinado agente, que esteja causando danos às lavouras (ALMEIDA; PETERSEN; CORDEIRO, 2001). A utilização de fungos, que possuem atividade contra agentes causadores de doenças em plantas tem crescido nos últimos anos, além da eficácia no combate a esses patógenos, possui uma diminuição dos impactos ambientais gerados pelos compostos químicos. (SILVA *et al.*, 2015).

1.3 Mecanismos de agentes de controle biológico

O controle biológico se baseia nas relações antagônicas entre os seres vivos como a competição, predação, parasitismo, amensalismo, resistência induzida ou pela liberação de metabólitos que inibam o crescimento de outro ser (SANTOS *et al.*, 2015). Competição é a disputa por território, nutrientes, água e luz, ou seja, elementos essenciais para a sobrevivência de um ser (DIAS, 2011). O amensalismo é um tipo de interação desarmônica em que um ser vivo libera substâncias que prejudiquem o desenvolvimento e crescimento de outras espécies (LAY-ANG, [20--]). Parasitismo é uma interação entre espécies, o qual uma delas rouba nutrientes, se beneficiando e prejudicando o hospedeiro (DUARTE, 2016). A indução de resistência ativa os mecanismos latentes de resistência da planta, por meio do uso de agentes patogênicos ou fatores abióticos (PASCHOLATI; MELO; DALIO, 2015). Essa resposta, como por exemplo o armazenamento de fitoalexinas, evita que a planta seja infectada por outros patógenos (CARVALHO, 2012). E por fim os metabólitos que são usados para inibir o desenvolvimento do patógeno, como exemplo os sideróforos, que possuem alta afinidade pelo ferro. Esses apresentam atividade contra microrganismos fitopatogênicos, pois eles roubam o ferro disponível, causando inibição do crescimento e da atividade metabólica dos microrganismos patogênicos (SANTIN, 2008).

Dentro dos agentes biológicos estão as leveduras que possuem grande potencial antagônico à fitopatógenos. As leveduras podem ser encontradas na flora epífita de algumas plantas, caracterizando-se como competidoras, efetivas colonizadoras de ferimentos, indutoras de resistência do hospedeiro e produtoras de enzimas líticas (SILVA; VIECELLI; TERAÓ, 2014). Foi observado em um estudo que *Candida saitoana* possui uma atividade contra *Botrytis cinerea*, através da sua capacidade de prevenir o crescimento necrotrófico do patógeno e estimular respostas de defesa estrutural (EL-GHAOUTH; WILSON; WISNIEWSKI, 1998). Alguns produtos patenteados e já comercializados utilizam *Candida oleophila* como antagonista, no combate a doenças pós-colheita, como o Biofungicida Aspire da empresa Ecogen (EL-NESHAWY; WILSON, 1997). Foi observado que algumas leveduras secretavam

proteínas tóxicas a outros microrganismos, sendo denominada de proteína *killer* e constatou-se a presença desse mecanismo em *Candida albicans* (CANDIDO *et al.*, 1995). As proteínas *killer* são aquelas que produzem exotoxina com atividade antimicrobiana, diante de microrganismo, possuidores de receptores de paredes dessa proteína (PONZZES *et al.*, 2007 *apud* POLONELLI *et al.*, 1991).

1.4. Processos fermentativos para produção de biomassa celular

A fermentação consiste em um conjunto de reações químicas, controladas por enzimas, com a finalidade de produzir energia (ATP) e oxidar o NADH para ser utilizado na via glicolítica (OLIVEIRA, 2010). O processo fermentativo, também chamado de bioprocesso, é utilizado para produção de produtos, desde a antiguidade. Os principais produtos de bioprocessos são fármacos, alimentos como iogurtes, produtos químicos e compostos utilizados na agricultura. A maioria dos produtos da fermentação são classificados em três tipos: biomassa, produtos celulares e compostos modificados por biotransformação ou bioconversão (NAJAFPOUR, 2007). Para a formação desses produtos pode-se dizer que um biorreator, pode ser operado de quatro formas distintas: descontínuo, descontínuo alimentado, semicontínuo e contínuo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A fermentação descontínua ou fermentação em batelada é o processo em que se baseia na inoculação de um biorreator, mantendo-o em condições ideais para o processo fermentativo do microrganismo (ZAMBELLI, 2010). Durante o processo fermentativo nada é adicionado ao sistema, apenas oxigênio, no caso de processos aeróbicos, e ácido ou base, no caso de processos que necessitem de um controle de pH (CARVALHO; SATO, 2001). Uma das principais características desse processo é a permanência constante do volume durante o processo, pois nada é adicionado ao sistema (ZAMBELLI, 2010). Dentre as etapas desse processo estão: lavar a dorna, carregá-la com mosto (meio de cultivo), esterilizá-la e adicionar o inóculo ou pé-de-cuba, que é um volume de suspensão de microrganismos em concentração adequada (CARVALHO; SATO, 2001).

Os processos de fermentação descontínua podem ser classificados em: processos sem recirculação de células, processos com recirculação de células e processos por meio de cortes (ZAMBELLI, 2010). O primeiro grupo baseia-se na inoculação de uma dorna com um microrganismo a partir de uma cultura pura. Já o segundo grupo, o reaproveita como inóculo o microrganismo inoculado e propagado na batelada anterior (CARVALHO; SATO, 2001). E o

terceiro, inocula-se uma dorna e quando a fermentação atinge um estado apropriado transfere-se parte do conteúdo fermentativo para uma outra dorna que está vazia (ZAMBELLI, 2010).

No estudo de Golaghaiee, Ardestani e Ghorbani (2017) foram testados meios com diferentes concentrações de sulfato de amônia, sulfato de ferro, glicina e glicose em um processo de fermentação submersa para crescimento e produção de proteínas de *Candida tropicalis* ATCC13803. A fermentação se deu em erlenmeyers contendo os diferentes tipos de meio, com a inoculação de 1 mL de suspensão de células *C. tropicalis* ATCC13803 por um período de 70 horas, agitação de 300 rpm e temperatura de 25 °C. Obtendo no melhor ensaio o valor de células de levedura de 8,68 log UFC/mL em um meio constituído de 0,3 g/L de sulfato de amônia, 0,15 g/L de sulfato de ferro, 2 g/L de glicina e 70 g/L de glicose. Observando que o sulfato de ferro e sulfato de amônia contribuíram em 41,76% e 35,27% para o crescimento da levedura, respectivamente e a glicose e a glicina em 17,12% e 5,86%, respectivamente.

No trabalho de Yönten e Aktas (2013) para a otimização das condições de fermentação em batelada simples para produção de *C. intermedia* Y-1981, com meio utilizando a lactose como fonte de carbono foram testados meios com diferentes concentrações de lactose e NaCl em diferentes temperaturas em pH 5. Sendo a fermentação realizada em Erlenmeyers contendo 95 mL de meio e adição do inóculo em 5% (v/v) sendo conduzido a uma agitação de 130 rpm por 36 horas. Dessa forma, foi obtido que a melhor condição de produção dessa levedura foi a uma concentração de lactose e NaCl de 18,4 g/L e 0,162 g/L, respectivamente em uma temperatura de 32,4 °C, sendo alcançado uma velocidade específica de crescimento de *C. intermedia* de 0,090 1/h com um consumo de 42% da lactose.

Já no estudo de Dhanasekaran *et al.* (2011) foi avaliado o crescimento de *Candida tropicalis* utilizando resíduo de abacaxi como fonte alternativa de carbono para o processo, possuindo 10,8% de açúcares redutores pela porcentagem em peso. O processo fermentativo ocorreu em Erlenmeyers contendo meio com suplementação de hidrolisado de abacaxi entre 1 e 5%, sendo incubado a 28°C por 7 dias. Com isso, foi observado uma produção de levedura de 492 mg/100mL de massa seca após os 7 dias de processo com o meio suplementado em 5% de hidrolisado de abacaxi, além do consumo de 6,81 mg/100mL de açúcares redutores no terceiro dia de fermentação, sendo o valor inicial de 9,45 mg/mL.

No trabalho de Begea *et al.* (2012) foi utilizado um processo em batelada simples, em que a fonte de carbono do meio era óleo de girassol em um biorreator de 40 L para a produção de *C. lipolytica*. A fermentação se deu com a inoculação de 5% (v/v) de inóculo em um volume de meio de 20 L sendo a temperatura mantida entre 30 e 32 °C e as taxas de agitação e aeração em 1300 rpm e 0,6 l/l/min, respectivamente. Durante o processo foi mantido o pH em

5-5,4. O processo com o meio suplementado com 20 g/L de óleo de girassol durou 48 horas, produzindo ao final 27,17 g/L de biomassa e 1,02-1,94 g/L de lipídeo residual, sendo 5,1-9,7% da concentração inicial de lipídeos. Dando, dessa forma, um rendimento de 1,4-1,52 g de biomassa total produzida por grama de gordura consumida.

1.5. Fonte de carbono, agitação e aeração no processo de fermentação para produção de biomassa celular

Dentre os açúcares utilizados pelos microrganismos estão: glicose, sacarose, frutose, ou ainda polissacarídeos, como o amido e a celulose (SCHIMIDELL, 2001). A seleção da fonte de carbono, bem como, a concentração da fonte de carbono no processo é de extrema importância, pois alguns microrganismos podem sofrer repressão metabólica, reduzindo, assim, o seu crescimento (LILLY, 1979).

A disponibilidade de glicose ou de um açúcar rapidamente fermentescível às células que cresceram na ausência de carboidratos fermentescíveis geram sinais metabólicos que disparam os fenômenos regulatórios celulares. Os sinais produzidos irão interagir com o produto da expressão de um gene, regulando sua transcrição por ativação de proteínas repressoras ou pela inibição de proteínas ativadoras (GANCEDO, 1992).

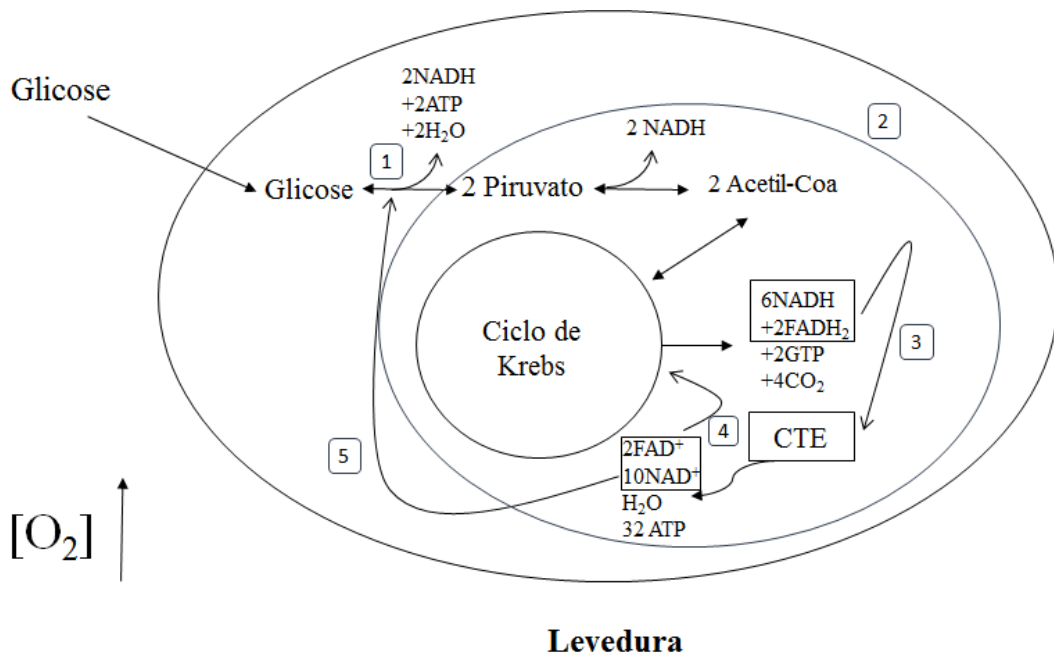
Segundo Lucero, Moreo e Lagunas (2002), dentre os açúcares, a glicose é a mais utilizada pelas leveduras, isso é devido a alguns mecanismos que são desencadeados pela glicose como a indução e repressão de transportadores de glicose, bem como, a repressão de enzimas necessárias ao catabolismo de outros açúcares. Porém acredita-se, que um terceiro mecanismo é responsável pelo uso preferencial da glicose, a inativação por glicose de transportadores de outros açúcares. Foram identificados em leveduras três tipos de transportadores específicos para galactose, maltose e α -glucosídeos. Esses transportadores são inativados na presença de glicose por um mecanismo que inclui proteólise.

Para altas taxas de crescimento de leveduras é necessário um alto valor energético nas células, o qual é gerado pela respiração celular. A respiração celular refere-se ao processo molecular, o qual a célula consome O_2 e produz CO_2 , sendo a primeira via desse processo a glicólise, a qual é um processo em que ocorre a quebra da glicose em uma sequência de reações produzindo duas moléculas de piruvato, ATP e NADH (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005).

Em seguida, essas moléculas de piruvato são convertidas em Acetil-CoA pelo complexo enzimático da piruvato oxidase (CROCOMO; GUTIERREZ, 2001). Essas moléculas

entram no Ciclo de Krebs, que é a segunda via do processo de respiração, ocorrendo em oito etapas de reações sucessivas, tendo o objetivo de produzir à partir de Acetil-CoA e oxalacetato molécula de citrato, o qual será oxidado para produzir CO_2 e energia conservada nas coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Dessa forma, as moléculas de NADH e FADH_2 produzidas nas etapas anteriores são oxidadas na cadeia transportadora de elétrons, a última etapa da respiração, transferindo os elétrons para os citocromos (NEVES, [2013?]). A cadeia transportadora de elétrons é o processo de fosforilação oxidativa, que envolve a redução de O_2 a H_2O com os elétrons doados pelo NADH e FADH_2 . Esse processo todo em leveduras é representado na Figura 1.

Figura 1 – Respiração celular com a via glicolítica, ciclo de Krebs e Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) em leveduras em meio contendo adequadas concentrações de oxigênio e glicose. (1) Via Glicolítica; (2) Mitocôndria; (3) Coenzimas Reduzidas entrando na Cadeia Transportadora de Elétrons; (4) Coenzimas oxidadas retornando ao Ciclo de Krebs; (5) Coenzimas oxidadas retornando para a Via glicolítica.

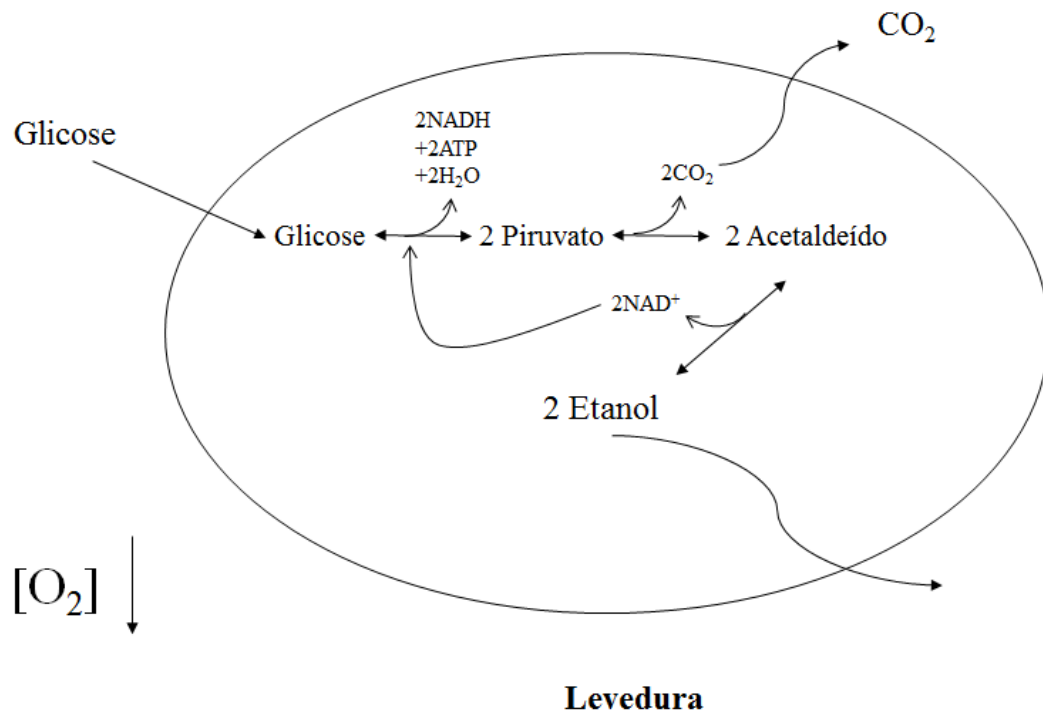


Fonte: autoria própria (2017)

O fluxo de glicose pela via glicolítica é regulado pela manutenção dos níveis de ATP nas células. O ajuste da taxa de glicólise é alcançado pela complexa interação entre o consumo de ATP, a regeneração de NADH e a regulação alostérica das enzimas da via (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Em meios com falta de oxigênio, ocorre a desregulação desse processo, devido a falta do aceptor final de elétrons da cadeia transportadora de elétrons, prejudicando a produção de ATP e a regeneração do NADH. Dessa forma, as leveduras desviam o seu metabolismo para fermentação alcoólica com o intuito de obter essas

moléculas. A fermentação é a degradação de glicose ou outros nutrientes orgânicos para obtenção de ATP em meios anaeróbicos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005). Esse processo ocorre mediante duas reações: a conversão de piruvato em acetaldeído, pela piruvato descarboxilase e de acetaldeído em etanol pela álcool desidrogenase, liberando CO_2 e NAD^+ , representação na Figura 2 (CROCOMO; GUTIERREZ, 2001).

Figura 2 – Fermentação alcoólica em leveduras sobre condições anaeróbicas ou sobre altas concentrações de glicose.



Fonte: autoria própria (2017)

Outra forma de desviar o metabolismo da levedura para a fermentação alcoólica é através de um efeito de repressão catabólica, chamado de Efeito *Crabtree*. Esse feito é um mecanismo de regulação da célula, causando a repressão da respiração celular da levedura, favorecendo a fermentação, quando em condições de altas concentrações de glicose no meio (AQUILLA, 2013). As altas concentrações de glicose, leva a um fluxo elevado da via glicolítica, resultando em altas produções de piruvato e na saturação da piruvato-desidrogenase, além de provocar a inibição de enzimas da via respiratória (FERNANDES, 2008).

O objetivo central de um sistema de agitação e aeração é o fornecimento adequado de oxigênio para a manutenção de uma dada atividade respiratória de um certo conjunto de células. Assim, o que se visa é transferir o oxigênio da fase gasosa para o líquido, fazer com que este oxigênio dissolvido penetre nestas células e seja consumido (SCHMIDELL, 2001).

Em processos aeróbios, o ar é fornecido para aumentar o crescimento celular, caso contrário o oxigênio dissolvido limitado é consumido todo, interrompendo a respiração celular, causando um decaimento do crescimento celular (NAJAFPOUR, 2007).

O ar sob pressão é fornecido através de um tubo contendo um anel com finos furos ou orifícios, sendo esses responsáveis pelo tamanho da bolha. Isso afeta o processo de transferência de massa. Quanto menor a bolha maior a área de superfície, gerando uma melhor transferência do oxigênio (NAJAFPOUR, 2007). A agitação é responsável pela homogeneização do meio, da manutenção de sólidos em suspensão e na eficiência de transporte de calor e massa. Dessa forma, a potência que se transfere ao líquido submetido a agitação é afetado pelo tipo e diâmetro dos impelidores, a altura e diâmetro da dorna, a existência ou não de chicana, a viscosidade do meio e a frequência de agitação (SCHMIDELL, 2001).

Segundo Schmidell (2001) no processo de transferência do oxigênio para o meio existem três problemas distintos, sendo o primeiro relacionado com a transferência da fase gasosa para a líquida, a difusão do mesmo até a célula e o seu consumo. No caso do primeiro problema ele está associado a três resistências: a película gasosa estagnada, através do qual o oxigênio deve se difundir, a interface gás-líquido e a película líquida estagnada ao redor da bolha. Dentre as três resistências a última é a mais dominante, sendo a principal no processo de transferência do oxigênio. O segundo problema, ou seja, o processo de difusão até a célula não é de difícil resolução, pois com uma adequada agitação o processo decorre normalmente. E por fim o consumo do oxigênio é basicamente controlado pela velocidade das reações enzimáticas da respiração do microrganismos. Por todos esses problemas uma adequada agitação e aeração é essencial para sanar essas resistências do processo.

A agitação do caldo de fermentação distribui uniformemente o ar no sistema. Submetendo o meio a agitação, você exerce uma energia no sistema. Aumentar a entrada de energia reduz o tamanho da bolha e isso, por sua vez, aumenta a área interfacial. Portanto, o coeficiente volumétrico de transferência de massa (oxigênio) seria uma função da entrada de energia por unidade de volume de caldo de fermentação, caracterizando o $K_L a$ (NAJAFPOUR., 2007). Outra constante relevante para o processo fermentativo é a velocidade específica de respiração do microrganismo (Q_{O_2}). Inicialmente é necessário definir o que se entende por velocidade específica de respiração, como sendo a relação da concentração celular com a velocidade de consumo do oxigênio. Na verdade, esta grandeza Q_{O_2} introduz, na presente discussão, a característica biológica do sistema em estudo, pois ela depende do microrganismo empregado, assim como da composição do meio e das condições de fermentação (SCHMIDELL, 2001). A concentração de oxigênio dissolvido em um fermentador é

normalmente medida com um eletrodo de oxigênio dissolvido, conhecido como sonda de DO, os quais possuem uma membrana permeável ao oxigênio (NAJAFPOUR, 2007).

2.OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1.Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo geral estabelecer uma condição otimizada da produção de biomassa de *Candida pseudointermedia* em processo descontínuo.

2.2.Objetivos Específicos

Os objetivos específicos abrangem a avaliação dos parâmetros que influenciam significativamente no crescimento da levedura *C. pseudointermedia*, que são:

- a) determinar os efeitos individuais de diferentes concentrações de sacarose hidrolisada na produção de *C. pseudointermedia*;
- b) determinar os efeitos individuais e combinados de diferentes concentrações de sacarose hidrolisada, taxa de aeração e velocidade de agitação sobre o crescimento da levedura *C. pseudointermedia* em processo descontínuo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Levedura *Candida pseudointermedia*

A levedura *Candida pseudointermedia* CMIAT 168-L10 utilizada para o desenvolvimento desse trabalho foi obtida da coleção de culturas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Essa linhagem foi isolada da epiderme da uva vinífera Cabernet Sauvignon, pela Embrapa Semi-Árido (Petrolina/PE), presente na fazenda ouro verde (Casa Nova/BA).

3.2. Manutenção da Levedura

O microrganismo foi retirado da coleção, mantida em ultrafreezer Sanyo Scientific, modelo MDF-U33V à uma temperatura de -80 °C, inoculado assepticamente (câmara de fluxo laminar) em um tubo de ensaio rosqueado contendo 10 mL de meio YM-ágar inclinado estéril. O meio foi preparado com 0,3 g/L de extrato de levedura; 0,3 g/L de extrato de malte; 0,5 g/L de peptona, 1 g/L de dextrose, 2 g/L de ágar e pH final 6,2 e o tubo de ensaio contendo o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C e 1 atm de pressão durante 15 minutos, sendo retirados da autoclave e mantidos a temperatura ambiente até a sua completa gelificação. Para favorecer o crescimento da levedura, o tubo contendo o inóculo foi incubado em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 30 °C, por 24 horas e após esse período foi armazenada a 4 °C na geladeira para ser utilizada durante 29 dias, sendo realizado um novo repique após este período. Esse processo se repetiu por 5 vezes, totalizando um período de 5 meses. Ao fim desse período, a levedura foi reativada com uma nova retirada da coleção da Embrapa.

3.3. Meio de Ativação da Levedura e Preparo do Pré-Inóculo

O meio de ativação da levedura e preparo do pré-inóculo foi o YM, cuja constituição foi descrita no item anterior, porém sem o ágar. Assim sendo, foram preparados 400 mL de meio YM e distribuídos em 4 Erlenmeyers com 100 mL de meio em cada. Por fim, foram autoclavados a temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm por 15 minutos e armazenado a 4 °C na geladeira até a inoculação da levedura com uma antecedência de 24 horas do início do processo fermentativo no biorreator. A levedura foi inoculada em meio de ativação YM, em

uma câmara de fluxo laminar, e mantida na incubadora com plataforma de agitação orbital a uma rotação de 150 rpm e temperatura de 30 °C, até início do processo fermentativo.

3.4. Preparo do meio para o Processo Fermentativo

O meio de cultura base utilizado no processo fermentativo foi o YM modificado (YM2), o qual foi constituído de 5,0 g/L de peptona, 3,0 g/L de extrato de levedura, 3,0 g/L de extrato de malte, no entanto, foram avaliadas 5 concentrações diferentes de sacarose (20, 25, 30, 35 e 40 g/L). Foi acrescentado 0,3% de antiespumante (Antifoam 204 da Sigma) e o pH foi aferido em 4,5.

O preparo do meio foi iniciado com a hidrólise da sacarose, a qual foi pesada e adicionado 1L de água (sistema de osmose reversa da Gehaka, modelo OS20LXE) e homogeneizado, em um Becker, até a total dissolução da sacarose. Em seguida, o pH foi aferido para 1,5 com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,0 M, sendo mantida a solução a 80 °C por 40 min, em banho-maria. Em seguida, a reação de hidrólise da sacarose foi interrompida com o abaixamento da temperatura em um banho com água gelada. Ao atingir a temperatura ambiente de 30 °C, os demais componentes do meio YM2 foram adicionados. Por fim, o pH foi aferido para 4,5 com solução de NaOH 50%, adicionado o antiespumante e completado o volume para 2,0 L com água.

3.5 Efeito da Concentração de Sacarose sobre a Produção de Biomassa Celular por processo Fermentativo em Batelada Simples

Após montagem da dorna, a qual possui um volume de 3L, do fermentador New Brunswinck Scientific Co, modelo BioFlo/CelliGen® 115, utilizando dois impelidores do tipo *Rushton*, o meio YM2 foi adicionado e o sistema foi fechado para autoclavagem a 111 °C e 0,5 atm de pressão por 30 min. Após a dorna atingir temperatura ambiente, o sensor de OD (Oxigênio Dissolvido), fabricado pela METTLER-TOLEDO, modelo SEM, INPRO 6830/12/220/NBS, foi posicionado na dorna e acionado para polarizar. No dia seguinte, a dorna foi conectada ao fermentador, o sensor de OD foi calibrado, os parâmetros da fermentação foram definidos e o meio de cultura foi inoculado com 1% (v/v) do pré-inóculo. Para avaliação dos efeitos dos parâmetros aeração e agitação sobre o crescimento celular foram definidas três condições de aeração (8, 9 e 10 L_{ar}/min) e três condições de agitação (150, 175 e 200 rpm). A temperatura do processo foi mantida em 30 °C e o processo conduzido durante 30 horas.

Alíquotas (20 mL) foram retiradas nos horários de 3, 6, 9, 24, 27 e 30h do início do processo e mantidas a -18°C até o momento das análises do crescimento microbiano e consumo de açúcares. Todas as fermentações foram realizadas em duplicata.

3.6. Monitoramento de Contaminantes

Segundo a metodologia de Hans Gram (1884), para constatar a ausência de contaminantes durante a fermentação foi realizada a técnica de coloração de Gram. Inicialmente foi coletada uma alíquota de 2,0 mL da fermentação em andamento e foram feitos esfregaços em lâminas para fixação das células. A solução de violeta genciana foi adicionada sobre os esfregaços e mantida por 1 minuto. O excesso foi removido com água de osmose e o lugol foi adicionado e mantido por 1 minuto. O excesso foi novamente retirado com água de osmose e adicionado o descorante, removendo imediatamente. Por fim, a fucsina foi adicionada e mantida por 30 segundos, o excesso foi removido e após secagem a lâmina foi levada ao microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E200, para análise das células.

3.7. Determinação da concentração de Biomassa celular e Análise de pH

Após o descongelamento das alíquotas coletadas durante a fermentação, elas foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos, a temperatura ambiente de 30°C . Em seguida, os sobrenadantes foram utilizados para determinação dos teores de açúcares redutores e pH. Aos *pellets* celulares foram adicionados 10 mL de água de osmose e homogeneizado com um auxílio de um agitador vórtex, sendo submetido à centrifugação novamente nas mesmas condições citadas anteriormente. Por fim, os *pellets* foram dissolvidos e diluídos em balões para determinação da densidade óptica das soluções em espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50 Conc) a um comprimento de onda de 600 nm. Os valores obtidos de densidade óptica foram convertidos em massa celular através de uma curva padrão para *Candida pseudointermedia* previamente obtida por peso seco.

O pH dos sobrenadantes obtido das amostras foi medido com o uso do pHmetro de bancada Hanna instruments, modelo HI 2221 Calibration Check pH/ORP Meter.

3.8. Determinação do teor de Açúcares Redutores (AR)

Os sobrenadantes obtidos após centrifugação das amostras foram submetidos à determinação do teor de açúcar redutor segundo a metodologia de Bernfeld (1955). Para o ensaio foram retirados 0,5 mL e adicionado 0,5 mL do reagente 3,5-dinitrosalicílico em tubos de ensaios. Esses foram agitados em vórtex para homogeneização e levados para o banho maria a uma temperatura de 100 °C por 15 minutos. Em seguida, a reação foi parada com a imersão dos tubos em água até atingirem a temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 4 mL de água de osmose em cada tubo e feito a leitura de absorbância no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm, utilizando a curva padrão para o cálculo das concentrações de açúcares redutores.

3.9. Otimização da produção da levedura *C. pseudointermedia* em processo fermentativo em batelada simples

Para avaliar os efeitos das diferentes taxas de aeração e agitação e concentração de açúcar redutor sobre a concentração final de *C. pseudointermedia* foi elaborado um planejamento experimental fatorial com o objetivo de obter uma condição otimizada de processo para produção de biomassa celular de *C. pseudointermedia*.

O planejamento fatorial com três variáveis independentes, e três pontos centrais, gerou 11 ensaios mediante a combinação dos 3 níveis das variáveis independentes, concentração inicial de sacarose nos níveis reais (e codificados): 25 (-1), 30 (0) e 35 (+1) g/L, taxa de aeração: 8 (-1), 9 (0) e 10 (+1) L_{ar}/min e taxa de agitação: 150 (-1), 175 (0) e 200 (-1) rpm. O planejamento avaliou três variáveis dependentes: produção de biomassa, fator de conversão de substrato em biomassa e produtividade em biomassa. Os ensaios propostos pelo delineamento experimental fatorial com as combinações dos níveis das variáveis independentes reais (e codificados) estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento experimental fatorial com as combinações dos níveis reais (e codificados) das variáveis independentes concentração de sacarose, taxa de aeração e taxa de agitação.

Ensaio	[Sacarose] (g/L)	Taxa de aeração (L_{ar}/min)	Taxa de agitação (rpm)
1	25 (-1)	8 (-1)	150 (-1)
2	35 (+1)	8 (-1)	150 (-1)
3	25 (-1)	10 (+1)	150 (-1)
4	35 (+1)	10 (+1)	150 (-1)
5	25 (-1)	8 (-1)	200 (+1)
6	35 (+1)	8 (-1)	200 (+1)
7	25 (-1)	10 (+1)	200 (+1)
8	35 (+1)	10 (+1)	200 (+1)
9	30 (0)	9 (0)	175 (0)
10	30 (0)	9 (0)	175 (0)
11	30 (0)	9 (0)	175 (0)

Fonte: dados da pesquisa

3.10. Fator de Conversão de Substrato em Biomassa ($Y_{x/s}$) e Produtividade de Biomassa Celular

Os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) de cada processo foram calculados, pela razão entre a diferença de biomassa no início do processo e no final e a diferença de açúcares redutores no início e no final do processo, como representado na Equação 1.

$$Y_{x/s} = -\frac{X_o - X}{S_o - S} \quad (1)$$

Sendo $Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em biomassa; X = concentração de biomassa final (g/L); X_o = concentração de biomassa inicial (g/L); S_o = concentração de açúcares redutores inicial (g/L); S = concentração de açúcares redutores final (g/L).

Já a produtividade dos processos foi calculada com a concentração de biomassa após 24 horas de processo sobre o tempo, o qual foi observado o crescimento máximo da levedura *C. pseudointermedia*, como representado na Equação 2.

$$Q_p = \frac{X}{t} \quad (2)$$

Sendo Q_p = produtividade de células (g/L.h); X = concentração de biomassa após 24 horas de processo (g/L); $t = 24$ h.

3.11. Análise Estatística

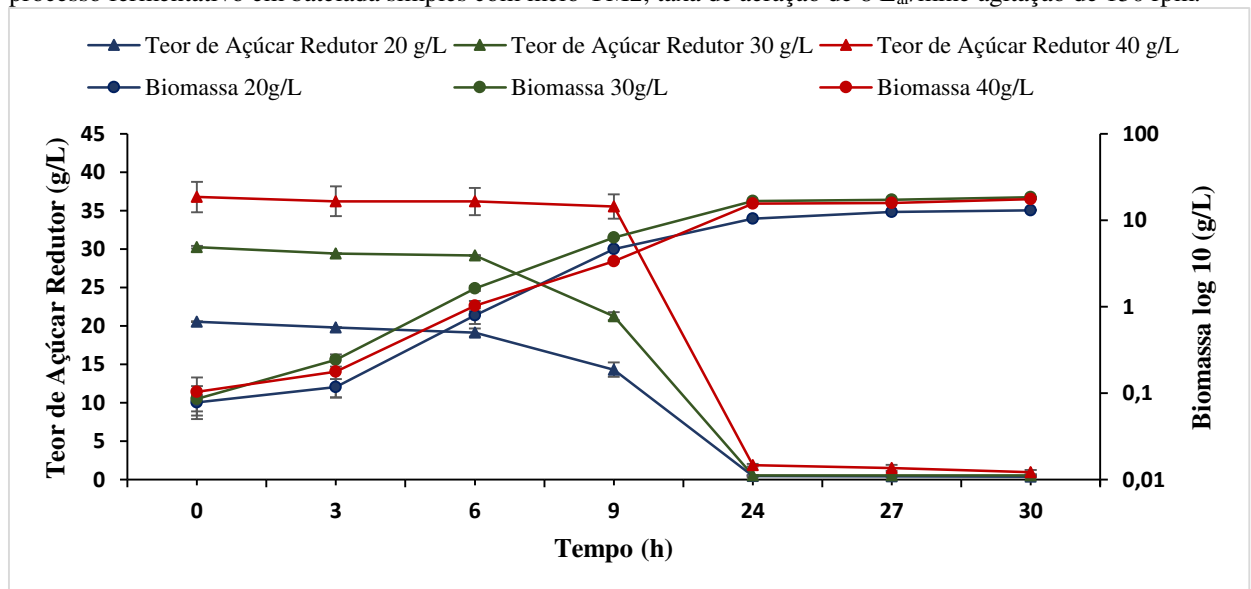
Os resultados de concentração máxima de biomassa, fator de conversão de substrato em biomassa e produtividade foram submetidos a análise de variância e as médias de cada ensaio a um comparativo com um nível de confiança de 90%, consequentemente um α , nível de significância, de 10%. Para essas análises foi utilizado o *software* STATISTICA® versão 10 (Copyright©StatSoft, 1984-2011, EUA).

4.RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Efeito da Concentração de Sacarose sobre a Produção de Biomassa Celular por Processo Fermentativo em Batelada Simples

O efeito da concentração de sacarose hidrolisada sobre a produção de biomassa de *C. pseudointermedia* foi testado no meio YM2 com taxa de aeração de 8 L_{ar}/min e 150 rpm de agitação em batelada simples e os resultados estão mostrados no Gráfico 1. A maior produção de biomassa foi observada quando a concentração da sacarose foi de 30 g/L, alcançando uma concentração de 18,56 g/L de biomassa após 30 horas de processo. O teor de açúcar residual foi de 0,523 g/L representando apenas 1,7% do teor de açúcar inicial do processo. Contudo, a fermentação com a concentração inicial de açúcar de 40 g/L mostrou uma menor produção de biomassa (17,535 g/L) e um maior teor de açúcar residual (0,967 g/L) ao final do processo fermentativo, representando 2,6% do açúcar inicial. No processo, com a menor concentração inicial de sacarose (20 g/L) foi alcançada a concentração de 13,1 g/L de biomassa e 0,3926 g/L de açúcar residual (1,90%).

Gráfico 1 – Efeito da concentração de sacarose hidrolisada sobre o crescimento de *C. pseudointermedia* em processo fermentativo em batelada simples com meio YM2, taxa de aeração de 8 L_{ar}/min e agitação de 150 rpm.



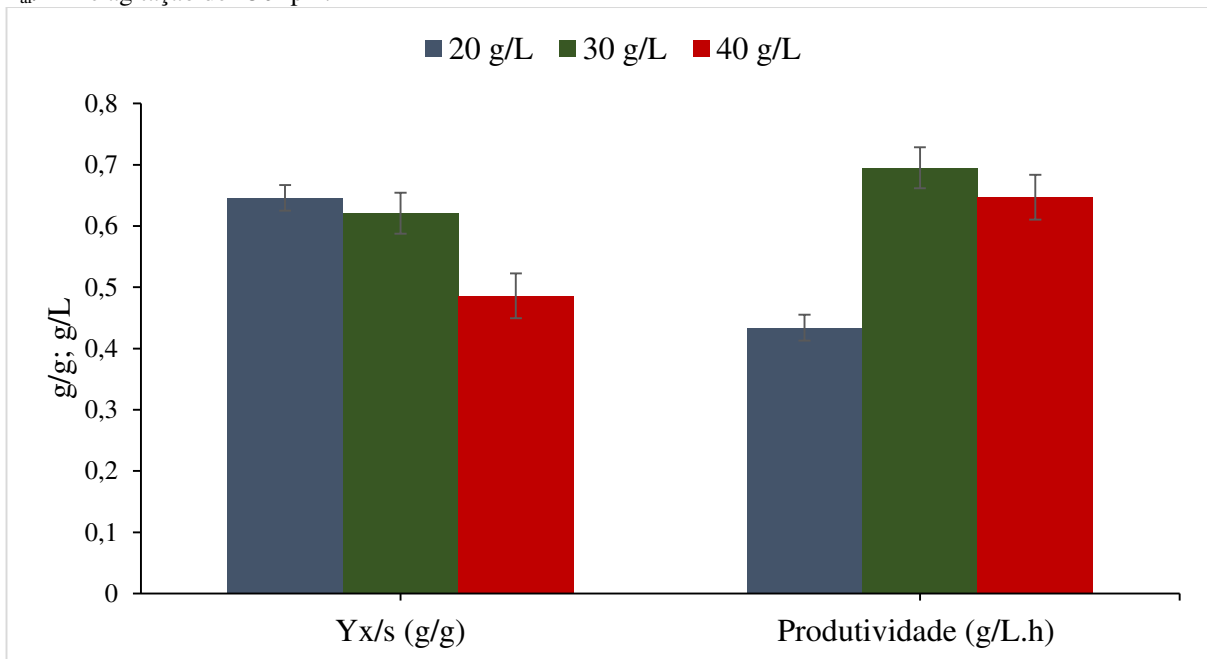
Fonte: dados da pesquisa

Como observado no gráfico, a levedura é inoculada na dorna no início da fase log, permanecendo durante 24 horas do processo. Nessa fase, o microrganismo se encontra em uma situação com o meio favorável ao seu metabolismo, devido ao suprimento de nutrientes acima de suas necessidades (ALTERTHUMM, 2001). Após as 24 horas de processo o microrganismo

entrou na fase estacionária até o final do processo. Sendo essa caracterizada pela diminuição da velocidade específica de crescimento até atingir a fase de morte (ALTERTHUMM, 2001). Na fase estacionária ainda ocorre um aumento de biomassa, porém não significativo para manter o processo, devido aos gastos de manutenção do mesmo.

Nos três processos o crescimento máximo da levedura foi observado no período de 24 horas, decaindo após esse tempo. Com esses dados, pode se calcular a produtividade de cada fermentação, sendo 0,434, 0,695 e 0,647 (g/L.h) na fermentações de 20, 30 e 40 g/L de açúcar inicial, respectivamente. Já os valores dos $Y_{x/s}$ para cada concentração de sacarose foram 0,646, 0,621 e 0,486 (g/g), respectivamente (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Efeito da concentração de sacarose hidrolisada sobre a produtividade de biomassa de *C. pseudointermedia* e $Y_{x/s}$ em processo fermentativo em batelada simples com meio YM2, taxa de aeração de 8 L_{ar}/min e agitação de 150 rpm.



Fonte: dados da pesquisa

A menor biomassa de levedura observada na maior concentração de açúcar pode ser explicada sob o aspecto da deficiência de oxigênio quando o processo alcança alta densidade celular. Segundo Lheningher, Nelson e Cox (2005), a fosforilação oxidativa é o ponto principal do rendimento energético do metabolismo em organismos aeróbicos. As etapas de degradação de carboidratos, lipídios e aminoácidos se dirigem para o ponto final em que a energia gerada é utilizada para a síntese de ATP. A fosforilação oxidativa envolve a redução de O_2 e H_2O com os elétrons doados por NADH e $FADH_2$ produzidos na glicólise e no ciclo de Krebs. Segundo Schmidell (2001), as moléculas de ATP irão participar necessariamente nas reações de síntese

de moléculas, para a sobrevivência das células e para o surgimento de novas células. Assim sendo, um cultivo com elevadas velocidades de crescimento celular, gera uma alta velocidade de consumo de O₂ pela alta densidade celular, acarretando uma maior necessidade de oxigênio dissolvido no meio. Essas considerações tornam óbvia a compreensão sobre a necessidade de se agitar e aerar um meio de cultivo com taxas ideais.

Diante do exposto pode se inferir, que na fermentação com a concentração da fonte de carbono a 40 g/L, as baixas taxas de aeração de 8 L_{ar}/min e agitação de 150 rpm pode ter reprimido a respiração e desviado uma parte do açúcar para a produção de etanol, devido à falta de oxigênio dissolvido no meio para ser utilizado no processo final da respiração celular, diminuindo a produtividade celular após 24 h de processo, sendo acusada pelo odor de álcool durante a fermentação nesse período.

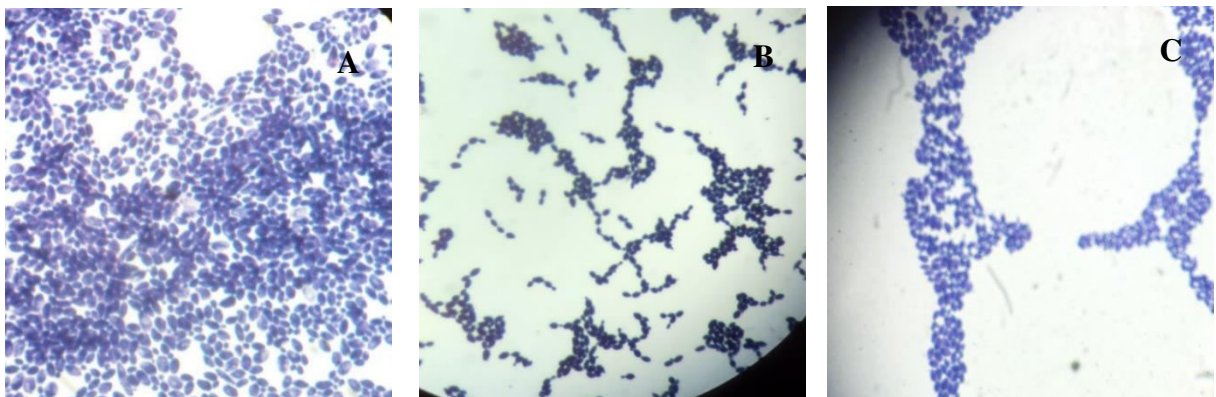
As altas concentrações de glicose, leva a um fluxo elevado da via glicolítica, resultando em altas produções de piruvato e na saturação da piruvato-desidrogenase, além de provocar a inibição de enzimas da via respiratória (FERNANDES, 2008). No estudo de Papanikolaou *et al.* (2017) foi observada que as leveduras *Candida diddensiae*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii* e *Candida oleophila* eram *Crabtree*-positiva, assimilando rapidamente a glicose e convertendo em etanol. *C. oleophila* apresentou uma das mais altas produção de etanol, alcançando 10 g/L e um rendimento de 0,31 g/g de produção de etanol por glicose consumida. Bem como, a *C. tropicalis*, que produziu 9 g/L com um rendimento de 0,27 g/g. Porém, não foi observado esse efeito na *C.pseudointermedia*, pois os fatores de conversão de substrato em biomassa dos processos foram altos para caracterizar um efeito *Crabtree*, podendo inferir que possivelmente a levedura é *Crabtree*-negativa.

No trabalho de Kalhorinia *et al.* (2014), foi produzido 9 g/L de etanol e rendimento de 0,3 g/g em um processo com a fonte de carbono de xilose, temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm e pH 5,5, por *Candida intermedia* MTCC-1404. Apontando, dessa forma, que possivelmente *C.pseudointermedia* tem a capacidade de produzir etanol, devido a sua semelhança com a espécie citada e aos baixos valores atingidos de açúcar residual e um fator de conversão de substrato em biomassa relativamente baixo da fermentação com concentração de sacarose de 40 g/L em comparação aos outros processos.

Durante todas as fermentações descritas anteriormente, segundo a técnica de coloração de Gram, não foi observada presença de contaminantes bacterianos durante o processo. Segundo Nicésio (2011) por possuírem grande quantidade de ácidos teicóicos, após a coloração, as Gram-positivas formam um complexo corado azul intenso, que não é removido facilmente com álcool-acetona. As Gram-negativas não retêm a coloração após o tratamento

com álcool-acetona e são reveladas posteriormente com solução de fucsina ou safranina, apresentando-se na coloração avermelhada. Segundo Moreira, Carvalho e Frota (2015), apesar da coloração de Gram não ser uma técnica eletiva para fungos, as leveduras do gênero *Candida sp.*, *Rodotorula sp.* e *Malassezia sp.* são coradas pelo cristal violeta, assim alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.*, podem se apresentar como Gram-lábeis. Como representado na Figura 3 as células mantiveram uma mesma conformação e coloração, implicando na ausência de contaminantes.

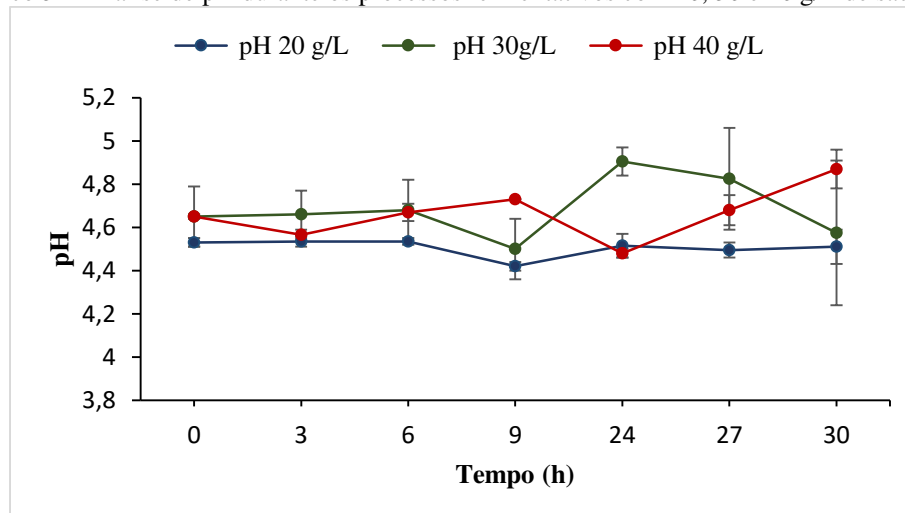
Figura 3 – Coloração de Gram da biomassa de *C. pseudointermedia* presente no processo fermentativo em batelada simples com teores de sacarose de 40g/L (A) após 27 horas, a 30g/L (B) após 6 horas e a 20 g/L após 9 horas.



Fonte: autoria própria (2017)

Como pode ser observado no Gráfico 3 não houve grandes variações de pH durante os processos fermentativos. Isso pode ser atribuído a característica da levedura de não produzir ácidos durante o processo fermentativo (NAKASE; KOMAGATA; FUKAZAWA, 1976).

Gráfico 3 – Análise de pH durante os processos fermentativos com 20, 30 e 40 g/L de sacarose.



Fonte: dados da pesquisa

Devido aos resultados obtidos da concentração de sacarose no meio, constatou-se a necessidade de avaliar as melhores taxas de agitação e aeração para o processo, afim de se obter uma maior produção de biomassa.

4.2. Efeito das taxas de aeração, agitação e concentração de sacarose sobre a biomassa da levedura, $Y_{x/s}$ e produtividade em biomassa

Os resultados obtidos para concentração de biomassa e $Y_{x/s}$ de *C. pseudointermedia* a partir do delineamento experimental para avaliar o efeito das taxas de aeração, agitação e concentração de sacarose em processo fermentativo em batelada simples estão mostrados na Tabela 2. O ensaio que mostrou a maior produção de biomassa foi o 5 com 24,35 g/L, fator de conversão de 1,03 g/g e produtividade de 0,811 g/L.h.

Tabela 2 – Resultados obtidos das variáveis dependentes biomassa, $Y_{x/s}$ e produtividade dos ensaios do Delineamento Experimental.

Ensaio	[Sacarose] (g/L); Aeração (Lar/min); Agitação (rpm)	Biomassa (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Produtividade (g/L.h)
1	25; 8; 150	17,25 ± 1,61	0,781 ± 0,07	0,575 ± 0,05
2	35; 8; 150	17,63 ± 2,12	0,568 ± 0,07	0,587 ± 0,07
3	25;10;150	21,24 ± 0,10	0,939 ± 0,04	0,708 ± 0,03
4	35; 10; 150	23,94 ± 0,05	0,758 ± 0,03	0,798 ± 0,02
5	25; 8; 200	24,35 ± 0,01	1,030 ± 0,03	0,811 ± 0,02
6	35; 8; 200	22,15 ± 1,43	0,701 ± 0,04	0,738 ± 0,05
7	25; 10; 200	17,64 ± 1,00	0,752 ± 0,02	0,588 ± 0,03
8	35; 10; 200	22,30 ± 0,97	0,626 ± 0,09	0,743 ± 0,03
9	30; 9; 175	20,25 ± 1,96	0,709 ± 0,09	0,675 ± 0,06
10	30; 9; 175	20,13 ± 0,81	0,734 ± 0,02	0,671 ± 0,02
11	30; 9; 175	21,26 ± 0,81	0,758 ± 0,02	0,708 ± 0,02

Fonte: dados da pesquisa

Com esses resultados de biomassa, no *software* STATISTICA® versão 10 foram obtidos os efeitos estimados, os valores de t e p-valor a um nível de confiança de 90%, afim de observar a influência de cada variável independente na produção de biomassa do processo. Além de definir os parâmetros ideais para o máximo de produção de levedura *C. pseudointermedia* em processo descontínuo simples. Sendo, esses efeitos da variáveis independentes representados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de t e p-valor e efeitos estimados de biomassa, gerado no *software* STATISTICA® versão 10.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t (2)	p
Média	20,54833	0,357379	57,49738	0,000302
Sacarose (L)	1,38625	0,437698	3,16714	0,086896
Aeração (L)	0,93625	0,437698	2,13903	0,165830
Agitação (L)	1,59375	0,437698	3,64121	0,067839
Sacarose x Aeração	2,29625	0,437698	5,24620	0,034466
Sacarose x Agitação	-0,15125	0,437698	-0,34556	0,762637
Aeração x Agitação	-4,21625	0,437698	-9,63279	0,010606

R² = 0,94; Nível de confiança = 90%; p-valor ≤ 0,10

Fonte: dados da pesquisa.

Foi obtido um coeficiente de determinação (R²) de 0,94, o que se caracteriza como ótimo, mostrando a porcentagem de variação da biomassa em relação as variáveis dependentes significativas. Segundo Khuri e Cornell (1996), quanto maior o R², isto é, quanto mais próximo de 1, menor será o erro e melhor o modelo. Com isso, para essa análise as variáveis que se mostraram significativa para a produção de biomassa foram: interação aeração e agitação, a qual foi a única que se mostrou negativa, interação concentração de sacarose e aeração, agitação e concentração de sacarose inicial.

Com esses efeitos pode-se inferir que aumentando a concentração de sacarose e aeração concomitantemente, você obtém uma maior produção de biomassa. Bem como, a agitação e a concentração de sacarose inicial, de forma independente, geram esse incremento na produção de biomassa.

Esse incremento da biomassa, com o aumento de sacarose, pode ser atribuída a eficiente metabolização da glicose por *Candida sp.* No trabalho de Falanghe (1962, 1964) cita processos baseados no uso de licor sulfítico, resíduo da indústria de papel e celulose, que usam *Candida utilis* e *Candida tropicalis*, que atacam pentoses e outros compostos de carbono e nitrogênio mais que outras leveduras. Segundo Moraes (2001), nos anos 60, hidrocarbonetos residuais pareceram excelentes e disponíveis substratos. *C. lipolytica* e *C. tropicalis* foram

extensivamente estudadas e, realmente, o desempenho de ambas foi muito bom. Já a variável agitação possui esse efeito positivo devido a uma eficiência maior na transferência de oxigênio para o meio.

Na interação concentração de açúcar e aeração, esse efeito positivo, deve-se a uma quantidade adequada de oxigênio para uma eficiente metabolização da quantidade de açúcar presente no meio de acordo com a respiração da levedura. Contudo, na interação agitação e aeração o efeito foi negativo, quanto menor esses dois parâmetros associados maior será os valores de biomassa do processo. Altas taxas de agitação e aeração, pode tornar o meio muito turbulento, dificultando a transferência de nutrientes ao microrganismo. Segundo Scartazzini (2001), o grau de agitação requerido para a transferência de oxigênio causa, em muitos casos, danos aos microrganismos devido ao alto grau de cisalhamento do agitador e aerador. Uma região de alto cisalhamento existe perto do agitador ou aerador, o qual decresce com o aumento da distância dos mesmos. A falta de uniformidade na área de cisalhamento expõe os microrganismos a uma variação de meio ambiente e de áreas de estresse o qual pode afetá-los adversamente.

Pelo Statistica, foi realizado, também, uma análise de variância (ANOVA) para os resultados de biomassa, representado na Tabela 4. O F calculado para a regressão foi quase dez vezes maior que o F tabelado, evidenciando que o modelo foi significativo a um nível de confiança de 90%, sendo esse bem ajustado para os resultados obtidos de biomassa. Segundo Box e Wetz (1973) para uma regressão ser significativa não apenas estatisticamente, mas também ser útil para fins preditivos, o valor de F calculado para a regressão deve ser no mínimo quatro a cinco vezes maior que o valor de F tabelado. Também, não houve falta de ajuste, pois o F calculado foi menor que o F tabelado, como evidenciado por Box e Wetz (1973), que o F da falta de ajuste em relação ao erro puro, pelo contrário, deve apresentar o menor valor possível, pois um alto F indica que há uma grande falta de ajuste dos dados ao modelo obtido.

Tabela 4 – Análise de Variância para a produção de biomassa da levedura.

Fontes de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	56,97727	7	56,97727	51,22174246	5,266195
Resíduo	3,33709	3	1,11236		
Falta de ajuste	2,57078	1	2,57078	6,709440723	8,526316
Erro puro	0,76632	2	0,38316		
Total	63,65145958	13			

$R^2 = 0,94$

Fonte: dados da pesquisa.

Da mesma forma, foi realizado o estudo dos efeitos estimados, e os valores de t e p-valor a um nível de confiança de 90 %, com o intuito de avaliar a influência das variáveis independentes sobre a produtividade em biomassa do processo, representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de t e p-valor e efeitos estimados de produtividade em biomassa, gerado no *software* STATISTICA® versão 10.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t (2)	p
Média	0,684667	0,011724	58,40037	0,000293
Sacarose (L)	0,046000	0,014359	3,20368	0,085169
Aeração (L)	0,031500	0,014359	2,19382	0,159502
Agitação (L)	0,053000	0,014359	3,69119	0,066191
Sacarose x Aeração	0,076500	0,014359	5,32785	0,033470
Sacarose x Agitação	-0,005000	0,014359	-0,34823	0,760909
Aeração x Agitação	-0,140500	0,014359	-9,78514	0,010283

$R^2 = 0,94$; Nível de confiança = 90%; p-valor $\leq 0,10$

Fonte: dados da pesquisa.

Como esperado os efeitos estimados para produtividade se comportou da mesma maneira que a produção de biomassa. Sendo significativo para sacarose, agitação, sacarose x aeração e aeração x agitação, como apontado na tabela.

Tabela 6 – Análise de Variância para a produtividade em biomassa da levedura.

Fontes de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	0,06324	7	0,06324	52,1782	5,266195
Resíduo	0,003637	3	0,001212		
Falta de ajuste	0,002812	1	0,002812	6,820937753	8,526316
Erro puro	0,000825	2	0,000412		
Total	0,070514333	13			

$R^2 = 0,94$

Fonte: dados da pesquisa.

Pelo Statistica, foi realizado, também, uma análise de variância (ANOVA) para os resultados de produtividade em biomassa, representado na tabela 6. O F calculado para a regressão foi quase dez vezes maior que o F tabelado, evidenciando que o modelo foi significativo a um nível de confiança de 90%, sendo esse bem ajustado para os resultados obtidos. Também, não houve falta de ajuste, pois o F calculado foi menor que o F tabelado.

Para o fator de conversão de substrato em biomassa, foram obtidos os feitos estimados, e os valores de t e p-valor a um nível de confiança de 90%, afim de observar a influência de cada variável independente no consumo de substrato convertido em produção de biomassa. Sendo, esses representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de t e p-valor e efeitos estimados de Y_x/s , gerado no *software* STATISTICA® versão 10.

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t (2)	p
Média	0,733667	0,014146	51,8637	0,000372
Sacarose (L)	-0,212325	0,017325	-12,2552	0,006592
Aeração (L)	-0,001325	0,017325	-0,0765	0,946001
Agitação (L)	0,015675	0,017325	0,9047	0,461095
Sacarose x Aeração	0,058825	0,017325	3,3953	0,076875
Sacarose x Agitação	-0,015175	0,017325	-0,8759	0,473463
Aeração x Agitação	-0,175175	0,017325	-10,1109	0,009641

$R^2 = 0,97$; Nível de confiança = 90%; p-valor $\leq 0,10$

Fonte: dados da pesquisa.

Desses dados, foi obtido um R^2 de 0,97, o que se caracteriza como ótimo, com um valor maior que o gerado pela análise de biomassa, representando a porcentagem de variação de substrato convertido em células de levedura em relação as variáveis independentes significativas. Dessa forma, as variáveis independentes, que se mostraram significativas para o

processo foram concentração de sacarose e a interação de aeração e agitação, gerando um efeito negativo para essa conversão e a interação concentração de sacarose e aeração de forma positiva para essa variável dependente.

Com esses efeitos pode-se inferir que aumentando a concentração de sacarose e aeração concomitantemente, você obtém uma eficiente conversão do substrato em biomassa. Porém, altas concentrações de açúcar inicial podem ser prejudicial para essa conversão. Bem como, altas taxas de aeração e agitação associadas, dificulta a transferência dessa fonte de carbono para a célula e conseqüentemente a produção de biomassa.

Segundo Schimidell (2001) conclui-se, portanto, que de nada adiantaria dissolver centenas de gramas de glicose por litro, além das quantidades necessárias dos demais nutrientes, para que se imaginasse efetuar um processo fermentativo descontínuo aeróbio, sem que se imaginasse igualmente introduzir, ao longo do processo, o oxigênio necessário para suportar a condição de aerobiose, tendo em vista a baixíssima capacidade de armazenar o O_2 na solução. Essa afirmação explica o efeito negativo da variável independente concentração de sacarose inicial e o efeito positivo da aeração associado a concentração inicial de sacarose, favorecendo a conversão de substrato em biomassa. Como foi explicado acima e fortalecendo essa hipótese, altas taxas de agitação e aeração torna o ambiente desfavorável para a transferência desse substrato para as células da levedura.

Da mesma forma que a biomassa foi realizado uma ANOVA para os resultados de Yx/s , representado na Tabela 8. O F calculado para a regressão foi quase vinte vezes maior que o F tabelado, evidenciando que o modelo foi significativo a um nível de confiança de 90%, sendo esse bem ajustado para os resultados obtidos de Yx/s . Também, não houve falta de ajuste, pois o F calculado foi menor que o F tabelado, indicando que a estimativa de variância é correta.

Tabela 8 – Análise de Variância para o fator de conversão de substrato em biomassa.

Fontes de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	0,1622	7	0,1622	100,4753704	5,266195
Resíduo	0,004843	3	0,001614		
Falta de ajuste	0,003642	1	0,003642	6,067148112	8,526316
Erro puro	0,001201	2	0,000600		
Total	0,171885956	13			

$R^2 = 0,97$

Fonte: dados da pesquisa.

Com os resultados pode-se definir as condições de processos que possuem uma maior produção de biomassa, podendo ser utilizado para realizar estudos em reatores de escala maior, para alta produção de *Candida pseudointermedia*. Além de estudos em escala de campo para sua aplicação como agente de controle biológico.

5.CONCLUSÃO

As melhores condições de produção da levedura *Candida pseudointermedia* foram: concentração de sacarose no meio de 25 g/L, taxa de aeração de 8 L_{ar}/min e taxa de agitação de 200 rpm, produzindo 24,35 g/L de biomassa da levedura, com uma produtividade de 0,811 g/L.h e um fator de conversão de substrato em biomassa de 1,03 g/g. Altas concentrações de sacarose hidrolisada no meio inibem o crescimento da levedura, bem como, altas taxas de agitação e aeração.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. G.; PETERSEN, P.; CORDEIRO, A. **Crise socioambiental e conversão ecológica da agricultura brasileira**. Rio de Janeiro: AS-PTA. 122p., 2001.

ALTERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. *In*: BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial volume 1**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. Cap.1, p. 1-32.

AQUILLA, T. The Biochemistry of Yeast- Debunking the Myth of Yeast Respiration and Putting Oxygen in Its Proper Place. **Magazine Brewing Techniques**, Estados Unidos: Cottage Grove, v.5, n. 2, 2013.

BARKAI-GOLAN, R. Postharvest disease initiation. *In*:_____. **Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and control**. 1. ed. Estados Unidos: Elsevier Science, 2001. Cap.2, p. 3-24.

BATISTA, D. C. *et al.* Manejo Integrado de *Lasiodiplodia theobromae* em Videira no Submédio do Vale do São Francisco. **Circular Técnico 91 Embrapa Semiárido**. Petrolina, 2010.

BEGEA, M. *et al.* Single-cell protein production of *Candida* strains in culture media based on vegetal oils. **Romanian Biotechnological Letters**, v.17, n.6, p.7776-7786, 2012.

BELING, R. R. (Ed.). **Anuário Brasileiro da Fruticultura: Brazilian Fruit Yearbook 2015**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 104p.

BLACKWELL, M. *et al.* **Saccharomycotina.Saccharomycetales**. Estados Unidos, 2009. Disponível em <<http://tolweb.org/Saccharomycetales/29043> >. Acesso em: 18 abr. 2017.

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.

CANDIDO, R. C. *et al.* Diferenciação de cepas de *Candida albicans* pelo sistema killer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.I.], v.28, n. 4, p. 321-324, 1995.

CARDOSO, J. E. *et al.* Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n. 4, 2009.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Semicontínua. *In*: SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial volume 2**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. Cap.11, p. 193-204.

CARVALHO, N. L. Resistência Genética Induzida em Plantas Cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v.7, n. 7, p. 1379-1390, 2012.

CHOUDHURY, M. M. **Doenças pós-colheita**. Embrapa Brasília, [20--]. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

CIA, P. **Doenças de pós-colheita em frutas (caqui, maracujá-doce e nêspera)**. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Hortifrutícola, São Paulo, 2002.

COSTA, A. L. **Reino Fungi**. [S.I.]: 2009. Disponível em <<http://florabrasilienses.blogspot.com.br>>. Acesso em: 17 abr. 2017.

CROCOMO, O. J.; GUTIERREZ, L. E. Caminhos Metabólicos. *In*: BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial volume 1**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. cap.6, p. 177-196.

DHANASEKARAN, D. *et al.* Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.8, p.26-32, 2011.

DIAS, P. P. **Controle biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição no crescimento de plantas**. 2011. 101f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

DUARTE, M. **Parasitismo**. [S.I.]: 2016. Disponível em <<https://www.todamateria.com.br/parasitismo/>>. Acesso em: 23 abr. 2017.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological Control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. **Phytopathology**, v.88, p.282-291, 1998.

EL-NESHAWY, S. M., WILSON, C. L. Nisin enhancement of biocontrol of postharvest diseases of apple with *Candida oleophila*. **Postharvest Biology and Technology** v.10, n. 1, p.9 -14, 1997.

FALANGHE, H. Production of fungal mycelial protein in submerged culture of soybean whey. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin: Springer, v.12, p330-334, 1964.

FALANGHE, H. Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vinasse. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin: Springer, v.10, p.572-576, 1962.

FERNANDES, A.P.F.V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membranas plasmática**. 2008. 177f. Tese (Doutorado em Biologia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

FREIRE, F.C.O. *et al.* Novos Hospedeiros do Fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. 1 ed. **Comunicado Técnico 91 Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, 2004.

GANCEDO, J.M.; Carbon catabolite repression in yeast. **European Journal Biochemistry**, Madrid: Springer, v.206, p.297-313, 1992.

GOLAGHAIEE, S.; ARDESTANI, F.; GHORBANI, H. R. Microbial protein production from *Candida tropicalis* ATCC13803 in a submerged batch fermentation process. **Applied food biotechnology**, v.4, n.1, p.35-42, 2017

HEWITT, H. G. Fungicide Performance *In:_____*. **Fungicides in crop protection**. CAB International, 1998.cap. 4. p. 87- 153.

KALHORINIA, S.; GOLI, J. K.; RAO, L. V. Screening and Parameters Optimization of Pentose Fermenting Yeasts for Ethanol Production using Simulated Media. **Biosciences Biotechnology Research Asia**. v.11, p.641- 648, 2014.

KHURI, A. I.; CORNELL, J. A. **Response surface: design and analyses**. 2 ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1996.

LACERDA, V (Ed.). Doenças pós-colheita de frutas. **Informe Agropecuário Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**, v.26, n. 228-2005, p. 56-62, 2005.

LAY-ANG, G. **Amensalismo**, [S.I.]: [20--]. Disponível em <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/amensalismo.htm>>. Acesso em: 23 abr. 2017.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Ciclo do Ácido Cítrico. *In:_____*. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 4ºed. Nova Iorque: Editora: W.H. Freeman, 2005. cap.16. p.601-630.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação Oxidativa e Fotofosforilação. *In:_____*. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 4ºed. Nova Iorque: Editora: W.H. Freeman, 2005. cap.19. p.690-750.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Glicólise, Gliconeogênese e via das pentoses fosfato. *In:_____*. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 4ºed. Nova Iorque: Editora: W.H. Freeman, 2005. cap.14. p.521-559.

LILLY, M. D. Production of intracellular Microbial Enzymes. *In: Lemuel B. Wingard, Ichiro Chibata eds. Applied Biochemistry and Bioengineering*. New York: Academic Press, v.2, 1979.

LUCERO, P.; MOREO, E.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the sugar transporters in *Saccharomyces cerevisiae* is inhibited by the presence of a nitrogen source. **FEMS yeast research**, Amsterdam, v.1, p.307-314, 2002.

MORAES, I.O. Produção de Microrganismos. *In: LIMA, U. A. et al. Biotecnologia Industrial volume 3*. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. cap.9, p. 199-217.

MOREIRA, G. A. M. Levedura associadas às flores de plantas do cerrado. *In: XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental*, 2014, João Pessoa. **Anais do XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental**. João Pessoa, 2014. p.82-1.

MOREIRA, J. L. B.; CARVALHO, C. B. M.; FROTA, C. C. Colorações. *In:_____*. **Visualização bacteriana e colorações**. Fortaleza: Editora Imprensa Universitária, 2015. cap.2, p. 27-61.

NAJAFPOUR,G.D. Dissolved Oxygen Measurement and Mixing. *In:_____*. **Biochemical Engineering and Biotecnology**. 1. ed. Estados Unidos: Elsevier, 2007. cap.2, p. 14-21.

NAJAFPOUR, G.D. Industrial Microbiology. *In: _____*. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1ª edição. Estados Unidos: Elsevier, 2007. cap.1, p. 1-13.

NAKASE, T.; KOMAGATA, K.; FUKAZAWA, Y. *Candida pseudointermedia* sp. Nov., isolated from “kamaboko”, a traditional fish-paste product in Japan. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 22, p. 177-182, 1976.

NEVES, R. **Respiração Celular aeróbica e fermentação**. Rio de Janeiro: [2013?]. Disponível em < <http://educacao.globo.com/biologia/assunto/fisiologia-celular/respiracao-celular-aerobica-e-fermentacao.html>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

NICÉSIO, R. G. **Coloração de Gram**. [S.l.], 2011. Disponível em < <http://www.biomedicinabrasil.com/2011/06/coloracao-de-gram.html>>. Acesso em: 15 maio 2017.

OLIVEIRA, M. Z. A. *et al.* Fungo *Lasiodiplodia theobromae*: um problema para a agricultura baiana. **Bahia Agrícola**, v. 9, n.2, p. 24-29, 2013

OLIVEIRA, R. **A bioquímica da fermentação**. Mato Grosso, 2010. Disponível em < <http://bioecoliveira.blogspot.com.br/2010/06/fermentacao-fermentacao-e-um-conjunto.html>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

PAPANIKOLAOU, S. *et al.* Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n.3, p. 262-281, 2017.

PARISI, M. C. M.; HENRIQUE, C. M.; PRATI, P. Doenças pós-colheita: um entrave na comercialização. **Pesquisa & Tecnologia**, Piracicaba, v.12, n. 2, jul-dez 2015.

PASCHOLATI, S. F.; MELO, T. A.; DALIO, R. J. D. Proteção de Plantas. **Revista Visão Agrícola**, São Paulo, n.13, p. 110-112, 2015.

PEREIRA, C. A. *et al.* Seleção de isolados de leveduras para o controle biológico de podridão pós-colheita de manga causada por *Lasiodiplodia theobromae*. *In: XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, 2011, Bento Gonçalves. **Anais XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Bento Gonçalves, 2011. p.1289.

PONZZES, C. M. P. B. S. *et al.* Caracterização do fator killer em leveduras selvagens isoladas durante o processo fermentativo de vinhos tropicais no Brasil. *In: XI Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia*, 2007, Mendoza. **Anais XI Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia**. Mendoza, 2007. p. 1-5.

PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to Botryodiplodia theobromae**. Vaduz: Pat. J. Cramer, 123p. 1980.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R. Fungicidas: aspectos gerais. **Revista Plantio Direto**. Passo Fundo RS: Aldeia Norte Editora, edição 97, jan./fev. 2007. Disponível em <http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=777>. Acesso em: 23 abr. 2017.

- RUIVO, C. C. C. **Ocorrência de leveduras em espécies vegetais nativas da mata atlântica, parque estadual da serra do mar – núcleo picinguaba, São Paulo.** 2005. 80f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
- SANTIN, R. C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. E *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incógnita* em *Phaseolus vulgaris*.** 2008. 82f. Tese (Doutorado em Fitotecnia Área de Concentração Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- SANTOS, L. A *et al.* Controle biológico e promoção de crescimento das plantas. **Revista Campo e Negócios Grãos.** Minas Gerais: Agro Comunicação, jul. de 2015.
- SCARTAZZINI, L.S. **Utilização do Biorreator *Airlift* na pré-fermentação do mosto de uva.** 2001. 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. *In:* SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial volume 2.** São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. cap.8, p. 179-192.
- SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. *In:* SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial volume 2.** São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. cap.2, p. 5-18.
- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). **Agronegócio Fruticultura.** Rio Grande do Sul, 2015.
- SILVA, A. M.; VIECELLI, M.P.; TERAPO, D. Estudo de Mecanismos usados por leveduras no biocontrole de fitopatógenos causadores de doenças pós-colheita de frutas. *In:* 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, n.14411, 2014, Campinas. **Anais do 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica.** Campinas, 2014. p. 1-7.
- SILVA, J. A. *et al.* Biocontrole in vitro de *Lasiodyplodia theobromae* por isolados de *Trichoderma* sp. *In:* III Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, v.2, n.1, 2015, Altas Floresta. **Anais do III Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos.** Altas Floresta: Cáceres, 2015. p.444-449.
- STANGARLIN, J. R. *et al.* A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Paraná, v.10, n. 1-2011, p. 18-46, 2010.
- TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* – situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.46-52. 2002.
- TEIXEIRA, R. A. **Mecanismos de Resistência a Fitodoeças.** 2011. 25f. Revisão Bibliográfica (Disciplina de Seminário)- Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

TERAO, D. *et al.* Estratégias de Controle de Podridões em Pós-Colheita de Melão: uma Revisão. 1º edição. **Documento 112 Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza: Embrapa, 2008.

VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J.E.; FREIRE, F.C.O. **Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc)**. [S.I.]: [20--]. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fielsfi902wyiv80z4s473ewtp564.html>>. Acesso em: 21 abr. 2017.

YÖNTEN, V.; AKTAS, N. Exploring the optimum conditions for maximizing the microbial growth of *Candida intermedia* by response surface methodology. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.44, n.1, p.26-39, 2013.

ZAMBELLI, R. A. **Fermentação Contínua e Fermentação Descontínua**. 2010. 25f. Revisão Bibliográfica (Disciplina de Enzimologia e Tecnologia Das Fermentações) - Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.