

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**Estratégias de cultivo para produção de biomassa e  
promotores de crescimento por *Herbaspirillum seropedicae*  
BR-11417**

***Wagner Scheidt***

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**Estratégias de cultivo para produção de biomassa e promotores de crescimento por *Herbaspirillum seropedicae* BR-11417**

**Wagner Scheidt**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Dr. Luiz Augusto da Cruz Meleiro**

*e*

**Dr. Luis Henrique de Barros Soares**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRRJ, Área de Concentração em Engenharia Química.

Seropédica, RJ  
Outubro de 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**WAGNER SCHEIDT**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Engenharia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/10/2015

---

Prof. Dr. Luiz Augusto da Cruz Meleiro. DEQ/IT/UFRRJ  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Maurício Cordeiro Mancini. DEQ/IT/UFRRJ  
(Membro Titular)

---

Dra. Verônica Massena Reis – Pesquisadora Embrapa Agrobiologia  
(Membro Titular)

660.63  
S318e  
T

Scheidt, Wagner, 1990-  
Estratégias de cultivo para produção de  
biomassa e promotores de crescimento por  
*Herbaspirillum seropedicae* BR-11417 /  
Wagner Scheidt - 2015.  
112 f.: il.

Orientador: Luiz Augusto da Cruz  
Meleiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia Química.

Bibliografia: f. 94-112.

1. Engenharia bioquímica - Teses. 2.  
Nitrogênio - Fixação - Teses. 3. Biomassa  
- Teses. 4. Fermentação - Teses. 5.  
Engenharia química - Teses. I. Meleiro,  
Luiz Augusto da Cruz, 1965-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Engenharia Química. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que tem me dado forças em todos os momentos desta caminhada e quem tem sido meu socorro nas horas de maior dificuldade;

A meus orientadores Prof. Dr. Luiz Augusto da Cruz Meleiro e Prof. Dr. Luis Henrique de Barros Soares pela amizade, auxílio e conhecimentos fornecidos durante a realização deste trabalho;

A meus pais Sandra e Ezequiel Scheidt pela luta, dedicação e incentivo durante toda minha vida;

A meus demais familiares e amigos que tem me apoiado e incentivado durante esses dois anos;

À minha namorada Roberta Karoline pela paciência em suportar a distância sempre com muita compreensão, apoio e carinho.

Ao pastor Charles e sua família pelo apoio espiritual e por terem me recebido de portas abertas em sua casa.

Aos colegas de laboratório da EMBRAPA Agrobiologia Marlei, Juliane, Wilson, Izadora, Paula e Gabriela pela disponibilidade em colaborar e ajudar sempre quando necessário.

Aos demais amigos e companheiros adquiridos durante este período.

## RESUMO

SCHEIDT, Wagner. **Estratégias de cultivo para produção de biomassa e promotores de crescimento por *Herbaspirillum seropedicae* BR-11417**. 2015. 102p Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* é estabelecida como sendo diazotrófica fixadora de nitrogênio, gram-negativa, vibrióide, membro da classe  $\beta$  das proteobactérias, apresentando a capacidade de produção de fitohormônios promotores do crescimento em plantas. Este trabalho apresentou como objetivos aprimorar o processo fermentativo de produção de *H. seropedicae*, buscando a máxima produção de células e compostos indólicos, com redução de custos do processo. Realizou-se a otimização do meio de cultura *Dextrose Yeast Glucose Sucrose* modificado – DYGS – através de ensaios fermentativos em *shaker*. Substituíram-se as fontes de carbono originais e aperfeiçoaram-se as concentrações dos demais componentes através da matriz experimental <sup>22</sup> obtida através do Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR. Obteve-se um meio de cultura simplificado, composto por glicerol (5,5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (2,8 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g L<sup>-1</sup>) e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g L<sup>-1</sup>) que se apresentou 49,8 % mais barato e com capacidade de produção de células 87,5 % maior quando comparado ao meio DYGS. Através da DCCR (<sup>23</sup>) aprimorou-se também as condições operacionais de biorreator, obtendo-se a melhor condição de cultivo a temperatura de 35 °C, aeração de 3 LPM e agitação de 180 RPM. Nestas condições, com o meio de cultura otimizado, obteve-se a produção celular máxima de  $X = 3,23 \text{ g L}^{-1}$  e de produto metabólico máximo de  $P = 9,02 \text{ mg L}^{-1}$ . Testou-se um meio de cultura com concentrações de glicerol e de extrato de levedura aumentadas para 8,0 g L<sup>-1</sup> e 4,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo observada uma produção celular máxima de  $X = 4,18 \text{ g L}^{-1}$  e de produto metabólico máximo de  $P = 11,74 \text{ mg L}^{-1}$ . Avaliou-se através de simulação computacional, o modelo matemático mais adequado para descrever o comportamento dinâmico das principais variáveis das fermentações em biorreator. Contudo, observou-se uma alta dificuldade em descrever adequadamente os perfis de todas as variáveis avaliadas, provavelmente devido às características específicas deste processo fermentativo e à necessidade de um modelo que leve em consideração parâmetros de limitações e inibições causadas pelo substrato e produto.

**Palavras-chave:** Diazotróficas, Inoculantes; Compostos indólicos, Simulação

## ABSTRACT

SCHEIDT, Wagner. **Culture strategies for biomass production and growth promoters by *Herbaspirillum seropedicae* BR-11417**. 2015. 102p Dissertation (Master in Sciences, Chemical Engineer). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The bacteria *Herbaspirillum seropedicae* is established as diazotrophic, nitrogen fixing, gram-negative, vibrioid,  $\beta$ -proteobacteria, showing ability to synthesize phytohormones growth promoters in plants. The goal of this work was to improve the fermentation production of *H. seropedicae*, seeking the maximum production of cells and indole compounds with process cost reduction. The optimization of the culture medium Yeast Dextrose Glucose Sucrose - DYGS – was conducted through fermentation tests on shaker. The original carbon sources were replaced, and the concentrations of nitrogen and nutrient sources were optimized through the Central Composite Rotational Design - CCRD (2<sup>2</sup>). The simplified culture medium obtained was composed of glycerol (5.5g L<sup>-1</sup>), yeast extract (2.8 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g L<sup>-1</sup>) e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5 g L<sup>-1</sup>). This medium provided an increase of 87.5 % in biomass production, and is 49.8 % cheaper than the traditional culture medium DYGS. An experimental design CCRD (2<sup>3</sup>) was carried with the purpose of improving the operational conditions of the bioreactor and the best growing condition was obtained at 35 °C, 3 LPM of aeration rate, and 180 RPM of agitation speed. Under these conditions, and using the previously optimized culture medium, the maximum cell production ( $X= 3.23 \text{ g L}^{-1}$ ) as well as the maximum metabolic product ( $P= 9.02\text{mg L}^{-1}$ ) were obtained. It was also tested a culture medium with glycerol and yeast extract concentrations increased to 8.0 g L<sup>-1</sup> and 4.0 g L<sup>-1</sup>, respectively. Under these conditions, it was observed that the maximum cell production and metabolic product increased to  $X= 4.18 \text{ g L}^{-1}$  and  $P= 11.74 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. An appropriate mathematical computer simulation model was developed and used to describe the dynamic behavior of the main variables of fermentation bioreactor. However, there was some difficulty to reproduce appropriately the profiles of all variables, probably due to the specific characteristics of this fermentation process, and the necessity of a mathematical model that takes into account parameters associated to limitations and inhibitions caused by substrate and product.

**Keywords:** Diazotrophic, Inoculants; Indole Compounds, Simulation

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da <i>Herbaspirillum seropedicae</i> com outras bactérias fixadoras de nitrogênio (Adaptado de BALDANI <i>et al.</i> , 1986).....	8
Tabela 2: Crescimento de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> com diferentes fontes de carbono e nitrogênio em meio NFb semi-sólido (Adaptado de BALDANI <i>et al.</i> , 1986). ....	9
Tabela 3: Concentração de GA e AIA (ng mL <sup>-1</sup> ) produzido por <i>H. seropedicae</i> em meio NFb e <i>G. diazotrophicus</i> em meio LGIP com 10 e 15% de sacarose (Adaptado de BASTIÁN <i>et al.</i> , 1998).....	10
Tabela 4: Soluções em estoque para uso rotineiro. ....	25
Tabela 5: Composição do meio DYGS (Rodrigues Neto <i>et al.</i> , 1986). ....	26
Tabela 6: Composição do meio de cultura NFb (DÖBEREINER <i>et al.</i> , 1995).....	26
Tabela 7: Composição do meio JNFb (DÖBEREINER <i>et al.</i> , 1995). ....	27
Tabela 8: Fator de rendimento ( $Y_{X/S}$ ) e velocidade exponencial máxima de crescimento ( $\mu_m$ ) para cada fonte de carbono testada em meio DYGS. ....	35
Tabela 9: Valores utilizados no DCCR 01 para a peptona bacteriológica e extrato de levedura. ....	36
Tabela 10: Matriz dos valores codificados utilizados no DCCR 01 e respostas obtidas para a biomassa (g L <sup>-1</sup> ). ....	36
Tabela 11: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes $t(7)$ e $p$ -valor para a variável resposta biomassa (DCCR 01).....	38
Tabela 12: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 01). ....	39
Tabela 13: Valores utilizados no DCCR 02 para os fatores K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> e MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O. ....	41
Tabela 14: Matriz dos valores codificados utilizados no DCCR 02 e respostas obtidas para a biomassa (g L <sup>-1</sup> ). ....	41
Tabela 15: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes $t(7)$ e $p$ -valor para a variável resposta biomassa (DCCR 02).....	43
Tabela 16: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 02). ....	44
Tabela 17: Meio de cultura otimizado para a produção de biomassa pela bactéria <i>H. seropedicae</i> .....	46
Tabela 18: Cotação de matérias-primas utilizadas na produção dos meios de cultura. Cotação realizada pela Embrapa Agrobiologia – CNPAB 2014.....	47
Tabela 19: Custo de produção do meio de cultura e custo por células para os ensaios de otimização da fonte de carbono e DCCR 01 e 02. ....	49
Tabela 20: Valores utilizados no DCCR 03 para os fatores temperatura, agitação e aeração.....	50
Tabela 21: Matriz dos valores codificados utilizados no DCCR 3 e respostas obtidas para a biomassa (g L <sup>-1</sup> ) e compostos indólicos (mg L <sup>-1</sup> ).....	51
Tabela 22: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes $t(7)$ e $p$ -valor para a variável resposta biomassa (DCCR 03).....	65
Tabela 23: Valores de biomassa experimentais e previstos pelo modelo (equação 38), resíduos e desvio relativo para o DCCR 03. ....	66
Tabela 24: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 03). ....	67
Tabela 25: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes $t(7)$ e $p$ -valor para a variável resposta compostos indólicos (DCCR 03). ....	70
Tabela 26: Valores de biomassa experimental e preditos pelo modelo e desvio relativo observados para o modelo matemático gerado para o DCCR 03. ....	71
Tabela 27: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 03). ....	72
Tabela 28: Parâmetros cinéticos estimados para fermentação com meio DYGS com fonte de carbono glicerol. ....	78
Tabela 29: Desvios obtidos para as variáveis dos modelos testados para a fermentação com meio DYGS com fonte de carbono glicerol. ....	79
Tabela 30: Parâmetros cinéticos estimados para fermentação com meio de cultura otimizado para a produção de <i>H. seropedicae</i> . ....	82
Tabela 31: Desvios obtidos para as variáveis dos modelos testados para a fermentação com meio de cultura otimizado para a produção de <i>H. seropedicae</i> .....	83
Tabela 32: Parâmetros cinéticos estimados para fermentação com meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados para 8,0 g L <sup>-1</sup> e 4,0 g L <sup>-1</sup> .....	86
Tabela 33: Desvios obtidos para as variáveis dos modelos testados para a fermentação com meio DYGS com fonte de carbono glicerol. ....	86



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: a) Potencial de crescimento das terras aráveis; b) Relação terras aráveis com a população mundial (Adaptado de ANDA, 2011).	2
Figura 2: Comparativo entre a produção de grãos, área plantada e utilização de fertilizantes (Adaptado de ANDA, 2011).	3
Figura 3: Modelo da reação de fixação do nitrogênio mediada pela enzima nitrogenase (Adaptado de MORGANTE, 2003).	5
Figura 4: Colônia de bactérias do gênero <i>Herbaspirillum</i> em meio de cultura NFB contendo três vezes a concentração de azul de bromotimol e acrescido de extrato de levedura (Adaptado de DÖBEREINER, 1995).	7
Figura 5: Microscopia eletrônica das células da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> crescida em Agar nutriente. <b>a)</b> Bactéria com um flagelo; <b>b)</b> bactéria com dois flagelos em um pólo; <b>c)</b> bactéria com três flagelos (BALDANI <i>et al.</i> , 1986).	9
Figura 6: Rotas para síntese de AIA em bactérias e plantas (Adaptado de SPAEPEN <i>et al.</i> , 2007; PATTEN & GLICK, 1996).	11
Figura 7: Esquema geral de um bioprocesso (Adaptado de SCHMIDELL <i>et al.</i> , 2001).	12
Figura 8: Ilustração de um biorreator agitação mecânica (Adaptado de THIEMANN, 2001).	13
Figura 9: Curva de crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo (adaptado de SCHMIDELL <i>et al.</i> , 2001).	17
Figura 10: Comparativo do crescimento da bactéria <i>H. seropedicae</i> em meio DYGS com diferentes fontes de carbono.	35
Figura 11: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta biomassa (DCCR 01).	37
Figura 12: Valores preditos pela equação (36) versus valores experimentais.	39
Figura 13: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a variável resposta biomassa em função da concentração da peptona versus extrato de levedura.	40
Figura 14: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes do DCCR 02.	42
Figura 15: Valores preditos pela equação (35) versus valores experimentais.	44
Figura 16: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a variável resposta biomassa em função da concentração do $K_2HPO_4$ versus $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .	45
Figura 17: Resultados obtidos para a otimização da concentração da fonte de carbono.	46
Figura 18: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 1.	53
Figura 19: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 2.	53
Figura 20: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 3.	54
Figura 21: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 4.	55
Figura 22: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 6.	56
Figura 23: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 7.	56
Figura 24: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 8.	57
Figura 25: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 9.	58
Figura 26: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 11.	59
Figura 27: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 12.	59
Figura 28: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 13.	60
Figura 29: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 14.	61
Figura 30: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 15.	61
Figura 31: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 16.	62
Figura 32: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 5.	63
Figura 33: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, $pO_2$ e glicerol para o ensaio 10.	63
Figura 34: Evolução das concentrações de Compostos Indólicos, Biomassa, $pO_2$ e Glicerol para o Ensaio 17.	64
Figura 35: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes do DCCR 03 sobre a produção de biomassa.	65
Figura 36: Valores preditos pela equação (36) versus valores experimentais.	67
Figura 37: Superfícies de resposta e curva de contorno para a variável resposta biomassa em função da: <b>a)</b> e <b>b)</b> temperatura versus agitação, <b>c)</b> e <b>d)</b> temperatura versus aeração e <b>e)</b> e <b>f)</b> aeração versus agitação.	68
Figura 38: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes do DCCR 03 sobre a produção de compostos indólicos.	69
Figura 39: Valores preditos pela equação (37) versus valores experimentais.	72
Figura 40: Superfícies de resposta e curva de contorno para a variável resposta compostos indólicos em função da: <b>a)</b> e <b>b)</b> temperatura versus agitação, <b>c)</b> e <b>d)</b> temperatura versus aeração e <b>e)</b> e <b>f)</b> aeração versus agitação.	73
Figura 41: Fermentação em meio DYGS utilizando glicerol como fonte de carbono.	75
Figura 42: Fermentação em meio otimizado para <i>shaker</i> .	76

Figura 43: Fermentação em meio otimizado com concentração de glicerol e extrato de levedura aumentados para 8,0 gL <sup>-1</sup> e 4,0 gL <sup>-1</sup> , respectivamente. ....	77
Figura 44: Erros obtidos para cada variável ao longo do tempo para as simulações do processo utilizando o meio de cultura DYGS com fonte de carbono glicerol para os modelos <b>a)</b> Monod, <b>b)</b> Moser, <b>c)</b> Contois & Fujimoto, <b>d)</b> Andrews, <b>e)</b> Levenspiel e <b>f)</b> Aiba & Shosa. ....	80
Figura 45: Resultado das simulações para a fermentação utilizando o meio de cultura DYGS com fonte de carbono glicerol para os modelos <b>a)</b> Monod, <b>b)</b> Moser, <b>c)</b> Contois & Fujimoto, <b>d)</b> Andrews, <b>e)</b> Levenspiel e <b>f)</b> Aiba & Shosa. ....	81
Figura 46: Erros obtidos para cada variável ao longo do tempo para as simulações do processo utilizando o meio de cultura otimizado para a produção de <i>H. seropedicae</i> para os modelos <b>a)</b> Monod, <b>b)</b> Moser, <b>c)</b> Contois & Fujimoto, <b>d)</b> Andrews, <b>e)</b> Levenspiel e <b>f)</b> Aiba & Shosa. ....	84
Figura 47: Resultado das simulações para a fermentação utilizando o meio de cultura otimizado para a produção de <i>H. seropedicae</i> para os modelos <b>a)</b> Monod, <b>b)</b> Moser, <b>c)</b> Contois & Fujimoto, <b>d)</b> Andrews, <b>e)</b> Levenspiel e <b>f)</b> Aiba & Shosa. ....	85
Figura 48: Erros obtidos para cada variável ao longo do tempo para as simulações do processo utilizando o meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados para 8,0 gL <sup>-1</sup> e 4,0 gL <sup>-1</sup> para os modelos <b>a)</b> Monod, <b>b)</b> Moser, <b>c)</b> Contois & Fujimoto, <b>d)</b> Andrews, <b>e)</b> Levenspiel e <b>f)</b> Aiba & Shosa. ...	88
Figura 49: Resultado das simulações para a fermentação utilizando o meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados para 8,0 gL <sup>-1</sup> e 4,0 gL <sup>-1</sup> com os modelos <b>a)</b> Monod, <b>b)</b> Moser, <b>c)</b> Contois & Fujimoto, <b>d)</b> Andrews, <b>e)</b> Levenspiel e <b>f)</b> Aiba & Shosa. ....	89

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>O mercado agrícola .....</b>	<b>2</b>
2.1.1	Inoculantes para o mercado agrícola.....	3
<b>2.2</b>	<b>Microrganismos promotores de crescimento de gramíneas.....</b>	<b>4</b>
2.2.1	Fixação biológica do nitrogênio .....	4
2.2.2	Bactérias diazotróficas endofíticas associativas .....	6
2.2.3	Gênero <i>Herbaspirillum</i> spp.....	6
2.2.4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	7
<b>2.3</b>	<b>Compostos indólicos .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4</b>	<b>Bioprocessos e processos fermentativos .....</b>	<b>11</b>
2.4.1	Biorreatores.....	13
2.4.2	Meio de cultura para a produção de microrganismos.....	14
2.4.3	Cinética de crescimento microbiano.....	15
2.4.4	Modelagem matemática de processos bioquímicos .....	17
2.4.5	Análise dos desvios do modelo .....	22
<b>2.5</b>	<b>Planejamento e otimização de processos fermentativos.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Microrganismo .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparo do estoque de bactérias.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>Meio de cultura.....</b>	<b>24</b>
3.3.1	Soluções em estoque.....	24
3.3.2	Meio <i>Dextrose Yeast Glucose Sucrose</i> – DYGS modificado .....	25
3.3.3	Meio NFB .....	26
3.3.4	Meio JNFb .....	27
<b>3.4</b>	<b>Fermentações em <i>shaker</i>.....</b>	<b>27</b>
3.4.1	Preparo do pré-inóculo para fermentações em <i>shaker</i> .....	27
3.4.2	Preparo do inóculo para fermentações em <i>shaker</i> .....	27
<b>3.5</b>	<b>Fermentação em erlenmeyer .....</b>	<b>28</b>
3.5.1	Parâmetros monitorados nas fermentações em <i>shaker</i> .....	28
<b>3.6</b>	<b>Fermentações em biorreator .....</b>	<b>28</b>
3.6.1	Biorreator .....	28
3.6.2	Preparo do pré-inóculo para fermentações em biorreator.....	28
3.6.3	Preparo do inóculo para fermentações em biorreator.....	28
3.6.4	Inoculação e fermentação em biorreator .....	28
3.6.5	Parâmetros analisados nas fermentações em biorreator .....	29
<b>3.7</b>	<b>Esterilização do processo.....</b>	<b>29</b>
<b>3.8</b>	<b>Métodos analíticos .....</b>	<b>29</b>
3.8.1	Absorbância (Abs).....	29
3.8.2	Concentração celular mássica ( <i>X</i> ).....	29
3.8.3	Quantificação dos compostos indólicos totais ( <i>P</i> ) pelo método do reagente de Salkowski.....	30
3.8.4	Determinação da concentração do glicerol ( <i>S</i> ) .....	30

<b>3.9</b>	<b>Otimização do meio de cultura.....</b>	<b>30</b>
3.9.1	Seleção da fonte de carbono.....	31
3.9.2	Delineamento Composto Central Rotacional 01 (DCCR01) - Fontes de nitrogênio.....	31
3.9.3	Delineamento Composto Central Rotacional 02 (DCCR02) - Fontes de nutrientes .....	31
3.9.4	Otimização da concentração da fonte de carbono.....	31
<b>3.10</b>	<b>Aperfeiçoamentos das condições operacionais do biorreator .....</b>	<b>31</b>
3.10.1	Delineamento Composto Central Rotacional 03 (DCCR03) - Condições do biorreator .....	32
<b>3.11</b>	<b>Fermentações em condições otimizadas .....</b>	<b>32</b>
3.11.1	Modelo matemático para o processo.....	32
<b>3.12</b>	<b>Estimação dos parâmetros cinéticos.....</b>	<b>32</b>
3.12.1	Validação dos resultados.....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Seleção do meio de cultura e fonte de carbono .....</b>	<b>34</b>
4.1.1	Seleção do meio de cultura.....	34
4.1.2	Seleção da fonte de carbono.....	34
<b>4.2</b>	<b>Otimização do meio de cultura.....</b>	<b>35</b>
4.2.1	DCCR 01: Concentração das fontes de nitrogênio .....	36
4.2.2	Análise estatística para o DCCR01 .....	37
4.2.3	DCCR02: Fontes de nutrientes .....	40
4.2.4	Análise estatística para o DCCR 02.....	42
4.2.5	Otimização da fonte de carbono .....	45
4.2.6	Meio de cultura otimizado .....	46
4.2.7	Análise de custo.....	47
<b>4.3</b>	<b>Aperfeiçoamento das condições de fermentação em biorreator .....</b>	<b>50</b>
4.3.1	DCCR 03: Condições de fermentação em biorreator .....	50
4.3.2	Ensaio fermentativos em biorreator.....	52
4.3.3	Análise estatística para o DCCR 03.....	64
<b>4.4</b>	<b>Ensaio em condições otimizadas e com diferentes meios de cultura .....</b>	<b>74</b>
4.4.1	Ensaio 1: Meio DYGS com fontes de carbono substituídas por glicerol (5,5 gL <sup>-1</sup> ).....	74
4.4.2	Ensaio 2: Meio de cultura otimizado .....	75
4.4.3	Ensaio 3: Meio de cultura otimizado com glicerol e extrato de levedura aumentados.....	76
<b>4.5</b>	<b>Modelagem e simulação para a produção de biomassa e compostos indólicos em condições otimizadas em biorreator .....</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de grãos com alta perspectiva de aumento da produção e área plantada nos próximos anos, sendo predominante a produção de arroz, milho, soja entre outros.

Para que ocorra o desenvolvimento da cultura em sua máxima capacidade, diversos nutrientes são exigidos visto que, por si só, o solo não é capaz de fornecer todos os nutrientes necessários à planta, sendo imprescindível a correção do solo com adubos. Entre os mais importantes nutrientes encontra-se o Nitrogênio.

O principal método de fixação de nitrogênio industrial se dá pelo processo chamado de *Haber-Bosch*, que é um método altamente oneroso do ponto de vista energético, elevando o preço dos adubos nitrogenados e encarecendo a cultura. Além dos fatores econômicos, o nitrogênio proveniente do processo *Haber-Bosch*, quando dosado em excesso ao solo, é altamente prejudicial ao meio ambiente, contaminando lençóis freáticos e degradando o solo.

Uma importante alternativa para reduzir a alta demanda de fertilizantes industriais nitrogenados são as bactérias que apresentam a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN consiste na quebra da molécula de nitrogênio e na sua combinação com o hidrogênio, produzindo amônia ( $\text{NH}_3$ ), que é assimilável por plantas. Diversas bactérias apresentam a capacidade de realizar a FBN, entre estas encontra-se a *Herbaspirillum seropedicae*.

Além da FBN, verificou-se que algumas bactérias podem apresentar outros mecanismos que proporcionam o crescimento de plantas, como, através da produção de fitohormônios promotores do crescimento, sendo, portanto, denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Diversas espécies de RPCP's são conhecidas, tais como as *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*.

A espécie *H. seropedicae* apresenta a produção de fitohormônios promotores do crescimento, entre os quais o composto indólico ácido indol-3-acético (AIA) é o mais ativo e melhor caracterizado fitohormônio, visto que se identificou que o AIA proporciona diversos benefícios para a planta, tais como o favorecimento na formação celular, iniciação das raízes laterais, na formação de gemas florais e no desenvolvimento do fruto.

Com o objetivo de se obter o melhor meio de cultivo para a bactéria *H. seropedicae* estirpe BR-11417 fornecida pela EMBRAPA agrobiologia, realizou-se o seu cultivo em *shaker* a partir do meio de cultura *Dextrose Yeast Glucose Sucrose* modificado – (DYGS), em que, através de uma sequência de ensaios fermentativos, buscou-se o meio de cultura com as concentrações de seus componentes aprimoradas, proporcionando assim a máxima produção de biomassa com menor custo produtivo.

Paralelamente aos ensaios em *shaker*, fermentou-se a bactéria *H. seropedicae* em um biorreator, em regime de batelada, em que se buscaram as melhores condições de agitação, vazão de ar e temperatura. Nesses ensaios, que ocorreram sob controle de pH, foram realizados o monitorando do crescimento celular, o consumo do substrato, a produção de metabólitos e o oxigênio dissolvido, com o objetivo de determinar as condições que proporcionem o menor consumo de insumos e melhor desempenho da bactéria na produção de biomassa e metabólitos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O mercado agrícola

Atualmente, a demanda de produtos agrícolas como soja, milho, feijão, trigo e etc., atinge um nível extremamente elevado devido ao aumento da população mundial e à sua projeção de crescimento ao longo do tempo (Figura 1). Em contrapartida, tentando evitar danos ambientais irreversíveis, existe o refreamento na expansão das fronteiras agrícolas (ANDA, 2001; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

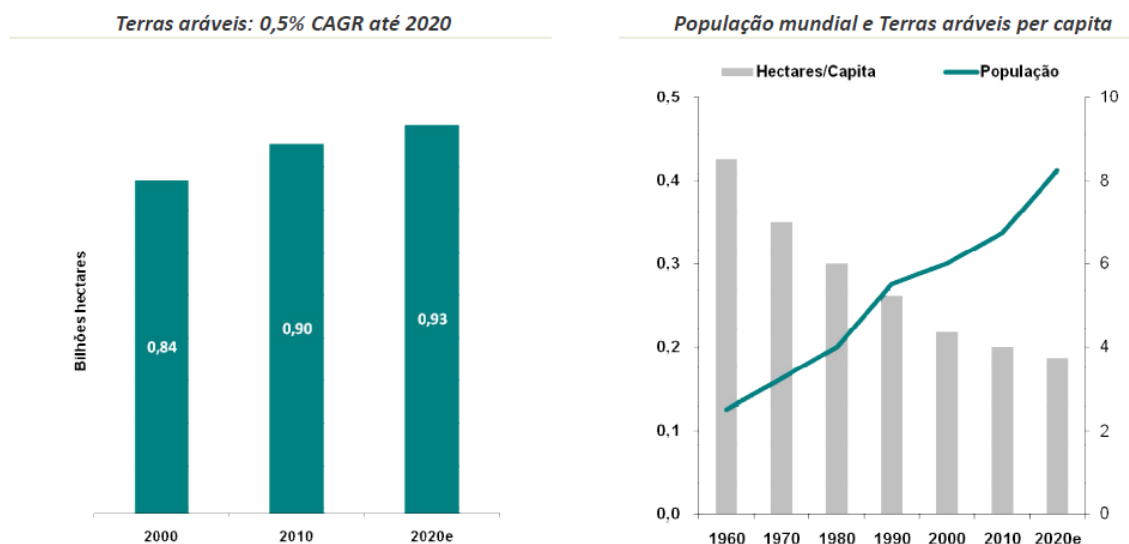


Figura 1: a) Potencial de crescimento das terras aráveis; b) Relação terras aráveis com a população mundial (Adaptado de ANDA, 2011).

O Brasil tornou-se em 2013 o quinto maior produtor mundial de grãos, atingindo, na safra 2012/2013, 186,82 milhões de toneladas, com previsão de aumento de 2,7 a 4,6 % para a próxima safra, dominando a produção o arroz, o milho e a soja, que representam 92,4 % da produção nacional de grãos e ocuparam 86,1 % da área colhida (CONAB, 2013).

Para o bom desenvolvimento de uma cultura, muitos nutrientes são exigidos, visto que o solo por si só não é capaz de fornecer estes nutrientes de forma que atenda à planta em seu máximo. Buscando aperfeiçoar a produção, são adicionados ao solo principalmente nitrogênio, fósforo e potássio. Para atender às necessidades das plantas, as entregas de fertilizantes nitrogenados (N) apresentaram evolução de 6,6 %, passando de 1.170 mil toneladas em 2012 para 1.247 mil toneladas em 2013 (CONAB, 2013). Através das correções realizadas no solo, a produção mundial tem conseguido ser aumentada, alcançando uma melhor relação produção de grãos por área plantada, conforme ilustrado na Figura 2.

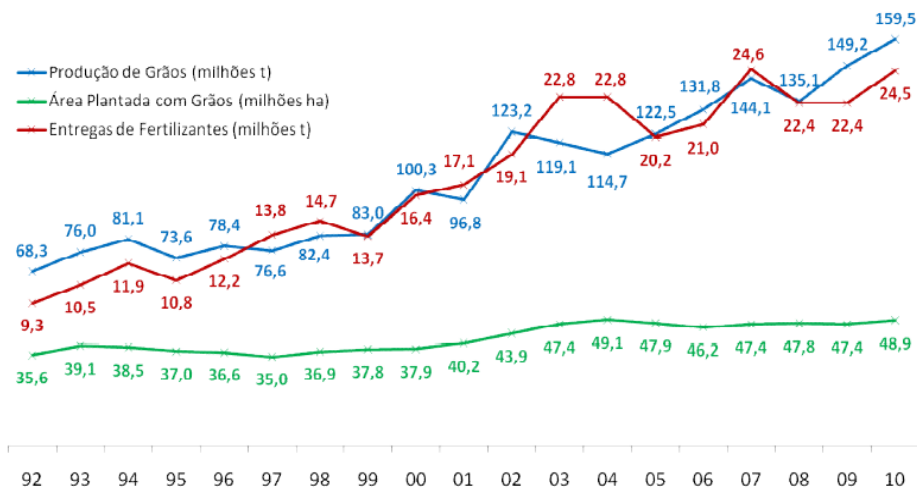


Figura 2: Comparativo entre a produção de grãos, área plantada e utilização de fertilizantes (Adaptado de ANDA, 2011).

### 2.1.1 Inoculantes para o mercado agrícola

O inoculante é definido como todo produto a base de microrganismos, capaz de favorecer de alguma forma o desenvolvimento de plantas ou um biofertilizante, composto por microrganismos vivos, que possuem como característica a capacidade de auxiliar de forma direta ou indireta o crescimento vegetal por meio de diferentes mecanismos, tais como: fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios, solubilização de fosfato, biocontrole, entre outros (FERREIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2009; REIS *et al.*, 2009).

A produção de inoculante no Brasil, embora antiga, tendo iniciado em 1956 no Rio Grande do Sul, vem aos poucos ganhando mercado e se tornando uma alternativa viável financeira e ecologicamente mais aceita. O nitrogênio biológico, inoculado a sementes de leguminosas é amplamente reconhecido como um dos fatores de maior importância no aumento da produtividade e redução de custos na cultura da soja no Brasil (FERREIRA, 2004; REIS *et al.*, 2009).

Os primeiros inoculantes utilizados vieram dos Estados Unidos e seu uso permitiu a identificação de estirpes que pudessem ser adaptadas às condições climáticas brasileiras, pois mesmo havendo diversos inoculantes lançados na Europa, EUA, México e Argentina, existe uma dificuldade desses microrganismos de se adaptarem ao clima tropical do Brasil (CAMPOS *et al.*, 1999; FERREIRA, 2008).

A inoculação de *H. Seropedicae* BR11417, em testes realizados de 2005 a 2008 por REIS *et al.*, (2009), em campos experimentais, apresentou redução de 50 % na dose do fertilizante nitrogenado necessário, quando esta associada à aplicação da bactéria. Alves (2007) identificou que a inoculação desta mesma estirpe aplicada sobre a cultura do milho BR 1030 no período da safrinha já é suficiente para manter a produção em patamar elevado.

Dalla Santa *et al.* (2004) observaram, em testes de campo, por dois anos consecutivos, que, com a inoculação de *Azospirillum spp.* estirpes RAM-7 e RAM-5 em milho, é possível reduzir em 40% a quantidade de fertilização nitrogenada recomendada.

Cavallet *et al.* (2000) em trabalho realizado com o inoculante “Graminante”, a base de *Azospirillum spp.*, concluiu que, dependendo da disponibilidade de nitrogênio, a inoculação das sementes de milho proporcionou o aumento da produção em até 30%.

A inoculação de bactérias diazotróficas em arroz apresenta também resultados significativos, havendo relatos de aumento de até 124% no acúmulo de massa seca (BALDANI *et al.*, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Muitos são os estudos comprovando a eficiência na utilização de inoculantes em diversas culturas. A ANPII (Associação Nacional dos Produtores e Importadores de inoculantes) registrou em 2011 a venda de mais de 19 milhões de doses de inoculantes para seus associados, sendo que mais de 90% do mercado é destinada a cultura de soja.

Mesmo o Brasil sendo responsável pela identificação de diversas bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Glucanacetobacter*, o mercado nacional oferece poucos biofertilizantes direcionados à cultura de não leguminosas. A ampliação do mercado de inoculantes para microrganismos, que realizem a fixação biológica de nitrogênio nas culturas de não leguminosas, em especial o milho, que em 2013 representou uma área colhida de mais de 15 milhões de hectares (CONAB, 2014), permitiria uma imensa elevação na escala de produção de inoculantes (BALDANI *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2007; SILVA, 2006).

## 2.2 Microrganismos promotores de crescimento de gramíneas

Um dos principais nutrientes necessários para o bom desenvolvimento de uma planta é o nitrogênio, que é um elemento existente em abundância no planeta, aproximadamente 78% do ar atmosférico, mas escasso no solo. O nitrogênio não é absorvido naturalmente por animais ou plantas, pois está na forma de uma molécula formada por dois átomos de nitrogênio unidos por uma ligação covalente tripla, extremamente estável e que requer uma grande demanda de energia para a sua síntese (FERREIRA *et al.*, 2010).

Um dos meios para se obter o nitrogênio é o método *Haber-Bosch*, que exige temperaturas de 400-600°C e pressão de 100-200 atm, sendo um processo que demanda muita energia e, portanto, encarece o produto final (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Outra forma de se obter o nitrogênio é através da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), obtida por algumas bactérias específicas como a *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*, que são capazes de quebrar a molécula de nitrogênio e combiná-la com o hidrogênio, gerando NH<sub>3</sub>, que é assimilável por plantas. Estes microrganismos, denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), adicionados em alta escala no solo, podem reduzir a necessidade de se utilizar nitrogênio industrial, como é o caso da soja, que pode ter até 100% da demanda do nitrogênio fornecida por FBN (HUNGRIA *et al.*, 2006, REIS JUNIOR *et al.*, 2006).

As RPCP's, além de realizarem a FBN, podem produzir e estimular a planta a produzir fitohormônios como as auxinas, que são fitohormônios estimuladores do crescimento em plantas (CROZIER *et al.*, 1988; DOBBELAERE *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Fixação biológica do nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos, e consiste na fixação do nitrogênio atmosférico na forma de NH<sub>3</sub> por ação microbiana. Os diazotróficos são de extrema importância, pois fornecem compostos nitrogenados diretamente para as plantas por meio de associações ou, quando os organismos morrem, liberando o NH<sub>3</sub> no ambiente, oferecendo nitrogênio ao solo, que é essencial para diversos ecossistemas (LINDERMANN & GLOVER, 2003; MOREIRA *et al.*, 2010).

Vários são os microrganismos diazotróficos existentes e sua ampla gama compreende *arqueobactérias*, *cianobactérias*, bactérias gram-positivas e gram-negativas, apresentando grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, podendo, ainda, ser de



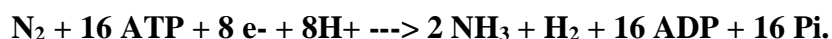
vida livre, estar associada a espécies vegetais ou estabelecer simbiose com leguminosas. Devido a essa vasta diversidade, sua ocorrência está relacionada a diversos ecossistemas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Em uma cultura qualquer, é bem comum serem encontradas bactérias de vida livre que podem ser autotróficas e heterotróficas, entre estas se destacam como principais as cianobactérias (*Gloeotheca*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Anabaena*, *Nostoc*) e a *Klebsiellapneumoniae*, sendo, também, igualmente comuns, as associativas a leguminosas, como os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* e as bactérias associadas às gramíneas, como os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (FERREIRA, 2008; FERREIRA *et al.*, 2003).

A FBN é responsável pela maior parte da fixação natural de nitrogênio no solo, representando mais de 90% das  $190 \times 10^{12}$  g ano<sup>-1</sup> do nitrogênio total fixado naturalmente, podendo ser considerado um dos processos de maior importância do planeta, junto com a fotossíntese e a decomposição orgânica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002; FERREIRA, 2008).

A FBN em leguminosas pode chegar a representar 100% do nitrogênio requerido para o desenvolvimento. Nas gramíneas, existem maiores restrições quanto ao número de gêneros de diazotróficas existentes em conjunto com a planta, tornando o FBN menos eficientes, quando comparadas às leguminosas. Contudo, várias bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico têm sido isoladas, entre elas estão os gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum*, encontradas no arroz, trigo, milho e sorgo (FERREIRA, 2008; REIS JUNIOR *et al.*, 2006).

A FBN se dá através de um complexo enzimático chamado nitrogenase, que é característico nas bactérias diazotróficas. Este complexo, entre outros, catalisa o nitrogênio do ar atmosférico (N<sub>2</sub>) até amônia (NH<sub>3</sub>), que é assimilável por plantas (FERNANDES, 2013). A nitrogenase ocorre segundo a reação:



onde e<sup>-</sup> simboliza elétron e Pi simboliza o fosfato inorgânico.

Do ponto de vista energético, é dispendioso para o organismo que a realiza, uma vez que são necessárias 16 moléculas de ATP (Figura 3) para realizar esta conversão (NEVES *et al.*, 1993).

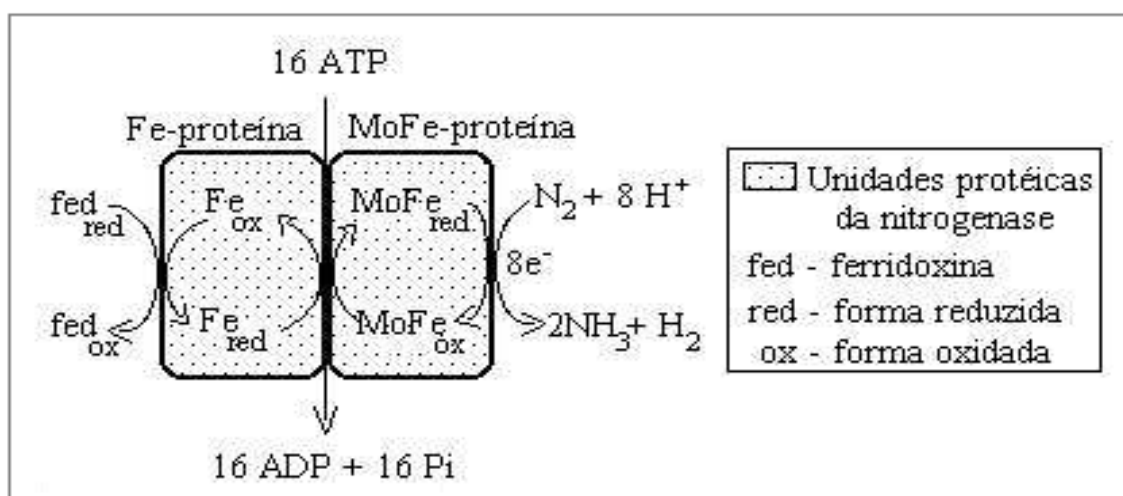


Figura 3: Modelo da reação de fixação do nitrogênio mediada pela enzima nitrogenase (Adaptado de MORGANTE, 2003).

### 2.2.2 Bactérias diazotróficas endofíticas associativas

As bactérias diazotróficas podem viver de forma livre em diversos ecossistemas, estar em simbiose ou associada às plantas. Bactérias como *Azospirillum spp.*, *Bacillus spp.* e *Paenibacillus spp.* habitam a rizosfera de gramíneas e, quando utilizadas como inoculante, apresentam efeitos benéficos ao crescimento vegetal (SELDIN *et al.*, 1998; CURÁ *et al.*, 2005). Outras bactérias diazotróficas, como a *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum spp.*, podem viver endofiticamente em raízes, colmos e folhas, proporcionando contribuições através da FBN e produção de compostos indólicos (BALDANI, 1996; GYANESHWAR *et al.*, 2001).

Diversas espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes externas de espécies de importância agrícola como: gramíneas e palmeiras (MAGALHÃES & DÖBEREINER, 1984; DÖBEREINER, 1992; BALDANI *et al.*, 1997; FERNANDES *et al.*, 2001), cafeeiros (JIMÉNEZ-SALGADO *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2001), tubérculos (PAULA, 1992; BALOTA, *et al.*, 1997;), orquídeas (LANGE & MOREIRA, 2002), fruteiras (RAO, 1983; WEBER *et al.*, 1999) e araucárias (NERONI & CARDOSO, 2007).

As bactérias associativas endofíticas, por definição, são aquelas que passam pelo menos parte do seu ciclo de vida no interior do tecido da planta hospedeira, sem lhe causar danos, estabelecendo relações benéficas, aumentando a resistência a doenças, estimulando o crescimento da planta e aumentando a fixação de nitrogênio atmosférico (PERIN *et al.*, 2003; STURZ & NOWAK, 2000).

As bactérias endofíticas apresentam seu ambiente ótimo de crescimento no interior de outras plantas, onde encontram um *habitat* sem os agentes inibidores existentes nas raízes das plantas ou nos solos. Muitos organismos podem ser encontrados no interior de plantas, alguns em grandes quantidades chamados de dominantes e outros em quantidades bem menores e difíceis de serem detectados, denominados de espécies raras (ROESCH, 2007).

Devido a sua capacidade de colonizar o interior das plantas, as bactérias diazotróficas endofíticas apresentam um grande potencial para serem utilizadas na agricultura, as bactérias endofíticas encontram no interior das plantas um ambiente livre de oxigênio, podendo assim manter em alto nível a nitrogenase, com elevada taxa de FBN e produção de fitohormônios (BALDANI & DÖBEREINER, 1995).

### 2.2.3 Gênero *Herbaspirillum spp.*

Baldani *et al.*, (1986) estabelecem o gênero *Herbaspirillum* como uma bactéria diazotrófica fixadora de nitrogênio que vive em associação as raízes de plantas como o milho, o sorgo e o arroz. Monteiro *et al.*, (2012) relataram em seu trabalho que o gênero *Herbaspirillum* é composto de quatorze espécies: *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986); *H. rubrisulbalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996); *H. frisingense* (KIRCHHOF *et al.*, 2001); *H. lusitanum* (VALVERDE *et al.*, 2003); *H. chlorophenicum* (IM *et al.*, 2004); *H. huttiense* subsp. *huttiense*, (DING & YOKOTA, 2004); *H. hiltneri* (ROTHBALLER *et al.*, 2006); *H. rhizosphaerae* (JUNG *et al.*, 2007), *H. huttiense* subsp. *putei*, *H. autotrophicum*, *H. aquaticum* (DOBRITSA *et al.*, 2010), *H. canariense*, *H. aurantiacum* e *H. soli* (CARRO *et al.*, 2012). Entre estas espécies descritas apenas a *H. seropedicae*, *H. rubrisulbalbicans*, *H. frisingense* e *H. lusitanum* são capazes de fixar nitrogênio (ALVES, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2012).

Alguns dos representantes do gênero *Herbaspirillum* apresentam a capacidade de viver de forma endofítica, ocorrendo o seu melhor desenvolvimento e maior tempo de vida quando no interior de outras plantas, apresentando baixo desenvolvimento quando exposto ao solo. Por serem capazes de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos das plantas,

podem transferir com maior eficiência os compostos nitrogenados produzidos e ainda não sofrem limitações de substâncias ricas em carbono (BALDANI *et al.* 1996, OLIVARES *et al.*, 1997).

O isolamento da *Herbaspirillum* se dá, com maior eficácia, no meio semi-sólido JNFb com diluições seriadas de amostras de raízes, colmos e folhas de cereais, gramíneas forrageiras ou cana-de-açúcar, sendo observado durante o seu crescimento a formação de uma película fina sobre o líquido. Quando plaqueadas em meio NFB com três vezes de azul de bromotimol, as colônias apresentam centro azul, como ilustrado na Figura 4 (DÖBEREINER *et al.*, 1995).

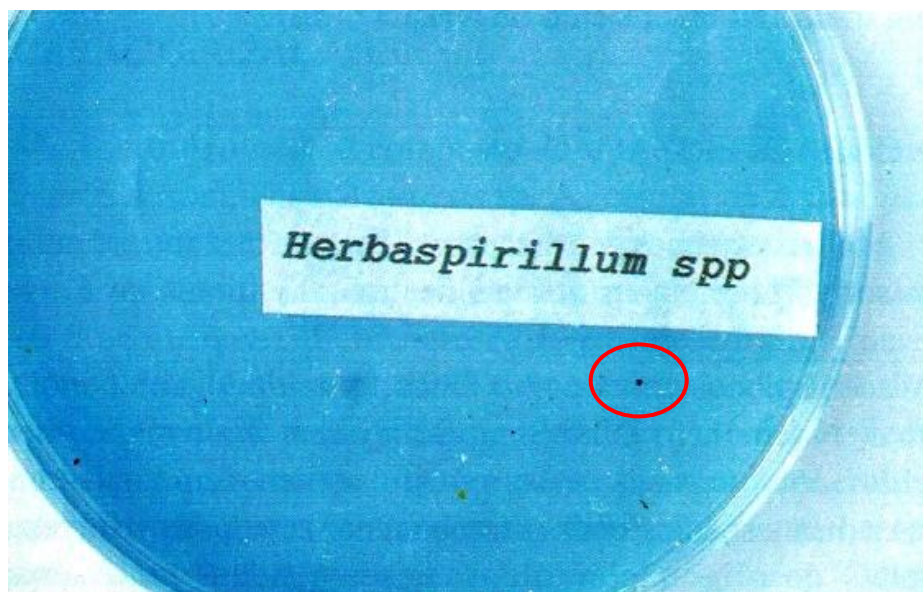


Figura 4: Colônia de bactérias do gênero *Herbaspirillum* em meio de cultura NFB contendo três vezes a concentração de azul de bromotimol e acrescido de extrato de levedura (Adaptado de DÖBEREINER, 1995).

#### 2.2.4 *Herbaspirillum seropedicae*

*H. seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica, gram negativa, vibrióide, membro da classe  $\beta$  das proteobactérias (BALDANI *et al.*, 1986). A *H. seropedicae* é a espécie que possui maior distribuição e ocorrência dentre as espécies diazotróficas endofíticas estudadas, apresentando a capacidade de colonizar raízes, caules e folhas de diferentes grupos de plantas, principalmente gramíneas, tendo sido encontrada em arroz, sorgo, milho, cana de açúcar, e banana (ALVES, 2007; BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 2001).

A primeira espécie do gênero *Herbaspirillum* a ser identificada foi *H. seropedicae*. Inicialmente, foi classificada por Baldani *et al.* (1986) como uma nova espécie do gênero *Azospirillum* por apresentar características similares, como a de crescimento de película em meio de cultura semi-sólido NFB, sendo classificada como um novo gênero após a análise do 16s rRNA. As características dessas bactérias são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação da *Herbaspirillum seropedicae* com outras bactérias fixadoras de nitrogênio (Adaptado de BALDANI *et al.*, 1986).

<i>Atributos</i>	<i>H. seropedicae</i>	<i>Aquaspirillum intersonii e Aquaspirillum peregrinum</i>	<i>Xanthobacter</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>R. ruhrum e R. tenue</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
Célula em formato vibrioide	+	-	-	-	-	-
Célula em formato helicoidal	-	+	-	-	+	-
Tipo predominante de flagelação	1-3 Flagelos Polares	Tufo Bipolar	-	Único flagelo polar	1-3 Flagelos Polares	Único flagelo Polar
Película nos meios semi-sólidos	+	-	-	-	-	-
Crescimento em N <sub>2</sub> como única fonte de N	+	-	+	-	+	-
Crescimento anaeróbico com NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	±	-	-	-	+
H <sub>2</sub> O pigmentos solúveis	-	+	-	+	+	-
Utilização de açúcares	+	-	+	+	-	+
Foto-autotrófica	-	-	-	+	-	-
Associação com raízes de plantas	+	-	-	+	-	+
Teor de G + C contendo DNA (mol%)	66-67	60-66	65-70	64	62-66	59-64

A *H. seropedicae* apresenta células de diâmetro entre 0,6 a 0,7 µm, flagelos variáveis, apresentando de um a três flagelos e podendo conter de um a dois flagelos por pólo (Figura 5). Outras características destas bactérias, apresentadas na Tabela 2, são: metabolismo respiratório típico, não fermenta açúcares, colônias de coloração marrom quando crescida em meio batata e com centro azulado quando em meio NFb com 3 vezes de azul de bromotimol, maior tolerância a variação do pH (5,4 a 8,0) e oxigênio para a nitrogenase, apresentando bom crescimento em ácidos orgânicos, glucose, galactose, L-arabiose, manitol, sorbitol e glicerol (BALDANI, 1986).

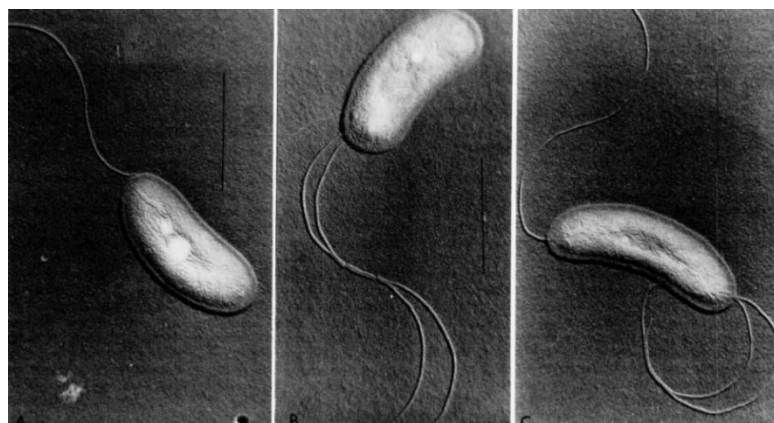


Figura 5: Microscopia eletrônica das células da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* crescida em Agar nutriente. **a)** Bactéria com um flagelo; **b)** bactéria com dois flagelos em um pólo; **c)** bactéria com três flagelos (BALDANI *et al.*, 1986).

Tabela 2: Crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* com diferentes fontes de carbono e nitrogênio em meio NFb semi-sólido (Adaptado de BALDANI *et al.*, 1986).

<i>Fonte(s) de Carbono</i>	<i>% de células positivas para as seguintes fontes de nitrogênio <sup>1</sup></i>	
	<i>NH<sub>4</sub>Cl</i>	<i>N<sub>2</sub></i>
Malato, succinato, citrato, $\alpha$ -cetoglutarato, fumarato, piruvato, trans-aconitato	100	100
Malonato	0	0
Manitol, glicerol, sorbitol	100	100
Glucose, galactose, L- arabinose	100	100
Fructose	100	0
Ácido de L-arabinose	- <sup>2</sup>	100
Ácido de glucose, galactose	- <sup>2</sup>	0

<sup>1</sup> Testes realizados para as estirpes Z67<sup>1</sup>, 2176, ZA95, ZS64, ZA113, 278, ZM141, ZAl10, ZS57, ZA80.

<sup>2</sup> Reações ácidas ocorreram durante todo o crescimento em meio suprido com NH<sub>4</sub>Cl para todos os açúcares e álcoois, não sendo possível distinguir da produção do ácido.

### 2.3 Compostos indólicos

Vários são os elementos que podem afetar o crescimento de uma planta, entre estes estão às auxinas, que são importantes fitohormônios de crescimento. A produção de fitohormônios por rizobactérias é observada como um dos responsáveis por estímulos no crescimento das plantas.

O fitohormônio de maior importância pertencente à classe das auxinas é o ácido indol-3-acético (AIA), sendo este o mais ativo e melhor caracterizado, proporcionando a planta aumento da alongação, maior divisão e diferenciação celular, participando da regulação da dominância apical, da abscisão foliar, da diferenciação vascular, auxiliando na iniciação das raízes laterais, na formação de gemas florais, na produção de filotaxia e no desenvolvimento do fruto, podendo ainda haver outros produtos denominados auxinas sintéticas que são amplamente usados na agricultura e que produzem efeitos similares aos do AIA (CROZIER *et al.*, 1988; DOBBELAERE *et al.*, 2003; FERNANDES, 2013; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Acredita-se que a produção de fitohormônios por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) seja um mecanismo de interação bactéria-planta. Através da síntese do fitohormônio pela bactéria, a planta tem seu crescimento estimulado e como consequência há um aumento na produção de metabólitos pela planta que servirão de nutrientes para as bactérias.

Diversos fatores podem afetar a produção de fitohormônios em bactérias, como compostos específicos da planta, o estresse ambiental, pH ácido e limitação de carbono (COSTACURTA *et al.*, 1998; BRANDL & LINDOW, 1997).

No gênero *Herbaspirillum* pode-se identificar a produção de compostos indólicos e outros fitohormônios. Bastián *et al.*, (1998) observaram em seu trabalho, que a estirpe *Herbaspirillum seropedicae* apresenta a produção de AIA e giberelina A3 (GA<sub>3</sub>) como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Concentração de GA e AIA (ng mL<sup>-1</sup>) produzido por *H. seropedicae* em meio NFb e *G. diazotrophicus* em meio LGIP com 10 e 15% de sacarose (Adaptado de BASTIÁN *et al.*, 1998).

<i>Composto</i>	<i>G. diazotrophicus</i> (10 %)	<i>G. diazotrophicus</i> (15 %)	<i>H. seropedicae</i>
GA <sub>1</sub>	1,6 ng mL <sup>-1</sup>	-	-
GA <sub>3</sub>	11,6 ng mL <sup>-1</sup>	-	12,5 ng mL <sup>-1</sup>
AIA	32,0 ng mL <sup>-1</sup>	21,0 ng mL <sup>-1</sup>	7,0 ng mL <sup>-1</sup>
AIA-conjugado	1,4 ng mL <sup>-1</sup>	3,3 ng mL <sup>-1</sup>	-
AIA-Total	33,4 ng mL <sup>-1</sup>	24,3 ng mL <sup>-1</sup>	7,0 ng mL <sup>-1</sup>

A descoberta de novos gêneros de bactérias tem proporcionado um maior interesse na melhor compreensão do papel do AIA na interação planta-bactéria. Inicialmente atribuíam-se a produção do AIA a patogênese mas, posteriormente, estudos relacionaram as bactérias promotoras de crescimento como um importante veículo de produção do AIA.

Atualmente, as principais vias biossintéticas identificadas para a produção do AIA são (DOBBELAERE *et al.*, 1999; LAMBRECHT *et al.*, 2000; SPAEPEN *et al.*, 2007):

1. Triptofano via rota da triptomina (TAM);
2. Triptofano via rota indol-3-acetonitrila (IAM);
3. Triptofano via rota indol-3-piruvato (IPyA);
4. Triptofano via indol-3-piruvato pela rota do indol piruvato ferredoxina oxirredutase (Ior);
5. Triptofano via rota indole-3-acetamida (IAM);
6. Triptofano via rota de oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO);
7. E uma independente de triptofano.

Diversos estudos têm sido realizados buscando a melhor compreensão sobre as rotas da biossíntese de AIA e diferentes vias de biossíntese foram identificadas, apresentando algumas similaridades entre plantas e bactérias (SPAEPEN *et al.*, 2007). As rotas para síntese de AIA em bactérias e plantas são apresentadas na Figura 6. A rota do indol-3-piruvato (IPyA) é considerada a principal via de biossíntese do AIA em plantas e a rota indol-3-acetamida (IAM) a via melhor caracterizada em bactérias, esta última sendo considerada uma via exclusiva para síntese por bactérias, não tendo sido ainda identificada em plantas (SPAEPEN *et al.*, 2007).

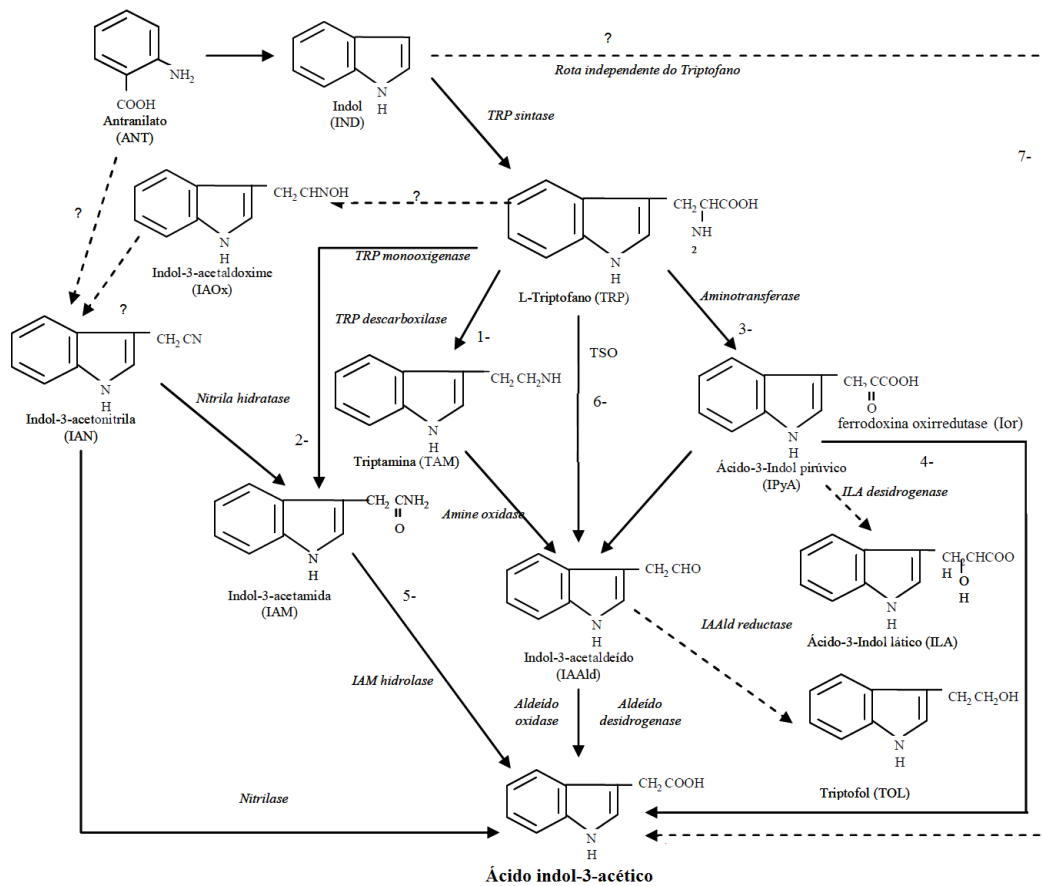


Figura 6: Rotas para síntese de AIA em bactérias e plantas (Adaptado de SPAEPEN *et al.*, 2007; PATTEN & GLICK, 1996).

## 2.4 Bioprocessos e processos fermentativos

Os processos que englobam operações de tratamento da matéria-prima e resíduos, preparo de meios de cultura, esterilização do meio de cultura e transformação do substrato em produto são classificados como bioprocessos. Os recipientes onde ocorrem as reações químicas catalisadas por microrganismos ou enzimas produzidas a partir de células vivas recebem a denominação de biorreator, reator bioquímico ou reator biológico (PEREIRA JR. *et al.*, 2008; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os bioprocessos, que são conduzidos utilizando microrganismos para a conversão do substrato em biomassa ou metabólitos, são tradicionalmente conhecidos como processos fermentativos, sendo estes processos importantes fontes de produtos de natureza biológica para a indústria farmacêutica, química, alimentícia, agrícola, energética e etc. (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Em um processo fermentativo, existem dois sistemas que interagem: A fase biológica composta pela população microbiana ou culturas e a fase ambiental que contém os substratos e produtos de processo, chamada de meio de cultura. Para a realização de um processo fermentativo, devem-se atender quatro pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto (SCHMIDELL *et al.*, 2001). O esquema geral de um bioprocessos com suas etapas é apresentado na Figura 7.

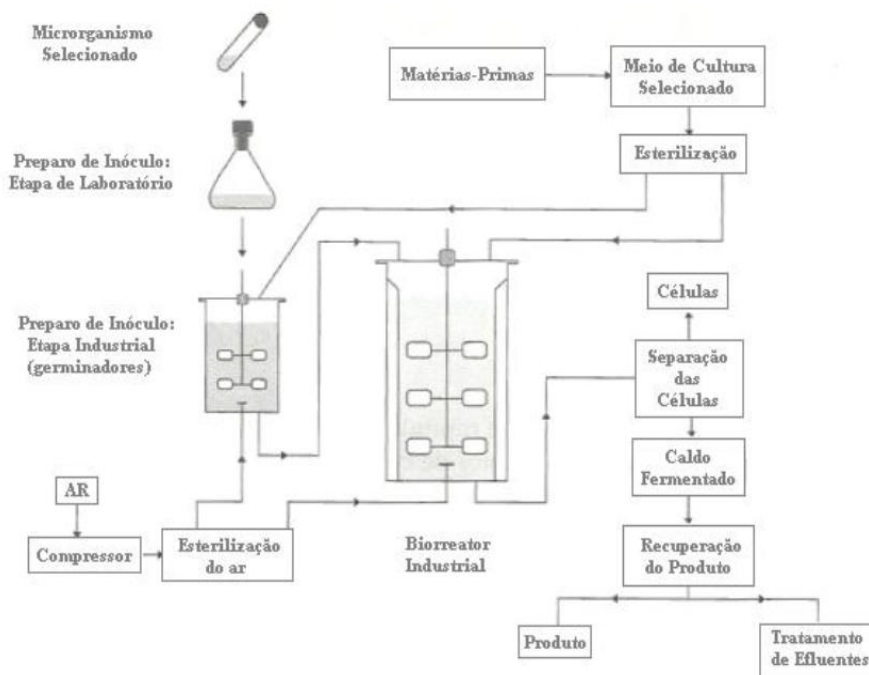


Figura 7: Esquema geral de um bioprocesso (Adaptado de SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Schmidell *et al.* (2001) acrescentaram que os microrganismos utilizados na indústria bioquímica devem apresentar as seguintes características:

- Elevada eficiência na conversão do subproduto em produto;
- Permitir o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração de produto no caldo fermentado;
- Não produzir substâncias incompatíveis com o produto, ser estável na produção quanto à quantidade e à qualidade e não formar produtos patogênicos;
- Ser constante quanto ao comportamento fisiológico;
- Não exigir condições de processo muito complexas, onde o ideal é um microrganismo que não opere em ponto de ótimo e sim em uma faixa;
- Não exigir meios de culturas dispendiosos, para manter a viabilidade econômica;
- Permitir a rápida liberação do produto para o meio.

Para os meios de cultura, é ideal que sejam:

- Economicamente viáveis;
- Atender a necessidades nutricionais dos microrganismos;
- Auxiliar no controle do processo, ou seja, manter as características dos microrganismos;
- Não causar problemas na recuperação do produto;
- Permitir o seu armazenamento para sempre estar disponível;
- Possuir composição razoavelmente fixa;
- Possuir um efluente de fácil tratamento.



### 2.4.1 Biorreatores

O meio de cultura inoculado com a fase biológica é processado em um biorreator, onde, para que a reação catalítica desejada ocorra em seu máximo, condições ótimas de crescimento para o agente biológico ou condições que proporcionem a faixa em que o microrganismo irá se desenvolver deve ser atendida, mantendo assim o máximo da atividade catalítica, seja para simples reação enzimática ou através do metabolismo da célula (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Podem-se encontrar diversas classificações para diferentes tipos de biorreatores, como por exemplo: quanto ao tipo de biocatalisador (células ou enzimas), quanto à configuração do biocatalisador (células/enzimas livres ou imobilizadas) ou quanto à forma de agitar o líquido no biorreator (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a quantidade de água no meio de cultivo. Quando há a ausência de água livre no meio, denomina-se processo em estado sólido ou fermentação em estado sólido (FES), quando há a presença de água livre, é classificado como processo ou fermentação submersa. O modelo de fermentação submersa é a modalidade mais aplicada em fermentações industriais, mais de 90% do total dos biorreatores utilizados industrialmente em processos submersos corresponde ao reator com agitação mecânica, conhecido como STR (*Stirred Tank Reactor*) ou reator de mistura perfeita, ilustrado na Figura 8. O STR permite a perfeita dissolução das fontes de energia e nutrientes, proporciona maior facilidade quanto à esterilização, controle da temperatura e pH (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

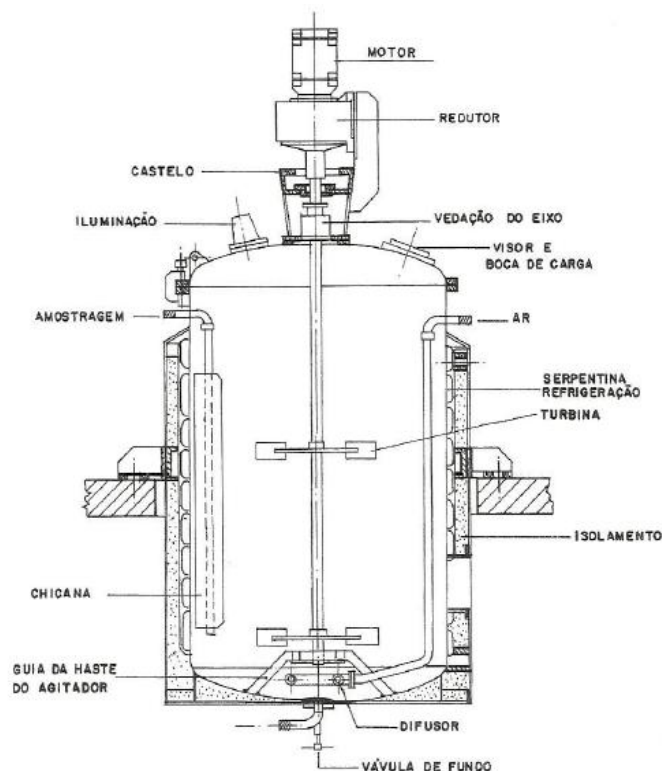


Figura 8: Ilustração de um biorreator agitação mecânica (Adaptado de THIEMANN, 2001).

O processo de fermentação classificado como descontínuo ou batelada simples é o mais seguro quanto a questões de manutenção e assepsia, pois ao final de cada batelada o reator e o novo meio de cultura devem ser esterilizados para receber um novo inóculo que deverá ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a sua pureza, ou seja,

garantir que apenas o microrganismo desejado esteja presente na fermentação. As fermentações descontínuas apresentam também ótimas condições de controle de estabilidade genética do microrganismo, entretanto podem apresentar baixa produtividade devido a efeitos inibitórios (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

#### 2.4.2 Meio de cultura para a produção de microrganismos

Os meios de cultura ou cultivo consistem em associações de nutrientes que fornecem a energia necessária para que a atividade metabólica do microrganismo ocorra fora de seu meio natural, mantendo máximas condições produtivas. Os meios de cultura devem levar em conta as características nutricionais do microrganismo a ser cultivado, buscando ser o mais similar possível ao *habitat* original do microrganismo (MOO-YOUNG, 1985, PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Os meios de cultura podem ser classificados, segundo a sua composição, em meios complexos ou quimicamente definidos. Os meios complexos apresentam em sua formulação subprodutos industriais e extratos naturais, tais como: glicerol, melação, peptona, extrato de levedura e outros, sua composição é complexa e variável, possuindo diversas fontes de cada elemento. Os meios quimicamente definidos são formulados com compostos puros, tais como: glicose, sulfato de amônio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, etc. Sua composição química é conhecida e reproduzível, contendo fontes de cada elemento e dos nutrientes essenciais requeridos (FERNANDES, 2013; PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Uma importante etapa na formulação do meio de cultura é a escolha dos nutrientes que farão parte da composição do meio. Os microrganismos utilizam como fonte de carbono diversos açúcares, tais como: a glicose, sacarose, frutose, amido, celulose, etc.; como fonte de nitrogênio, pode-se utilizar sais, como o  $\text{NH}_4\text{HSO}_4$ , o  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , aminoácidos ou ureia, como fonte de fósforo podem utilizar os fosfatos solúveis, como o monoamônio fosfato (MAP), ou o diamônio fosfato (DAP), os quais também são fontes de nitrogênio (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Na escolha dos componentes para a composição do meio de cultura industrial, além de atenderem às necessidades nutricionais do microrganismo, deve-se levar em conta o fator econômico, pois alguns meios são extremamente complexos e tornam a fermentação bastante dispendiosa, tornando o processo inviável (PEREIRA JR. *et al.*, 2008; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Como fonte de carbono, além das já citadas, pode-se utilizar o glicerol, que se apresenta como uma fonte de carbono viável para processos fermentativos. O glicerol bruto, oriundo da fabricação de biodiesel, é um produto abundante e sua utilização vai da fabricação de novos produtos químicos, aditivos para combustíveis de automóveis, metanol e alimento para animais, onde, se purificado, pode ainda ser usado como fonte de carbono alternativa para a produção de microrganismos (IMANDI *et al.*, 2006; POLETO, 2014).

O glicerol em sua forma bruta apresenta diversos nutrientes como o fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que podem ser metabolizados por microrganismos durante seu crescimento em fermentações. Devido ao aumento do volume de glicerina produzida em todo o mundo proveniente dos resíduos da fabricação de biodiesel, tem-se buscado novas alternativas para o consumo desse resíduo, sendo que a sua utilização como fonte de carbono para a fermentação de microrganismos pode contribuir para reduzir consideravelmente o preço do processo, uma vez que carboidratos puros, como a glicose, possuem alto valor comercial (POLETO, 2014; TABOSA *et al.*, 2009).

### 2.4.3 Cinética de crescimento microbiano

O objetivo do estudo dos dados cinéticos de um bioprocessamento é quantificar a qual taxa ocorre o crescimento celular, o consumo do substrato, a formação do produto entre outros possíveis parâmetros que estejam relacionados ao crescimento celular, como agentes externos (pH, temperatura, oxigenação, e etc.). A obtenção destes parâmetros para o setor de bioprocessos é essencial para se adequar o projeto da bancada para a escala industrial (VIEGAS, 2003).

Tosetto (2002) acrescenta que a cinética dos processos fermentativos possui como objetivo medir a velocidade das transformações que ocorrem durante a fermentação, estudar a influência do pH, temperatura e demais parâmetros externos sobre a velocidade de transformação, correlacionar, por meio de equações empíricas ou de modelos matemáticos, a velocidade de transformação com os fatores que cercam o processo e aplicar as equações na otimização e controle do processo.

Um meio de cultivo é composto por três elementos: os microrganismos ou biomassa ( $X$ ), os produtos do metabolismo ou metabólitos ( $P$ ) e os nutrientes ou substratos ( $S$ ). Tais valores experimentais de  $X$ ,  $P$  e  $S$  são as concentrações de cada elemento descrito representados em função do tempo e são indicados por  $X=X(t)$ ,  $P=P(t)$  e  $S=S(t)$ , permitindo que sejam traçadas as curvas que representam o processo (HISS, 2001; PAGNONCELLI, 2008).

Diversos parâmetros são de fundamental importância para analisar o desenvolvimento da biomassa nas condições impostas para crescimento, entre eles estão as taxas específicas de crescimento do microrganismo ( $r_x$ ), consumo do substrato ( $r_s$ ) e de formação do produto ( $r_p$ ), definidas respectivamente pelas equações (1), (2) e (3) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (2)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

Outros parâmetros a serem analisados são a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ), que mede a velocidade do desenvolvimento celular microbiano, a velocidade específica de consumo de substrato ( $\mu_s$ ), que relaciona o consumo do substrato ( $S$ ) à produção de biomassa ( $X$ ) e a velocidade específica de formação de produto ( $\mu_p$ ), que relaciona a produção dos metabólitos ( $P$ ) com a concentração celular ( $X$ ), sendo  $\mu_x$ ,  $\mu_s$  e  $\mu_p$  representados respectivamente pelas equações (4), (5) e (6) (PAGNONCELLI, 2008; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left( -\frac{dS}{dt} \right) \quad (5)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

A velocidade máxima de crescimento celular na fase exponencial ( $\mu_m$ ) é outro importante parâmetro a ser estimado, sendo muito útil na escolha das melhores condições de fermentação.

Pode-se observar, experimentalmente, que o aumento da população de microrganismos ( $X$ ) ao longo do tempo de fermentação ( $t$ ) está relacionado com a quantidade populacional e uma constante de proporcionalidade, a taxa específica de crescimento máximo do microrganismo ( $\mu_m$ ) (VIEGAS, 2003). Esta relação pode ser descrita matematicamente pela equação (7).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad (7)$$

Integrando-se a equação (7) obtém-se:

$$\mu_m t = \ln \frac{X}{X_0} \quad (8)$$

A velocidade máxima exponencial,  $\mu_m$ , é o coeficiente angular da função obtida pela regressão no ponto em que o coeficiente é máximo e sua duração é o tempo que se matem o valor do coeficiente angular ao máximo possível (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Em processos descontínuos, pode-se ainda determinar os fatores de conversão, onde serão relacionados entre si os valores de  $X$ ,  $P$  e  $S$ , tais dados são muito úteis para determinar o rendimento da produção de biomassa e metabólitos. Os fatores a serem determinados são o de conversão do substrato em biomassa ( $Y_{X/S}$ ), de biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ) e de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), obtidos pelas equações (9), (10) e (11) (FERNANDES, 2013; PAGNONCELLI, 2008; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (9)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (10)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (11)$$

Após a inoculação do meio de cultura com a bactéria desejada, aplicando-se as condições favoráveis ao crescimento microbiano observa-se, em cultivo descontínuo, uma curva de desenvolvimento celular característica, exemplificada na Figura 9.

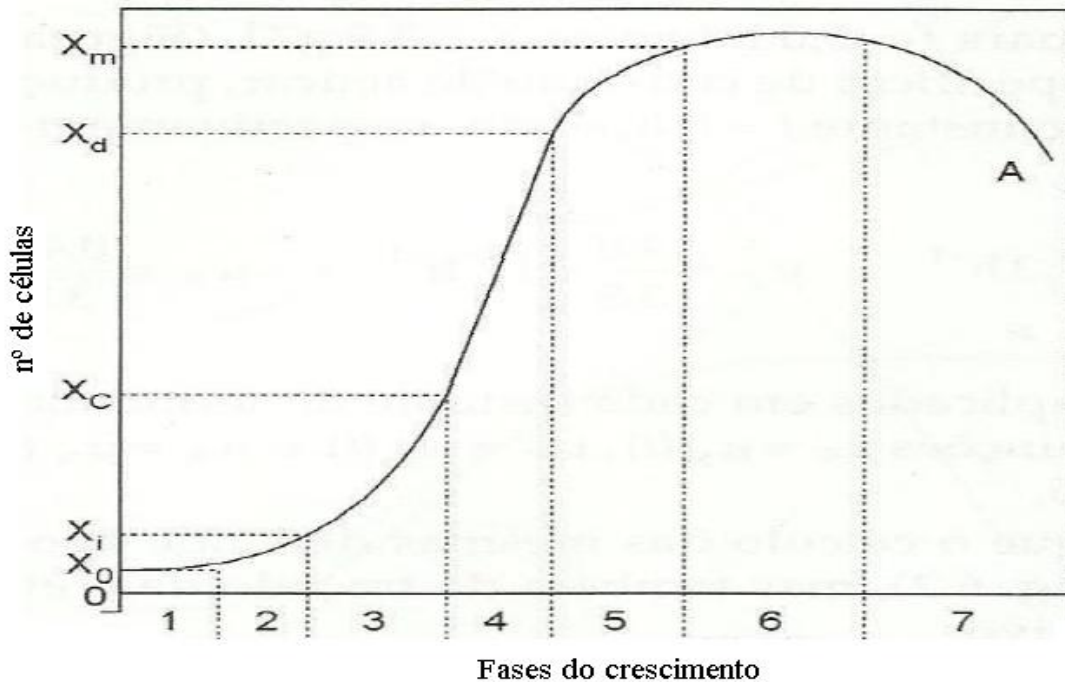


Figura 9: Curva de crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo (adaptado de SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A análise dos dados fornecidos pela Figura 9 permite descrever as fases do crescimento microbiano (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

- Fase 1 - Fase lag ou de latência – imediatamente após a inoculação do meio, é o período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo, não há reprodução celular ( $X = X_0 = \text{constante}$ ).
- Fase 2 - Fase de transição – início da reprodução microbiana.
- Fase 3 - Fase logarítmica ou exponencial – a velocidade específica de crescimento é constante e máxima ( $\mu_X = \mu_m$ ).
- Fase 4 - Fase linear de crescimento – apresenta a taxa de reprodução constante ( $r_X = r$ ).
- Fase 5 - Fase de desaceleração – devido ao esgotamento de componentes no meio de cultura ou acúmulo de metabólitos inibidores, as velocidades de reação diminuem até se anularem.
- Fase 6 - Fase estacionária –  $X$  atinge o seu valor máximo  $X_m$ , há igualdade entre o crescimento e a morte de microrganismos.
- Fase 7 - Fase declínio ou lise – A concentração celular diminui a uma velocidade que excede a reprodução.

#### 2.4.4 Modelagem matemática de processos bioquímicos

A modelagem matemática de processos bioquímicos é uma importante etapa para a estimação do comportamento dinâmico do microrganismo em fermentação para condições reais, sendo necessária para se observar de forma mais concisa a produtividade e o rendimento do processo. Existe a necessidade de se obter parâmetros cinéticos que se ajustem aos dados experimentais disponíveis, estes parâmetros podem sofrer alterações dependendo das

condições operacionais e do tipo de processo utilizado (AUGUSTO *et al.*, 1994; PERTEV *et al.*, 1997).

Segundo Borges (2008), quando o crescimento celular ocorre sem a presença de metabólitos nocivos ao meio microbiano, o processo pode ser descrito pela equação de Monod (1949), que é a mais simples representação de um processo de crescimento microbiano, descrevendo apenas o crescimento na presença de um substrato limitante, não levando em conta as demais inibições. A Equação de Monod é apresentada a seguir:

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (12)$$

Em processos fermentativos sempre existe a possibilidade de haver um agente inibidor e, nesses casos, desaconselha-se a utilização da equação de Monod. Os modelos cinéticos mais usados em bioprocessos podem ser divididos em (VIEGAS, 2003; SCHMIDELL *et al.*, 2001):

- Não-estruturados e não-segregados, nos quais as células de microrganismos são consideradas como solutos;
- Estruturados e não-segregados, nestes modelos as células são tratadas como indivíduos de múltiplos componentes, no entanto as composições dos componentes são de média semelhança;
- Não-estruturados e segregados, onde as células são descritas por um único componente, mas são tratadas como seres individuais;
- Estruturados e segregados, onde as células são formadas por múltiplos componentes.

Segundo Andrietta (1994), os principais modelos encontrados na literatura para a descrição de processos fermentativos são os não-estruturados e não-segregados, que possuem os seus fundamentos no princípio da determinação da velocidade específica de crescimento microbiano ( $\mu$ ) e na produção do produto, pelo decréscimo da velocidade específica máxima ocasionada por termos de inibição e limitação.

Existem, na literatura, vários modelos com diferentes considerações dos interferentes da velocidade específica de crescimento do microrganismo e geração de produto, variando de autor para autor. A inibição causada pelo substrato, produtos, concentração de células, substrato limitante e a temperatura pode ser levado em consideração por alguns modelos, já em outros, alguns parâmetros podem deixar de serem avaliados.

Vários efeitos gerados sobre o crescimento da biomassa são descritos em equações cinéticas e, em determinados momentos do processo, os modelos podem apresentar inconsistências estruturais. Para evitar tal problema, se faz necessário uma análise detalhada no momento da escolha do modelo a ser utilizado, pois estes modelos podem apresentar uma faixa de validade muito estreita e muitas vezes apresentaram resultados muito distantes dos obtidos experimentalmente.

Para se modelar um processo de fermentação, existe a necessidade de se ter em mãos os parâmetros cinéticos já definidos ou obtidos através de experimentos e simulações. Os métodos para obter os parâmetros podem ser os clássicos ou determinísticos (BORGES, 2008; TOSETTO, 2008).

Os principais fatores a serem considerados na modelagem são: a inibição pelo substrato limitante, inibição pelo substrato, inibição pelo produto e inibição pela concentração

celular. Esses fatores podem variar de acordo com o microrganismo, condições experimentais e de autor para autor (ANDRIETTA, 1994).

Devido à grande variabilidade dos processos microbianos, existe uma grande gama de modelos matemáticos, a escolha do modelo adequado está relacionada com a boa análise dos fatores que afetam o processo, se há inibição gerada pelo substrato, pelo produto ou por ambos (COELHO, 2011).

Além da equação de Monod, que é utilizada para processos de crescimento em um único substrato limitante, podem-se encontrar na literatura modelos matemáticos para processos fermentativos que levem em consideração a velocidade específica de crescimento da biomassa ( $\mu_x$ ), a velocidade específica máxima ( $\mu_m$ ), a limitação causada pelo substrato ( $K_S$ ), a inibição proveniente do substrato ( $K_i$ ), inibição pelo produto ( $K_P$ ), considerando a concentração de substrato ( $S$ ), a concentração de células ( $X$ ), a concentração do produto ( $P$ ) e produto máximo ( $P_m$ ) e a máxima concentração celular ( $X_m$ ) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Alguns dos modelos que descrevam o parâmetro de crescimento celular ao longo do tempo ( $\mu_x$ ) são apresentados a seguir:

### 1. Crescimento com substrato limitante

- Equação de Moser (1958)

$$\mu_x = \frac{\mu_m S^n}{K_S^n + S^n} \quad (13)$$

- Equação de Contois & Fujimoto (1959)

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_S X + S} \quad (14)$$

### 2. Crescimento em um único substrato limitante e inibidor

- Equação de Andrews (1968)

$$\mu_x = \frac{\mu_a S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (15)$$

- Equação de Wu *et al.* (1988)

$$\mu_x = \frac{\mu_a}{1 + \frac{K_S}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n} \quad (16)$$

### 3. Crescimento com múltiplos substratos limitantes

- Equação de Dunn *et al.* (1992)

$$\mu_x = \frac{\mu_{m1} S_1}{K_{S1} + S_1} + \frac{\mu_{m2} S_2}{K_{S2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}} \quad (17)$$

#### 4. Crescimento com produto metabólito inibidor

- Equação de Aiba (1968)

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \cdot e^{-K_p P} \quad (18)$$

- Equação de Ghose & Tyagi (1979)

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{P}{P_m}\right] \quad (19)$$

- Equação de Sevely et al. (1980); apud Dourado (1987)

$$\mu_x = \mu_m \left[ \frac{S}{(K_s + S)} \right] \cdot \left[ \frac{K_p}{(P + K_p)} \right] \cdot \left[ 1 - \frac{P}{P_m} \right] \quad (20)$$

- Equação de Aiba & Shoda (1969)

$$\mu_x = \frac{\mu_m}{\left(1 + \frac{K_s}{S}\right) \left(1 + \frac{P}{K_i}\right)} \quad (21)$$

#### 5. Inibição pela concentração celular do substrato e produto

- Equação de Levenspiel (1980)

$$\mu_x = \mu_m \left[ \frac{S}{(K_s + S)} \right] \cdot \left[ 1 - \frac{P}{P_m} \right]^n \quad (22)$$

- Equação de Lee *et al.* (1983)

$$\mu_x = \mu_m \left[ \frac{S}{(K_s + S)} \right] \cdot \left[ 1 - \frac{P}{P_m} \right]^n \cdot \left[ 1 - \frac{X}{X_m} \right]^m \quad (23)$$

#### 6. Inibição pelo produto exponencial

- Equação de Jin *et al.* (1981); apud Dourado (1987)

$$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \cdot e^{((-K_1 P) - (-K_2 S))} \quad (24)$$

A descrição do comportamento das velocidades específicas de formação do produto e de consumo do substrato pode ser realizada de forma análoga ao método utilizado para se descrever o crescimento da biomassa. Deve-se analisar qualitativamente o comportamento das curvas de consumo do substrato e formação do produto e verificar se há a ocorrência de fatores como inibições e limitações e, então, escolher o modelo matemático que melhor se enquadre no processo.

Pode-se citar, como modelos específicos para a descrição da relação entre a biomassa e produto ou substrato, as equações de Luedeking & Piret (1959), sendo a equação (25) para a definição da velocidade específica de formação do produto e a equação (26) para a velocidade específica de consumo do substrato (LIU *et al.*, 2003).



$$\mu_p = \alpha\mu_x + \beta \quad (25)$$

$$\mu_s = \mu_x \frac{1}{Y_{x/s}} + ms \quad (26)$$

onde  $\alpha$  é o coeficiente de formação do produto associado ao crescimento celular,  $\beta$  o coeficiente de formação do produto não associado ao crescimento celular e  $ms$  o coeficiente de manutenção.

Outro importante parâmetro associado ao crescimento celular e produção de metabólitos por bactérias, principalmente em fermentações realizadas em biorreatores agitados e aerados mecanicamente, é o oxigênio dissolvido no meio de cultura. Equações empíricas para quantificar o oxigênio dissolvido em meio fermentado podem ser obtidas levando-se em conta diversas variáveis, tais como a taxa de fluxo de ar, a velocidade do agitador, crescimento celular e produção de metabólitos.

Sendo conhecida a evolução do oxigênio dissolvido no meio de fermentação, é possível obter uma equação em função da concentração de biomassa, gerando, assim, um modelo cinético capaz de prever o comportamento do oxigênio dissolvido. O balanço de massa para o oxigênio dissolvido em meio de cultura líquido agitado pode ser descrito pela seguinte equação (27) (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2010; ÇALIK *et al.*, 2004):

$$\frac{dO_2}{dt} = -K_l(O_{2n} - O_{2min}) - q_{O_2} X \quad (27)$$

onde  $O_{2min}$  é a mínima concentração de oxigênio observada durante a fermentação,  $O_{2n}$  é a concentração de o oxigênio ao longo da fermentação,  $K_l$  é o coeficiente de transferência de oxigênio ao meio de cultura e  $q_{O_2}$  é a taxa específica de consumo de oxigênio. Sendo  $K_l(O_{2n} - O_{2min})$  a taxa de transferência de oxigênio (TTO) e o termo  $q_{O_2} X$  a taxa de consumo de oxigênio (TCO).

Garcia-Ochoa *et al.* (2010) relataram ainda que o TCO é usualmente relacionado ao oxigênio utilizado para a manutenção da biomassa e o oxigênio consumido para o crescimento celular, originando a equação (28):

$$TCO = q_{O_2} X = m_{O_2} X + \frac{1}{Y_{x/O}} \frac{dX}{dt} \quad (28)$$

onde  $m_{O_2}$  é o coeficiente de manutenção e  $Y_{x/O}$  é o coeficiente de rendimento da biomassa em relação ao volume de oxigênio.

A velocidade específica de consumo de oxigênio pode ser obtida substituindo a equação (28) em (27), obtendo:

$$\frac{1}{X} \frac{dO_2}{dt} = -\frac{K_l(O_{2n} - O_{2m})}{X} - \frac{1}{Y_{x/O}} \mu_x - m_{O_2} = \mu_{O_2} \quad (29)$$

#### 2.4.5 Análise dos desvios do modelo

Para avaliar os desvios proporcionados pelo modelo matemático em relação aos dados experimentais pode-se utilizar:

- **Coefficiente de determinação ( $R^2$ )**

O  $R^2$  quantifica a representação dos postos experimentais pelos pontos calculados pelo modelo matemático, sendo descrito pela equação (RODRIGUES & IEMMA, 2005):

$$R^2 = \frac{VE}{VT} \quad (30)$$

onde  $VE$  é a variação explicada e  $VT$  é a variação total.

- **Erro simples (ES)**

O erro simples é calculado pela subtração do dados experimental menos o simulado obtido para o instante de tempo amostral (SANJARI, 2013) :

$$ES(t) = y_{ip}(t) - y_i(t) \quad (31)$$

onde  $y_i$  é o valor experimental,  $y_{ip}$  é o valor predito pelo modelo.

- **Erro simples percentual (ES%)**

O erro simples percentual é o erro percentual observado para a variável simulado em relação ao dado experimental para o determinado tempo amostral (SANJARI, 2013):

$$ES\%(t) = \frac{(y_{ip}(t) - y_i(t))}{y_i(t)} 100 \quad (32)$$

onde  $y_i$  é o valor experimental,  $y_{ip}$  é o valor predito pelo modelo.

- **Desvio Padrão Residual (DPR)**

Apresenta os desvios gerados pelo modelo em relação aos pontos experimentais, descrito pela equação (ATALA *et al.*, 2001; SANJARI, 2013 ):

$$DPR = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{ip})^2} \quad (33)$$

onde  $n$  é o número de pontos experimentais,  $y_i$  é o valor experimental,  $y_{ip}$  é o valor predito pelo modelo.

- **Desvio Padrão Residual (DPR%)**

É o percentual de erro gerado pelo modelo, dado pela equação (ATALA *et al.*, 2001):

$$DPR\% = \frac{DPR}{\bar{y}_i} 100 \quad (34)$$

onde  $\bar{y}_i$  é a média dos valores experimentais.

## 2.5 Planejamento e otimização de processos fermentativos

Para se obter bons resultados experimentais visando sua otimização e avaliação dos principais efeitos sobre as respostas obtidas para um determinado produto, é essencial realizar um bom planejamento experimental sobre o processo em estudo. O planejamento experimental baseado em fundamentos estatístico é uma importante ferramenta para avaliação de efeitos e impactos sobre uma determinada variável (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

O planejamento experimental pode ser baseado em diversas estratégias, entre elas encontram-se os projetos fatoriais como o delineamento fatorial fracionado e o delineamento composto central rotacional (DCCR). No planejamento, busca-se também aprimorar as condições experimentais, minimizando os esforços e gastos envolvidos, sempre visando obter, da melhor forma possível, as informações procuradas (RODRIGUES & IEMMA, 2005; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Um importante método, envolvendo os trabalhos de fermentações com microrganismos, é o Método de Superfície de Resposta (MSR). Pode-se definir o MSR como um conjunto de técnicas utilizadas para estudar processos, através de uma abordagem qualitativa e quantitativa, de modo a apresentar um esboço dos efeitos das variáveis de entrada (parâmetros) sobre as variáveis de saída (respostas). Um planejamento de experimento fornece um grande número de informações úteis, permitindo investigar de forma mais ampla os dados fornecidos pelo processo (FERNANDES, 2013; NETO *et al.*, 1996).

A otimização de um processo fermentativo, muitas vezes está relacionada a uma maior produção e, frequentemente, na contra mão de uma metodologia mais produtiva, a redução de custos do processo, sendo necessária a definição da função objetivo a ser otimizada. A função objetivo é a representação matemática do objetivo a ser estabelecido na condução do processo, podendo ser definida como objetivo técnico ou econômico, ou ainda como uma mescla dos critérios técnicos e econômicos (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para se obter dados sobre a produção de biomassa e compostos indólicos através da bactéria *H. seropedicae* BR 11417, uma série de experimentos fermentativos foram conduzidos em *shaker* e biorreator. Todos os experimentos foram realizados na EMBRAPA – Agrobiologia, localizada em Seropédica – RJ, no Laboratório de Bioprocessos.

#### 3.1 Microrganismo

A bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 isolada por Baldani *et al.* (1986) foi fornecida pela Coleção de Culturas Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia (CRB Johanna Döbereiner).

#### 3.2 Preparo do estoque de bactérias

Os isolados fornecidos pela coleção de cultura, foram crescidos em placas com o meio de cultura sólido NFb com 3 vezes de azul de bromotimol (Tabela 6), a fim de garantir a pureza da cultura selecionada. Após o crescimento da cultura, selecionou-se uma colônia de células, sendo esta crescida, inicialmente, em tubo de ensaio com 5 mL do meio líquido JNFb (Tabela 4). Após o período de fermentação, a solução foi transferida para um erlenmeyer de 500 mL de volume, contendo 100 mL do meio de cultura JNFb, ambas as etapas ocorreram em *shaker*, por 24 h, com temperatura de 35 °C e agitação de 150 RPM. Após a fermentação, adicionou-se 20% de glicerol ao meio fermentado, coletando-se alíquotas de 1,0 mL do caldo fermentado, que foram transferidas para *ependorf* de 1,5 mL, o estoque foi então armazenado em geladeira.

#### 3.3 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados na manipulação deste microrganismo são os mesmos meios ricos e complexos propostos para isolamento, como o JNFb semi-sólido, o NFb com indicador para caracterização e o meio DYGS (DÖBEREINER *et al.*, 1995). Estes meios de cultura não são indicados para a produção em larga escala, pois costumam levar ingredientes variados e específicos que tornam o meio muito dispendioso para a produção industrial, sendo necessária a otimização do meio de cultura.

##### 3.3.1 Soluções em estoque

Diversas soluções frequentemente utilizadas no cultivo da *H. seropedicae* foram preparadas e mantidas em estoque, atendendo a seus critérios de armazenamento e tempo de validade, sendo estas soluções apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Soluções em estoque para uso rotineiro.

<i>Soluções em estoque</i>
NaCl a 10%;
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O a 1%;
Fe EDTA a 1,64%;
Micronutrientes
Solução alcoólica de azul de bromotimol a 5%; (solução 0,5% em 0,2N KOH)
Vitaminas para meio de cultura
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O a 0,1%;
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O a 1%;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> a 10%;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a 10%;

A composição e o preparo da solução de **Fe-EDTA** (DÖBEREINER, 1995) são dados por:

- 16,0 g de Na<sub>2</sub> EDTA (sal disódico do ácido etileno diaminotetra-acético);
- 11,95 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O;
- 950 mL de água.
- A solução foi aquecida até estar totalmente dissolvida, após o seu resfriamento, completou-se o volume até 1,0 litro.

A composição da **Solução de micronutrientes** (DÖBEREINER, 1999) é:

- 0,04 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O;
- 1,20 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O;
- 1,40 g L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>;
- 1,00 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O
- 1,175 g L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.
- 1000 mL com água destilada

Os componentes e as etapas para a produção da **Solução de vitaminas** (DÖBEREINER, 1995) é dada por:

- 10 mg L<sup>-1</sup> biotina
- 20 mg L<sup>-1</sup> piridoxol-HCl
- 100 mL de água destilada
- A solução foi dissolvida em banho-maria, completando o volume para 100 mL com água destilada.
- Para os procedimentos de diluição do inóculo, foi utilizada uma solução salina composta por NaCl 0,85% (p/v).

### 3.3.2 Meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose modificaso – DYGS

O meio de cultura DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986) é capaz de proporcionar aos microrganismos um crescimento acelerado, pois fornece fontes de carbono, nitrogênio e

nutrientes diversos (Tabela 5), sendo considerado um meio rico para favorecer o crescimento máximo de bactérias em um tempo de fermentação menor.

Tabela 5: Composição do meio DYGS (Rodrigues Neto *et al.*, 1986).

<i>Composto</i>	<i>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</i>
Glicose	2,0
Ácido málico	2,0
Peptona bacteriológica	1,5
Extrato de levedura	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Ácido glutâmico.	1,5

Os componentes foram dissolvidos em água destilada até completar 1,0 L, o pH do meio foi ajustado para 6,0 utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) ou KOH (10%) sendo então devidamente esterilizado.

### 3.3.3 Meio NFb

O meio NFb foi desenvolvido pelo pesquisador Fábio Pedrosa e apresenta a composição descrita na Tabela 6 (DÖBEREINER *et al.*, 1995):

Tabela 6: Composição do meio de cultura NFb (DÖBEREINER *et al.*, 1995)

<i>Composto</i>	<i>Quantidade</i>
Ácido málico	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Solução de micronutrientes	2,0 mL
Azul de bromotimol	2,0 mL
FeEDTA	4,0 mL
Solução de vitaminas	1,0 mL
KOH	4,5 g

Os componentes listados na Tabela 6 foram dissolvidos em água destilada até completar 1,0 L, o pH do meio foi ajustado para 6,5 antes de ser esterilizados utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) ou KOH (10%). Para utilizar o meio de forma sólida, adicionou-se 15 g de Agar e, como indicador para *H. seropedicae*, adicionou-se 3 vezes a concentração de azul de bromotimol.

### 3.3.4 Meio JNFb

O meio JNFb (Tabela 7) foi desenvolvido a partir do meio tradicional NFb, incorporando alterações em sua composição propostas pela pesquisadora Johanna Döbereiner (DÖBEREINER *et al.*, 1995).

Tabela 7: Composição do meio JNFb (DÖBEREINER *et al.*, 1995).

<i>Composto</i>	<i>Quantidade</i>
Ácido málico	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Solução de micronutrientes	2,0 mL
Azul de bromotimol	2,0 mL
FeEDTA	4,0 mL
Solução de vitaminas	1 mL
KOH	4,5 g

Os componentes foram dissolvidos em água destilada até completar 1,0 L, o pH do meio foi ajustado para 5,8 antes de ser esterilizado utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) ou KOH (10%). Para utilizar o meio de forma semi-sólida, adicionou-se 1,7 g de Agar. Em fermentações utilizando o JNFb na forma líquida, não foi adicionado o corante azul de bromotimol e Agar.

## 3.4 Fermentações em *shaker*

Inicialmente, os experimentos foram realizados em erlenmeyer, com condições de agitação e temperatura controladas em *shaker*. O preparo do inóculo utilizado nas fermentações e os ensaios de otimização do meio de cultura foram realizados em *shaker*.

### 3.4.1 Preparo do pré-inóculo para fermentações em *shaker*

Inoculou-se uma alíquota de 0,5 mL da solução em estoque de *H. Seropedicae* em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio DYGS modificado com as fontes de carbono tradicionais substituídas por glicerol, sendo então incubadas em *shaker* por 24 horas nas condições de 150 PRM e 35 °C de agitação e temperatura respectivamente.

### 3.4.2 Preparo do inóculo para fermentações em *shaker*

Verteu-se em erlenmeyer, com capacidade para 500 mL, contendo 50 mL do meio a ser fermentado, o conteúdo do tubo do pré-inóculo. O erlenmeyer foi então devidamente incubado em *shaker* em agitação de 150 RPM e temperatura de 35 °C pelo período de 24 h.

### 3.5 Fermentação em erlenmeyer

O conteúdo do inóculo preparado para a fermentação em *shaker* foi dividido de forma igualitária entre dois erlenmeyers de capacidade de 1000 mL contendo 250 mL do meio a ser fermentado. Os frascos foram levados ao *shaker* em agitação de 150 RPM e temperatura de 35 °C. Foi realizado o monitoramento dos parâmetros de crescimento até que não se observasse mais desenvolvimento celular.

#### 3.5.1 Parâmetros monitorados nas fermentações em *shaker*

Em cada fermentação em *shaker*, realizaram-se coletas de amostra para que os seguintes parâmetros fossem determinados:

- Crescimento de celular (DO 600 nm);
- Concentração celular (massa seca, g L<sup>-1</sup>).

### 3.6 Fermentações em biorreator

Para se obter uma melhor compreensão do crescimento celular e da produção de compostos indólicos em condições mais próximas das observadas industrialmente, foram realizadas fermentações em biorreator em escala de bancada.

#### 3.6.1 Biorreator

O biorreator utilizado foi da marca *Sartorius Stedium Biostat B-Blus Twin*, com capacidade de 2,0 L, para os ensaios em batelada, controle de agitação (RPM), de vazão de ar (LPM), de temperatura (°C), de oxigênio dissolvido (%  $pO_2$ ) e controle automático de pH por adição de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 3% (v/v) ou KOH a 5% (v/v).

O biorreator, filtros de ar e soluções de ácido e base foram esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos.

#### 3.6.2 Preparo do pré-inóculo para fermentações em biorreator

Em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio referente ao ensaio proposto pela DCCR 03, inoculou-se uma alíquota de 0,5 mL da solução em estoque de *H. seropedicae*, sendo então incubadas em *shaker* por 24 horas nas condições de 150 RPM e 35 °C de agitação e temperatura respectivamente.

#### 3.6.3 Preparo do inóculo para fermentações em biorreator

Em erlenmeyer, com capacidade para 500 mL, contendo 100 mL do meio a ser fermentado, verteu-se o pré-inóculo, que foi incubado em *shaker* sob agitação de 150 RPM e temperatura de 35 °C por 24 h.

#### 3.6.4 Inoculação e fermentação em biorreator

A inoculação do biorreator foi realizada utilizando o inóculo preparado em *shaker*, em que 100 mL de inóculo preparado em erlenmeyer, fermentado por 24 horas, foram adicionados ao biorreator contendo 2000 mL do meio a ser fermentado. Realizou-se coleta de



amostras para o controle dos parâmetros de crescimento celular, formação do produto e consumo do substrato. As amostras foram centrifugadas a 10000 PRM por 10 minutos, filtradas em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenadas em geladeira.

### 3.6.5 Parâmetros analisados nas fermentações em biorreator

As amostras coletadas durante a fermentação em biorreator foram utilizadas para a análise dos seguintes parâmetros:

- Crescimento celular (DO 600 nm);
- Concentração celular (Massa Seca,  $\text{g L}^{-1}$ );
- Concentração de compostos indólicos ( $\text{mg L}^{-1}$ );
- Consumo da fonte de carbono (glicerol,  $\text{g L}^{-1}$ ).

## 3.7 Esterilização do processo

Todas as etapas fermentativas foram conduzidas de forma asséptica, os meios de cultura, tanto em erlenmeyer quanto em biorreator, e os demais componentes do biorreator (filtros de ar, frasco com antiespumante e soluções controladoras de pH) foram esterilizados em autoclave nas condições de 2 atm e 121  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, de forma a garantir a assepsia do processo.

## 3.8 Métodos analíticos

### 3.8.1 Absorbância (Abs)

A absorbância foi determinada coletando uma alíquota do meio fermentado dos cultivos em *shaker* ou em biorreator, em que a amostra foi inserida em uma proveta com capacidade para 2 mL e sua absorbância determinada em espectrofotômetro de UV visível da *PG Instruments* modelo *T-60* no comprimento de onda de 600 nm. Utilizou-se como “branco” (referência) água destilada. A leitura foi realizada na faixa de 0,02 a 1,00 de absorbância. Quando extrapolado o limite de 1,00, diluía-se a amostra quantas vezes fossem necessárias.

### 3.8.2 Concentração celular mássica (X)

Para determinar a concentração celular mássica, utilizou-se a técnica do peso-seco, relacionando a absorbância com a concentração celular.

Inicialmente coletou-se a solução mãe, que foi dividida e diluída com água destilada nas proporções de 2/3, 1/2 e 1/3. A solução mãe e as diluições foram homogeneizadas e tiveram sua absorbância medida. Uma alíquota de 10 mL foi então filtrada em membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  previamente pesada.

As membranas juntamente com o filtrado foram secas em estufa a 65  $^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, após este período, transferiu-se o conjunto para um dessecador e, após 2 horas, realizou-se a pesagem. Verificando-se que o peso do conjunto mantinha-se constante, realizavam-se os cálculos.

Utilizando o *Microsoft Office Excel* (2010), relacionou-se a absorbância (Abs) com a respectiva concentração celular e realizou-se uma regressão linear, obtendo-se então a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Através do coeficiente angular ( $\alpha$ ), obteve-se a relação para o cálculo da concentração celular (X), conforme a equação (35):

$$X = Abs * \alpha \quad (35)$$

### 3.8.3 Quantificação dos compostos indólicos totais (P) pelo método do reagente de Salkowski

Preparou-se o reagente de Salkowski segundo o método proposto por Gordon & Weber (1951), realizando a substituição do  $\text{HClO}_4$  por  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . O reagente foi preparado adicionando-se uma alíquota de 1 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 M (1,35 g/10 mL) a 50 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (35%).

A curva de calibração foi construída utilizando concentrações crescentes de AIA (Vetec), onde alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram transferidas para micro placas de poliestireno de 96 poços com capacidade de 300  $\mu\text{L}$  por poço. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Salkowski. Colocou-se a placa em repouso de forma a não haver contato com a luz, após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente a intensidade da coloração foi avaliada em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 530 nm utilizando espectrofotômetro *Biochrom Anthos Zenyth 200st* (SARWAR & KREMER, 1995).

Para a quantificação dos compostos indólicos presentes nas amostras da fermentação, alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram transferidas em triplicata para micro placas de 96 poços com capacidade de 300  $\mu\text{L}$  por poço, em seguida foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Salkowski, sendo a micro placa armazenada e, após 30 minutos de reação no escuro, procedeu-se a leitura da absorvância no espectrofotômetro. Para cada análise de AIA em amostras de fermentação, buscando-se reduzir erros, preparou-se uma curva de calibração nas concentrações de 0,0  $\text{mg L}^{-1}$ , 5  $\text{mg L}^{-1}$ , 10,0  $\text{mg L}^{-1}$ , 15,0  $\text{mg L}^{-1}$ , 20,0  $\text{mg L}^{-1}$  e 40,0  $\text{mg L}^{-1}$  na mesma placa em que foram realizadas as leituras das amostras de fermentação.

### 3.8.4 Determinação da concentração do glicerol (S)

O glicerol foi quantificado utilizando um cromatográfico *Shimadzu* (*Shimadzu Corporation*, Japão) composto pelos seguintes módulos: bomba (modelo LC-10AD) e forno para coluna (modelo CTO-10AC) conectados em série com um detector de índice de refração (modelo RID-10A). A aquisição e o tratamento dos dados foram controlados pelo *software LC Solution* (*Shimadzu*, Japão). A condição cromatográfica aplicada nas análises foi: coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H, fase móvel consistindo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005  $\text{mol L}^{-1}$ , vazão de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$  e temperatura de 65°C.

Inicialmente construiu-se a curva de calibração analítica, prepararam-se padrões de glicerol (ACROS) nos níveis de concentração: 1, 3, 5 e 10  $\text{g L}^{-1}$ . As diferentes concentrações foram injetadas no cromatógrafo relacionando a área obtida com sua respectiva concentração.

As amostras de fermentação, devidamente centrifugadas e filtradas, foram injetadas no cromatógrafo na quantidade de 20  $\mu\text{L}$ , a área do pico obtido foi relacionada com a curva de calibração, obtendo-se então a concentração do glicerol para a determinada amostra.

## 3.9 Otimização do meio de cultura

Após a seleção do meio de cultura a ser utilizado no cultivo da *H. seropedicae*, estabeleceu-se uma sequência de experimentos visando à otimização e simplificação do meio a ser utilizado. O meio selecionado para realizar as fermentações foi o meio DYGS modificado, sendo um meio rico, complexo e que proporciona aos microrganismos um crescimento acelerado. Este meio de cultura é composto por três fontes de carbono (ácido

málico, ácido glutâmico e glicose), duas fontes de nitrogênio (peptona bacteriológica e extrato de levedura) e duas fontes de nutrientes ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

A simplificação do meio de cultura ocorreu em três etapas, à primeira consistindo de testes com diferentes fontes de carbono, a segunda destinada a otimização das concentrações das fontes de nitrogênio e nutrientes, onde se utilizou o aplicativo *Statistica for Windows* versão 10.0 para estabelecer as matrizes combinatórias experimentais DCCR01 e DCCR02, que consistem em diferentes variações das concentrações das fontes de nitrogênio e nutrientes presentes no meio DYGS modificado, tendo como variável resposta a biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ). A terceira etapa teve como objetivo aperfeiçoar a concentração da nova fonte de carbono.

### **3.9.1 Seleção da fonte de carbono**

Para a seleção da fonte de carbono, conduziram-se diferentes experimentos utilizando fontes distintas, onde as fontes originais do meio DYGS modificado, composto por glicose, ácido málico e ácido glutâmico, foram substituídos unicamente por glicerol, glicose ou ácido málico na mesma concentração do total das fontes de carbono originais do DYGS modificado.

### **3.9.2 Delineamento Composto Central Rotacional 01 (DCCR01) - Fontes de nitrogênio**

Para aprimorarem as fontes de nitrogênio, elaborou-se uma matriz experimental DCCR 2<sup>2</sup>, onde se realizou 10 experimentos com variações da peptona bacteriológica e extrato de levedura, sendo 4 combinações distintas, 2 combinações no ponto central e 4 nos pontos axiais.

### **3.9.3 Delineamento Composto Central Rotacional 02 (DCCR02) - Fontes de nutrientes**

Buscando aperfeiçoar as concentrações das fontes de nutrientes do meio DYGS, preparou-se uma matriz experimental DCCR 2<sup>2</sup> onde, de modo análogo ao DCCR 01, foram realizados 10 experimentos com variações do  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , sendo 4 combinações distintas, 2 combinações no ponto central e 4 nos pontos axiais.

### **3.9.4 Otimização da concentração da fonte de carbono**

Realizou-se a variação da concentração da fonte de carbono definida no item 3.9.1 propondo-se uma série de ensaios com concentrações de  $2,75 \text{ g L}^{-1}$ ,  $5,50 \text{ g L}^{-1}$ ,  $8,25 \text{ g L}^{-1}$ ,  $11,00 \text{ g L}^{-1}$  e  $13,75 \text{ g L}^{-1}$ , completando o meio de cultura com as concentrações das fontes de nitrogênio e nutrientes pré-estabelecidos anteriormente através das DCCR 01 e 02.

## **3.10 Aperfeiçoamentos das condições operacionais do biorreator**

Com o objetivo de otimizar as condições de agitação, aeração e temperatura para a fermentação de *H. seropedicae*, realizou-se uma série de experimentos em biorreator utilizando como meio de cultura o meio DYGS modificado com suas fontes de carbono tradicionais substituídas por glicerol na concentração de  $5,5 \text{ g L}^{-1}$ .

O tratamento dos dados se deu através do aplicativo *Statistica for Windows* versão 10.0, por meio do qual se estabeleceu a matriz combinatória experimental DCCR03.

### 3.10.1 Delineamento Composto Central Rotacional 03 (DCCR03) - Condições do biorreator

Para aperfeiçoarem as condições do processo de fermentação em biorreator, elaborou-se uma matriz experimental empregando um DCCR 2<sup>3</sup>, formado por 17 experimentos que consistem em variações da temperatura (°C), agitação (RPM) e aeração (LPM), apresentando 8 combinações distintas, 6 nos pontos axiais e 3 no ponto central tendo como variáveis respostas a produção de biomassa (g L<sup>-1</sup>) e produção de compostos indólicos (mg L<sup>-1</sup>).

## 3.11 Fermentações em condições otimizadas

Após o aperfeiçoamento do meio de cultura e das condições do processo em biorreator, realizou-se uma série de experimentos em condições otimizadas, utilizando o meio de cultura aperfeiçoado, fermentou-se em biorreator nas condições que proporcionaram maior produção de biomassa e maior produção de compostos indólicos.

### 3.11.1 Modelo matemático para o processo

Observou-se que a produção de células é inteiramente dependente de  $S$ , a produção do produto metabólico está relacionada com  $X$  e a velocidade do crescimento do microrganismo ( $\mu_X$ ), o consumo do substrato se dá para a produção de células e manutenção das células já existentes e a variação do oxigênio no meio de cultura esta relacionada à  $X$  e a velocidade de produção de células.

Logo, os modelos propostos para descrever as fermentações, considerando as características observadas deste bioprocessos, foram os modelos descritos por Monod (1949), Moser (1958), Contois & Fujimoto (1959), Andrews (1968), Levenspiel (1980) e Aiba & Shosa (1996) para a taxa de variação da biomassa, os modelos descritos por Luedeking & Piret (1959) para a taxa de consumo do substrato e taxa de formação de produto e o modelo de Ochota *et al.* (2009) para a taxa de consumo de oxigênio.

## 3.12 Estimação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_m$ ), os fatores de conversão de substrato em células ( $Y_{XS}$ ), de célula em produto ( $Y_{PX}$ ) e de substrato em produto ( $Y_{PS}$ ), foram calculados para a DCCR 01, DCCR02, DCCR 03 e para as fermentações em condições otimizadas conforme as equações propostas pelo item 2.4.3.

Os parâmetros cinéticos presentes nos modelos selecionados no item 3.11.1, para as fermentações em condições otimizadas são: limitação pelo substrato ( $K_S$ ); inibição pelo substrato ( $K_I$ ); coeficiente de formação do produto associado ao crescimento celular ( $\alpha$ ); coeficiente de formação do produto não associado ao crescimento celular ( $\beta$ ); coeficiente de manutenção pelo substrato ( $m_S$ ); coeficiente de transferência de oxigênio ao meio de cultura ( $K_L$ ); coeficiente de manutenção pelo oxigênio ( $m_{O_2}$ ); coeficiente de rendimento da biomassa pelo oxigênio ( $Y_{XO}$ ).

Os valores para cada parâmetro foram obtidos através de um algoritmo de regressão não linear fazendo uso das equações cinéticas do modelo matemático e dos dados experimentais obtidos durante as fermentações. As etapas de regressão e de simulação do processo foram realizadas no ambiente de programação científica MATLAB 4.2, versão do estudante.

### **3.12.1 Validação dos resultados**

Os resultados obtidos pelos modelos tiveram sua eficiência em descrever o processo experimental avaliada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) equação (30), pelo erro simples (ES) equação (31), pelo erro relativo percentual (ER%) equação (32), pelo desvio padrão residual (DPR) equação (33) e pelo percentual do desvio padrão residual (DPR%) equação (34).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Seleção do meio de cultura e fonte de carbono

Visando obter o melhor meio de cultura, de modo a alcançar as maiores concentrações de produção de biomassa e compostos indólicos, realizou-se uma série de experimentos para aperfeiçoar as suas fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes.

#### 4.1.1 Seleção do meio de cultura

A bactéria *H. seropedicae* tem, originalmente, como meio de cultura o meio semi seletivo JNFb. Entretanto, apesar deste meio fornecer boas condições para o desenvolvimento da bactéria, nota-se que não são alcançadas as condições ideais para que o máximo potencial de crescimento e produção de metabólitos seja atingido, proporcionando apenas um crescimento mais lento e limitado do microrganismo devido às concentrações não otimizadas de fonte de carbono, nitrogênio e nutrientes.

Como alternativa ao meio JNFb, existem diversos outros meios de cultura que fornecem de forma mais ampla os nutrientes necessários para o crescimento da bactéria. Selecionou-se como meio de cultura para *H. seropedicae* o meio *Dextrose Yeast Glucose Sucrose* modificado – DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986), que é reconhecidamente um meio mais rico e complexo, que pode fornecer um crescimento mais de maior velocidade.

#### 4.1.2 Seleção da fonte de carbono

Uma vez que o meio DYGS modificado apresenta três diferentes fontes de carbono, a bactéria pode apresentar preferência de consumo por determinada fonte, tornando complexas futuras análises do seu comportamento cinético de crescimento, além de tornar o meio mais oneroso e, eventualmente, inviável do ponto de vista industrial.

Visando substituir as três fontes de carbono inicialmente estabelecidas por uma única fonte, realizaram-se fermentações comparativas entre o meio DYGS, com as suas fontes tradicionais de carbono, e meios com fontes de carbono distintas, mas capazes de fornecer um bom desenvolvimento ao microrganismo. Apresenta-se na Figura 10 o estudo comparativo entre o crescimento da bactéria com o meio DYGS, com as fontes de carbono tradicionais, e outros meios com a substituição destas por uma única fonte. As fontes de carbono testadas para substituir as tradicionais foram o ácido málico, o glicerol e a glicose.

Como observado na Figura 10, a bactéria apresenta um rápido crescimento inicial no meio DYGS quando comparado às demais, apresentando crescimento celular máximo no tempo  $t = 10$  h com  $X = 1,6$  g L<sup>-1</sup>. Entretanto, com as fontes substituídas por glicerol e glicose, embora o crescimento inicial tenha sido menor, o crescimento máximo de células foi superior, quando comparado com o crescimento no meio DYGS. Para a glicose, a concentração celular máxima ocorreu no tempo  $t = 19$  h com  $X = 1,86$  g L<sup>-1</sup> e para o glicerol em  $t = 30$  h com  $X = 2,44$  g L<sup>-1</sup>.

Pode-se observar, através da Tabela 8, que as fontes tradicionais do meio DYGS fornecem  $\mu_m$  superior quando comparada às demais, entretanto o rendimento  $Y_{XS}$  fornecido é inferior a todas as demais fontes testadas, indicando limitação no crescimento celular e, talvez, inibições geradas pelas diversas fontes de carbono.

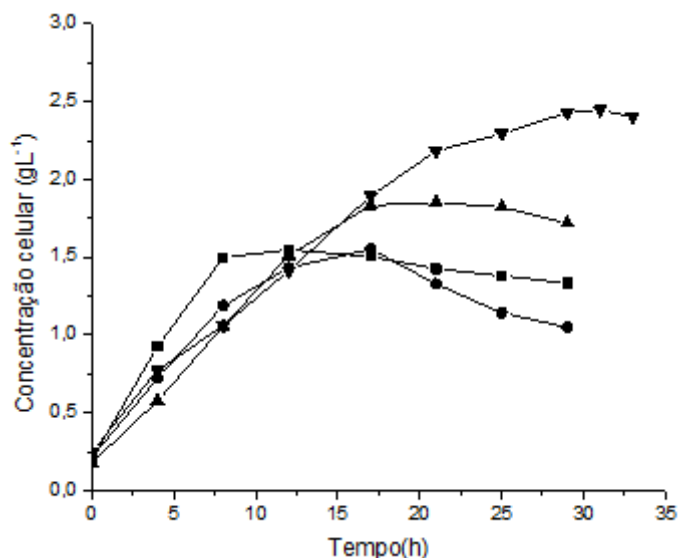


Figura 10: Crescimento comparativo da bactéria *H. seropedicae* em meio DYGS utilizando como fonte de carbono o ácido málico (●), glicose (▲), glicerol (▼) ou fontes de carbono do DYGS (■).

Tabela 8: Fator de rendimento ( $Y_{X/S}$ ) e velocidade exponencial máxima de crescimento ( $\mu_m$ ) para cada fonte de carbono testada em meio DYGS.

<i>Fonte de Carbono</i>	$Y_{X/S}$	$\mu_m$
DYGS	0,243	0,380
Glicerol	0,400	0,240
Glicose	0,304	0,291
Ácido málico	0,245	0,302

Fonte de carbono DYGS: Glicose, ácido málico e ácido glutâmico

O glicerol, por sua vez, apresenta  $\mu_m$  inferior às demais fontes testadas, mas o seu rendimento em biomassa é notoriamente superior, alcançando uma concentração de células em torno de 25% acima das demais.

O glicerol, além de proporcionar rendimento na produção de biomassa superior às fontes de carbono do DYGS, possui a vantagem de apresentar custo de aquisição inferior, pois, tem a sua origem proveniente de resíduos da fabricação de biodiesel (IMANDI *et al.*, 2006). A sua utilização em processos fermentativos oferece a vantagem adicional de proporcionar uma finalidade mais adequada para este resíduo. Dessa forma, o glicerol apresenta mais uma vantagem como substituto para as fontes de carbono tradicionalmente utilizadas em bioprocessos.

## 4.2 Otimização do meio de cultura

Visando o aperfeiçoamento do meio de cultura selecionado, utilizando o glicerol como fonte de carbono, realizou-se um DCCR envolvendo como variáveis independentes as fontes de nitrogênio (DCCR 01). Em um segundo DCCR (DCCR 02) utilizando as fontes de nutrientes como variáveis independentes e tendo como variável de resposta a biomassa

produzida, a concentração necessária de glicerol para obter a máxima produção de biomassa também foi otimizada. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir.

#### 4.2.1 DCCR 01: Concentração das fontes de nitrogênio

O DCCR 01 compreende os níveis das variáveis independentes peptona bacteriológica e extrato de levedura. Empregou-se um fatorial completo  $2^2$  no DCCR, contendo 2 blocos de ensaios, o primeiro com 4 ensaios distintos e 1 ensaio no ponto central e o segundo com 4 ensaios nos pontos axiais e 1 no ponto central, resultando em um número total de 10 ensaios.

Os valores utilizados para cada fator da matriz do DCCR 01 são apresentados na Tabela 9. Apresenta-se na Tabela 10 a matriz dos ensaios do DCCR 01 com os resultados obtidos para a variável biomassa e os respectivos rendimentos de células por biomassa  $Y_{X/S}$  em cada ensaio realizado.

Tabela 9: Valores utilizados no DCCR 01 para a peptona bacteriológica e extrato de levedura.

<i>Variáveis</i>	<b>-1,41</b>	<b>-1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,41</b>
Peptona Bacteriológica (g L <sup>-1</sup> )	0,44	0,75	1,50	2,25	2,56
Extrato de Levedura (g L <sup>-1</sup> )	0,59	1,00	2,00	3,00	3,41

Tabela 10: Matriz dos valores codificados utilizados no DCCR 01 e respostas obtidas para a biomassa (g L<sup>-1</sup>).

<i>Ensaio</i>	<i>Peptona</i> (g L <sup>-1</sup> )	<i>E. Levedura</i> (g L <sup>-1</sup> )	<i>Biomassa</i> (g L <sup>-1</sup> )	<i>Y<sub>X/S</sub></i> (g <sub>cel</sub> /g <sub>glicerol</sub> )
1	-1	-1	1,37	0,249
2	1	-1	1,64	0,298
3	-1	1	2,70	0,491
4	1	1	2,64	0,480
5	0	0	2,44	0,444
6	-1,41	0	2,48	0,451
7	1,41	0	2,38	0,433
8	0	-1,41	1,33	0,242
9	0	1,41	2,59	0,471
10	0	0	2,36	0,429

Os valores obtidos para os 10 ensaios do DCCR01 apresentam os resultados das fermentações da bactéria *H. seropedicae* para diferentes níveis das fontes de nitrogênio, onde os valores obtidos para a biomassa variaram de um mínimo de  $X = 1,37$  g L<sup>-1</sup> com rendimento  $Y_{X/S} = 0,249$  no Ensaio 1, sob as condições reduzidas de -1 e -1 para a peptona e extrato de levedura, respectivamente, até um máximo de  $X = 2,70$  g L<sup>-1</sup> e  $Y_{X/S} = 0,491$  no Ensaio 3 nos níveis de peptona e extrato de levedura de -1 e 1, respectivamente.

Os pontos centrais, ensaios 5 e 10, obtiveram produção de biomassa de  $X = 2,44$  e  $2,36$  g L<sup>-1</sup>. Essa proximidade representa boa reprodutibilidade dos ensaios realizados, trazendo maior confiabilidade no método empregado.



Observou-se nos ensaios 3 e 9 que o aumento da concentração do extrato de levedura trouxe um incremento na produção de biomassa, sendo superior aos pontos centrais, Ensaio 5 e 10, chegando a  $X = 2,70$  e  $2,59 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Nos ensaios 1, 2 e 8, onde o extrato de levedura foi reduzido, a produção de biomassa não ultrapassou  $X = 1,64 \text{ g L}^{-1}$ , mostrando o efeito positivo do aumento da concentração desta variável sobre a produção de biomassa.

Analisando o Ensaio 6, observa-se que, com a redução da peptona a produção de biomassa também é beneficiada. Já nos ensaios 2 e 7, onde houve um aumento da concentração da peptona, a produção de biomassa não apresentou aumento significativo, atingindo os valores de  $X = 1,64$  e  $2,38 \text{ g L}^{-1}$ , valores abaixo da produção obtida nos pontos centrais Ensaio 5 e 10.

O resultado obtido no Ensaio 3 representa um acréscimo de aproximadamente 12,5 % na produção de biomassa, com um fator de rendimento  $Y_{X/S} = 0,491$ , superior ao rendimento obtido nos pontos centrais, ensaios 5 e 10, cujos valores foram  $Y_{X/S} = 0,444$  e  $0,429$ . Este resultado indica que o aumento do extrato de levedura paralelamente à redução da peptona é uma excelente estratégia para elevar a produção de biomassa.

#### 4.2.2 Análise estatística para o DCCR01

Para se obter uma melhor compreensão dos resultados obtidos no DCCR01, realizou-se uma série de análises estatísticas, que são apresentadas a seguir.

##### 4.2.2.1 Diagrama de Pareto

O Diagrama de Pareto, com os efeitos estimados das variáveis independentes sobre a variável resposta biomassa, é apresentado na Figura 11. O grau de confiança utilizado foi de 95% e o valor de significância de  $p=0,05$ .

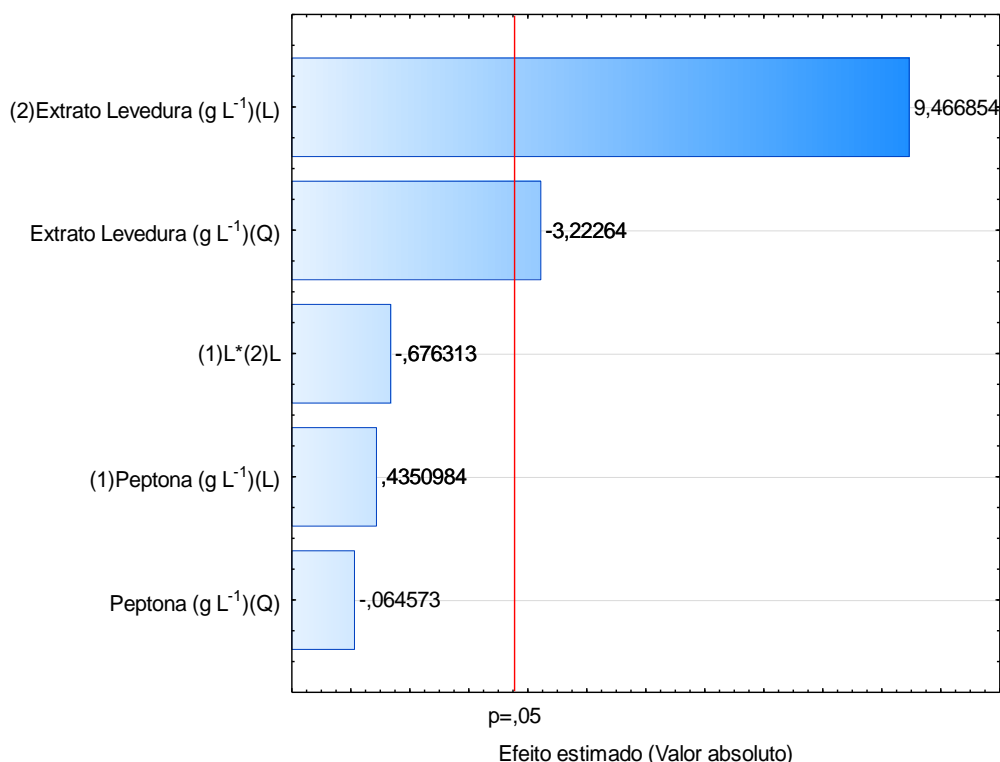


Figura 11: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta biomassa (DCCR 01).

O Diagrama de Pareto mostra um efeito estatístico significativo da variável extrato de levedura sobre a biomassa, tanto no termo linear quanto no quadrático, já a variável peptona não apresentou efeito significativo.

#### 4.2.2.2 Coeficientes de regressão e tabela ANOVA

Com o objetivo de obter uma equação que descreva o comportamento da biomassa frente aos efeitos das variáveis peptona e extrato de levedura, realizou-se a regressão dos dados obtidos através do DCCR01. O coeficiente de regressão obtido foi avaliado pelo erro padrão e pelos testes  $t(4)$  e  $p$ -valor, os resultados são expressos na Tabela 11.

Tabela 11: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes  $t(4)$  e  $p$ -valor para a variável resposta biomassa (DCCR 01).

<i>Variável</i>	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(4)</i>	<i>p-valor</i>
Média	2,398	0,111	21,470	>0,001
(1)Peptona (L)	0,024	0,111	0,435	0,685
Peptona (Q)	-0,004	0,147	-0,064	0,951
(2)Extrato Levedura (L)	0,529	0,111	9,466	>0,001
Extrato Levedura (Q)	-0,239	0,148	-3,222	0,032
(1)L*(2)L	-0,053	0,158	-0,676	0,535

$\alpha=0,05$   $t_{\text{tab}}=2,78$

Analisando a Tabela 11, pode-se verificar através dos testes  $t(4)$  e  $p$ -valor que, como já observado no Diagrama de Pareto, a variável com maior efeito sobre a biomassa é o extrato de levedura. Os valores significativos de  $t(4)$  são aqueles em módulo superiores ao  $t_{\text{tab}}$ , sendo 9,4 e -3,2 para o extrato de levedura em seu termo linear e quadrático, respectivamente. Esses termos também apresentaram um valor de  $p$  significativo, inferiores ao nível de significância de 0,05. A peptona não apresentou resultados consideráveis.

Através dos coeficientes de regressão obtidos na Tabela 11, pode-se construir um modelo matemático que expressa à variação da biomassa para diferentes faixas de concentrações de peptona e extrato de levedura. O modelo obtido é apresentado abaixo.

$$Biomassa = 2,398 + 0,529x_1 - 0,239x_1^2 \quad (36)$$

onde  $x_1$ = extrato de levedura.

Utilizando a equação (36), construiu-se um gráfico que relaciona os valores experimentais aos preditos, apresentados pela reta gerada pela equação. Como observado na Figura 12, a relação apresentada entre os valores preditos e experimentais é satisfatória, validando mais uma vez a equação (36).

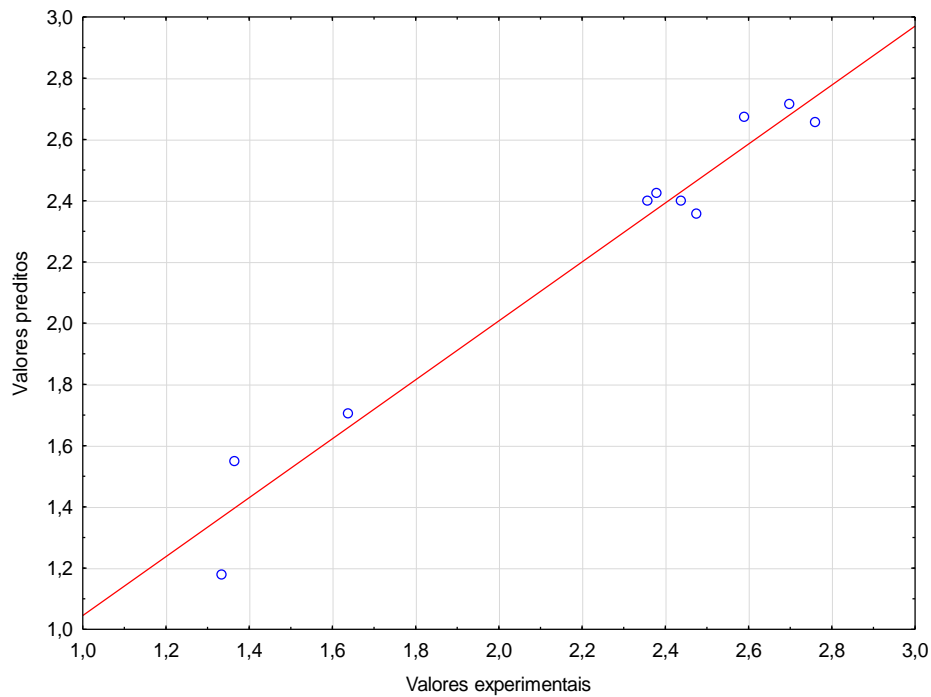


Figura 12: Valores preditos pela equação (36) versus valores experimentais.

Os valores obtidos pela ANOVA para os dados fornecidos pelo DCCR 01 são apresentados na Tabela 12. A análise de variância apresentou uma variação explicada ( $R^2$ ) altamente significativa, de 96,25 % e o valor do  $F_{Calculado}$  (20,55) foi superior ao  $F_{Tabelado}$  (4,05), confirmando a acurácia do modelo matemático proposto pelo equação (36) para a descrição do processo.

Tabela 12: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 01).

<i>Fator</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrado Médio</i>	$F_{Calc}$	$F_{Tab}$
Regressão	2,565	5	0,513	20,55	6,26
Resíduos	0,100	4	0,025		
Total	2,665	9			

$$R^2=0,9625 \quad F_{5, 4, 0.05}=6,26$$

#### 4.2.2.3 Superfície de resposta

Por fim, foi possível construir as superfícies de resposta e curvas de contorno da biomassa em função da peptona bacteriológica versus extrato de levedura, ilustradas na Figura 13.

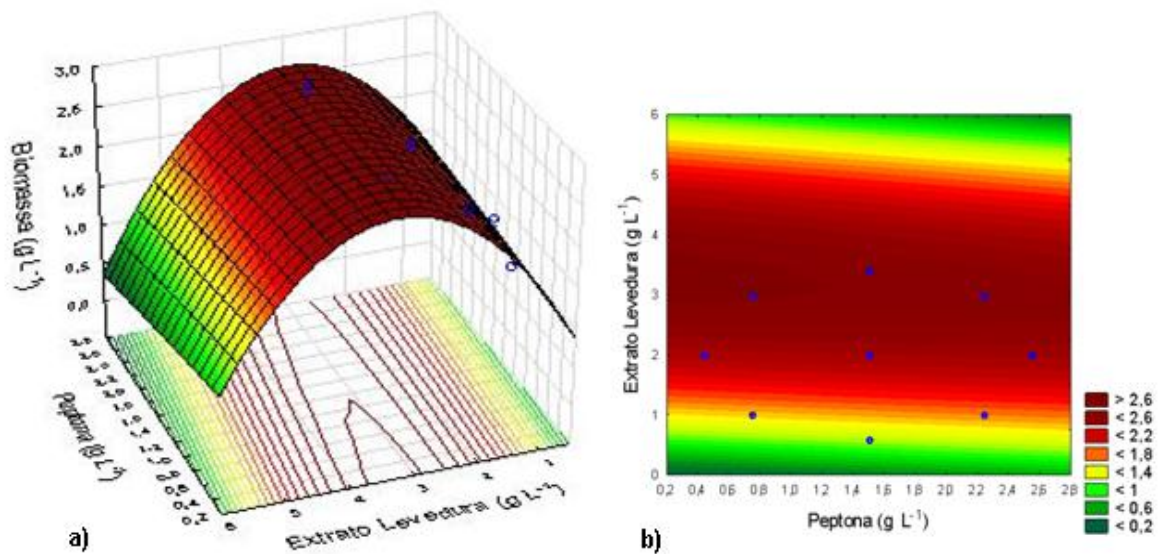


Figura 13: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a variável resposta biomassa em função da concentração da peptona versus extrato de levedura.

A análise da Figura 13 permite, mais uma vez, verificar a importância do extrato de levedura para a produção de biomassa, que apresentou a faixa ótima de produção entre 2,8 a 4,0 g L<sup>-1</sup>. Por sua vez, a peptona pouco influenciou a variável resposta, afetando-a ainda de forma negativa quando sua concentração esteve em patamares elevados, sugerindo a retirada da peptona do meio de cultura a ser utilizado para a produção de *H. seropedicae*.

Após a análise estatística realizada para o DCCR01, sugeriu-se a alteração das concentrações das fontes de nitrogênio do meio de cultura em otimização. As concentrações da peptona bacteriológica e do extrato de levedura, que originalmente eram de 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, foram alterados para 2,8 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e a peptona foi retirada do meio de cultura.

#### 4.2.3 DCCR02: Fontes de nutrientes

O DCCR 02 compreendeu as variáveis independentes fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), que são os sais utilizados como fontes de nutrientes no meio DYGS modificado, e como variável resposta a biomassa produzida. Os níveis utilizados para as variáveis independentes compreenderam os valores de suas concentrações na faixa de 0,25 a 0,85 g L<sup>-1</sup> para ambos os sais. Os demais componentes do meio de cultura foram o glicerol na concentração de 5,5 g L<sup>-1</sup> e o extrato de levedura com sua concentração otimizada pelo DCCR 01 de 2,8 g L<sup>-1</sup>.

De modo análogo ao DCCR 01, a técnica empregada no DCCR 02 foi a de um fatorial completo 2<sup>2</sup> apresentando 2 blocos, o primeiro com 4 ensaios distintos e 1 ensaio no ponto central e o segundo com 4 ensaios nos pontos axiais e 1 no ponto central, totalizando 10 ensaios. Os valores utilizados para cada fator na construção da matriz do DCCR 02 são apresentados na Tabela 13 e os resultados obtidos para a biomassa e o rendimento  $Y_{X/S}$ , bem como os níveis utilizados no DCCR 02, são apresentados na Tabela 14.

Tabela 13: Valores utilizados no DCCR 02 para os fatores  $K_2HPO_4$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

<i>Variáveis</i>	<b>-1,41</b>	<b>-1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,41</b>
$K_2HPO_4(g L^{-1})$	0,15	0,25	0,50	0,75	0,85
$MgSO_4 \cdot 7H_2O (g L^{-1})$	0,15	0,25	0,50	0,75	0,85

Tabela 14: Matriz dos valores codificados utilizados no DCCR 02 e respostas obtidas para a biomassa ( $g L^{-1}$ ).

<i>Ensaio</i>	$K_2HPO_4$ ( $g L^{-1}$ )	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ( $g L^{-1}$ )	<i>Biomassa</i> ( $g L^{-1}$ )	$Y_{X/S}$ ( $g_{cel}/g_{glicerol}$ )
1	-1	-1	2,75	0,500
2	1	-1	2,72	0,495
3	-1	1	2,83	0,514
4	1	1	2,59	0,471
5	0	0	3,02	0,550
6	-1,41	0	2,67	0,552
7	1,41	0	2,60	0,485
8	0	-1,41	2,72	0,473
9	0	1,41	2,82	0,495
10	0	0	3,03	0,513

Os resultados obtidos para as fermentações com *H. seropedicae* com as diferentes variações dos sais e fontes de nutrientes são apresentados no DCCR 02. Os valores observados durante as 10 fermentações variaram de um mínimo de  $X = 2,59 g L^{-1}$  e  $Y_{X/S} = 0,471$  em condições elevadas para ambos os sais nos níveis de +1 e +1, até um máximo de concentração de células superior a  $X = 3,00 g L^{-1}$  e  $Y_{X/S} = 0,55$ , alcançados nos ensaios 5 e 10 realizados nos níveis de concentração central para ambos os sais.

Observou-se nos pontos centrais os maiores valores de biomassa para a DCCR, onde, se obteve  $X = 3,02$  e  $3,04 g L^{-1}$ , para os ensaios 5 e 10 respectivamente. Outro fator importante a ressaltar foi à boa reprodutibilidade entre os pontos centrais, tornando evidente a confiabilidade no método empregado.

Os ensaios 4, 6 e 7 apresentaram uma concentração de células inferior aos demais ensaios, não alcançando concentrações superiores à  $X = 2,67 g L^{-1}$  e rendimentos abaixo de  $Y_{X/S} = 0,485$ . Analisando os níveis de sais utilizados, observou-se que para o Ensaio 4, nos níveis +1 e +1, a concentração dos sais foi elevada, o que pode ter proporcionado prejuízos ao desenvolvimento celular. Os ensaios 6 e 7 apresentaram níveis de concentração de sais na faixa de -1,41 e +1,41 para o  $K_2HPO_4$  e nos pontos centrais para o  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , indicando a baixa funcionalidade de trabalhar-se nas condições axiais do  $K_2HPO_4$ .

Para os ensaios 1, 2, 3, 8 e 9 os resultados de biomassa variaram de  $X = 2,72$  a  $2,83 g L^{-1}$ , indicando uma baixa variação de biomassa em diferentes concentrações de sais, tanto com o aumento quanto a diminuição da concentração do  $K_2HPO_4$  ou  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  o resultado se manteve dentro desta faixa, com exceção dos ensaios descritos anteriormente, mostrando uma ampla faixa ótima de condições operacionais.

Comparando a maior concentração celular obtida no DCCR 01 (Ensaio 3), que apresentou um  $X = 2,70 g L^{-1}$  e  $Y_{X/S} = 0,491$ , com o DCCR 02, que apresentou um ponto máximo de concentração de células de  $X = 3,04 g L^{-1}$  e  $Y_{X/S} = 0,513$  no Ensaio 10, pode-se observar um incremento em torno de 12,0 % na produção de células.

#### 4.2.4 Análise estatística para o DCCR 02

Para discutir de forma mais aprofundada os resultados obtidos no DCCR 02, realizou-se análises estatísticas sobre os dados obtidos, os resultados são apresentadas a seguir.

##### 4.2.4.1 Diagrama de Pareto

O Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis independentes,  $K_2HPO_4$  ou  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , sobre a variável resposta (biomassa) é apresentado na Figura 14. O grau de confiança utilizado é de 95 % e o valor de significância de  $p=0,05$ .

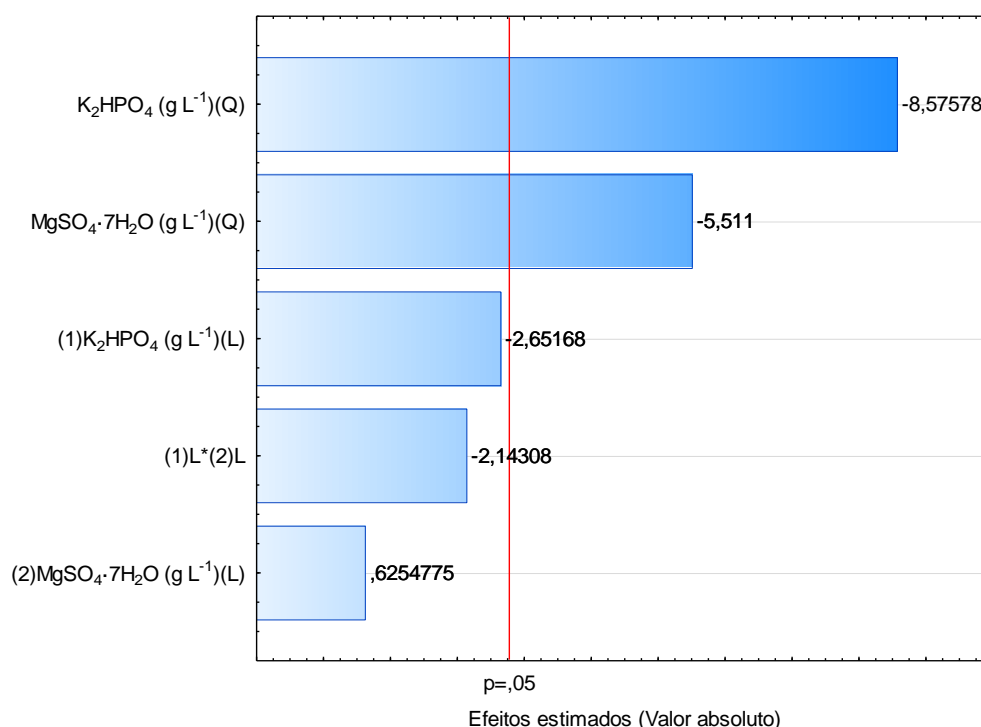


Figura 14: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes do DCCR 02.

O Diagrama de Pareto mostra um efeito estatístico significativo da variável  $K_2HPO_4$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  com seus termos quadráticos sobre a biomassa. Desta forma, pode-se observar que ambos os sais apresentam influência significativa sobre a produção de biomassa.

##### 4.2.4.2 Coeficientes de regressão e tabela ANOVA

Realizou-se a regressão dos dados obtidos a partir dos experimentos do DCCR02, obtendo-se os coeficientes de regressão, o desvio padrão da amostra, o  $t(4)$  e  $p$ -valor para cada provável efeito, sendo os resultados obtidos expressos na Tabela 15.

Tabela 15: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes  $t(7)$  e  $p$ -valor para a variável resposta biomassa (DCCR 02).

<i>Variável</i>	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(4)</i>	<i>p-valor</i>
Média	3,029	0,034	89,422	>0,001
(1)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )(L)	-0,045	0,017	-2,652	0,057
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )(Q)	-0,195	0,023	-8,576	0,001
(2)MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g L <sup>-1</sup> )(L)	0,011	0,017	0,625	0,566
MgSO <sub>4</sub> (g L <sup>-1</sup> )(Q)	-0,125	0,023	-5,511	0,005
(1)L * (2)L	-0,051	0,024	-2,143	0,099

$\alpha=0,05$   $t_{\text{tabelado}}=2,78$

Analisando a Tabela 15, pode-se observar através dos testes  $t(4)$  e  $p$ -valor, que as variáveis K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O apresentaram efeitos significativos na sua forma quadrática. Os valores de  $t(4)$  significativos são superiores ao  $t_{\text{tabelado}}$  (2,78) e os valores de  $p$  significativos são os inferiores à significância de 0,05, salientando a importância que o K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e o MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O apresentam sobre a produção de biomassa.

Através dos coeficientes de regressão considerados significativos pelos testes  $t(4)$  e  $p$ -valor, construiu-se um modelo matemático capaz de expressar a variação da biomassa em diferentes faixas de concentrações de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e o MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O o modelo é apresentado na equação abaixo.

$$Biomassa = 3,029 - 1,95x_1^2 - 0,125x_2^2 \quad (37)$$

Onde  $x_1 = \text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $x_2 = \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Através da equação (37), construiu-se um gráfico relacionando os valores experimentais com os valores fornecidos pelo modelo, onde observa-se no gráfico resultante apresentado na Figura 15, a proximidade dos dados experimentais aos do modelo.

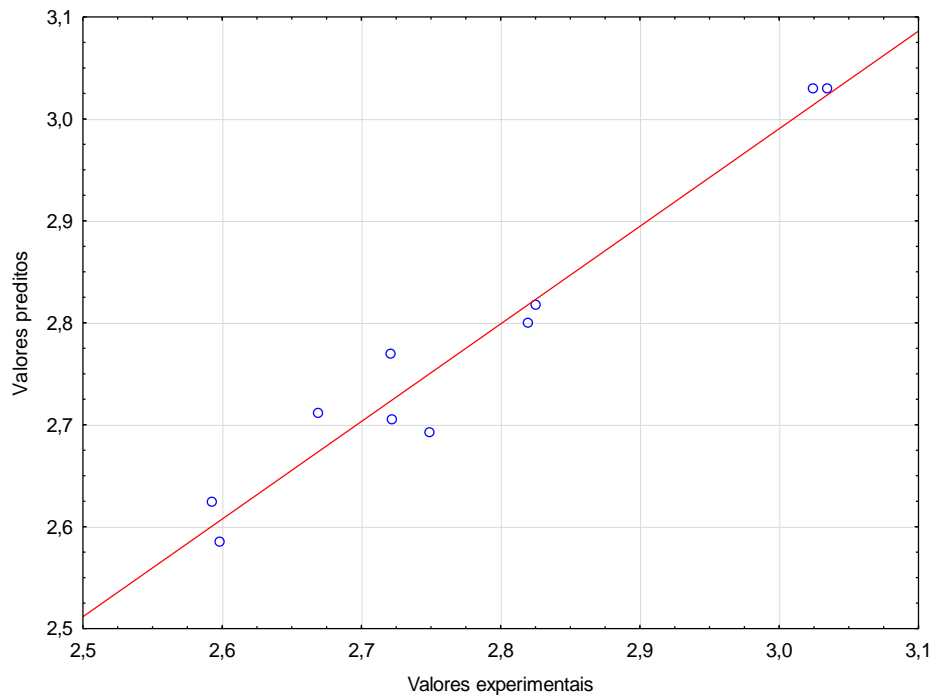


Figura 15: Valores preditos pela equação (37) versus valores experimentais.

Pode-se observar a boa relação entre os valores experimentais e preditos pelo modelo através da Figura 15. Tal relação permite concluir que a equação (37) é válida para descrever o comportamento da biomassa dentro da faixa estudada de  $K_2HPO_4$  e o  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

Os resultados obtidos através da ANOVA para os dados fornecidos pelo DCCR 02 são apresentados na Tabela 16. A variação explicada da análise de variância foi de 95,74 % e o valor do  $F_{Calculado}$  (18,00) foi superior ao  $F_{Tabelado}$  (6,26), comprovando a validade do modelo matemático proposto pela equação (37) e concluindo que este apresenta um bom ajuste para os dados experimentais.

Tabela 16: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 02).

<i>Fator</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrado Médio</i>	$F_{Calc}$	$F_{Tab}$
Regressão	0,207	5	0,041	18,00	6,26
Resíduos	0,009	4	0,002		
Total	0,216	9			

$$R^2=0,9574 \quad F_{5, 4, 0.05}=6,26$$

#### 4.2.4.3 Superfície de reposta

Para observar melhor o desenvolvimento da biomassa para diferentes valores de  $K_2HPO_4$  e o  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , construiu-se através dos dados fornecidos pelo DCCR 02 uma superfície de resposta e curva de contorno da biomassa em função dos sais, que estão ilustradas na Figura 16.



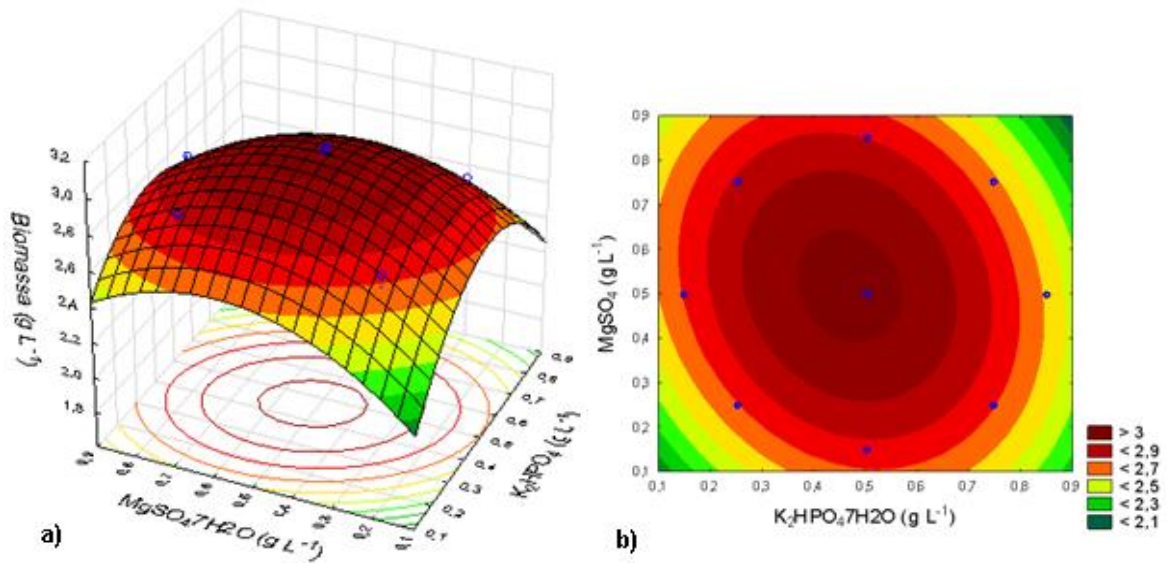


Figura 16: Superfícies de resposta (a) e curva de contorno (b) para a variável resposta biomassa em função da concentração do  $K_2HPO_4$  versus  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

Analisando a Figura 16, observa-se uma possível faixa de trabalho onde a concentração celular ultrapassou  $X = 3,00 \text{ g L}^{-1}$ . Esta faixa foi observada onde a concentração de  $K_2HPO_4$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  estiveram entre 0,4 a 0,6  $\text{g L}^{-1}$ , aproximadamente. Foram observados valores reduzidos de produção celular em pontos axiais onde, o  $K_2HPO_4$  ou o  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  estiveram altamente reduzidos ou elevados.

Analisando os dados estatísticos obtidos do DCCR 02, foi possível observar a melhor faixa de trabalho possível para os sais de nutrientes e observou-se a necessidade e a importância de ambos os sais. É possível obter-se bons resultados de produção celular em uma faixa de concentração de 0,4 a 0,6  $\text{g L}^{-1}$  para ambos os sais, de modo que foi sugerido que a concentração original de 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de  $K_2HPO_4$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  fosse mantida, juntamente com 2,8  $\text{g L}^{-1}$  de extrato de levedura e a exclusão da peptona bacteriológica sugeridos após a execução do DCCR 01.

#### 4.2.5 Otimização da fonte de carbono

A fim de maximizar a produção de células, realizou-se a variação da concentração da fonte de carbono (glicerol) através de uma série de ensaios com concentrações de glicerol em 2,75  $\text{g L}^{-1}$ , 5,50  $\text{g L}^{-1}$ , 8,25  $\text{g L}^{-1}$ , 11,00  $\text{g L}^{-1}$  e 13,75  $\text{g L}^{-1}$ , completando o meio de cultura com 2,8  $\text{g L}^{-1}$  de extrato de levedura, 0,5  $\text{g L}^{-1}$  de  $K_2HPO_4$  e 0,5  $\text{g L}^{-1}$   $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , valores pré-estabelecidos anteriormente através dos DCCR 01 e 02.

Os resultados obtidos através da série de experimentos propostos são apresentados na Figura 17. Pode-se perceber que com a redução do glicerol para 2,75  $\text{g L}^{-1}$ , o rendimento obtido foi o maior entre os ensaios, alcançando  $Y_{XS} = 0,518$ , embora a produção de biomassa tenha atingido apenas  $X = 1,587 \text{ g L}^{-1}$ . Já para os demais ensaios, as concentrações alcançadas foram de  $X = 2,989 \text{ g L}^{-1}$  e  $Y_{XS} = 0,495$  para 5,50  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol;  $X = 2,802 \text{ g L}^{-1}$  e  $Y_{XS} = 0,315$  para 8,25  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol;  $X = 2,578 \text{ g L}^{-1}$  e  $Y_{XS} = 0,215$  para 11,00  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol e  $X = 2,544 \text{ g L}^{-1}$  e  $Y_{XS} = 0,172$  para 13,75  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol.

O melhor resultado observado foi para a produção de biomassa na concentração de 5,50  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol, onde o rendimento obtido esteve próximo ao maior resultado observado nos ensaios, com 2,75  $\text{g L}^{-1}$ . Logo, visando a máxima produção de biomassa, sugeriu-se que a concentração de glicerol fosse mantida no patamar de 5,50  $\text{g L}^{-1}$ .

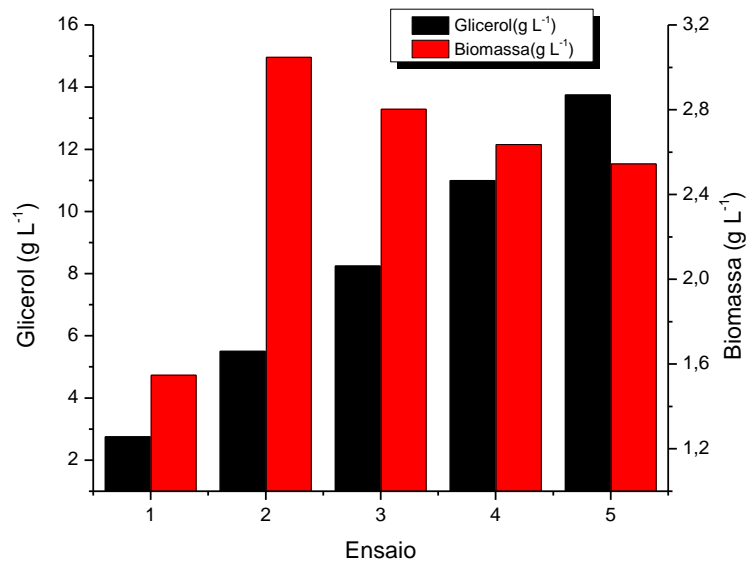


Figura 17: Resultados obtidos para a otimização da concentração da fonte de carbono.

#### 4.2.6 Meio de cultura otimizado

O meio de cultura otimizado para a produção de *H. seropedicae* a partir do meio tradicional DYGS modificado com as novas concentrações para cada componente é apresentado na Tabela 17.

Tabela 17: Meio de cultura otimizado para a produção de biomassa pela bactéria *H. seropedicae*.

Composto	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Glicose	0,0 g
Ácido glutâmico	0,0 g
Ácido málico	0,0 g
Peptona bacteriológica	0,0 g
Extrato de levedura	2,8 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Glicerol	5,5 g

Observou-se que o meio de cultura otimizado apresentou uma capacidade de produção em células de *H. seropedicae* de  $X = 3,05 \text{ g L}^{-1}$  e rendimento de  $Y_{X/S} = 0,495 \text{ g/g}$ , superior aos resultados obtidos preliminarmente com o DYGS, de  $X = 1,55 \text{ g L}^{-1}$  com um rendimento de  $Y_{X/S} = 0,243 \text{ g/g}$ . O ganho em biomassa com a nova formulação do meio de cultura representa um acréscimo em torno de 93% na produção e mais do que o dobro do rendimento em biomassa. Além do benefício da maior produção de células, a nova formulação do meio de cultura foi reduzida a apenas quatro componentes, tornando-o mais simples com menor custo, pois não estarão presentes em sua formulação o ácido málico, o ácido glutâmico, a glicose e a peptona bacteriológica, que são reagentes de alto valor comercial.

#### 4.2.7 Análise de custo

Com o intuito de avaliar os custos de cada meio produzido durante os DCCR's e comparar o valor agregado final do meio otimizado com o meio DYGS modificado tradicionalmente utilizado, realizou-se a análise de custo dos componentes de cada meio utilizado.

Através da cotação das matérias-primas apresentadas na Tabela 18, observou-se que se destacam como componentes de maior valor agregado o ácido málico, o extrato de levedura e a peptona bacteriológica, com preços em R\$/g de 0,208, 0,420 e 0,760, respectivamente. Todos esses componentes estão presentes no meio DYGS tradicional, tornando este meio bastante oneroso.

Com as simplificações propostas para a otimização do meio de cultura, foi possível simplificá-lo a um número menor de componentes e retirar as fontes de carbono (ácidos glutâmico e málico) e substituí-los apenas por glicerol (glicerina), que apresenta um custo reduzido de apenas 0,021 R\$/g. Além da redução das fontes de carbono, foi possível excluir a peptona bacteriológica que também apresenta elevado valor de compra.

Tabela 18: Cotação de matérias-primas utilizadas na produção dos meios de cultura. Cotação realizada pela Embrapa Agrobiologia – CNPAB 2014.

<i>Reagentes</i>	<i>Conteúdo da Embalagem (g)</i>	<i>Preço (R\$)</i>	<i>Preço (R\$/g)</i>
Ácido málico	250	52,00	0,208
Ácido glutâmico	500	49,90	0,100
Glicerina	630*	13,28	0,021
Glicose	500	19,99	0,040
Extrato de levedura	500	210,00	0,420
Peptona bacteriológica	500	379,90	0,760
Fosfato de potássio dibásico	500	36,30	0,073
Sulfato de magnésio	500	11,00	0,022

\*Embalagem com 1000 ml de glicerina

Através dos valores do meio DYGS com as alterações das fontes de carbono apresentados na Tabela 19, é possível verificar que o meio DYGS tradicional apresenta custos por litro de meio de cultura e por gramas de biomassa de R\$ 2,67 e R\$ 1,67, respectivamente. Entretanto, quando substituídas as três fontes de carbono originais por glicerol, é possível reduzir o custo do meio à R\$ 2,14 e o custo por grama de biomassa cai para R\$ 0,88, resultando em uma economia de 19,85 % no custo do meio e de 47,30 % no custo final por grama de biomassa.

A partir da Tabela 19, também é possível verificar através dos DCCR 01 a possibilidade de redução de custos com matéria-prima e o aumento da produção com a redução da concentração da peptona bacteriológica, obtendo-se um custo reduzido a R\$ 0,54 por grama de células no ensaio 6.

O DCCR 02 ocorreu sem a adição de peptona bacteriológica e com o aumento do extrato de levedura para a concentração de 2,80 g L<sup>-1</sup>, com estas estratégias observou-se a possibilidade de alcançar um custo celular de R\$ 0,44 por grama e um meio de cultura em custo de R\$ 1,34 por litro nos ensaios 5 e 10. Estes valores significam uma redução de 49,81 % no custo do meio de cultura e 73,65 % no custo por grama da biomassa, quando comparados ao meio DYGS tradicional.

O meio de cultura otimizado apresenta a composição dos ensaios 5 e 10 que ocorreram em condições centrais do DCCR 02. Estes ensaios apresentaram uma capacidade superior de produção de células quando comparados ao meio DYGS tradicional, além de serem meios mais simples, com custos de meio e biomassa inferiores ao DYGS tradicional. Logo, o custo do meio de cultura e de células para o meio otimizado é de R\$ 1,34 L<sup>-1</sup> e R\$ 0,44 g<sub>cel</sub><sup>-1</sup>, respectivamente. A redução de componentes, de 7 para apenas 4, e a maior capacidade produtiva, tornam o meio otimizado mais viável do que o DYGS tradicional.

Tabela 19: Custo de produção do meio de cultura e custo por células para os ensaios de otimização da fonte de carbono e DCCR 01 e 02.

<i>Meio de Cultura</i>	<i>Produção (g<sub>cel</sub>/L)</i>	<i>Custo Meio (R\$/L)</i>	<i>Custo Células (R\$/g<sub>cel</sub>)</i>	<i>Meio de Cultura</i>	<i>Produção (g<sub>cel</sub>/L)</i>	<i>Custo Meio (R\$/L)</i>	<i>Custo Células (R\$/g<sub>cel</sub>)</i>
DYGS	Tradicional	1,60	2,67	DYGS	Glicose	1,86	1,21
	A. málico	1,61	3,17		Glicerol	2,44	0,88
DCCR 01 Ensaio	1	1,37	0,84	DCCR 02 Ensaio	1	2,75	0,48
	2	1,64	1,40		2	2,72	0,50
	3	2,70	0,74		3	2,83	0,47
	4	2,64	1,19		4	2,59	0,53
	5	2,44	0,88		5	3,02	0,44
	6	2,48	0,54		6	2,67	0,49
	7	2,38	1,24		7	2,6	0,53
	8	1,33	1,17		8	2,72	0,49
	9	2,59	1,06		9	2,82	0,48
	10	2,36	0,91		10	3,04	0,44

### 4.3 Aperfeiçoamento das condições de fermentação em biorreator

Com o objetivo de aperfeiçoar as condições que afetam a produção de biomassa e compostos indólicos em biorreator, realizou-se um “Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR” envolvendo como variáveis independentes, a temperatura (°C), a agitação (RPM) e a aeração (LPM), e tendo como variáveis dependentes (resposta) a biomassa produzida ( $\text{g L}^{-1}$ ) e os compostos indólicos totais metabolizados ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Os experimentos foram realizados paralelamente à otimização do meio de cultura, e o meio utilizado para o DCCR03 foi o DYGS modificado substituído das fontes de carbono tradicionais por  $5,5 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol. Esta substituição se deu em virtude do ótimo desempenho observado do glicerol como fonte de carbono e devido à maior praticidade na quantificação do seu consumo.

#### 4.3.1 DCCR 03: Condições de fermentação em biorreator

O DCCR realizado compreendeu os níveis das variáveis independentes nas faixas de 28 e 42°C para a temperatura, de 75 a 225 RPM para a agitação e de 1 a 7 LPM de volume ar introduzido no fermentador.

Empregou-se um fatorial completo  $2^3$  no DCCR, contendo 3 blocos de ensaio, o primeiro e o segundo bloco com 4 ensaios distintos e 1 ensaio no ponto central cada, e o terceiro com 6 ensaios nos pontos axiais e 1 no ponto central, resultando em um número total de 17 ensaios. As variáveis respostas analisadas para esta etapa do trabalho foram a concentração de biomassa gerada ( $\text{g L}^{-1}$ ) e a concentração de compostos indólicos metabolizados ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Os valores utilizados para cada fator na matriz do DCCR são apresentados na Tabela 20 e a matriz dos ensaios do DCCR e os valores de concentração de biomassa e indólicos obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 20: Valores utilizados no DCCR 03 para os fatores temperatura, agitação e aeração.

<i>Variáveis</i>	<b>-1,68</b>	<b>-1,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,68</b>
Temperatura (°C)	28	30,8	35	39,2	42
Agitação (RPM)	75	105,4	150	194,6	225
Aeração (LPM)	1	2,2	4	5,8	7

Tabela 21: Matriz dos valores codificados utilizados no DCCR 3 e respostas obtidas para a biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) e compostos indólicos ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

<i>Ensaio</i>	<i>Tempo de fermentação (h)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Agitação (RPM)</i>	<i>Aeração (LPM)</i>	<i>Biomassa (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</i>	<i>Comp. Indólicos (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</i>	$\mu_m(\text{h}^{-1})$	$Y_{X/S}$ ( $\text{g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ )	$Y_{P/X}$ ( $\text{mg}_{\text{produto}}/\text{g}_{\text{cel}}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{mg}_{\text{produto}}/\text{g}_{\text{cel}}$ )
1	30	-1	-1	-1	2,541	11,760	0,262	0,443	<b>4,759</b>	<b>2,107</b>
2	25	-1	-1	1	2,078	4,782	0,285	0,350	1,789	0,626
3	28	-1	1	-1	2,583	11,970	0,287	0,452	4,423	2,000
4	26	-1	1	1	2,393	5,390	0,286	0,422	1,946	0,820
<b>5</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,140</b>	<b>11,770</b>	<b>0,372</b>	<b>0,548</b>	<b>3,441</b>	<b>1,884</b>
6	24	1	-1	-1	3,171	11,152	0,349	0,533	3,354	1,788
7	26	1	-1	1	2,488	9,860	0,386	0,429	3,827	1,643
8	23	1	1	-1	3,344	9,940	0,419	<b>0,583</b>	2,848	1,659
9	20	1	1	1	3,192	7,390	0,431	0,546	2,185	1,193
<b>10</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,153</b>	<b>11,464</b>	<b>0,396</b>	<b>0,539</b>	<b>3,225</b>	<b>1,737</b>
11	24	-1,68	0	0	2,068	5,629	0,216	0,464	2,500	1,160
12	31	+1,68	0	0	1,895	8,670	0,250	<b>1,143</b>	<b>4,458</b>	<b>5,094</b>
13	23	0	-1,68	0	2,735	9,990	0,333	0,469	3,303	1,550
14	20	0	+1,68	0	3,139	11,310	0,374	0,531	3,548	1,885
15	34	0	0	-1,68	3,148	8,701	0,378	0,540	2,521	1,362
16	20	0	0	+1,68	2,470	3,114	0,400	0,429	1,036	0,444
<b>17</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3,142</b>	<b>11,630</b>	<b>0,396</b>	<b>0,542</b>	<b>3,480</b>	<b>1,887</b>

A Tabela 21 apresenta os pontos máximos obtidos experimentalmente para a biomassa e AIA. Os valores utilizados para os compostos indólicos são provenientes na média dos três maiores pontos observados durante a fermentação. Este procedimento foi adotado para reduzir os erros experimentais e favorecer os ensaios que fornecessem resultados com maior acúmulo de compostos indólicos e não apenas os picos de produção.

Analisando os resultados obtidos para a biomassa e compostos indólicos presentes na matriz de dados apresentados na Tabela 21, observa-se que a amplitude de variação da biomassa esteve dentro da faixa de  $X = 1,89$  a  $3,34 \text{ g L}^{-1}$  nos ensaios 12 e 8, respectivamente, e para os compostos indólicos os resultados estiveram na faixa de  $P = 3,11 \text{ mg L}^{-1}$  no ensaio 16 até  $P = 11,97 \text{ mg L}^{-1}$  no ensaio 3.

Para a biomassa, os resultados de menor valor ocorreram com a temperatura nos níveis axiais de  $-1,68$  e  $+1,68$ , ou seja, com  $28$  e  $42^\circ\text{C}$ , respectivamente. Com a aeração e agitação em seus pontos centrais, os baixos resultados de produção indicam que a bactéria apresenta dificuldades de sobreviver e se desenvolver em condições axiais positivas ou negativas de temperaturas (ensaios 11 e 12), não ultrapassando a concentração celular de  $X=2,07 \text{ g L}^{-1}$ . Os rendimentos observados para o ensaio 12 apresentaram altos níveis, pois o substrato fornecido não foi consumido totalmente, mesmo com os elevados rendimentos, as produções observadas de biomassa e de produto ficaram em patamares reduzidos, desaconselhando o uso de temperaturas próximas a  $42^\circ\text{C}$ .

Já em condições de temperatura nos pontos centrais ou em  $+1$ , com condições que favoreçam a dissolução do oxigênio (ensaios 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15 e 17), a produção de biomassa foi superior a  $X=3,13 \text{ g L}^{-1}$ , com rendimentos de biomassa por substrato variando de  $Y_{X/S} = 0,531$  a  $0,580 \text{ g/g}$ . O máximo de produção de biomassa foi observado em condições de temperatura e agitação no nível  $+1$  e aeração reduzida em  $-1$  (ensaio 8), garantindo uma boa dissolução do oxigênio e proporcionando a minimização de possíveis efeitos inibitórios causados pela oxigenação excessiva.

Observou-se que a produção de compostos indólicos é prejudicada pelo aumento da aeração, como visto nos ensaios 2, 4, e 16, onde a aeração ocorreu com o volume nos níveis de  $+1$  e  $+1,68$ , ou com temperatura muito baixa (nível  $-1,68$ ) como visto no ensaio 11, não ultrapassando  $P = 5,63 \text{ mg L}^{-1}$ . Os resultados para a produção de compostos indólicos nos ensaios 1, 3, 5, 6, 10, 14 e 17 apresentaram patamares elevados e não inferiores a  $P = 11,15 \text{ mg L}^{-1}$ , com rendimento de produto por células variando de  $Y_{P/X} = 3,225$  a  $4,759 \text{ mg/g}$  e de produto por biomassa variando de  $Y_{P/S} = 1,737$  a  $2,107 \text{ mg/g}$ . Esses resultados coincidem com aqueles de temperatura em níveis centrais ou  $-1$  e agitações nos níveis  $0$ ,  $+1$  e  $+1,68$ , mostrando que em condições com pouca oxigenação, ou seja, com pouca introdução de oxigênio e maior agitação, a produção do produto metabólico será favorecida.

Os pontos centrais (ensaios 5, 10 e 17) apresentaram notória repetibilidade e elevada produção, tanto para biomassa quanto compostos indólicos.

#### 4.3.2 Ensaios fermentativos em biorreator

Para uma melhor compreensão dos dados obtidos durante as fermentações propostas pelo DCCR 03, apresentaram-se graficamente os dados dos ensaios realizados juntamente com uma análise do comportamento do crescimento da concentração da biomassa ( $X$ ), produção de compostos indólicos ( $P$ ), consumo do glicerol ( $S$ ) e potencial de oxigênio dissolvido ( $pO_2$ ). Os ensaios foram divididos em bloco 1, ensaios 1, 2, 3 e 4; bloco 2 ensaios 6, 7, 8 e 9; bloco 3, ensaios 11, 12, 13, 14, 15 e 16; e pontos centrais, ensaios 5, 10 e 17.

Os resultados obtidos nas fermentações utilizando as condições dos ensaios 1 e 2 são apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente. A diferença nas condições fermentativas está nos níveis de aeração, onde no ensaio 1 usou-se o nível  $-1$  ( $2,2 \text{ LPM}$ ) e no ensaio 2 o



nível +1 (5,8 LPM). A temperatura e a agitação de ambos os ensaios estão nos níveis -1, ou seja, 30,8 °C e 105,4 RPM, respectivamente.

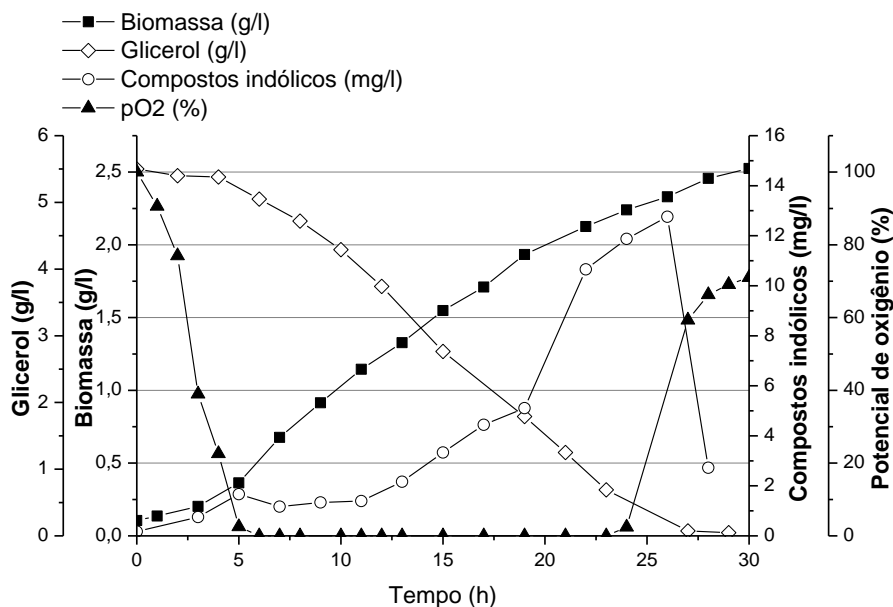


Figura 18: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 1.

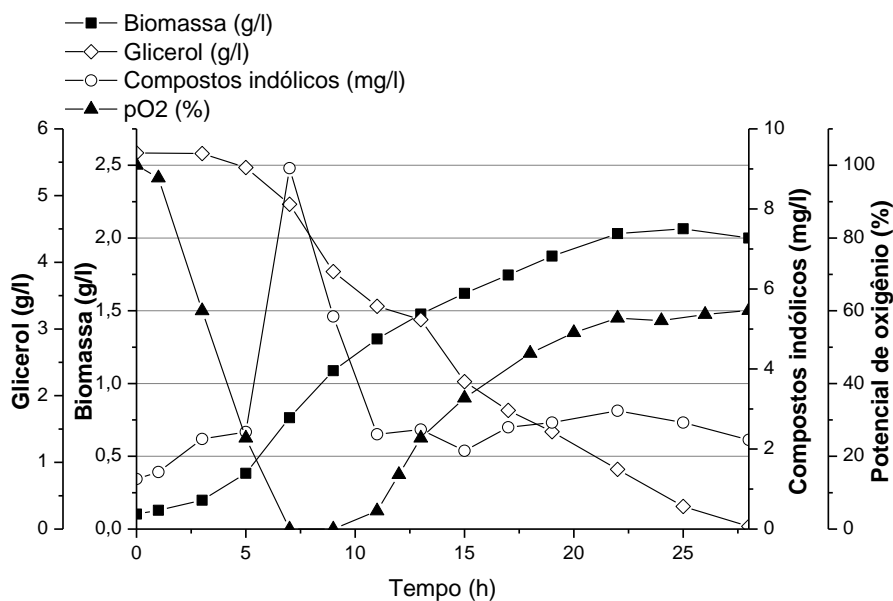


Figura 19: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 2.

O ensaio 1 apresentou produções de biomassa e de compostos indólicos superiores ao ensaio 2, sendo a produção de biomassa 22,3 % maior e a média de compostos indólicos 146 % superior. Dessa forma, verifica-se que o ensaio 1 fornece condições mais apropriadas para o desenvolvimento do microrganismo e produção de compostos indólicos quando comparado ao ensaio 2.

O ensaio 1 apresentou a velocidade máxima exponencial igual à  $\mu_m = 0,262 \text{ h}^{-1}$ , produção máxima de biomassa de  $X = 2,541 \text{ g L}^{-1}$ . Verificou-se também uma rápida e total dissolução do oxigênio presente na fermentação, em que o  $pO_2$  mínimo ocorreu do tempo  $t = 5$  a 24 h. A fermentação durou um total de 30 horas, observando-se um alto acúmulo de compostos indólicos a partir de  $t=19\text{h}$ , chegando a  $P= 12,76 \text{ mg L}^{-1}$ , e a sua degradação com o início da fase de morte bacteriana em  $t=27\text{h}$ .

Já para o ensaio 2, o tempo total de crescimento da bactéria foi de 25h, a velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,2078 \text{ h}^{-1}$  e a biomassa máxima de  $X = 2,078 \text{ g L}^{-1}$ . O  $pO_2$  zero foi observado apenas durante o período de  $t = 7$  a 9 h, coincidindo com um pico de produção de compostos indólicos de  $P = 9,02 \text{ mg L}^{-1}$ , que ocorreu em  $t = 7$  h, paralelamente com uma fase aparentemente mais aguda de crescimento da bactéria. Com o aumento do  $pO_2$ , os compostos indólicos sofreram uma rápida degradação e, a partir de  $t=11$  h, mantiveram-se em níveis mínimos próximos a  $P = 2,00 \text{ mg L}^{-1}$ .

A evolução nas fermentações dos ensaios 3 e 4 são ilustradas nas Figuras 20 e 21, onde os níveis utilizados para o ensaio 3 foram -1, para a temperatura, 1 para a agitação e -1 para a aeração, enquanto o ensaio 4 utilizou os níveis, -1 para a temperatura, 1 agitação e -1 aeração. Observou-se que o ensaio 3 exibiu produção de células e compostos indólicos superiores ao ensaio 4, sendo 8% superior em biomassa e 120% superior na produção média de indólicos.

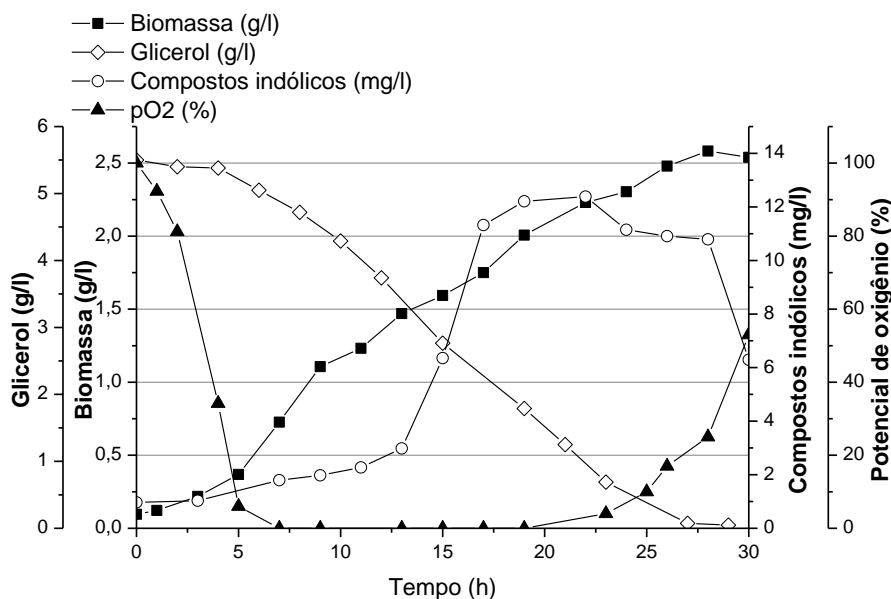


Figura 20: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa,  $pO_2$  e glicerol para o ensaio 3.

O ensaio 3 exibiu máxima velocidade exponencial de  $\mu_m = 0,287 \text{ h}^{-1}$  e máxima produção de biomassa de  $X = 2,583 \text{ g L}^{-1}$ , proporcionando em seu perfil de produção de compostos indólicos a tendência de acúmulo. A partir do tempo  $t = 13$  h houve um aumento de produção, partindo de  $P = 3 \text{ mg L}^{-1}$  e chegando a valores superiores a  $P = 12 \text{ mg L}^{-1}$  em  $t = 22$  h. A concentração de compostos indólicos produzidos foi mantida até  $t = 28$  h, sendo observada a degradação do produto a partir desse tempo, coincidindo com o início da fase de morte do microrganismo e resultante aumento do  $pO_2$ .

Devido ao nível elevado de aeração presente no ensaio 4 (Figura 21) não se observou o consumo total do oxigênio dissolvido durante a fermentação. O menor valor de  $pO_2$  observado foi de 40% em  $t = 7$  h, coincidindo com um pico de produção de compostos

indólicos que chegou a  $P = 11,2 \text{ mg L}^{-1}$  em  $t=9 \text{ h}$ . A partir deste tempo, observou-se uma rápida degradação do produto, coincidindo com a elevação do percentual de oxigênio dissolvido no meio de cultura. A velocidade máxima exponencial observada foi de  $\mu_m = 0,286 \text{ h}^{-1}$  e a máxima produção de biomassa de  $X = 2,393 \text{ g L}^{-1}$ .

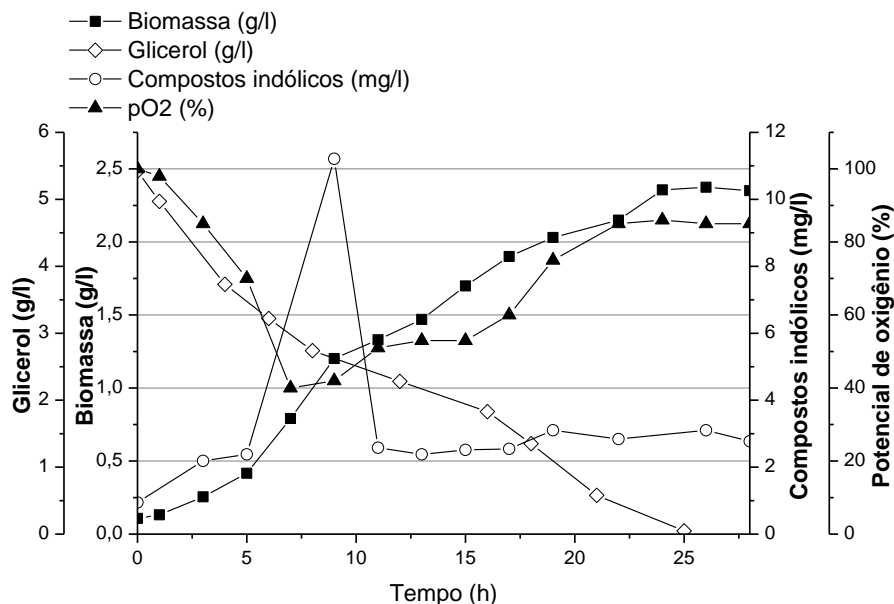


Figura 21: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 4.

Comparando os ensaios do bloco 1, ensaios 1, 2, 3 e 4, observou-se o efeito dos níveis de aeração no processo, principalmente quanto à produção de compostos indólicos. Os ensaios 1 e 3, com aeração reduzida em 2,2 LPM, apresentaram uma produção na forma de acúmulo e, na média dos 3 maiores pontos de compostos indólicos, a produção resultante foi mais do que o dobro do observado nos ensaios 3 e 4, que utilizaram aeração de 5,8 LPM. Estes ensaios foram realizados na mesma temperatura, 30,8 °C, e a agitação variou de 105,4 RPM nos ensaios 1 e 2, a 194,6 RPM nos ensaios 3 e 4. Os ensaios com agitação em maiores níveis apresentaram produção de biomassa e compostos indólicos pouco superior aos ensaios de menor agitação.

A evolução das fermentações para os ensaios 6 e 7 é apresentada nas Figuras 22 e 23, onde foram utilizados os níveis de temperatura +1 e agitação -1 para ambos os ensaios e, -1 para a aeração no ensaio 6 e +1 para a aeração no ensaio 7. Teve-se, para a biomassa e compostos indólicos, uma produção superior nas condições propostas para o ensaio 6, onde a biomassa foi 27,8 % maior e obteve-se para a média dos indólicos produção 13,1 % superior.

O ensaio 6 (Figura 22) apresentou velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,349 \text{ h}^{-1}$  e máxima produção de biomassa de  $X = 3,171 \text{ g L}^{-1}$ . O oxigênio inserido na fermentação foi rapidamente consumido, onde o  $pO_2$  encontrou-se em zero no tempo  $t = 4 \text{ h}$ , permanecendo zerado até  $t = 19 \text{ h}$ . A produção de compostos indólicos tem um incremento a partir do tempo  $t = 11 \text{ h}$ , chegando a valores superiores a  $P = 10 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo observado um perfil de acúmulo do produto que permaneceu sem aparente degradação até o início da fase de morte, em  $t = 26 \text{ h}$ , com o esgotamento total da fonte de carbono. A produção celular no ensaio 6 foi mantida constante e a formação do produto manteve-se em seu máximo durante toda a fase exponencial, cessando com o início da fase estacionária.

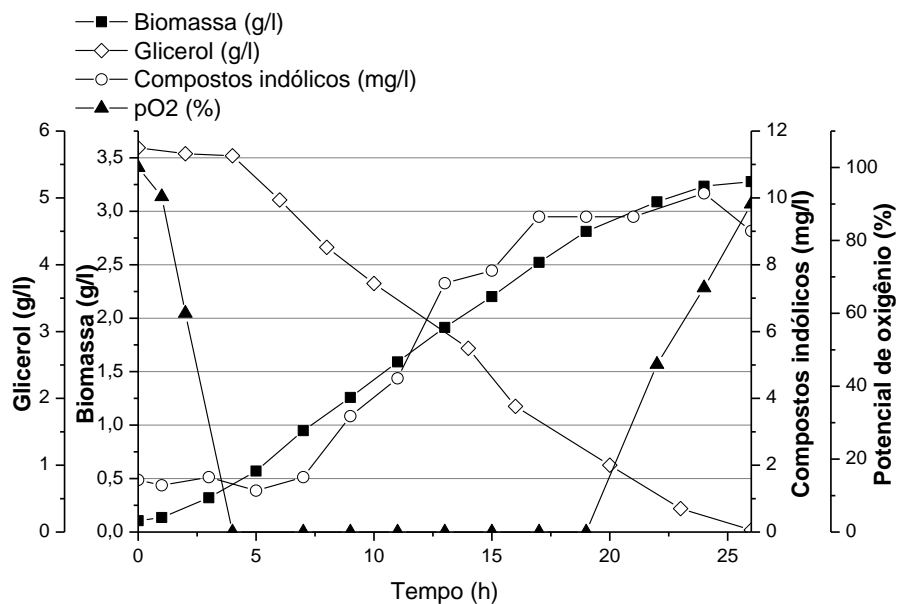


Figura 22: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 6.

O ensaio 7 (Figura 23) apresentou inicialmente, entre  $t = 3$  a 9 h, um crescimento celular mais elevado onde foi observado o máximo da produção de compostos indólicos mais, após e esse período, a produção celular sofreu uma ligeira desaceleração, juntamente com a produção de compostos indólicos.

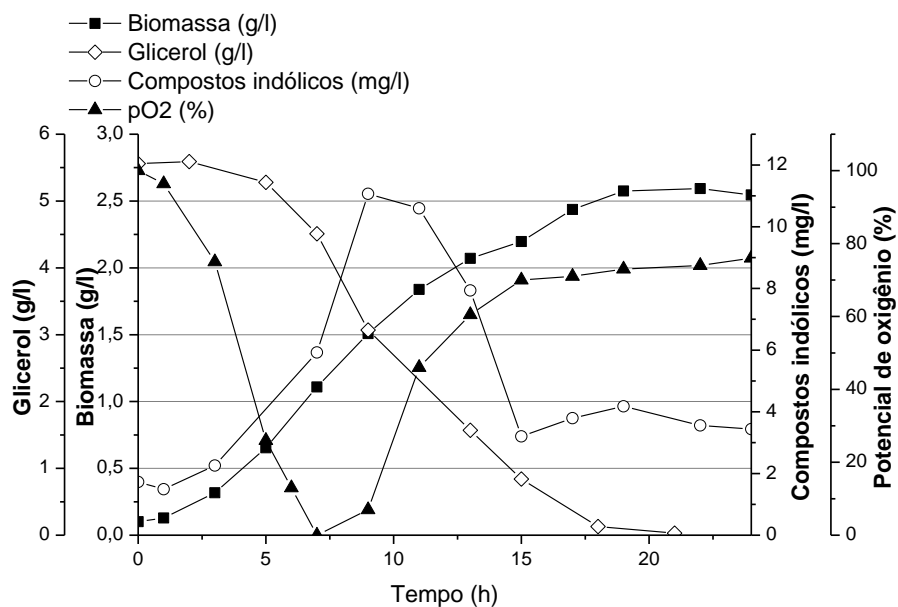


Figura 23: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 7.

Para o ensaio 7, a velocidade máxima exponencial exibida foi de  $\mu_m = 0,386 \text{ h}^{-1}$  e a máxima produção de biomassa de  $X = 2,488 \text{ g L}^{-1}$ . A produção máxima de compostos indólicos ocorreu em  $t = 9 \text{ h}$  e ocorreu em quantidade superior a  $P = 11,00 \text{ mg L}^{-1}$ , coincidindo com o consumo total do oxigênio dissolvido durante o período de  $t = 7$  a

9h. Após esse período houve degradação do produto e a partir de  $t = 15$  h chegou-se a valores próximos a  $P = 3,50 \text{ mg L}^{-1}$ , permanecendo próximo a esse nível durante o resto da fermentação.

Os resultados dos ensaios 8 e 9 são apresentados nas Figuras 24 e 25 respectivamente. Esses ensaios ocorreram nos níveis de temperatura e agitação em +1, já para a aeração, o ensaio 8 utilizou o nível +1 e o ensaio 9 empregou o nível -1.

Assim como verificado nos ensaios apresentados até o momento, o ensaio 7, que foi fermentado com o volume de oxigênio em nível reduzido, apresentou produtividade superior ao ensaio 8. A biomassa apresentou produção 23,5 % superior e a média de produção de compostos indólicos exibiu valor 23,4 % acima da produção observada no ensaio 8.

O ensaio 8 (Figura 24) apresentou o consumo total de oxigênio em  $t = 6$  h, sendo mantido em zero até o tempo  $t=15$ h. A produção de compostos indólicos atingiu seu máximo em  $t=16$ h com  $P=10,21 \text{ mg L}^{-1}$ , permanecendo em nível máximo até  $t = 23$  h. Após esse período, com a entrada da produção de biomassa na fase estacionária e com o aumento do  $pO_2$ , observou-se uma rápida degradação do produto. A velocidade máxima exponencial atingida no ensaio 8 foi de  $\mu_m = 0,419 \text{ h}^{-1}$  e a máxima produção de biomassa de  $X = 3,344 \text{ g L}^{-1}$ .

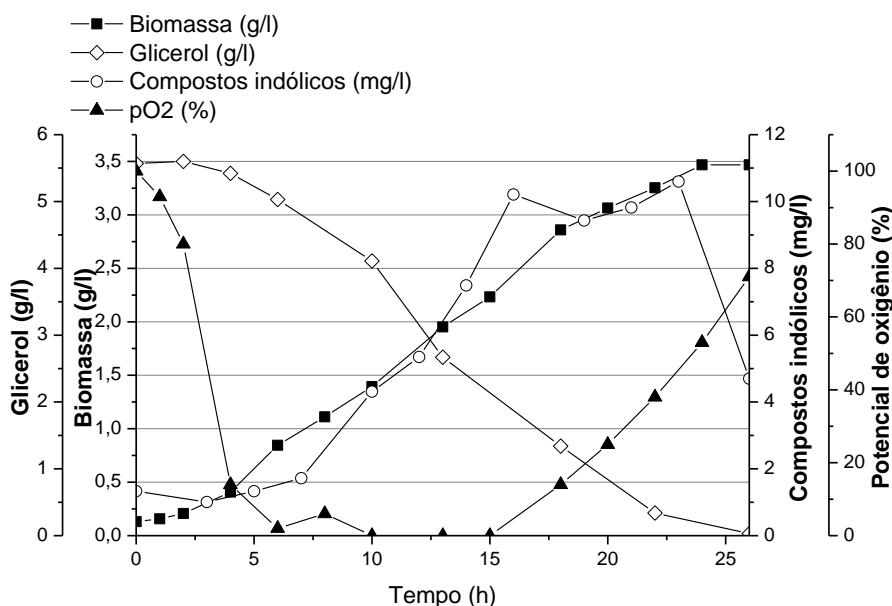


Figura 24: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa,  $pO_2$  e glicerol para o ensaio 8.

Observou-se no ensaio 9 (Figura 25) velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,431 \text{ h}^{-1}$  e máxima produção de biomassa de  $X = 3,192 \text{ g L}^{-1}$ . Este ensaio não apresentou consumo total do oxigênio introduzido no meio, sendo o mínimo do  $pO_2$  observado em  $t = 5$  h, com  $pO_2 = 37 \%$ . A produção de compostos indólicos apresentou um pico máximo de  $8,67 \text{ mg L}^{-1}$  em  $t = 10$  h, com início da fase de maior produção em  $t = 5$  h. Após esse ponto de máximo de compostos indólicos, observou-se uma rápida degradação do produto, chegando a  $P = 2,74 \text{ mg L}^{-1}$  em  $t = 14$  h, sendo mantidos valores próximos a este P até o final da fermentação.

O bloco 2 apresentou um incremento na produção de biomassa, observando-se que em fermentações com condição de aeração reduzidas, como visto nos ensaios 6 e 8, e com a agitação em nível +1, como visto no ensaio 8, a produção da biomassa é favorecida. A

velocidade máxima exponencial observada também foi superior às obtidas no bloco 1, tendo esse incremento com provável origem na temperatura em nível maior.

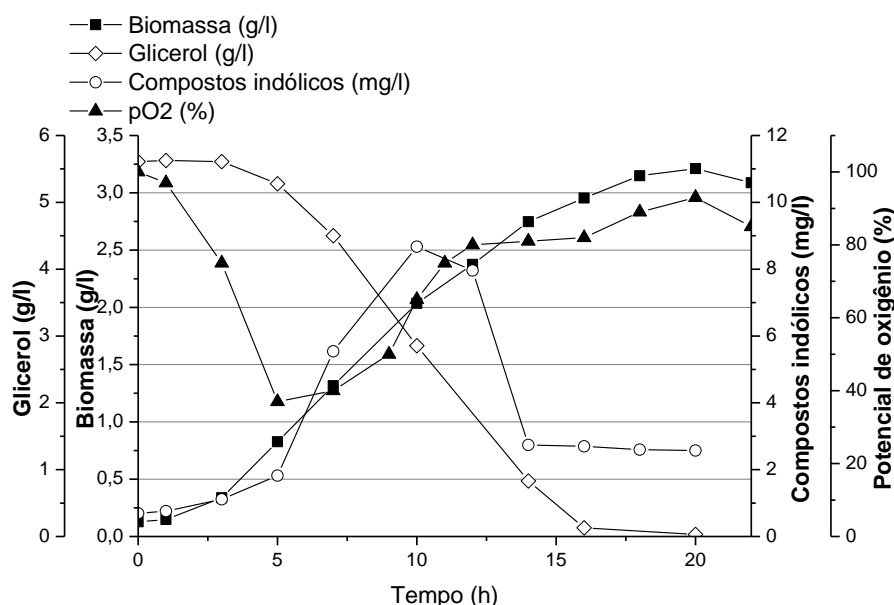


Figura 25: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 9.

Os ensaios apresentados no bloco 1, com temperatura de 30,8 °C e aeração de 2,2 LPM apresentaram uma produção de compostos indólicos superior aos ensaios do bloco 2, entretanto, a biomassa e a velocidade máxima exponencial atingiram valores mais elevados no bloco 2, com a temperatura em 39,2 °C e aeração em 5,8 LPM. Este fato indica uma forte influência da temperatura e da aeração sobre a produção de biomassa e compostos indólicos.

No terceiro bloco de experimentos, constam os ensaios realizados utilizando variações nos níveis axiais (+1,64 e -1,68), onde duas variáveis foram mantidas em seus respectivos pontos centrais e outra era variada axialmente.

As figuras 26 e 27 apresentam as fermentações realizadas nas condições apresentadas para os ensaios 11 e 12, onde as condições de aeração e agitação foram mantidas nos pontos centrais e a temperatura foi utilizada nos níveis de -1,68 para o ensaio 11 e +1,68 no ensaio 12. Ambos os ensaios apresentaram baixa capacidade de produção de biomassa e de compostos indólicos e o glicerol fornecido não foi inteiramente consumido durante a fermentação, ou seja, a atividade metabólica celular cessou antes do consumo total do substrato.

O Ensaio 11 (Figura 26) apresentou velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,216 \text{ h}^{-1}$  e máxima produção de biomassa de  $X = 2,608 \text{ g L}^{-1}$ , a produção de indólicos apresentou um pico de  $P = 7,33 \text{ mg L}^{-1}$  em  $t = 13\text{h}$ , coincidindo com o mínimo de  $pO_2$  obtido no período de  $t = 9$  a  $15 \text{ h}$ . Após este período, o produto sofreu uma rápida degradação, chegando em  $P = 1,96 \text{ mg L}^{-1}$ , mantendo-se próximo a este valor até o fim da fermentação.

O ensaio 12 apresentou baixa produção de biomassa, chegando a apenas  $X = 1,80 \text{ g L}^{-1}$ . A velocidade máxima exponencial atingiu  $\mu_m = 0,216 \text{ h}^{-1}$  e não foi observado o consumo total do glicerol presente no meio de cultura, restando uma concentração de  $S = 3,75 \text{ g L}^{-1}$  e o  $pO_2$  não foi inferior a 50%. O perfil de produção de compostos indólicos foi de acúmulo, chegando a  $P = 9,17 \text{ mg L}^{-1}$  e apresentando degradação apenas quando o crescimento celular alcançou a fase estacionária.

Os ensaios 11 e 12 indicam que as temperaturas axiais utilizadas de 28 e 42 °C não são indicadas para a produção de biomassa e compostos indólicos por *H. seropedicae*, sendo aconselhável utilizar temperaturas superiores a 28 °C e inferiores a 42 °C.

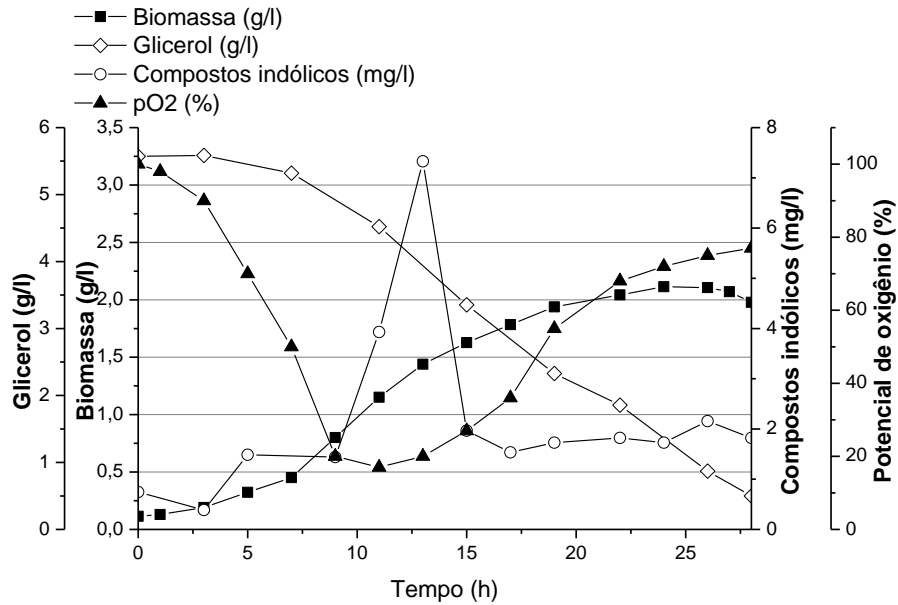


Figura 26: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 11.

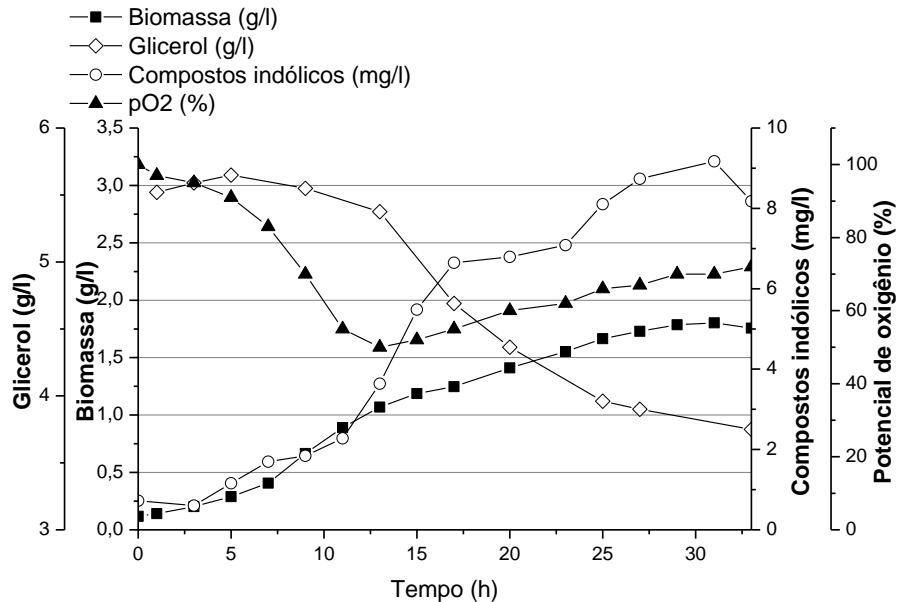


Figura 27: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 12.

Os resultados dos ensaios 13 e 14 são apresentados nas Figuras 28 e 29. Nestes ensaios utilizaram-se os níveis axiais de +1,68 e - 1,68 para a agitação, respectivamente, e os níveis centrais de temperatura e aeração para ambos os ensaios.

O ensaio 13 (Figura 28) foi realizado em condições reduzidas de agitação, tornando o oxigênio menos solúvel no meio e, conseqüentemente, o pO<sub>2</sub> inferior ao observado no

ensaio 14 (Figura 29), que foi realizado em condições elevadas de agitação. Com menos oxigênio dissolvido no meio, o crescimento da biomassa no ensaio 13 acabou sendo limitado, atingindo resultados inferiores aos do ensaio 14. A produção máxima de compostos indólicos foi observada em um pico em  $t = 13$  h com  $P = 13,4$  mg L<sup>-1</sup>. Esta elevada concentração foi degradada juntamente com a diminuição da atividade metabólica, atingindo  $P = 3,01$  mg L<sup>-1</sup> em  $t = 17$  h, sendo mantidos valores próximos a este valor até a fase estacionária. O ensaio 13 atingiu a velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,333$  h<sup>-1</sup> e máxima produção de biomassa de  $X = 2,735$  g L<sup>-1</sup>.

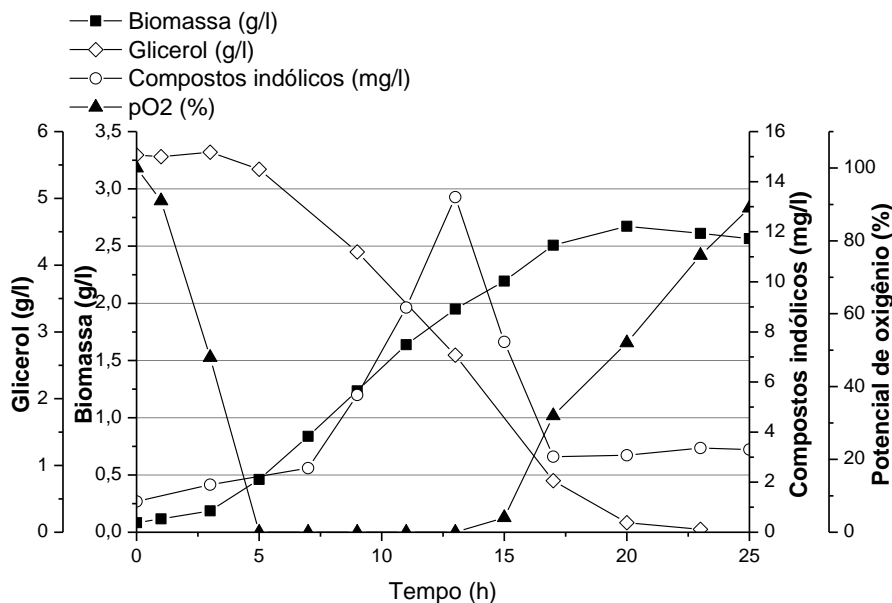


Figura 28: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 13.

O ensaio 14 (Figura 29) apresentou melhores resultados tanto para a biomassa quanto para compostos indólicos, sendo superior em 15 % na biomassa e 13,2 % na média de compostos indólicos. Ambos os ensaios apresentaram resultados satisfatórios na produção de biomassa e compostos indólicos.

N ensaio 14, que utilizou agitação de 225 RPM, o oxigênio dissolvido manteve-se em níveis mais elevados no meio devido a este alto patamar de agitação, onde foi verificado que o  $pO_2$  não foi inferior a 35%. Esse excesso de oxigênio favoreceu a produção de biomassa, chegando a  $X = 3,05$  g L<sup>-1</sup>. A produção de compostos indólicos foi máxima durante o período de menor  $pO_2$ , atingindo  $P = 12,07$  mg L<sup>-1</sup> em  $t = 13$  h e sofrendo degradação com a redução da atividade metabólica celular. Com o conseqüente aumento do oxigênio dissolvido, esses níveis chegaram a  $P = 2,31$  mg L<sup>-1</sup> em  $t = 17$  h. Ainda neste ensaio, observou-se velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,374$  h<sup>-1</sup>.

Através desses resultados, pode-se verificar que em agitações mais elevadas o  $pO_2$  apresenta níveis maiores, significando um maior teor de oxigênio dissolvido no meio fermentado. Esse oxigênio em excesso favorece a velocidade de crescimento celular e proporciona maior produção de compostos indólicos, entretanto, os indólicos são degradados com a redução da atividade metabólica.



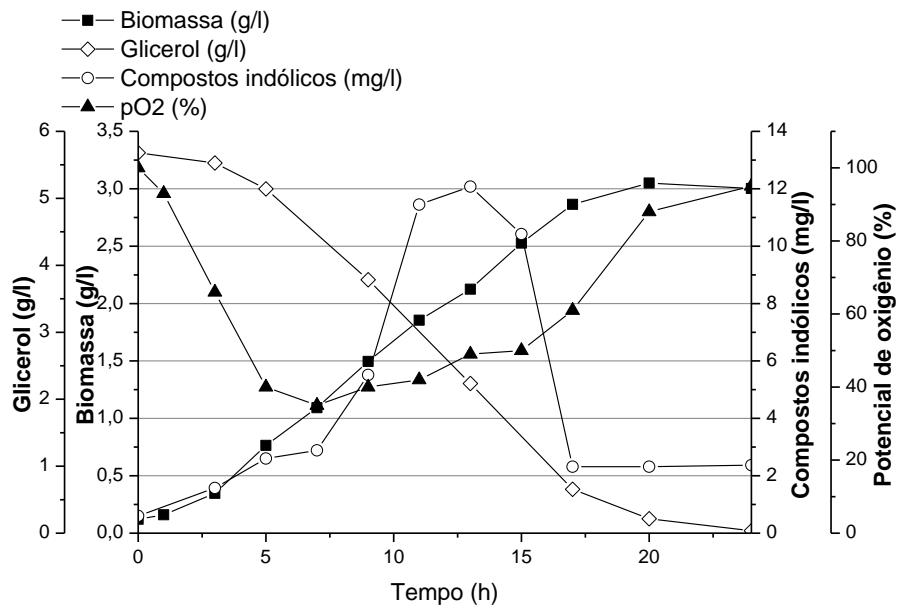


Figura 29: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 14.

A evolução da fermentação dos ensaios 15 e 16, que foram realizadas empregando para a temperatura e agitação as condições centrais e para a aeração os níveis axiais, são apresentadas nas Figuras 30 e 31, respectivamente.

O ensaio 15 (Figura 30) apresentou superioridade de 27,5% na produção de biomassa e 180 % na produção media de compostos indólicos quando comparado ao ensaio 16 (Figura 31).

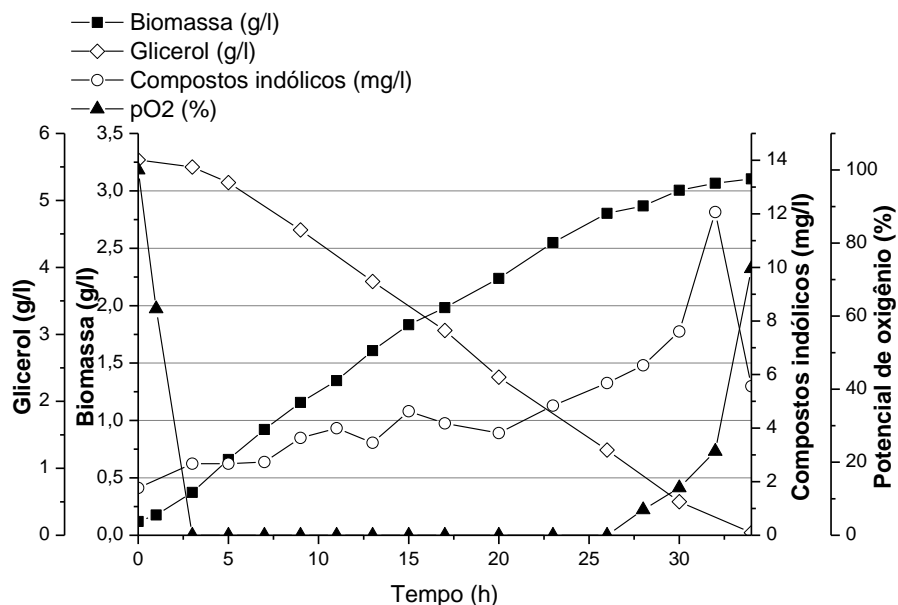


Figura 30: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 15.

O ensaio 15 apresentou um rápido consumo do oxigênio dissolvido e a produção de compostos indólicos não ocorreu em alto nível, apresentando um pico máximo de

$P = 12,06 \text{ mg L}^{-1}$  em  $t = 32 \text{ h}$ , que foi rapidamente degradado com o início da fase estacionária do microrganismo em  $t = 34 \text{ h}$ . A produção de biomassa chegou a  $X = 3,148 \text{ g L}^{-1}$ , com velocidade máxima exponencial atingindo  $\mu_m = 0,378 \text{ h}^{-1}$ .

No ensaio 16 (Figura 31) não ocorreu o consumo total do oxigênio dissolvido, chegando a um  $pO_2$  mínimo de 36% em  $t = 5 \text{ h}$ . A maior produção de indólicos ocorreu em um pico em  $t = 7 \text{ h}$  de  $P = 5,32 \text{ mg L}^{-1}$ , a biomassa máxima foi de  $X = 2,470 \text{ g L}^{-1}$  e velocidade máxima na fase exponencial de  $\mu_m = 0,400 \text{ h}^{-1}$ .

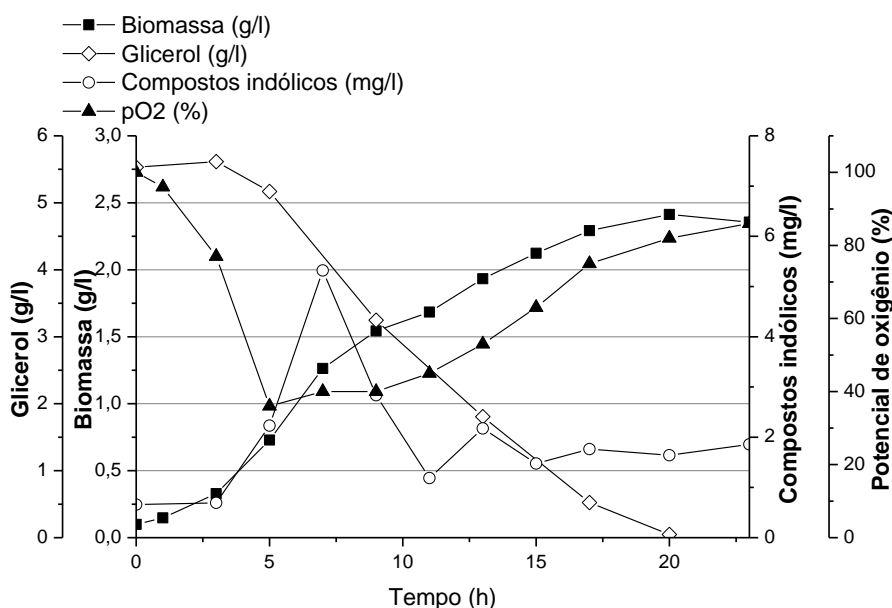


Figura 31: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa,  $pO_2$  e glicerol para o ensaio 16.

Como observado nos ensaios 15 e 16, os níveis axiais de aeração utilizados para estas fermentações de 1 e 7 LPM, respectivamente, não forneceram condições para um desempenho satisfatório na produção de compostos indólicos. Para a biomassa, os níveis de produção alcançados foram bons, principalmente para o ensaio 15, que alcançou uma produção de  $X = 3,148 \text{ g L}^{-1}$ .

Os ensaios 5, 10 e 17, que utilizaram os níveis centrais de temperatura, agitação e aeração ( $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 150 RPM e 4 LPM, respectivamente) propostos pela matriz experimental, são apresentados nas Figuras 32, 33 e 34. Observou-se uma excelente repetibilidade dos valores obtidos para compostos indólicos e biomassa, sendo observado um valor médio máximo para a biomassa de  $X = 3,145 \text{ g L}^{-1}$  e compostos indólicos médios de  $P = 11,621 \text{ mg L}^{-1}$ .

Observou-se o  $pO_2$  com nível mínimo em torno de 30% para todos os ensaios, indicando a presença de oxigênio em excesso. A produção máxima de compostos indólicos coincidiu com a faixa em que o  $pO_2$  foi a menor possível. A partir de  $t = 5 \text{ h}$ , com a redução do  $pO_2$  no meio de cultura, a produção de compostos indólicos ocorreu de forma mais acelerada, observando-se então a degradação do produto com o aumento do oxigênio dissolvido no meio de cultura, ocorrida juntamente com a desaceleração da produção de células e com o início da fase de morte do microrganismo, verificada a partir de  $t = 15 \text{ h}$ .

Os três ensaios apresentaram produção de células rápida e contínua, com seu pico de produção em aproximadamente  $t = 20 \text{ h}$ , a produção de compostos indólicos apresentou acúmulo durante o período em que a produção de células ocorreu em seu máximo, ocorrendo sua degradação com a desaceleração da produção de células e o aumento do excesso de

oxigênio. O crescimento celular cessou com o consumo total do glicerol, indicando que o substrato fornecido pode estar em níveis baixos.

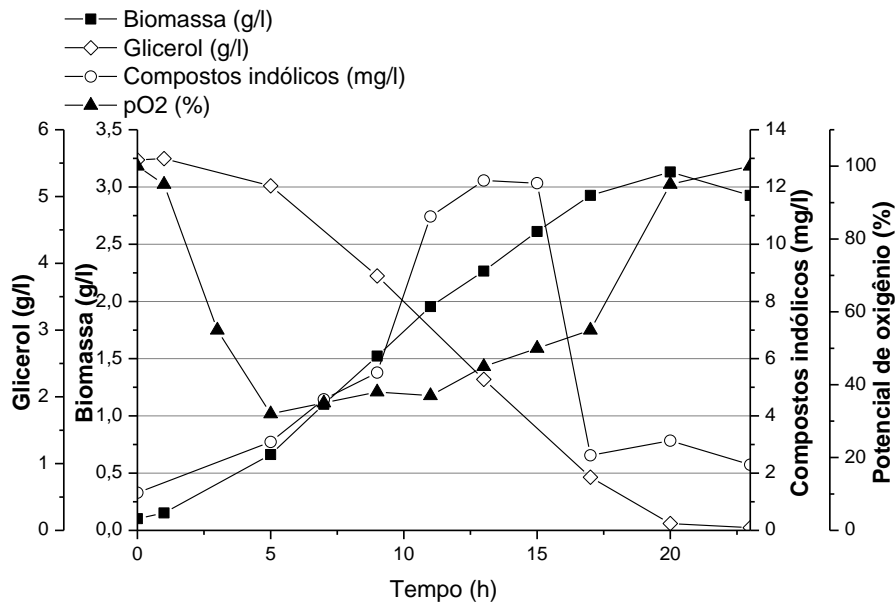


Figura 32: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 5.

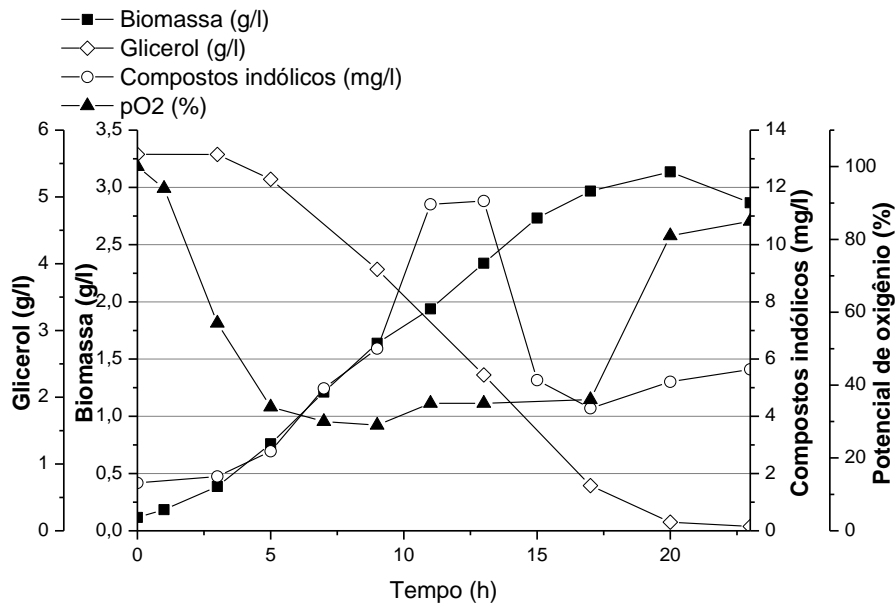


Figura 33: Evolução das concentrações de compostos indólicos, biomassa, pO<sub>2</sub> e glicerol para o ensaio 10.

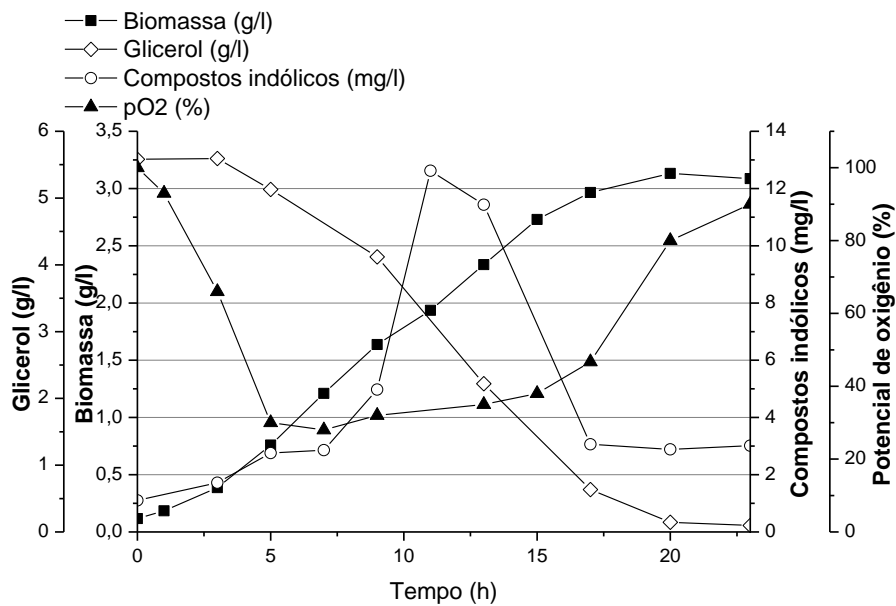


Figura 34: Evolução das concentrações de Compostos Indólicos, Biomassa, pO<sub>2</sub> e Glicerol para o ensaio 17.

### 4.3.3 Análise estatística para o DCCR 03

Visando obter melhor compreensão dos resultados obtidos para cada ensaio realizado a partir do DCCR 03 e elucidar o comportamento da produção de biomassa e de compostos indólicos em diferentes faixas de temperatura, agitação e aeração, realizou-se uma série de análises estatísticas, que são apresentadas a seguir.

#### 4.3.3.1 Diagrama de Pareto para a variável resposta biomassa

O Diagrama de Pareto com os efeitos estimados que as variáveis independentes exercem sobre a variável resposta biomassa é apresentado na Figura 35. O grau de confiança utilizado foi de 90% e o valor de significância de  $p=0,1$ .

O Diagrama de Pareto mostra um efeito estatisticamente significativo proveniente das variáveis temperatura, aeração e agitação com seus termos lineares e também com o termo quadrático da variável temperatura. O efeito observado no termo quadrático da temperatura apresentou a maior significância, podendo a temperatura ser considerada a variável com efeito mais considerável sobre a produção de biomassa.

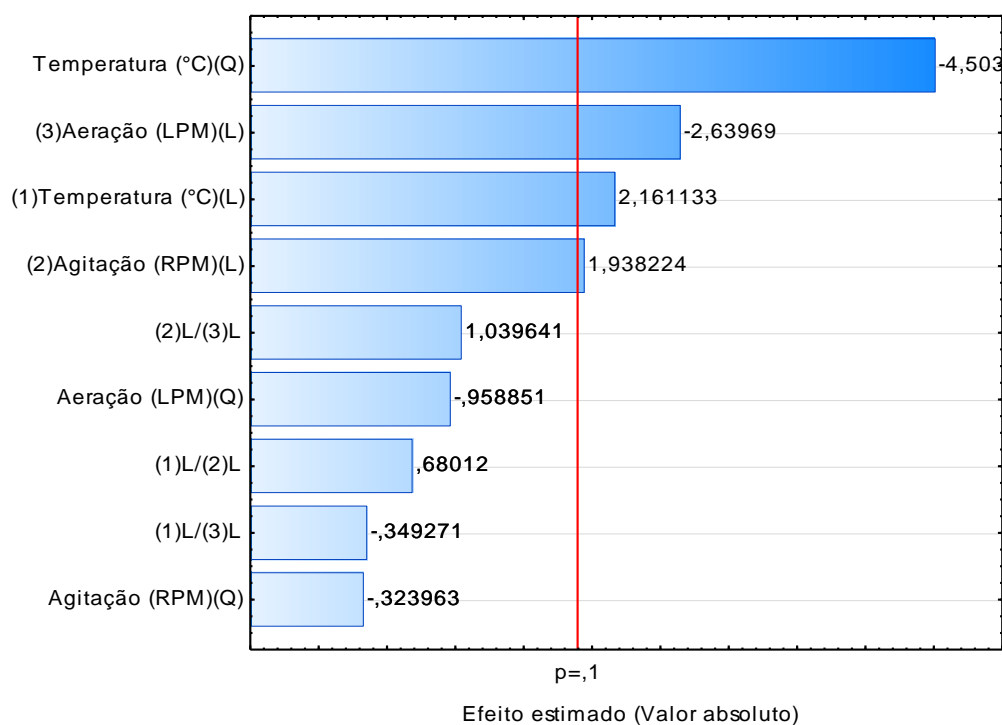


Figura 35: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes do DCCR 03 sobre a produção de biomassa.

#### 4.3.3.2 Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para a variável resposta biomassa

Realizou-se a regressão dos dados obtidos para cada ensaio fornecido pelo DCCR 03, obtendo-se os coeficientes de regressão, o erro padrão da amostra e os testes  $t(7)$  e  $p$ -valor para cada provável efeito. Os valores são expressos na Tabela 22.

Tabela 22: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes  $t(7)$  e  $p$ -valor para a variável resposta biomassa (DCCR 03).

<i>Variável</i>	<i>Coef. de regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(7)</i>	<i>p-valor</i>
Média	3,131	0,160	19,509	>0,001
(1)Temperatura (°C)(L)	0,163	0,075	2,161	0,067
Temperatura (°C)(Q)	-0,378	0,084	-4,503	0,002
(2)Agitação (RPM)(L)	0,146	0,075	1,938	0,093
Agitação (RPM)(Q)	-0,027	0,084	-0,323	0,755
(3)Aeração (LPM)(L)	-0,199	0,075	-2,639	0,033
Aeração (LPM)(Q)	-0,080	0,084	-0,958	0,369
1L x 2L	0,067	0,098	0,680	0,518
1L x 3L	-0,034	0,098	-0,349	0,737
2L x 3L	0,102	0,098	1,039	0,333

$\alpha=0,1$   $t_{\text{tab}}=1,9$

Os resultados observados para os testes  $t(7)$  e  $p$ -valor corroboram a importância dos efeitos causados pela temperatura, aeração e agitação sobre a produção de biomassa. Os

coeficientes de regressão utilizados na formulação do modelo matemático para a descrição do processo em estudo foram os que apresentaram, para a sua respectiva variável, um valor de  $t(7)$  superior em módulo a  $t_{\text{tab}} = 1,90$  e  $p$ -valor inferior à significância  $\alpha=0,1$ . Com a seleção dos coeficientes de efeito significativo, o modelo matemático pode ser construído, sendo este expresso pela equação abaixo.

$$\text{Biomassa} = 3,131 + 0,163x_1 - 0,378x_1^2 + 0,146x_2 - 0,199x_3 \quad (38)$$

onde  $x_1$ = temperatura,  $x_2$ = agitação e  $x_3$ = aeração.

Os resultados previstos pela equação (38) para cada ensaio experimental e seus determinados desvios relativos são apresentados na Tabela 23. Estipulou-se previamente uma confiabilidade desejada de 90 %, sendo tolerados desvios de até 10% em relação aos dados experimentais. Os ensaios 11 e 12 apresentaram desvio relativo de 15,66 e -18,95 %, respectivamente, que são valores significativamente superiores à confiabilidade desejada. Os níveis das variáveis durante a fermentação desses dois ensaios foram centrais na agitação e aeração e para a temperatura utilizaram-se os níveis axiais de -1,68 para o ensaio 11 e +1,68 para o ensaio 12.

Pode-se observar que o modelo proposto pela equação (38) apresenta validade reduzida em condições axiais de temperatura, sendo indicada a sua utilização acima do limite axial inferior e abaixo do superior. Os demais ensaios apresentaram resultados inferiores ou não significativamente acima dos 10 % de confiabilidade proposto.

Tabela 23: Valores de biomassa experimentais e previstos pelo modelo (equação 38), resíduos e desvio relativo para o DCCR 03.

<i>Ensaio</i>	<i>Biomassa Experimental (g L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Biomassa Calculada (g L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Desvio Relativo (%)</i>
1	2,541	2,642	-3,825
2	2,078	2,242	-7,321
3	2,583	2,854	-9,495
4	2,393	2,536	-5,631
5	3,140	3,131	0,285
6	3,171	2,969	6,786
7	2,488	2,570	-3,174
8	3,344	3,263	2,478
9	3,192	2,854	-9,495
10	3,153	3,131	0,701
11	2,068	1,788	15,661
12	1,895	2,338	-18,949
13	2,735	2,884	-5,180
14	3,139	3,378	-7,068
15	3,148	3,467	-9,201
16	2,470	2,795	-11,632
17	3,142	3,131	0,349

Um gráfico comparativo entre os valores experimentais e os obtidos através do modelo matemático proposto pela equação (38) é apresentado na Figura 36. Como mencionado

anteriormente, os dados que mais se distanciam daqueles representados pela reta de regressão são os fornecidos pelos ensaios 11 e 12, os demais pontos descrevem satisfatoriamente o comportamento das fermentações.

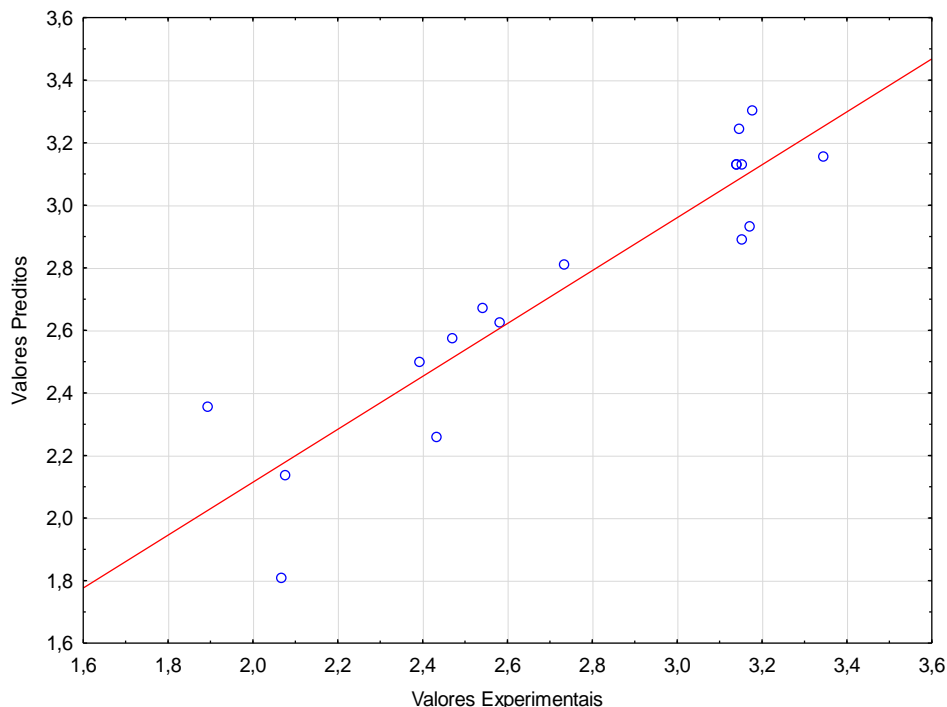


Figura 36: Valores preditos pela equação (38) versus valores experimentais.

Os valores obtidos a partir da análise de variância referentes aos dados fornecidos pelo DCCR 03 são apresentados na Tabela 24. A ANOVA apresentou uma variação explicada de 84,57 %, a variação observada foi abaixo dos 90 % desejados, indicando que alguns valores não são bem representados pelo modelo, como já discutido, e a maior variação é observada nos pontos axiais de temperatura. O valor do  $F_{Calculado}$  obtido foi de 4,26, superior ao  $F_{Tabelado}$  de 2,72, o teste  $F$  apresenta valores adequados, comprovando a validade do modelo matemático proposto pela equação (38) para descrever a produção da biomassa em biorreator.

Tabela 24: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 03).

<i>Fator</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrado Médio</i>	$F_{Calc}$	$F_{Tab}$
Regressão	2,985	9	0,332	4,26	2,72
Resíduos	0,544	7	0,078		
Total	3,529	16			

$R^2=0,8457$   $F_{9, 7, 0.1}=2,72$

#### 4.3.3.3 Superfície de resposta para a variável resposta biomassa

Os resultados para as superfícies de resposta e curvas de contorno para a variável resposta biomassa em função da temperatura, aeração e agitação são apresentados na Figura 37.

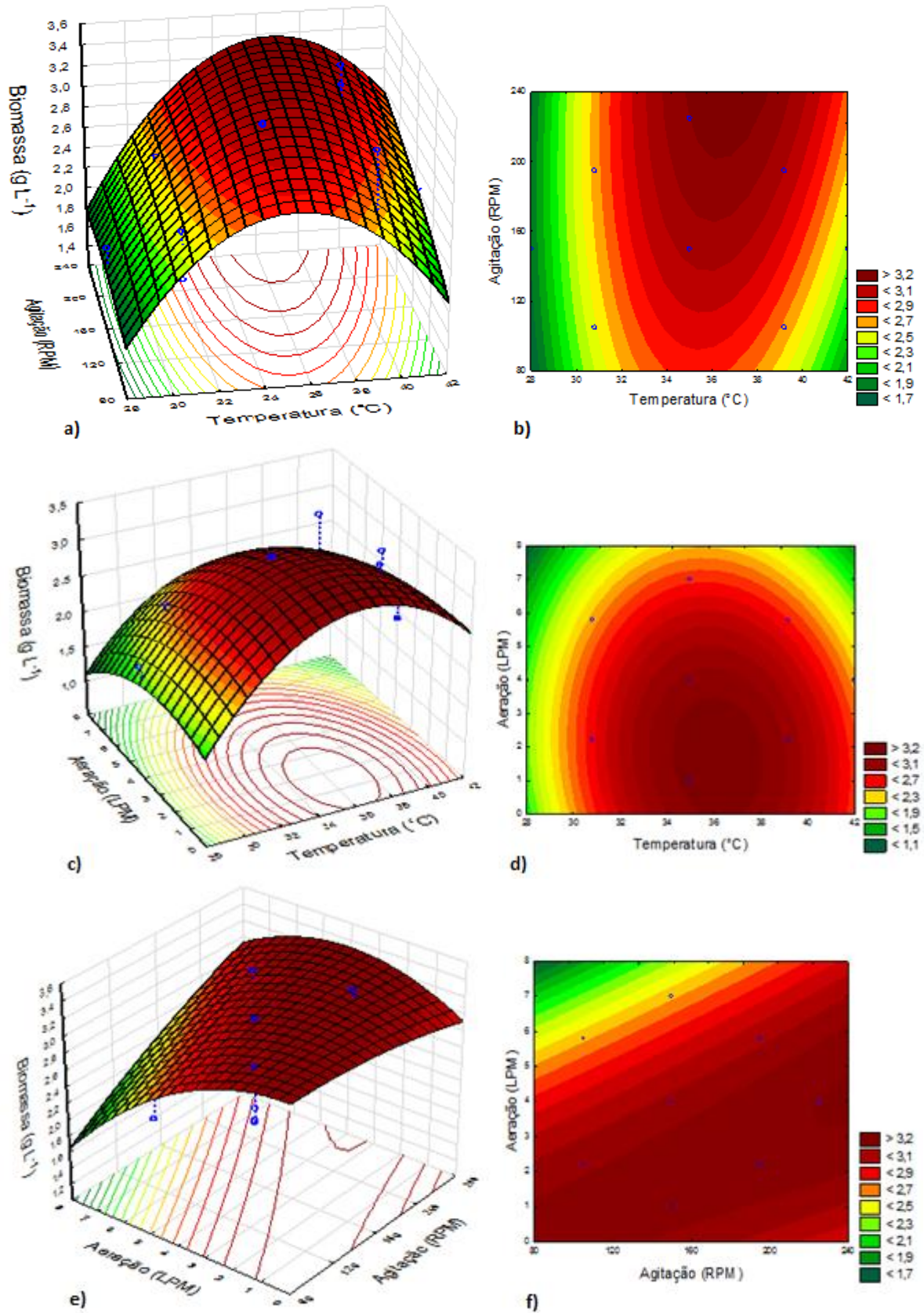


Figura 37: Superfícies de resposta e curva de contorno para a variável resposta biomassa em função da: a) e b) temperatura versus agitação, c) e d) temperatura versus aeração e e) e f) aeração versus agitação.



Como observado na Figura 37 a), b), c) e d), torna-se evidente a influência do efeito da temperatura sobre a formação da biomassa. Sua alteração para pontos de temperatura fora dos pontos centrais implica em uma elevada redução na produção. Observa-se também na Figura 37 a), b) e) e f) o baixo efeito gerado pela agitação, onde sua alteração só é percebida em níveis extremos inferiores ou superiores. Este baixo efeito se dá que devido à agitação, que mesmo em baixos níveis, coloca o meio de cultura em regime turbulento, sendo este significativamente alterado apenas se a agitação estiver muito elevada ou em processos sem agitação.

Observa-se ainda na Figura 37 c), d), e) e f) os efeitos causados pela aeração, que apresenta uma influência na produção de biomassas significativa, principalmente quando usada em excesso, podendo causar a redução da produção. A Figura 37 corrobora os dados fornecidos pelo Diagrama de Pareto, que exibe a temperatura como variável de maior efeito, seguido pela aeração e agitação, que apresentam efeitos significativos menos perceptíveis.

Com a análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno obtidas, pode-se definir que para uma produção de biomassa em nível elevado, a faixa de operação do biorreator deve atender às condições de temperatura entre 34 e 38 °C, agitação superior a 150 RPM e aeração de 0 a 4 LPM. Entretanto, em agitações próximas a zero, observou-se uma produção lenta de biomassa, sendo recomendada que esta seja utilizada em seu máximo possível.

#### 4.3.3.4 Diagrama de Pareto para a variável resposta compostos indólicos

O Diagrama de Pareto apresentado na Figura 38 ilustra como é possível analisar os efeitos proporcionados pela temperatura, agitação e aeração em sua forma linear, quadrática ou combinadas entre si. Assumiu-se um grau de confiança de 90 % e o valor de significância de  $\alpha=0,1$ .

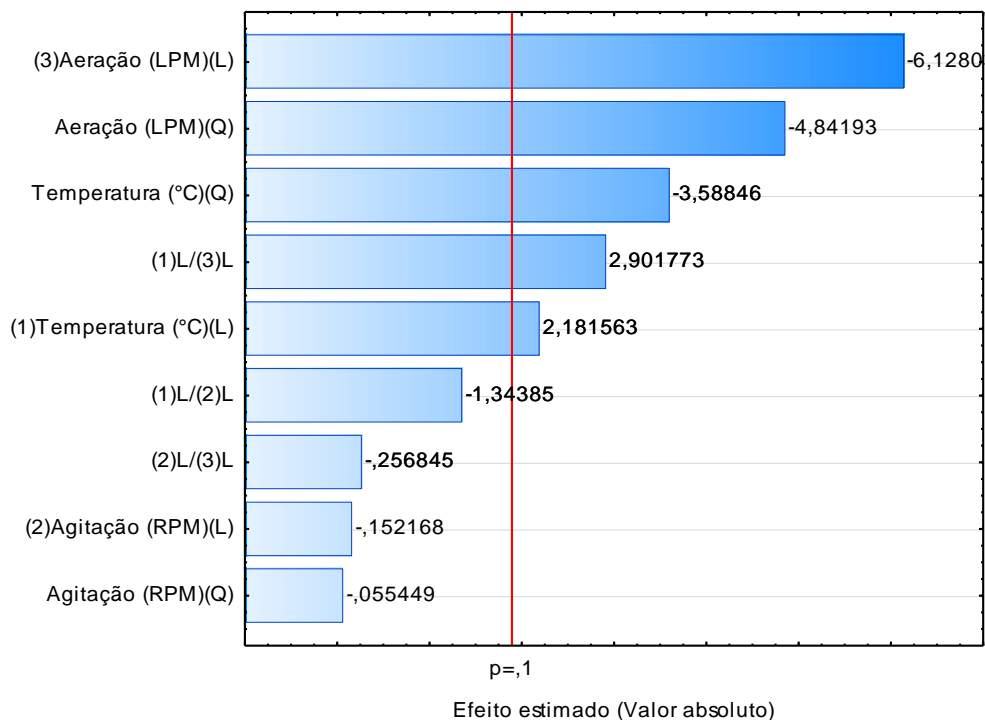


Figura 38: Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes do DCCR 03 sobre a produção de compostos indólicos.

Pode-se verificar que os efeitos mais significativos são causados pela aeração, em sua forma linear e quadrática, apresentando-se significativos também os efeitos proporcionados pela temperatura, linear e quadrática e a combinação linear da aeração e temperatura. A agitação, como observado, não apresenta efeitos significativos, sejam estes positivos ou negativos.

#### 4.3.3.5 Coeficientes de regressão e tabela ANOVA para a variável resposta compostos indólicos

Realizou-se para a variável resposta compostos indólicos a regressão dos dados obtidos para cada ensaio com o objetivo de obter os coeficientes de regressão e o erro padrão da amostra. Além disso, a significância dos termos da regressão de cada possível efeito proporcionado pelas variáveis temperatura, agitação e aeração foi avaliada pelos testes  $t(7)$  e  $p$ -valor. Os valores são expressos na Tabela 25.

Tabela 25: Coeficientes de regressão, erro padrão e testes  $t(7)$  e  $p$ -valor para a variável resposta compostos indólicos (DCCR 03).

<i>Variável</i>	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>t(7)</i>	<i>p-valor</i>
Média	11,503	0,681	16,885	$p < 0,001$
(1)Temperatura (°C)(L)	0,701	0,322	2,182	0,065
Temperatura (°C)(Q)	-1,280	0,357	-3,588	0,009
(2)Agitação (RPM)(L)	-0,049	0,322	-0,152	0,883
Agitação (RPM)(Q)	-0,020	0,357	-0,055	0,957
(3)Aeração (LPM)(L)	-1,970	0,322	-6,128	$p < 0,001$
Aeração (LPM)(Q)	-1,727	0,357	-4,842	0,002
1L x 2L	-0,562	0,419	-1,344	0,221
1L x 3L	1,215	0,419	2,902	0,023
2L x 3L	-0,108	0,419	-0,257	0,805

$\alpha=0,1$   $t_{\text{tab}}=1,90$

Para a construção do modelo matemático do processo de produção de compostos indólicos, os coeficientes de regressão utilizados foram os que apresentaram teste  $t(7)$  superior em módulo a  $t_{\text{tab}}=1,90$  e o teste  $p$ -valor inferior ao coeficiente de significância  $\alpha=0,1$ . O modelo matemático para o processo é expresso pela equação (39).

$$C.I. = 11,503 + 0,701x_1 - 1,280x_1^2 - 1,970x_3 - 1,727x_3^2 + 1,215x_1x_3 \quad (39)$$

onde  $x_1$ = temperatura,  $x_3$ = aeração.

O comparativo entre os dados experimentais e os calculados pelo modelo proposto pela equação (39) é apresentado na Tabela 26, os limites de validade para os valores calculados pelo modelo foram estabelecidos em um nível de confiança de 90 %, sendo considerados dentro do limite de validade os resultados obtidos abaixo ou próximos ao desvio relativo de 10 %.

O ensaio 11, que representa a fermentação em condição axial inferiores de temperatura, apresentou o maior desvio relativo, -16,15%, cujo valor está significativamente

fora da faixa de confiança pré-estabelecida, mostrando que o modelo não representa com confiabilidade a produção de compostos indólicos em condições reduzidas de temperatura.

O modelo apresentado pela equação (39) pode ser considerado válido pra representar o processo de produção de compostos indólicos em biorreator, entretanto devem-se evitar faixas de temperaturas axialmente reduzidas.

Tabela 26: Valores de biomassa experimental e preditos pelo modelo e desvio relativo observados para o modelo matemático gerado para o DCCR 03.

<i>Ensaio</i>	<i>Compostos Indólicos Experimental (g L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Compostos Indólicos Calculado (g L<sup>-1</sup>)</i>	<i>Desvio Relativo (%)</i>
1	11,760	10,979	7,114
2	4,782	4,611	3,701
3	11,970	10,979	9,026
4	5,390	4,832	11,548
5	11,770	11,503	2,321
6	11,152	9,989	11,639
7	9,860	8,865	11,224
8	9,940	9,953	-0,131
9	7,390	8,323	-11,210
10	11,464	11,503	-0,338
11	5,629	6,713	-16,150
12	8,670	9,068	-4,389
13	9,990	11,320	-11,749
14	11,310	11,503	-1,678
15	8,701	9,938	-12,454
16	3,114	3,319	-6,182
17	11,630	11,503	1,104

Um gráfico construído relacionando valores experimentais com os calculados é apresentado na Figura 39. Como observado, a maior parte dos valores apresenta bom ajuste a reta de regressão e que mesmo os pontos mais dispersos não prejudicam a tendência gerada pela regressão, não tornando os resultados de dispersão muito expressivos.

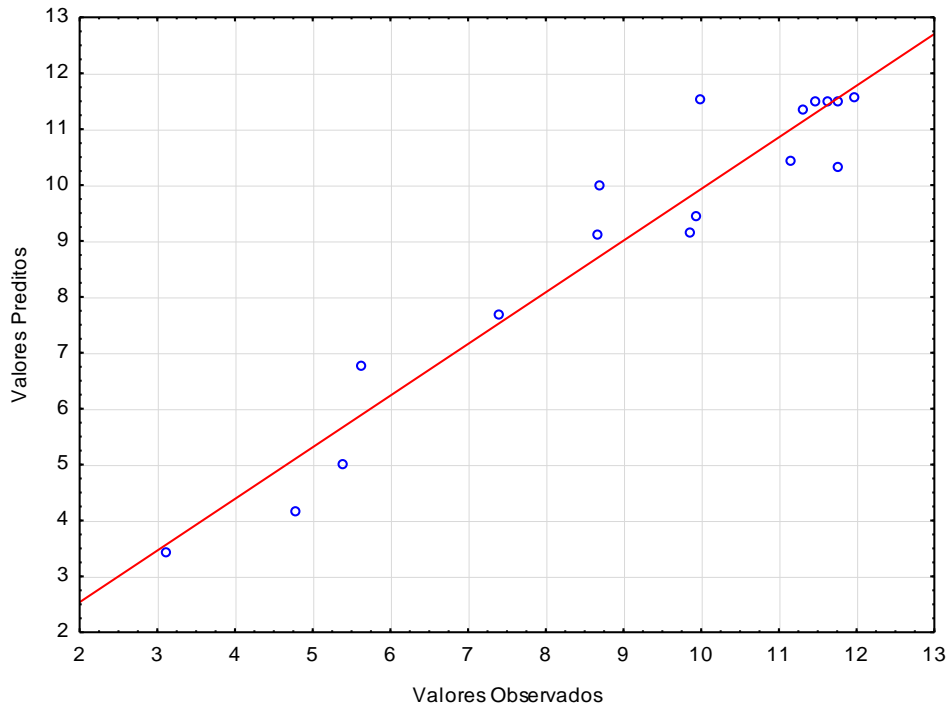


Figura 39: Valores preditos pela equação (39) versus valores experimentais.

A ANOVA calculada para a variável resposta compostos indólicos é apresentada na Tabela 27, onde é possível observar uma variação explicada de 92,40%, dentro da faixa desejável. O  $F_{Calculado}$  foi igual a 9,46, superior ao  $F_{Tabelado}$  de 2,72, comprovando a validade do modelo matemático proposto pela equação (39).

Tabela 27: Tabela ANOVA para a variável resposta biomassa (DCCR 03).

<i>Fator</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Quadrados Médios</i>	$F_{Calc}$	$F_{Tab}$
Regressão	9	119,35	13,26	9,46	2,72
Resíduos	7	9,81	1,40		
Total	16	129,16			

$R^2=0,9240$   $F_{9, 7,0.1}=2,72$

#### 4.3.3.6 Superfície de resposta para a variável resposta compostos indólicos

Os resultados para as superfícies de resposta e curvas de contorno para a variável resposta compostos indólicos em função da temperatura, aeração e agitação são apresentados na Figura 40.

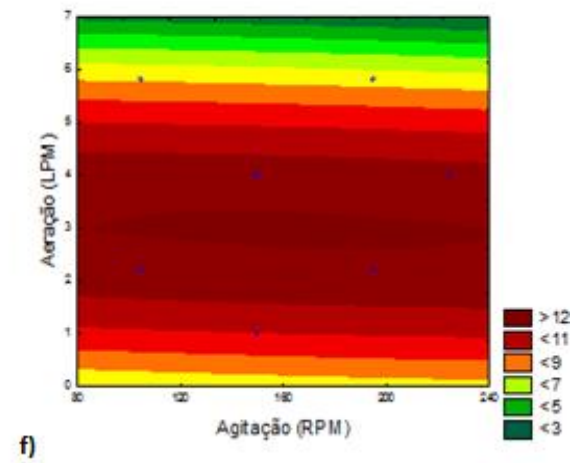
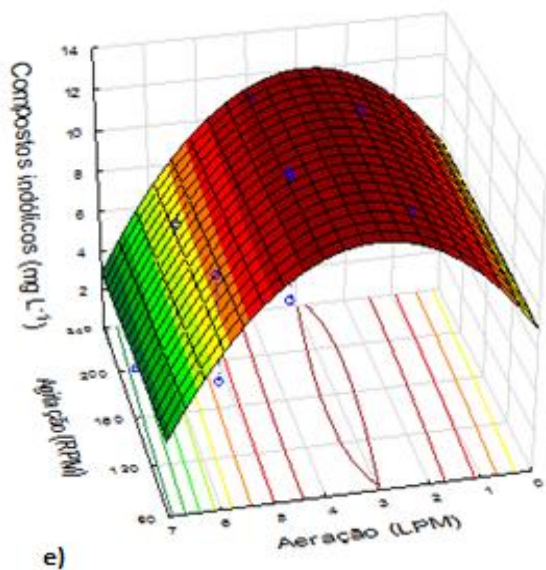
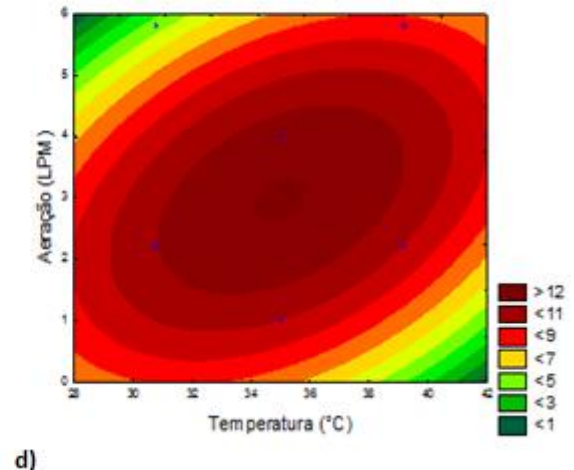
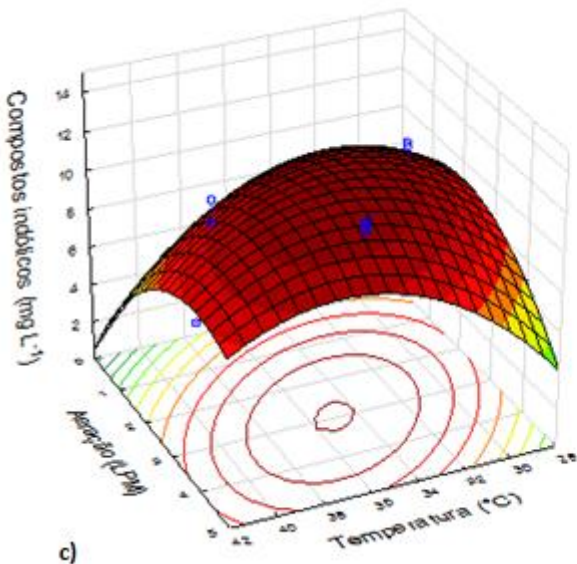
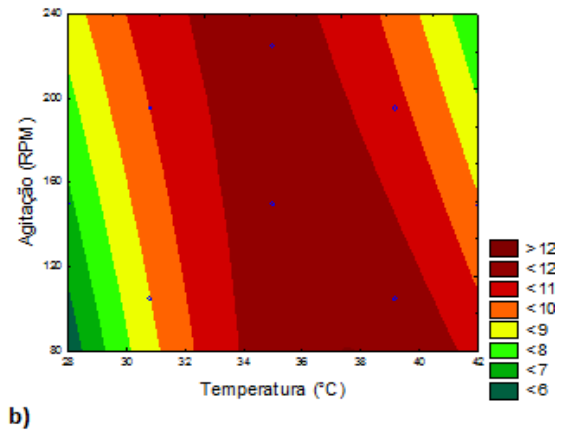
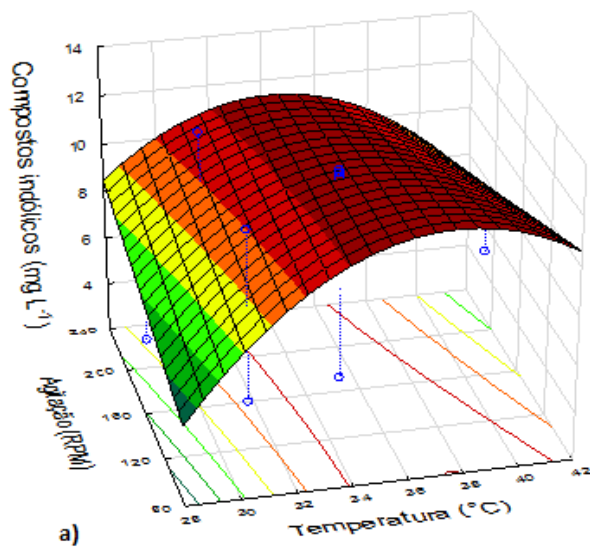


Figura 40: Superfícies de resposta e curva de contorno para a variável resposta compostos indólicos em função da: **a) e b)** temperatura versus agitação, **c) e d)** temperatura versus aeração e **e) e f)** aeração versus agitação.

O efeito da temperatura e agitação sobre a produção de indólicos é apresentado na Figura 40 a) e b), onde se verifica que a temperatura exibe um efeito visivelmente elevado. Já o eixo correspondente à agitação mantém-se quase que sem variações, indicando uma ação pouco significativa da agitação. As partes c) e d) da Figura 40, exibem o comportamento da produção de compostos indólicos quanto a temperatura e aeração, onde se nota um elevado efeito de ambas as variáveis, indicando que pequenas variações implicam em um efeito considerável na produção de compostos indólicos. A relação entre a agitação e aeração é apresentada na Figura 40 e) e f) e, como observado anteriormente, a produção de compostos indólicos se mantém constante em diferentes pontos de agitação, já para a aeração, pequenas variações apresentam um efeito significativo.

Observa-se nas superfícies de respostas e curvas de contorno o elevado efeito da temperatura e da aeração sobre a produção de compostos indólicos, semelhante ao observado com a biomassa, a agitação não apresentou efeito de elevada significância.

As faixas de operação da temperatura, agitação e aeração em biorreator para manter a produção de compostos indólicos em níveis elevados devem estar entre 34 a 36°C para a temperatura, próximo a 3 LPM para a vazão de ar, sendo indiferente o valor de agitação utilizado, desde que este esteja dentro dos limites axiais estudados.

#### **4.4 Ensaios em condições otimizadas e com diferentes meios de cultura**

Os ensaios 1, 2 e 3, apresentados a seguir, foram realizados em condições otimizadas de biorreator e com diferentes meios de cultura, em que foram definidas como condições de biorreator, temperatura de 35°C, aeração de 3 LPM e agitação de 180 RPM. Tais condições foram definidas através do DCCR 03, onde se buscou o melhor ponto de produção de biomassa e de compostos indólicos em uma única fermentação.

##### **4.4.1 Ensaio 1: Meio DYGS com fontes de carbono substituídas por glicerol (5,5 g L<sup>-1</sup>)**

Realizou-se o ensaio 1 em condições otimizadas de biorreator obtidas através do DCCR 03 utilizando como meio de cultura o mesmo adotado durante o DCCR 03, composto por glicerol (5,5 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (2,0 g L<sup>-1</sup>), peptona (1,5 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g L<sup>-1</sup>) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g L<sup>-1</sup>). O resultado da fermentação é apresentado na Figura 41.

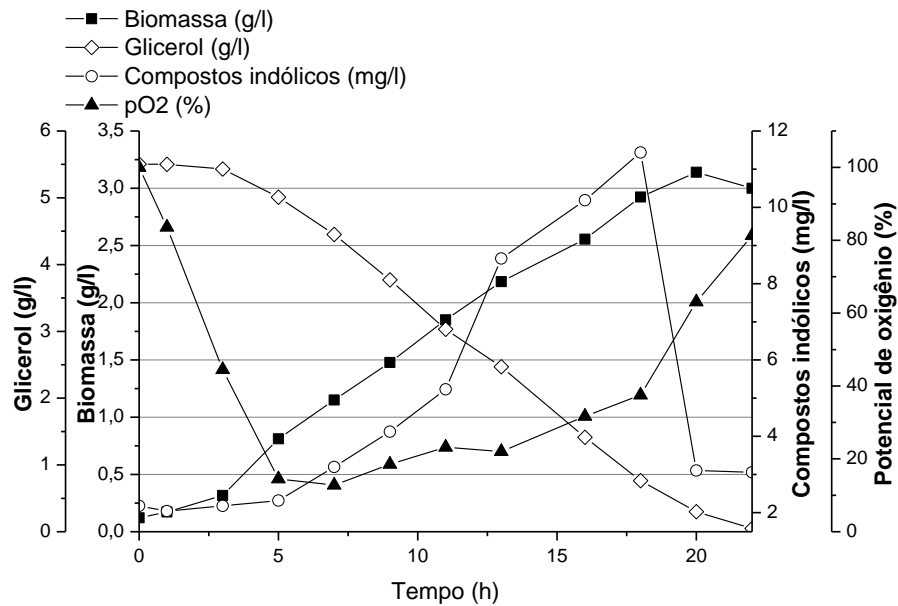


Figura 41: Fermentação em meio DYGS utilizando glicerol como fonte de carbono.

Obteve-se neste ensaio uma produção máxima de biomassa de  $X = 3,140 \text{ g L}^{-1}$ , velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,373 \text{ h}^{-1}$  e produto metabólico máximo de  $P = 11,435 \text{ mg L}^{-1}$ . Foi observado crescimento celular até o tempo  $t = 20 \text{ h}$ , o oxigênio dissolvido manteve-se reduzido desde  $t = 5 \text{ h}$  com  $pO_2 = 14,5 \%$ , tendo seu percentual aumentado no meio de cultura com o fim do crescimento celular. Os compostos indólicos apresentaram produção e acúmulo durante o período em que se observou crescimento celular, com o início da fase de morte dos microrganismos e aumento do oxigênio dissolvido no meio de cultura os compostos indólicos foram rapidamente degradados.

Observou-se ainda no ensaio 1, um rendimento de biomassa por substrato de  $Y_{X/S} = 0,548 \text{ g/g}$ , de produto por células de  $Y_{P/X} = 3,065 \text{ mg/g}$  e de produto por substrato de  $Y_{P/S} = 1,681 \text{ mg/g}$ . Os rendimentos observados no ensaio 1 estão próximos aos melhores rendimentos observados na DCCR 03, principalmente quanto à produção de biomassa.

#### 4.4.2 Ensaio 2: Meio de cultura otimizado

Realizou-se o ensaio 2 nas condições otimizadas selecionadas para biorreator e o meio de cultura utilizado foi o aquele otimizado para *shaker* (Tabela 17).

Os resultados do ensaio 2 são apresentados na Figura 42, onde obteve-se produção máxima de biomassa de  $X = 3,231 \text{ g L}^{-1}$ , velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,345 \text{ h}^{-1}$  e produto metabólico máximo de  $P = 9,028 \text{ mg L}^{-1}$ . Não se observou o consumo total do oxigênio inserido no meio de cultura, que chegou a um mínimo de  $pO_2 = 4,2 \%$ . Os compostos indólicos tiveram sua produção acrescida após o tempo  $t = 5 \text{ h}$  e o máximo de produção foi observado em  $t = 15 \text{ h}$ , ocorrendo sua degradação com a entrada da produção de células na fase estacionária. A produção de células ocorreu linearmente até aproximadamente  $t = 18 \text{ h}$ , após este tempo observou-se a fase de desaceleração do crescimento e a fase estacionária juntamente com o aumento do  $pO_2$  presente no meio de cultura, tendo o crescimento celular cessado em  $t = 23 \text{ h}$ .

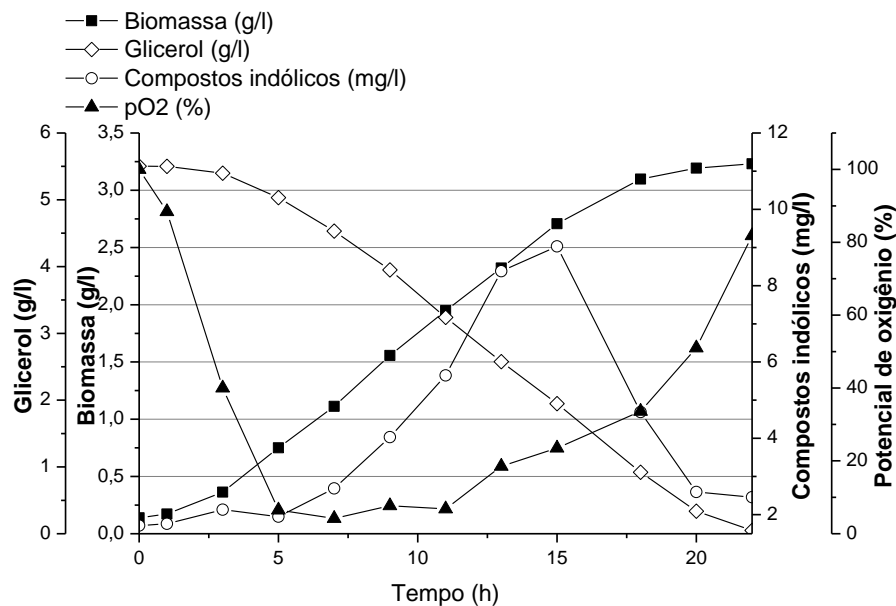


Figura 42: Fermentação em meio otimizado para *shaker*.

Também foram observados os rendimentos de biomassa por substrato de  $Y_{X/S} = 0,561 \text{ g/g}$ , de produto por células de  $Y_{P/X} = 2,363 \text{ mg/g}$  e de produto por substrato de  $Y_{P/S} = 1,327 \text{ mg/g}$ . O ensaio 2 apresentou um rendimento de produção de células elevado, entretanto o rendimento de compostos indólicos ficou abaixo do obtido no ensaio 1. Atribuiu-se a produção inferior de compostos indólicos do ensaio 2 às simplificações aplicadas ao meio de cultura durante a sua otimização, logo, devido à redução dos componentes, o meio tornou-se menos favorável para a produção de compostos indólicos devido a alguma limitação causada a bactéria.

#### 4.4.3 Ensaio 3: Meio de cultura otimizado com glicerol e extrato de levedura aumentados

O ensaio 3 consistiu em aumentar as concentrações de glicerol e de extrato de levedura presentes no meio de cultura otimizado, buscando reduzir as limitações causadas pela diminuição dos componentes do meio de cultura. A concentração utilizada para o glicerol foi de  $8,0 \text{ g L}^{-1}$  e para o extrato de levedura foi de  $4,0 \text{ g L}^{-1}$ . As condições operacionais foram mantidas de acordo com as condições otimizadas selecionadas anteriormente, ou seja, temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , agitação de 180 RPM e aeração de 2,2 LPM.

Os resultados do ensaio 3 são apresentados na Figura 43, onde se obteve uma produção máxima de biomassa de  $X = 4,181 \text{ g L}^{-1}$ , velocidade máxima exponencial de  $\mu_m = 0,447 \text{ h}^{-1}$  e produto metabólico máximo de  $P = 11,764 \text{ mg L}^{-1}$ . Observou-se o consumo total do oxigênio dissolvido próximo a  $t = 5 \text{ h}$ , que se manteve zerado até  $t = 17 \text{ h}$ . A produção de compostos indólicos foi contínua e acumulativa até o tempo  $t = 19 \text{ h}$ , após este período, com o aumento do  $pO_2$  e redução da atividade celular, os compostos indólicos sofreram degradação, sendo reduzidos a  $P = 5,30 \text{ mg L}^{-1}$  em  $t = 21 \text{ h}$ , mantendo-se próximo a este valor durante o resto da fermentação. Constatou-se crescimento celular até próximo ao tempo  $t = 25 \text{ h}$ , após o que a fermentação entrou na fase estacionária.



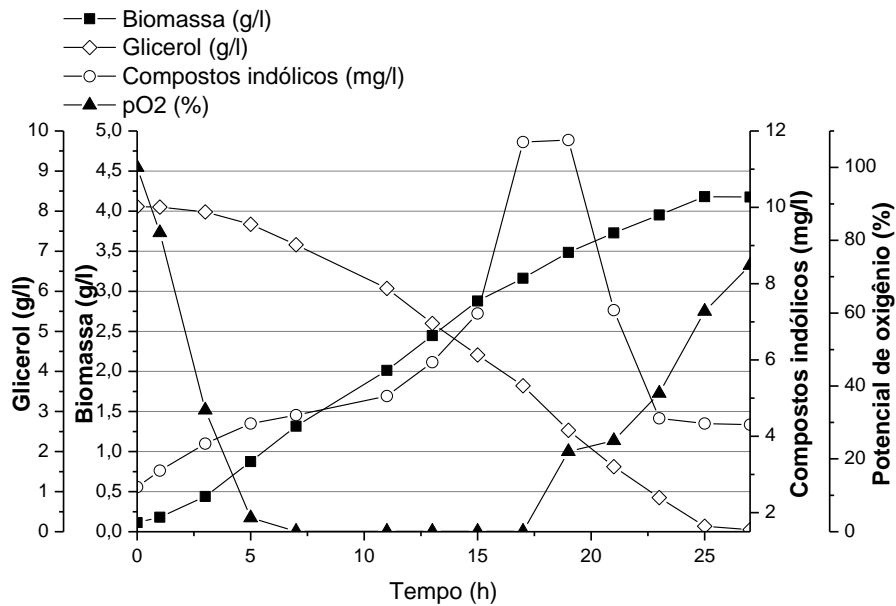


Figura 43: Fermentação em meio otimizado com concentração de glicerol e extrato de levedura aumentados para  $8,0 \text{ g L}^{-1}$  e  $4,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente.

Os rendimentos obtidos no ensaio 3 foram de  $Y_{X/S} = 0,501 \text{ g/g}$  para a biomassa pelo substrato, de  $Y_{P/X} = 2,236 \text{ mg/g}$  para o produto por células e de  $Y_{P/S} = 1,120 \text{ mg/g}$  para o produto pelo substrato. Embora as produções de células e de produtos tenham sido elevadas, foram inferiores àquelas obtidas nos ensaios 1 e 2, indicando possíveis limitações de produção de biomassa e um limite máximo possível para a produção de compostos indólicos pelo microrganismo estudado.

#### 4.5 Modelagem e simulação para a produção de biomassa e compostos indólicos em condições otimizadas em biorreator

Com o objetivo de estudar detalhadamente o comportamento dinâmico deste bioprocessamento através de técnicas de simulação computacional, buscou-se obter um modelo matemático capaz de representar adequadamente as taxas de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados ao processo.

Para tanto, os modelos cinéticos descritos no Capítulo 2, propostos por Monod (1949), Moser (1958), Contois & Fujimoto (1959), Andrews (1968), Levenspiel (1980), Aiba & Shosa (1996), Luedeking & Piret (2003) e Ochota *et al.* (2009) foram incorporados às equações de balanço de massa, resultando em um conjunto de equações diferenciais que foram avaliadas segundo sua capacidade de reproduzir os dados experimentais apresentados nas seções anteriores.

Os parâmetros obtidos para as fermentações realizadas em condições otimizadas, descritas na seção 4.4, são apresentados nas tabelas a seguir. A velocidade máxima na fase exponencial e os fatores de rendimento foram calculados previamente pelas equações descritas no Capítulo 2 e seus valores foram inseridos nos modelos. Os modelos foram avaliados e comparados pela média do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), desvio ao quadrado ( $D^2$ ) e pela média do percentual do desvio padrão residual (DPR%).

Os parâmetros cinéticos obtidos para a fermentação com meio DYGS com fonte de carbono glicerol são apresentados na Tabela 28. Como pode ser verificado,  $K_S$  apresentou valor elevado, ficando evidente que o processo apresenta limitação pelo substrato. Com

exceção do modelo de Aiba & Shosa (1996), todos os demais modelos apresentaram valores próximos para  $K_S$ , validando o resultado obtido.

Tabela 28: Parâmetros cinéticos estimados para fermentação com meio DYGS com fonte de carbono glicerol.

<i>Parâmetros</i>	<i>Monod (1949)</i>	<i>Moser (1958)</i>	<i>Contois &amp; Fujimoto (1959)</i>	<i>Andrews (1969)</i>	<i>Levenspiel (1980)</i>	<i>Aiba &amp; Shosa (1969)</i>
$K_S$ (g/L)	3,72	3,40	3,71	2,42	2,62	6,02
$K_I$ (g/L)	-	-	-	14,66	-	-
$K_P$ (g/L)	-	-	-	-	-	0,02
$n$	-	0,54	-	-	0,09	-
$P_m$ (g/L)	-	-	-	-	$4,96 \times 10^{-3}$	-
$\alpha$	$8,37 \times 10^{-3}$	$7,60 \times 10^{-3}$	$5,28 \times 10^{-3}$	$8,01 \times 10^{-3}$	$7,73 \times 10^{-3}$	$8,30 \times 10^{-3}$
$\beta$ (1/h)	$-8,65 \times 10^{-4}$	$-7,50 \times 10^{-4}$	$-3,65 \times 10^{-4}$	$-8,26 \times 10^{-4}$	$-7,73 \times 10^{-4}$	$-8,66 \times 10^{-4}$
$m_s$ (g <sub>Subst</sub> /g <sub>Cel</sub> h)	$-3,13 \times 10^{-2}$	$-0,67 \times 10^{-2}$	$-2,11 \times 10^{-2}$	$-1,89 \times 10^{-2}$	$-2,37 \times 10^{-2}$	$-2,54 \times 10^{-2}$
$K_L$ (h <sup>-1</sup> )	0,38	0,39	0,31	0,39	0,38	0,39
$m_{O_2}$ (gO <sub>2</sub> /g <sub>Cel</sub> h)	-2,06	-1,89	-1,83	-1,94	-1,95	-1,98
$Y_{X/O}$ (g <sub>Cel</sub> /gO <sub>2</sub> )	0,11	0,14	0,08	0,14	0,12	0,13

O modelo de Andrews (1968) apresentou  $K_S$  inferior aos modelos estudados e o  $K_I$  exibiu um valor significativo de 14,66 g/L, o que indica a ocorrência de inibições pelo substrato em altas concentrações. Os modelos de Levenspiel (1980) e Aiba & Shosa (1996) levam em consideração inibições e limitações caudas pelo produto. O modelo de Levenspiel (1980) apresentou  $K_S$  próximo à maioria dos modelos testados, a potência de inibição do produto ( $n$ ) resultou em valores que tornaram o termo inibição pela concentração máxima do produto significativo na equação, indicando que ocorreram inibições causadas pelo metabólico produzido. Para o modelo de Aiba & Shosa (1996) o  $K_S$  obtido foi superior aos demais modelos, indicando uma possível incoerência com os resultados observados. Além disso,  $K_P$  indicou uma possível limitação causada pela concentração do produto, o valor da constante é da mesma ordem dos valores experimentais do produto metabólico, o que indica possíveis limitações.

Os desvios observados para cada modelo testado para a fermentação com meio DYGS com substituição das fontes de carbono tradicionais por glicerol são apresentados na Tabela 29. Observa-se uma elevada proximidade nos valores médios de  $R^2$ , Desvio<sup>2</sup> e DPR. O modelo de Levenspiel (1980) apresentou a variação explicada média mais significativa, com 95%, juntamente com os menores Desvio<sup>2</sup> e DPR's médios.

Tabela 29: Desvios obtidos para as variáveis dos modelos testados para a fermentação com meio DYGS com fonte de carbono glicerol.

<i>Parâmetros</i>	<i>Monod (1949)</i>	<i>Moser (1958)</i>	<i>Contois &amp; Fujimoto (1959)</i>	<i>Andrews (1969)</i>	<i>Levenspiel (1980)</i>	<i>Aiba &amp; Shosa (1969)</i>
R <sup>2</sup> -X	0,93	0,93	0,99	0,92	0,93	0,92
R <sup>2</sup> -S	0,99	0,97	0,99	0,98	0,98	0,98
R <sup>2</sup> -P	0,90	0,93	0,68	0,93	0,92	0,92
R <sup>2</sup> -O <sub>2</sub>	0,94	0,94	0,93	0,94	0,95	0,94
R <sup>2</sup> -MÉDIO	0,94	0,94	0,90	0,94	0,95	0,94
D <sup>2</sup> -X	3,85	4,11	0,56	4,43	3,64	4,53
D <sup>2</sup> -S	2,39	3,15	3,4	2,99	1,91	3,33
D <sup>2</sup> -P	2,85x10 <sup>-5</sup>	1,82x10 <sup>-5</sup>	9,65x10 <sup>-5</sup>	1,97x10 <sup>-5</sup>	2,52x10 <sup>-5</sup>	2,01x10 <sup>-5</sup>
D <sup>2</sup> -O <sub>2</sub>	42,23	43,45	52,64	44,68	41,32	45,49
D <sup>2</sup> -MÉDIO	12,12	12,68	14,15	13,03	11,72	13,34
DPR%-X	4,61	4,76	1,75	4,95	4,48	5,00
DPR%-S	2,22	2,54	2,64	2,48	1,98	2,62
DPR%-P	6,37	5,09	11,72	5,29	5,98	5,35
DPR%-O <sub>2</sub>	3,99	4,05	4,46	4,11	3,95	4,14
DPR -MÉDIO	4,30	4,11	5,14	4,21	4,10	4,28

O modelo de Contois & Fujimoto (1959) apresentou bons resultados para as variáveis X e S, mais não apresentou a mesma capacidade de descrição com P e O<sub>2</sub>, apresentando uma variação explicada de apenas 68% para o produto. Para os demais modelos todas as variáveis apresentaram desvios próximos.

Os erros obtidos para cada variável, ao longo do tempo, para as simulações do processo podem ser visualizados na Figura 44. Foi possível observar através desta Figura a evolução dos erros simples e percentual ao longo da fermentação para cada variável. Mais uma vez fica evidente a proximidade dos erros obtidos para os modelos, podendo também ser verificado, através da análise do erro, que, quando comparadas aos dados experimentais, os modelos superestimaram as previsões em alguns períodos e em outros instantes subestimaram esses valores.

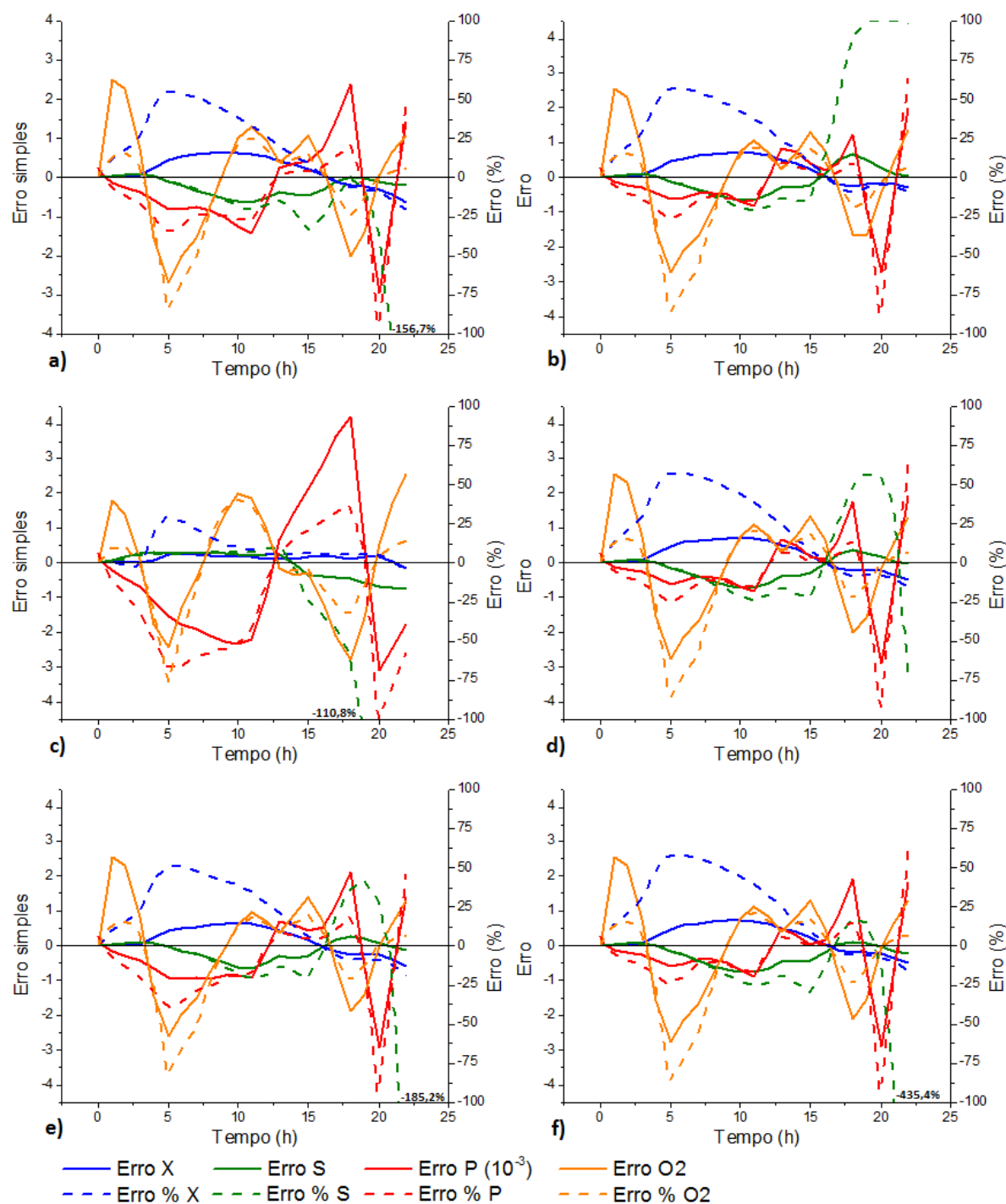


Figura 44: Erros obtidos para cada variável ao longo do tempo para as simulações do processo utilizando o meio de cultura DYGS com fonte de carbono glicerol para os modelos **a)** Monod, **b)** Moser, **c)** Contois & Fujimoto, **d)** Andrews, **e)** Levenspiel e **f)** Aiba & Shosa.

Nota-se que a biomassa apresenta maiores erros de predição nas primeiras 10h de fermentação, sendo reduzido o erro ao passar deste tempo. O substrato apresenta, durante o maior tempo da fermentação, baixos valores de erros, entretanto, ao final da fermentação há um elevado aumento do erro, ultrapassando, para alguns modelos, 100% do valor da variável.

Observou-se também, para erros de predição do produto e do oxigênio, uma oscilação entre valores positivos e negativos ao longo da fermentação, não apresentando uma tendência.

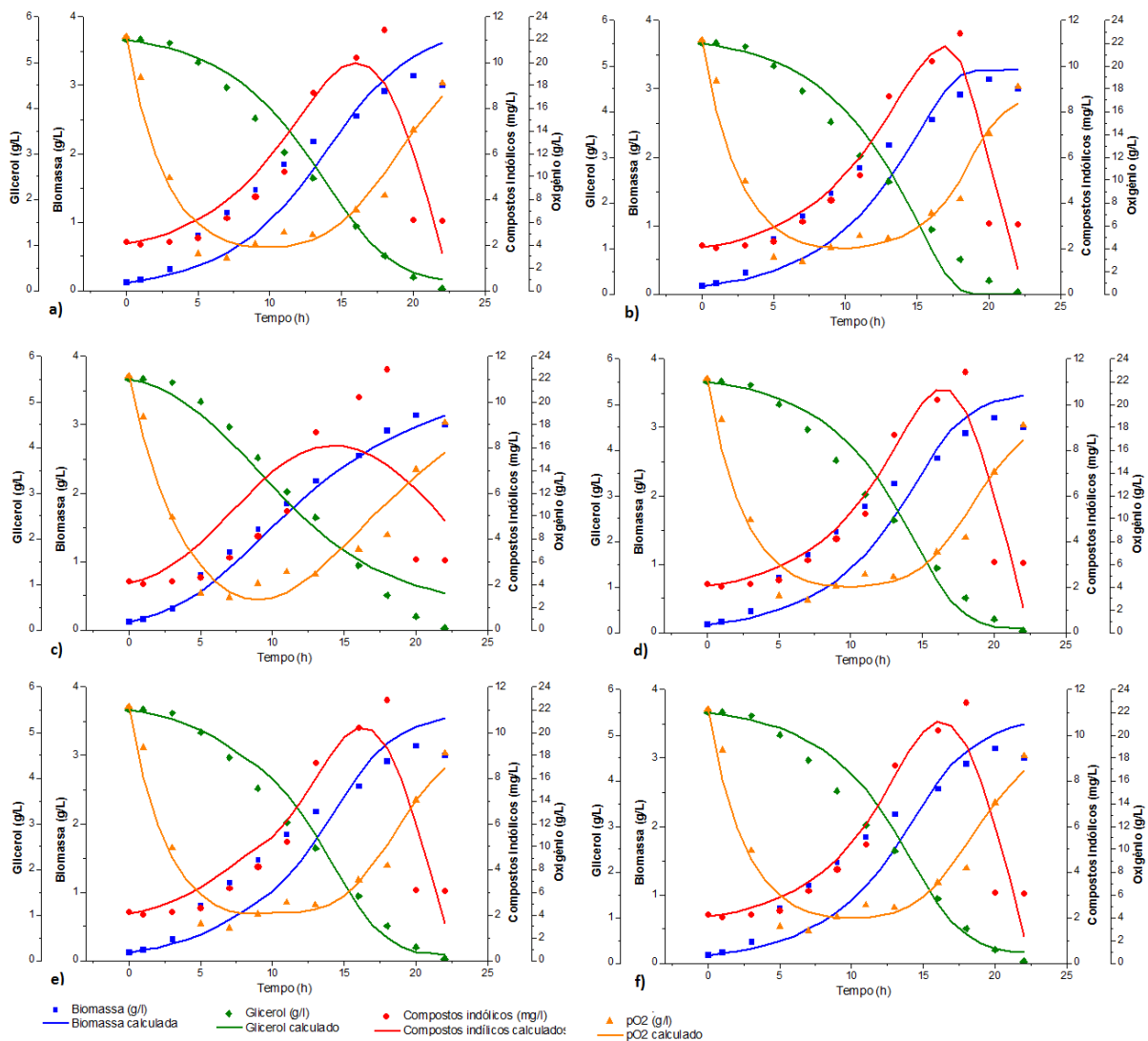


Figura 45: Resultado das simulações para a fermentação utilizando o meio de cultura DYGS com fonte de carbono glicerol para os modelos **a)** Monod, **b)** Moser, **c)** Contois & Fujimoto, **d)** Andrews, **e)** Levenspiel e **f)** Aiba & Shosa.

De modo geral, é possível observar através da Figura 45 certa similaridade na qualidade das previsões dos modelos testados. O modelo de Contois & Fujimoto (1959) apresentou visualmente o pior ajuste para o produto, corroborando os resultados apresentado na Tabela 29. Os demais modelos exibiram boa capacidade de representação dos dados experimentais de biomassa, substrato e oxigênio. O modelo de Moser (1958) foi o que melhor representou a evolução temporal da biomassa na fase final de crescimento, entretanto todos os modelos superestimaram a produção final de células e não descreveram com eficiência a fase de maior velocidade de produção de biomassa.

Observou-se que os modelos apresentaram dificuldade para representar a produção de compostos indólicos, sobretudo nas fermentações onde houve degradação, tendo em vista o comportamento altamente não linear apresentado por este produto e também devido a sua correlação com mais de uma variável de processo.

Os resultados obtidos na fermentação com meio o otimizado são apresentados na Tabela 30. Os valores para  $K_S$  foram próximos a 3,0, com exceção do modelo de Levenspiel (1980), que apresentou valor inferior aos demais para este parâmetro, assim como observado

na fermentação anterior. A constante de inibição pelo substrato,  $K_I$ , obtida pelo modelo de Andrews (1968) foi elevada, significando que a inibição pelo substrato foi baixa. A inibição pelo produto fornecida pelo modelo de Levenspiel (1980) foi mais significativa do que a observada na fermentação anterior e o modelo de Aiba & Shosa (1996) apresentou um valor para este parâmetro próximo ao obtido na última fermentação.

Tabela 30: Parâmetros cinéticos estimados para fermentação com meio de cultura otimizado para a produção de *H. seropedicae*.

<i>Parâmetros</i>	<i>Monod (1949)</i>	<i>Moser (1958)</i>	<i>Contois &amp; Fujimoto (1959)</i>	<i>Andrews (1969)</i>	<i>Levenspiel (1980)</i>	<i>Aiba &amp; Shosa (1969)</i>
$K_S$ (g/L)	3,23	3,44	3,18	3,19	1,24	3,79
$K_I$ (g/L)	-	-	-	485,82	-	-
$K_P$ (g/L)	-	-	-	-	-	0,02
$n$	-	1,38	-	-	0,29	-
$P_m$ (g/L)	-	-	-	-	$6,88 \times 10^{-3}$	-
$\alpha$	$7,98 \times 10^{-3}$	$7,42 \times 10^{-3}$	$5,13 \times 10^{-3}$	$5,46 \times 10^{-3}$	$6,15 \times 10^{-3}$	$4,98 \times 10^{-3}$
$\beta$ (1/h)	$-9,28 \times 10^{-4}$	$-8,15 \times 10^{-4}$	$-4,34 \times 10^{-4}$	$-5,43 \times 10^{-4}$	$-6,02 \times 10^{-4}$	$-4,92 \times 10^{-4}$
$m_s$ (g <sub>Subst</sub> /g <sub>Cel</sub> h)	$-2,17 \times 10^{-2}$	$-3,44 \times 10^{-2}$	$-2,84 \times 10^{-2}$	$-1,24 \times 10^{-2}$	$-1,70 \times 10^{-2}$	$-2,34 \times 10^{-2}$
$K_L$ (h <sup>-1</sup> )	0,36	0,35	0,29	0,36	0,33	0,36
$m_{O_2}$ (g <sub>O<sub>2</sub></sub> /g <sub>Cel</sub> h)	-2,01	-2,07	-1,93	-1,96	-2,26	-1,66
$Y_{X/O}$ (g <sub>Cel</sub> /g <sub>O<sub>2</sub></sub> )	0,11	0,10	0,07	0,11	0,07	0,14

Os resultados obtidos para os desvios de cada modelo em relação aos dados experimentais são apresentados na Tabela 31. Observa-se a melhor média das variações explicadas pelo o modelo de Aiba & Shosa (1996), com 92%, já o modelo de Levenspiel (1980) apresentou os melhores resultados para o Desvio<sup>2</sup>-médio e DPR-médio. Todos os modelos apresentaram desvios elevados para o produto, com R<sup>2</sup> abaixo de 90 %, indicando a dificuldade da modelagem desta variável.

A análise dos resultados exibidos na Figura 46 permite concluir que os modelos apresentaram menor erro para as variáveis  $X$  e  $S$ . Para a variável  $X$ , o maior índice de erro observado está durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, já para  $S$ , o modelo apresentou erros que extrapolaram 100 % do valor relativo à variável no final do ensaio. Este fato é justificado pelos baixos valores de  $S$  ao final da fermentação, onde mesmo com o erro simples sendo baixo, quando comparado à variável, o erro torna-se elevado.

Os resultados das simulações das variáveis  $P$  e  $O_2$  apresentaram erros que oscilaram bastante durante o ensaio, destacando a dificuldade do modelo em descrever a queda repentina apresentada pelo  $O_2$  durante a fermentação, resultando em erros percentuais que extrapolam 100 % do valor desta variável. Para a variável  $P$ , observaram-se erros elevados durante toda a fermentação, principalmente ao final do ensaio, onde ocorreu a degradação do produto. Este fato corrobora a dificuldade dos modelos captarem a dinâmica desta variável.

Tabela 31: Desvios obtidos para as variáveis dos modelos testados para a fermentação com meio de cultura otimizado para a produção de *H. seropedicae*.

<i>Parâmetros</i>	<i>Monod (1949)</i>	<i>Moser (1958)</i>	<i>Contois &amp; Fujimoto (1959)</i>	<i>Andrews (1969)</i>	<i>Levenspiel (1980)</i>	<i>Aiba &amp; Shosa (1969)</i>
R <sup>2</sup> -X	0,94	0,95	0,99	0,95	0,96	0,96
R <sup>2</sup> -S	0,99	0,99	0,98	0,99	1,00	0,98
R <sup>2</sup> -P	0,65	0,75	0,76	0,75	0,71	0,82
R <sup>2</sup> -O <sub>2</sub>	0,93	0,93	0,94	0,93	0,96	0,92
R <sup>2</sup> -MÉDIO	0,88	0,91	0,91	0,91	0,91	0,92
D <sup>2</sup> -X	3,17	2,68	0,60	3,02	1,99	2,70
D <sup>2</sup> -S	0,9	1,06	3,71	1,08	0,31	3,42
D <sup>2</sup> -P	6,93x10 <sup>-5</sup>	3,78x10 <sup>-5</sup>	3,87x10 <sup>-5</sup>	3,49x10 <sup>-5</sup>	4,20x10 <sup>-5</sup>	2,45x10 <sup>-5</sup>
D <sup>2</sup> -O <sub>2</sub>	68,55	68,13	60,78	69,86	44,68	80,86
D <sup>2</sup> -MÉDIO	18,16	17,97	16,27	18,49	11,75	21,75
DPR%-X	3,97	3,65	1,72	3,88	3,15	3,67
DPR%-S	1,27	1,38	2,59	1,40	0,75	2,48
DPR%-P	12,19	9,00	9,11	8,65	9,49	7,24
DPR%-O <sub>2</sub>	6,86	6,84	6,46	6,93	5,54	7,45
DPR -MÉDIO	6,08	5,22	4,97	5,21	4,73	5,21

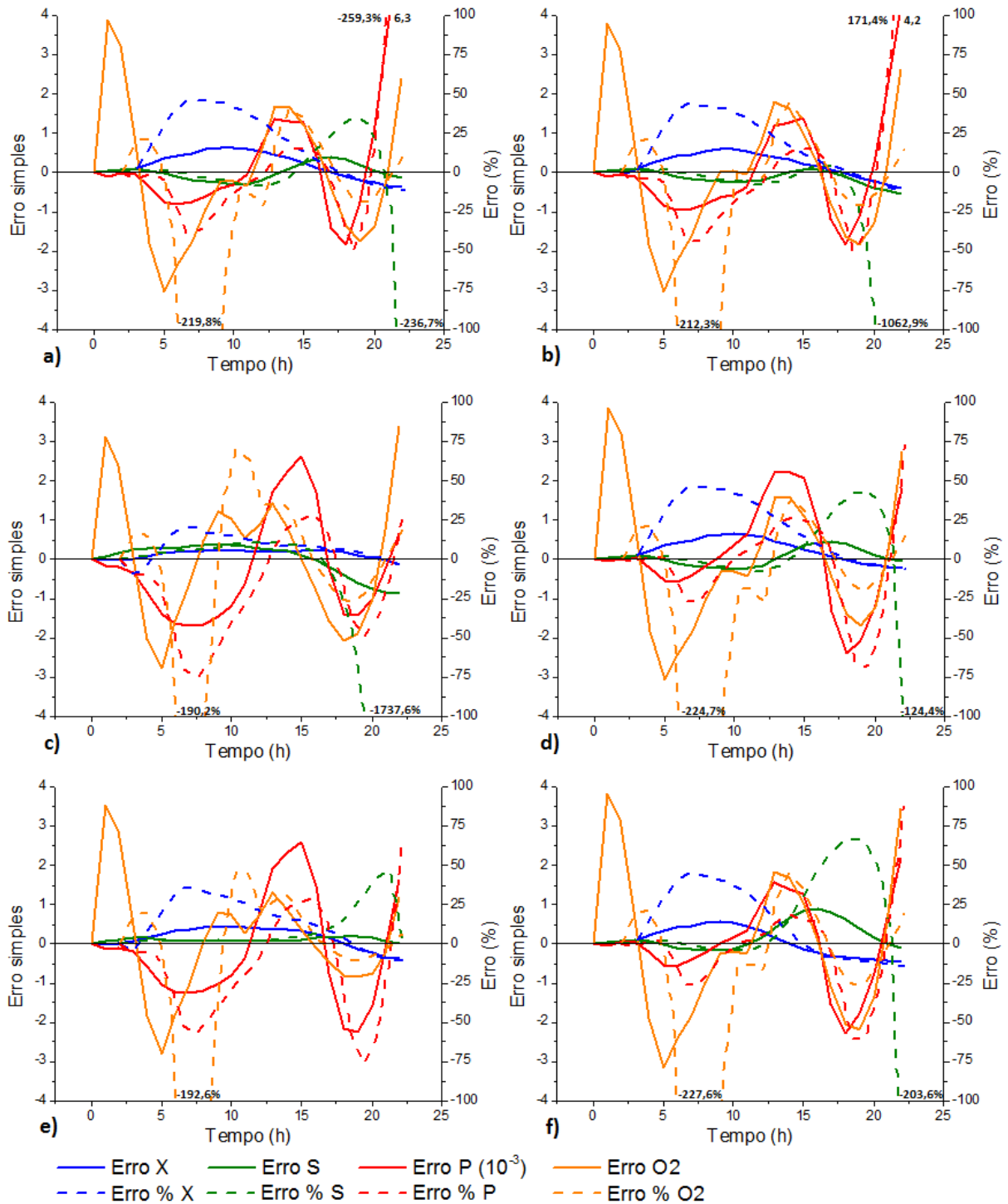


Figura 46: Erros obtidos para cada variável ao longo do tempo para as simulações do processo utilizando o meio de cultura otimizado para a produção de *H. seropedicae* para os modelos **a)** Monod, **b)** Moser, **c)** Contois & Fujimoto, **d)** Andrews, **e)** Levenspiel e **f)** Aiba & Shosa.

Apresentam-se na Figura 47 os resultados da simulação do processo através dos modelos avaliados e a comparação com os dados experimentais. É possível concluir que, de modo geral, os modelos foram capazes de descrever satisfatoriamente a tendência das principais variáveis deste processo fermentativo. Pode-se perceber que o modelo de Contois & Fujimoto (1959) foi capaz de descrever bem os perfis de *X* e *S*, porém este modelo não apresentou o mesmo desempenho para descrever *P* adequadamente. No entanto, todos os



modelos apresentaram dificuldades para modelar esta variável, reforçando a dificuldade de se obter um modelo matemático que seja capaz de capturar adequadamente o efeito de todas as variáveis de processo sobre a dinâmica de formação dos compostos indólicos, sobretudo o ponto máximo de produção e a fase de degradação do produto.

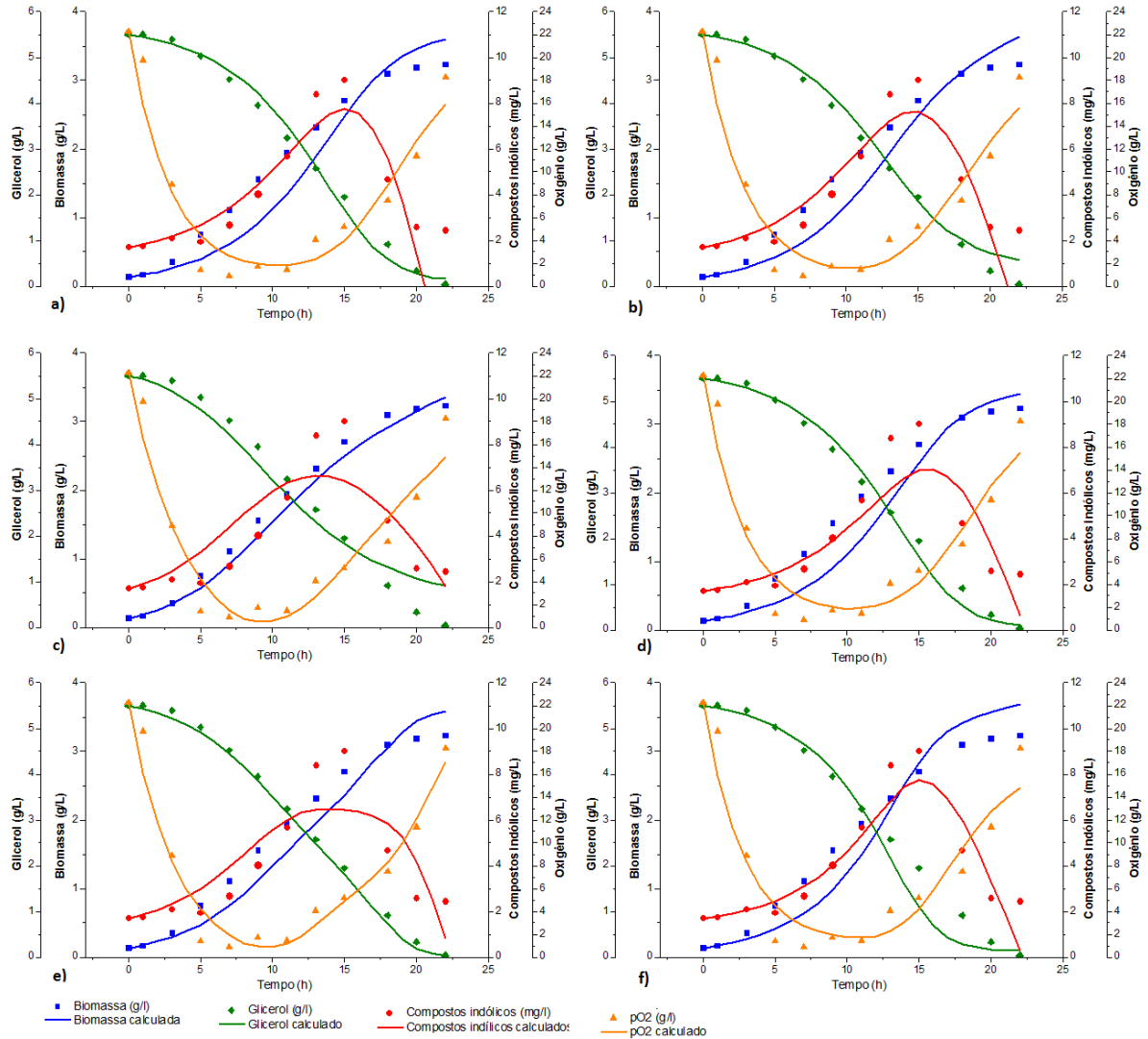


Figura 47: Resultado das simulações para a fermentação utilizando o meio de cultura otimizado para a produção de *H. seropedicae* para os modelos a) Monod, b) Moser, c) Contois & Fujimoto, d) Andrews, e) Levenspiel e f) Aiba & Shosa.

Os parâmetros cinéticos para a fermentação com meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados são apresentados na Tabela 32. A limitação pelo substrato  $K_S$  observada para este ensaio foi superior aos apresentados anteriormente, este fato se deve à elevada concentração do substrato utilizado. Os valores deste parâmetro ficaram em torno de 7,0 para a maioria dos modelos (Monod, Moser, Andrews e Levenspiel), enquanto os modelos de Contois & Fujimoto (1959) e Aiba & Shosa (1996) exibiram resultados próximos a 12,0, indicando uma possível inconsistência entre os modelos. O modelo de Andrews (1968) apresentou um elevado valor para  $K_I$ , indicando baixa inibição pelo substrato, já os modelos de Levenspiel (1980) e Aiba & Shosa (1996) indicam uma possível inibição causada pelo produto em suas concentrações mais elevadas.

Tabela 32: Parâmetros cinéticos estimados para fermentação com meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados para 8,0 g L<sup>-1</sup> e 4,0 g L<sup>-1</sup>.

<i>Parâmetros</i>	<i>Monod (1949)</i>	<i>Moser (1958)</i>	<i>Contois &amp; Fujimoto (1959)</i>	<i>Andrews (1969)</i>	<i>Levenspiel (1980)</i>	<i>Aiba &amp; Shosa (1969)</i>
K <sub>S</sub> (g/L)	7,76	7,76	11,44	7,65	7,04	12,51
K <sub>I</sub> (g/L)	-	-	-	266,53	-	-
K <sub>P</sub> (g/L)	-	-	-	-	-	0,02
n	-	1,12	-	-	0,06	-
P <sub>m</sub> (g/L)	-	-	-	-	5,53 x10 <sup>-3</sup>	-
α	4,88 x10 <sup>-3</sup>	5,16 x10 <sup>-3</sup>	5,23 x10 <sup>-3</sup>	4,94 x10 <sup>-3</sup>	5,69 x10 <sup>-3</sup>	9,29 x10 <sup>-3</sup>
β (1/h)	-4,42 x10 <sup>-4</sup>	-4,69 x10 <sup>-4</sup>	-2,90 x10 <sup>-4</sup>	-4,55 x10 <sup>-4</sup>	-5,15 x10 <sup>-4</sup>	-11,26 x10 <sup>-4</sup>
ms (g <sub>Subst</sub> /g <sub>Cel</sub> h)	-2,93 x10 <sup>-2</sup>	-3,16 x10 <sup>-2</sup>	2,49 x10 <sup>-2</sup>	-3,27 x10 <sup>-2</sup>	-2,22 x10 <sup>-2</sup>	-4,86 x10 <sup>-2</sup>
K <sub>L</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,36	0,36	0,26	0,36	0,37	0,37
mO <sub>2</sub> (gO <sub>2</sub> /g <sub>Cel</sub> h)	-1,28	-1,35	-1,61	-1,28	-1,27	-1,44
Y <sub>X/O</sub> (g <sub>Cel</sub> /gO <sub>2</sub> )	0,12	0,11	0,06	0,12	0,14	0,13

A variação média explicada observada foi inferior a 90% nos modelos de Contois & Fujimoto (1959) e Aiba & Shosa (1996), já os outros modelos apresentaram valores superiores a 90%. Os modelos não apresentaram um bom ajuste para o produto, com um máximo de 81% para o modelo de Levenspiel (1980). Já os DPR's observados para essa fermentação foram superiores aos demais.

Tabela 33: Desvios obtidos para as variáveis dos modelos testados para a fermentação com meio DYGS com fonte de carbono glicerol.

<i>Parâmetros</i>	<i>Monod (1949)</i>	<i>Moser (1958)</i>	<i>Contois &amp; Fujimoto (1959)</i>	<i>Andrews (1969)</i>	<i>Levenspiel (1980)</i>	<i>Aiba &amp; Shosa (1969)</i>
R <sup>2</sup> -X	0,94	0,94	1,00	0,94	0,93	0,90
R <sup>2</sup> -S	0,98	0,98	0,97	0,98	0,99	0,99
R <sup>2</sup> -P	0,80	0,79	0,54	0,80	0,81	0,61
R <sup>2</sup> -O <sub>2</sub>	0,96	0,96	0,95	0,96	0,97	0,97
R <sup>2</sup> -MÉDIO	0,92	0,92	0,86	0,92	0,93	0,86
D <sup>2</sup> -X	8,07	7,35	13,85	8,74	7,85	12,57
D <sup>2</sup> -S	7,90	4,52	10,67	7,06	6,00	4,08
D <sup>2</sup> -P	3,72x10 <sup>-5</sup>	3,89x10 <sup>-5</sup>	9,32x10 <sup>-5</sup>	3,70x10 <sup>-5</sup>	3,59x10 <sup>-5</sup>	1,70x10 <sup>-5</sup>
D <sup>2</sup> -O <sub>2</sub>	40,21	39,66	52,25	39,87	40,65	43,44
D <sup>2</sup> -MÉDIO	14,05	12,88	19,19	13,92	13,63	15,02
DPR%-X	4,68	4,46	6,13	4,87	4,61	5,84
DPR%-S	1,99	1,51	2,32	1,88	1,74	1,43
DPR%-P	4,87	4,97	7,70	4,85	4,78	10,40
DPR%-O <sub>2</sub>	15,45	15,35	17,62	15,39	15,54	16,06
DPR -MÉDIO	6,75	6,57	8,44	6,75	6,67	8,43

Os melhores resultados observados foram para o modelo de Moser (1958) e Levenspiel (1980), que obtiveram  $R^2$ -médio de 0,92 e 0,93;  $D^2$ -médio de 12,88 e 13,63 e DPR-médio de 6,57 e 6,67, respectivamente. Todos os modelos testados apresentaram desempenho abaixo do esperado para a variável  $P$ , assim como para os ensaios anteriores.

Os erros simples e percentuais, relativos a cada variável ao longo do tempo para o respectivo ensaio são apresentados na Figura 48. Observa-se que para a variável  $O_2$  ocorreram percentuais de erros muito elevados, este fato ocorreu devido ao valor experimental desta variável ser zero no período de tempo de  $t=7$  a 17 h, causando uma indeterminação numérica.

Pode-se observar o maior percentual de erro para  $X$  na fase exponencial da fermentação, com gradativa redução no final. Para  $S$  o maior erro ocorre para valores experimentais reduzidos, proporcionando um elevado erro percentual. As variáveis  $P$  e  $O_2$  sofreram constantes oscilações entre erros positivos e negativos, indicando uma elevada dificuldade dos modelos em descrever estas variáveis.

Os resultados das simulações desta fermentação utilizando o meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados são exibidos na Figura 49. Mais uma vez ficou evidente a dificuldade de se obter um bom ajuste para a produção de compostos indólicos, principalmente na região em que há degradação do produto. A fase de crescimento celular simulada esteve abaixo dos dados experimentais e a biomassa final foi superestimada.

O consumo do substrato e oxigênio durante as fermentações foram satisfatoriamente descritos pelos modelos, apresentando visualmente o melhor ajuste. O modelo de Contois & Fujimoto (1959) apresentou o pior desempenho na capacidade de descrição dos dados experimentais, assim como nos ensaios anteriores.

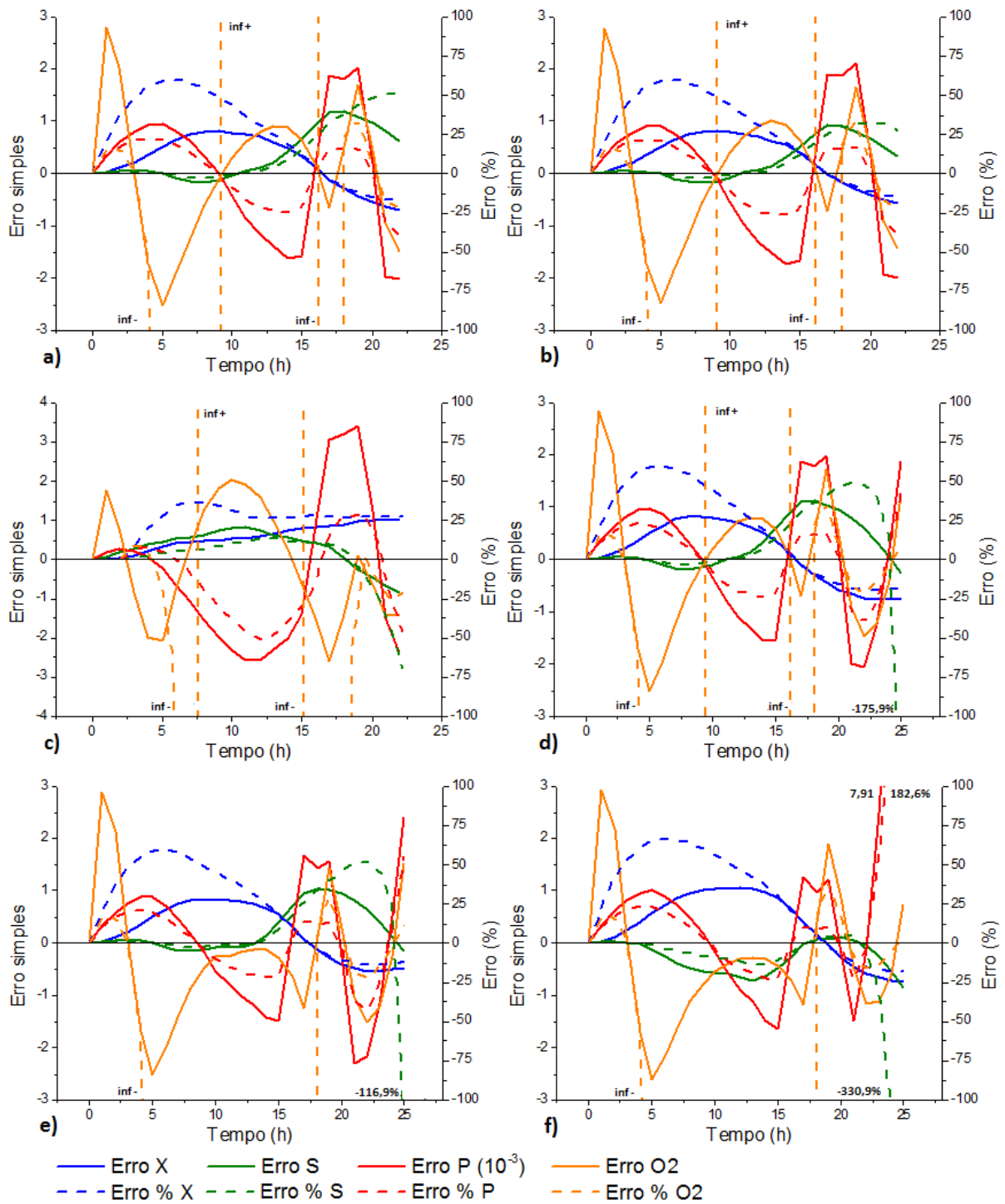


Figura 48: Erros obtidos para cada variável ao longo do tempo para as simulações do processo utilizando o meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados para  $8,0 \text{ g L}^{-1}$  e  $4,0 \text{ g L}^{-1}$  para os modelos **a)** Monod, **b)** Moser, **c)** Contois & Fujimoto, **d)** Andrews, **e)** Levenspiel e **f)** Aiba & Shosa.

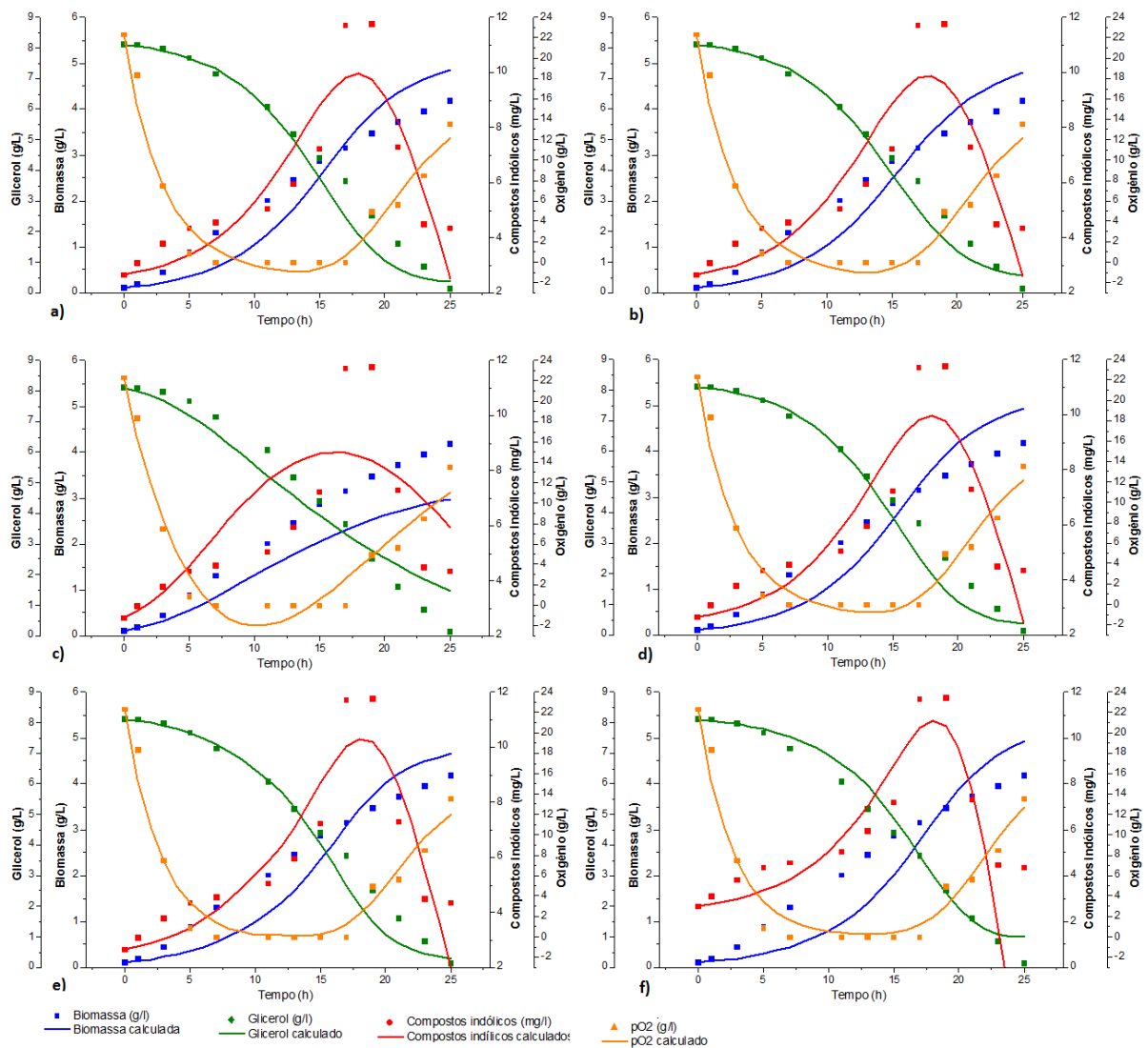


Figura 49: Resultado das simulações para a fermentação utilizando o meio de cultura otimizado com concentrações de glicerol e extrato de levedura aumentados para  $8,0 \text{ g L}^{-1}$  e  $4,0 \text{ g L}^{-1}$  com os modelos **a)** Monod, **b)** Moser, **c)** Contois & Fujimoto, **d)** Andrews, **e)** Levenspiel e **f)** Aiba & Shosa.

Os parâmetros relacionados à formação do produto apresentaram em todas as fermentações e modelos testados nesta etapa do trabalho a constante  $\alpha$  positiva e superior ao módulo de  $\beta$ , indicando que o produto tem sua formação significativamente associada à produção de células.

Os baixos valores para  $m_s$  obtidos nos modelos apontam que o consumo de substrato está relacionado de forma mais expressiva ao crescimento celular do que à sua manutenção.

O coeficiente de transferência de oxigênio ao meio de cultura,  $K_L$ , exibiu valores similares em todos os ensaios e modelos. Como este parâmetro está relacionado às propriedades reológicas do meio de cultura, este resultado indica porque este parâmetro pouco se alterou com as variações das composições dos meios fermentados.

O consumo de oxigênio para manutenção de células,  $mO_2$ , apresentou maiores resultados na terceira fermentação, sendo este fato explicado pela maior produção de biomassa durante este ensaio.

Para que os modelos utilizados apresentem a capacidade de descrever os perfis das variáveis do processo fermentativo, observou-se a necessidade de se levar em consideração as inibições e limitações causadas pelo substrato e pelo produto. As equações de Monod (1949), Moser (1958), Contois & Fujimoto (1959) apresentam relações mais simples entre o substrato e a taxa de crescimento celular, considerando apenas a limitação causada por este, logo, modelos que levem em consideração um maior número de parâmetros, como os de Andrews (1968), Levenspiel (1980), Aiba & Shosa (1996), são mais adequados para se descrever o processo.

Os modelos testados para descrever as dinâmicas desse processo são principalmente utilizados na representação de ensaios fermentativos conduzidos por leveduras, sobretudo para a produção de etanol. Em tais fermentações, não se observa a degradação do produto final, o que explica a dificuldade em se obter uma boa descrição dos dados experimentais do produto durante as simulações com a bactéria em estudo no trabalho. Este fato deixa evidente a necessidade de se adaptar os modelos testados ou propor modelos mais adequados para descrever o metabolismo dessa bactéria.

## 5 CONCLUSÕES

Como resultado final deste trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

### **Aprimoramento do meio de cultura para a produção de *H. seropedicae***

Através das etapas e otimização do meio de cultura pode-se reduzir os componentes do meio, favorecendo a produção de células. O novo meio foi simplificado de 7 componentes presentes no meio DYGS a apenas 4 componentes, com composição dada por 5,5 g L<sup>-1</sup> de glicerol, 2,8 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

O meio otimizado apresentou capacidade de produção de células 87,5% superior ao meio DYGS, o custo por litro do novo meio é de R\$1,34 e o custo por grama de células de R\$0,44. Esses valores representam uma redução de 49,8% no custo do meio de cultura e 73,6% no custo da produção de biomassa quando comparado ao meio DYGS.

### **Otimização das condições de fermentação em biorreator**

Observou-se nas fermentações em biorreator o elevado efeito da temperatura e da aeração sobre a produção de biomassa e compostos indólicos. Para a biomassa, a máxima produção de células foi observada para temperaturas na faixa de 34-38°C, aeração na faixa de 0-4 LPM e agitação superior a 150 RPM. Os compostos indólicos em máxima produção foram observados em temperaturas de 34-36°C, aeração próxima a 3 LPM e não foi observado um ponto ótimo de agitação.

A temperatura interferiu diretamente na capacidade de multiplicação celular e na produção de metabólitos. Entretanto, em temperaturas próximas aos pontos axiais o crescimento microbiano é afetado negativamente e a produção de metabólitos é reduzida.

A aeração apresentou uma extensa faixa de trabalho para a produção de células, embora os resultados do DCCR indiquem a possibilidade de redução da aeração próxima à zero. A aeração afeta a velocidade de produção de células, visto que em fermentações pouco aeradas a produção de células foi mais lenta. Os compostos indólicos apresentaram uma faixa de produção estreita, onde o microrganismo não encontra condições propícias para produzir compostos indólicos em aerações reduzidas, já em elevadas aerações, aparentemente ocorre à degradação do produto metabólico.

A agitação apresentou baixo efeito sobre a produção de biomassa e compostos indólicos, os efeitos significativos foram observados em agitações baixas ou acima dos níveis axiais testados. Este fato se dá provavelmente devido às condições hidráulicas a que o meio de cultura se encontra, visto que mesmo em baixas agitações, o meio estará em regime turbulento, o que proporciona a total dissolução dos componentes do meio e do oxigênio.

O produto metabólico apresentou ligação direta com a produção de células. Observou-se que a partir da redução da produção de células, a produção de compostos indólicos cessou e, em algumas condições, foi rapidamente degradado. A degradação do produto ocorreu pelo excesso de oxigênio em meio de cultura ou pelo seu consumo para a manutenção de células em condições de baixa concentração de substrato.

Os ensaios se apresentaram propícios à produção de espuma com notória perturbação no controle do pH e entupimento nos filtros de ar. Para controle da espuma foi necessária a utilização de antiespumante em todas as fermentações.

A fermentação de *H. seropedicae* em biorreator apresentou elevada capacidade de produção de biomassa e de compostos indólicos. Através do DCCR, foi possível relacionar a produção de biomassa, compostos indólicos, consumo de glicerol e oxigênio dissolvido às condições operacionais do biorreator de temperatura, aeração e agitação, sendo possível determinar a melhor faixa de produção.

### **Modelagem e simulação de ensaios fermentativos**

As simulações foram realizadas para as fermentações ocorridas em biorreator em condições otimizadas e os modelos testados foram capazes de descrever, ao menos qualitativamente, o comportamento dinâmico do processo em estudo. Entretanto, em algumas condições operacionais, os modelos não apresentaram bom desempenho na representação das variáveis de processo.

Observou-se uma dificuldade elevada em se obter o perfil simulado dos dados experimentais do produto, sobretudo na fase final de crescimento do microrganismo que, com o esgotamento das fontes de carbono, o produto apresentou degradação. Dessa forma, os modelos não apresentaram capacidade de descrever satisfatoriamente os dados experimentais obtidos durante este período.

A modelagem matemática indicou que o processo de produção de células sofre inibição pelo substrato mais significativa no meio de cultura DYGS com fonte de carbono glicerol. Todas as fermentações apresentam limitações causadas pelo substrato e pelo produto quando estes estavam em altas concentrações.



## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para a continuidade e complementação deste trabalho, recomenda-se extrapolar os limites utilizados para a agitação. Dentro dos limites utilizados, a agitação não apresentou efeito significativo, de modo que a elevação de seu nível à acima dos testados neste trabalho possa representar a obtenção novas condições ótimas de produção em biorreator.

Sugere-se ainda uma análise mais detalhada do metabólito AIA (ácido indol-3-acético). Tendo em vista que o método analítico utilizado quantifica os compostos indólicos totais presentes no caldo fermentado, uma análise mais detalhada em HPLC pode detectar qual é o composto indólico de maior produção e em quais condições o AIA terá sua produção favorecida.

Propõe-se também fazer-se uso de modelos matemáticos compartimentados (*piecewise-defined function*), visto que este método utiliza mais de um modelo cinético para descrever uma determinada variável, sendo capaz de descrever de forma mais precisa o seu comportamento.

## 7 REFERÊNCIAS

- AIBA, S. and SHODA, M. Reassessment of product inhibition in alcohol fermentation. J. Ferment. Technol., v. 47, p.790-794, 1969.
- AIBA, S., SHODA, M. and NAGATANI, M. Kinetics of product formation in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v. 10, p.845-864, 1968.
- ANDREWS, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate. Biotechnology and Bioengineering, v.10, p.707-723, 1968
- ANDRIETTA, S. R. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica contínua em Escala Industrial. Campinas: FEA; UNICAMP, 1994. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994.
- Associação Nacional para a Difusão de Adubos (ANDA). Investimentos no Brasil. Julho, 2011. Disponível em: <[www.anda.org.br](http://www.anda.org.br)>. Acesso em: 15 de maio de 2014.
- ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R.; MAUGERI FILHO, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. Applied biochemistry and biotechnology. v 91-93. p 353-364, 2001.
- AUGUSTO, E. F. P., BONOMI, A., GIUDICI, R. Estratégias para ajuste de parâmetros em modelos de processos fermentativos inibidos pelo substrato e produto. Estudo de casos. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S. A. Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, 1994. Anais. São Paulo SP, Brasil, 1994.
- BACA, B.E.; SOTO-URZUA, L.; XOCHIHUA-CORONA, Y.G.; CUERVO-GARCIA, A. Characterization of two aromatic amino acid aminotransferases and production of indole acetic acid in *Azospirillum* strains. Soil Biology and Biochemistry, v.26, p.57-63, 1994.
- BALDANI, J. I., CARUSO, L., BALDANI, V. L., GOI, S. R., DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biology and Biochemistry, 1997. 29: 911-922.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. In: international symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, 1995, Angra dos Reis. Abstracts... Angra dos Reis: The National Center for Agrobiological Research (Embrapa-CNPAB), 1995. p.53-54.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.
- BALDANI, V.L.D.; Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma novobactéria

- diazotrófica. 1996, 223f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.
- BALOTA, E. L., LOPES, E. S., DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1997- 32: 627-639.
- BASTIÁN, F., COHEN, A., PICCOLI, P., LUNA, V., BARALDI, R., BOTTINI, R., Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.* v. 24, p. 7-11, 1998.
- BORGES, P. C. S. Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada. UFU, Dissertação de Mestrado – Uberlândia, MG, 2008
- BRANDL M.T.; LINDOW S.E. Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *Mol Plant–Microbe Interact.* v.10. p.499–505, 1997.
- ÇALIK, P., YILGÖR, P., AYHAN, P., & DEMIR, A. S. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. *Chemical engineering science*, 59(22), 5075-5083, 2004.
- CAMPOS, B. C. de; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante Graminate nas culturas de trigo e aveia. *Revista Ciência Rural.* v 29. p. 401-407, 1999.
- CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid state fermentation systems. *Process. Biochem.* 15:2-7. 1980.
- CARRO L.; RIVAS R.; LEÓN-BARRIOS M.; GONZÁLEZ-TIRONTE M.; VELÁSQUEZ E.; VALVERDE A.; *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and 2 *Herbaspirillum soli* sp. nov., three new species isolated in Tenerife (Canary Islands). Spain, 2012.
- CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C. DOS S.; JAIME JOSÉ HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R. & CHARLES FABIANO OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.4, n.1, p.129-132, 2000.
- COÊLHO, D. Gusmão. Modelagem e otimização do processo de síntese do ácido propanóico via fermentação do glicerol. UNICAMP, Dissertação de Mestrado - Campinas, SP, 2011.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. -safra 2012/2013 v.1- Brasília: Conab, 2013 - Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 05 de agosto de 2014
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. -safra 2013/2014 v.1- Brasília: Conab, 2014 - Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 28 de setembro de 2015

- CONTOIS, D.E. Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures. *J. Gen. Microbiol.*, v. 21, .40-50, 1959
- COSTACURTA A.; MAZZAFERA P.; ROSATO Y.B. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts. *FEMS Microbiol Lett.* v. 159. p.215–220, 1998.
- CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.2833-2837, 1988.
- CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M. de; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, Johanna; PEDROSA, F. de O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.
- CURÁ, J.A.; RIBAUDO, C.M.; GAETANO, A.M.; GHIGLIONE, H.O. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas de desarrollo. *Foro*, p. 10 – 12, mar. 2005.
- DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.H.; ALVAREZ, G.L.M.; JUNIOR, P.R. AND SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. Inoculation in Wheat, Barle y and Oats Seeds Greenhouse Experiments. *Brazilian archives of biology and technology*, v.47, n. 6, p. 843-850, 2004.
- DING, L.; YAKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2223–2230, 2004.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.22, p.107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. 1992, *Symbiosis* 13: 1-13.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p. il.
- DOBRITSA, A.P., REDDY, M. C. S., SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60: 1418-1426.

- DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y. Modeling and Statistic Optimization of the Ethanol Production in a Cascade Reactor I. Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, n.2, 187-194. 1987.
- DUNN, I.J., HEINZLE, E., INGHAM, J., PRENOSIL, J.E. *Biological Reaction Engineering*. VCH, 1988
- FERNANDES, M. F., FERNANDES, R. M., RODRIGUES, L.S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2001- 36: 1509-1517.
- FERNANDES, V. H. Otimização dos Parâmetros de Produção de Biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR-11145) para Incorporação em Inoculantes Agrícolas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.
- FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em variedades de arroz. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010
- FERREIRA, J.S. Seleção e avaliação de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz inundado. 2004. 44p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- FERREIRA, J.S.; SABINO, D.C.C.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia*, v.37, p.6-12, 2003.
- FERREIRA, JOILSON SILVA. Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado: qualidade do inoculante e necessidade da reinoculação. Tese de Doutorado, UFRRJ, Seropédica, Brasil. 85 f. : il., 2008.
- GARCIA-OCHOA, F., GOMEZ, E., SANTOS, V. E., & MERCHUK, J. C. Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 289-307, 2010.
- GHOSE, T.K. and TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. 11. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 21, p. 1401-1420, 1979
- GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n.3, p. 393-398, 2007.
- GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. *Agronomia*, v.37, p.25-30, 2003.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 8, p. 2634 – 2645, 2001.

- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v.183, n. 8, p. 2634 – 2645, 2001.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 851–855, 2004.
- IMANDI, S. B; KARANAM., S. K.; AND GARAPATI, H. R. Optimization of Process Parameters for the Production of Lipase in Solid State Fermentation by *Yarrowia Lipolytica* from Niger Seed Oil Cake (*Guizotia Abyssinica*) *Journal of Microbial & Biochemical Technol*, 2: 28-33, 2010.
- JIMÉNEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., TAPIA- HERNÁNDEZ, A., MASCARÚA-ESPARZA, M. A., MARTÍNEZ- ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO. J. *Coffea Arabica* L.: A new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogenfixing- acetobacteria. *Applied of Environmental of Microbiology*, 1997- 63: 3676-3683.
- JUNG, S.Y., LEE, M.H., OH, T.K., YOON, J.H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007. 57: 2284–2288.
- KIRCHHOF, G., ECKERT, B., STOFFELS, M., BALDANI, J.I., REIS, V.M. HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen - fixing bacterial species that occurs in C4 - fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 157-168, 2001.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.
- LANGE, A.; MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de *Orchidaceae* e de outras famílias vegetais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 26: 535-543, 2002.
- LEE, J.H., PAGAN, R.J., ROGERS, P.L. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zimomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 659-669, 1983.
- LEVENSPIEL, O. *Chemical Reaction Engineering*. Nova York, São Paulo, Edgard Blücher, 2. edição, 1972. (3 edição, atualizada), 2000.
- LINDERMANN, W. C.; GLOVER, C. R. Nitrogen fixation by legumes. Cooperative Extension Service – College of Agriculture and home Economics. Guide A-129, may 2003, 4p.
- LIU, J.Z.; WENG, L.P.; ZHANG, Q.L.; XU, H.; JI, L.N. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal* 14, 2003. 137–141.

- LUEDEKING, R.; PIRET, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.*, vol. 1, n. 4, p. 393-411, 1959.
- MAGALHÃES, F. M. M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *Revista de Microbiologia*, 1984. 15: 246-252.
- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, n. 55, p. 417-430, 1983.
- MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI E.; WASSEM R.; MARIN A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS L. C. C.; SCHMIDT M. A.; TADRA-SFEIR M. Z.; PANKIEVICZ V. C. S.; CRUZ L. M.; CHUBATSU L. S.; PEDROSA F. O.; SOUZA E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. Department of Genetics, Universidade Federal do Paraná, Brazil, 2012.
- MOO-YOUNG, M. *Comprehensive Biotechnology. The Principles of Biotechnology: Scientific Fundamentals*, v.1, Ed. Pergamon Press-Oxford, 1985.
- MOREIRA, F. M. S. e SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, 626p, 2002.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. *Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações*. UFLA, Lavras, Brasil, 2010.
- MORGANTE, P. G. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. Disponível em: <docslide.com.br>. Acesso em: 25 de janeiro de 2013.
- MOSER, A. STOICHIOMETRY OF BIOPROCESSES. IN: REHM, H.J. REED, G. VOLUME EDITOR: BRAUER, H. *Biotechnology- A comprehensive treatise in 8 volumes*. Weinheim, V.C.H. Verlagsgesellschaft. V.2, p. 227-241, 1985
- NERONI, R.F., CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. *Scientia Agricola* 64: 303-304, 2007.
- NETO, B. B.; SCARMINO, L. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1996.
- NEVES, M. C. P. e FRANCO, A. A. Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio em plantas. *In*: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) *Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas*. P. 127-167, Itaguaí, 1993.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.
- PAGNONCELLI, M. G. B. Estudo do mecanismo de produção de oligossacarídeos com atividade nutracêuticas a partir da quitosana por hidrólise enzimática com processo fermentativo simultâneo. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do

- Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2008.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol.* v.68. p.3795–3801, 2002.
- PAULA, M. A. Interação micorrizas vesículo arbusculares- bactérias diazotróficas em batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. 168f. (Tese de Doutorado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Brasil, 1992.
- PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de Bioprocessos. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.
- PERIN, L.; SILVA, M. F. da; FERREIRA, J. S.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia, Seropédica/RJ*, v. 37, n. 2, p. 47-53, ago./dez. 2003.
- PERTEV, C., TÜRKER, M., BERBER, R. Dynamic modeling, sensitivity analysis and parameter estimation of industrial yeast fermenters. *Computers Chemical Engineering*, 21, 739-744. 1997
- POLETO, L. Isolamento e identificação de microrganismos produtores de hidrogênio a partir do glicerol residual. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
- RAO, N.S.S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 863-866, 1983.
- REIS JÚNIOR, F.B.; REIS, V.M. & TEIXEIRA, K.R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v .41, n .3, 2006.
- REIS, V. M.; ALVES, G. C.; MARRIEL, I. E.; REIS JUNIOR, F. B. dos; ZILLI, J. E. Recomendação de inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417 Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009.
- RODRIGUES E IEMMA, Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos, 2ed., São Paulo, Brasil, Editora Casa do Pão, 2009
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J. R. V. A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *Citri* Tipo B. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v. 12, p. 16, 1986.
- ROESCH, L. F. W . Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 165f
- ROTHBALLER, M., SCHMID, M., KLEIN, I., GATTINGER, A., GRUNDMANN,, S., HARTMANN, A. 2006. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-



- sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1341–1348.
- SABINO, D.C.C. Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- SANJARI, Ehsan. A new simple method for accurate calculation of saturated vapor pressure. *Thermochimica Acta*, 2013. p12– 16
- SANTOS, P. E. L., CRISTALES, R.B., MELLADO, J.C. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001- 67: 2790-2798.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*, v.172, p.261-269, 1995.
- SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI., W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Eds. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil, v.2, 2001.
- SELDIN, L.; ROSADO, A. S.; CRUZ, D. W. *et al...* Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 10, p. 3860 – 3868, 1998.
- SILVA, L. S., Produção experimental de inoculantes agrícolas á base de *Azospirillum* spp. para Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas e Forrageiras. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ IPT/ I. BUTANTAN Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, SP. Brasil. 2006.
- SILVA, Sebastião. *Plantas forrageiras de A a Z*. Viçosa: Ed. Aprenda Fácil, 225p, 2009.
- SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). *Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity*. Houston: Studium Press, LLC, 2006. p. 43-93
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. *FEMS Microbiology Rev.* v.31, p. 425-448, 2007.
- STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, n. 15, p. 183 – 190, 2000.
- TABOSA, M.; SOARES, L.; SAAVEDRA, G. *Utilização do Glicerol como Fonte de Carbono em Fermentação Submersa*. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza-CE, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Assimilação de Nutrientes. In: TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3a edição. Porto Alegre-RS, ed. Artmed, p. 286-298, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. (4 ed). São Paulo: Artmed, 2009.

- THIEMANN, J. E. Construção de equipamentos de fermentação. In: Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Eds. Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W; Schmidell, W. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil, 2001.
- TOSETTO, G. Mantei. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. UNICAMP, Dissertação de Mestrado.- Campinas, SP, 2002.
- VALVERDE, A., VELAZQUEZ, E., GUTIERREZ, C., CERVANTES, E., VENTOSA, A., IGUAL, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogenfixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:1979–1983, 2003
- VIEGAS; M. C. Otimização de Sistema de Fermentação Alcoólica Contínua Utilizando Reatores Tipo Torre e Leveduras Com Características Floculantes. Campinas: FEA; UNICAMP, Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- WEBER, O.B., BALDANI, V.L.D., TEIXEIRA, K.R.S., KIRCHHOF, G., BALDANI, J.I. DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. Plant and Soil 210: 103-113, 1999.
- WU, Y.C., HAO, O.J., OU, K.C., SCHOELZE, R.J. Treatment of leachate from solid waste landfill site using a two-stage anaerobic filter. Biotechnology and Bioengineering, v. 31, p.257-266, 1988.