

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA POR
FERMENTAÇÃO DO QUEROSENE

Influência do Meio de Cultura e
das variáveis Físico-Químicas
sobre o Rendimento Celular
Composição Química da Proteína.

Dr. RICARDO SADIR, Eng^o Químico

Tese apresentada à Faculdade de
Tecnologia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Livre Docente.

Campinas, São Paulo
1972

À mes pais
Angélica Saman. e
Juan Sadr.

C O N T E Ú D O

- I - Resumo e "Summary"
- II - Introdução e Revisão Bibliográfica
- III - Materiais e Métodos
 - 1. Hidrocarboneto
 - 2. Meios de Cultura
 - 3. Microrganismo
 - 4. Equipamentos
 - 5. Determinação do Crescimento Celular
 - 6. Preparação da Levedura seca e determinação do rendimento celular
 - 7. Determinação Analítica dos Componentes
 - 8. Determinação de Amino Ácidos
- IV - Resultados e Discussão
 - 1. Frascos agitados
 - 2. Fermentador
 - 3. Composição Química da Levedura
- V - Comparação dos Resultados obtidos com relação aos outros autores
- VI - Conclusões
- VII - Gráficos e Quadros
- VIII - Bibliografia
- IX - Agradecimentos

I - R E S U M O

Pesquisamos o cultivo da *Candida lipolytica* ATCC 8661 em querosene com 76% de compostos parafínicos, como única fonte de carbono e energia. Dos 46 meios de cultura experimentados, só aqueles com uréia e NH_4Cl foram os mais adequados como fonte nitrogenada. Nutrientes orgânicos tais como extrato de levedura e farelo de arroz, adicionados ao meio de cultura inorgânica, não melhoraram o rendimento em biomassa; melão de cana de açúcar, produz uma marcante queda do rendimento. A Autólise da levedura é menos intensiva quando usa-se NH_4NO_3 como fonte nitrogenada.

Encontramos que pH_5 é bom para a cultura e que o máximo rendimento e o mínimo tempo de fermentação eram conseguidos controlando o pH . Com 5% (v/v) querosene no meio de cultura, obtém-se o melhor rendimento em levedura.

Trabalhando num fermentador de laboratório, encontramos que as melhores condições de trabalho foram conseguidas com a taxa específica de crescimento celular = 2,3 g/l/hr, produtividade máxima em biomassa $\mu_{\text{max}} = 2,3 \text{ g/l/hr}$ e constante de rendimento $Y_p = 0,86$.

Com excessão da metionina, os aminoácidos essenciais de nossa SCP (proteína unicelular) estavam presentes em quantidades maiores que a proteína standard de referência da FAO. Encontramos alta concentração de Cistina e Triptofano.

I - SUMMARY

Cultivation of *Candida lipolytica* ATCC 8661, in kerosene with 76% paraffin, as sole carbon and energy source was investigated. From 46 cultures medium experimented, only those with urea and NH_4Cl were the most suitable nitrogen source. Organic nutrient such as yeast extract and rice bran added to the inorganic medium, did not improve biomass yield; black trap molasses produce a marked drop in yield.

Yeast autolysis is less intensive when NH_4NO_3 is used as nitrogen source. pH 5 have been found suitable for growth; maximum yield and shorter fermentation time were when pH was adjusted and controlled. 3% (v/v) kerosene in the culture medium give the best yeast yield.

Working in a bench fermenter, optimum conditions were found at the specific growth rate $\mu = 0,2 \text{ hr}^{-1}$ when maximum biomass productivity $p_{\text{max}} = 2,3 \text{ gr/ltr/hr}$ and yield constant $Y_p = 0,86$ were achieved.

Except methionine, essential aminoacids of our SCP product were present in higher amount than FAO reference protein. We found very high concentration of Cystine and Tryptophan.

II - INTRODUÇÃO - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Foram publicados vários trabalhos sobre o cultivo de leveduras em frações destiladas do óleo de petróleo, a fim de obter proteínas microbianas, bem como diminuir o conteúdo em parafinas da matéria prima usada.

O problema da produção de biomassa, usando querosene como matéria-prima, será o objetivo principal deste trabalho.

Aiba, S. e outros (2) cultivaram a *Candida guilliermondii* em meio de cultura constituído essencialmente de n-alcenos. As operações do fermentador foram variadas consideravelmente para poder medir a taxa de crescimento específico μ_x para a fase de crescimento logarítmica. Foi também medida a área interfacial do óleo dispersado no fermentador, determinada empiricamente a correlação entre a área interfacial por unidade de volume do líquido e as condições operacionais.

Aiba, S. e outros (1) cultivaram *Candida guilliermondii* em frascos agitados e também num fermentador de laboratório, com meio de cultura com n-alcenos, composto principalmente de dodecano (C12) e pentadecano (C15). A taxa de crescimento específico μ_x observado na fase de crescimento logarítmico, foi de aproximadamente $0,14 \text{ hr}^{-1}$. A máxima concentração celular obtida, em cada fermentação, foi praticamente proporcional à concentração inicial de hidrocarboneto, desde que a concentração seja inferior a 1,0% em volume. O fator de rendimento $Y_{x/s}$ avaliado da curva de crescimento logarítmico da célula foi perto de 0,70. Verificou-se que a taxa de crescimento específico era reduzida adicionando-se uma pequena quantidade de agente surfactante no meio da cultura. A adição de surfactantes, causava uma apreciável separação das células da interface óleo-meio.

Casas Campillo e outros (3) encontraram que fungos do gênero *Monilia* eram capazes de crescer em derivados do petróleo como única fonte de carbono e energia.

As experiências foram realizadas com querosene usando concentrações entre 1 a 4% (v/v), demonstrando que o crescimento do microrganismo dependia da concentração de n-alcanos. Os rendimentos obtidos com querosene oscilam entre 4,0 - 8,2 g de célula seca/litro de meio. Usando somente um n-alcano do querosene, o n-octadecano, o rendimento foi de 85% sobre o n-octadecano, obtido em 30 h no fermentador.

Colin, R. (4) cultivando uma *Candida* sp. em frações - de n-alcanos, como única fonte de carbono, encontrou um rendimento celular máximo de 60 g de célula seca por litro do meio de cultura, correspondendo a 21 g de ácidos graxos por litro do meio, quando usado um meio de cultura deficiente em nitrogênio. Encontrou que a *Candida* 107, crescia mais rapidamente a concentrações de n-alcanos mais altas do que a concentrações mais baixas.

Dostálak, M. e outros (5) demonstraram claramente que a fração parafínica é a única fonte de carbono e energia na fermentação de gas-oil. Estes autores encontraram que as condições ótimas para a fermentação contínua de *Candida lipolytica* em gas-oil foram com taxa de diluição $D = 0,16-0,19$, ou seja, quando a produtividade de células alcança um valor de 1,7 g/litro/h e um coeficiente de rendimento $Y = 0,92$. O gas-oil usado, continha 19,87% pêso/pêso de n-alcanos com $C_{10} - C_{23}$.

Ertola, R.J. e outros (6) cultivaram *Pseudomonas aeru*ginosas NCTC 5940, em meio contendo sais minerais e octadecano puro como única fonte de carbono, em processos contínuo e descontínuo. Conseguiram um rendimento celular máximo de 70% em pêso/por pêso de octadecano.

Ertola, R.J. e outros (7) cultivaram *Micrococcus cere*ficus em meio contendo sais minerais e gas-oil como fonte de carbono; verificando que o conteúdo original de n-parafinas no gas-oil, era sensivelmente reduzido depois da fermentação. O tempo de geração de 1,0 - 2,5 h foi observado durante a fase exponencial de cres-cimento. A fração protéica e o conteúdo de lipídeos do tecido das

células, variou de 68 a 75,5% e de 6,8 a 11,6% (base seca), respectivamente.

Ertola, R.J. e outros (8) trabalharam com um meio de cultura contendo 20 g gas-oil/litro de meio, conseguiram obter um máximo de 8 a 10 g de célula seca de micrococcus/ por litro de meio. O trabalho realizado a pH 7 controlado; velocidade de agitação 900 rpm e aeração de 1V/min. Utilizaram ainda o hexadecano em concentração de 4 g por litro de meio, nas mesmas condições que para o gas-oil, - obtendo um rendimento de 85 a 90% por hexadecano.

Ertola, R.J. (9) estudou a possibilidade de variar a composição química dos aminoácidos contidos nas proteínas microbianas obtidas usando hidrocarbonetos como matéria-prima, de maneira a melhorar o valor potencial da proteína. A variação é conseguida mudando as condições físico-químicas da fermentação, principalmente o pH.

Leathen, W.W. e outros, (10) da Gulf Research and Development Company, cultivando duas culturas de Candida em n-alcenos puros (98 a 99% de pureza), encontraram que quanto menor a taxa de crescimento, maior é o teor em proteínas no produto e vice-versa. Os rendimentos celulares foram mais altos com heptadecano e octadecano, que com alcenos de mais baixo peso molecular. A proteína celular crua, foi maior com n-alcenos de baixo peso molecular, tais como undecano e dodecano.

Imine, B. (11) da Société Française des Petroles BP, La vera-França, explicam o processo utilizado para fermentar n-parafinas puras e frações de petróleo, assim como os sistemas de coleta celular e purificação. Esta Companhia encontra-se atualmente produzindo proteína celular dos derivados do petróleo, em escala comercial.

Iizuka, H. e outros (12) trabalhando com Candida rugosa em meio de cultura contendo 10% (v/v) de querosene, obtiveram um rendimento de 1070 mg de célula seca/por litro de meio, ou seja, um rendimento de 1,07 célula seca por 100 ml de querosene.

Munk, V. e outros (13) cultivaram *Candida lipolytica* em gas-oil destilado entre 180 a 400°C, contendo 10 a 20% de n-alcenos de cadeia com longitudes de 10 até 25 átomos de carbono por molécula. Verificaram que a medida que aumenta a taxa de diluição, a concentração de biomassa no fermentador diminui, assim como o grau de desparafinação do gas-oil. O coeficiente de rendimento máximo obtido foi $y = 0,94$, a uma taxa de diluição $D = 0,13$. Conseguiram rendimentos satisfatórios com taxa de diluição entre 0,11 até 0,33. Determinaram que a máxima produtividade do fermentador conseguia-se com taxa de diluição entre 0,16 e 0,19. Sob estas condições de trabalho, a concentração de biomassa alcançou 9 g por litro de meio e o rendimento foi $y = 0,92$. A produtividade do fermentador, foi de 1,7 g de biomassa por litro de substrato fermentado, por hora. O experimento foi realizado a uma concentração constante de gas-oil, no substrato em fermentação, e, sendo que um litro continha 73 g de gás-oil com 20% de n-alcenos e ponto de congelamento 0°C. Em outras experiências, os autores aumentaram a concentração de gas-oil no meio de cultura desde 73 g por litro até 170 g por litro de meio, com a finalidade de examinar as condições de cultivo do ponto de vista econômico, quando se usam altas concentrações de gas-oil no meio. Assim, utilizaram a melhor taxa de diluição encontrada para a experiência anterior, ou seja, $D = 0,16$. A concentração de biomassa aumentou ligeiramente no meio de cultura, desde 10 g de levedura seca por litro de meio com 73 g de gas-oil por litro de meio até 12,6 g por litro de meio com 170 g de gas-oil por litro de meio de cultura. A produtividade do fermentador aumentou paralelamente. O coeficiente de rendimento foi bem mais baixo a alta concentração de hidrocarbonetos do que a baixa concentração. Por esta razão não se pode pensar em cultivar leveduras em meios de cultura com alta concentração de hidrocarbonetos, a um valor fixo da taxa de diluição. Também, a desparafinação do gas-oil e a concomitante mudança do ponto de congelamento é menos eficiente a alta concentração de gas-oil no meio de cultura. Com 73 g de gas-oil por litro, o óleo foi desparafinado até um ponto de congelamento de -21°C, sendo que com 170 g por litro, o ponto de congelamento foi somente -9°C, do va

lor inicial de 0°C. A diferença de coeficiente de rendimento, que acontece a diferentes concentrações de gas-oil no meio de cultura, ou a diferente taxa de diluição, é devido a variedade de hidrocarbonetos no substrato e o seu consumo por etapas, dependendo do número de átomos de carbono dos diferentes hidrocarbonetos presentes. As parafinas individuais presentes no gas-oil não são degradadas uniformemente; as parafinas inferiores ($C_{10} - C_{14}$) são preferidas às médias ($C_{15} - C_{17}$) e estas são preferíveis às altas ($C_{18} - C_{25}$). Experimentos demonstraram que o coeficiente de rendimento é maior para parafinas com 14 a 17 átomos de carbono por molécula, enquanto que para cadeias mais curtas ou mais longas o coeficiente de rendimento é menor. Estes fatos significam que para otimizar um processo fermentativo com hidrocarbonetos, é necessário conhecer, não apenas, um valor ótimo da taxa de diluição e a quantidade de parafina no meio, mas também a composição química qualitativa das parafinas.

Sheehan, B.T. e outros (14) trabalhando com metano, demonstraram que a densidade celular dependia da taxa de diluição e a concentração do hidrocarboneto no meio de cultura. Obtiveram uma concentração celular de 9 g de célula seca por litro de meio a uma taxa de diluição de $0,14 \text{ hr}^{-1}$, obtendo rendimento de 0,6 g de célula seca por grama de metano usado.

Shin-Ichiro, O. e outros (15) obtiveram condições favoráveis de desenvolvimento da *Candida lipolytica*, Y0 - 148 em querosene, trabalhando com pH 7 controlado e adicionado no meio de fermentação um agente surfactante ativo, o "Runox M 210". Nas melhores condições de fermentação conseguiram rendimento de 11 g de célula seca por litro de meio de cultura, contendo inicialmente 10% (v/v) de querosene, sendo que o tempo de fermentação foi de 30 horas. Os seguintes aminoácidos foram ainda encontrados, cultivando *Candida lipolytica* em querosene e hidrolizada com ácidos:

AMINOÁCIDOS	%
Leucina - - - - -	3,43
Isoleucina - - - - -	2,50
Valina - - - - -	2,64
Treonina - - - - -	1,79
Metionina - - - - -	0,36
Cistina - - - - -	0,08
Lisina - - - - -	3,50
Arginina - - - - -	2,07
Histidina - - - - -	0,86
Fenilalanina - - - - -	2,15
Triptofano - - - - -	0,36
Ácido Glutâmico - - - - -	3,79
Ácido Aspártico - - - - -	4,57
Glicina - - - - -	2,15
Alanina - - - - -	2,58
Prolina - - - - -	1,53
Tirosina - - - - -	1,00
Serina - - - - -	1,86

Singh, H.D. e outros (16) encontraram as melhores condições de fermentação de um microrganismo do gênero *Trichosporon* (*Trichosporon pullulans*) trabalhando com meio de cultura contendo sais minerais e gas-oil, destilado entre 250 a 350°C, a pH 4,5. A concentração do gas-oil foi variada desde 10 até 80%, provando-se que diferentes concentrações de fosfato não têm efeito sensível no crescimento do organismo. Determinaram analiticamente o conteúdo de proteína crua das células que foi entre 51,7 até 60% das células secas, enquanto que a verdadeira proteína obtida por extração alcalina, oscilou entre 32,9 até 41,2 %. A determinação da composição química dos aminoácidos foi comparada com o padrão da FAO, encontrando-se semelhança de resultados, com exceção do triptofano e metionina que eram

ligeiramente menores que na proteína padrão.

Sadir, R. (17) desenvolvendo estudos sobre um desenho de um fermentador específico para ser usado na produção de proteína celular obtida de hidrocarbonetos e construção racional dos sistemas de agitação, conseguiu obter valores de transferência de oxigênio - de até $49 \text{ cm}^3 \text{ O}_2$ por litro por hora, trabalhando com velocidade de agitação de 2.000 rpm e aeração de 44 litros de ar por min. para um fermentador de 28 litros de capacidade total. Nas melhores condições de transferência de oxigênio, obtinha rendimentos de 59 a 62 g de células secas por 100 g de metano, e 87 a 96 g de célula seca por 100 g de parafinas do gas-oil.

Wang, D.I.C. (18) até 1968 fez uma revisão geral das pesquisas realizadas sobre a produção de proteína microbiana dos derivados do petróleo, refere-se aos rendimentos obtidos com diferentes microrganismos e diferentes hidrocarbonetos; além disso, ressaltava o custo econômico do produto elaborado em escala comercial. Este autor enfatizou a importância econômica da transferência de massa, de oxigênio e do desenho racional de equipamentos adequados a este processo.

Wang, D.I.C. (19) descreveu os aspectos dos problemas de engenharia que se apresentam na fermentação de hidrocarbonetos. Propõe um fermentador não agitado mecanicamente e denominado "air lift", onde o meio de cultura é agitado e oxigenado pela introdução de uma forte corrente de ar, conseguindo altos valores de transferência de oxigênio e economia no processo, quando se elimina o alto consumo de energia elétrica usado nos sistemas agitados mecanicamente.

Wagner, F. e outros (20) cultivando *Mycardia* NB Z 23 em querosene, encontraram que o tempo de geração foi de três horas e 10 minutos trabalhando com um meio de cultura contendo 4,5% de querosene; obtiveram um rendimento máximo de aproximadamente 12 g de

célula seca por litro de meio. Estes autores determinaram a composição química dos aminoácidos contidos em Nocardia cultivada em querosena. Ocorreu um fato muito interessante: a Nocardia apresentou pequena quantidade de lisina e grande quantidade de metionina, comparada com a Candida lipolytica cultivada em querosene por Shin-Ichi e outros (15), que tem grande quantidade de lisina e pequena de metionina.

Wayman, M e outros (21) preocupados com a grande importância que tem a transferência de massa de oxigênio à célula microbiana durante a fermentação de hidrocarbonetos, realizaram a seguinte experiência: Aumentaram a transferência de massa de oxigênio, aumentando a pressão parcial do mesmo por aumento da pressão total do ar entrante no fermentador. Estes autores aumentaram a pressão de ar de entrada até 100 libras por polegada quadrada manométrica (aproximadamente 7 Kg por cm^2) num fermentador contendo um meio de cultura com n-hexadecano como fonte de carbono, e Candida lipolytica. Foi observada uma inibição do crescimento do microrganismo com o aumento de pressão. O rendimento celular máximo obtido a 100 libras por polegada quadrada foi aproximadamente um terço do obtido à pressão de 15 libras por polegada quadrada (aproximadamente 1 kg por cm^2 quadrado). A inibição foi atribuída aos componentes gasosos presentes no ar entrante.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Hidrocarboneto: Foi utilizado querosene comercial, cujas características físicas cumpram as especificações dos padrões estabelecidos pelo Conselho Nacional do Petróleo.

As porcentagens em peso de hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos e aromáticos no querosene utilizado foram:

	%
Parafínicos	76,0
Naftênicos	15,0
Aromáticos	9,0

A composição química aproximada do querosene usado foi :

Carbono	88,00 % peso
Hidrogênio	12,00 % peso
Enxofre	0,08 % peso

Os hidrocarbonetos tinham de 12 a 18 átomos de carbono. Na prova de destilação, o querosene destilou entre 140°C a 285°C, aproximadamente. As especificações do querosene usado, cumprem as Normas ONP - 03 - Rev. 1, da Resolução nº 3 - 67 de 25 - 04-67, do Conselho Nacional do Petróleo do Brasil.

A composição química do querosene usado neste trabalho, não deve ser tomada como padrão dos querosenes produzidos no País, -- pois na mesma destilaria, no mesmo dia, é possível ter grandes variações na composição química deste produto, pois a Petrobrás destila petróleos nacionais e estrangeiros das mais variadas procedências. O mesmo conceito é válido para as propriedades físicas do querosene.

2 - Meios de cultura

O meio de cultura para tubo Stock, tem a seguinte composição:

	%
Extrato de levedura - - - - -	1
Extrato de malta - - - - -	1
NaCl - - - - -	0,3
Agar - - - - -	2

O meio de cultura para inóculo tem a seguinte composição:

	%
Extrato de levedura - - -	1
Extrato de malte - - -	1
NaCl - - - - -	0,3
Querosene - - - - -	0,5 v/v
Glucose - - - - -	1

Para frascos agitados usaram-se 46 meios de cultura experimentais com a finalidade de encontrar o meio mais adequado para obter alto rendimento celular e para estudar as variáveis físico-químicas da fermentação.

Os Quadros I-A e I-B, dão os meios de cultura utilizados para determinar o efeito dos nutrientes adicionados, sobre o rendimento celular.

O Quadro II mostra os meios de cultura com a adição de nutrientes orgânicos, com a finalidade de determinar seu efeito sobre o rendimento celular.

O Quadro III dá os meios de cultura utilizando diferentes concentrações em hidrocarbonetos, com a finalidade de demonstrar o seu efeito sobre o rendimento celular.

O quadro IV dá os meios de cultura necessários para determinar a ação de diferentes concentrações salinas e concentrações de querosene sobre o rendimento celular.

O meio de cultura 39 foi usado para a fermentação, em fermentador escala piloto. Todos os meios de cultura foram esterilizados a 121°C por 30 minutos, em seguida resfriados até 30°C e então adicionado o querosene previamente esterilizado por filtração a vácuo, através de um filtro de membrana "Millipore" (millipore Corp., Bedford, Massachusetts, E.U.A.) tipo MB-HA, de 47 mm de diâmetro, com porosidade de 0,45 microns $\pm$ 0,02 microns, com pré filtração através de um pré filtro de micro fibras de vidro "Millipore". Foi escolhido este tipo de filtro, por sua completa resistência aos hidrocar

bonetos, além de sua alta porosidade (79,5%) a razoáveis taxas de fluxo: 65ml/min/cm² de área de filtração, a 70 cm Hg e 25°C.

3 - Microrganismo

Foi usado a Candida lipolytica ATCC 8661, recebida em forma liofilizada, e rehidratada em água destilada estéril. Com a suspensão aquosa de levedura inocularam-se tubos "stock" contendo meio de cultura sólido. Os tubos foram incubados a 30°C para o desenvolvimento da cultura. Após cinco dias a cultura estava bem desenvolvida e efetuaram-se os transpasses da cultura para outros tubos "stock" contendo o mesmo meio de cultura, incubando-se a 30°C durante dois dias, quando se obteve um bom desenvolvimento celular. Posteriormente o microrganismo foi transferido ao meio de cultura líquido com querosene, com a finalidade de aclimatá-lo e desenvolver-se - nesta fonte de carbono e energia. Fizera-se várias transferências - de aclimação, cada uma de 48 horas, em frascos agitados a 300 rpm e a temperatura de 30 - 33°C. Após dois meses de aclimação do microrganismo foram iniciados os ensaios de rendimento celular, em frascos agitados e fermentador pilôto.

4 - Equipamentos

Para os ensaios em frascos agitados, utilizou-se uma máquina agitadora rotativa (giratory shaker da Fermentation Design, Inc.) com velocidade controlável de 0-400 rpm, e temperatura controlável entre ambiente e 60°C. Os ensaios foram feitos a 300 rpm e temperatura controlada de 33°C.

Nas experiências pilôto utilizamos um fermentador de 7,5 litros de volume total (Fermentation Design, Inc.) provido de controle automático de espuma e pH (Eletrodo) de vidro Ingold. O volume útil de trabalho foi de quatro litros, trabalhando com agitação constante de 800 rpm e aeração de 2 volumes de ar x volume de meio x minuto com pressão constante de 1 Kg/cm², manométrica. O sistema

agitador foi provido de 2 turbinas tipo padrão, com 6 asas retas, e colocadas simetricamente dentro do liquido em relação 1/3 H (Primeiro agitador a 1/3 da altura do liquido, o segundo outro 1/3, e o nível do liquido a 1/3 da segunda turbina); a temperatura foi controlada automaticamente a 33°C.

5 - Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi controlado medindo a turbidez do meio de cultura, a diferentes tempos progressivos de incubação, com um colorímetro "Spectronic 20" da Bausch and Lomb, com absorvância de 610 m μ . Os valores são dados em densidade ótica (O.D.) a 610 m μ . A turbidez da cultura é aproximadamente proporcional à massa celular da levedura, assim sendo, a turbidez aumenta com o crescimento do microrganismo.

Na fermentação de querosene o hidrocarboneto residual não consumido pela levedura durante o processo, tem a propriedade de reter a maior parte das células microbianas obtidas na fase aquosa. Assim sendo, estando o meio de cultura em repouso, as células de levedura separam-se em duas fases: aquosa e oleosa (hidrocarboneto). Esta separação de fases e distribuição não proporcional da levedura, nas mesmas, impossibilita o uso do colorímetro e portanto a aplicação convencional da turbidez para a determinação da concentração celular, pois é requerido uma turbidez homogênea para obter-se dados corretos. A solução do problema das duas fases e portanto da homogeneização da cultura antes da leitura, no colorímetro, foi conseguida da seguinte maneira:

O meio de cultura contendo células de levedura em duas fases, aquosa e oleosa, foi centrifugada em ultra centrífuga Beckman refrigerada a 4°C e uma velocidade 10.000 rpm (Força centrífuga média 10.062g), por cinco minutos. Após a centrifugação obtiveram-se três fases, a saber: no fundo do tubo a levedura que estava na fase aquosa, depois uma fase aquosa livre de levedura e em seguida a fase oleosa contendo ainda leveduras. A fase aquosa foi extraída do tubo da

centrífuga por sucção com uma pipeta alongada na sua base em forma de tubo capilar, sendo que a extração foi realizada cuidadosamente de modo a extrair somente a fase aquosa sem nada da fase oleosa. A fase aquosa o meio de cultura esgotado é eliminada. No tubo da centrífuga, contendo o creme de levedura separado da fase aquosa e a fase oleosa contendo levedura, foi adicionada acetona até completar o volume original do meio, sendo a mistura centrifugada a 10.062 g por cinco minutos; separando-se a levedura no fundo do tubo. O líquido livre de células de levedura é eliminado. Adiciona-se novamente acetona no tubo da centrífuga agora contendo só levedura com vestígios de querosene; as células são ressuspensas na acetona e novamente centrifugada, eliminando-se o solvente. A levedura é ressuspenso e centrifugada duas vezes com uma solução aquosa contendo 0,1% NaCl com a finalidade de lavar e eliminar os restos de solvente. A levedura obtida é ressuspensa em água destilada no mesmo tubo da centrífuga, até o mesmo volume do meio de cultura originalmente centrifugado. Dilui-se a suspensão na relação 1:20 (uma parte de suspensão em 20 partes de água destilada), e determina-se a densidade ótica da suspensão diluída.

Um volume conhecido de uma suspensão concentrada de levedura, com densidade ótica conhecida, foi centrifugada, e o creme de levedura obtido é secado a vácuo no mesmo tubo da centrífuga a temperatura de 50 - 60°C. Por diferença de peso do tubo com e sem levedura, calcula-se o peso da levedura seca. A unidade da levedura seca determinou-se gravimetricamente (por diferença de peso em posterior secagem). Uma grama de levedura completamente seca - (referida a 0,0% unidade) em um litro de suspensão aquosa, deu uma densidade ótica de 0,57 (O.D. 610 m μ).

A recuperação das células em maiores quantidades, - por exemplo do fermentador, quando não era requerida determinação de rendimento, foi feita da seguinte maneira: o meio de cultura - contendo as células de levedura foi filtrado em papel de filtro, usando funil.

O creme de levedura retido no filtro juntamente com hidrocarboneto, foi suspenso em acetona e centrifugado; O creme obtido foi lavado duas vezes e centrifugado com água salina (NaCl 0,2%) e depois com água de torneira. O Creme final foi secado a vácuo até um conteúdo de umidade de aproximadamente 10% e a levedura seca conservada em frascos de vidro.

6 - Determinação Analítica dos Componentes

Umidade cinza e matéria graxa crua da levedura, foram determinadas pelo método oficial da AOAC; Fibra crua foi determinada pelo método de Scharrer e Kirschner; Nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl; e Proteína crua obtém-se multiplicando o nitrogênio total por 6,25.

Os aminoácidos foram determinados com o analisador de aminoácidos "Spinco" (Spinco Division Beckman Instruments Inc.) Modelo 126, sobre uma amostra da proteína de levedura hidrolizada em meio ácido. O triptofano da proteína hidrolizada em meio alcalino, foi determinado colorimetricamente, de acordo com o método de E. L. Müller (Müller, E. L., Journal of the Science and Food and Agriculture, Vol. 18, nº 9, Set. 1967).

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Frascos Agitados

A. Candida lipolytica ATCC 8661, acclimatada a trabalhar em meio de cultura contendo querosene como única fonte de carbono e energia, foi utilizada para inocular uma série de frascos erlenmeyer de 500 ml, cada um contendo 50 ml de meio de cultura. Para todas as experiências os frascos eram inoculados com um volume de 2,5 ml. de inóculo de 24 horas de idade, sendo que este volume de inóculo e, correlativamente, a quantidade de levedura produzida pelo mesmo, era descontado do rendimento final. Para todos os casos experimentais de meios de cultura, trabalhou-se em um agitador rotativo a 300 r.p.m. e temperatura controlada de 33°C.

1.1. Efeito da fonte nitrogenada sobre o rendimento celular.

Para conhecer a fonte nitrogenada mais adequada na transformação de querosene em material celular, foram experimentados meios de cultura tentativos com NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 e $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2$ mantendo-se constante a concentração dos outros constituintes do meio, e trabalhando com uma concentração de 10% (v/v) de querosene. A quantidade da fonte nitrogenada a ser usada, foi calculada com base em experiências prévias de rendimento celular e conteúdo em proteína da célula, sendo que para alguns casos se colocou um excesso de aproximadamente 25% do nitrogênio teórico requerido para obter o máximo rendimento celular com 10% de querosene - (v/v) ou seja, de aproximadamente 40% (g de levedura seca por 100 ml de querosene). A proteína celular obtida para o máximo rendimento por litro de meio de cultura, dividida por 6,25 nos dá a quantidade de nitrogênio teórico requerido por litro de meio.

Os quadros I-A e I-B, mostram a composição dos meios de cultura experimentados para determinar a influência da fonte nitrogenada e de outros sais, no rendimento celular.

O quadro V, dá os resultados obtidos com os meios de cultura dos quadros I-A e I-B, sendo que a concentração celular é dada em valores de densidade ótica (valores obtidos com diluição 1:20 antes da leitura no colorímetro, e os dados obtidos multiplicados por 20 para obter os valores reais.) Isto é necessário porque a escala de leitura da densidade ótica no colorímetro usado, alcança um valor máximo de $\text{O.D.} = 2,0$.

Os resultados obtidos são mostrados no gráfico 1, onde se observa claramente que o melhor rendimento celular é obtido com uréia ou com NH_4Cl como fonte nitrogenada, sendo que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 são fontes nitrogenadas não recomendáveis para a produção de proteína microbiana do querosene, ao menos em nosso caso experimental.

1.2. Efeito da concentração de NH_4Cl sobre o crescimento celular.

Tomando arbitrariamente meios de cultura contendo NH_4Cl como fonte nitrogenada, pesquisou-se o efeito da concentração do mesmo no meio de cultura, sobre o rendimento celular.

O gráfico 2 mostra os resultados obtidos com meio de cultura 1 e 2, (quadro V). Nota-se claramente, que o meio 2 contendo 10g NH_4Cl por litro de meio de cultura é mais adequado que o meio 1, usando 7 gramas de NH_4Cl por litro. No primeiro caso temos um excesso de aproximadamente 25% de nitrogênio.

1.3. Efeito da concentração de MgSO_4 sobre o crescimento celular.

O gráfico 3 indica que o meio de cultura 6, contendo 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro, é mais eficiente que os meios 5 e 4 contendo 0,4 g e 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro de meio, respectivamente - (Quadro V).

1.4. Efeito da concentração de KH_2PO_4 sobre o crescimento celular.

O gráfico 4 demonstra que o meio de cultura 4, contendo 5 g de KH_2PO_4 por litro, é mais eficiente que os meios 2 e 3, contendo sete e dez gramas de KH_2PO_4 por litro, respectivamente. (Quadro V)

1.5. Efeito da concentração de NaCl sobre o crescimento celular.

O gráfico 5, mostra que o meio de cultura 6, contendo 0,1 g de NaCl por litro, é ligeiramente superior ao meio 7 contendo 0,2 g de NaCl por litro. (Quadro V).

1.6. Efeito da adição de nutrientes orgânicos, no meio de cultura sobre o rendimento celular.

Foram realizadas várias experiências com finalidade de demonstrar as vantagens e desvantagens da adição de nutriente orgânico

em meios de cultura e comparar os resultados com os obtidos com meios de cultura sintéticos e completamente inorgânicos. Foram experimentados três tipos de matérias orgânicas, a saber:

- a) Levedura autolizada -- incorporação principalmente de proteínas, aminoácidos, vitaminas e outros fatores de crescimento.
- b) Farelo de arroz -- incorporação de carboidrato (essencialmente amido), proteína e gordura.
- c) Melago de cana -- incorporação principal de carboidratos (essencialmente sacarose e açúcares redutores) e sais minerais.

O gráfico 6 mostra os resultados obtidos usando o meio básico 6 para todos os casos. Foi demonstrado concretamente que a adição destes nutrientes, não apresenta vantagem no rendimento celular -- com relação ao obtido com o meio básico 6, totalmente inorgânico.

O meio de cultura 24, contendo duas gramas de levedura autolizada por litro de meio de cultura, produz um rendimento celular ligeiramente inferior ao produzido no meio 28 contendo seis gramas de farelo de arroz por litro de meio; este dá um rendimento celular quase igual ao meio básico 6.

O meio de cultura 29, contendo duas gramas de melago de cana por litro de meio, e 35 contendo duas gramas de farelo de arroz e duas gramas de melago de cana por litro de meio de cultura, deram rendimentos apreciavelmente menores que o meio básico 6.

Isto demonstra que em nosso caso, a adição de nutrientes orgânicos, principalmente sacarose e açúcares redutores, interferem -- na fermentação, diminuindo o rendimento celular com relação ao obtido com nutrientes inorgânicos somente. (Quadro VI)

1.7. Efeito da composição do meio de cultura sobre a autólise da levedura, durante a incubação.

O gráfico 7 mostra as curvas obtidas com os meios de cultura 6, 12, 19, 21, 29 e 36. (Quadros V e VI)

Foi demonstrado que para o meio de cultura 36, contendo levedura autolizada, farelo de arroz e melaço de cana, a autólise inicia-se após 36 horas de fermentação; para o meio 29, contendo melaço de cana de açúcar a autólise inicia-se após 48 horas de fermentação. No meio 36, temos cinco vezes mais melaço que no 29 e, portanto, mais sais, sendo que este pode ter sido o motivo principal da rápida autólise no primeiro caso.

Nos meios 6, 12, 19 e 21 a autólise inicia-se após 60 horas de fermentação; sendo que a taxa de velocidade da autólise foi crescente, começando com o meio 19, usando NH_4NO_3 como fonte nitrogenada; depois meio 21 com uréia; em seguida meio 12 contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e finalmente meio 6 contendo NH_4Cl .

Do ponto de vista prático-econômico, o meio de cultura - que melhor se apresenta para trabalhar em escala industrial, seria o 21 com uréia como fonte nitrogenada, pois dá um rendimento celular maior e uma taxa de velocidade de autólise baixa após 60 horas de fermentação. No caso de recuperar a levedura antes das 60 horas de fermentação, ou seja, no pico máximo de produção (o qual é realmente feito na indústria) então seria praticamente indistinto o uso dos meios 6 ou 21, (Quadro VII).

1.8. Efeito da concentração de hidrocarboneto no meio de cultura, sobre o rendimento celular.

O gráfico 8 mostra seis curvas de crescimento celular, representando cada uma, concentrações diferentes de querosene em meio de cultura com NH_4Cl , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NaCl (ver quadros III e VIII).

Pelas curvas, nota-se que a concentração ideal de querosene para obter altos rendimentos em célula, é de 3%, sendo que diminui progressivamente com 5%, 1%, 10%, 15% e 20% respectivamente.

O gráfico 8 relaciona a taxa de crescimento celular em relação ao tempo de fermentação, sendo que a taxa para o meio de

cultura com 3% de querosene, no pico máximo de crescimento, é praticamente igual ao obtido com 5% de querosene.

O alto crescimento celular obtido com 3% de querosene, foi realmente surpreendente principalmente quando comparado com os obtidos com as outras concentrações de querosene.

1.9. Efeito da concentração salina do meio de cultura com diferentes concentrações de querosene sobre o crescimento celular.

Os quadros IV e IX dão a composição dos meios de cultura a diferentes concentrações de querosene, e os resultados obtidos no crescimento celular, respectivamente. Pode-se notar que o NH_4Cl do meio experimental nº 37 com 1% de querosene, foi reduzido em 4 vezes no meio 43, ou seja, 2,5g NH_4Cl por litro de meio em lugar de 10g NH_4Cl por litro, sendo que o crescimento celular praticamente não mudou; isto é lógico pois, 2,5g NH_4Cl por litro supre o nitrogênio suficiente para a levedura produzida e com um excesso aproximado de 25%.

Em experiência paralela, comparou-se o meio de cultura 43 e 45, ambos com 2,5 gramas NH_4Cl por litro de meio, mas o primeiro com 5 gramas KH_2PO_4 por litro e o segundo com 1,25 gramas KH_2PO_4 por litro (quantidade calculada baseada na levedura produzida, relacionada com os requerimentos estudados com o meio de cultura 6, mas com um excesso de 40% sobre o valor 1,25); sendo que o crescimento celular caiu ligeiramente com relação ao meio 45 (aproximadamente 10%); significando com isso que a adição necessária de KH_2PO_4 para o meio 45 obter o mesmo rendimento que o 43 deverá ser da ordem de aproximadamente 1,5 gramas por litro.

Paralelamente foram feitas experiências com 3% de querosene (meios 44 e 46) encontrando-se que a quantidade de 4 - 5 gramas KH_2PO_4 por litro é a adequada para obter o rendimento atingido com 5g no meio 44.

1.10. Queda de pH durante a fermentação. pH não controlado.

O gráfico 9 mostra as curvas de pH obtidas durante a fermentação de vários meios de cultura (Quadro X).

Pode-se notar que na maioria dos casos, a grande queda do pH é produzida nas primeiras 24 horas de fermentação; sendo que a menor queda corresponde ao meio de cultura 2^o com uréia como fonte nitrogenada; e a máxima queda após 24 horas corresponde ao meio 12, ou seja, com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Nota-se que o pH após descer, começa novamente a subir, coincidindo isto com o início da autólise da levedura, que é lógico espera-se, pela liberação de grupos nitrogenados alcalinos. Um fato interessante apresenta - se exclusivamente com meio 36, que após cair bruscamente de pH = 5,0 para pH = 4,4 em 24 horas, praticamente não desce mais com a continuação da fermentação, e após 84 horas de fermentação, o pH é de 5,2, ou seja, o mais alto com relação aos outros meios experimentados. Isto poderia explicar-se pelo alto conteúdo de melago do meio 36, que introduz substâncias buffer ao meio de cultura, permitindo a estabilização de seu pH.

1.11. Efeito do controle de pH do meio de cultura, sobre o crescimento celular.

O gráfico 10, mostra duas curvas comparativas do meio de cultura 6, uma sem controle de pH durante a fermentação, e a outra com controle (ver quadro XI). Em ambos os casos o pH inicial foi de 5,0. As curvas demonstram claramente que com controle de pH=5,0, o máximo pico de crescimento celular é alcançado nas 48 horas de fermentação, enquanto que sem controle de pH, o pico máximo se obtém nas 60 horas de fermentação. Além disso, o crescimento celular com controle de pH é maior que sem controle. Isso demonstra a vantagem de controlar a pH = 5,0 durante a fermentação, não só pelo aumento de rendimento, mas também pela grande redução do tempo para alcançar

o pico máximo de produtividade, sendo que isto, industrialmente é mais importante que o ligeiro aumento de rendimento.

1.12. Efeito da temperatura sobre o crescimento celular e velocidade de crescimento.

O gráfico 11 nos dá duas curvas correspondentes ao meio de cultura nº 6 com pH inicial 5,0 e sem controle posterior. Realizando-se a fermentação a 30°C, obtém-se após 84 horas de fermentação, um pico máximo de crescimento celular, superior com relação à fermentação a 33°C; no entanto, a esta temperatura, o pico máximo é conseguido em 60 horas de fermentação. Industrialmente, seria mais interessante conseguir o pico máximo em 60 horas a 33°C, do que em 84 horas a 30°C, com um ligeiro aumento de rendimento. (Quadro XII)

1.13. Rendimento celular para querosene

Baseados nas leituras de densidade ótica dos resultados obtidos de vários meios de cultura, calculamos o rendimento celular - percentual com relação ao querosene introduzido inicialmente no meio de cultura.

O quadro XIII nos dá uma relação dos rendimentos obtidos com alguns meios de cultura.

Pode-se notar o alto rendimento celular de 63% para o meio de cultura nº 38 com 3% de querosene. Nota-se também que 3% de querosene é um ponto crítico, por quanto uma percentagem menor ou maior produz uma queda no rendimento celular.

2. Fermentador

Foram realizadas experiências de fermentação em descontínuo com pH controlado no fermentador já descrito no capítulo sobre equipamentos. Esta experiência foi realizada com a finalidade de comparar os resultados com os obtidos em frascos agitados; além disso, para ter informações em escala piloto, o que futuramente nos poderá ser útil para realizar trabalhos de ampliação de escala (Scale-up) e de fermen-

tação contínua." Nossas experiências em fermentador, foram realizadas com o meio de cultura 39, contendo 50cc de querosene por litro de meio de cultura.

Os resultados obtidos, são mostrados no gráfico 12 onde se compara a produtividade de levedura no fermentador em grama de levedura seca por litro de meio de cultura, com o tempo de fermentação. Nota-se que temos uma fase lenta até as 7 horas de fermentação, sendo que então a produtividade aumenta rapidamente até as 12 horas de fermentação; vindo logo uma fase mais lenta até as 24 horas, e finalmente virá a fase estacionária.

O meio de cultura no fermentador foi inoculado com um cultivo de *Candida lipolytica* preparado em frascos agitados, contendo aproximadamente 5g. de células de levedura por litro. Nos cálculos e no gráfico 12, a quantidade do inóculo introduzido foi descontado do total de células produzidas, de maneira que para todos os efeitos partimos da fase produtiva.

Com os dados obtidos, e fórmulas matemáticas conhecidas, calcularemos todos os valores que tipificam uma fermentação descontínua.

Serão calculados os seguintes valores:

$P_{\text{médio}}$ = coeficiente de produtividade, (g. célula seca/ litro de meio de cultura/hora), durante o período completo de cultivo (24 horas).

p_{max} = coeficiente de produtividade máxima na fase logarítmica (exponencial).

X' = taxa de crescimento (equivalente aos valores de produtividade p).

X = massa celular/unidade de volume (g. célula seca/ litro de meio de cultura), calculando a partir das leituras da densidade ótica durante todo o processo fermentativo. (1 g. célula seca/litro de meio = 0,57 O.D. - 610 m μ)

X_1 = X na fase logarítmica.

S = massa de substrato limitante de crescimento/unidade de volume (ml querosene/l de meio de cultura).

μ = taxa específica de crescimento celular (hr^{-1})

t_d = tempo de duplicação ou tempo de geração (hr)

Y_{kg} = constante de rendimento médio no período completo de fermentação 24 horas (g levedura seca/g querosene).

Y_p = constante de rendimento médio no período completo de fermentação (g levedura seca/g parafinas contidas no querosene).

Y_{kv} = constante de rendimento médio no período completo de fermentação (g levedura seca/g querosene)

Os valores são os seguintes:

X = 26,2 g célula seca/l de meio de cultura (24 horas)

X_1 = 16,6 - 5,2 = 11,4g célula seca/l de meio de cultura (5 horas)

$P_{\text{médio}}$ = $X' \text{ médio} = \frac{X}{t} = \frac{26,2}{24} = 1,9\text{g célula seca/ l de meio de cultura hora.}$

P_{max} = $X' \text{ max} = \frac{X_1}{t_1} = \frac{11,4}{5} = 2,3\text{g célula seca/l de meio de cultura hora.}$

$\mu = \frac{P_{\text{max}}}{X_1} = \frac{2,3}{11,4} = 0,2 \text{ hr}^{-1}$

S = $S_v = 50 \text{ ml querosene/l meio de cultura} \approx S_g = 40 \text{ g querosene/l meio de cultura}$ (Densidade do querosene usado é 0,797) = $S_p = 30,3 \text{ g parafinas/l de meio de cultura}$ (parafinas representa 76% do querosene).

$t_d = \frac{1 \ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{0,2} = \frac{0,693}{0,2} = 3,46 \text{ horas}$

$Y_{kg} = \frac{X}{S} = \frac{26,2 \text{ g/l}}{40 \text{ g/l}} = 0,66$

$$Y_{K_V} = \frac{X}{S_V} = \frac{26,2 \text{ g/l}}{5000 \text{ cc/l}} = 0,52$$

$$Y_P = \frac{X}{S_P} = \frac{26,2 \text{ g/l}}{30,3 \text{ g/l}} = 0,86$$

3. Composição química da levedura.

No quadro XIV, temos a composição química da levedura obtida no fermentador com meio de cultura 39. Pode-se observar que o conteúdo em proteína é bastante bom e comparável ao conteúdo de proteína da Torula utilis obtida com melago de cana de açúcar. O que chama a atenção é o alto conteúdo em matéria graxa obtido, apesar de se ter trabalhado durante toda a fermentação com um excesso de nitrogênio; sabendo-se que para obter células com alto conteúdo em matéria graxa, deve-se trabalhar na fermentação com uma deficiência em nitrogênio.

O alto conteúdo em proteína e gordura da levedura de querosene, confere grande valor a este produto, podendo ser usado na suplementação de rações balanceadas para animais.

O quadro XV, dá a composição dos aminoácidos da levedura de querosene, obtida no fermentador com meio de cultura 39. A recuperação de aminoácidos da proteína crua foi de 83%, sendo mais alto que o obtido normalmente da Torula utilis fabricada com melago de cana de açúcar.

O quadro XVI apresenta uma relação comparativa entre a composição dos aminoácidos da proteína de levedura de querosene e a proteína Standard, de referência, da FAO (Food and Agricultural Organization).

Pode-se observar, que a nossa proteína tem todos os aminoácidos essenciais, sendo que a Cistina encontra-se em porcentagem aproximada de cinco vezes maior na proteína de querosene que no

Standard da FAO, e a treonina duas vezes e meia maior. A Lisina, Isoleucina, Valina, Metilalanina e Triptofano encontram-se em porcentagens ligeiramente maiores, enquanto que a Leucina é praticamente igual. Finalmente a Metionina presente na proteína do petróleo, é a metade da presente na proteína de referência. De acordo com isto, nossa proteína é superior à proteína Standard da FAO, sendo que a deficiência de Metionina pode ser solucionada por incorporação em forma para ou por adição de outra proteína com alta porcentagem em Metionina.

V - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM RELAÇÃO AOS OUTROS AUTORES

1. Fonte Nitrogenada

Nossa conclusão de que com uréia e NH_4Cl como fonte nitrogenada para o meio de cultura, nos dá os melhores rendimentos e que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 não são recomendáveis para a produção de proteína microbiana, coincide com os resultados encontrados por Shin-Ichiro Ôtsuka e outros (15) e Singh, H.D. e outros (16).

2. Concentração de hidrocarboneto.

Encontramos que a melhor concentração de hidrocarboneto no meio de cultura para obter o maior rendimento em levedura oscila entre 3 - 5% (v/v); o maior valor de X foi conseguido com uma concentração de 20% (v/v) de querosena, porém o rendimento foi muito baixo. Concentração menor que 3%, e maior que 5% produziu uma queda no rendimento. Shin-Ichiro e outros (15) conseguiram o máximo rendimento celular com 5% (v/v) de hidrocarboneto no meio, sendo o valor máximo de X obtido com 15% (v/v) de hidrocarboneto. Para Singh, H.D. e outros (16) o valor máximo de X foi conseguido com 80% (v/v) de hidrocarboneto no meio de cultura, seguindo logo 10% (v/v) e logo as concentrações intermediárias entre 10 - 80%.

3. Adição de nutrientes orgânicos

Não encontramos vantagem em adicionar nutrientes orgânicos no meio basal inorgânico, pois os rendimentos foram quase iguais em alguns casos, e em outros foram sensivelmente menores. Concluímos que a adição dos nutrientes orgânicos que utilizamos prejudica o rendimento. A desvantagem de usar nutrientes orgânicos coincide com os resultados obtidos por Shin-Johiro Ôtsuka e outros (15).

4. Efeito da Composição do meio de Cultura sobre a autólise da levedura, e sua ação sobre o pH.

Não encontramos trabalho similar para efeito de comparação.

5. O quadro XVII, mostra claramente os valores elevados em X e p_{max} por nós conseguidos, o que pode ser facilmente explicável porque usamos querosene com alta porcentagem em parafinas. Nossos valores de Y_{K7} e Y_{K8} são também bem mais altos que o conseguido por outros autores.

Os dados de μ e Y_p por nós obtidos, são bastante semelhantes aos obtidos por outros autores; isto confirma nossa teoria de que nossos valores elevados para X , p_{max} , Y_{K7} , Y_{K8} são devidos ao alto conteúdo em parafinas do nosso querosene.

De acordo com os resultados obtidos, um litro de querosene dará aproximadamente 500 g de levedura seca (0,0% unidade).

6. O quadro XVIII, que compara a composição dos aminoácidos por nós e por outros autores, com relação ao standard da FAO, mostra vários fatos interessantes, como por exemplo:

a.

Todos os autores encontraram deficiência de metionina, com exceção de Wagner F., e outros (20).

b.

Todos os autores encontraram deficiência em Cistina e alguns têm ausência deste amino ácido, com exceção de nossa proteína que tem um elevadíssimo teor em Cistina, e quase cinco vezes superior ao standard da FAO. O mesmo acontece com Triptofano que mostra deficiência em alguns e ausência em outros, sendo que encontramos um teor mais elevado que o standard.

c.

Não encontramos coincidência em dados de composição de aminoácidos entre os vários autores. Inclusive, encontramos grandes diferenças e disparidade nas porcentagens. Isto pode ser explicável, assumindo que a composição dos aminoácidos e suas porcentagens podem variar quando se varia a matéria-prima, o microrganismo, e as condições físico-químicas da fermentação.

VI - CONCLUSÕES

1. Foram estudadas as melhores condições físico-químicas para a produção de levedura usando querosene comercial altamente parafínico como matéria-prima. O querosene utilizado possui 76% de parafinas.

2. O método utilizado para separar a levedura do meio de cultura esgotado, contendo ainda resíduo de hidrocarboneto não consumido (por sucessivas centrifugações) foi altamente satisfatório; o qual foi demonstrado ao realizar uma correlação entre os valores da Densidade Ótica determinados em forma direta do meio de fermentação centrifugado e em forma indireta, ou seja, obtendo o primeiro a levedura seca e logo ressuspensando para determinar a densidade ótica.

3. Foram estudados 46 meios de cultura diferentes para serem testados em frascos agitados, sendo que, somente alguns deram resultados satisfatórios em rendimento celular.

Ficou demonstrado que a uréia e o NH_4Cl são as melhores fontes de nitrogênio para a produção de proteínas de querosene.

A adição de nutrientes orgânicos ao meio de cultura - inorgânico basal, não dá vantagem no rendimento celular, com relação ao meio puramente inorgânico; inclusive, em alguns casos, a adição vai acompanhada por uma diminuição sensível do rendimento, principalmente quando se adiciona melago de cana de açúcar.

Foram determinadas as curvas da autólise da levedura no meio de cultura, sendo que a velocidade de destruição da levedura, varia com o tipo de meio de cultura utilizado e, logicamente, com a sua composição química. Encontramos que a taxa de velocidade de autólise, foi menor para o meio de cultura contendo NH_4NO_3 como fonte nitrogenada, que para a uréia e o NH_4Cl . Durante a autólise produz-se um aumento do pH, devido a liberação de nitrogênio amínico.

O meio de cultura contendo uréia como fonte nitrogenada, é o mais adequado para trabalhar em grande escala, portanto, dá o maior rendimento celular de todos os meios de cultura com 10% querosene (v/v) e tem uma taxa de velocidade de autólise bastante baixa.

A melhor concentração de querosene em meio de cultura, para obter altos rendimentos em levedura, foi de 3% (v/v).

4. O controle de pH durante a fermentação é necessário para obter um rendimento maior em levedura; além disto, os tempos de fermentação para obter o máximo pico de produtividade, são bem menores controlando o pH do que sem controle.

5. A temperatura de fermentação de 30°C obtém-se rendimento em levedura ligeiramente superior que com 33°C; mas a esta última temperatura o pico máximo de produtividade é alcançada, em tempo sensivelmente menor que na primeira temperatura.

6. Trabalhando num fermentador com pH controlado foram conseguidas fermentações completas em 24 horas com um meio de cultura contendo 5% de querosene (v/v). Para obter a mesma produtividade em frascos agitados, foram necessárias 48 horas de fermentação. O rendimento obtido em fermentador com meio de cultura 39, foi comparável àquela obtido em frasco agitado com o mesmo meio.

Durante as 24 horas de fermentação, apresentam-se as quatro fases típicas, ou seja: fase lenta até as 7 horas; fase exponencial ou logarítmica das 7 às 12 horas; outra fase lenta entre 12 e 24 horas e finalmente a fase estacionária, que progredida resultará na autólise da levedura.

Durante a fase exponencial, a produtividade foi bastante alta com peso máximo igual a 2,3 g/l h, sendo que caiu para peso médio = 1,09 g/l h para o ciclo fermentativo completo.

A taxa específica de crescimento celular, foi calculada em $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$; correspondendo a um tempo de geração de 3,46 horas.

As constantes de rendimento foram bastante altas, correspondendo a 0,66, 0,52 e 0,86 com relação ao peso de querosene, volume de querosene e parafinas no querosene, respectivamente.

7. A proteína obtida de querosene, possui todos os aminoácidos essenciais e em porcentagem maior que a proteína standard de referência, da FAO, com exceção da metionina.

GRÁFICO 1 - Efeito da Fonte Nitrogenada sobre o Rendimento Celular

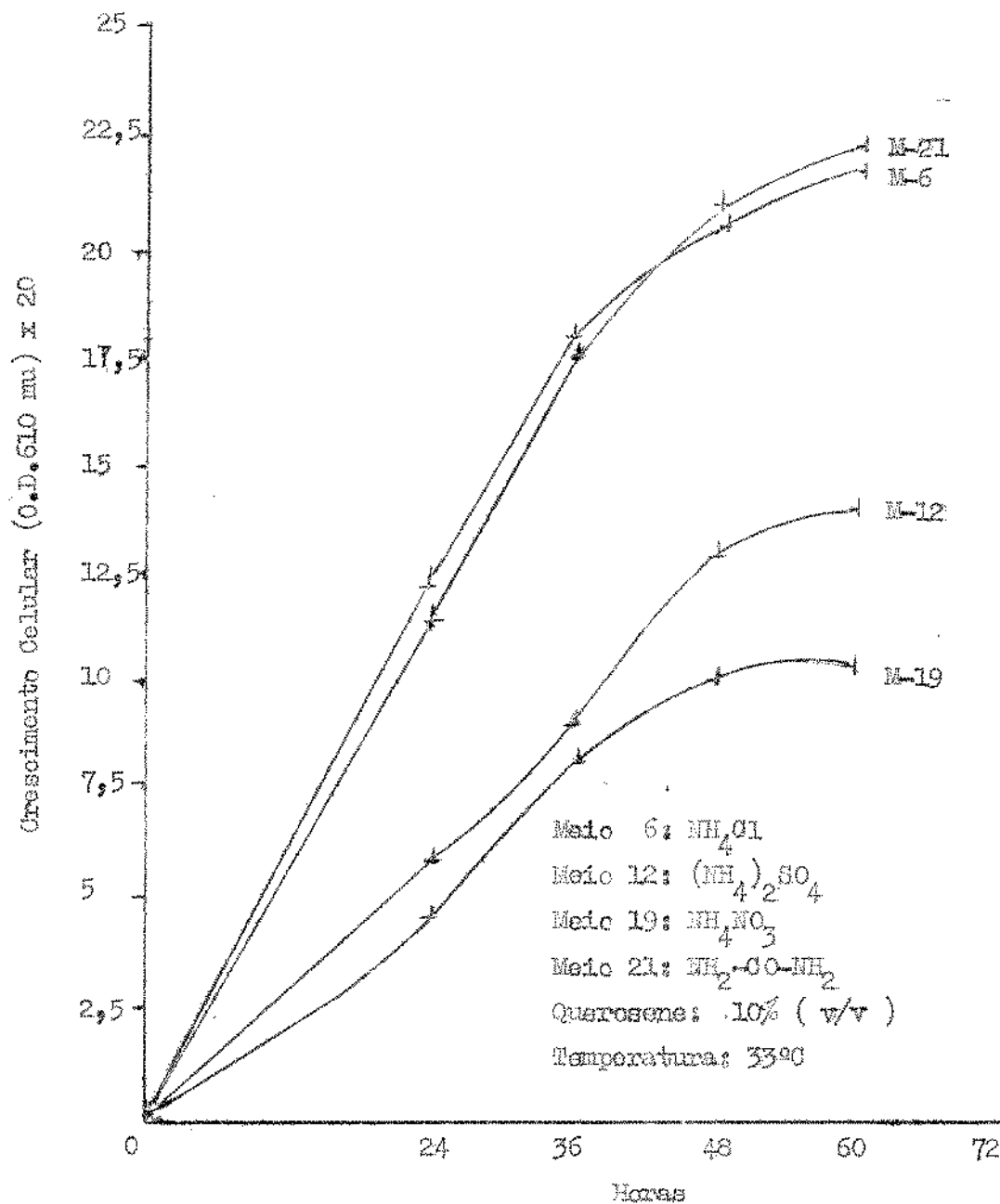


GRÁFICO 2 - Efeito da Concentração de NH_4Cl sobre o Crescimento Celular

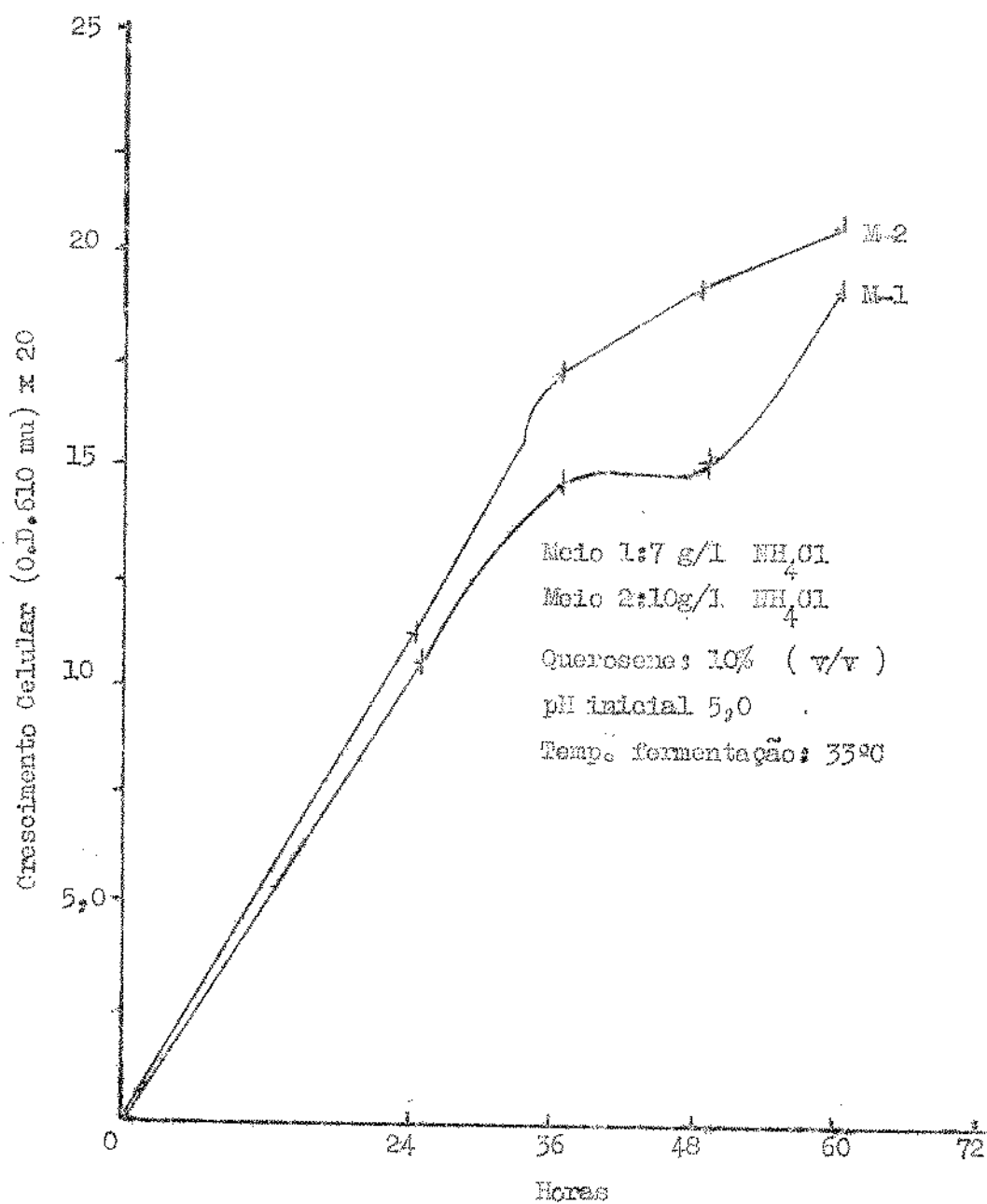


GRÁFICO 3 -- Efeito da Concentração de MgSO_4 sobre o Crescimento Celular.

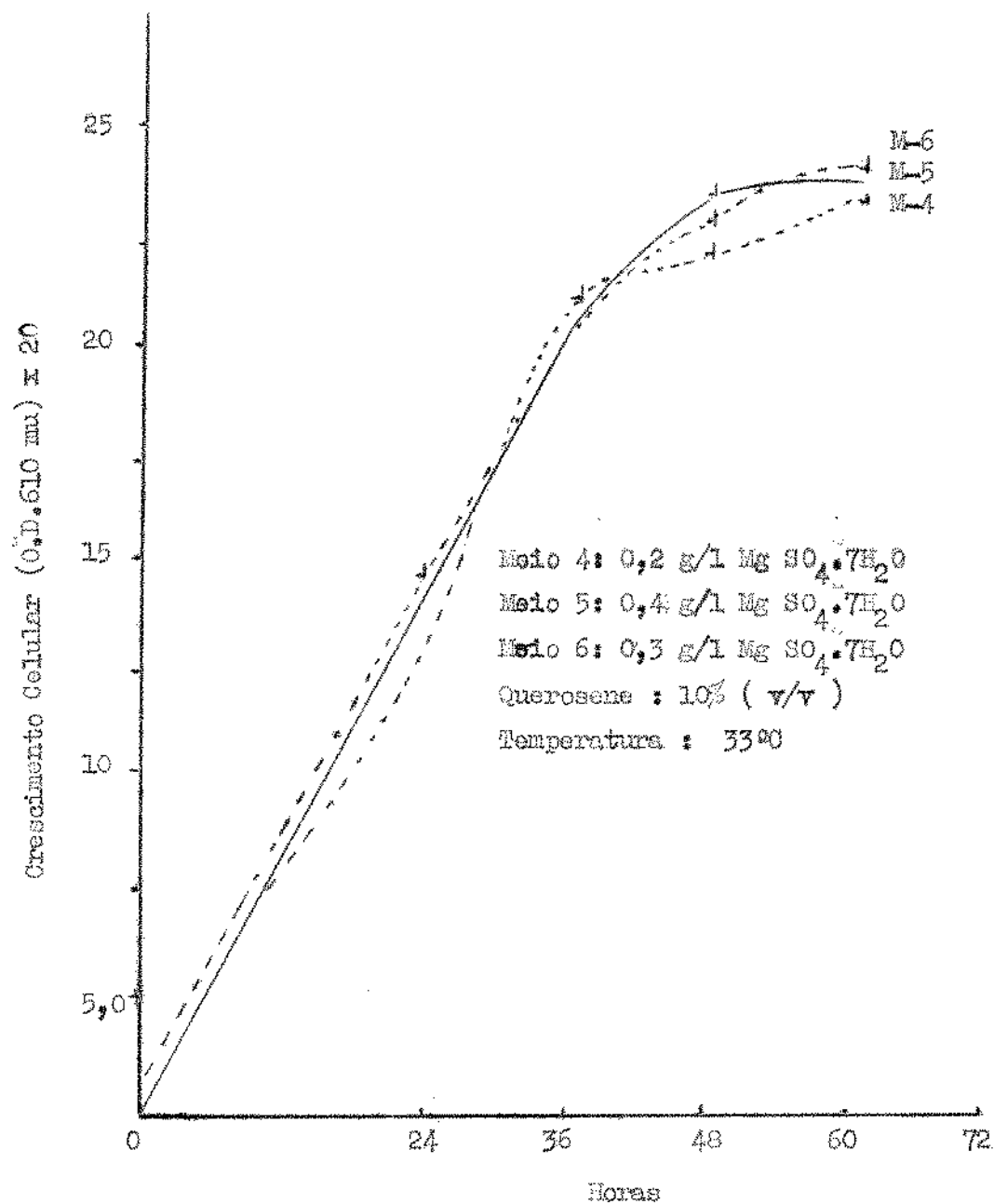


GRÁFICO 4 - Efeito da Concentração de KH_2PO_4 sobre o Crescimento Celular.

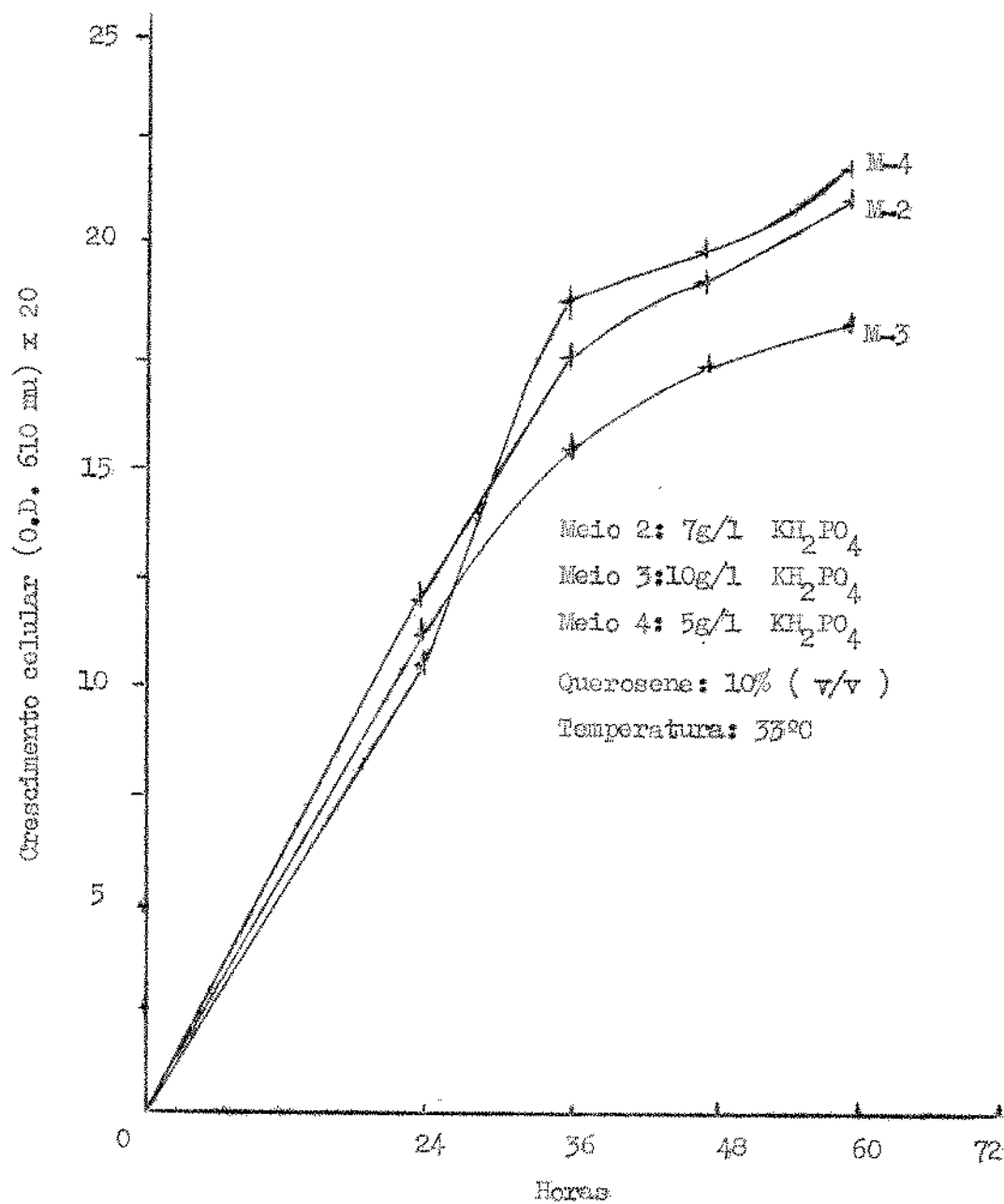


GRÁFICO 5 - Efeito da Concentração de NaCl sobre o Crescimento Celular

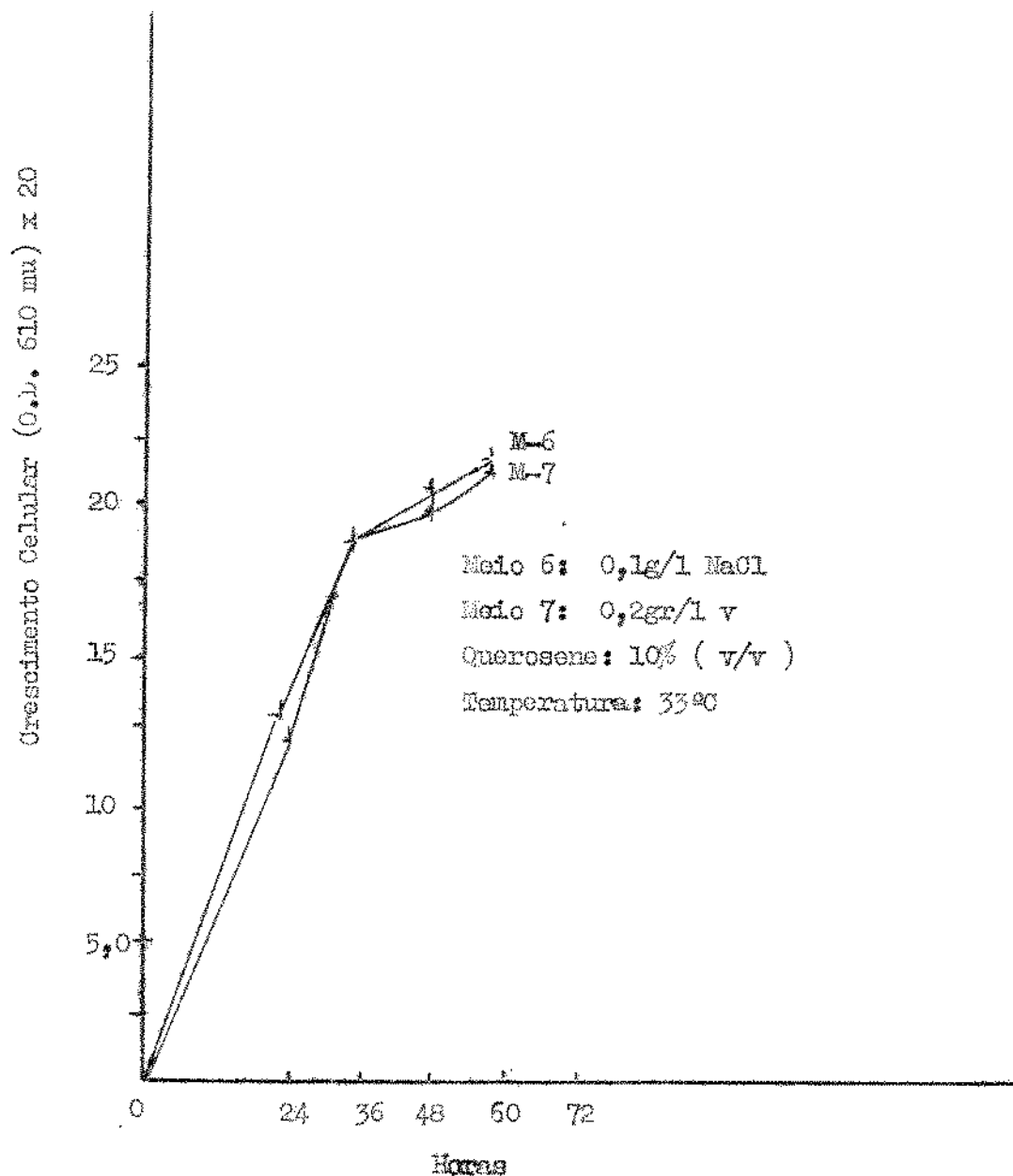


GRÁFICO 6 - Efeito da Adição de Nutrientes Orgânicos no meio de Cultura, sobre o Rendimento Celular.

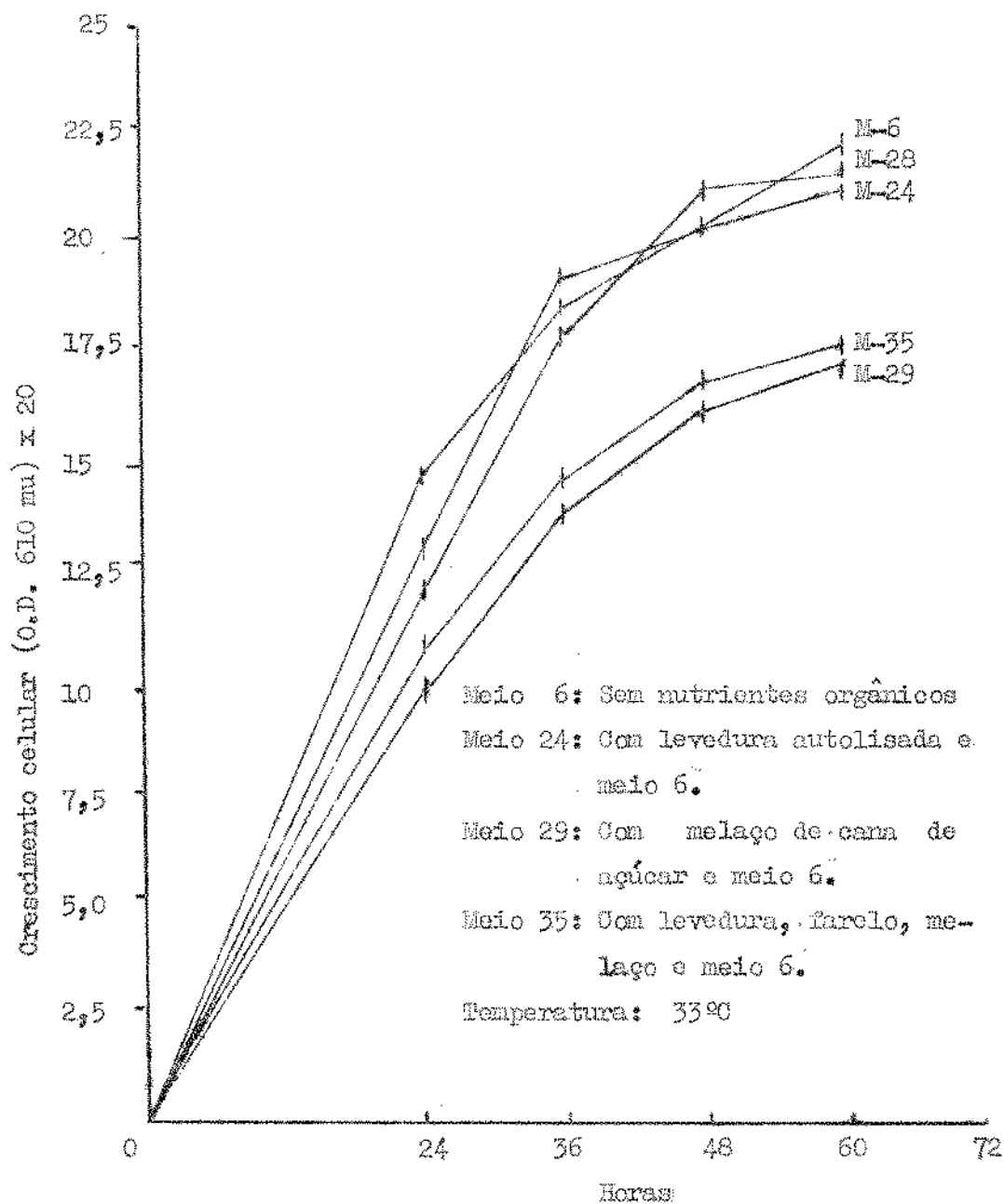


GRÁFICO 7 - Efeito da Concentração do Meio de Cultura
sobre a Autólise de Levedura durante a
Incubação.

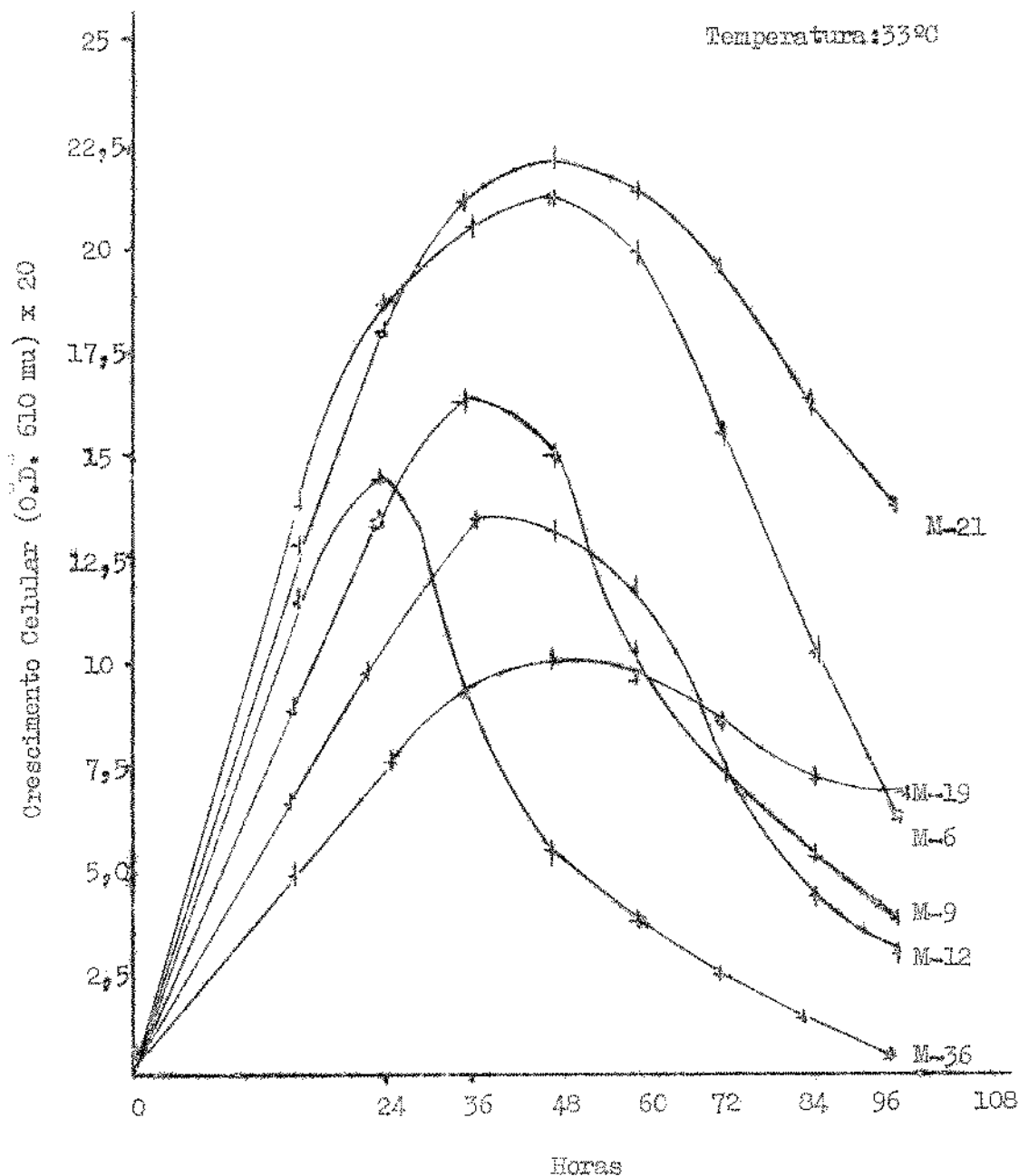
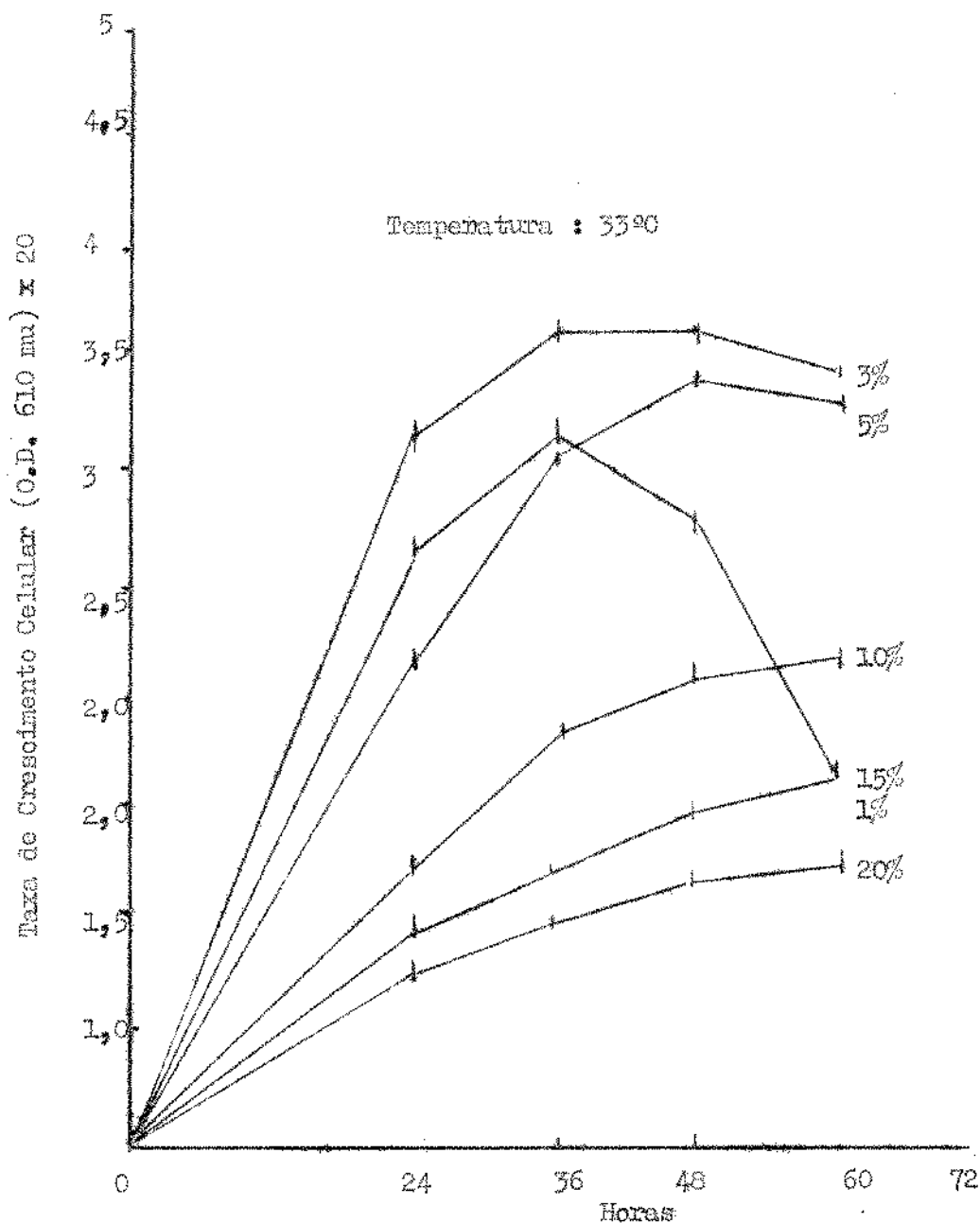


GRÁFICO 8 - Efeito da Concentração do Hidrocarbureto no meio de Cultura, sobre o rendimento celular.



Tôdas as taxas de crescimento referem-se a 1,0%. Querosene, para o caso do meio 42, com 200 ml querosene/l a taxa de crescimento será: $\frac{10 \text{ ml} \times 0,1}{200 \text{ ml}}$

GRÁFICO 9 - Queda de pH (não controlado) durante a fermentação.

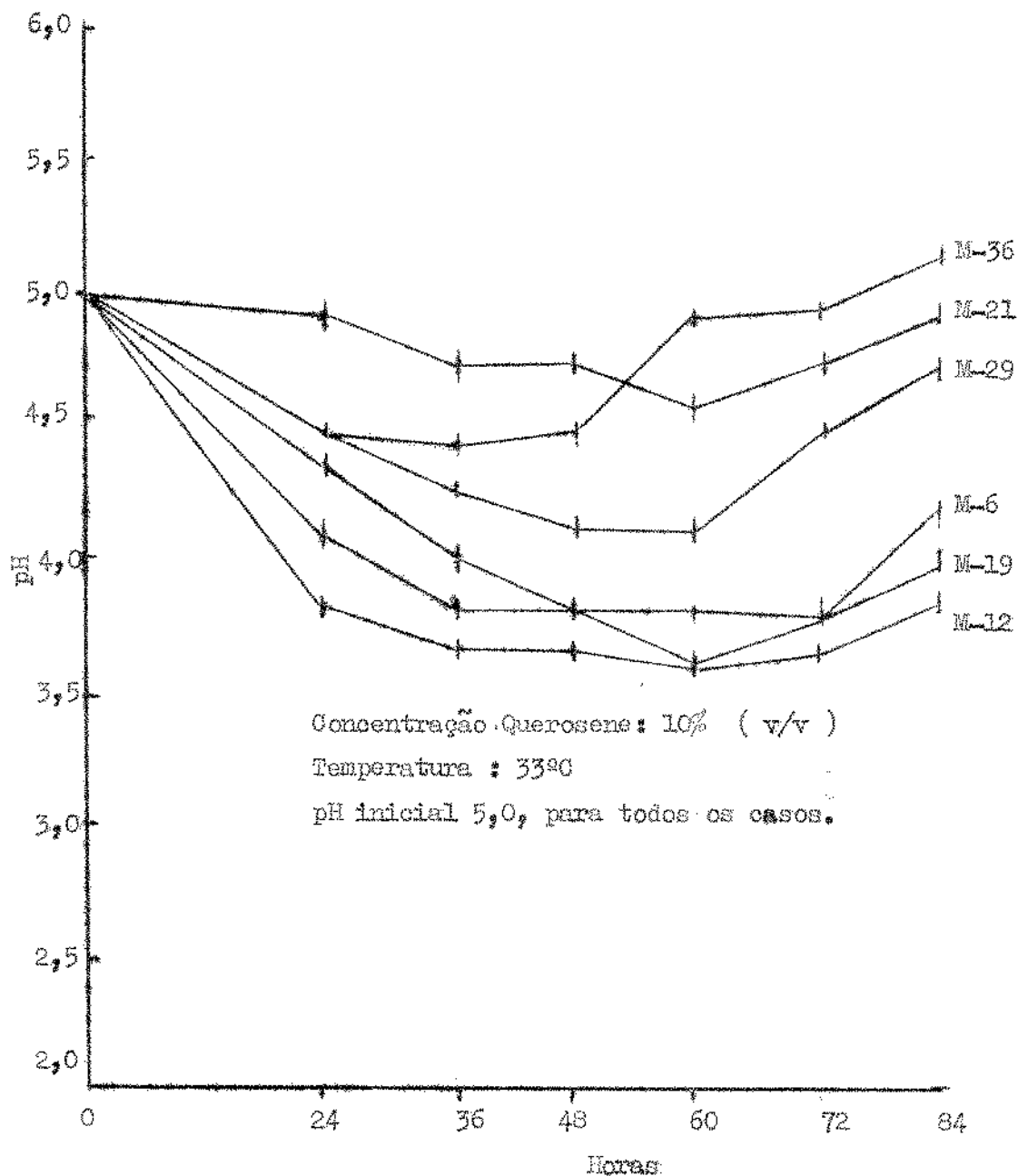


GRÁFICO 10 - Efeito do Controle de pH do Meio de Cultura, sobre o Crescimento Celular.

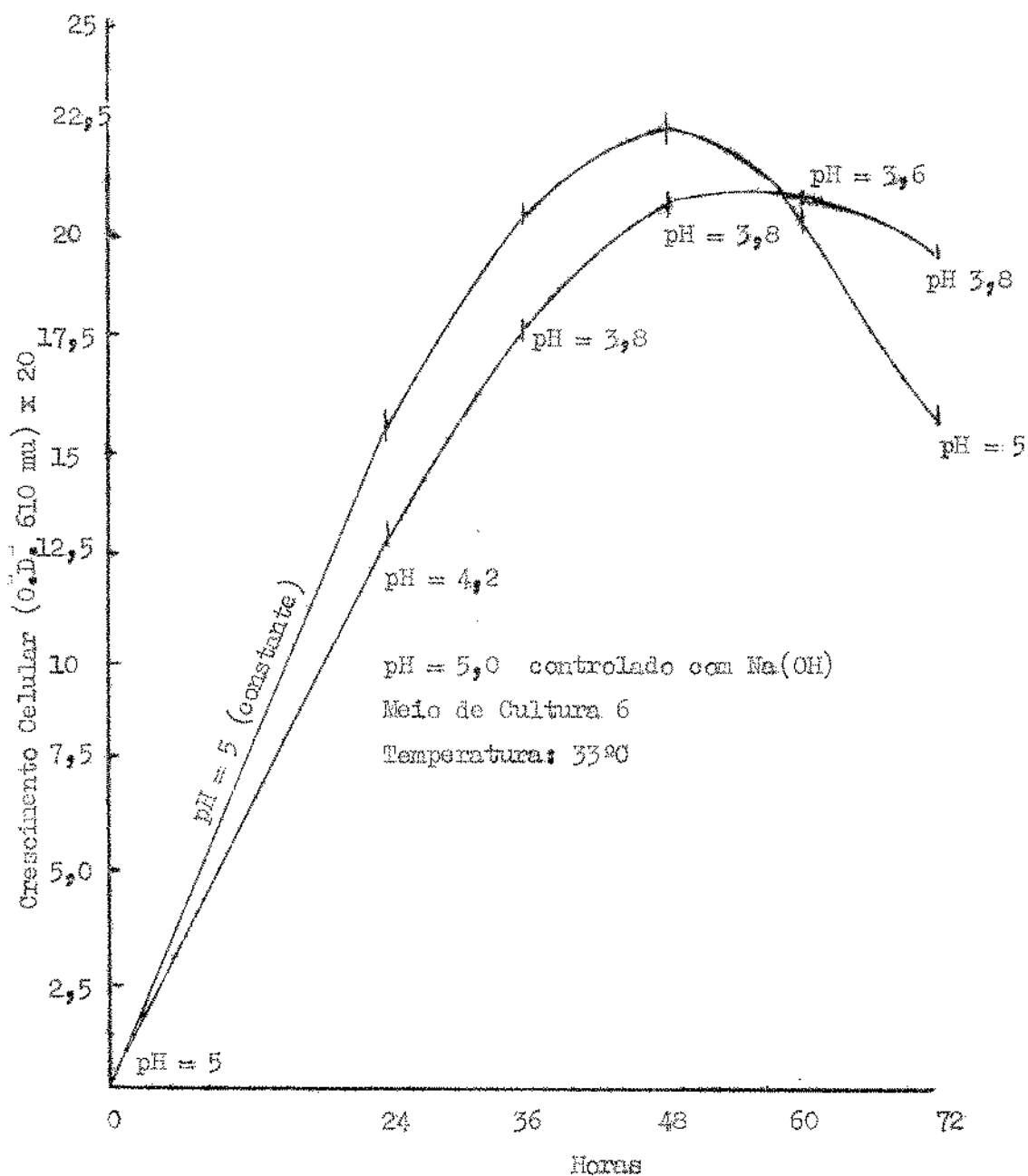


GRÁFICO 11 - Efeito da Temperatura sobre o Crescimento Celular e Velocidade de Crescimento.

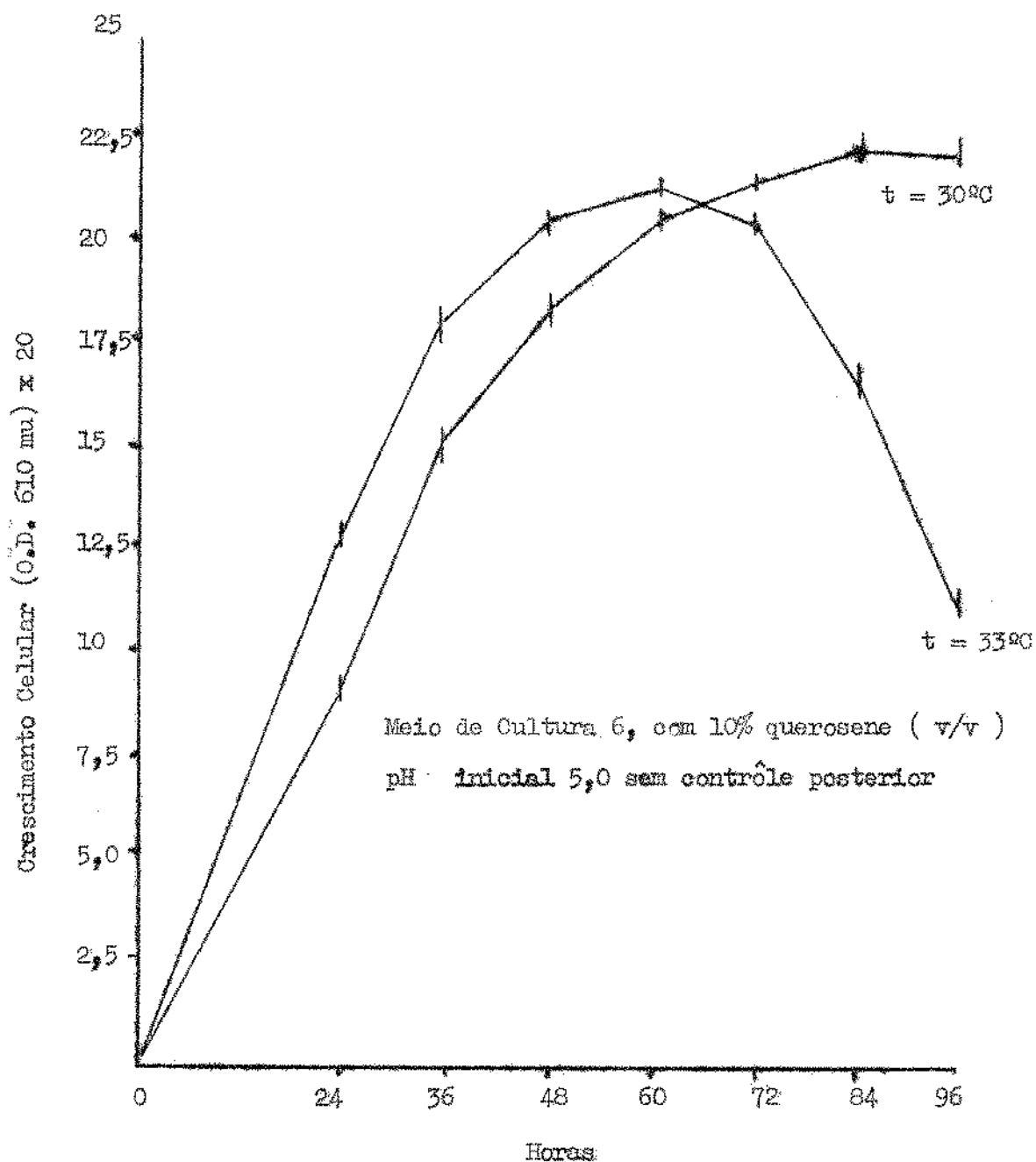
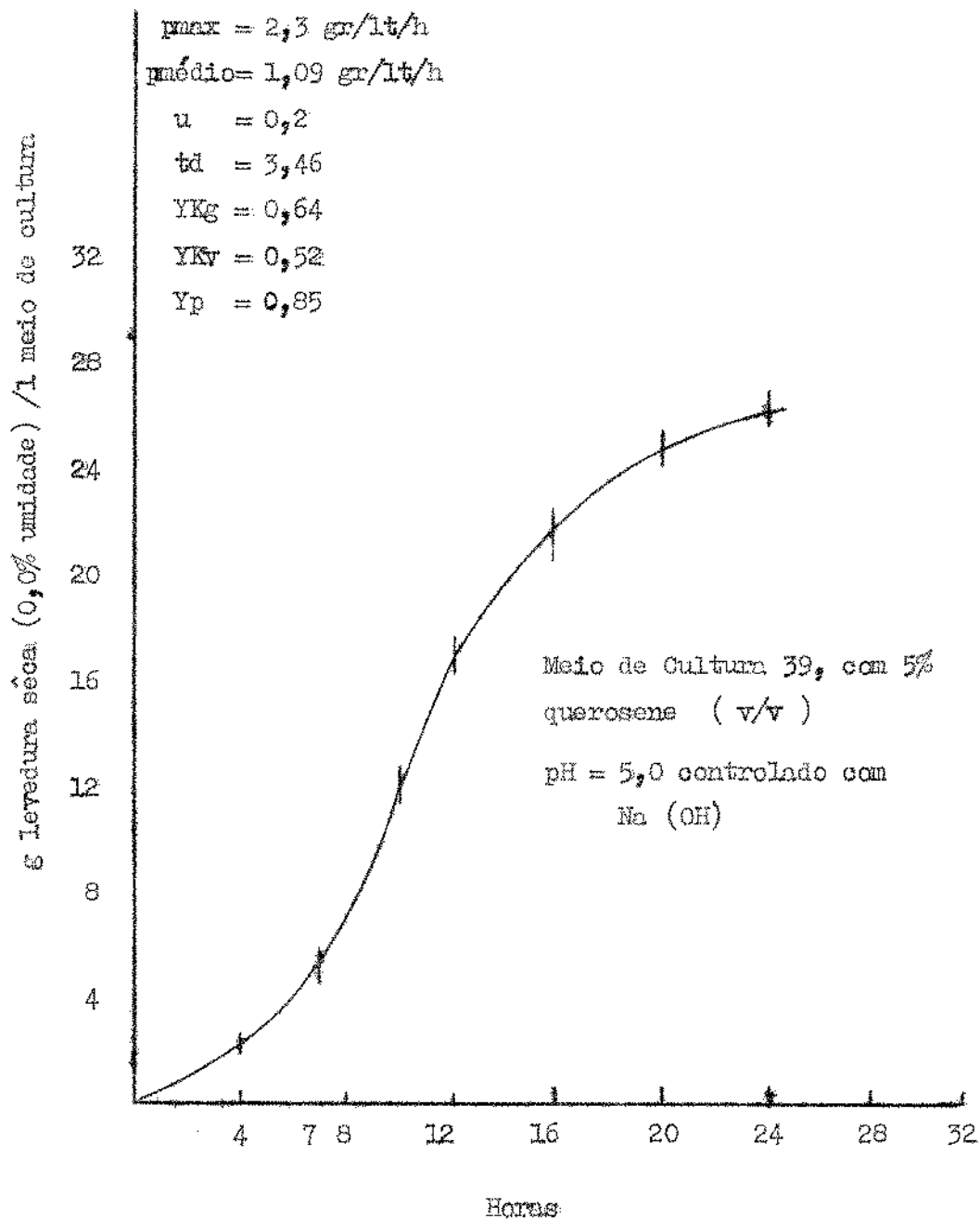


GRÁFICO 12 - Produtividade de levedura em Fermenta-
dor.



QUADRO I - A - Composição do meio de cultura para a fermentação

Componentes: (a)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
NH ₄ Cl	7	10	10	10	10	10	10				
(NH ₄) ₂ SO ₄								15	15	15	15
NH ₄ NO ₃											
NH ₂ - CO - NH ₂											
K H ₂ PO ₄	7	7	10	5	5	5	5	0,5	0,5	0,5	3
KCl								2	2	2	2
Mg SO ₄ - 7 H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	1	0,5
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2					
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O								1	1	1	1
CaCl ₂ · 2 H ₂ O											
Querosene ml/l	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

(a) = g/l de solução aquosa final.

QUADRO I - B - Composição do meio de cultura para a fermentação

Componentes (a)	Meios de cultura										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
NH_4Cl						10					
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15	15	15	15	15						
NH_4NO_3							12	12			
$\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2$									7	7	7
$\text{K H}_2\text{PO}_4$	5	3	3	3	3	2,5	5	5	5	5	5
KCl	2	4	2	1	1		2	2	2	2	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
NaCl						0,1	0,1	2	0,1	2	0,1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1	1	2	1	1	3,5					
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$					1						
Querosene ml/l	100	100	100	100	100	100					

(a) = g/l de solução aquosa final

QUADRO II - Composição de meio de cultura para a fermentação

Componentes. (a.)	Meio de Cultura													
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
NH ₄ Cl	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
KH ₂ PO ₄	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Querosene ml/litro	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Levedura autolizada.	1	2	4									2	2	2
Farelo de arroz:				2	4	6						6	6	6
Melão de cana de açúcar							2	4	6	8	10		2	10

(a) = g/l de solução aquosa final

QUADRO III - Composição do meio de cultura para a fermentação

Componentes (a)	Meio de cultura					
g/litro solução aquosa final	37	38	39	40	41	42
NH_4Cl	10	10	10	10	15	20
KH_2PO_4	5	5	5	5	7,5	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
Querosen. ml/litro	10	30	50	100	150	200

(a) = g/litro de solução aquosa final

QUADRO IV

Componentes (a)	Meio de cultura		
	43	44	45
NH_4Cl	2,5	8	2,5
KH_2PO_4	5	5	1,25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	0,3	0,3
NaCl	0,1	0,1	0,1
Querosene ml/litro	10	30	10
			30

(a) = g/l de solução aquosa final

QUADRO V - CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FRASCOS AGITADOS

Efeito dos Nutrientes sobre o Rendimento Celular

Mido de cultura.	Densidade Ótica determinada (O.D. 610 mμ) x 20				
	0 h.	24 h	36 h	48 h	60 h
1	0,006	10,800	14,400	15,000	19,600
2	0,007	11,600	17,300	19,600	21,200
3	0,003	11,200	15,500	17,200	18,100
4	0,006	10,700	18,600	19,700	21,500
5	0,006	11,800	18,300	21,200	21,600
6	0,006	12,300	18,500	20,900	22,100
7	0,006	12,100	18,800	20,700	21,900
8	0,007	2,200	5,100	7,100	7,600
9	0,007	3,500	6,200	8,700	9,200
10	0,007	3,800	6,900	8,500	8,900
11	0,008	5,200	11,700	13,300	13,800
12	0,009	5,100	9,100	12,900	13,600
13	0,009	6,100	12,200	13,700	13,900
14	0,009	5,500	11,200	13,100	13,700
15	0,008	4,900	11,800	12,600	13,200
16	0,003	5,300	12,100	13,500	13,900
17	0,006	8,900	13,500	15,200	16,100
18	0,008	4,300	7,900	9,500	9,800
19	0,008	4,500	8,600	10,100	10,600
20	0,006	11,300	16,900	19,500	19,800
21	0,006	11,800	18,300	21,200	22,300
22	0,007	12,100	17,800	20,300	21,900

QUADRO VI - CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FRASCOS AGITADOS

Efeito da adição de nutrientes orgânicos.

Meio de cultura.	Densidade Ótica determinada (O.D. 610 mμ) x 20				
	0 h	24 h	36 h	48 h	60 h
23	0,030	13,700	18,200	19,600	20,700
24	0,070	14,300	18,500	20,200	21,500
25	0,150	9,600	16,300	17,900	18,200
26	0,01	12,500	18,200	20,100	21,100
27	0,03	13,200	18,500	20,900	21,500
28	0,04	12,300	19,400	21,300	21,700
29	0,080	9,700	12,500	16,100	17,200
30	0,13	8,200	12,700	13,300	14,100
31	0,180	8,500	14,800	13,200	11,900
32	0,240	6,300	10,200	11,800	8,300
33	0,280	4,400	8,00	11,600	6,800
34	0,130	12,500	18,200	19,300	19,800
35	0,230	11,300	14,200	16,800	17,500
36	0,400	12,800	12,600	9,600	6,000
6 (Branco)	0,006	12,600	18,700	20,200	21,900

QUADRO VII - CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FRASCOS AGITADOS

Efeito da composição química do meio de cultura, sobre a autólise.

Meio de cultura:	Densidade Ótica determinada. (O.D. 610 mμ) x 20									
	0 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h	84 h	96 h	108 h	
6	0,006	13,200	19,500	21,100	21,700	20,500	15,200	10,500	6,300	
12	0,009	6,500	10,200	12,500	13,700	12,500	6,800	4,200	2,800	
19	0,008	4,300	7,900	9,500	10,200	10,100	8,500	7,200	6,800	
21	0,006	12,700	19,200	21,500	22,100	21,800	19,500	16,500	13,200	
29	0,080	8,700	13,200	16,900	14,500	9,600	7,300	4,800	3,200	
36	0,400	11,500	13,700	8,500	5,300	3,600	1,300	1,100	0,800	

QUADRO VIII -- CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FRASCOS AGITADOS

Efeito da concentração de hidrocarbonetos no meio de cultura, sobre o rendimento celular

Meio de cultura	Densidade ótica determinada (O.D. 610 mμ) x 20				
	0 h	24 h	36 h	48 h	60 h
37	0,006	2,600	3,200	2,800	1,600
38	0,006	9,500	13,200	15,600	14,800
39	0,006	10,800	15,100	16,900	16,600
40	0,006	12,700	16,100	21,200	21,900
41	0,007	13,600	18,800	22,300	24,600
42	0,008	14,900	20,300	25,800	25,200

QUADRO IX - CONCENTRAÇÃO CELULAR EM FRASCOS AGITADOS

Efeito da concentração salina no meio, sobre o rendimento celular

Meio de cultura	Densidade Ótica determinada (O.D. 610 mμ) x 20				
	0 h	24 h	36 h	48 h	60 h
43	0,005	2,400	2,900	3,100	2,900
44	0,006	9,700	12,900	15,800	15,300
45	0,005	1,900	2,500	2,800	2,700
46	0,006	9,300	12,200	15,400	15,100

QUADRO X - Queda de pH durante a fermentação em frascos agitados
pH não controlado

Meio de cultura.	pH					
	0h	24 h	36 h	48 h	60 h	84 h
6	5,0	4,1	3,8	3,8	3,6	4,2
12	5,0	3,8	3,6	3,6	3,5	3,8
19	5,0	4,3	4,0	3,8	3,8	4,0
21	5,0	4,8	4,6	4,6	4,4	4,8
29	5,0	4,4	4,2	4,1	4,1	4,6
36	5,0	4,4	4,3	4,4	4,8	5,2

QUADRO XI - Efeito do controle de pH sobre o rendimento celular

Horas	pH	Densidade Ótica Determinada (O.D. ₆₁₀ mμ)x 20
0	5,0	0,006
0	5,0	0,006
24	4,2	12,800
24	5,0	14,300
36	3,8	18,200
36	5,0	20,500
48	3,8	20,700
48	5,0	22,500
60	3,6	21,100
60	5,0	20,600
72	3,8	19,700
72	5,0	16,500

pH = 5,0 controlado com Na(OH) cada 8 h, em frascos agitados, com meio de cultura nº 6.

Temperatura = 33°C

QUADRO XII -- Efeito da temperatura sobre o crescimento celular e
velocidade de crescimento.

Horas	Temperatura °C	Densidade Ótica determinada (O.D. 610 mμ)	
			x 20
0	30	0,006	
0	33	0,006	
24	30	8,900	
24	33	12,500	
36	30	15,300	
36	33	17,900	
48	30	18,300	
48	33	20,500	
60	30	20,600	
60	33	21,800	
72	30	21,900	
72	33	20,500	
84	30	22,400	
84	33	16,800	
96	30	22,100	
96	33	11,200	

Meio de cultura 6, com pH inicial de 5,0.

QUADRO XIII -- Rendimento celular por querosene

Meio de cultura	Querosene no meio de cultura (v/v)	Rendimento celular (a)
	%	
6	10	38
13	10	24
19	10	19
21	10	40
24	10	37
28	10	37
29	10	30
37	1	56
38	3	91
39	5	58
40	10	38
41	15	29
42	20	22

(a) = g levedura sêca (0,0 % umidade) por 100ml querosene

Nota: 1,0 g levedura sêca (0,0% umidade) por litro de suspensão aquosa corresponde a uma Densidade Ótica (O.D._{630 nm}) igual a 0,57.

QUADRO XIV - Composição Química da Levedura Sêca (a)

Composição da Célula	(Referente à célula com 0,0001 unidade)
	%
Cinza	5,10
Fibra Grossa	6,41
Proteína Grossa	47,80
Matéria Grossa	13,50

(a) Levedura obtida no fermentador, com meio de cultura 39.

QUADRO XV - Composição dos aminoácidos da levedura hidrolizada.

Aminoácidos	Levedura seca calculada sobre 0,00% de unidade g/100 g
Lisina	2,55
Histidina	0,10
Amônia	1,53
Arginina	1,55
Ac. Aspártico	2,30
Treonina	3,40
Serina	2,48
Ac. Glutâmico	2,20
Prolina	2,23
Glicina	1,70
Alanina	2,33
Cistina	4,44
Valina	2,53
Metionina	0,49
Isoleucina	2,80
Leucina	2,32
Tirosina	1,88
Fenilalanina	1,77
Triptofano	1,13

QUADRO XVI -- Composição dos aminoácidos da proteína de levedura de
querosene, com relação à proteína Standard, de refe
rência, da FAO.

Aminoácido	Proteína (a)	
	Querosene	Referência da FAO
Metionina	1,02	2,2
Cistina	9,30	2,0
Istina	5,34	4,2
Treonina	7,11	2,8
Isoleucina	6,00	4,2
Leucina	4,40	4,8
Valina	5,30	4,2
Fenilalanina	3,70	2,8
Triptofano	2,36	1,4

(a) = g/100 g de proteína

QUADRO XVII - A -- Comparação dos nossos resultados com outros autores

Referência	Microorganismo	Hydrocarboneto	Concentração Hidrocarboneto cc. (gr) /lt.	X (gr/lt)
(3)	Monilia	querosene	10 -40 (v/v)	4,0 - 8,2
(8)	Micrococcus	gas-oil	20 (v/v)	8,0 - 10,0
(12)	Candida	querosene	100 (v/v)	1,07
(13)	Candida	gas-oil	75 (p/v)	9,0
(13)	Candida	gas-oil	170 (p/v)	12,6
(15)	Candida	querosene	100 (v/v)	11,0
(20)	Nocardia	querosene	45 (v/v)	12,0
(5)	Candida	gas-oil	75 (p/v)	12,6
(1)	Candida	n - alkanes	0,5 - 50 (v/v)	
(7)	Micrococcus	gas-oil		
(3)	Monilia	n - octadecane		
(6)	Pseudomonas	octadecane		
(8)	Micrococcus	hexadecane		
(17)	Candida	gas-oil		
(16)	Trichosporon	gas-oil	100 ((v/v)	
(16)	Trichosporon	gas-oil	300 (v/v)	
Nossos	Candida	querosene	50 (v/v)	26,2

QUADRO XVII - B - Comparação dos nossos resultados com outros autores

Referência	P_{max} ($\text{cm}^2/\text{kg/hr}$)	(hr^{-1})	td (hr)	Kv	Y_D	Y_{Kd}
(5)				$0,40 - 0,20$		
(8)				$0,40 - 0,50$		
(12)				$0,01$		$0,12$
(13)	1,7					$0,07$
(13)				$0,10$		
(15)			3,1	$0,27$		
(20)			3,5		$0,70$	$0,17$
(5)	1,1	$0,2$				
(1)		$0,14$				
(7)			$1,0 - 2,5$			
(5)					$0,85$	
(6)					$0,70$	
(8)					$0,85 - 0,90$	
(17)					$0,87 - 0,96$	
(16)		$0,23$	3,0			
(16)		$0,21$	3,2			
Nossos	2,3	$0,2$	3,46	$0,52$	$0,86$	$0,66$

VIII - BIBLIOGRAFIA

1. Aiba, S., Huang, K.L., Moritz, V., Someya, J.; Cultivation of Yeast Cells by Using n-Alkanes as the Sole Carbon Source (II); J. Ferment. Technol., 47, 3, 211-219 (1969).
2. Aiba, S., Moritz, V., Someya, J., Huang, K.L.; Cultivation of Yeast Cells by Using n-Alkanes as the Sole Carbon Source (I); J. Ferment. Technol., 47, 3, 203-210 (1969).
3. Casas-Campillo, C., Morales, J.L., Larrea, S., Rodriguez H.; Monilia as a Source of Single-Cell Protein; X International Congress for Microbiology, México City (1970).
4. Colin Ratledge; Production of Fatty Acids and Lipid by a Candida sp. Growing on a Fraction of n-Alkanes Predominating in Tridecane; Biotech. and Bioeng., X, 511-533 (1968).
5. Dostálek, M., Mank, V., Voljovi, O., Fencel, Z.; Cultivation of the Yeast Candida lipolytica on Hydrocarbons; Biotech. and Bioeng., X, 865-875 (1968).
6. Ertola, R.J., Idilly, M. D., Webb, P.C.; Production of Cell Tissue from Hydrocarbons by a Microbiological Process; Biotech. and Bioeng., III, 309-319 (1965).
7. Ertola, R.J., Mazza, L.A., Palatti, P.A., Segovia, E.F.; Gas Oil Utilization by a Micrococcus Strain; Jour. Farm. Techn., 47, 9, 536-541 (1969).
8. Ertola, R.J., Mazza, L.A., Palatti, A.P.; Composition of Cell Material and Biological Value of the Cellular Protein of a Micrococcus Strain Grown on Hydrocarbons; Biotech. and Bioeng., XI, 409-416, (1969)
9. Ertola, R.J.; Single Cell Protein Production from hydrocarbons, X International Congress for Microbiology, México City, (1970).

10. Leathen, W.W., Kinsel, H.A.; Hydrocarbon Selectivity by Candida Species; X International Congress for Microbiology, México City, (1970).
11. Iaine, E.; Single Cell Protein Production from Hydrocarbons; X International Congress for Microbiology, México City, (1970).
12. Iizuka, H., Suokane, M., Makajima, J.; Microbiological studies on Petroleum and Natural Gas.; J.Gen.Appl. Microbiology, 11, 2, (1965).
13. Munk, V., Dostálak, M. e Voljovi, O.; Cultivation of Yeast on Gas Oil, Biotech. and Bioengineering, XI, 383-391 (1969).
14. Sheehan, B.T. e Johnson, M.J.; Production of Microbial Cells from Methane; X International Congress for Microbiology, México City, (1970).
15. Shin-Ichiro Ôtsuka, Ryosuke Ishii e Noburu Katsuya; Utilization of Hydrocarbons as Carbon Sources in Production of Yeast Cell, J. Gen. Appl. Microbiol. 12, 1, (1966).
16. Singh, H.D., Parua, P.K., Chakravarty, M., Baruah, J.N., Lyengar, M.S.; Utilization of Gas-Oil in the Production of Single Cell Protein; J. Gen. Appl. Microbiol. 16, 91-101 (1970).
17. Sadir, R.; Estudo de um Fermentador para Produzir Proteínas dos Derivados do Petróleo; Universidade Estadual de Campinas, -- São Paulo, Brasil (1970)
18. Wang, D.I.C.; Protein from Petroleum; Chemical Engineering, -- (August 26, 1968).
19. Wang, D.I.C.; Engineering Aspects of SCP Production from Hydrocarbons; X International Congress for Microbiology, México City (1970).
20. Wagner, F., Kleemann, T.H., e Zaim, W.; Microbial Transformation of Hydrocarbons; Biotech. and Bioeng., XI, 393-408 (1969).
21. Wayman, M., e Wein, E.; The effect of air pressure on the growth of Candida lipolytica on n-hexadecane; Canadian Journal Microbiol., 15, 1255-1261 (1969).

II - AGRADECIMENTOS

Somos profundamente gratos ao Dr. André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP.

Assim como aos técnicos João S. Tange, Edimar Angelucci e Ivaldo B. Figueiredo, que colaboraram nas análises químicas.

Nossa gratidão à Eng. Iracema de Oliveira Moraes da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, que colaborou nas experiências de laboratório.

Agradecemos ainda à Companhia Atlantic de Petróleo, Shell Brasil S.A., Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobrás), Refinaria e Exploração de Petróleo "União" S.A. e Companhia Esso Brasileira de Petróleo S.A. pelas valiosas informações fornecidas.