



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DO SORO DE QUEIJO PARA OBTENÇÃO DE RIBONUCLEOTÍDEOS

Autor: RODENEI OGRODOWSKI

Orientador: PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

Tese a ser apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutorado em Engenharia de alimentos.

Campinas, fevereiro 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Og7p	Ogrodowski, Rodenei Produção de biomassa a partir do soro de queijo para obtenção de ribonucleotídeos / Rodenei Ogrodowski. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006. Orientador: Ranulfo Monte Alegre Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1 Soro de queijo. 2. Kluyveromyces marxianus. 3. Ribonucleotídeos. 4. Biomassa. 5. Fermentação. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.
------	---

(cars/fea)

Título em inglês: Production of biomass by whey to ribonucleotides obtention

Palavras-chave em inglês (Keywords): Whey, Kluyveromyces marxianus, Ribonucleotides
Biomass, Fermentation

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Ranulfo Monte Alegre

Jorge Alberto Vieira da Costa

Lucia Regina Durrant

Deise Maria Fontana Capalbo

Marta Cristina Teixeira Duarte

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
Membro

Profa. Dra. Deise Maria Fontana Capalbo
Membro

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
Membro

Prof. Dr. Romildo Martins Sampaio
Membro

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Membro

Que Deus nos dê a serenidade de aceitar o que não se pode mudar,
coragem de mudar o que pudermos e a sabedoria de conhecer a
diferença.

Às pessoas que não esqueceram e que também sentiram a mesma
ansiedade que agora experimento; e que, na difícil arte de ensinar me
induziram à dúvida ao invés da certeza, à crítica ao invés da passividade,
e me levaram além da teoria, meu carinho e minha gratidão.

Aos meus pais Henrique e Clara
Aos meus irmãos Wanderlei, Rosane, Rosangela,
Jucimar e Zenir
Aos meus sogros Raymundo e Lecy
Obrigado por terem acreditado no meu ideal,
Na minha utopia, no meu mundo de sonhos.
Por terem escutado as minhas constantes angústias,
Alegrias e decepções, sempre como se fosse a última vez.
Por terem acreditado que chegaria ao final por
Acreditarem que ainda chegarei a ser mais do que sonhei.

À Chris, minha esposa companheira de todos
os momentos, pelo amor, carinho, paciência,
confiança, ajuda e por me dar forças para
vencer.....

Agradecimentos

À Deus, pela iluminação e presença constante em minha vida.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela orientação, amizade, confiança e incentivo durante este trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que me proporcionou conhecimento e crescimento profissional.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos Dani, Eli, Rodrigo, Mylene, Lucielen, Bia, Machadinho, Tati, Hélio e Rafael, pelo ambiente saudável, festas, rodada de chimarrão, churrascos descontraídos...e principalmente a amizade.

Se nós soubéssemos o que o amanhã traria, não precisaríamos de nossos sonhos, esperanças e planos. Mas o amanhã é uma pergunta sem resposta, um novo desafio para enfrentar, uma nova aventura para ousar.

Se Deus nos amou antes que o tempo fosse tempo, é para que aproveitemos o tempo com urgência de amar.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1- INTRODUÇÃO	17
2- OBJETIVOS	19
2.1- GERAL	19
2.2- ESPECÍFICOS.....	19
3- JUSTIFICATIVA.....	21
4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
4.1- PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE RIBONUCLEOTÍDEOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSA	28
4.1.1- Processos para extração e tratamentos enzimático do RNA.....	30
4.1.2- Produção	32
4.2- APLICAÇÕES E USOS	36
4.3- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	38
5- MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1- MEIOS DE CULTURA E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	41
5.1.1- Microrganismos	41
5.1.2- Soro de queijo desidratado (SQD).....	41
5.1.3- Manutenção das culturas estoque	41
5.2- MEIO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....	42
5.2.1- Inóculo	42
5.2.2- Produção de biomassa em frascos Erlenmeyer.....	42
5.2.2.1- <i>Seleção das Variáveis Importantes do Processo</i>	43
5.2.2.2- <i>Determinação da Relação entre as Principais Variáveis e seus Melhores Níveis</i>	45
5.2.3- Produção de biomassa em fermentador de bancada	45
5.2.3.1- <i>Influência do controle do pH na produção de biomassa em fermentação convencional para K. marxianus</i>	46
5.2.3.2- <i>Influência da concentração de substrato na produção de biomassa em fermentação por batelada alimentada para K. marxianus</i>	46
5.2.4- Autólise celular.....	46
5.2.5- Tratamento enzimático e térmico	48
5.3- MÉTODOS ANALÍTICOS.....	48
5.3.1- Determinação de massa celular seca (MCS)	48
5.3.2- Determinação da concentração de lactose	49
5.3.3- Quantificação dos Ribonucleotídeos	49
6- RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

6.1- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NO SORO DE QUEIJO.....	51
6.2- PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNA E ESCURECIMENTO DO MEIO.....	51
6.3- VARIAÇÃO DO VALOR DO PH DO MEIO DURANTE A ESTERILIZAÇÃO	52
6.4- PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FRASCOS ERLLENMEYER	53
6.4.1- Seleção das variáveis mais importantes do processo e seus efeitos sobre a produção de biomassa.....	53
6.4.1.1- <i>Candida utilis</i> CCT3469.....	53
6.4.1.1.1- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>C. utilis</i> CCT3469 em 24h.....	55
6.4.1.1.2- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>C. utilis</i> CCT3469 em 48h.....	57
6.4.1.2- <i>Bacillus subtilis</i> CCT0534.....	59
6.4.1.2.1- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>B. subtilis</i> CCT0534 em 24h	60
6.4.1.2.2- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>B. subtilis</i> CCT0534 em 48h	62
6.4.1.3- <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT4294.....	64
6.4.1.3.1- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>K. marxianus</i> CCT4294 em 24h.....	65
6.4.1.3.2- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>K. marxianus</i> CCT4294 em 48h.....	67
6.4.1.4- <i>Candida sp</i>	69
6.4.1.4.1- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>Candida sp</i> em 24h.....	70
6.4.1.4.2- Interpretação dos resultados do cultivo de <i>Candida sp</i> em 48h.....	72
6.4.1.5- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
6.4.2- Determinação dos melhores níveis das variáveis operacionais do processo de produção de biomassa.....	76
6.4.2.1- <i>Bacillus subtilis</i> CCT0534.....	76
6.4.2.2- <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT4294 (28°).....	80
6.4.2.3- <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT4294 (35°C)	85
6.4.2.4- <i>Candida sp</i> (28°C).....	89
6.4.2.5- <i>Candida sp</i> (35°C).....	93
6.5- QUANTIFICAÇÃO DOS RIBONUCLEOTÍDEOS	97
6.5.1- Curva padrão	97
6.5.2- Processo de autólise.....	99
6.5.3- Processo de tratamento enzimático e térmico.....	107
6.6- PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FERMENTADOR DE BANCADA.....	109
6.6.1- Fermentação batelada convencional	109
6.6.1.1- Sem controle de pH	109
6.6.1.2- Com controle de pH	111
6.6.2- Fermentação batelada alimentada.....	113
7- CONCLUSÕES.....	117
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1: Composição do soro de queijo.....	25
Tabela 5.1: Composição do meio para crescimento da <i>S. cerevisiae</i>	42
Tabela 5.2: Composição do meio de fermentação.....	43
Tabela 5.3: Matriz do planejamento Plackett Burman para 16 ensaios.....	44
Tabela 5.4: Níveis das variáveis do planejamento Plackett Burman não saturado.....	45
Tabela 5.5: Matriz do planejamento fatorial completo 2 ²	47
Tabela 5.6: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2 ²	47
Tabela 6.1: Valores de massa celular seca (g.L ⁻¹) de <i>Candida utilis</i> CCT3469 em 24 e 48h de fermentação.	54
Tabela 6.2: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>C. utilis</i> CCT3469 para 24h de cultivo.	55
Tabela 6.3: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>C. utilis</i> CCT3469 para 48h de cultivo.	57
Tabela 6.4: Valores de massa celular seca (g.L ⁻¹) de <i>B. subtilis</i> CCT0534 em 24 e 48h de fermentação.	59
Tabela 6.5: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>B. subtilis</i> CCT0534 para 24h de cultivo.	60
Tabela 6.6: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>B. subtilis</i> CCT0534 para 48h de cultivo.	62
Tabela 6.7: Valores de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) e pH de <i>K. marxianus</i> CCT4294 em 24 e 48h de fermentação.	64
Tabela 6.8: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>K. marxianus</i> CCT4294 para 24h de cultivo.	65
Tabela 6.9: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>K. marxianus</i> CCT4294 para 48h de cultivo.	67
Tabela 6.10: Valores de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) de <i>Candida</i> sp em 24 e 48h de fermentação.	69
Tabela 6.11: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>Candida</i> sp para 24h de cultivo.	70
Tabela 6.12: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de <i>Candida</i> sp para 48h de cultivo.	72
Tabela 6.13: Valores de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) e pH de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 24 e 48h de fermentação.	74
Tabela 6.14: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para o <i>B. subtilis</i> CCT0534.	77
Tabela 6.15: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para o <i>B. subtilis</i> CCT0534.	77

Tabela 6.16: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca do <i>B. subtilis</i> CCT0534.	78
Tabela 6.17: Análise de variância das respostas de massa celular seca para o <i>B. subtilis</i> CCT0534... ..	78
Tabela 6.18: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a <i>K. marxianus</i> CCT4294. (28°C)	81
Tabela 6.19: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a <i>K. marxianus</i> CCT4294. (28°C)	81
Tabela 6.20: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da <i>K. marxianus</i> CCT4294 (28°C).	82
Tabela 6.21: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a <i>K. marxianus</i> CCT4294. (28°C)	82
Tabela 6.22: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a <i>K. marxianus</i> CCT4294. (35°C)	85
Tabela 6.23: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a <i>K. marxianus</i> CCT4294. (35°C)	86
Tabela 6.24: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da <i>K. marxianus</i> CCT4294 (35°C).	86
Tabela 6.25: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a <i>K. marxianus</i> CCT4294. (35°C)	87
Tabela 6.26: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a <i>Candida</i> sp. (28°C)	89
Tabela 6.27: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a <i>Candida</i> sp. (28°C)	90
Tabela 6.28: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da <i>Candida</i> sp (28°C).	90
Tabela 6.29: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a <i>Candida</i> sp. (28°C).....	91
Tabela 6.30: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a <i>Candida</i> sp. (35°C)	93
Tabela 6.31: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L ⁻¹) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a <i>Candida</i> sp. (35°C)	93
Tabela 6.32: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da <i>Candida</i> sp (35°C).	94
Tabela 6.33: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a <i>Candida</i> sp. (35°C).....	94
Tabela 6.34: Curva padrão de quantificação de RNA pelo método do Orcinol	98
Tabela 6.35: Concentração (µg.mL ⁻¹) e rendimento (mgRNA.g ⁻¹ MCS) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2 ² para o tempo de autólise de 6h.	100
Tabela 6.36: Efeitos estimados para a resposta rendimento de RNA para o tempo de autólise de 6h.	100

Tabela 6.37: Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e rendimento ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para o tempo de autólise de 12h.	101
Tabela 6.38: Efeitos estimados para a resposta rendimento de RNA para o tempo de autólise de 12h.	102
Tabela 6.39: Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e rendimento ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para o tempo de autólise de 18h.	103
Tabela 6.40: Efeitos estimados para a resposta rendimento de RNA para o tempo de autólise de 18h.	103
Tabela 6.41: Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e rendimento ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para o tempo de autólise de 24h.	104
Tabela 6.42: Efeitos estimados para a resposta de rendimento de RNA para o tempo de autólise de 24h.	105
Tabela 6.43: Concentração e rendimento de RNA obtidos do tratamento com a enzima fosfodiesterase nos tempos de 2, 4 e 6h.	108
Tabela 6.44: Concentração e rendimento de RNA obtidos do tratamento com a enzima 5'-ácido adenílico deaminase nos tempos de 2, 4 e 6h.	108
Tabela 6.45: Concentração de massa celular seca – MCS.....	110
Tabela 6.46: Concentrações de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e de lactose (g.L^{-1}) de fermentação tipo batelada em fermentador de bancada com pH constante em 6,5 para a <i>K. marxianus</i> CCT4294.	112
Tabela 6.47: Concentrações de massa celular seca –MCS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 6.1: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>C. utilis</i> CCT3469 para 24h de cultivo.....	56
Figura 6.2: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>C. utilis</i> CCT3469 para 48h de cultivo.....	58
Figura 6.3: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>B. subtilis</i> CCT0534 para 24h de cultivo.	61
Figura 6.4: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>B. subtilis</i> CCT0534 para 48h de cultivo	63
Figura 6.5: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>K. marxianus</i> CCT4294 para 24h de cultivo.....	66
Figura 6.6: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>K. marxianus</i> CCT4294 para 48h de cultivo.....	68
Figura 6.7: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>Candida</i> sp para 24h de cultivo.....	71
Figura 6.8: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de <i>Candida</i> sp para 48h de cultivo.....	73
Figura 6.9: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de SQD para o <i>B. subtilis</i> CCT0534 em 24h de fermentação.	80
Figura 6.10: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de SQD para a <i>K. marxianus</i> CCT4294 em 24h de fermentação a 28°C.....	84
Figura 6.11: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de SQD para a <i>K. marxianus</i> CCT4294 em 24h de fermentação a 35°C.....	88
Figura 6.12: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ para a <i>Candida</i> sp em 48h de fermentação a 28°C.	92
Figura 6.13: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de (NH ₄) ₂ SO ₄ para a <i>Candida</i> sp em 48h de fermentação a 35°C.	95
Figura 6.14: Curva padrão de quantificação de RNA pelo método do Orcinol.....	98
Figura 6.15: Superfície de resposta do rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 6h de autólise. Rendimento em (mgRNA.g ⁻¹ MCS)	101
Figura 6.16: Superfície de resposta da rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 12h de autólise. Rendimento em (mgRNA.g ⁻¹ MCS)	102
Figura 6.17: Superfície de resposta da rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 18h de autólise. Rendimento em (mgRNA.g ⁻¹ MCS)	104
Figura 6.18: Superfície de resposta da rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 24h de autólise. Rendimento em (mgRNA.g ⁻¹ MCS)	105
Figura 6.19: Produção de massa celular seca (●), consumo de lactose (■) e pH do meio (▲) durante fermentação tipo batelada em fermentador de bancada sem controle de pH para a <i>K. marxianus</i> CCT4294.	111

Figura 6.20: Produção de massa celular seca (●) e consumo de lactose (■) durante fermentação tipo batelada em fermentador de bancada com pH constante em 6,5 para a <i>K. marxianus</i> CCT4294.	113
Figura 6.21: Produção de massa celular seca (●) e consumo de lactose (■) durante fermentação tipo batelada alimentada em fermentador de bancada com pH constante em 6,5 para a <i>K.</i> <i>marxianus</i> CCT4294.	115

NOMENCLATURA

AMP – Adenosina 5' – monofosfato
ATCC – American Type Culture Collection
CCT – Coleção de Culturas Tropicais
CMP – Citina 5' – monofosfato
DBO – Demanda Biológica de Oxigênio
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DQO – Demanda Química de Oxigênio
EU – Unidades de Enzima
GL – Graus de Liberdade
GMP – Guanosina 5' – monofosfato
GRAS – Generally Recognized As Safe
IMP – Inosina 5' – monofosfato
L – Linear
MCS – Massa Celular Seca
MQ – Quadrado Médio
Q – Quadrático
RNA – Ácido Ribonucléico
SQ – Soma dos Quadrados
SQD – Soro de Queijo Desidratado
TCA – Tricloro Acético
UMP – Uridina 5' – monofosfato
XMP – Xantosina 5' - monofosfato

RESUMO

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios que pode ser aproveitado como subproduto em processos fermentativos, na produção de biomassa principalmente de leveduras. Após autólise, quando a parede celular da levedura é rompida e a molécula de RNA parcialmente hidrolisada através da ação de enzimas intracelulares, alguns ribonucleotídeos são extraídos.

Neste trabalho foi estudada a produção de biomassa para a obtenção de ribonucleotídeos por diferentes microrganismos em fermentação em batelada, em meio contendo principalmente soro de queijo e sais minerais. Inicialmente foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyer para definir a melhor linhagem produtora e as condições de cultivo, temperatura, pH, agitação e composição do meio, através dos planejamentos experimentais Plakett Burman e fatorial composto central bem como o tempo de fermentação. Em uma segunda etapa o processo de autólise das células foi otimizado utilizando planejamento fatorial completo 2^2 , seguido do estudo do tratamento enzimático e térmico para aumentar o rendimento final de ribonucleotídeos.

Os resultados experimentais definiram como melhor microrganismo produtor de biomassa e ribonucleotídeos a *Kluyveromyces marxianus* CCT4294, com concentração de 25,98 g.L⁻¹ obtidos após 28h de fermentação. Após o processo de autólise e do tratamento enzimático e térmico os melhores rendimentos foram 42,32 e 31,67 mgRNA.g⁻¹MCS, respectivamente.

ABSTRACT

The whey is mainly a by-product of the dairy industry that can be taken advantage of as substratum in fermentative processes, in the biomass production of yeasts. After autólise, when the cellular wall of the yeast is broken and the molecule of RNA partially hydrolyzed through the action of intracellular enzymes, some ribonucleotides are extracted.

In this work it was studied the biomass production for ribonucleotides obtaining for different microorganisms in fermentation in batch, in medium containing whey and mineral salts mainly. Initially they were made fermentations in flasks Erlenmeyer to define the best producing microorganism and the cultivation conditions, temperature, pH, agitation and composition of the medium, through the experimental plannings Plackett Burman and factorial central composition as well as the time fermentation. In one second stage the process of autólise of the cells was optimized using complete factorial planning 2^2 , followed by the study of the enzymatic and thermal treatment to increase the final revenue of ribonucleotides.

The experimental results defined as better microorganism used in the biomass and ribonucleotides production was the *Kluyveromyces marxianus* CCT4294, with concentration of $25,98 \text{ g.L}^{-1}$ obtained in 28h of fermentation. After the autólise process and the enzymatic and thermal treatment the best yield were of 42,32 and 31,67 $\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$, respectively.

1- INTRODUÇÃO

Ribonucleotídeos são polímeros de mononucleotídeos unidos por ligações de ésteres entre grupos de fosfatos e riboses. A estrutura dos nucleotídeos é dividida em três principais grupos: bases nitrogenadas (purina ou pirimidina), ribose (α -D-ribofuranose) e grupo fosfato. A sequência de bases nitrogenadas determina as propriedades biológicas da molécula. Os nucleotídeos são ésteres fosfóricos dos nucleosídeos presentes na molécula de RNA como adenosina, guanosina, citidina e uridina, que são complexos de purina ou pirimidina unidos por D-ribofuranose através de ligações de *N*- β -glicosídica. Após autóclises de leveduras e hidrólises parciais, as moléculas de RNA são convertidas em ribonucleotídeos, complexos intracelulares que podem ser extraídos da biomassa (Belem e Lee, 1998; Belem e Lee, 1997; Belem *et al.*, 1997).

Derivados de ribonucleotídeos podem ser produzidos por fermentações aeróbias e anaeróbias em soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, sendo utilizados como bioingredientes em alimentos para realçar a resposta sensorial. Sendo que durante a produção de queijo o descarte deste soro é um dos grandes problemas nas indústrias de laticínios, pois mais de 3800 L/dia são liberados para o sistema de esgoto, com carga equivalente a 1800 pessoas (Ben-Hassan *et al.*, 1994, citado por Belem *et al.*, 1997). Outros problemas podem ocorrer se a descarga for contínua no solo, ou seja, pode ocasionar baixo rendimento na colheita dos produtos e conduzir a sérios problemas de poluição das águas. No entanto, segundo os mesmos autores, tem-se que este soro contém 5% (p/p) de lactose, 0,65 a 0,80% (p/v) de proteína e quando desidratado, pode conter até 65% (p/v) de lactose e 10 a 15% (p/v) de proteína. Sabendo-se que esta lactose é responsável pela alta demanda biológica de oxigênio, muitos processos fermentativos

foram propostos como alternativa para reduzir o problema de desperdício e disposição do soro de queijo (Belem e Lee, 1997; Belem e Lee, 1998; Belem *et al.*, 1997).

O presente trabalho apresenta uma alternativa para reduzir este problema, através da utilização do soro de queijo em processos fermentativos para produção de biomassa visando à obtenção de ribonucleotídeos.

2- OBJETIVOS

2.1- GERAL

Estudar a produção de biomassa a partir do soro de queijo utilizando diferentes microrganismos para obtenção de ribonucleotídeos por processos de autólise e tratamento enzimático e térmico.

2.2- ESPECÍFICOS

Etapa 1:

Selecionar o melhor microrganismo produtor e definir as melhores condições como concentração do meio, temperatura de incubação, pH, agitação e tipo de fermentação (batelada e batelada alimentada), para produção de biomassa.

Etapa 2:

Definir as melhores condições de autólise e hidrólise parciais para a obtenção dos ribonucleotídeos, utilizando tratamento enzimático e térmico.

3- JUSTIFICATIVA

Um dos grandes problemas das indústrias de laticínios é o descarte de alto volume de soro de queijo, provocando assim a poluição das águas e a contaminação do solo. No entanto, parte deste problema pode ser eliminado pela utilização do soro de queijo em processos fermentativos, podendo até mesmo ser utilizado na produção de ribonucleotídeos, sendo que diferentes microrganismos, entre eles as leveduras, adaptam-se facilmente ao soro de queijo, devido a alta concentração de lactose.

Os ribonucleotídeos são produtos de interesse para as indústrias, tanto alimentícia como na farmacêutica, pois são utilizados como realçadores de sabores, produzem efeito de suavidade nos alimentos e eliminam algumas características indesejáveis, como o gosto metálico em alimentos enlatados, além de atuarem como imunoestimuladores em alimentos para animais e bioingredientes em alimentos para humanos. Promovem ainda, proteção contra infecção bacteriana e possuem importantes aplicações como: elaboração de medicamentos indicados contra desordens circulatórias, reumatismo, neuralgias, recuperação funcional, detecção precoce de HIV e prevenção da progressão da doença de imunodeficiência adquirida (AIDS).

Além das aplicações citadas, há de se ressaltar o alto valor agregado dos ribonucleotídeos, como é o caso da inosina 5'-monofosfato (IMP), o qual cada grama alcança o custo de aproximadamente US\$ 27,00.

4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ben-Hassan e Ghaly (1994) relatam que os maiores poluentes em águas residuárias de indústrias de laticínios são o soro de queijo gerado durante o processo de produção, seguido de águas de lavagem e águas de pasteurização.

A produção mundial de queijo tem alcançado de 11 a 12 milhões de toneladas por ano, sendo que deste processo é gerada uma quantidade total de soro de aproximadamente 100 milhões de toneladas. O soro é dividido em dois tipos, doce e ácido, e este valioso subproduto obtido da fabricação de queijo, bem como o permeado de soro, contem muito dos nutrientes do leite podendo ser utilizado quase que por completo, para obtenção de produtos como etanol, biomassa de levedura e ácido láctico (Maiorella e Castillo, 1984; Grba *et. al.*, 2002). Anualmente, no Canadá, dos 1,7 bilhões de quilos de soro de queijo produzido, 17% é depositado em reservatórios e 26% sobre o solo. A cada Kg de queijo cottage produzido, um total de 0,2 Kg de DBO é enviado para os rios ou para tratamento de águas residuárias, entre outros corpos de água ou ainda descarregado sobre o solo. Este alto valor de DBO (40.000 a 60.000 ppm) o torna prejudicial ao tratamento de esgoto. O nitrogênio do soro de queijo é solúvel em água e pode ser levado para as águas do solo, tornando-se assim, perigoso para a saúde humana e animal. A distribuição contínua de soro de queijo no solo pode comprometer a estrutura física e química do mesmo, diminuindo o rendimento de colheita dos produtos agrícolas e provocar sérios problemas de poluição das águas (Ben-Hassan e Ghaly, 1994).

O problema da utilização da lactose do leite ou do soro de queijo tem sido descrito na literatura, relatando que populações inteiras não são capazes de hidrolisar a lactose devido à falta de β -galactosidase em seus tratos digestivos, o que ocorre principalmente em

pessoas mais velhas. O mesmo problema pode ocorrer na utilização desta lactose por suínos na fase de crescimento, enquanto que suínos jovens o podem consumir normalmente. Portanto, estes problemas provocaram limitações do uso do soro como alimento, sendo uma alternativa para seu uso a hidrólise da lactose, através da enzima lactase, em glicose e galactose. O soro e/ou leite assim tratados podem ser utilizados no processo de produção de sorvetes, alimentos para bebês e podem ser muito interessantes para a produção de complementos de alimento humano e animal. Apesar destas vantagens, a maior parte do soro é descartada como resíduo líquido em muitos países ao redor do mundo, causando vários problemas de poluição, pois sua demanda biológica de oxigênio (DBO) varia de 35000 a 40000 ppm, devido principalmente à lactose, que representa uma fração mássica de 4,5-5%, que é o mesmo conteúdo encontrado no permeado de soro após extração de proteínas através da ultrafiltração (Maiorella e Castillo, 1984; Grba *et. al.*, 2002; Barba *et. al.*, 2001).

Ben-Hassan e Ghaly (1994) informam que processos fermentativos do soro de queijo com leveduras aeróbias podem ser usados para reduzir a poluição, bem como produzir proteínas unicelulares. Estes autores citam resultados obtidos por Mickle *et. al.* (1974), relatando a redução da DQO do soro de queijo cottage utilizando a *Kluyveromyces fragilis* em condições aeróbias de 82 a 92%. Ghaly e Singh (1989) também relataram que a fermentação aeróbia de soro de queijo, usando a levedura *K. fragilis*, foi bem sucedida na redução da DQO total em 42%, da DQO solúvel em 65%, dos sólidos totais em 53% e da amônia em 90%. Já Burgess (1977) conseguiu uma redução para DQO acima de 81% quando usou fermentação para produção de proteína de levedura de permeado de soro de queijo.

Segundo Ben-Hassan e Ghaly (1994) a composição média do soro de queijo está descrita na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição do soro de queijo.

Características	Valores quantificados
Sólido totais	63835 mg/L
Fixos	9100 mg/L
Voláteis	54738 mg/L
Percentual volátil	85,74 %
Percentual fixo	14,26 %
Sólidos suspensos	22150 mg/L
Fixos	185 mg/L
Voláteis	21965 mg/L
Percentual volátil	99,16 %
Percentual fixo	0,84 %
Nitrogênio total (Kjeldahl)	1690 mg/L
Amônia	270 mg/L
Orgânico	1420 mg/L
Percentual orgânico	84,02 %
Percentual amônia	15,98 %
Demanda química de oxigênio total	74220 mg/L
Solúvel	59640 mg/L
Insolúvel	14580 mg/L
Percentual solúvel	80,36 %
Percentual insolúvel	19,64 %
Lactose	5,0 %
pH	4,9

Fonte: Ben-Hassan e Ghaly (1994)

O soro contém além de lactose, vitaminas e minerais, os quais aumentam a atividade fisiológica de leveduras. Assim, para uma boa utilização da lactose do soro é importante escolher uma cepa de levedura com características fisiológicas estáveis (Grba *et. al.*, 2002).

Giec e Kosikowski (1982) relatam que o interesse na produção industrial de biomassa de leveduras, utilizando como substrato o soro de queijo, surgiu em 1958 através de alguns estudos feitos por pesquisadores da época. Com ênfase na utilização do soro de queijo para a produção de biomassa e álcool, têm-se focalizado atenção na natureza e desempenho satisfatório em fermentação de lactose por leveduras, como a *K. fragilis* (*K. marxianus*) que tem sido uma espécie importante na fermentação aeróbia. Através de processos como ultrafiltração do soro, a proteína pode ser removida, sobrando um permeado de soro com alto teor de sólidos totais (30 - 32%) que pode ser utilizado como substrato com grande potencial para fermentação aeróbia.

Na biomassa obtida através de processos que utilizam leveduras e outros microrganismos, podem ser encontrados os ribonucleotídeos, como também polissacarídeos e oligossacarídeos. Os polissacarídeos microbianos consistem de três principais tipos: intracelulares, os quais podem ser formas de armazenamento de carbono ou energia para a célula; estruturais, os quais são componentes de estrutura de células; e extracelulares. Polissacarídeos tais como glucana e manana são os principais constituintes da parede celular de leveduras. Estes complexos são polissacarídeos estruturais e podem ser extraídos das células, após autólise de leveduras seguida de centrifugação, sendo que, a glucana representa mais de 50% da composição da parede celular da levedura e a manana mais de 30%. Oligossacarídeos são carboidratos de 3 a 10 monômeros de açúcar, que podem ser obtidos, tanto pelo controle da hidrólise parcial de polissacarídeos ou pela polimerização de dissacarídeos. Eles são solúveis em água e suavemente doce, podendo ser de 0,3 a 0,6 vezes tão doce quanto a sacarose. Quando hidrolisados parcialmente, os polissacarídeos presentes na parede celular de leveduras (glucana e manana) podem ser convertidos em oligossacarídeos (Belem e Lee, 1998).

Em leveduras, a fração de ácido nucléico consiste principalmente de ácido ribonucléico (RNA). Após autólise, quando a parede celular da levedura é rompida e a molécula de RNA parcialmente hidrolisada através da ação de enzimas intracelulares, ribonucleotídeos tais como guanosina 5'-monofosfato (GMP) e inosina 5'-monofosfato (IMP) podem ser extraídos da biomassa, sendo que 1,0 g destas substâncias puras de *Saccharocycles cerevisiae* custa aproximadamente US\$ 27,00. Substâncias como adenosina 5'-monofosfato (AMP), citidina 5'-monofosfato (CMP) e uridina 5'-monofosfato (UMP), também podem ser extraídas após hidrólises dos nucleotídeos (Belem e Lee, 1999; Belem e Lee, 1998; Belem e Lee, 1997; Belem *et al.*, 1997).

Belem *et al.* (1997), relataram que algumas fontes microbianas tais como *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium citrinum*, *Streptomyces aureus*, *Bacillus megaterium*, *Micrococcus glutamicus* e *Escherichia coli*, podem ser produtoras de ribonucleotídeos. Porém, nenhuma pesquisa foi realizada até o momento, empregando a levedura *K. marxianus* em presença de soro de queijo, como produtora de ribonucleotídeos. Este microrganismo tem grandes vantagens quando utilizado em fermentações com soro de queijo, pois é um produtor ativo de β -galactosidase quando a lactose é usada como substrato, apresentando bom rendimento além de ser padrão - GRAS (generally recognized as safe).

Kluyveromyces são unicelulares nucleados e são ascomicetos que podem se reproduzir sexualmente ou assexualmente. *K. marxianus* e *K. lactis* são cepas que podem ser utilizadas industrialmente devido à habilidade de consumir lactose e assim crescerem em soro de queijo. A primeira difere de outros microrganismos devido ao fato de crescer numa faixa maior de temperatura (Belem e Lee, 1998).

A preparação de complexos intracelulares, para aplicações em alimentos, requer técnicas eficientes de rompimento de parede celular e de separação dos produtos de interesse dos componentes indesejáveis. Há referências de estratégias diferentes para romper ou debilitar a parede das células de leveduras, porém, entre os métodos físicos, químicos e enzimáticos disponíveis, a autólise é o único método prático usado em escala industrial (Belem e Lee, 1997; Belem *et al.*, 1997).

4.1- PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DE RIBONUCLEOTÍDEOS EXTRAÍDOS DA BIOMASSA

Os ribonucleotídeos podem ser obtidos por diferentes vias, entre elas podem ser destacadas as vias fermentativa e a hidrólise química ou enzimática de ácidos ribonucléicos. Enquanto a via hidrolítica permite a obtenção de todos os ribonucleotídeos que compõem o ácido ribonucléico, a via fermentativa produz somente os correspondentes às mutações efetuadas pelo microrganismo selecionado, sendo que esta última é amplamente utilizada quando se pretende unicamente a obtenção dos ribonucleotídeos de interesse alimentício. Para aplicações nas indústrias tanto alimentícias quanto farmacêuticas, a hidrólise enzimática apresenta a vantagem da especificidade da hidrólise na posição desejada, assim como condições de operações relativamente suaves e grande versatilidade, sendo que seus métodos permitem melhorar a obtenção na produção dos ribonucleotídeos e influenciar na economia do processo (Benaiges *et al.*, 1989; Olmedo *et al.*, 1994).

Uma alternativa para fermentar meios com alto conteúdo de lactose e prevenir a repressão catabólica da síntese de enzimas é a fermentação em batelada alimentada, que pode evitar a inibição por substrato e resultar em alto rendimento de biomassa. Esta é a principal razão pela qual, cultivos em batelada alimentada podem oferecer maiores vantagens, em relação a fermentações em batelada simples e contínua, na produção de

complexos intracelulares de leveduras. Fermentações aeróbias e anaeróbias, por *K. marxianus* var. *marxianus*, têm sido propostas como tratamento para reduzir a poluição com o soro de queijo e a partir deste, produzir proteínas unicelulares, enzimas tais como poligalacturonase ou carboxipeptidase, biomassa e etanol em batelada, em um único estágio de fermentação contínua com 100% de célula reciclável e em colunas tipo leito empacotado (Belem e Lee, 1998).

A produção de RNA e seus derivados estão diretamente relacionados com a produção de biomassa, sendo por isso importante estudar processos de fermentação. Em fermentações contínuas o crescimento de *K. marxianus* é oxidativo sob condições de fluxo subcrítico de substrato e limitação de carbono com suprimento adequado de oxigênio. Quando somente o metabolismo oxidativo tomar lugar, o rendimento de biomassa usualmente é alto com aumento da concentração de açúcar. Durante a fermentação contínua pode ocorrer o acúmulo de piruvato e promover maior fluxo glicolítico, resultando na redução do rendimento final de biomassa. A fermentação batelada alimentada permite obter altos rendimentos de biomassa e previne o desequilíbrio do metabolismo glicolítico sobre o metabolismo oxidativo (inibição por substrato). Assim, meio altamente concentrado de substrato pode ser acrescentado a um reator que contém meio parcialmente fermentado com baixos conteúdos de açúcar (Belém e Lee, 1999).

O RNA pode ser comercialmente produzido através de fermentações contínuas usando a levedura *C. utilis*, com rendimento final próximo a 14% (p/v). IMP pode ser produzido por vários processos biotecnológicos: hidrólise enzimática de ácido ribonucléico de *S. cerevisiae* e *C. utilis*; fermentação direta para 5'-IMP através de mutantes de *B. ammoniagenes*; produção microbiana de inosina através de *B. subtilis*, *B. ammoniagenes* ou *Mycobacterium*, seguido por fosforilação química para 5'IMP, e através de hidrólises

químicas de RNA. GMP pode ser produzido através de hidrólise enzimática de RNA de levedura usando enzimas obtidas de culturas de *P. citrinum* e *S. aureus*; fosforilação química de guanosina, produzida a partir da glicose através de mutantes de *B. subtilis*; conversão enzimática de monofosfato 5'-xantosina (XMP) para (GMP) usando mutantes de *B. ammoniagenes*; sínteses químicas de ribose 5-amino-4-imidazolecarboxamida, que é produzida por processo fermentativo usando *B. megaterium* e fermentação direta a partir de glicose usando *B. subtilis*, *B. ammoniagenes*, *M. glutamicus* e *E. coli*. Atualmente, estes dois últimos processos estão disponíveis para produção industrial de GMP (Belem e Lee, 1998; Belem e Lee, 1997).

4.1.1- Processos para extração e tratamentos enzimático do RNA

Entre os métodos químicos, físicos e enzimáticos utilizados para o rompimento da parede celular, a autólise, que ocorre a pH próximo a 5,0, é o método mais prático em escala industrial. Durante a autólise celular o RNA intracelular decompõe-se em substâncias não flavorizantes de baixa massa molar como os nucleosídeos ou bases púrica/pirimídica. Quando a autólise é realizada a pH menor do que 6,0 a formação de GMP (guanosina 5'monofosfato) é muito menor. No entanto, 50 a 80% do RNA intracelular permanecem intactos quando a autólise da levedura é conduzida a uma faixa de pH constante de 6,2 a 6,4 e temperatura de 30 a 60°C por 10 a 30h. Neste caso, o RNA intracelular que não foi autolisado pode ser facilmente hidrolisado a 5'-nucleosídeo pela ação da enzima fosfodiesterase (Revillion *et. al.*, 2003).

Os diferentes métodos de extração são de diversas complexidades, sendo um dos mais utilizados, o método fenólico, útil para a extração de ácidos nucléicos totais ou RNA total de bactérias, fungos, plantas e tecidos animais. O uso de soluções salinas

concentradas, métodos menos sofisticados, permite a extração das ribonucleoproteínas citoplasmáticas, deixando intacto o material nuclear que contém o DNA. As soluções alcalinas como NaOH ou KOH também são utilizadas e seu uso, juntamente com soluções salinas, permite extrair ácido ribonucléico de forma quase quantitativa. Por outro lado, também são descritas as soluções de hidróxido de amônia como agentes extratores efetivos (Benaiges *et al.*, 1989).

Para estudar a hidrólise enzimática do RNA extraído de leveduras de cerveja com solução enzimática parcialmente purificada, determinam-se as condições ótimas de operação, que permitem obtenção máxima de ribonucleotídeos e mínima de outros produtos provenientes da ação persistente de outras atividades enzimáticas também presentes. As condições de operação para a hidrólise de RNA para obtenção de ribonucleotídeos dependem da enzima utilizada e do grau de purificação requerido (Benaiges *et al.*, 1989).

Extrato de levedura foi produzido a partir de leveduras de cervejaria de indústria de cerveja através de combinações de tratamentos enzimáticos usando endoprotease, exoprotease, 5-fosfodiesterase e deaminase monofosfato adenosina (AMP). Efeitos da combinação e dosagem de enzimas, sequência de tratamentos na recuperação de sólidos e proteínas, sabor e características foram investigadas. A dosagem de exoprotease afetou fortemente a recuperação de proteína, o grau de hidrólises e características sensoriais. Quando a célula de levedura foi tratada usando combinação ótima de endoprotease e exoprotease, alta recuperação de sólidos (48,3-53,1%) e melhor perfil de sabor foram obtidos. Entre várias seqüências de tratamentos usando múltiplas enzimas, como o tratamento com protease seguido por nuclease, resulta em maior conteúdo de 5-guanosina monofosfato (5-GMP). As concentrações ótimas de 5-fosforodiesterase e AMP-deaminase encontradas foram de 0,03% para ambas. Após o tratamento usando combinações e

dosagens ótimas de enzimas e sequências de tratamento com quatro enzimas, obteve-se alto rendimento de sólidos (55,1%) e conteúdo de 5-nucleotídeos de 3,67% (Chae *et al.*, 2001).

4.1.2- Produção

Giec e Kosikowski (1982) estudaram a atividade de leveduras que fermentam lactose em permeado de soro concentrado, sendo que o meio foi suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e K_2HPO_4 . Após ter comparado dez leveduras, os melhores resultados encontrados foram de 8,0 e 11,0 g.L⁻¹ de biomassa seca com concentração de 5 e 12% de lactose no permeado, respectivamente, com taxa de aeração de 2,0 vvm, temperatura de 30°C e pH inicial 5,6.

Maiorella e Castillo (1984) estudaram a produção de etanol, biomassa e enzima usando soro de queijo como substrato. Para a produção de biomassa, utilizaram a *K. fragilis*, que é considerada satisfatória para alimentos e apresenta bom rendimento quando cultivada em soro de queijo. Neste processo de fermentação em batelada, os autores extraíram a proteína de 25000L de soro obtendo o permeado com concentração de lactose residual de 46 g.L⁻¹ e DBO total de aproximadamente 35000 ppm, que foi suplementado com extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e fermentado a pH inicial 5,0 e temperatura de 40°C. A biomassa produzida foi de 517 Kg (aproximadamente 20 g.L⁻¹) e a redução da DBO do permeado foi de aproximadamente 95% (DBO final de 1750 ppm), mostrando que este processo é efetivo na redução do custo no tratamento de águas residuárias.

Inchaurredo *et. al.* (1994) estudaram o crescimento de leveduras e produção de β -galactosidase em fermentação batelada extritamente aeróbia (nível de oxigênio dissolvido superior a 40% de saturação) em meio sintético limitado de lactose (4,0 g.L⁻¹ para frascos

Erlenmeyer e $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ para fermentador de bancada), comparando várias cepas, dentre elas a *K. marxianus*. Os resultados obtidos para esta levedura, em relação à produção de biomassa, foram considerados baixos, $1,55 \text{ g.L}^{-1}$ em frascos Erlenmeyer e aproximadamente $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ em fermentador de bancada. Os autores relatam que os baixos valores obtidos foram devido à baixa concentração de lactose presente no meio, pois em processos fermentativos a mesma é consumida favorecendo a produção de biomassa.

Grba *et. al.* (2002) utilizaram cinco cepas da levedura *K. marxianus* para estudar a produção de álcool e biomassa em fermentações de soro de queijo, com diferentes concentrações de lactose – 5, 10 e 15%, em processos de batelada e batelada alimentada e com os meios suplementados com extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e MgSO_4 . A análise estatística dos resultados mostrou que o rendimento de biomassa, após a fermentação em diferentes temperaturas (30, 34 e 37°C) e pH (4,5 – 5,0), apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para as cinco cepas de *K. marxianus* e que a temperatura e a concentração de lactose não tiveram nenhuma influência significante sobre o mesmo. Com relação ao rendimento de etanol, observaram que para as cinco cepas e para a concentração de lactose há diferença significativa ($p < 0,05$), o que não foi observado para a temperatura. O melhor resultado para produção de biomassa foi de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ e 7,31% de etanol.

Belem, em 1998 (citado por Belem e Lee, 1998), relatou que fermentações em batelada alimentada poderiam reduzir a poluição com o soro de queijo altamente concentrado, mostrando que, mais de 95% da lactose do meio foi consumida por *K. marxianus* durante a fermentação com aeração de 1,0 a 2,0 vvm. Demonstrou também que a produtividade de biomassa atingiu $2,4 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em batelada alimentada, quando as

fermentações foram conduzidas com alta taxa de aeração (2,0 vvm), ao contrário de 0,6 a 1,0 g.L⁻¹.h⁻¹ quando conduzidas a 1,0 vvm.

Benaiges *et. al.* (1990) estudaram as condições operacionais ótimas de hidrólise enzimática de RNA para produção de ribonucleotídeos. O RNA utilizado foi o de leveduras de cervejaria obtidos através de extração com amônia e hidrolisado com fosfodiesterase. Neste estudo, as melhores condições determinadas foram temperatura igual a 60°C e pH 7,0, obtendo bom rendimento de ribonucleotídeos em concentração inicial de RNA abaixo de 1,0 g.L⁻¹ e tempo de reação de 1 hora, sendo que, com a concentração inicial de substrato maior que 1,5 g.L⁻¹ ocorreu inibição da hidrolase.

Belem *et al.* (1997) analisaram a produção enzimática de ribonucleotídeos autolisados de *K. marxianus* cultivadas em soro de queijo, desenvolvendo tratamentos enzimáticos para ajudar no aumento do rendimento final de nucleotídeos. Para isso, utilizaram como microrganismo produtor o *K. marxianus* var. *marxianus* ATCC 28244 (anteriormente *K. fragilis* ATCC 28244). O meio era composto de soro de queijo desidratado e suplementos, sendo este, antes da esterilização, ajustado para pH igual a 8,5 para evitar a precipitação de proteína e antes da inoculação para 4,5. O cultivo foi realizado em batelada e amostras do sobrenadante analisadas por HPLC para quantificação dos ribonucleotídeos. Durante a fermentação, estes autores acompanharam as cinéticas do processo e verificaram que 80% da lactose do meio foi consumida após 20h de fermentação, que corresponde ao final da fase lag de crescimento microbiano. O rendimento de nucleotídeos de leveduras autolisadas variou de 100 a 600 µg/g de biomassa, em peso seco, abaixo daqueles relatados por Fish (1991) para *S. cerevisiae*. O rendimento foi fortemente influenciado pelas temperaturas de autólise. Após 12h de autólise, o rendimento de inosina 5'-monofosfato foi três vezes maior que o rendimento após 6h. A

produção de outros derivados de ribonucleotídeos, incluindo bases nitrogenadas, também aumentou, indicando que a hidrólise de RNA ocorreu aleatoriamente, sendo que o rendimento de hipoxantina aumentou de 5,0 µg/g de biomassa após 6h de autólise, para 7,6 µg/g de biomassa após 12h. Para aumentar a especificidade de hidrólises de RNA e a conversão em nucleotídeos, um tratamento enzimático com fosfodiesterase foi necessário. Com isso, houve aumento no conteúdo de hipoxantina para 12 µg/g de biomassa e rendimento final de 800, 2000 e 250 µg/g de biomassa de AMP, GMP e IMP, respectivamente, após autólise e os tratamentos enzimático e térmico.

Revillion *et. al.* (2003) utilizaram a levedura *K. marxianus* para cultivo em soro de queijo com o objetivo de produzir extrato de levedura com grau alimentício com determinação de RNA por espectrofotometria. Para esta determinação os autores avaliaram a influência do processo de autólise juntamente com tratamento enzimático e térmico utilizando a enzima 5'fosfodiesterase, tendo obtido como melhor resultado uma concentração de 430 mg.L⁻¹ de RNA com rendimento de 17,2 mgRNA.g⁻¹biomassa para tratamento a 50°C por 30h e pH de 6,5.

Em 1997, Belem e Lee estudaram a produção de derivados de RNA através de *K. fragilis* cultivada em soro de queijo, utilizando um mutante deste microrganismo como produtor. A composição do meio, as condições de crescimento do inóculo e da fermentação, taxa de aeração e agitação foram as mesmas empregada por Belem *et al.* (1997). Após diferentes tempos de fermentação (24, 48 e 72h), as células de leveduras foram autolisadas por duas técnicas diferentes. O sobrenadante foi filtrado e analisado por HPLC para quantificação dos ribonucleotídeos, sendo que a máxima quantidade de nucleotídeos determinada por espectrofotometria, para cada autólise, ocorreu nas condições ótimas de 50°C e pH 7,5.

Belem e Lee (1999) utilizaram quatro amostras de soro de queijo como substrato em diferentes concentrações de lactose, todas suplementadas igualmente com extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 para produção de biomassa. O meio, antes da esterilização, teve seu pH ajustado para 8,5 para evitar a precipitação de proteína. Estudaram a cinética do processo de fermentação em batelada alimentada, determinando o rendimento e a produtividade, verificando se havia relação direta entre crescimento microbiano e produção de RNA. Os diferentes experimentos iniciaram com o meio de menor concentração e após 20h, alimentados com os demais. O melhor resultado obtido foi de aproximadamente 29,0 g.L⁻¹ de biomassa e de 1,5 % (p/p) de RNA com a alimentação de permeado de soro em vazão volumétrica de 180 mL.h⁻¹ e aeração de 2 vvm.

O processo para produção enzimática de ribonucleotídeos, a partir de RNA de origem microbiana, foi estudado utilizando a levedura *Saccharomyces carlbergensis*, subproduto de indústrias cervejeiras. Experimentalmente 86% de RNA presentes nas leveduras puderam ser extraídos com NH_3 , com valores elevados de pureza e rendimento em menor tempo de extração (15 minutos) e menor temperatura (60°C). Após a separação, o RNA foi precipitado com HCl (pH 4,9), pois este é mais acessível economicamente que o etanol (Benaiges *et al.*, 1989).

4.2- APLICAÇÕES E USOS

Os ribonucleotídeos são produtos de alto valor agregado que podem ser de ampla utilização tanto na indústria alimentícia como na farmacêutica. As substâncias como GMP e IMP contribuem no teste “umami” e realçam sabores em concentrações menores que o limiar de detecção, produzem efeito de suavidade no alimento e eliminam algumas características indesejáveis, como o gosto metálico dos alimentos enlatados. Devido as suas

altas estabilidades ao calor, há um interesse crescente pelo uso destes, juntamente com o glutamato de monossódio, em produtos tais como caldos e molhos, produtos prontos ou pré-cozidos congelados. Enquanto que a GMP dá maior enriquecimento no sabor, a IMP tem uma baixa absorção de umidade, que é uma vantagem para uso em produtos de mistura seca. Além de seus usos como realçadores de sabores, derivados de ribonucleotídeos, tais como nucleosídeos e bases livres, são indicados para usos terapêuticos, sendo utilizados como imunoestimuladores em alimentos para animais (bovino, suínos e aves) e bioingredientes em alimentos para humanos. Suplementos de purina e pirimidina de RNA de extrato de levedura de cervejaria promovem proteção contra infecção bacteriana e aumentam as funções imunológicas em animais. Já as substâncias como AMP, UMP e, especialmente, CMP têm importantes aplicações em indústrias farmacêuticas, como elaboração de alguns medicamentos indicados contra desordens circulatórias, reumatismo, neuralgias e recuperação funcional (Belem e Lee, 1997; Belem e Lee, 1998; Belem e Lee, 1999; Belem *et al.*, 1997; Fish, 1991; Benaiges *et al.*, 1989).

Análogos de nucleosídeos de purina natural podem ser sintetizados em anel pirimidina tiazol, inserindo um átomo de enxofre no lugar do átomo de nitrogênio na posição 7 do anel de purina, a qual apresenta atividade imunoativa significativa. 8-Bromoguanosina, 8-mercaptoguanosina e 7-metil-8-oxoguanosina também exibem imunoatividade significativa. A metil inosina monofosfato é usada na detecção precoce de HIV e para prevenir a progressão da doença de imunodeficiência adquirida (AIDS) (Belem e Lee, 1998; Belem e Lee, 1999).

Os nucleotídeos têm aplicações, como realçadores de sabor, em alguns produtos alimentícios bem conhecidos, tais como sopas, caldo de carne, molhos, lanches, molhos de

salada, sucos enlatados, hambúrgueres, salsichas, molusco enlatado e queijo (Belem e Lee, 1998).

4.3- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia do planejamento experimental fatorial associada à análise de superfície de resposta é uma ferramenta fundamental na teoria estatística, por fornecer informações muito mais seguras do processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erro (Box et al., 1978).

Através desta técnica sistemática de condução de experimentos é possível avaliar os efeitos principais das variáveis nas respostas desejadas, bem como a interação entre elas. A partir da análise de variância pode-se propor um modelo probabilístico adequado que correlaciona as respostas em função das variáveis estudadas, construindo-se as superfícies de resposta para determinar as faixas ótimas de operação. Nem sempre o objetivo do trabalho em estudo é a otimização do processo, mas sim um melhor conhecimento sobre as respostas do sistema frente às variações ou perturbações que podem ocorrer dentro das faixas de operação estabelecidas. Assim, outra informação muito importante que pode ser obtida através do planejamento fatorial é a verificação das variáveis que apresentam nenhuma ou pouca influência nas respostas, fornecendo subsídios fundamentais quanto à flexibilidade e robustez do sistema e conseqüentemente na definição da melhor estratégia de controle operacional.

4.3.1 - Planejamento fatorial e “Screening Design”

A análise univariável ou o estudo de uma variável por vez mantendo as outras constantes, dificulta grandemente a discussão dos resultados, além do tempo gasto, material

e principalmente da falta de conclusão baseada numa metodologia científica. A maior falta de informação no estudo univariável relaciona-se ao efeito sinérgico ou antagônico entre as variáveis, que só podem ser obtidas pela determinação dos efeitos de interação entre as variáveis através de um planejamento fatorial. Uma outra vantagem do planejamento fatorial é a possibilidade de otimizar várias respostas ao mesmo tempo.

Para se aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento fatorial com dois níveis (-1 e +1) para cada variável. Uma particularidade muito grande em processos bioquímicos é o grande número de variáveis envolvidas. Os planejamentos fatoriais fracionados são muito úteis nas etapas prévias de um desenvolvimento de processo, por exemplo, para identificação das variáveis mais relevantes que devem entrar num planejamento completo numa etapa posterior. Assim, este procedimento é muito interessante em termos qualitativos, mas não se deve a partir de um planejamento fracionado otimizar o processo. Isto porque os efeitos principais, na verdade contrastes, estão confundidos com interações de 2ª ou 3ª ordem ou superiores, conforme o tipo de resolução do fracional.

Quando o número de variáveis aumenta, a utilização do planejamento fracionado começa a dificultar a análise dos contrastes das variáveis. Uma alternativa muito interessante que reduz drasticamente o número de ensaios a serem realizados é o planejamento fatorial proposto por Plackett e Burman em 1946, citado por Rodrigues et al., 1998. São planejamentos saturados, muito úteis como avaliação prévia de variáveis (“screening design”), etapa preliminar à otimização de processos. As frações propostas por

Plackett Burman (PB) permitem estimar “efeitos principais” (contrastes) com variância mínima. Nos planejamentos de PB as colunas são todas ortogonais. Esta simetria permite que os “efeitos principais” de cada variável sejam determinados individualmente, admitindo-se que os efeitos de interação sejam desprezíveis (Barros Neto et al., 1995). Os planejamentos propostos por PB com maior potencial de uso para 12, 16, 20, 24, 28 e 36 ensaios, existindo, porém para sistemas superiores a 100 variáveis. Eles podem ser usados por qualquer número de fatores ou variáveis de entrada, desde que estes fiquem pelo menos e 1 abaixo do número de ensaios. Apesar disto, é conveniente utilizar um planejamento que fique com o número de ensaios um pouco superior ao número de variáveis, para se ter graus de liberdade que possibilitem estimar o erro padrão e assim definir as variáveis estatisticamente significativas. Embora os planejamentos de PB apresentem as vantagens citadas acima, ele é pouco utilizado na literatura (Rodrigues et al., 1998).

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- MEIOS DE CULTURA E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

5.1.1- Microrganismos

Os microrganismos utilizados para a produção de biomassa foram: *K. marxianus* CCT4294, *C. utilis* CCT3469, *S. cerevisiae* (isolada do processo de fermentação da indústria Santa Délia – Cosmópolis, SP), *Candida* sp (isolada do efluente da indústria Rhodia – Paulínia, SP) e *B. subtilis* CCT0534.

5.1.2- Soro de queijo desidratado (SQD)

O soro de queijo desidratado (ALIBRA Ingredientes Ltda., Marechal Candido Rondon, PR) antes de ser usado passou por um processo de extração de proteína para evitar a precipitação e o escurecimento do meio quando esterilizado. Solução de soro de queijo com 15% (p/v) foi acidificada até pH 4,3 e aquecida até ebulição, resfriada e filtrada, descartando-se o precipitado. Para a utilização do soro de queijo no processo de fermentação foram realizadas diluições do mesmo nas concentrações desejadas, conforme planejamento.

5.1.3- Manutenção das culturas estoque

Os microrganismos foram propagados em tubos de ensaio com tampa contendo meio composto de (% p/v): extrato de levedura - 1,0; peptona - 2,0; soro de queijo desidratado -15,0 e Ágar -2,0 a pH 4,5, ajustado imediatamente antes da esterilização a 121°C por 15 min., com exceção da *S. cerevisiae* que foi propagada em meio PDA. O

crescimento ocorreu à temperatura de 30°C por 24h e os tubos foram mantidos em refrigerador.

5.2- MEIO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

5.2.1- Inóculo

O crescimento do inóculo foi feito em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio composto de (% p/v): soro de queijo desidratado - 5,0; extrato de levedura - 0,5; (NH₄)₂SO₄ - 0,4 e KH₂PO₄ - 0,2 a pH 4,5, com exceção da *S. cerevisiae* que cresceu em meio descrito na Tabela 5.1 a pH 5,0. Estes foram inoculados a partir das culturas estoque e incubados a 30°C com agitação de 150 rpm por 24h.

Tabela 5.1: Composição do meio para crescimento da *S. cerevisiae*.

Composto	Concentração (% p/v)
Sacarose	5,0
Extrato de levedura	0,5
KCl	0,17
MgSO ₄ .H ₂ O	0,07
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,183
KH ₂ PO ₄	0,5

5.2.2- Produção de biomassa em frascos Erlenmeyer

Primeiramente foram realizadas fermentações em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio para produção de biomassa, visando definir qual o melhor microrganismo produtor e as melhores condições como concentração do meio (Tabela 5.2), temperatura de incubação (28 – 35°C), pH_{inicial} (3,5 – 6,5) e agitação (100 – 300 rpm). Os frascos Erlenmeyer foram inoculados com 10% (v/v) de inóculo (item 5.2.1) e incubados

por 24 e 48h. Antes da esterilização o pH do meio foi ajustado para 3,0 com H_2SO_4 4,0 N para evitar a caramelização e antes da inoculação o pH do meio esterilizado foi ajustado para o valor desejado com NaOH 4,0 N.

Tabela 5.2: Composição do meio de fermentação.

Composto	Concentração (% p/v)
Soro de queijo desidratado	3,0 – 15,0
Extrato de levedura	0,2 – 1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2 – 1,0
KH_2PO_4	0,2 – 1,0

Exceção foi feita para *S. cerevisiae* que foi cultivada em meio descrito na Tabela 5.1 com pH 5,0 e variação na concentração de sacarose de 5,0 para 5,7 % (p/v), para se ter a mesma concentração de substrato das fermentações de soro de queijo com outros microrganismos equivalente ao ponto central do planejamento Plackett Burman. A fermentação transcorreu com tempo, agitação e temperatura de incubação determinadas durante o processo de produção de biomassa dos demais microrganismos, de modo a relacionar a produção de biomassa com a dos demais microrganismos.

5.2.2.1- Seleção das Variáveis Importantes do Processo

O planejamento de Plackett Burman (PB) foi usado na avaliação das variáveis mais importantes do processo. Para isto, foram utilizadas no processo fermentativo 7 variáveis independentes, cujos efeitos estatísticos foram analisados através do software Statistica 5.0.

As variáveis independentes estudadas foram: temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$), $\text{pH}_{\text{inicial}}$ do meio, agitação (rpm) e concentrações (% p/v) de soro de queijo desidratado (SQD),

extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 . A resposta determinada (variável dependente) para cada ensaio foi expressa em termos de massa celular seca.

A Tabela 5.3 apresenta o planejamento de PB na forma codificada para 16 ensaios com 3 pontos centrais, para o cálculo do erro puro e a Tabela 5.4 os valores reais das variáveis correspondentes ao nível inferior (-1) e superior (+1).

Tabela 5.3: Matriz do planejamento Plackett Burman para 16 ensaios.

Ensaio	Temp. de incubação	pH _{inicial}	Agitação	Soro de queijo desidratado	Extrato de levedura	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4
1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1
7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1
8	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
9	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1
11	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
12	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
14	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
15	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 5.4: Níveis das variáveis do planejamento Plackett Burman não saturado.

Variáveis	Níveis	-1	0	+1
Temperatura de incubação (°C)		28	31,5	35
pH _{inicial}		3,5	5,0	6,5
Agitação (rpm)		100	200	300
SQD (% p/v)		3,0	9,0	15,0
Extrato de levedura (% p/v)		0,2	0,6	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (% p/v)		0,2	0,6	1,0
KH ₂ PO ₄ (% p/v)		0,2	0,6	1,0

5.2.2.2- Determinação da Relação entre as Principais Variáveis e seus Melhores Níveis

Os experimentos subsequentes foram feitos utilizando as variáveis estatisticamente mais significativas obtidas no planejamento Plackett Burman (item 5.2.2.1) para a realização de planejamento fatorial composto central, ou seja, planejamento estrela.

5.2.3- Produção de biomassa em fermentador de bancada

Após a definição do melhor microrganismo produtor de biomassa, da concentração do meio e das condições operacionais, foram feitas fermentações em batelada convencional, em fermentador de bancada (Bioflo III – New Brunswick – capacidade 5,0L, controle de pH, temperatura, alimentação e agitação), para analisar a influência do controle de pH e batelada alimentada, bem como o efeito da adição de substrato. Os processos ocorreram por 72h. Antes da esterilização o pH do meio de fermentação foi ajustado para 3,0 com H₂SO₄ 4,0 N para evitar a reação de Mailard e caramelização do mesmo e antes da

inoculação o pH do meio esterilizado foi ajustado com NaOH 4,0 N para o valor definido no item 5.2.2.

5.2.3.1- Influência do controle do pH na produção de biomassa em fermentação convencional para K. marxianus

Para determinar a influência do pH do meio na produção de biomassa, através dos perfis cinéticos de crescimento celular e consumo de substrato, foram conduzidas fermentações sem controle de pH e a pH constante. Os cultivos foram realizados com 4 L de meio e aeração de 1,5 vvm. O fermentador foi inoculado com 10% (v/v) de inóculo (item 5.2.1).

5.2.3.2- Influência da concentração de substrato na produção de biomassa em fermentação por batelada alimentada para K. marxianus

Para determinar a influência da concentração de substrato na produção de biomassa, através dos perfis cinéticos de crescimento celular e consumo do mesmo, foi conduzida fermentação do tipo batelada alimentada com valor de pH definido no item 5.2.3.1. O cultivo foi realizado inicialmente com 2 L de meio e após 12 h alimentado com mais 2 L (vazão = 0,34 L.h⁻¹) com aeração de 1,5 vvm. O fermentador foi inoculado com 10% (v/v) de inóculo (item 5.2.1).

5.2.4- Autólise celular

O meio fermentado foi centrifugado a 7000 rpm por 15 min. Amostras do sobrenadante foram reservadas para a quantificação dos ribonucleotídeos (t = 0). A biomassa foi lavada e centrifugada novamente e finalmente ressuspensa em água destilada. Desta solução foi tirada uma amostra para a determinação de massa celular seca e o restante

usado no processo de autólise. Para a autólise, a solução contendo as células foi diluída em tampão fosfato (KH_2PO_4 e K_2HPO_4) 0,1M com pH deste tampão ajustado para 6,0 - 7,5, com razão suspensão de biomassa/volume de tampão de 1:1 (v/v) e autolisadas com variação de temperatura de 40 - 55°C, por 6, 12, 18 e 24h com agitação de 150 rpm. As células autolisadas foram centrifugadas a 7000 rpm por 15 min, sendo o sobrenadante reservado para a quantificação dos ribonucleotídeos e a biomassa reservada para a realização do tratamento enzimático e térmico. Os resultados foram analisados através do planejamento fatorial completo 2^2 com três pontos centrais (Tabela 5.5 e 5.6).

Tabela 5.5: Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 .

Ensaio	Temp. de autólise	pH do tampão
1	+1	+1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	-1	-1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Tabela 5.6: Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^2 .

Níveis Variáveis	-1	0	+1
Temperatura de autólise (°C)	40	47,5	55
pH do tampão	6,0	6,75	7,5

5.2.5- Tratamento enzimático e térmico

O tratamento enzimático foi feito utilizando duas enzimas, a fosfodiesterase (SIGMA) e 5'-ácido adenílico deaminase (SIGMA), para analisar e comparar o rendimento final de ambas. As células autolisadas (obtidas do melhor resultado do planejamento no item 5.2.4) foram lavadas e centrifugadas novamente, descartando o sobrenadante. Estas, por sua vez, foram ressuspensas em água destilada e desta suspensão foi feita a determinação de massa celular seca. Para o processo de tratamento enzimático a suspensão foi diluída em tampão fosfato 0,1M em pH 7,0 para fosfodiesterase e 5,5 para 5'-ácido adenílico deaminase, com razão suspensão de biomassa/volume de tampão de 1:1 (v/v) e tratada com 0,1; 0,3 e 0,5% (p/v) de enzima a 65°C por 2, 4 e 6h. Para cessar a atividade enzimática as amostras foram aquecidas a 85°C por 15 min, e a seguir foram centrifugadas a 7000 rpm por 15 min, sendo o sobrenadante reservado para a quantificação dos ribonucleotídeos.

5.3- MÉTODOS ANALÍTICOS

5.3.1- Determinação de massa celular seca (MCS)

Alíquotas de 10 mL de amostra foram centrifugadas a 7000 rpm por 15 min.; o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com água destilada, seguindo de secagem em estufa a vácuo a 65°C até peso constante (~21h), sendo determinada a quantidade de massa celular pelo método gravimétrico.

5.3.2- Determinação da concentração de lactose

A concentração de lactose presente no meio foi determinada pelo método de Fehling, que se baseia na reação de carbonos anoméricos livres de carboidratos com íons cobre (II), produzindo óxido de cobre (I) em meio básico.

5.3.3- Quantificação dos Ribonucleotídeos

A quantificação dos ribonucleotídeos foi feita pelo Método do Orcinol. O processo de extração foi realizado por duas etapas sequenciais distintas. Primeiro com autólise das células seguido de tratamentos enzimático e térmico. Segundo Soto *et. al.* (2002) neste método o ácido rompe as ligações glicosídicas e desidrata os monossacarídeos para a reação com o Orcinol, assim como a oxidação dos grupos cetonas livres.

Método do Orcinol (Renne *et. al.*, 1985):

- Construção da curva padrão

- A curva padrão foi construída com RNA (SIGMA) em solução de TCA 5% para se obter concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e reagente Orcinol.

- Concentração de RNA da amostra

- Para determinação de RNA nas amostras, 2 mL de amostra foram misturados com 2 mL de Orcinol.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NO SORO DE QUEIJO

A concentração de lactose presente no soro de queijo desidratado determinada pelo método de Fehling foi de 65%.

6.2- PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNA E ESCURECIMENTO DO MEIO

Nos trabalhos de Belem *et. al.* (1997), Belem e Lee (1997) e Belem e Lee (1999) o pH do meio de fermentação foi ajustado para 8,5 antes da esterilização para evitar a precipitação de proteínas. No entanto, neste trabalho, ao realizar o mesmo processo, ocorreu precipitação e escurecimento do meio, não condizendo com os autores citados.

Portanto, para solucionar o problema e poder desenvolver o trabalho proposto, foram realizados testes de esterilização do meio contendo soro de queijo desidratado (Industrializado). Os testes ocorreram em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio, descrito no item 5.2.2.1 (ponto central), bem como em meio contendo somente soro de queijo desidratado (15% p/v), ambos em diferentes valores de pH_{inicial} (4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0).

Os resultados obtidos para ambos os testes foram os mesmos, observando-se que, quanto menor o valor do pH_{inicial} maior a precipitação no meio e quanto maior o valor do pH_{inicial} maior o escurecimento do mesmo, em função da reação de Maillard e caramelização. Devido a isto, optou-se por extrair a proteína do soro de queijo como descrito no item 5.1.2.

6.3- VARIAÇÃO DO VALOR DO pH DO MEIO DURANTE A ESTERILIZAÇÃO

Também foram realizados testes do meio (mesmo do item 6.2, porém com soro de queijo desidratado sem proteína), em frascos Erlenmeyer de 500mL com 200mL de meio, para analisar a mudança do valor do pH durante a esterilização e seu comportamento quanto à precipitação e escurecimento. Os valores de pH ajustados antes da esterilização e os obtidos após a esterilização estão descritos no Quadro 6.1.

Quadro 6.1: Valores de pH dos meios de cultura antes e após esterilização.

pH antes da esterilização	3,0	3,5	4,0	4,6	5,0	6,0	7,0	8,0	8,5	9,0
pH após a esterilização	3,0	3,5	3,8	4,51	4,86	5,31	6,11	6,73	6,81	6,9

Através dos resultados obtidos observa-se que os valores de pH 3,0 e 3,5 não apresentaram queda durante a esterilização e também, pode-se observar que não ocorreu precipitação no meio. Nos meios com valores de pH mais altos ocorreu escurecimento. Com isso, concluiu-se que para a realização das fermentações o meio deveria ser esterilizado a pH 3,0, ajustando-se para o pH desejado após a esterilização. O ajuste do pH do meio foi feito a partir da calibração do pH em um frasco nas mesmas condições dos meios de cultivo. Este procedimento utilizado foi apenas para medir o volume de NaOH 4,0N a ser adicionado no frasco usado para a fermentação e também para evitar assim maior risco de contaminação.

Em relação ao meio do inóculo o pH foi ajustado para 4,6 antes da esterilização, para que, após esta etapa, atingisse o valor de pH desejado de 4,5, conforme quadro 6.1.

6.4- PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FRASCOS ERLLENMEYER

6.4.1- Seleção das variáveis mais importantes do processo e seus efeitos sobre a produção de biomassa

Nesta etapa foram definidas as variáveis mais significativas do processo para a produção de biomassa, utilizando o planejamento experimental Plackett Burman, conforme as Tabelas 5.3 e 5.4, através do software “Statistic for Windows 5.0”.

6.4.1.1- Candida utilis CCT3469

Este microrganismo foi analisado conforme sua produção de biomassa através de planejamento para os tempos de 24 e 48h de fermentação, sendo os resultados expressos em massa celular seca (g de massa celular seca por L de meio fermentado).

A Tabela 6.1 apresenta os valores de massa celular seca obtidos em 24 e 48h de fermentação.

Tabela 6.1: Valores de massa celular seca (g.L^{-1}) de *Candida utilis* CCT3469 em 24 e 48h de fermentação.

Ensaio	24h	48h
1	1,28	1,53
2	1,03	1,00
3	0,96	1,07
4	1,17	1,80
5	1,17	1,61
6	1,92	2,90
7	0,01	0,17
8	1,45	1,91
9	0,35	0,33
10	1,92	1,97
11	1,42	1,84
12	0,01	0,18
13	1,19	1,63
14	1,20	1,16
15	0,01	0,41
16	0,92	1,18
17	1,89	2,13
18	1,89	2,10
19	1,89	2,76

Os resultados da Tabela 6.1 mostram, tanto para 24h como para 48h de fermentação, concentrações de biomassa atingindo valores máximos próximos a $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, consideravelmente baixos quando comparados com os demais microrganismos (Tabelas 6.4, 6.7 e 6.10). Relacionando cada ensaio separadamente para 24 e 48h, observa-se que com exceção dos ensaios 2, 9 e 14, ocorreu aumento na produção de biomassa com aumento do tempo de fermentação de aproximadamente 53% como no caso do ensaio 4.

6.4.1.1.1- Interpretação dos resultados do cultivo de *C. utilis* CCT3469 em 24h

A Tabela 6.2 e a Figura 6.1 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para 24h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos ao intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.2: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *C. utilis* CCT3469 para 24h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	1,137421*	0,000577*	1970,071*	0,000000*
Temp. de incubação (°C)	0,040500*	0,001258*	32,186*	0,000964*
pH inicial	-0,050750*	0,001258*	-40,332*	0,000614*
Agitação (rpm)	0,804000*	0,001258*	638,954*	0,000002*
SQD (g.L ⁻¹)	-0,489000*	0,001258*	-388,618*	0,000007*
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,233250*	0,001258*	185,368*	0,000029*
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	0,141750*	0,001258*	112,651*	0,000079*
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,526500*	0,001258*	-418,420*	0,000006*

R = 0,8034 Erro puro = 0,0000063

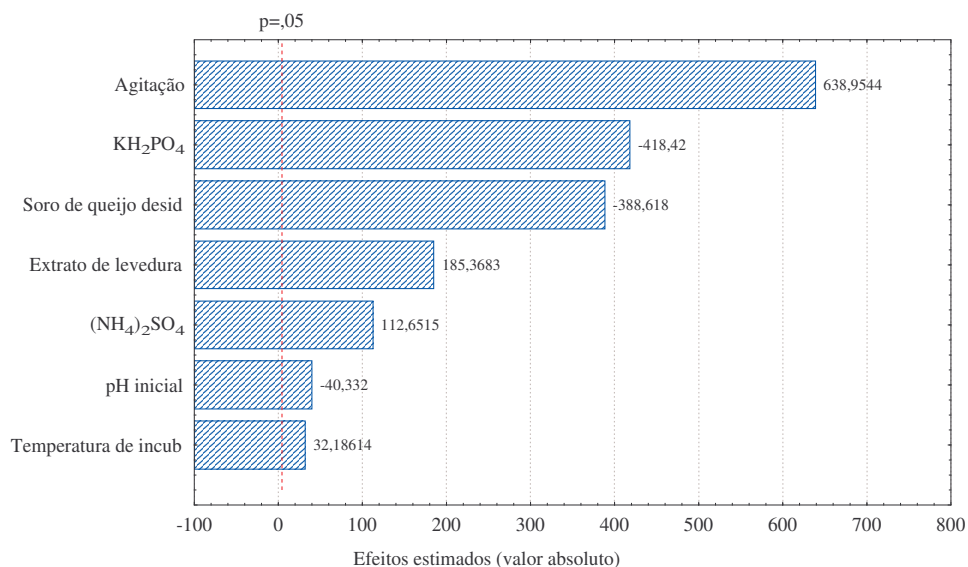


Figura 6.1: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *C. utilis* CCT3469 para 24h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.2, que estão representados na Figura 6.1, sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$), sendo que as variáveis agitação, concentrações de KH₂PO₄ e soro de queijo desidratado apresentaram maior significância na resposta com relação as demais. A agitação apresentou seu efeito significativo no nível +1, o que corresponde a maior produção de biomassa com agitação próxima a 300 rpm. No entanto, as concentrações de KH₂PO₄ e o soro de queijo desidratado apresentaram seus efeitos significativos no nível -1, o que corresponde a concentrações próximas a 0,2 e 3,0 % p/v, respectivamente, para a maior produção de biomassa.

Relacionando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.1 para o tempo de 24h de cultivo, observa-se que as maiores concentrações de massa celular seca (1,915 g.L⁻¹) foram obtidas nos ensaios 6 e 10, nos quais está presente o nível de maior significância (agitação).

6.4.1.1.2- Interpretação dos resultados do cultivo de *C. utilis* CCT3469 em 48h

A Tabela 6.3 e a Figura 6.2 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para o tempo de 48h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos ao intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.3: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *C. utilis* CCT3469 para 48h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	1,454211*	0,086163*	16,87737*	0,003492*
Temp. de incubação (°C)	0,092500	0,187789	0,49257	0,671078
pH inicial	-0,192500	0,187789	-1,02509	0,413114
Agitação (rpm)	0,978750*	0,187789*	5,21198*	0,034897*
SQD (g.L ⁻¹)	-0,276250	0,187789	-1,47107	0,279100
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,388750	0,187789	2,07015	0,174284
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	0,147500	0,187789	0,78546	0,514459
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,783750	0,187789	-4,17357	0,052896

R = 0,8024 Erro puro = 0,1410583

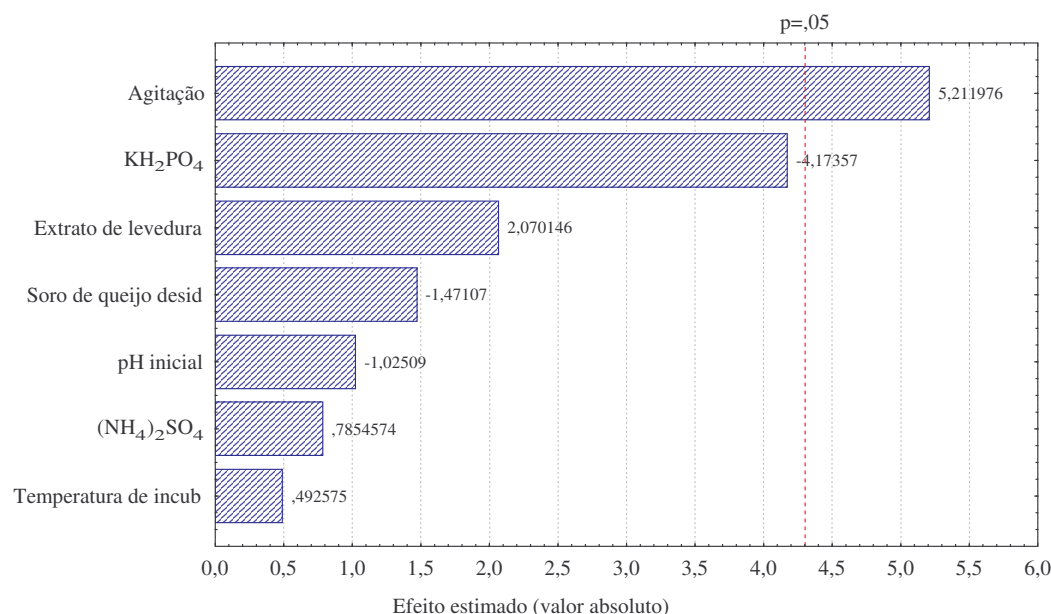


Figura 6.2: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *C. utilis* CCT3469 para 48h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.3 que estão representados na Figura 6.2 sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que somente a variável agitação apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), no nível +1, o que corresponde a maior produção de biomassa com agitação próxima a 300 rpm. A concentração de KH₂PO₄ não pode ser considerada não significante, pois apresentou valor de “p” igual a 0,052896, muito próximo a 0,05 que é o valor limite para se considerar estatisticamente significativo a um intervalo de confiança de 95%. Esse resultado foi obtido no nível -1, correspondente a concentração próxima a 0,2 % p/v para a maior produção de biomassa.

Comparando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.1 para o tempo de 48h de cultivo, observa-se que a maior concentração de massa celular seca (2,895 g.L⁻¹) foi obtida no ensaio 6, no qual está presente o nível de maior significância (agitação). Como

somente esta variável foi a de maior significância para este microrganismo, não foi realizado o planejamento fatorial composto central.

6.4.1.2- *Bacillus subtilis* CCT0534

Este microrganismo foi analisado conforme sua produção de biomassa através de planejamento para os tempos de 24 e 48h de fermentação, sendo os resultados expressos em massa celular seca (g de massa celular seca por L de meio fermentado).

A Tabela 6.4 apresenta os valores de massa celular seca obtidos em 24 e 48h de fermentação.

Tabela 6.4: Valores de massa celular seca (g.L^{-1}) de *B. subtilis* CCT0534 em 24 e 48h de fermentação.

Ensaio	24h	48h
1	0,22	0,11
2	3,84	4,23
3	1,45	0,92
4	0,01	0,01
5	1,09	3,74
6	0,01	0,01
7	0,01	0,01
8	0,18	0,24
9	0,17	0,15
10	2,68	3,13
11	0,01	0,01
12	0,01	0,01
13	0,69	0,71
14	0,21	0,15
15	0,01	0,01
16	0,31	0,23
17	0,51	1,62
18	0,49	1,62
19	0,51	1,58

Os resultados da Tabela 6.4 mostram, tanto para o tempo de 24h como para de 48h de fermentação, concentrações de biomassa atingindo valores máximos próximos a 4,230 g.L⁻¹, consideravelmente pouco significativos quando comparados com os resultados dos demais microrganismos (Tabelas 6.1, 6.7 e 6.10). Relacionando cada ensaio separadamente, para 24 e 48h, observa-se que na maioria deles ocorreu aumento na produção de biomassa com aumento do tempo de fermentação com variação de 2% (ensaio 13) a 245 % (ensaio 5). Ao contrário, em outros ensaios como 1, 3, 9, 14 e 16, verificou-se uma diminuição da concentração de biomassa.

6.4.1.2.1- Interpretação dos resultados do cultivo de *B. subtilis* CCT0534 em 24h

A Tabela 6.5 e a Figura 6.3 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para o tempo de 24h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos ao intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.5: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *B. subtilis* CCT0534 para 24h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	0,64900*	0,002388*	271,794*	0,000014*
Temp. de incubação (°C)	0,11125*	0,005204*	21,377*	0,002181*
pH inicial	1,12350*	0,005204*	215,885*	0,000021*
Agitação (rpm)	0,04750*	0,005204*	9,127*	0,011792*
SQD (g.L ⁻¹)	-1,03925*	0,005204*	-199,696*	0,000025*
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	-0,14000*	0,005204*	-26,902*	0,001379*
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,08125*	0,005204*	-15,612*	0,004077*
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,18250*	0,005204*	-35,068*	0,000812*

R = 0,7198 Erro puro = 0,0001083

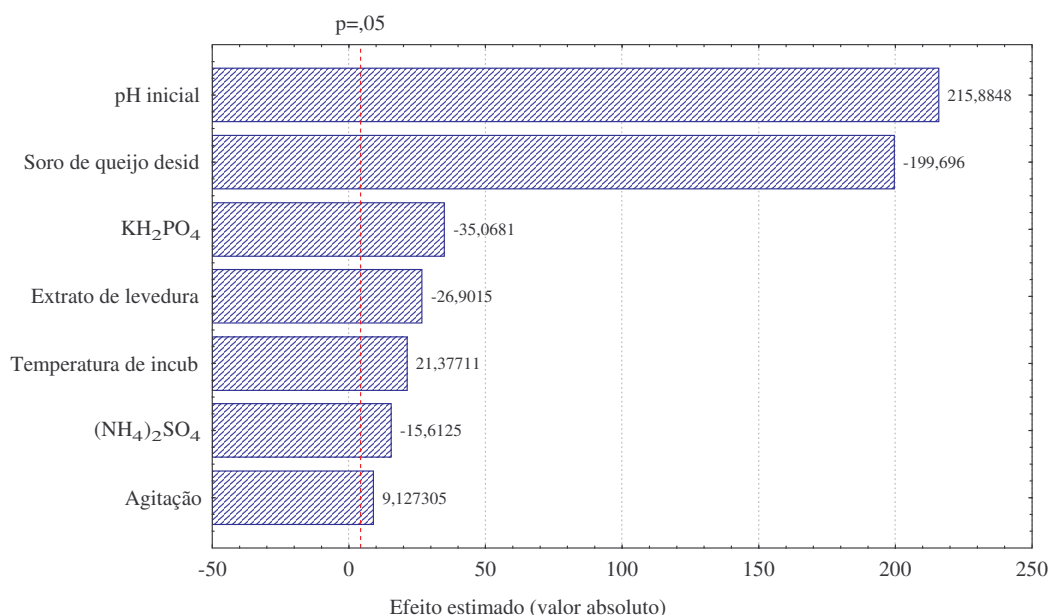


Figura 6.3: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *B. subtilis* CCT0534 para 24h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.5 que estão representados na Figura 6.3 sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$), sendo que as variáveis pH inicial e concentração de soro de queijo desidratado apresentaram maior significância na resposta com relação às demais. Para a produção de biomassa o pH inicial apresentou seu efeito significativo no nível +1, o que corresponde a pH inicial próximo a 6,5. Já a concentração de soro de queijo desidratado apresentou seu efeito significativo no nível -1, o que corresponde a concentração próxima a 3,0 % p/v para a maior produção de biomassa.

Comparando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.4 para o tempo de 24h de cultivo, observa-se que a maior concentração de massa celular seca ($3,840 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida no ensaio 2, no qual estão presentes os níveis destacados com maior significância (pH inicial e concentração de soro de queijo desidratado).

6.4.1.2.2- Interpretação dos resultados do cultivo de *B. subtilis* CCT0534 em 48h

A Tabela 6.6 e a Figura 6.4 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para o tempo de 48h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos ao intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.6: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *B. subtilis* CCT0534 para 48h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	0,967684*	0,005298*	182,6464*	0,000030*
Temp. de incubação (°C)	-0,288125*	0,011547*	-24,9524*	0,001602*
pH inicial	1,517875*	0,011547*	131,4518*	0,000058*
Agitação (rpm)	0,344375*	0,011547*	29,8237*	0,001122*
SQD (g.L ⁻¹)	-0,724875*	0,011547*	-62,7760*	0,000254*
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,281875*	0,011547*	24,4111*	0,001674*
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,330625*	0,011547*	-28,6330*	0,001218*
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,554375*	0,011547*	-48,0103*	0,000434*

R = 0,65339 Erro puro = 0,0005333

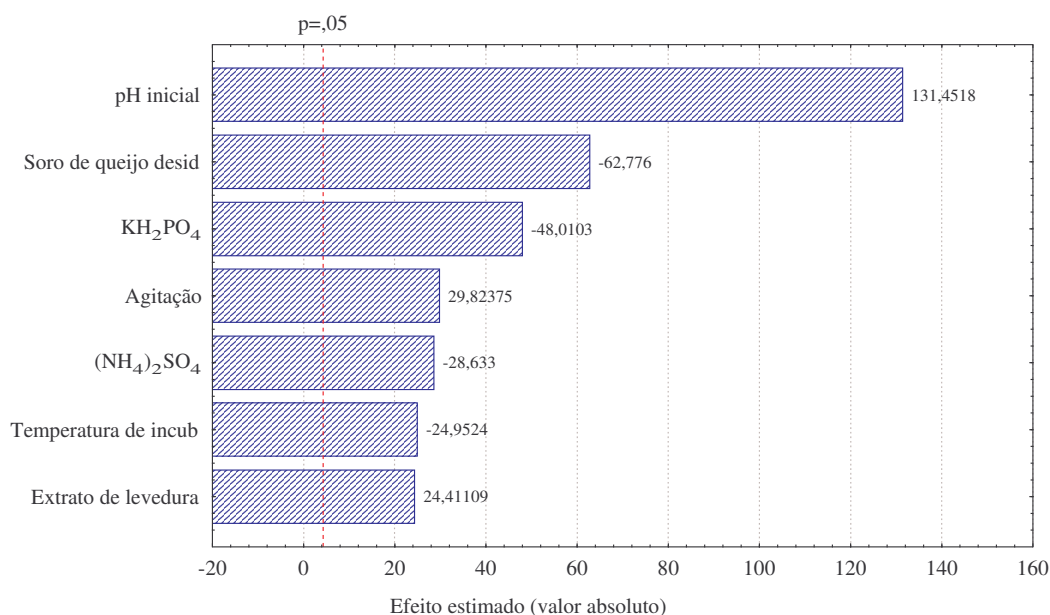


Figura 6.4: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *B. subtilis* CCT0534 para 48h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.6 que estão representados na Figura 6.4 sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que todas as variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$), em especial a variável pH inicial que apresentou maior significância na resposta com relação às demais. Seu efeito significativo foi no nível +1, o que corresponde a pH inicial próximo a 6,5 para a maior produção de biomassa. No entanto, também vale destacar a concentração de soro de queijo desidratado, pois apresentou nível -1 bastante significativo.

Comparando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.4 para o tempo de 48h de cultivo, observa-se que a maior concentração de massa celular seca ($4,230 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida no ensaio 2, no qual estão presentes os níveis destacados com maior significância (pH inicial e concentração de soro de queijo desidratado).

A partir da análise dos resultados obtidos para *B. subtilis* CCT0534, têm-se que as maiores concentrações de biomassa, para ambos os tempos (24 e 48h) de fermentação,

deram-se no ensaio 2, no qual houve aumento de apenas 10,2%. Portanto, para o planejamento fatorial composto central, ou seja, a sequência do trabalho, o cultivo ocorreu por 24h, economizando assim tempo e custos de processos.

6.4.1.3- *Kluyveromyces marxianus* CCT4294

Este microrganismo foi analisado conforme sua produção de biomassa através de planejamento para os tempos de 24 e 48h de fermentação, sendo os resultados expressos em massa celular seca (g.L^{-1}).

A Tabela 6.7 apresenta os valores de massa celular seca e pH obtidos em 24 e 48h de fermentação.

Tabela 6.7: Valores de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e pH de *K. marxianus* CCT4294 em 24 e 48h de fermentação.

Ensaio	24h		48h	
	MCS	pH	MCS	pH
1	3,07	3,37	3,12	3,30
2	3,10	5,61	3,46	5,90
3	4,59	5,87	6,06	5,79
4	8,60	4,73	7,69	4,72
5	8,31	4,63	7,63	4,49
6	2,56	3,45	2,94	3,43
7	7,30	4,53	7,54	4,52
8	4,06	3,34	4,23	3,43
9	5,82	4,79	5,80	4,68
10	5,43	5,54	7,74	5,70
11	2,94	3,55	2,30	3,49
12	2,00	3,39	2,14	3,41
13	3,70	4,67	4,74	5,70
14	3,96	3,00	4,84	2,87
15	1,86	3,65	2,48	3,58
16	3,40	3,89	3,99	4,88
17	7,01	4,34	6,77	3,91
18	7,34	4,24	6,76	3,90
19	7,26	4,18	6,66	3,90

Os resultados da Tabela 6.7 mostram, tanto para o tempo de 24h como para de 48h de fermentação, concentrações de biomassa variando de 1,86 g.L⁻¹ até próximas a 8,60 g.L⁻¹. Estes resultados atingiram valores mais significativos quando comparados com os demais microrganismos estudados (Tabelas 6.1, 6.4 e 6.10), como no caso do ensaio 4, que apresentou produção máxima de 8,60 g.L⁻¹ para o tempo de cultivo de 24h com valor do pH final 4,73. Relacionando cada ensaio separadamente, para 24 e 48h, observa-se que com aumento do tempo de fermentação ocorreram situações de aumento e de diminuição nas concentrações de biomassa.

6.4.1.3.1- Interpretação dos resultados do cultivo de *K. marxianus* CCT4294 em 24h

A Tabela 6.8 e a Figura 6.5 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para o tempo de 24h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.8: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *K. marxianus* CCT4294 para 24h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	4,858421*	0,039492*	123,0217*	0,000066*
Temp. de incubação (°C)	-0,387500*	0,086072*	-4,5021*	0,045963*
pH inicial	2,875000*	0,086072*	33,4024*	0,000895*
Agitação (rpm)	1,275000*	0,086072*	14,8132*	0,004526*
SQD (g.L ⁻¹)	1,010000*	0,086072*	11,7344*	0,007184*
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,270000	0,086072	3,1369	0,088361
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,477500*	0,086072*	-5,5477*	0,030989*
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,082500	0,086072	-0,9585	0,438956

R = 0,52224 Erro puro = 0,0296333

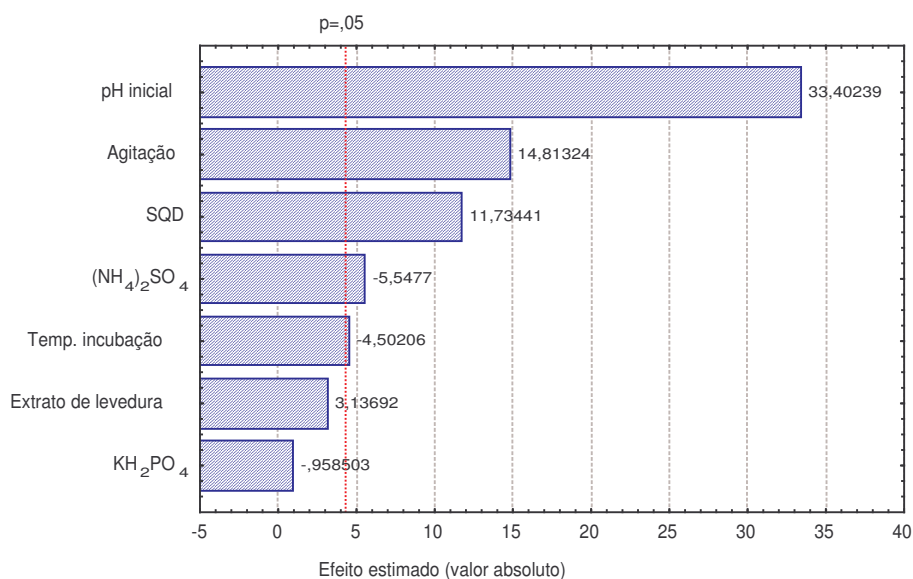


Figura 6.5: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *K. marxianus* CCT4294 para 24h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.8 que estão representados na Figura 6.5 sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que as variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) foram: pH inicial, agitação, concentração de soro de queijo desidratado, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e temperatura de incubação. No entanto, as três primeiras foram as de maior significância na resposta com relação às demais. Estas apresentaram seus efeitos significativos no nível +1, o que corresponde a maior produção de biomassa com pH inicial 6,5, agitação 300 rpm e concentração de soro de queijo desidratado 15,0 % p/v.

Comparando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.7 para o tempo de 24h de cultivo, observa-se que as maiores concentrações de massa celular seca (8,60 e 8,31 g.L⁻¹) foram obtidas nos ensaios 4 e 5, respectivamente, nos quais estão presentes os níveis de maior significância (pH inicial, agitação e concentração de soro de queijo desidratado).

Em relação à temperatura de incubação, a maior concentração de biomassa foi obtida a 35°C (ensaio 4), porém o efeito significativo foi a 28°C (nível -1).

6.4.1.3.2- Interpretação dos resultados do cultivo de *K. marxianus* CCT4294 em 48h

A Tabela 6.9 e a Figura 6.6 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para o tempo de 48h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.9: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *K. marxianus* CCT4294 para 48h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	5,099474*	0,013955*	365,4276*	0,000007*
Temp. de incubação (°C)	-0,727500*	0,030414*	-23,9201*	0,001743*
pH inicial	3,077500*	0,030414*	101,1876*	0,000098*
Agitação (rpm)	1,270000*	0,030414*	41,7573*	0,000573*
SQD (g.L ⁻¹)	0,042500	0,030414	1,3974	0,297137
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,432500*	0,030414*	14,2205*	0,004909*
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,625000*	0,030414*	-20,5499*	0,002360*
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	0,620000*	0,030414*	20,3855*	0,002398*

R = 0,69535 Erro puro = 0,0037

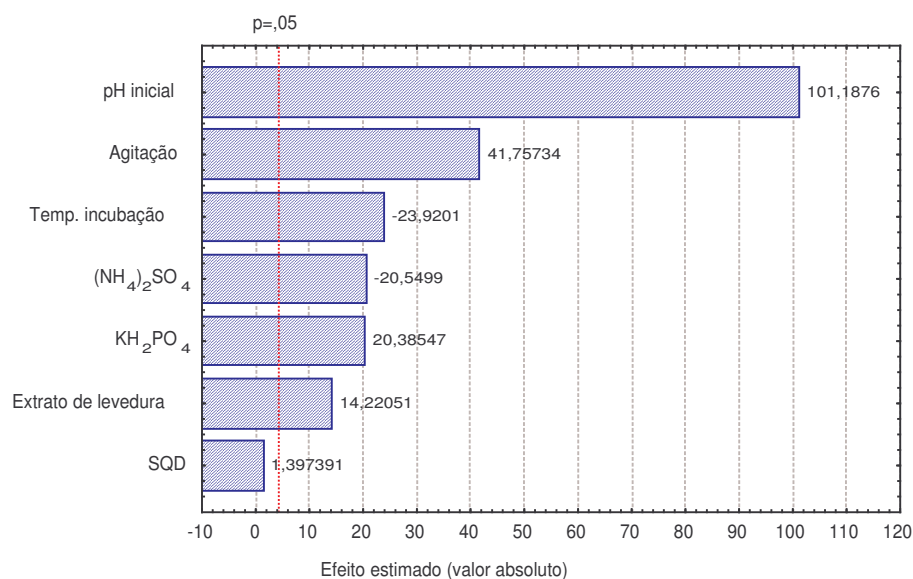


Figura 6.6: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *K. marxianus* CCT4294 para 48h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.9 que estão representados na Figura 6.6 sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que, com exceção da concentração de soro de queijo desidratado, todas as outras variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). O pH inicial foi a variável que apresentou maior significância, em nível +1, o que corresponde a maior produção de biomassa em pH inicial 6,5.

Comparando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.7 para o tempo de 48h de cultivo, observa-se que as maiores concentrações de massa celular seca (7,74 e 7,69 g.L⁻¹) foram obtidas nos ensaios 10 e 4, respectivamente, nos quais está presente o nível de maior significância (pH inicial). No entanto, os melhores resultados (8,60 e 8,31 g.L⁻¹) foram obtidos em 24h de fermentação.

A partir da análise dos resultados para *K. marxianus* CCT4294, têm-se que as maiores concentrações de biomassa foram obtidas nos ensaios 4 e 5 em 24h de

fermentação. Portanto, para o planejamento fatorial composto central o cultivo ocorreu por 24h.

6.4.1.4- *Candida sp*

Este microrganismo foi analisado conforme sua produção de biomassa através de planejamento para os tempos de 24 e 48h de fermentação, no qual os resultados foram expressos em massa celular seca (g.L^{-1}).

A Tabela 6.10 apresenta os valores de massa celular seca obtidos em 24 e 48h de fermentação.

Tabela 6.10: Valores de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) de *Candida sp* em 24 e 48h de fermentação.

Ensaio	24h		48h	
	MCS	pH	MCS	pH
1	2,51	4,60	3,28	6,68
2	1,18	7,24	1,12	7,20
3	1,47	6,12	2,38	6,48
4	4,58	6,23	6,96	7,77
5	4,51	6,51	6,94	6,49
6	3,93	3,78	1,18	3,65
7	2,19	4,51	3,01	4,61
8	2,73	3,40	2,28	3,59
9	1,48	5,58	2,43	5,87
10	4,36	6,17	4,24	6,29
11	4,98	3,81	2,04	6,06
12	1,13	3,57	1,81	3,45
13	2,06	4,57	3,40	6,78
14	1,81	3,40	1,85	3,60
15	0,68	3,57	1,63	3,60
16	1,74	5,15	1,77	6,41
17	3,33	5,65	4,86	6,25
18	3,37	5,84	5,05	6,33
19	3,19	5,86	4,59	6,33

Os resultados da Tabela 6.10 mostram, para 24h e 48h de fermentação, concentrações de biomassa variando de 0,68 g.L⁻¹ até 6,96 g.L⁻¹. Quando o tempo de fermentação passou de 24 para 48h, observou-se aumento na produção de biomassa de aproximadamente 52% como no caso do ensaio 4, com produção máxima de 6,96 g.L⁻¹, valor este consideravelmente viável para realização de fermentação em 48h.

6.4.1.4.1- Interpretação dos resultados do cultivo de *Candida* sp em 24h

A Tabela 6.11 e a Figura 6.7 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para o tempo de 24h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.11: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *Candida* sp para 24h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	2,69632*	0,021684*	124,3486*	0,000065*
Temp. de incubação (°C)	-0,41500*	0,047258*	-8,7816*	0,012721*
pH inicial	0,29000*	0,047258*	6,1365*	0,025543*
Agitação (rpm)	1,92500*	0,047258*	40,7337*	0,000602*
SQD (g.L ⁻¹)	0,70250*	0,047258*	14,8652*	0,004495*
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,68750*	0,047258*	14,5478*	0,004692*
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,07750	0,047258	-1,6399	0,242700
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	-1,20500*	0,047258*	-25,4982*	0,001535*

R = 0,80734 Erro puro = 0,0089333

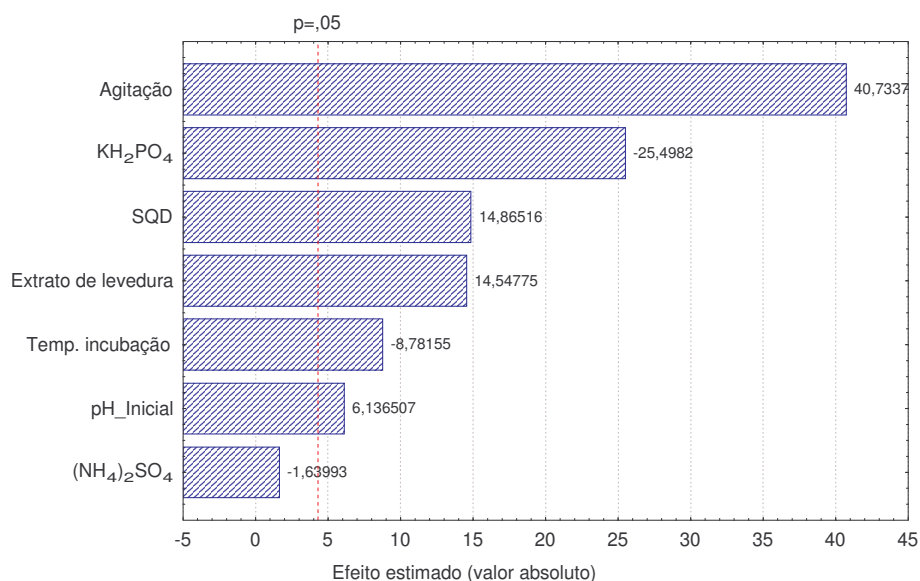


Figura 6.7: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *Candida* sp para 24h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.11 que estão representados na Figura 6.7 sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que, com exceção da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, todas as outras variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). As variáveis de maior significância foram a agitação no nível +1 e a concentração de KH_2PO_4 no nível -1, correspondendo a maior produção de biomassa em 300 rpm e 0,2 % p/v, respectivamente.

Comparando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.10 para o tempo de 24h de cultivo, observa-se que a maior concentração de massa celular seca ($4,98 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida no ensaio 11, no qual estão presentes os níveis de maior significância (agitação e concentração de KH_2PO_4).

6.4.1.4.2- Interpretação dos resultados do cultivo de *Candida* sp em 48h

A Tabela 6.12 e a Figura 6.8 apresentam os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca para o tempo de 48h de cultivo. Os parâmetros com (*) são estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.12: Valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca de *Candida* sp para 48h de cultivo.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	p
Média	3,23368*	0,053031*	60,9773*	0,000269*
Temp. de incubação (°C)	-0,35250	0,115578	-3,0499	0,092786
pH inicial	1,75250*	0,115578*	15,1629*	0,004321*
Agitação (rpm)	1,25500*	0,115578*	10,8584*	0,008375*
SQD (g.L ⁻¹)	0,78750*	0,115578*	6,8136*	0,020868*
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	0,82250*	0,115578*	7,1164*	0,019180*
(NH ₄)SO ₄ (g.L ⁻¹)	-1,38500*	0,115578*	-11,9832*	0,006892*
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	-0,96000*	0,115578*	-8,3061*	0,014187*

R = 0,64327 Erro puro = 0,0534333

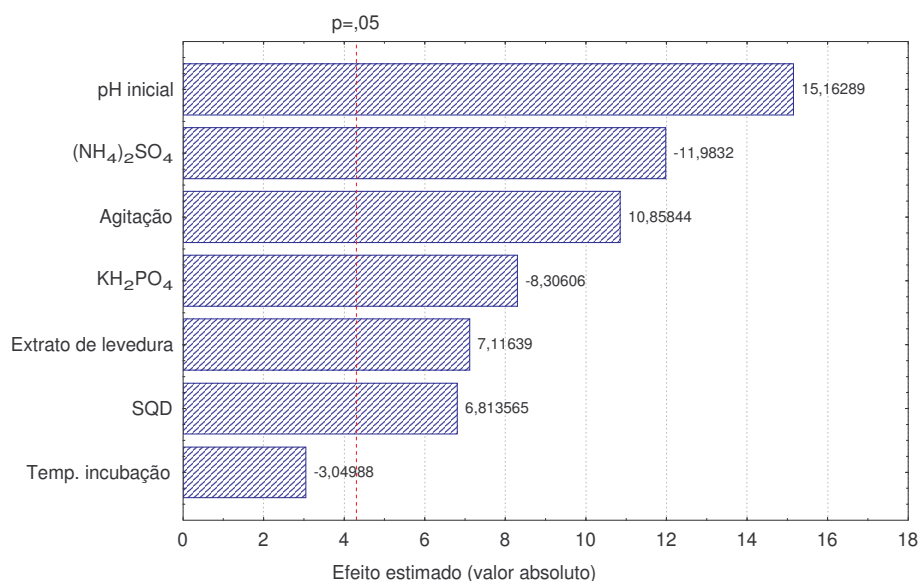


Figura 6.8: Gráfico de Pareto com representação dos efeitos estimados das variáveis estudadas para a resposta massa celular seca de *Candida* sp para 48h de cultivo.

Analisando os resultados da Tabela 6.12 que estão representados na Figura 6.8 sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que, com exceção da temperatura de incubação, todas as outras variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). As variáveis de maior significância para produção de biomassa foram o pH inicial 6,5 (nível +1), concentração de (NH₄)₂SO₄ de 0,2 % p/v (nível -1) e agitação de 300 rpm (nível +1).

Comparando os resultados estatísticos com os valores da Tabela 6.10 para o tempo de 48h de cultivo, observa-se que as maiores concentrações de massa celular seca (6,96 e 6,94 g.L⁻¹) foram obtidas nos ensaios 4 e 5, respectivamente, nos quais estão presentes os níveis de maior significância (pH inicial, concentração de (NH₄)₂SO₄ e agitação). Em relação à temperatura de incubação, a maior concentração de biomassa foi obtida a 35°C (ensaio 4), porém o efeito significativo foi a 28°C (nível -1).

A partir da análise dos resultados para *Candida* sp, observa-se que as maiores concentrações de biomassa ocorreram nos ensaios 4 e 5 em 48h de fermentação. Portanto, para o planejamento fatorial composto central o cultivo foi mantido em 48h.

6.4.1.5- *Saccharomyces cerevisiae*

Este microrganismo foi analisado conforme sua produção de biomassa, sem utilização de planejamento, para os tempos de 24 e 48h de fermentação, no qual os resultados foram expressos em massa celular seca (g.L^{-1}) e estão mostrados na Tabela 6.13.

Tabela 6.13: Valores de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e pH de *Saccharomyces cerevisiae* em 24 e 48h de fermentação.

Agitação (rpm)	24h		48h	
	MCS	pH	MCS	pH
100	5,26	4,1	5,23	3,74
300	6,93	3,4	7,99	2,90

Pela Tabela 6.13, observa-se que o melhor resultado obtido para a concentração de biomassa foi $7,99 \text{ g.L}^{-1}$ em 48h de cultivo a uma agitação de 300rpm. Portanto, este meio foi utilizado para quantificação de ribonucleotídeos.

O Quadro 6.2 apresenta os melhores resultados de concentração de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) obtidos para os microrganismos estudados, respectivamente com seus níveis significativos e suas variáveis mais importantes destacadas com asterísco.

Quadro 6.2: Resultados das concentrações de biomassa e das variáveis analisadas pelo planejamento Plackett Burman com seus melhores níveis para as cepas estudadas nos tempos de 24 e 48h de fermentação.

Microrganismos		T (°C)	pH	Agitação (rpm)	Concentração (% p/v)				MCS (g.L ⁻¹)
					SQD	Ext. lev.	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	
<i>C. utilis</i> CCT3469	24h	35	3,5	300*	3,0*	0,2	1,0	0,2*	1,92
	48h	35	3,5	300*	3,0	1,0	1,0	0,2	2,90
<i>B. subtilis</i> CCT0534	24h	35	6,5*	300	3,0*	0,2	0,2	0,2	3,84
	48h	28	6,5*	300	3,0*	1,0	0,2	0,2	4,23
<i>K. marxianus</i> CCT4294	24h	28	6,5*	300*	15,0*	1,0	0,2	0,2	8,60
	48h	28	6,5*	300*	15,0	1,0	0,2	1,0	7,74
<i>Candida sp</i>	24h	28	6,5	300*	15,0	1,0	0,2	0,2*	4,98
	48h	28	6,5*	300*	15,0	1,0	0,2*	0,2	6,96

Dos resultados apresentados para a produção de biomassa, observa-se que para todos os microrganismos estudados a variável agitação apresentou efeito estatisticamente significativo no nível +1, que corresponde à agitação de 300 rpm. Isto pode ser justificado pelo fato de que quanto maior a agitação maior é a transferência de oxigênio ao meio. Portanto para os demais experimentos fixou-se a agitação em 300 rpm.

Os microrganismos *B. subtilis* CCT0534, *K. marxianus* CCT4294 e a *Candida sp* foram os que apresentaram mais de uma variável com efeito de maior significância. Portanto, devido a isto, estes foram selecionados para a realização do planejamento fatorial composto central com seus melhores tempos de fermentação.

6.4.2- Determinação dos melhores níveis das variáveis operacionais do processo de produção de biomassa

A partir das informações obtidas do planejamento Plackett Burman, utilizou-se a técnica de superfície de resposta através da realização de um planejamento fatorial composto central, com o objetivo de determinar os níveis das variáveis operacionais que resultem maiores concentrações de biomassa no processo de fermentação. Neste tipo de planejamento o número de níveis aumenta de 3 para 5, em relação ao planejamento de Plackett Burman, possibilitando assim verificar efeitos de segunda ordem na resposta, além de aumentar a faixa de estudo das variáveis e permitir verificar efeitos de interações entre os fatores.

Nos experimentos subsequentes, as variáveis selecionadas foram as de maior significância para a realização de um planejamento fatorial completo 2^2 , mais quatro pontos axiais e três pontos centrais, ou seja, planejamento estrela ou composto central. As demais variáveis foram fixadas conforme a representação dos efeitos na resposta de produção de biomassa para cada microrganismo estudado.

6.4.2.1- Bacillus subtilis CCT0534

As variáveis mais significativas para o *B. subtilis* CCT0534 foram o pH inicial e a concentração de soro de queijo desidratado (SQD), que estão representadas na Tabela 6.14, juntamente com os níveis dos fatores utilizados no planejamento. Para este experimento os demais fatores, como temperatura de incubação de 35°C e as concentrações (% p/v) de 0,2 para KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e extrato de levedura, foram utilizados, conforme planejamento Plackett Burman, para o tempo de 24h de fermentação.

Tabela 6.14: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para o *B. subtilis* CCT0534.

Fatores	Níveis				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
pH inicial	6,0	6,15	6,5	6,85	7,0
SQD	1,0	1,58	3,0	4,42	5,0

A matriz do planejamento fatorial composto central e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.15.

Tabela 6.15: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para o *B. subtilis* CCT0534.

Ensaio	Níveis dos fatores		Respostas	
	pH inicial	SQD	MCS	pH final
1	-1	-1	1,27	7,98
2	1	-1	1,36	8,24
3	-1	1	2,58	7,41
4	1	1	2,29	7,71
5	0	0	1,80	7,83
6	0	0	2,08	7,88
7	0	0	1,90	7,83
8	-1,41	0	1,91	7,57
9	0	1,41	2,61	7,51
10	1,41	0	1,70	8,04
11	0	-1,41	0,98	8,17

A Tabela 6.16 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca (g.L^{-1}), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição

normal padrão. Os valores marcados com asterisco são significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.16: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca do *B. subtilis* CCT0534.

		Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média		1,929699*	0,085048*	22,68953*	0,001937*
pH inicial	L	-0,124395	0,104319	-1,19245	0,355378
	Q	-0,087332	0,124479	-0,70158	0,555592
SQD	L	1,137960*	0,104319*	10,90851*	0,008299*
	Q	-0,097391	0,124479	-0,78239	0,515910
pH inicial x SQD		-0,190000	0,147309	-1,28980	0,326139

$R^2 = 0,9792$ Erro puro = 0,0217

Para obter um modelo estatístico que descreva o comportamento da produção de massa celular seca em diversas condições, foi necessário fazer a análise de variância do processo, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.17.

Tabela 6.17: Análise de variância das respostas de massa celular seca para o *B. subtilis* CCT0534.

	SQ	GL	MQ	F calculado	F (0,95-5-5)
Regressão	2,6677	5	0,5335	47,21	5,05
Resíduos	0,0566	5	0,0113		
Falta ajuste	0,01325	3			
Erro puro	0,04340	2			
Total	2,7244	10			

$R^2 = 0,9792$

F calc./F tab. = 9,35

O modelo estatístico que representa a relação entre as variáveis pH inicial e concentração de soro de queijo desidratado, para estimar a concentração de massa celular seca, é apresentado na Equação 6.1.

$$MCS = 1,93 - 0,062.(pH) - 0,044.(pH)^2 + 0,57.(SQD) - 0,05.(SQD)^2 - 0,095.(pH).(SQD) \quad (6.1)$$

Um modelo estatístico para ser válido deve possuir uma correlação elevada e uma relação entre o F calculado e tabelado superior a 4 vezes. Na Tabela 6.17 pode-se verificar que estas condições foram satisfatórias ao nível de 95% de confiança, no qual a relação de F calculado e tabelado foi de 9,35 e o coeficiente de determinação 0,9792, sendo válido assim os parâmetros do estudo. Obteve-se então o modelo quadrático que representa o comportamento da concentração de massa celular seca dentro de uma determinada faixa de pH inicial do meio e concentração de soro de queijo desidratado.

A Figura 6.9 apresenta a superfície de resposta obtida neste estudo.

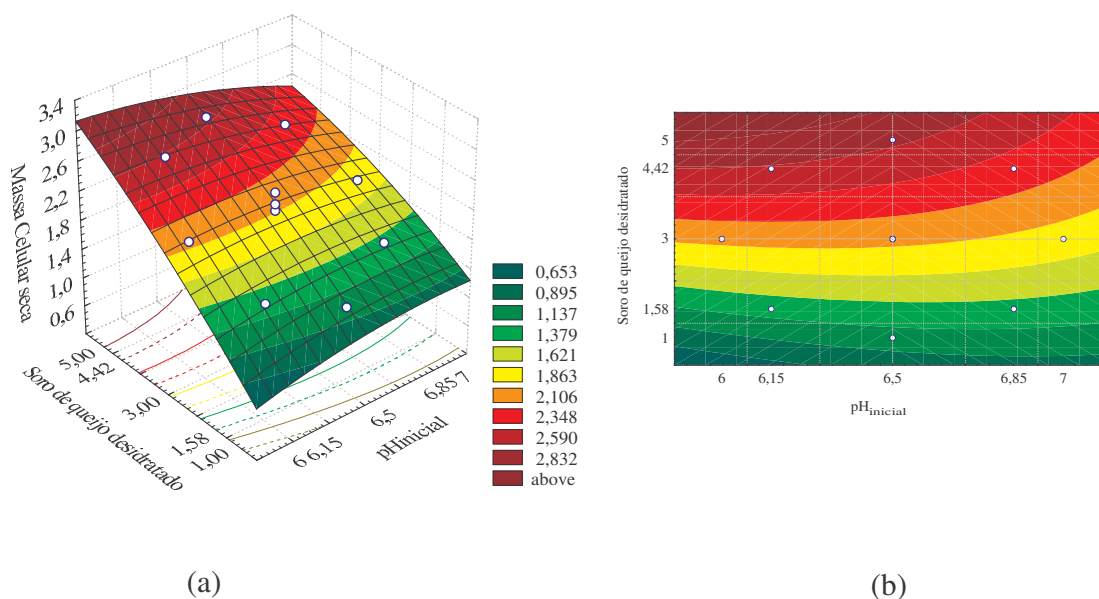


Figura 6.9: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de SQD para o *B. subtilis* CCT0534 em 24h de fermentação.

Na Figura 6.9 (a) e (b) observa-se que a concentração de massa celular seca aumenta conforme o aumento da concentração de soro de queijo desidratado e a diminuição do pH inicial do meio. A maior produção de biomassa foi $2,61 \text{ g.L}^{-1}$ a pH inicial do meio de 6,5 e concentração de soro de queijo desidratado de 5,0 % p/v, correspondendo ao ensaio 9, atingindo assim valor consideravelmente pouco significativo quando comparado com os demais microrganismos estudados.

6.4.2.2- *Kluyveromyces marxianus* CCT4294 (28°)

As variáveis mais significativas para a *K. marxianus* CCT4294 também foram o pH inicial e a concentração de soro de queijo desidratado (SQD), que estão representadas na Tabela 6.18, juntamente com os níveis dos fatores utilizados no planejamento. Para o soro de queijo desidratado a melhor resposta foi em sua maior concentração (15,0% p/v). Para

este experimento, os demais fatores como temperatura de incubação (28°C) e as concentrações (% p/v) de KH_2PO_4 (0,2) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2) e de extrato de levedura (1,0), tiveram seus níveis fixados, conforme o planejamento Plackett Burman, para o tempo de 24h de fermentação.

Tabela 6.18: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a *K. marxianus* CCT4294. (28°C)

Fatores	Níveis				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
pH inicial	6,0	6,15	6,5	6,85	7,0
SQD	10,0	11,5	15,0	18,5	20,0

A matriz do planejamento fatorial composto central e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.19.

Tabela 6.19: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a *K. marxianus* CCT4294. (28°C)

Ensaio	Níveis dos fatores		Respostas	
	pH inicial	SQD	MCS	pH final
1	-1	-1	9,52	5,53
2	1	-1	9,18	5,93
3	-1	1	11,97	4,72
4	1	1	12,97	4,93
5	0	0	12,27	5,15
6	0	0	11,72	5,08
7	0	0	13,54	5,08
8	-1,41	0	11,93	4,93
9	0	1,41	11,79	4,77
10	1,41	0	11,17	5,26
11	0	-1,41	9,04	6,09

A Tabela 6.20 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca (g.L^{-1}), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição normal padrão. Os valores marcados com asterisco são significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.20: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da *K. marxianus* CCT4294 (28°C).

		Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média		12,51025*	0,538912*	23,21389*	0,001851
pH inicial	L	-0,10321	0,661022	-0,15613	0,890264
	Q	-0,99787	0,788771	-1,26509	0,333281
SQD	L	2,53692	0,661022	3,83788	0,061677
	Q	-2,13966	0,788771	-2,71265	0,113270
pH inicial x SQD		0,67000	0,933435	0,71778	0,547411

$R^2 = 0,87647$ Erro puro = 0,8713

Como já relatado, para obter um modelo estatístico que descreva o comportamento da produção de massa celular seca em diversas condições, foi necessário fazer a análise de variância do processo, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.21.

Tabela 6.21: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a *K. marxianus* CCT4294. (28°C)

	SQ	GL	MQ	F calculado	F (0,95-5-5)
Regressão	19,93	5	3,986	7,09	5,05
Resíduos	2,809	5	0,5618		
Falta ajuste	1,0664	3			
Erro puro	1,7426	2			
Total	22,7388	10			

$R^2 = 0,87647$

F calc./F tab. = 1,404

O modelo estatístico que representa a relação entre as variáveis pH inicial e concentração de soro de queijo desidratado, para estimar a concentração de massa celular seca, é apresentado na Equação 6.2.

$$MCS = 12,51 - 0,052.(pH) - 0,5.(pH)^2 + 1,27.(SQD) - 1,07.(SQD)^2 - 0,335.(pH).(SQD) \quad (6.2)$$

Na Tabela 6.21 pode-se ver que as condições de fermentação não permitiram obter bons resultados analíticos, pois a relação do F calculado com o tabelado foi de 1,404, quando o ideal seria esta razão ser maior ou igual a 4. Mesmo nestas condições, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da concentração de massa celular seca dentro de determinada faixa de pH inicial do meio e concentração de soro de queijo desidratado. Pois mesmo a relação sendo menor que 4, o F calculado foi superior ao tabelado, sendo válido assim os parâmetros neste tipo de processo de fermentação em estudo.

A Figura 6.10 apresenta a superfície de resposta obtida neste estudo.

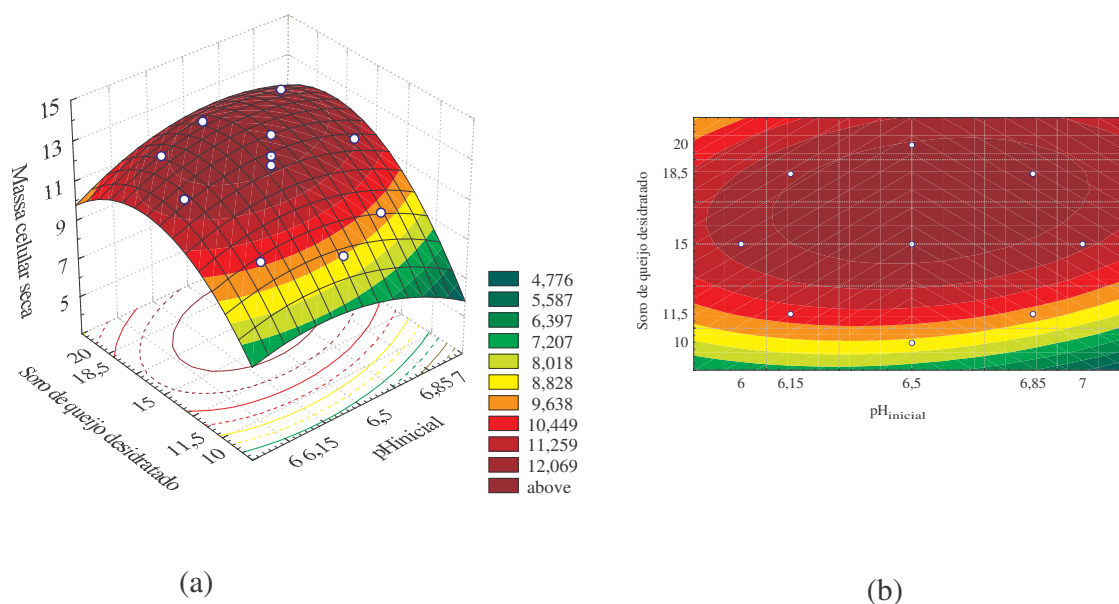


Figura 6.10: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de SQD para a *K. marxianus* CCT4294 em 24h de fermentação a 28°C.

Na Figura 6.10 (a) e (b) observa-se que, para a maior concentração de massa celular seca, o pH inicial ideal tende ao ponto central (6,5) e a concentração de soro de queijo desidratado entre o ponto central e o nível +1 tendendo ao central (15,0 % p/v). A maior produção de biomassa foi 13,54 g.L⁻¹ a pH inicial do meio de 6,5 e concentração de soro de queijo desidratado de 15,0 % p/v, correspondendo ao ensaio 7, atingindo assim valores mais significativos que os demais microrganismos estudados. Este resultado confirma os relatos de Inchaurrondo *et. al.* (1994), que quanto maior a concentração de lactose no meio maior será a produção de biomassa, pois a lactose presente no meio é consumida e transformada em biomassa.

Na fermentação para produção de biomassa na fase de definição das variáveis mais significativas do processo (planejamento Plackett Burman), para este microrganismo (item 6.4.1.3) a temperatura apresentou efeito no nível -1, que corresponde a 28°C. No entanto, a

maior produção de biomassa ($8,60 \text{ g.L}^{-1}$) ocorreu no ensaio 4, no qual a temperatura de incubação foi de 35°C . Portanto, optou-se em fazer também este mesmo experimento mudando somente a temperatura de 28 para 35°C .

6.4.2.3- *Kluyveromyces marxianus* CCT4294 (35°C)

A Tabela 6.22 apresenta os níveis dos fatores utilizados no planejamento para a temperatura de incubação de 35°C .

Tabela 6.22: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a *K. marxianus* CCT4294. (35°C)

Fatores	Níveis				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
pH inicial	6,0	6,15	6,5	6,85	7,0
SQD	10,0	11,5	15,0	18,5	20,0

A matriz do planejamento fatorial composto central e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.23.

Tabela 6.23: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a *K. marxianus* CCT4294. (35°C)

Ensaio	Níveis dos fatores		Respostas	
	pH inicial	SQD	MCS	pH final
1	-1	-1	8,37	4,98
2	1	-1	8,53	5,22
3	-1	1	8,38	4,79
4	1	1	9,14	5,04
5	0	0	8,76	5,02
6	0	0	8,86	5,01
7	0	0	8,62	5,03
8	-1,41	0	8,41	4,91
9	0	1,41	8,03	4,82
10	1,41	0	9,58	5,08
11	0	-1,41	8,52	5,31

A Tabela 6.24 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca (g.L^{-1}), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição normal padrão. Os valores marcados com asterisco são significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.24: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da *K. marxianus* CCT4294 (35°C).

		Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média		8,746783*	0,069601*	125,6700*	0,000063*
pH inicial	L	0,644342*	0,085372*	7,5475*	0,017106*
	Q	0,234950	0,101871	2,3063	0,147505
SQD	L	-0,017778	0,085372	-0,2082	0,854322
	Q	-0,489360*	0,101871*	-4,8037*	0,040708*
pH inicial x SQD		0,300000	0,120554	2,4885	0,130587

$R^2 = 0,82397$ Erro puro = 0,0145333

A Tabela 6.25 mostra a análise de variância das respostas de massa celular seca para a *K. marxianus* CCT4294 cultivada a 35°C.

Tabela 6.25: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a *K. marxianus* CCT4294. (35°C)

	SQ	GL	MQ	F calculado	F (0,95-5-5)
Regressão	1,472	5	0,2944	4,68	5,05
Resíduos	0,3145	5	0,0629		
Falta ajuste	0,2854	3			
Erro puro	0,0291	2			
Total	1,7865	10			
$R^2 = 0,82397$				F calc./F tab. = 0,927	

O modelo estatístico que representa a relação entre as variáveis pH inicial e concentração de soro de queijo desidratado, para estimar a concentração de massa celular seca, é apresentado na Equação 6.3.

$$MCS = 8,747 + 0,322.(pH) + 0,117.(pH)^2 - 0,009.(SQD) - 0,245.(SQD)^2 + 0,15.(pH).(SQD) \quad (6.3)$$

Na Tabela 6.25 pode-se ver que as condições não foram alcançadas, pois o F calculado foi menor que o tabelado e a relação foi de 0,927. Portanto, este modelo não descreve com precisão o comportamento da produção de massa celular seca dentro de uma determinada faixa de pH inicial do meio e concentração de soro de queijo desidratado. Porém, o valor do F calculado se aproxima do F tabelado, podendo ser válido assim, os parâmetros neste tipo de processo de fermentação em estudo.

A Figura 6.11 apresenta a superfície de resposta obtida neste estudo.

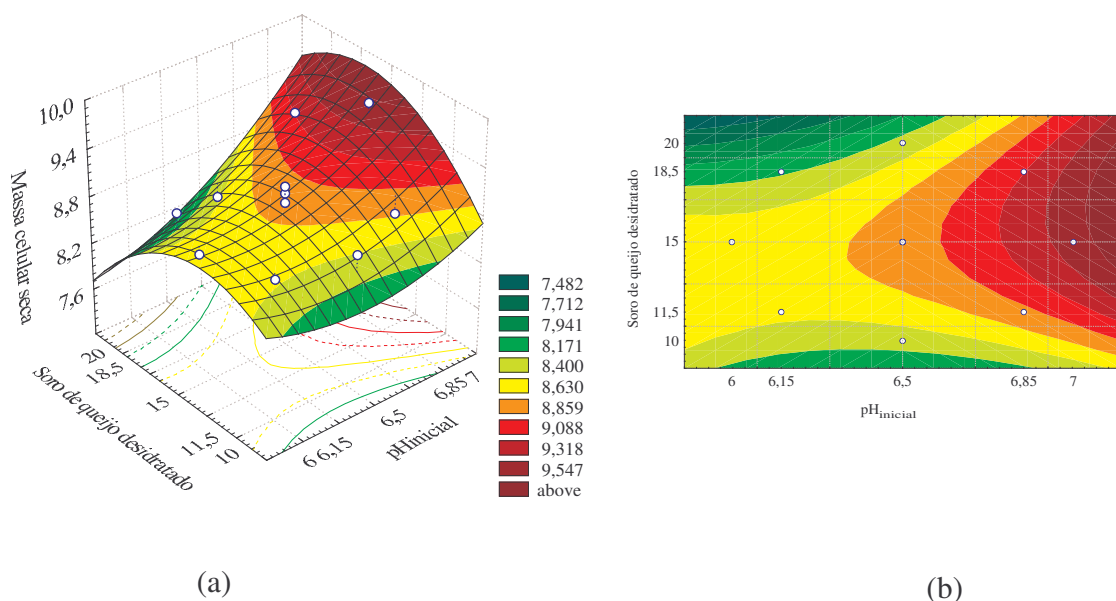


Figura 6.11: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de SQD para a *K. marxianus* CCT4294 em 24h de fermentação a 35°C.

Na Figura 6.11 (a) e (b) observa-se que a concentração de soro de queijo desidratado ideal está na região entre o ponto central e o nível +1, tendendo ao central (15,0 % p/v) e aumentando o valor do pH inicial aumenta a concentração de massa celular seca. A maior produção de biomassa obtida foi 9,58 g.L⁻¹ a pH inicial do meio de 7,0 e a concentração de soro de queijo desidratado de 15,0 % p/v, atingindo assim valores também significativos, porém menores que os obtidos a 28°C. Confirmando também o que Inchaurredo *et. al.* (1994) relatam, que quanto maior a concentração de lactose no meio maior a produção de biomassa.

Analisando os resultados obtidos para ambas as temperaturas (28 e 35°C), tem-se que o cultivo a 28°C apresentou melhores valores, sendo assim ideal para a produção de biomassa, como dado no planejamento Plackett Burman. Portanto, para a realização das

fermentações em fermentador de bancada (Bioflo III) e produção de biomassa para quantificação de ribonucleotídeos a temperatura utilizada foi a de 28°C, com as concentrações (% p/v) de soro de queijo desidratado 15,0, KH₂PO₄ 0,2, (NH₄)₂SO₄ 0,2 e extrato de levedura 1,0 a pH inicial de 6,5 e agitação de 300 rpm.

6.4.2.4- *Candida sp* (28°C)

As variáveis mais significativas para a *Candida sp* foram o pH inicial e a concentração de (NH₄)₂SO₄, que estão representadas na Tabela 6.26, juntamente com os níveis dos fatores utilizados no planejamento Plackett Burman. Para este experimento os demais fatores, como temperatura de incubação de 28°C e as concentrações (% p/v) de 0,2 de KH₂PO₄, 1,0 de extrato de levedura e 15,0 de soro de queijo desidratado, foram utilizados, conforme planejamento Plackett Burman, para o tempo de 48h de fermentação.

Tabela 6.26: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a *Candida sp*. (28°C)

Fatores	Níveis				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
pH inicial	6,0	6,15	6,5	6,85	7,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1	0,13	0,2	0,27	0,3

A matriz do planejamento fatorial composto central e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.27.

Tabela 6.27: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a *Candida sp.* (28°C)

Ensaio	Níveis dos fatores		Respostas	
	pH inicial	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	MCS	pH final
1	-1	-1	3,12	6,81
2	1	-1	3,18	7,27
3	-1	1	2,95	6,79
4	1	1	3,66	7,29
5	0	0	3,20	7,05
6	0	0	4,31	7,21
7	0	0	3,78	7,11
8	-1,41	0	3,57	6,71
9	0	1,41	3,91	7,07
10	1,41	0	3,80	7,64
11	0	-1,41	3,42	7,06

A Tabela 6.28 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca (g.L^{-1}), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição normal padrão. Os valores marcados com asterisco são significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.28: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da *Candida sp* (28°C).

		Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média		3,765106*	0,320534*	11,74636*	0,007170*
pH inicial	L	0,274391	0,393162	0,69791	0,557458
	Q	-0,305400	0,469145	-0,65097	0,581865
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	L	0,250972	0,393162	0,63834	0,588593
	Q	-0,325519	0,469145	-0,39386	0,559528
pH inicial x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		0,325000	0,555188	0,58539	0,617539

$R^2 = 0,36125$ Erro puro = 0,3082333

A Tabela 6.29 mostra a análise de variância das respostas de massa celular seca para a *Candida* sp cultivada a 28°C.

Tabela 6.29: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a *Candida* sp. (28°C)

	SQ	GL	MQ	F calculado	F (0,95-5-5)
Regressão	0,5977	5	0,1195	0,56	5,05
Resíduos	1,0565	5	0,2113		
Falta ajuste	0,4401	3			
Erro puro	0,6164	2			
Total	1,6542	10			
$R^2 = 0,36125$				F calc./F tab. = 0,11	

O modelo estatístico que representa a relação entre as variáveis pH inicial e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para estimar a concentração de massa celular seca, é apresentado na Equação 6.4.

$$\text{MCS} = 3,765 + 0,137 \cdot (\text{pH}) - 0,153 \cdot (\text{pH})^2 + 0,125 \cdot ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) - 0,163 \cdot ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)^2 + 0,163 \cdot (\text{pH}) \cdot ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) \quad (6.4)$$

Na Tabela 6.29 pode-se ver que as condições não foram alcançadas, pois o F calculado foi menor que o tabelado e a relação foi de 0,11. Portanto, este modelo não descreve com precisão o comportamento da produção de massa celular seca dentro de uma determinada faixa de pH inicial do meio e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

A Figura 6.12 apresenta a superfície de resposta obtida neste estudo.

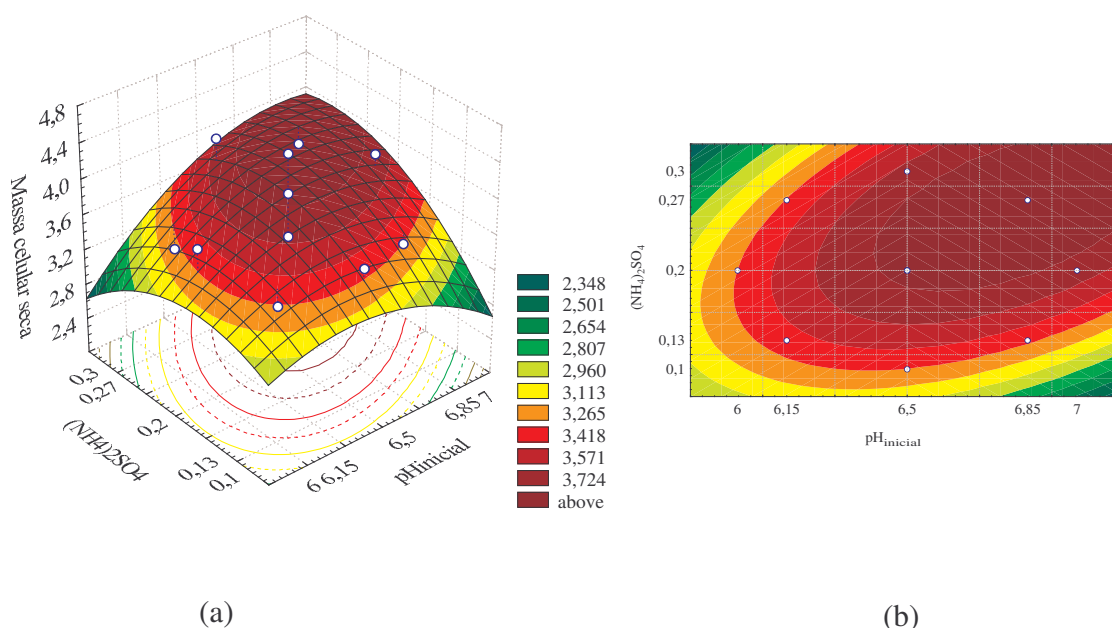


Figura 6.12: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a *Candida* sp em 48h de fermentação a 28°C.

Na Figura 6.12 (a) e (b) observa-se que, para a maior concentração de massa celular seca, tanto o pH inicial como a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tende ao nível +1. O maior valor obtido para produção de biomassa foi 4,31 g.L⁻¹ a pH inicial do meio de 6,5 e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,2 % p/v, correspondendo a região central, atingindo valores pouco significativos quando comparados com os da *K. marxianus* CCT4294.

Na fermentação para produção de biomassa na fase de definição das variáveis mais significativas do processo, planejamento Plackett Burman, para este microrganismo (item 6.4.1.4) a temperatura apresentou efeito no nível -1, que corresponde a 28°C. No entanto, a maior produção de biomassa (6,96 g.L⁻¹) ocorreu no ensaio 4, no qual a temperatura de incubação foi de 35°C. Portanto, optou-se em fazer também este mesmo experimento mudando somente a temperatura de 28 para 35°C.

6.4.2.5- *Candida sp* (35°C)

A Tabela 6.30 apresenta os níveis dos fatores utilizados no planejamento para a temperatura de incubação de 35°C.

Tabela 6.30: Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial composto central para a *Candida sp.* (35°C)

Fatores	Níveis				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
pH inicial	6,0	6,15	6,5	6,85	7,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1	0,13	0,2	0,27	0,3

A matriz do planejamento fatorial composto central e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.31.

Tabela 6.31: Respostas da concentração de massa celular seca – MCS (g.L⁻¹) e pH final obtidos da interação das variáveis através do planejamento fatorial composto central para a *Candida sp.* (35°C)

Ensaio	Níveis dos fatores		Respostas	
	pH inicial	(NH ₄) ₂ SO ₄	MCS	pH final
1	-1	-1	5,55	5,39
2	1	-1	5,43	4,89
3	-1	1	4,84	5,37
4	1	1	5,28	5,00
5	0	0	4,98	4,92
6	0	0	4,83	4,89
7	0	0	5,10	5,30
8	-1,41	0	5,10	5,35
9	0	1,41	5,36	5,31
10	1,41	0	5,86	4,84
11	0	-1,41	5,37	4,85

A Tabela 6.32 apresenta os valores dos efeitos estimados para a resposta massa celular seca (g.L^{-1}), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição normal padrão. Os valores marcados com asterisco são significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.32: Efeitos estimados para a resposta de massa celular seca da *Candida* sp (35°C).

		Efeito	Erro padrão	t(2)	p
Média		4,970596*	0,078102*	63,64271*	0,000247*
pH inicial	L	0,348938	0,095798	3,64243	0,067798
	Q	0,436903	0,114312	3,82201	0,062144
(NH ₄) ₂ SO ₄	L	-0,219177	0,095798	-2,28790	0,149384
	Q	0,321214	0,114312	2,80997	0,106749
pH inicial x (NH ₄) ₂ SO ₂		0,280000	0,135277	2,06982	0,174325

$R^2 = 0,75386$ Erro puro = 0,0183

A Tabela 6.33 mostra a análise de variância das respostas de massa celular seca para a *Candida* sp cultivada a 35°C.

Tabela 6.33: Análise de variância das respostas de massa celular seca para a *Candida* sp. (35°C)

	SQ	GL	MQ	F calculado	F (0,95-5-5)
Regressão	0,7419	5	0,1484	3,06	5,05
Resíduos	0,2422	5	0,0484		
Falta ajuste	0,2056	3			
Erro puro	0,0366	2			
Total	0,9841	10			

$R^2 = 0,75386$

F calc./F tab. = 0,606

O modelo estatístico que representa a relação entre as variáveis pH inicial e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para estimar a concentração de massa celular seca, é apresentado na Equação 6.5.

$$\text{MCS} = 4,97 + 0,174.(\text{pH}) + 0,218.(\text{pH})^2 - 0,11.((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) + 0,161.((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)^2 + 0,14.(\text{pH}).((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) \quad (6.5)$$

Na Tabela 6.33 pode-se ver que as condições não foram alcançadas, pois o F calculado foi menor que o tabelado e a relação foi de 0,606. Portanto, este modelo não descreve com precisão o comportamento da produção de massa celular seca dentro de uma determinada faixa de pH inicial do meio e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

A Figura 6.13 apresenta a superfície de resposta obtida neste estudo.

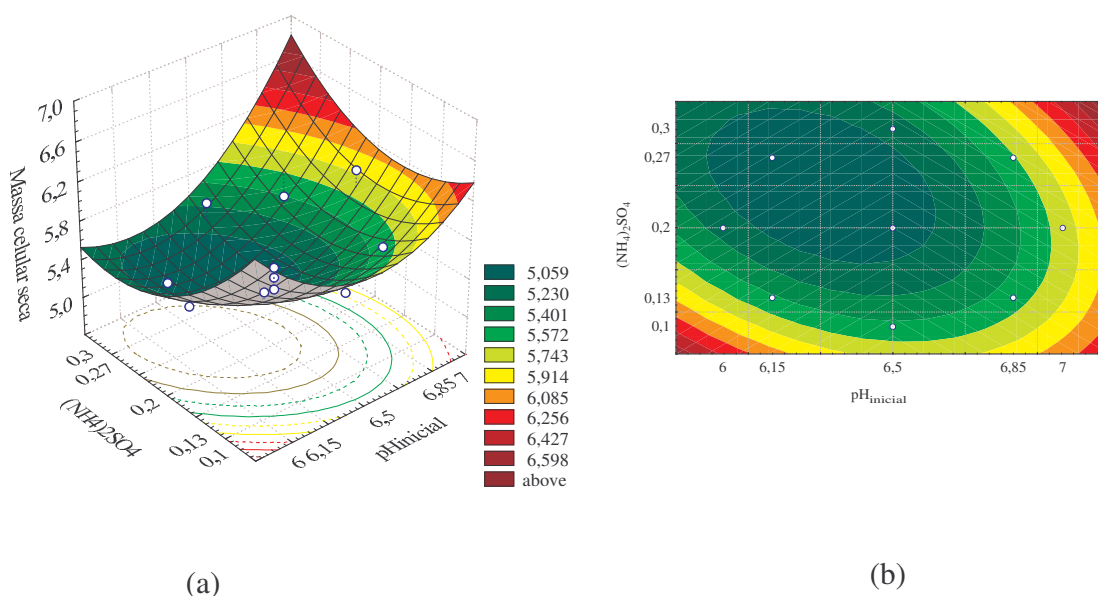


Figura 6.13: Superfície de resposta da massa celular seca em função do pH inicial e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para a *Candida* sp em 48h de fermentação a 35°C.

Na Figura 6.13 (a) e (b) observa-se que o processo precisa de ajuste para obter maior concentração de massa celular seca, tendendo aos extremos. No entanto, pelo que

vemos e pelos resultados obtidos, pode-se dizer que tanto o pH inicial como a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tende a nível $+\alpha$. A maior produção de biomassa obtida foi $5,86 \text{ g.L}^{-1}$ a pH inicial do meio de 7,0 e a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,2 % p/v, atingindo valores não tão significativos como os da *K. marxianus* CCT4294.

Analisando os resultados de concentração de massa celular seca da *Candida* sp para ambas as temperaturas (28 e 35°C), tem-se que a maior produção não foi a 28°C como dado pelo planejamento Plackett Burman, e sim a 35°C com produção de $5,86 \text{ g.L}^{-1}$.

O Quadro 6.3 apresenta os melhores resultados de concentração de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) obtidos para os microrganismos estudados, respectivamente com seus níveis significativos. Os níveis destacados com asterisco foram analisados neste planejamento, fatorial composto central, sendo os demais fixados com valores determinados no planejamento Plackett Burman.

Quadro 6.3: Resultados das concentrações de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e das variáveis analisadas pelo planejamento fatorial composto central com seus melhores níveis para as cepas estudadas nos seus respectivos tempos de fermentação.

Microrganismos	T ($^\circ\text{C}$)	pH	Agitação (rpm)	Concentração (% p/v)				MCS (g.L^{-1})
				SQD	Ext. lev.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KH_2PO_4	
<i>B. subtilis</i> CCT0534 (24h)	35	6,5*	300	5,0*	0,2	0,2	0,2	2,61
<i>K. marxianus</i> CCT4294 (24h)	28	6,5*	300	15,0*	1,0	0,2	0,2	13,54
	35	6,5*	300	15,0*	1,0	0,2	1,0	9,58
<i>Candida</i> sp	28	6,5*	300	15,0	1,0	0,2*	0,2	4,31
	35	7,0*	300	15,0	1,0	0,2*	0,2	5,86

Dos resultados apresentados para a produção de biomassa, observa-se que a *K. marxianus* CCT4294 foi a que apresentou melhor resultado, obtendo concentração de massa celular seca de 13,54 g.L⁻¹. Este valor é superior aos encontrados por Giec e Kosikowski (1982), que obtiveram 11,0 g.L⁻¹ a 30°C e pH inicial menor que 6,0, Inchaurredo *et. al.* (1993) que obtiveram 4,2 g.L⁻¹ e Grba *et. al.* (2002) que obtiveram 10,0 g.L⁻¹ em pH inferior a 5,0 sem influência significativa da temperatura e concentração de lactose.

Pelos resultados obtidos definiu-se que para a sequência deste trabalho, ou seja, quantificação de ribonucleotídeos e fermentação em fermentador de bancada, o microrganismo utilizado foi somente a *K. marxianus* CCT4294.

6.5- QUANTIFICAÇÃO DOS RIBONUCLEOTÍDEOS

Para a realização da quantificação dos ribonucleotídeos do processo de fermentação, autólise e tratamento enzimático e térmico foi necessário traçar a curva padrão utilizando RNA padrão (SIGMA), através do método do Orcinol.

6.5.1- Curva padrão

A Tabela 6.34 apresenta a massa de RNA padrão utilizada e os valores de absorbância obtidos para traçar a curva padrão (Figura 6.14).

Tabela 6.34: Curva padrão de quantificação de RNA pelo método do Orcinol

Pontos	Massa RNA Padrão (µg)	Absorbância
1	10	0,047
2	20	0,11
3	40	0,24
4	60	0,37
5	80	0,49
6	90	0,54
7	100	0,60

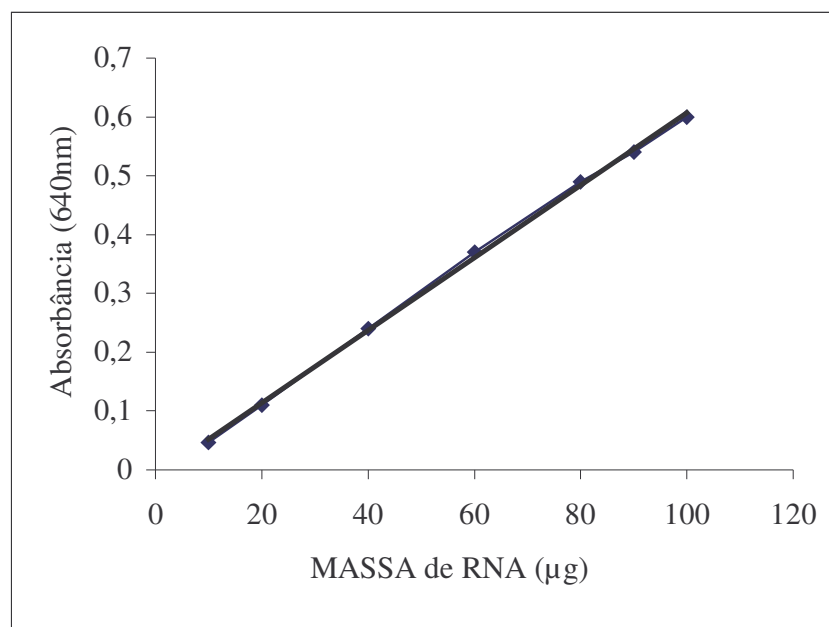


Figura 6.14: Curva padrão de quantificação de RNA pelo método do Orcinol

A Equação 6.6 representa a equação da reta para a quantificação de RNA pelo método Orcinol para um R^2 de 0,9991.

$$y = 0,0062x - 0,0101 \quad (6.6)$$

Sabendo-se que em células de microrganismos existe também a presença de DNA e que em processos de identificação pode ocorrer interferência, optou-se em fazer, para

controle, a análise de DNA padrão (SIGMA) utilizando o método do Orcinol. Neste processo foram utilizadas duas amostras contendo 150 µg (amostra-A) e 300 µg (amostra-B) de DNA padrão. Os valores de absorbância determinados foram de 0,074 para a amostra-A e de 0,146 para a B. Estes resultados correspondem, respectivamente, a 13,56 µg e 25,18 µg, ou seja, o método do Orcinol reconheceu a presença de DNA em apenas 9 % para amostra A e 8,4 % para amostra B, que equivale a uma média de 8,7 %. Isto quer dizer que, no processo de quantificação de ribonucleotídeos do presente trabalho, 8,7 % dos valores determinados pode representar DNA.

6.5.2- Processo de autólise

Para o processo de quantificação de ribonucleotídeos foi feita uma fermentação com 4L de meio em fermentador Bioflow, na qual foi obtida massa celular seca de 14,27g.L⁻¹, sendo o sobrenadante usado para quantificação de RNA.

O resultado obtido para a concentração de RNA do meio fermentado foi 1299,60 µg.mL⁻¹, ou seja, rendimento de 91,07 mgRNA.g⁻¹ MCS (Massa Celular Seca). Este valor elevado pode ser devido a produção de metabólitos secundários, como as enzimas intracelulares (ex: β-galactosidase) que hidrolisam a célula liberando ribonucleotídeos para o meio, conforme citação de Belem e Lee (1997), Belem *et. al.* (1997) e Jenson (1993).

A biomassa restante do meio fermentado foi ressuspensa em água para a realização da autólise, que está descrita abaixo, para os tempos de 6, 12, 18 e 24h. Nesta suspensão foi determinada a massa celular seca de 137,33g.L⁻¹.

6.5.2.1- Tempo de autólise de 6h

Os resultados obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central para o tempo de autólise de 6h são apresentados na Tabela 6.35.

Tabela 6.35: Concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e rendimento ($\text{mgRNA}.\text{g}^{-1}\text{MCS}$) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para o tempo de autólise de 6h.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	RENDIMENTO
1	2908,23	21,18
2	167,90	1,22
3	1461,45	10,64
4	63,06	0,46
5	388,87	2,83
6	448,55	3,27
7	417,90	3,04

As Tabelas 6.36, 6.38, 6.40 e 6.42 apresentam os valores dos efeitos estimados para a resposta rendimento de RNA ($\text{mgRNA}.\text{g}^{-1}\text{MCS}$), juntamente com os parâmetros estatísticos erro padrão e distribuição normal padrão. Os valores marcados com asterisco são significativos a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 6.36: Efeitos estimados para a resposta rendimento de RNA para o tempo de autólise de 6h.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (2)	p
Média	6,091429*	0,083181*	73,23117*	0,000186*
pH do tampão (1)	5,65*	0,220076*	25,67298*	0,001514*
Temperatura (2)	15,07*	0,220076*	68,47642*	0,000213*
1 e 2	4,89*	0,220076*	22,21962*	0,002019*
R ² = 0,853 Erro Puro = 0,048				

A Figura 6.15 apresenta a superfície de resposta obtida para o tempo de autólise de 6h.

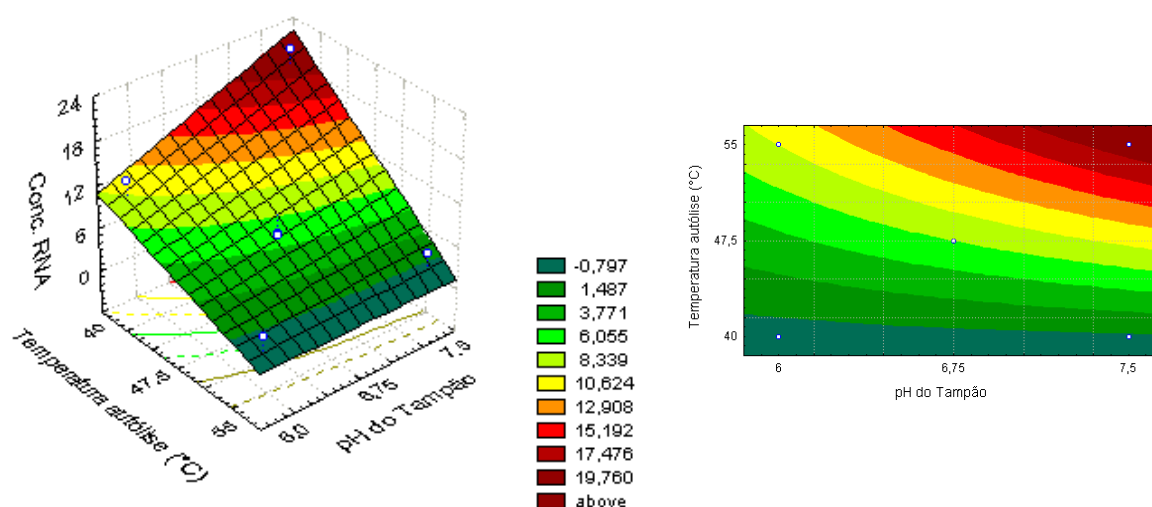


Figura 6.15: Superfície de resposta do rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 6h de autólise. Rendimento em ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$)

6.5.2.2- Tempo de autólise de 12h

Os resultados obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central para o tempo de autólise de 12h são apresentados na Tabela 6.37.

Tabela 6.37: Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e rendimento ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para o tempo de autólise de 12h.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	RENDIMENTO
1	3169,52	23,08
2	232,42	1,69
3	2079,19	15,14
4	79,19	0,58
5	480,81	3,50
6	509,84	3,71
7	495,32	3,61

Tabela 6.38: Efeitos estimados para a resposta rendimento de RNA para o tempo de autólise de 12h.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (2)	p
Média	7,33*	0,039701*	184,6289*	2,93E-05*
pH do tampão (1)	4,525*	0,10504*	43,07896*	0,000538*
Temperatura (2)	17,975*	0,10504*	171,1258*	3,41E-05*
1 e 2	3,415*	0,10504*	32,51152*	0,000945*

$R^2 = 0,82991$ Erro Puro = 0,011

A Figura 6.16 apresenta a superfície de resposta obtida para o tempo de autólise de 12h.

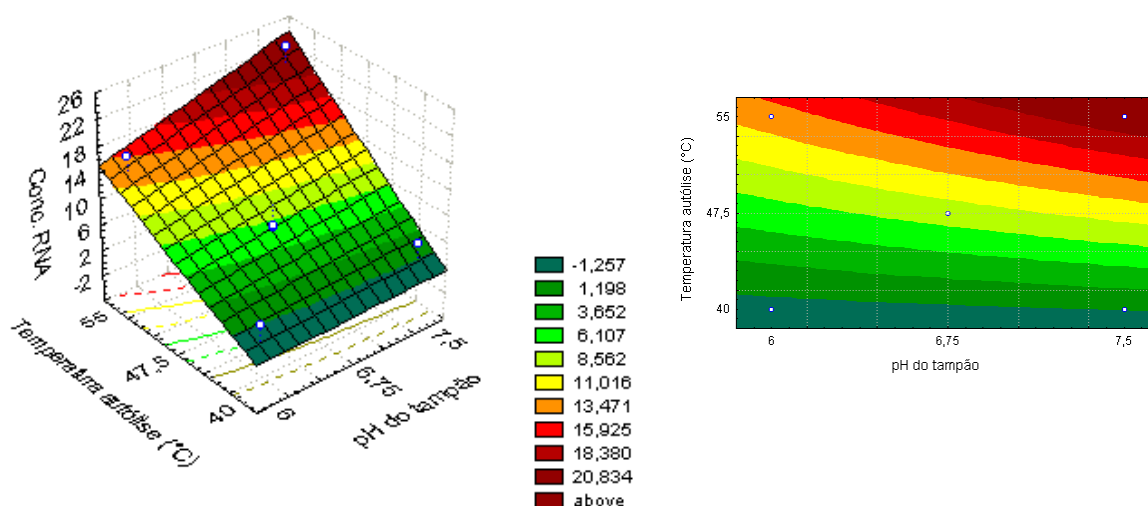


Figura 6.16: Superfície de resposta da rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 12h de autólise. Rendimento em (mgRNA.g⁻¹MCS)

6.5.2.3- Tempo de autólise de 18h

Os resultados obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central para o tempo de autólise de 18h são apresentados na Tabela 6.39.

Tabela 6.39: Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e rendimento ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2^2 para o tempo de autólise de 18h.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	RENDIMENTO
1	3300,16	24,03
2	280,80	2,04
3	2458,23	17,90
4	67,90	0,49
5	608,22	4,43
6	629,19	4,58
7	616,29	4,49

Tabela 6.40: Efeitos estimados para a resposta rendimento de RNA para o tempo de autólise de 18h.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (2)	p
Média	8,28*	0,028536*	290,1629*	1,19E-05*
pH do tampão (1)	3,84*	0,075498*	50,86204*	0,000386*
Temperatura (2)	19,70*	0,075498*	260,9329*	1,47E-05*
1 e 2	2,29*	0,075498*	30,33179*	0,001085*

$R^2 = 0,8447$ Erro Puro = 0,0057

A Figura 6.17 apresenta a superfície de resposta obtida para o tempo de autólise de 18h.

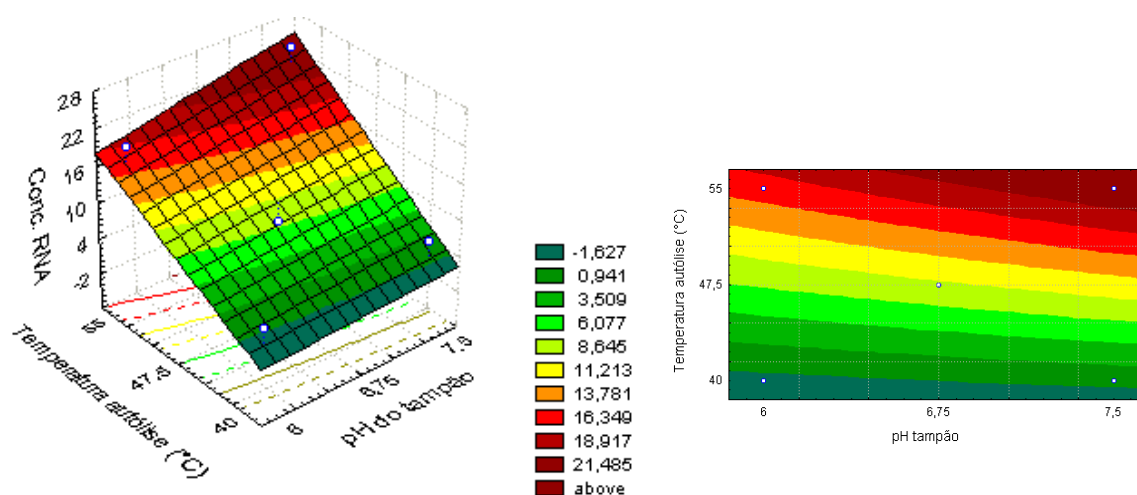


Figura 6.17: Superfície de resposta da rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 18h de autólise. Rendimento em (mgRNA.g⁻¹MCS)

6.5.2.4- Tempo de autólise de 24h

Os resultados obtidos do planejamento fatorial completo 2² com triplicata no ponto central para o tempo de autólise de 24h são apresentados na Tabela 6.41.

Tabela 6.41: Concentração (μg.mL⁻¹) e rendimento (mgRNA.g⁻¹MCS) de RNA obtidos do planejamento fatorial completo 2² para o tempo de autólise de 24h.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	RENDIMENTO
1	3364,68	24,50
2	158,23	1,15
3	2472,74	18,01
4	75,97	0,55
5	885,65	6,45
6	927,58	6,75
7	905,00	6,59

Tabela 6.42: Efeitos estimados para a resposta de rendimento de RNA para o tempo de autólise de 24h.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t (2)	p
Média	9,000*	0,227575*	39,54737*	0,000639*
pH do tampão (1)	3,545*	0,602107*	5,887654*	0,027657*
Temperatura (2)	20,405*	0,602107*	33,8893*	0,00087*
1 e 2	2,945*	0,602107*	4,891154*	0,039349*

$R^2 = 0,9161$ Erro Puro = 0,3625

A Figura 6.18 apresenta a superfície de resposta obtida para o tempo de autólise de 24h.

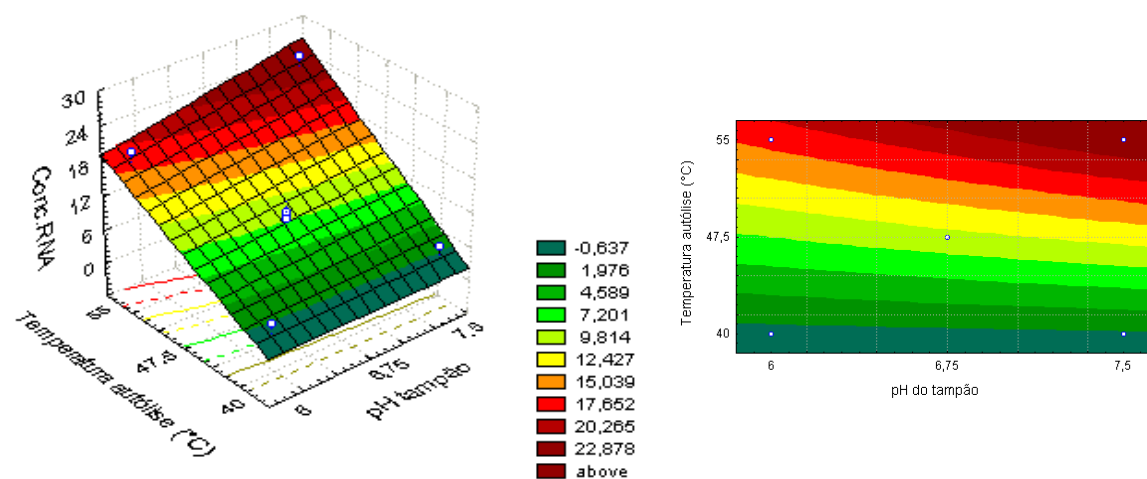


Figura 6.18: Superfície de resposta da rendimento de RNA em função do pH do tampão e temperatura para o tempo de 24h de autólise. Rendimento em (mgRNA.g⁻¹MCS)

Através dos resultados das Tabelas 6.35, 6.37, 6.39 e 6.41 ou Figuras de 6.15 a 6.18, observa-se que para maior concentração e/ou rendimento de RNA, tanto o pH do tampão como a temperatura de autólise ideal tendem ao nível +1, o que corresponde respectivamente a pH 7,5 e temperatura 55°C, condições estas presentes no ensaio 1. Portanto, quanto maior o pH do tampão e da temperatura de autólise, maior é a

concentração de RNA. Observa-se também que, a concentração de RNA aumenta com o aumento do tempo de autólise, porém com pequena diferença entre os tempos 18 e 24h. Estes resultados podem ser melhor visualizados no Quadro 6.4. Segundo Revillion *et. al.* (2003) quando a autólise é conduzida a pH maior do que 6,0 facilita a formação de alguns tipos de ribonucleotídeos e o RNA que não foi liberado no processo de autólise pode ser facilmente hidrolisado pela ação de enzimas. Sendo assim, para a sequência do trabalho, a etapa de autólise foi feita com tempo de 18h, seguindo-se o tratamento enzimático e térmico. Ainda, analisando os efeitos das Tabelas 6.36, 6.38, 6.40 e 6.42 e pelas respectivas Figuras, pode-se dizer que, quanto maior o tempo de autólise a influência do pH do tampão diminui e a da temperatura aumenta.

A maior concentração de RNA nestas condições foi $3364,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com rendimento de $24,5 \text{ mg.g}^{-1}$ de massa celular seca, resultado este superior aos encontrados por Belem *et. al.*(1997) que obtiveram rendimento de 0,1 a $0,6 \text{ mg.g}^{-1}$ nas mesmas condições de processo por 12h, Belem e Lee (1999) obtiveram rendimento próximo a 16 mg.g^{-1} enquanto que Revillion *et. al.*(2003) obtiveram concentração de $430 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com rendimento de $17,2 \text{ mg.g}^{-1}$ a 50°C e pH 6,5.

Quadro 6.4: Resultados das concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e rendimentos ($\text{mg.g}^{-1}\text{MCS}$) de RNA e das variáveis analisadas com seus melhores níveis para os tempos de 6, 12, 18 e 24h de autólise obtidos pelo planejamento fatorial completo 2^2 .

Tempo de autólise (h)	T ($^{\circ}\text{C}$)	pH do Tampão	Concentração	Rendimento
6	55	7,5	2908,23	21,18
12	55	7,5	3169,52	23,08
18	55	7,5	3300,16	24,03
24	55	7,5	3364,68	24,50

6.5.3- Processo de tratamento enzimático e térmico

Para a quantificação de ribonucleotídeos na etapa de tratamento enzimático e térmico foi necessário fazer outra fermentação com *K. marxianus*, com 4L de meio em fermentador Bioflow, na qual foi determinada a concentração de massa celular seca de 16,35 g.L⁻¹, sendo o sobrenadante usado para a quantificação de RNA . O resultado obtido para a concentração de RNA do meio fermentado foi de 2584,10 µg.mL⁻¹, ou seja, rendimento de 158,10 mgRNA.g⁻¹MCS.

Utilizando a levedura *S. cerevisiae*, os resultados obtidos no meio fermentado foram de 8,22 g.L⁻¹ de concentração de massa celular seca e concentração de RNA de 651,60 µg.mL⁻¹, atingindo rendimento de 79,27 mgRNA.g⁻¹ de massa celular seca.

Com os resultados descritos para as duas leveduras, tem-se que a *K. marxianus* foi a que apresentou maior concentração e rendimento de RNA no meio fermentado.

A biomassa do meio fermentado da *K. marxianus* foi ressuspensa em água para a realização da autólise, na qual foi determinada a concentração de massa celular seca de 219,15 g.L⁻¹. O resultado da concentração de RNA após a autólise foi de 9274,60 µg.mL⁻¹, com rendimento de 42,32 mgRNA.g⁻¹MCS.

Em relação aos resultados de concentração e de rendimento de RNA obtidos no meio fermentado e no processo de autólise, o rendimento do primeiro (meio fermentado) foi maior que o do segundo (autólise), isto devido à diferença de concentração de célula presente no meio, os quais apresentaram, respectivamente, 16,35 g.L⁻¹ e 219,15 g.L⁻¹. No entanto, o segundo apresentou maior valor na concentração de RNA.

A biomassa autolisada foi ressuspensa em água para a realização do tratamento enzimático e térmico, que está descrito nos itens 6.5.3.1 e 6.5.3.2 para as duas enzimas, para os tempos de 2, 4 e 6h, cuja concentração de massa celular seca foi 208,59 g.L⁻¹.

6.5.3.1- Enzima Fosfodiesterase

A Tabela 6.43 apresenta os valores de concentração e rendimento de RNA obtidos nos tempos de 2, 4 e 6h de tratamento com a enzima fosfodiesterase.

Tabela 6.43: Concentração e rendimento de RNA obtidos do tratamento com a enzima fosfodiesterase nos tempos de 2, 4 e 6h.

CONCENTRAÇÃO ENZIMA		CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			RENDIMENTO ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$)		
% p/v	UE.L ⁻¹	2h	4h	6h	2h	4h	6h
0,1	20,0	3935,88	4197,98	4238,30	18,87	20,12	20,32
0,3	60,0	5036,69	4855,24	4891,53	24,15	23,27	23,45
0,5	100,0	5504,43	5697,98	5302,82	26,39	27,32	25,42

6.5.3.2- Enzima 5'-ácido adenílico deaminase

A Tabela 6.44 apresenta os valores de concentração e rendimento de RNA obtidos nos tempos de 2, 4 e 6h de tratamento com a enzima 5'-ácido adenílico deaminase.

Tabela 6.44: Concentração e rendimento de RNA obtidos do tratamento com a enzima 5'-ácido adenílico deaminase nos tempos de 2, 4 e 6h.

CONCENTRAÇÃO ENZIMA		CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			RENDIMENTO ($\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$)		
% p/v	UE.L ⁻¹	2h	4h	6h	2h	4h	6h
0,1	90,0	2355,24	2504,43	2677,82	11,29	12,00	12,84
0,3	270,0	4524,59	5153,62	4887,50	21,69	24,71	23,43
0,5	450,0	6008,46	6605,24	6556,85	28,80	31,67	31,43

Nas Tabelas 6.43 e 6.44 observa-se que, quanto maior a concentração de ambas as enzimas maior é a concentração e rendimento de RNA obtido, o que não se pode dizer para o tempo de tratamento, pois os melhores resultados foram obtidos no tempo de 4h.

Entre as duas enzimas estudadas a que apresentou melhor resultado foi a 5'-ácido adenílico deaminase com concentração de 6605,24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e rendimento de 31,67 $\text{mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$, resultado este superior ao encontrado por Belem *et. al.*(1997) que obtiveram rendimento de 3,05 mg.g^{-1} .

6.6- PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FERMENTADOR DE BANCADA

6.6.1- Fermentação batelada convencional

6.6.1.1- Sem controle de pH

A fermentação ocorreu durante um período de 24h, sendo que amostras foram retiradas em intervalos de 2h. Os valores de concentração de massa celular seca, concentração de lactose e pH são apresentados na Tabela 6.45 e representados pelas curvas na Figura 6.19.

Tabela 6.45: Concentração de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}), concentração de lactose (g.L^{-1}) e pH de fermentação tipo batelada em fermentador de bancada sem controle de pH para a *K. marxianus* CCT4294.

Tempo (h)	pH	MCS	Lactose
0	6,49	2,40	71,61
2	6,01	2,99	66,02
4	5,81	4,17	64,50
6	5,63	5,45	62,83
8	5,30	7,30	56,90
10	5,09	7,89	48,29
12	4,92	11,11	40,43
14	4,78	12,75	31,89
16	4,66	14,76	24,28
18	4,58	15,40	17,51
20	4,50	17,21	13,77
22	4,47	18,20	12,30
24	4,46	18,30	12,10

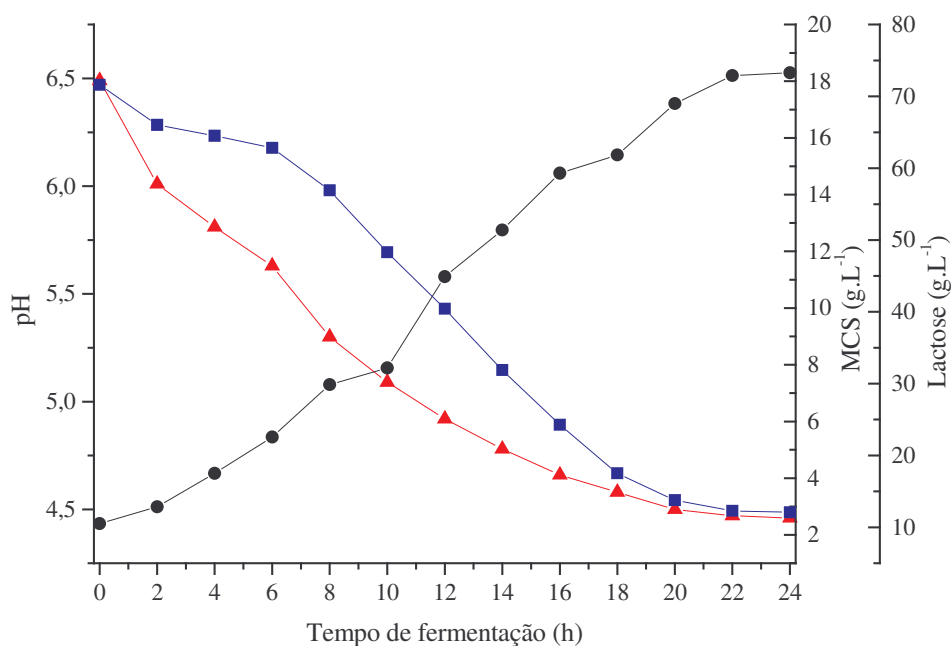


Figura 6.19: Produção de massa celular seca (●), consumo de lactose (■) e pH do meio (▲) durante fermentação tipo batelada em fermentador de bancada sem controle de pH para a *K. marxianus* CCT4294.

Após 24 horas de fermentação o valor final da concentração de lactose foi de 12,1 g.L⁻¹, ou seja, consumo de 59,51 g.L⁻¹ para produção de massa celular seca de 18,3 g.L⁻¹ com pH final em 4,46.

6.6.1.2- Com controle de pH

Com a finalidade de aumentar a produção de massa celular, foi feita uma fermentação com pH constante em 6,5, durante o período de 46h, com amostras sendo retiradas em intervalos de 2h. Os valores das concentrações de massa celular seca e de lactose são apresentados na Tabela 6.46 e representados pelas curvas na Figura 6.20.

Tabela 6.46: Concentrações de massa celular seca – MCS (g.L^{-1}) e de lactose (g.L^{-1}) de fermentação tipo batelada em fermentador de bancada com pH constante em 6,5 para a *K. marxianus* CCT4294.

Tempo (h)	MCS	Lactose
0	2,18	70,71
2	2,27	65,50
4	4,95	59,30
6	6,32	50,70
8	8,05	39,30
10	10,89	32,26
12	14,03	26,88
14	16,09	20,12
16	17,16	15,30
18	19,18	9,37
20	19,53	6,42
22	19,94	3,51
24	24,13	0,98
26	25,82	0
28	25,98	0
30	25,94	0
32	25,73	0
34	25,66	0
36	25,41	0
38	25,04	0
40	24,41	0
42	23,71	0
44	23,03	0
46	21,94	0

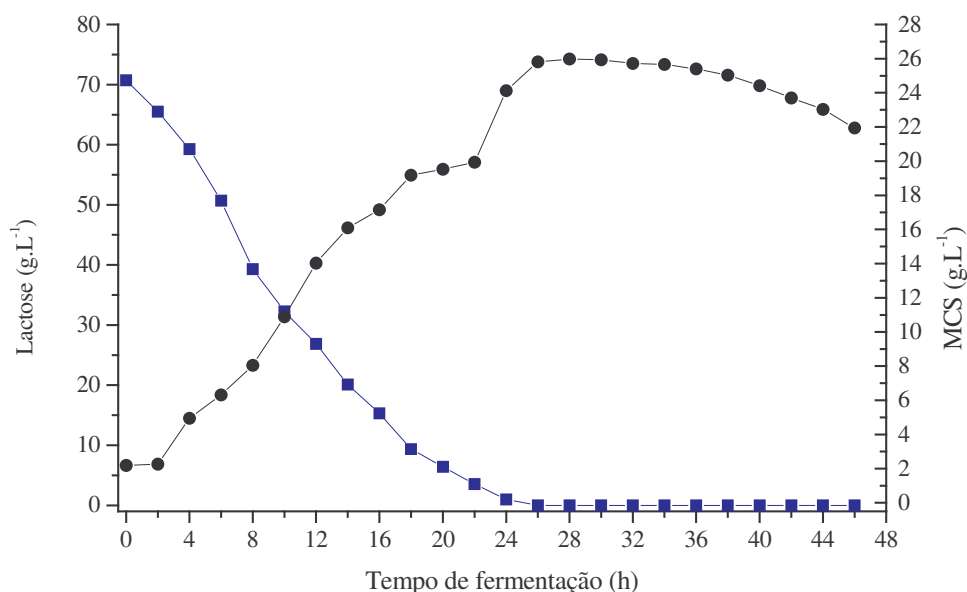


Figura 6.20: Produção de massa celular seca (●) e consumo de lactose (■) durante fermentação tipo batelada em fermentador de bancada com pH constante em 6,5 para a *K. marxianus* CCT4294.

Após 24 horas de fermentação houve total consumo de lactose para máxima produção de massa celular seca de 25,98 g.L⁻¹ em 28h.

6.6.2- Fermentação batelada alimentada

Com base nos resultados obtidos no item anterior (6.6.1), uma fermentação batelada alimentada foi feita a pH constante de 6,5. O ensaio transcorreu normalmente até 12h, sendo que a partir deste momento meio de cultura fresco foi alimentado com vazão de 0,34 L.h⁻¹, ou seja, o fermentador foi alimentado até as 18h, sendo a duração total da fermentação de 50h.

Os valores das concentrações de massa celular seca e de lactose são apresentados na Tabela 6.47 e representados pelas curvas na Figura 6.21.

Tabela 6.47: Concentrações de massa celular seca –MCS (g.L^{-1}) e de lactose (g.L^{-1}) de fermentação tipo batelada alimentada em fermentador de bancada com pH constante em 6,5 para a *K. marxianus* CCT4294.

Tempo (h)	MCS	Lactose
0	2,10	71,72
2	2,85	65,88
4	4,72	59,39
6	6,32	51,18
8	8,14	40,86
10	10,45	34,15
12	12,87	28,17
14	13,08	27,76
16	12,66	27,98
18	13,24	28,10
20	14,15	25,25
22	15,47	22,31
24	17,77	19,63
26	18,82	16,89
28	21,56	14,54
30	22,17	11,22
32	23,08	7,80
34	23,82	4,22
36	24,63	1,68
38	24,62	0,82
50	24,60	0

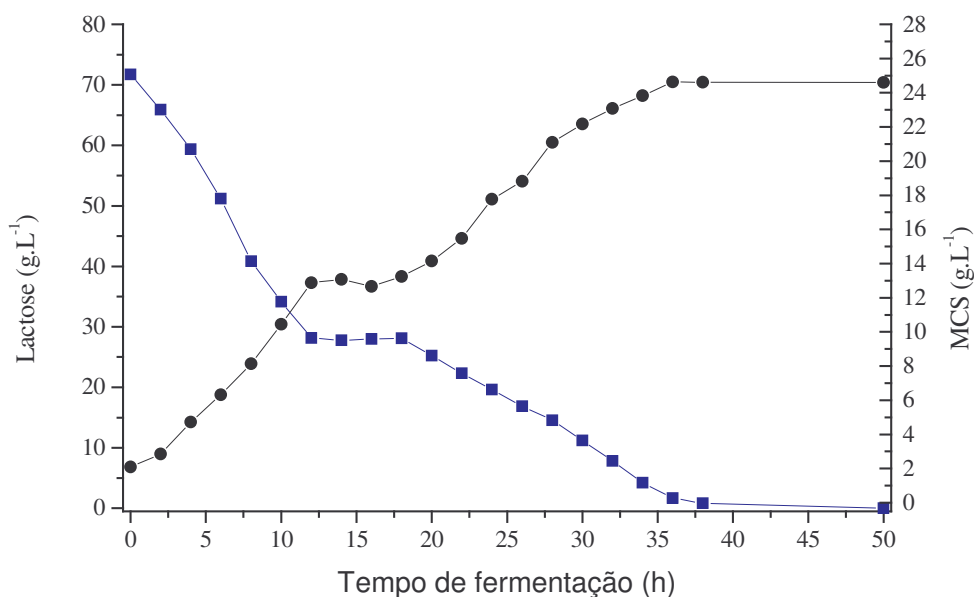


Figura 6.21: Produção de massa celular seca (●) e consumo de lactose (■) durante fermentação tipo batelada alimentada em fermentador de bancada com pH constante em 6,5 para a *K. marxianus* CCT4294.

Na Figura 6.21 e na Tabela 6.47, observa-se que o comportamento das curvas até 12h segue as características da fermentação em batelada e durante a alimentação, que ocorreu no período de 12 a 18h, tanto a concentração de massa celular seca como a de lactose permanecem praticamente constantes. A partir do momento em que a alimentação foi cessada, as curvas voltaram a seguir normalmente as características da fermentação até o consumo total da lactose, com produção máxima de massa celular seca de 24,63 g.L⁻¹ em 36h.

Comparando as três fermentações feitas em fermentador Bioflow, a que apresentou melhor resultado foi a batelada que transcorreu a pH constante, com produção de massa

celular seca de 25,98 g.L⁻¹. O resultado obtido foi superior ao encontrado por Maiorella e Castillo (1984) que obtiveram 20,0 g.L⁻¹ a 40°C e pH 5,0 e por Barba *et. al.* (2001) que obtiveram 17,0 g.L⁻¹ em 1000 L de meio de soro de queijo. Também, este resultado não condiz com Belem e Lee (1998) que relatam que a maior produção de biomassa ocorre em fermentação batelada alimentada.

As três fermentações realizadas em fermentador Bioflow apresentaram a fase lag curta, isso devido a presença de lactose no inóculo, facilitando assim à adaptação da levedura ao meio e com isso seu crescimento.

Na fermentação sem controle de pH o consumo de lactose não foi total, pois restou 12,1g.L⁻¹, mantendo-se constante no decorrer da fermentação, isso devido ao pH ter decrescido rapidamente. Neste processo a produção máxima de célula seca foi de 18,3 g.L⁻¹. Já na fermentação a pH constante, o consumo de lactose foi total em 24h com a máxima produção de célula seca de 25,98 g.L⁻¹ em 28h de fermentação.

Na fermentação batelada alimentada a produção de célula atingiu somente 24,63 g.L⁻¹, sendo que consumiu toda lactose presente no meio.

7- CONCLUSÕES

Dentre os microrganismos estudados, durante a etapa do planejamento Plackett Burman, o melhor resultado obtido para a produção de biomassa (MCS) foi $8,60 \text{ g.L}^{-1}$ para a *K. marxianus* CCT4294, em meio contendo 15% (p/v) de soro de queijo desidratado em 24h de fermentação.

Dentre os microrganismos estudados, durante a etapa do planejamento fatorial composto central, o melhor resultado obtido para a produção de biomassa (MCS) foi $13,54 \text{ g.L}^{-1}$ para a *K. marxianus* CCT4294, em meio contendo 15% (p/v) de soro de queijo desidratado, que equivale a $97,5 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose, em 24h de fermentação.

Estes resultados mostram que é possível utilizar soro de queijo como excelente fonte de carbono para produção de biomassa por fermentação.

Os melhores resultados obtidos para a concentração de RNA foram: $2584,10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (rendimento de $158,10 \text{ mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) para o meio fermentado, $9274,60 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (rendimento de $42,32 \text{ mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) para o processo de autólise e $6605,24 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (rendimento de $31,67 \text{ mgRNA.g}^{-1}\text{MCS}$) para o processo de tratamento enzimático e térmico com a enzima 5'-ácido adenílico deaminase.

Para a produção de massa celular utilizando a levedura *K. marxianus* o melhor processo é a fermentação batelada com pH constante em 6,5, sendo sua maior produção de $25,98 \text{ g.L}^{-1}$ em 28h de fermentação.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBA, D.; BEOLCHINI, F.; DEL RE, G.; DI GIACOMO, G.; VEGILÍO, F. Kinetic analysis of *Kluyveromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. **Process Biochemistry**, v.36, p.531-536, 2001.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp. Campinas, SP, 1995.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Fed-batch fermentation to oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Process Biochemistry**, v.34, p.501-509, 1999.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.7, p.565-598, 1998.

BELEM, M. A. F.; LEE, B. H. Production of RNA derivatives by *Kluyveromyces fragilis* grown on whey. **Food Science and Technology International**, v.3, p.437-444, 1997.

BELEM, M. A. F.; GIBBS, B. F.; LEE, B. H. Enzymatic production of ribonucleotides from autolysates of *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. **Journal of Food Science**, v.62, n.4, p.851-855, 1997.

- BENAIGES, M. D.; LÓPEZ-SANTIN, J.; SOLÀ, C. Production of 5'-ribonucleotides by enzymatic hydrolysis of RNA. **Enzyme Microbiology Technology**, v.12, p.86-89, 1990.
- BENAIGES, M. D.; LÓPEZ-SANTÍN, J.; SOLÁ, C. Proceso de producción enzimática de 5'-ribonucleótidos a partir de ARN de origen microbiano. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.29, n.3, p.285-296, 1989.
- BEN-HASSAN, R. M.; GHALY, A. E. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.47, p.89-104, 1994.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. & HUNTER, J.S. Statistics for Experimenters – An Introduction to Design, **Data Analysis and Model Building**. John Wiley & Sons, N. Y., 1978.
- CHAE, M. A. F.; GIBBS, B. F.; LEE, B. H. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1. effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. **Bioresource Technology**, v.76, n.3, p.253-258, 2001.
- FISH, W. W. A method for the quantitation of 5'-mononucleotides in foods and food ingredients. **Journal Agric. Food Chem.**, v.39, p.1098-1101, 1991.

- GIEC, A.; KOSIKOWSKI, F. V. Activity of lactose fermenting yeasts in producing biomass from concentrated whey permeates. **Journal of Food Science**, v.47, p.1892-1907, 1982.
- GRBA, S.; STEHLIK-TOMAS, V.; STANZER, D.; VAHEIÉ, N.; SKRLIN, A. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. **Chemistry Biochemistry Engeneering**, v.16, n.1, p.13-16, 2002.
- INCHAURRONDO, V. A.; YANTORNO, O. M.; VOGET, C. E. Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose-limited synthetic medium. **Process Biochemistry**, v.29, p.47-54, 1994.
- JENSON, I. Biotechnology and the food supply Food ingredient products of biotechnology. **Food Australia**, v. 45(12), p.568-571, 1993.
- MAIORELLA, B. L.; CASTILLO, F. J. Ethanol, biomass and enzyme production for whey waste abatement. **Process Biochemistry**, p.157-161, 1984.
- OLMEDO, F.; ITURBE, F.; GOMEZ-HERNÁNDEZ, J.; LÓPES-MUNGUÍA, A. Continuous production of 5'-ribonucleotides from yeast RNA by hydrolysis with immobilizes 5'-phosphodiesterase and 5'-adenylate deaminase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.36-40, 1994.

- RENEE, R. A.; JOAN, M. G.; MARIA, L. W. (1985), *Basic Biochemical Methods.* , Cornell University, cap. 4, p. 94-95.
- REVILLION, J. P. P.; BRANDELLI, A., AYUB, M. A. Z. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.1, p.21-33, 2003.
- RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. Planejamento Fatorial e “Screening Design” como Ferramenta para Otimização de Pcessos Bioquímicos. **Anais XII SINAFERM**, Seção Técnica C2, Uberlândia, agosto de 1998.
- SOTO, C.; CUELLO, M., ALFONSO, Y., CABRERA, O., SIERRA, G. Validación de una técnica colorimétrica para la determinación de carbohidratos. **VacciMonitor**, v.11, n.3, p.11-14, 2002.