

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

APROVEITAMENTO DE EMULSÃO DE ÓLEO
SOLÚVEL DE CORTE PARA PRODUÇÃO DE
PROTEÍNA MICROBIANA DE

Proveer Saccharomyces lipolytica

*Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida por Maria Assima Bittar e
aprovada pela Comissão Julgadora em
21.07.95.*

Ranulfo Monte Alegre

MARIA ASSIMA BITTAR
ENGENHEIRA QUÍMICA

Prof. Dr. RANULFO M. ALEGRE
ORIENTADOR

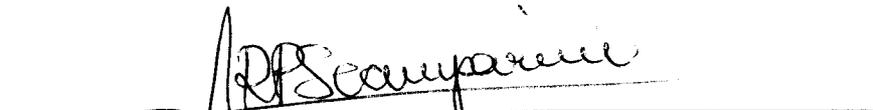
Tese Apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para Obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos

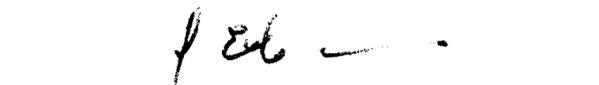
CAMPINAS/SP
JULHO/95

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre - Orientador


Prof.ª Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini - Membro


Prof. Dr. Gil Eduardo Serra - Membro


Prof.ª Dra. Lucia Regina Durrant - Membro

*A Deus; ao meu pai com saudade;
e com carinho à minha mãe, meus
irmãos e meu marido.*

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela orientação, incentivo e paciência em todas as etapas do trabalho.

- Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

- Aos amigos do DEA, por proporcionarem inúmeros e indispensáveis momentos de alegria e descontração.

- A todos que, com profissionalismo e ética, contribuíram para a conclusão deste trabalho, direta ou indiretamente.

- Aos funcionários do Centro de Tecnologia da Unicamp que forneceram amostras de emulsão de óleo solúvel de corte.

ÍNDICE

TABELAS.....	i
FIGURAS	ii
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1- INTRODUÇÃO	01
1.1 - Objetivo	02
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1 - Degradação de hidrocarbonetos por microrganismos	03
2.2 - Mecanismo de ataque ao hidrocarboneto	06
2.3 - Fatores que influenciam o crescimento	08
2.4 - Proteínas unicelulares por fermentação de hidrocarbonetos.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 - Microrganismo	16
3.2 - Substrato	16
3.2.1 - Características do óleo solúvel antes de ser usado	16
3.2.2 - Características da emulsão de óleo solúvel de corte após a sua utilização	17
3.3 - Meios de cultura.....	18
3.4 - Esterilização	19
3.5 - Pré-fermentação	19
3.6 - Fermentações	20
3.6.1 - Fermentações em erlenmeyers.....	20
3.6.2 - Fermentação em fermentador de 1 litro	20
3.6.3 - Fermentação em fermentador de 6 litros.....	20
3.7 - Determinação de massa celular seca.....	21
3.8 - Determinação do pH.....	21
3.9 - Determinação de proteína	21

3.10 - Determinação da concentração de substrato	22
3.11 - Determinação da velocidade específica do crescimento celular e determinação do rendimento	22
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 - CONCLUSÕES	49
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
APÊNDICE A	53
APÊNDICE B	55

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 3.1 - Composição dos meios de cultura sólidos utilizados para conservação do microrganismo	16
TABELA 3.2 - Características do óleo solúvel de corte	17
TABELA 3.3 - Composição dos meios de cultura líquidos de D1 a D5	19
TABELA 3.4 - Composição dos meios de cultura líquidos de E1 a E8	19
TABELA 4.1 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em erlenmeyers por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, pH inicial 5,5	28
TABELA 4.2 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, pH inicial 6,5	32
TABELA 4.3 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em erlenmeyers por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, pH inicial 5,5	35
TABELA 4.4 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em fermentador de 1 litro por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, pH inicial 5,5	38
TABELA 4.5 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em erlenmeyers por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, pH inicial 5,5	42

TABELA 4.6 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em fermentador de 6 litros por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, pH inicial 5,5.....	46
TABELA 4.7 - Taxa específica de crescimento (μ) e rendimento celular (Y) de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em diferentes porcentagens de óleo	47
TABELA A1 - Dados de concentração de proteína e absorvância para curva de calibração	53
TABELA B1 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio de cultura D1 com pH inicial 5,5	55
TABELA B2 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D2 com pH inicial 5,5	55
TABELA B3 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D3 com pH inicial 5,5	56
TABELA B4 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D4 com pH inicial 5,5	56
TABELA B5 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D5 com pH inicial 5,5	57
TABELA B6 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D1 com pH inicial 6,5	57

TABELA B7 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D2 com pH inicial 6,5	58
TABELA B8 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D3 com pH inicial 6,5	58
TABELA B9 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D4 com pH inicial 6,5	59
TABELA B10 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D5 com pH inicial 6,5	59
TABELA B11 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio D5 com pH inicial 5,0	60
TABELA B12 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E1 com pH inicial 5,5	60
TABELA B13 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E2 com pH inicial 5,5	61
TABELA B14 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E3 com pH inicial 5,5	61
TABELA B15 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E4 com pH inicial 5,5	62

TABELA B16 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 1 litro. Meio E1 com pH inicial 5,5.....	62
TABELA B17 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 1 litro. Meio E2 com pH inicial 5,5.....	63
TABELA B18 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 1 litro. Meio E3 com pH inicial 5,5.....	63
TABELA B19 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 1 litro. Meio E4 com pH inicial 5,5.....	64
TABELA B20 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E5 com pH inicial 5,5	64
TABELA B21 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E6 com pH inicial 5,5	65
TABELA B22 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E7 com pH inicial 5,5	65
TABELA B23 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em erlenmeyers. Meio E8 com pH inicial 5,5	66
TABELA B24 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 6 litros. Meio 8 com pH inicial 5,5.....	67

TABELA B25 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 6 litros. Meio E5 com pH inicial 5,5.....	68
TABELA B26 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 6 litros. Meio E6 com pH inicial 5,5.....	69
TABELA B27 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 6 litros. Meio E7 com pH inicial 5,5.....	70
TABELA B.28 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% - v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em fermentador de 6 litros. Meio E8 com pH inicial 5,5.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 4.1 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D1, pH inicial 5,5.25
- FIGURA 4.2 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D2, pH inicial 5,5.26
- FIGURA 4.3 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D3, pH inicial 5,5.26
- FIGURA 4.4 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D4, pH inicial 5,5.27
- FIGURA 4.5 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *accharomyces lipolytica* em meio de cultura D5, pH inicial 5,5.27
- FIGURA 4.6 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D1, pH inicial 6,5.29
- FIGURA 4.7 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D2, pH inicial 6,5.29
- FIGURA 4.8 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D3, pH inicial 6,5.30

- FIGURA 4.9 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D4, pH inicial 6,5.30
- FIGURA 4.10 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D5, pH inicial 6,5.31
- FIGURA 4.11 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D5, pH inicial 5,0.31
- FIGURA 4.12 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E1, pH inicial 5,5.
Crescimento em erlenmeyers.33
- FIGURA 4.13 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E2, pH inicial 5,5.
Crescimento em erlenmeyers.34
- FIGURA 4.14 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E3, pH inicial 5,5.
Crescimento em erlenmeyers.34
- FIGURA 4.15 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Candida lipolytica* em meio de cultura E4, pH inicial 5,5.
Crescimento em erlenmeyers.35
- FIGURA 4.16 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Candida lipolytica* em meio de cultura E1, pH inicial 5,5.
Crescimento em fermentador de 1 litro36.

FIGURA 4.17 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E2, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 1 litro.....	37
FIGURA 4.18 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v))por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E3, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 1 litro.....	37
FIGURA 4.19 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E4, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 1 litro.....	38
FIGURA 4.20 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% (v/v)) por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E10, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 1 litro.....	40
FIGURA 4.21 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% (v/v)) por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E11, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 1 litro.....	40
FIGURA 4.22 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% (v/v)) por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E12, pH inicial 5,5. Crescimento em erlenmeyers.....	41
FIGURA 4.23 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% (v/v)) por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E13, pH inicial 5,5. Crescimento em erlenmeyers.....	41

FIGURA 4.24 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por <i>Candida lipolytica</i> em meio de cultura E3, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 6 litros.	43
FIGURA 4.25 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% (v/v)) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em meio de cultura E10, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 6 litros	44
FIGURA 4.26 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% (v/v)) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em meio de cultura E11, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 6 litro.....	44
FIGURA 4.27 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% (v/v)) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em meio de cultura E12, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 6 litros.	45
FIGURA 4.28 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% (v/v)) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em meio de cultura E13, pH inicial 5,5. Crescimento em fermentador de 6 litros.	45

RESUMO

Saccharomyces lipolytica CCT 0913 foi utilizada em meio de cultura contendo emulsão de óleo solúvel de corte usada como única fonte de carbono, para produção de proteína microbiana (SCP) e redução de Demanda Química de Oxigênio.

Foram utilizados dois meios de cultura, um deles contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cuja concentração variou de 2,5 a 15 g/l e o outro NH_4Cl , cuja concentração variou de 0,1 a 1,5 g/l. No meio contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verificou-se a influência do pH inicial (5,0, 5,5 e 6,5) no crescimento celular em erlenmeyers. O melhor resultado, 1,12 g/l de massa celular seca com 31,92% de proteína foi obtido com 15 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5,5 e 5% de emulsão de óleo solúvel de corte.

No meio contendo NH_4Cl , as fermentações foram conduzidas em erlenmeyers e fermentadores de 1 e 6 litros. Em fermentador de 6 litros, a porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte variou de 5 a 40% (v/v) no meio de cultura. Com 20% de emulsão de óleo solúvel de corte e 1,0 g/l de NH_4Cl foi possível produzir 3,19 g/l de massa celular seca e reduzir a DQO do meio de cultura de 6188 para 4596 mg/l.

SUMMARY

A medium containing used cutting oil emulsion as carbon source was used by *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 for microbial protein production (SCP) and Chemical Oxygen Demand (COD) removal.

It was utilized two culture medium, one of them containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, its concentration was studied in the range of 2.5 to 15 g/l. In the other, containing NH_4Cl , concentration was changed in the range of 0.1 to 1.5 g/l. In the medium containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ it was verified the initial pH influence (5.0, 5.5 e 6.5) in cellular growth in erlenmeyers flasks. The best result (1.12 g/l of cellular dried mass with 31.92% of protein) was obtained with 15 g/l of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, initial pH 5.5 and 5% of cutting oil emulsion.

With medium containing NH_4Cl the fermentations were carried out in erlenmeyers and fermentors of 1 and 6 liters. In the 6 liter fermentor the percentage of cutting oil emulsion was changed in the range of 5 to 40% (v/v) in the culture medium. With 20% of cutting oil emulsion and 1.0 g/l of NH_4Cl it was possible to produce 3.19 g/l of cellular dried mass and to reduce the medium COD from 6188 to 4596 mg/l.

1 - INTRODUÇÃO

Em usinagem de peças metálicas é praticamente obrigatória a utilização de óleo solúvel de corte. Este óleo tem a finalidade de resfriar a ferramenta, evitando que esta perca o seu corte e danifique o material em usinagem, assim como também evitar a oxidação do mesmo. Entretanto, os óleos solúveis utilizados em usinagem possuem uma vida útil, após a qual são descartados. Quando lançados em leitos de rios, causam grande poluição dos mesmos, uma vez que possuem alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO); e quando lançados em plantas de tratamento de águas residuárias, estas tornam-se subdimensionadas. O tratamento aeróbico destes rejeitos é economicamente inviável devido à alta DBO; e o tratamento anaeróbico, além de não reduzir a carga poluidora até limites desejáveis de lançamento, são sistemas sensíveis que necessitam ser alimentados com efluentes equalizados, não só com respeito à vazão, como também à concentração de poluentes.

EINSELE (1983), relatou que o aproveitamento de hidrocarbonetos por microrganismos foi publicado por MIYOSHI (1895), onde foi observado que fungos *Botrytis Cinerea* podiam atacar parafinas. Entretanto, a primeira referência com leveduras consumindo hidrocarbonetos foi feita por PERRIER (1913), citado por EINSELE (1983).

Durante a segunda guerra mundial, uma série de artigos fundamentais apareceram na área de desenvolvimento da microbiologia do petróleo (BUSHNELL & HAAS, (1941); ZOBELL, (1946)), citados por EINSELE. Os trabalhos relatados por esses e outros autores nessa época foram realizados com bactérias. Foi apenas no final dos anos 40 que estudos detalhados sobre crescimento de leveduras apareceram.

JUST et al. (1948), citados por ENSELE (1983), cultivaram *Candida tropicalis* e *Candida lipolytica*, utilizando parafinas como única fonte de carbono, sob condições não estéreis e sem infecções, mostrando assim, que a utilização de leveduras pode ser vantajosa se comparada com fungos e bactérias.

WALKE et al. (1974), em um estudo comparativo em degradação de petróleo realizada por leveduras, fungos e bactérias, concluíram que estes microrganismos utilizados não apresentaram diferenças em seus potenciais de degradação.

1.1 OBJETIVO

Estudar o aproveitamento de emulsão de óleo solúvel de corte, utilizado em usinagem de peças metálicas, para produção de proteína microbiana de *Saccharomyces lipolytica*.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Degradação de hidrocarbonetos por microrganismos.

EINSELE (1983) cita que o primeiro trabalho com relação à utilização de hidrocarboneto por microrganismos foi publicado por MIYOSHI (1895), onde ele observou que o fungo *Botrytis cinerea* podia atacar parafinas. Segundo EINSELE (1983) o primeiro trabalho sobre leveduras consumindo hidrocarbonetos foi publicado por PERRIER (1913). Durante a segunda guerra mundial uma série de artigos apareceram na área de desenvolvimento da microbiologia do petróleo, (BUSHENELL & HAAS, (1941); ZOBELL, (1946)). Os trabalhos citados por esses e outros autores, nesta época, utilizaram bactérias, sendo que apenas no final dos anos 40 apareceram estudos detalhados do crescimento de leveduras. JUST et al (1948), citados por EINSELE (1983), foram os primeiros a cultivar *Candida lipolytica* e *Candida tropicalis* sob condições não estéreis e sem infecções. Suas culturas cresceram na presença de sais inorgânicos e parafinas. As eficiências de crescimento mostraram ser maiores com a utilização de parafinas do que com carboidratos. O *Micrococcus sphaeroides*, que foi isolado do solo de uma estação de enchimento de gás, também foi capaz de crescer em presença de hidrocarbonetos e em glicose. HOERBURGER, (1955), citado por EINSELE, observou posteriormente o crescimento da *Candida tropicalis* em parafinas.

Segundo EINSELE (1983), no final dos anos 60 e começo dos anos 70 foram desenvolvidos processos para produção de proteínas tanto em escala laboratorial como em plantas industriais. A crescente demanda de proteínas para alimentação humana e ração levaram à procura de outras fontes além da agricultura. Várias fontes tem sido encontradas para cultivo de células microbianas, as quais são produzidas por processos fermentativos, utilizando n-alcenos como substrato. Os produtos da biomassa microbiana derivados destes processos são referenciados como proteína unicelular, um nome genérico que infelizmente é impróprio em muitos casos, ou seja, não é correto chamar um produto de proteína quando ele contém de 25 a 50% de material não proteico. A comissão de fermentação da IUPAC recomenda Biomassa de Célula Simples, isto é, pode ser chamado Biomassa de Células Simples Protéica.

Os estudos extensivos realizados na tentativa de utilizar alcanos como fonte de carbono para produção de uma variedade de compostos úteis, tais como massa celular, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e coenzimas ou antibióticos, foram revisados por FUKUI & TANAKA (1980), citado por EINSELE (1983).

ATLAS (1978) estudou a habilidade de microrganismos em degradar hidrocarbonetos e esta habilidade era conhecida desde o século passado. CLAUDE ZOBEL (1946), citado por ATLAS (1978), foi o pioneiro em estudos da interação de microrganismos e hidrocarbonetos. ZOBEL (1946), concluiu que todos os tipos de hidrocarboneto alifáticos: gasosos, líquidos e sólidos, olefinicos, aromáticos e naftênicos, podem ser susceptíveis à oxidação por microrganismo e que alifáticos são mais susceptíveis quando comparados com compostos aromáticos e naftênicos, quando os hidrocarbonetos são a única fonte de carbono e energia para o crescimento microbiano. A degradação de hidrocarbonetos por microrganismo é um processo oxidativo. Poucos microrganismos foram isolados com a capacidade de atacar hidrocarboneto em condições anaeróbicas. Os microrganismos podem atacar hidrocarbonetos numa larga faixa de temperatura, sendo que os psicofílicos podem degradar hidrocarbonetos em temperatura inferior a 0 e microrganismos termofílicos podem degradar em temperatura superior a 60C. Os caminhos metabólicos foram estabelecidos para um número de alifáticos simples e estruturas aromáticas. O caminho de degradação de um alcano envolve uma formação sequencial de um álcool, um aldeído e um ácido graxo. O ataque enzimático inicial envolve enzimas chamadas oxigenases. Hidrocarbonetos podem ser degradados por cooxidação, alguns podem ser poupados do ataque microbiano, enquanto que outros tem preferência de ataque a um substrato em uma mistura, o que é chamado de diauxia.

LEWELYN (1967), estudando o comportamento dos microrganismos, observou que eles estão sujeitos às leis estabelecidas pela termodinâmica e realizam transformações moleculares com altas eficiências, cada transformação sendo promovida por enzimas específicas que estes organismos simples possuem. Embora fosse conhecido por algum tempo que certos tipos de microrganismos podiam metabolizar hidrocarbonetos, foi durante o estudo do seu crescimento em efluente de refinaria e considerando seu potencial para óleo dessulfurizante, que verificou-se a possibilidade de crescimento de levedura para produção de ração de hidrocarboneto de petróleo, conforme descoberta de CHAMPAGNAT, A. (1964), citado por LEWELYN. CHAMPANG, que com ajuda de outros pesquisadores foi capaz de propor as bases para um processo em larga escala de produção de proteínas de leveduras a partir de hidrocarbonetos. Observaram que leveduras metabolizavam n-parafinas de C₁₀ a C₃₀ preferencialmente e que podem remover essas parafinas de uma fração de petróleo padrão.

WALKER et al. (1974) fizeram um estudo comparativo de degradação de petróleo por leveduras, fungos e bactérias, e a habilidade deles em degradar um substrato de carbono misto. O substrato continha hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, acíclicos e aromáticos polinucleares. Observaram que os alcanos normais são menos sensíveis para degradação por bactérias e leveduras, quando o comprimento das cadeias aumenta de C₁₀ a C₂₀. Também foram degradados pelos microrganismos hidrocarbonetos mais complexos como cumenos,

naftalenos, pristanos, 1,2 bezantraceno, pirilenos e pirenos. Os resultados obtidos para alguns fungos mostraram que há uma pequena relação entre o comprimento da cadeia e a sensibilidade de biodegradação. Em geral, os modelos observados para utilização de hidrocarbonetos foram similares para bactérias, leveduras e fungos. O trabalho mostrou o potencial dos microrganismos em degradação de hidrocarbonetos, beneficiando os processos de tratamento.

Os microrganismos estudados foram:

LEVEDURAS: *Sporobomyces* sp., *Candida* sp., *C. tropicalis*, *Hansenula beijerinckii*, *Aereobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis*, e *R. rubra*.

FUNGOS: *Cladosporium resinae*, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.

BACTÉRIAS: *Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa*, *Vibrio* spp., *Acinetobacter* spp., *Leucothrix mucor*, *Nocardia asteroides*, *N. coralina*, *Rhizobium melilote* e *R. leguminosarum*.

ERTOLA et al. (1965) estudaram o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 5940 em meio de sais minerais aerado com octadecano puro como única fonte de carbono, realizado em processos contínuos e descontínuos. Os balanços de carbono e nitrogênio foram feitos sob diferentes condições. Obtiveram um rendimento máximo de 70% em relação ao octadecano utilizado.

SAMPAIO (1995) demonstrou ser a *Saccharomyces lipolytica* capaz de degradar hidrocarbonetos complexos (óleo-deisel), produzindo quantidade razoáveis de bioemulsificante e de biomassa, com alto teor proteico. Os resultados por ele obtidos, para produção de biomassa foi com o pH 5,0 e a concentração de substrato de 3%.

2.2- Mecanismo de ataque ao hidrocarboneto.

YOSHIDA et al. (1971) estudaram o mecanismo de consumo de hidrocarboneto líquido por microrganismos através do crescimento da *Candida tropicalis* em dois fermentadores diferentes. Um fermentador "frasco shaker" continha o meio de cultura aquoso e o hidrocarboneto e o outro tipo de fermentador, com disco rotatório, continha somente o meio de cultura aquoso, onde vapores de n-parafinas de C₆ a C₁₈ eram fornecidos continuamente, sem a formação de uma fase de hidrocarboneto líquido. A taxa de crescimento da *Candida tropicalis* no fermentador com disco rotatório, sob condições tais que o fornecimento de vapor de hidrocarboneto fosse suficiente, mostrou-se equivalente com aqueles do tipo "frasco shaker". Várias teorias têm sido propostas sobre a maneira com que os hidrocarbonetos líquidos são consumidos pelos microrganismos. JOHN-SON (1964), citado por YOSHIDA et al. (1971), utilizou parafina de peso molecular maior que C₁₀, estimando sua solubilidade em água a partir da extrapolação da solubilidade de n-parafinas de C₅ a C₈; negou a possibilidade de hidrocarbonetos mais pesados que C₁₀ dispersos na fase aquosa serem consumidos por microrganismos por contato direto com gotas de óleo. AIBA et al (1969), citado por YOSHIDA et al. (1971), concluíram que o tamanho mais susceptível do substrato era o submicron chamado de acomodação. AIBA et al. (1969) estabeleceram que as taxas de dissolução de hidrocarboneto dentro da fase aquosa, calculadas por valores de solubilidade e difusividade, eram desprezíveis comparadas com as taxas de decréscimo na quantidade de hidrocarboneto observado nos seus experimentos. ERICKSON & HUMPHREY (1969), citados por YOSHIDA et al. (1971), consideraram a possibilidade do microrganismo consumir o hidrocarboneto dissolvido na fase aquosa pelo contato direto de células e gotas de óleo, concluindo que nas primeiras fases do crescimento, ou para baixa concentração celular, o consumo a partir da fase aquosa foi importante e o crescimento seguinte era dependente da quantidade da área disponível da gota, visto que a taxa de crescimento linear somente pode ser explicada através do contato direto de células e gotículas.

YOSHIDA et al. (1973) estudaram o cultivo da *Candida tropicalis* utilizando n-hexadecano como substrato. Seus resultados mostraram que os microrganismos consomem o hidrocarboneto acomodado na fase aquosa como gotículas submicron. A produção de células na fase de crescimento linear foi limitado pelo fornecimento de substrato e foi maior do que a produção na fase exponencial. Tentaram ajustar as concentrações para a equação tipo Monod, mas não foi possível analisar a concentração de n-hexadecano no final da fase exponencial, uma vez que seria necessária uma grande quantidade de caldo para ser retirado do fermentador.

PFAMMATTER et al. (1992) estudaram o mecanismo de crescimento de *Candida pseudo-tropicalis* em resíduo de petróleo. O microrganismo utilizou o hidrocarboneto como fonte de carbono. As células foram suspensas no meio e a assimilação do hexadecano ocorreu na interface entre as fases aquosa e orgânica. A taxa de crescimento de células foi comparada com a taxa de produção de proteína durante a reprodução celular em um sistema emulsionável. Hidrocarbonetos de cadeias menores são solubilizados mais rapidamente que os de cadeias maiores.

VELANKAR et al. (1975) estudaram o mecanismo de consumo de hidrocarbonetos por microrganismos e estabeleceram que o contato direto entre células e gotas de hidrocarbonetos não é essencial para o crescimento. Porém, a solubilização de hidrocarboneto pelo surfactante exerce um papel importante na transferência de hidrocarboneto. Eles utilizaram *Pseudomonas aeruginosa* crescendo em um meio contendo: 2,5 g/l de KH_2PO_4 ; 0,5g/l de Na_2HPO_4 ; 3,5g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,8g/l de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 0,3g/l de MgCl_2 ; 0,01g/l de $\text{MnCl}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,01g/l de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,03g/l de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O experimento foi realizado em pH 7,0 e temperatura de 30°C, utilizando heptano como substrato. Observaram uma fase lag curta seguida de um aumento da densidade ótica e o decréscimo da tensão superficial devido à ação dos agentes de superfície ativa. Estes agentes de superfície ativa não foram identificados, mas são responsáveis pela solubilização do hidrocarboneto. Eles concluíram que a taxa de crescimento cresce com o aumento da taxa de agitação e a taxa de crescimento linear ocorre em altas concentrações para as altas taxas de agitação.

2.3 - Fatores que influenciam o crescimento.

PROKOP et al. (1971) estudaram os efeitos do tamanho do inóculo, volume da fase dispersa e concentração de substrato no crescimento em batelada da *Candida lipolytica* em sistema composto de n-hexadecano dissolvido em um rejeito de óleo. As curvas de crescimento mostraram uma região de crescimento linear para um intervalo de 1,5 até 9,5 horas de experimento. A taxa de crescimento linear é diretamente relacionada com o volume da fase dispersa e com a concentração inicial do substrato nesta fase. Concluíram que com o aumento da concentração inicial de substrato, a taxa de crescimento linear aumentou.

BLANCH & EINSELE (1973) estudaram a cinética do crescimento da *Candida tropicalis* em n-hexadecano puro como substrato em fase dispersa. A fermentação pode ser subdividida em dois tipos distintos: aquela quando somente o substrato puro está envolvido e aquela quando o substrato está dissolvido em uma fase inerte dispersante. A partir do procedimento usual de crescimento de cultura em carboidratos, com substrato puro em fase dispersa, relataram suas observações experimentais que são: 1) as culturas mostram duas regiões de crescimento, primeiramente a exponencial e logo após, crescimento linear; 2) a taxa de crescimento específico no período de crescimento exponencial é função da velocidade do agitador; mas em altas velocidades esta dependência não foi tão significativa; 3) a taxa de crescimento específico aumentou com o aumento da concentração do surfatante. Eles observaram também, que leveduras que assimilam hidrocarbonetos fixam-se nas superfícies das gotículas de óleo, formando flocos, gotículas e células. Estes flocos foram encontrados na fase primária da fermentação, antes que a assimilação completa tivesse ocorrido. Concluíram que o crescimento linear em hidrocarboneto puro é função da agitação.

PROKOP & ERICKSON (1972) estudaram os efeitos do volume e da temperatura em fase dispersa no crescimento por batelada da *Candida lipolytica*. As formas das curvas de crescimento foram basicamente similares às dos compostos de n-hexadecano dissolvido em resíduo de óleo. Todas as curvas de crescimento em batelada mostraram uma região linear. A taxa de crescimento linear e seus comprimentos variaram com a mudança dos volumes da fase dispersa. O efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento foi analisado na faixa de 23°C a 34°C. Eles utilizaram um meio inorgânico constituído por: 7,0g/l de KH_2PO_4 ; 0,4g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g/l de NaCl ; 5,0g/l de NH_4Cl e pH 5,0. Para a análise do efeito do volume em fase dispersa, variaram de 1,5 até 22% o seu volume e utilizaram uma concentração inicial de substrato de 215g/l em fase dispersa, a quantidade de inóculo foi mantida ao redor de 1g de células/l (g massa celular seca / l). A taxa de aeração variou a partir de 1,5 à 2,5 l/min. Os resultados dos experimentos são mostrados na figura 2.1.

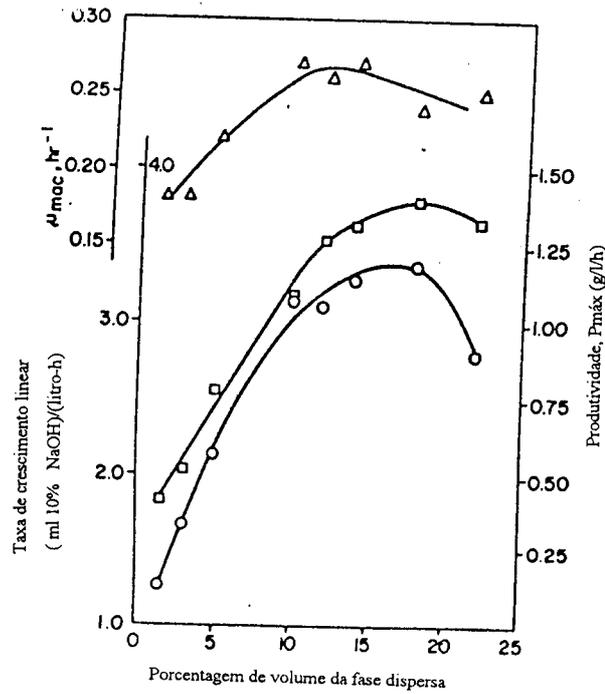


FIGURA 2.1 - Efeito do volume da fase dispersa na taxa de crescimento de *Candida li[olytica*; (-Δ-) taxa máxima de crescimento macroscópico; (-○-) taxa de crescimento linear medida pelo consumo de álcali; (-□-) produtividade máxima de biomassa.

Quanto ao efeito da temperatura, PROKOP & ERICKSON (1972) verificaram que a temperatura ótima para o crescimento foi 32°C, o que pode ser verificado através da figura 2.2 apresentada abaixo:

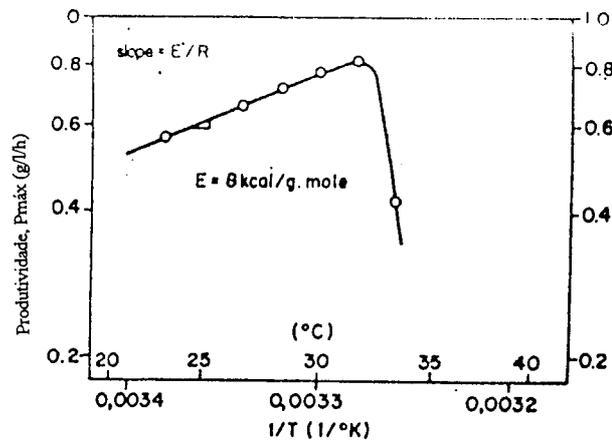


FIGURA 2.2 - Modelo de Arrhenius para a taxa de crescimento celular

WANG & OCHOA (1972) mediram a área interfacial de hidrocarbonetos em fermentação de leveduras e as relações com as taxas de crescimento específico. Nos experimentos, foi avaliada a área interfacial do hexadecano como fonte de carbono no crescimento da *Candida intermedia*, utilizando um sedimentador conectado diretamente com o fermentador para medir a área interfacial do hidrocarboneto durante o crescimento ativo do microrganismo. A fermentação ocorreu em temperatura de 30°C e pH 3,0 em um meio que continha: 5,0 g/l de hexadecano; 10,0g/l de (NH₄)₂SO₄; 3,5g/l de KH₂PO₄; 0,5g/l de MgSO₄·7H₂O; 0,1g/l de extrato de levedura. WANG & OCHOA (1972), concluíram que a área interfacial específica do hidrocarboneto está relacionada com a velocidade do agitador, com a concentração de hidrocarbonetos, surfactantes e que a taxa de crescimento do microrganismo é diretamente relacionada com a área interfacial específica do hidrocarboneto , o que pode ser verificado pela figura abaixo:

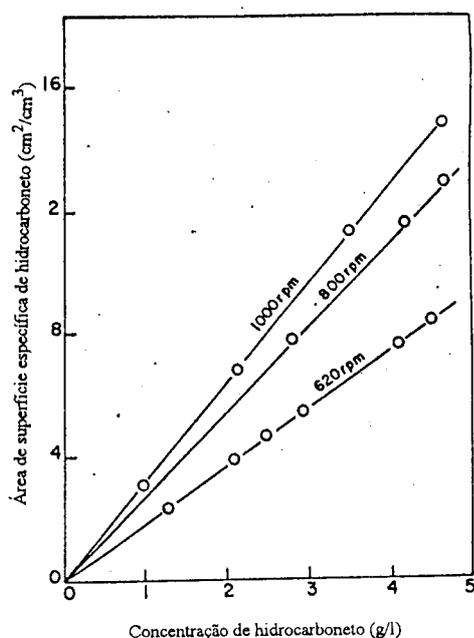


FIGURA 2.3 - Área de superfície interfacial de n-hexadecano em função de sua concentração em fermentação descontínua por *Candida intermedia* em vários níveis de rotação.

SING et al. (1990) estudaram o crescimento de *Candida tropicalis* em regime batelada alimentada e utilizaram como substrato n-hexadecano, produzindo um bioemulsificante extracelular que apresentou atividade diante de vários hidrocarbonetos, máxima com aromáticos e mínima com parafinas normais. Em condições de crescimento com nitrogênio

limitante notaram que a atividade do bioemulsificante é mais elevada do que em condições com substrato limitante. Muitos microrganismos produzem materiais poliméricos extracelulares com excelentes propriedades ativas superficiais. Entre as leveduras, espécies de candidas têm sido largamente empregadas em fermentações de hidrocarbonetos, especialmente para produção de proteína a partir de células simples. O meio inorgânico para a fermentação continha: 2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$; 1,26g/l de KH_2PO_4 ; 0,75g/l de Na_2HPO_4 ; 0,75 g/l de Mg_2SO_4 e traços dos elementos (Ca, Fe, Cu, Zn), o fermentador tinha a capacidade para 1,5 litros, a temperatura e o pH foram controlados automaticamente em 36°C , pH 4,0 respectivamente e a aeração foi de 2vvm. A *Candida tropicalis* apresentou taxa de crescimento de 0,38/h em substratos de cadeias C_{10} a C_{18} e em n-parafinas fracionadas, valor próximo aos obtidos em frações de querosene, de onde as n-parafinas foram extraídas.

SADIR (1972) estudou o cultivo da *Candida lipolytica* ATCC 8661, utilizando querosene com 76% de compostos parafínicos como única fonte de carbono e energia. Experimentou 46 meios de cultura e verificou que os meios de cultura com uréia e NH_4Cl foram os mais adequados. Nutrientes orgânicos tais como extrato de levedura e farelo de arroz, adicionados ao meio de cultura inorgânico, não melhoraram o rendimento em biomassa; melão de açúcar produz uma marcante queda do rendimento. Nas melhores condições de trabalho obteve taxa específica de crescimento celular $\mu = 0,2 \text{ hr}^{-1}$ e produtividade máxima em biomassa (p max) 2,3 g/l/hr. O controle de pH durante a fermentação foi necessário para obter um rendimento maior em levedura, verificando-se que os tempos de fermentação, para obter o pico máximo de produtividade, foram bem menores controlando o pH do que sem controle. Testou a temperatura de 30°C , onde obteve rendimento em levedura ligeiramente superior que com 33°C ; mas nesta última temperatura o pico máximo de produtividade foi alcançado em tempo sensivelmente menor que na primeira temperatura.

BLANCH & FIETCHER (1974) observaram o fenômeno de coalescência e dispersão na fermentação de hidrocarbonetos. O crescimento de organismos em sistemas água-óleo tem sido de grande atenção, tanto do ponto de vista do modelo matemático quanto experimental. A frequência da coalescência e dissolução da fase dispersa foram consideradas. Para o caso de substrato puro como a fase dispersa, as frequências de coalescência são importantes, sendo as gotas menores consumidas mais rapidamente do que as grandes e os efeitos de segregação na fermentação causaram diferenças no crescimento observado. No caso de substrato dissolvido em fase dispersa inerte, uma taxa insuficientemente rápida de coalescência da gotícula resultará em diferentes concentrações de substrato, de gota para gota, com consequente divergência dos crescimentos esperados. A frequência de dispersão da coalescência (u) em sistemas orgânicos aquosos puros foi estudada. Parece não existir uma relação definitiva entre frequência de coalescência e as condições operacionais empregadas devido aos diferentes

sistemas e técnicas de medição utilizadas. O objetivo desses autores foi determinar a frequência de coalescência sob condições reais de fermentação. Um método utilizado por HOWARTH, citado por FIETCHER & BLANCH (1973), tem as vantagens de permitir um exame independente dos efeitos do tamanho da gota e da velocidade do agitador em frequência de coalescência. Quando nenhuma substância externa é adicionada, o valor de u pode ser determinado sob condições operacionais estéreis. O método faz com que o tamanho das gotas aumente em média, seguindo de uma súbita redução da velocidade do agitador. Sob estas condições a taxa de coalescência temporariamente excede a taxa de quebra e pode ser medida em função do tamanho das gotas.

$$u = \left(\frac{d\sigma_m}{dt}\right)_{t=0} / (2 - 2^{2/3})\sigma_i$$

σ_m = Diâmetro médio da gota para a nova agitação

σ_i = Diâmetro médio da gota para a agitação inicial.

u = Frequência de coalescência de gota simples

t = tempo

MUNK et al. (1969) estudaram o cultivo da *Candida lipolytica* em resíduo de óleo da destilação de gasolina e querosene de 180 a 400°C, contendo 10 a 20% de n-alcenos. A condição ótima para produção de biomassa e desparafinação foi estimada para várias taxas de diluição e várias concentrações de resíduo de óleo. Observaram que a concentração de biomassa diminuiu, assim como o grau de desparafinação, com o aumento da taxa de diluição. Obtiveram um rendimento máximo $Y = 0,94$ para taxa de diluição de $0,13h^{-1}$. A máxima concentração de biomassa $9,0 \text{ g/l}$ e o rendimento de $Y = 0,92$, ocorreu quando a taxa de diluição variou de $0,16$ a $0,19h^{-1}$. Os autores aumentaram a concentração de resíduo de óleo no meio de cultura desde 73g/l até 170g/l . Utilizando taxa de diluição de $0,16h^{-1}$ observaram que com 73 g/l de óleo a concentração de massa celular seca foi de 10 g/l , enquanto que com 170g/l de gas-oil utilizado obtiveram $12,6 \text{ g/l}$ da massa celular seca, ou seja, o rendimento foi bem mais baixo quando utilizaram altas concentrações de substrato.

DOSTÁLEK et al. (1968) estudaram o crescimento da *Candida lipolytica* em resíduo de óleo de destilação de gasolina e querosene sob o ponto de vista da produção de biomassa e

desparafinação de óleo. Os melhores resultados foram encontrados na faixa de taxa de diluição de $0.16-0.19h^{-1}$, a produtividade de biomassa foi de 1.7 g/l/h e o coeficiente de rendimento $Y=0.92$. Eles concluíram que em processos contínuos e bateladas a degradação do resíduo ocorreu em várias taxas e rendimentos e provaram a dependência das condições de cultivo com a concentração e composição das frações parafínicas do resíduo de óleo.

COLIN (1968) estudou o cultivo da *Candida lipolytica* em fração de n-alcenos (dodecano 22%, tridecano 48%, tetradecano 28%) como única fonte de carbono. Ele observou que a taxa de crescimento aumentava com o aumento das concentrações de n-alcenos. Para alcançar um bom crescimento foi necessário 10% de inóculo e o aumento gradual da taxa de agitação favoreceu o crescimento. O rendimento máximo obtido foi de 60 g/l .

2.4 - Proteínas unicelulares por fermentação de hidrocarbonetos.

BELLO et al. (1973) estudaram a composição química e a qualidade biológica da *Candida lipolytica* cultivada em hidrocarbonetos de cadeia normal, e verificaram que as análises de aminoácidos revelaram uma deficiência em aminoácidos sulfurosos. Estudaram o crescimento e a absorção de proteínas unicelulares (SCP) por cobaias, e compararam os resultados com os de caseína e ovo em níveis de 8 a 12% de proteína. Concluíram que farinha comercial de *Candida lipolytica* é um concentrado protéico de grande interesse do ponto de vista nutritivo, devido às respostas do crescimento animal e ao aproveitamento do nitrogênio ingerido. Tomando como referência os índices de proteína do ovo dessecado e desidratado, o comportamento da levedura de petróleo não é similar ao da caseína, ainda que ambas as fontes protéicas se caracterizem por uma porcentagem reduzida de aminoácidos sulfurados. As maiores diferenças com a caseína foram observados nos índices representativo da contribuição do crescimento. A caseína em relação ao ovo, tem um coeficiente de conversão protéica de 73,5%, enquanto a levedura de petróleo só alcança 31%. Entre os diferentes cultivos utilizados para este fim, os que utilizam a *Candida lipolytica* oferecem propriedades especiais como: possuem boa capacidade fermentativa, só assimilam um açúcar (glicose) e são capazes de converter em substâncias celulares uma grande variedade de n-alcanos.

BELLO et al. (1973) estudaram a digestibilidade das proteínas por cobaias e em vidro, a partir de leveduras de panificação seca (*Saccharomices cerevisiae*), levedura torula (*Candida utilis*) e levedura (*Candida lipolytica*) cultivada em hidrocarbonetos. Os resultados de seus coeficientes de digestibilidade são relatados quando ratos foram alimentados com dietas de proteína com níveis de 8 a 12% e são comparados com os obtidos por caseína. Todas mostraram uma baixa digestibilidade de nitrogênio em cobaias. A digestibilidade por tripsina em vidro foi estudada e a taxa de digestão foi seguida por mudança na absorbância. Uma inibição trípica na hidrólise foi observada, tendo sido atribuída à presença de um inibidor da atividade protéica sobre proteínas unicelulares.

SHIN-ICHIRO et al. (1966) citados por SADIR (1972), cultivaram *Candida lipolytica* YO -148 em querosene como fonte de carbono. O melhor rendimento obtido foi de 11g/l de massa celular seca em pH 7 controlado e volume inicial de querosene de 10% (v/v). O tempo de fermentação foi de 30 horas. A porcentagem de proteína na biomassa produzida foi 37,52% em relação a massa celular seca.

WAGNER et al. (1969), estudaram o cultivo da *Nocardia* sp., *Mycobacterim phlei* e *Candida lipolytica* em solução de sais inorgânicos contendo n-alcanos C₁₀-C₂₀ como única

fonte de carbono e energia. A fase de crescimento exponencial ocorreu num intervalo de tempo entre 0,5 e 7,0 horas. A concentração final de células foi de 9,0 a 26 g/l utilizando mistura de n-alcenos na faixa de n-decano até n-eicosano. Uma dependência linear foi encontrada entre a produção de massa celular e consumo de n-alcenos. Proteína celular e lípidios sintetizados pelo microrganismo foram influenciados pelo tipo da fonte de nitrogênio. No crescimento da *Nocardia* NB Z 23, utilizando querosene como fonte de carbono, o tempo de crescimento foi de 3 horas e 10 minutos, onde foi utilizado 4,5% de substrato. O rendimento máximo obtido foi de 12 g/l de massa celular seca.

ERTOLA et al. (1969) estudaram o crescimento de uma linhagem de *Micrococcus cerificans* em meios simples com n- hexadecano ou resíduo de óleo deixado na destilação de gasolina e querosene entre 180°C a 400°C. Eles observaram que as amostras de material celular de fermentações de hexadecanos ou resíduo de óleo não diferiram significamente em suas composições. O conteúdo de proteína variou de 68 a 75%. O valor biológico da proteína celular recuperado de fermentações de hexadecanos foi 67 (caseína, 70). No caso de crescimento celular em resíduo de óleo, o material celular recuperado foi completamente purificado para melhorar a qualidade de sua proteína e o valor biológico observado foi de 63. Eles observaram que o microrganismo crescendo em meio contendo hexadecano alcançou um rendimento na massa celular de 85 a 90%, enquanto que no meio contendo resíduo de óleo o rendimento foi de apenas 10 a 12%.

WHITWORTH, D. A. (1974) cultivou *Candida lipolytica* ATCC 8661 em meio de cultura contendo hexadecano (10g/l) como única fonte de carbono, extrato de levedura e sais inorgânicos. Células foram pré-cultivadas em um fermentador de 5 litros e foram usadas para inocular 100 litros de meio contido em um fermentador, o volume final de operação foi de 70 litros, o pH foi ajustado para 5,5 e controlado durante a fermentação; a temperatura 30°C; agitação 350 rpm; aeração 40l/min. O teor de proteína encontrado foi 28,3% em relação a massa celular seca.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Microrganismo

O microrganismo utilizado foi "*Saccharomyces lipolytica*" CCT0913 (NCY825), cedido pela Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisa "André Tosello" conservado em ágar inclinado. Os meios utilizados para a conservação do microrganismo estão descritos na tabela 3.1.

TABELA 3.1 - Composição dos meios de cultura sólidos utilizados para conservação do microrganismo.

COMPOSIÇÃO	MEIOS		
	A	B	C
Emulsão de óleo solúvel de corte	5,0	5,0	5,0
Ágar	3,0	3,0	3,0
Extrato de levedura	2,0	10,0	10,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,5	0,4
KH ₂ PO ₄	3,5	3,5	1,0
Na ₂ HPO ₄	1,5	1,5	
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	5,0	
NH ₄ Cl			1,0
NaCl			0,1

Emulsão de óleo solúvel de corte (% v/v)

Ágar (% p/v)

Concentrações dos sais e extrato de levedura - g/l

3.2 - Substrato

Foi utilizado como substrato uma amostra de emulsão de óleo solúvel de corte usado, obtido no centro de tecnologia (CT) da UNICAMP.

3.2.1 - Características do óleo solúvel antes de ser usado.

De acordo com o catálogo fornecido pela Petrobras (um dos fabricantes deste óleo) o óleo emulsionável é do tipo LUBRAX industrial FC - 37 -EM. Este catálogo foi a única fonte de informação conseguida.

Este óleo emulsionável, tipo óleo em água, é utilizado em usinagem e acabamento de metais. Ele é formulado com naftênicos básicos e aditivos especiais, que lhe conferem suas características emulsionáveis. Esta emulsão é excepcionalmente estável, em qualquer regime de trabalho. Possui um agente bactericida que controla o crescimento de microrganismos, evitando a degradação das emulsões e o surgimento de odores desagradáveis. Para se obter o máximo rendimento deste aditivo, é necessário que as emulsões sejam preparadas, manuseadas e armazenadas em boas condições de assepsia, mantendo-se sempre concentrações de óleo superiores a 5% na emulsão. Estas emulsões liberam rapidamente as bolhas de ar, evitando a formação de espuma.

TABELA 3.2 - Características do óleo solúvel de corte:

GRAU	37
Densidade a 20/4°C	0,9217
Ponto de fulgor (VA) (°C)	190
Ponto de fluidez (°C)	-24
Viscosidade a 37,8 °C	43,5
Viscosidade a 40 °C	38,0
Viscosidade a 98,9 °C	5,36
Viscosidade a 100 °C	5,19
Corrosão à lâmina de Cu;3h;100 °C	1b
Emulsão a 5%	-----
Estabilidade	Estável
Espuma	Traços

Fonte : Catálogo fornecido pela Petrobras

3.2.2 - Características do óleo solúvel de corte após a sua utilização.

De acordo com um usuário deste óleo a sua mistura inicial com água variou de 2 a 5% para formar a emulsão de óleo solúvel de corte. Após sua utilização, a emulsão de óleo solúvel de corte apresenta limalhas de ferro e odor

desagradável de gás sulfídrico, consequência do crescimento de microrganismos durante sua utilização.

A amostra de emulsão de óleo solúvel de corte utilizada neste trabalho foi obtida junto ao centro de Tecnologia da Unicamp, tomada no reservatório de uma máquina operatriz. Sua concentração aproximada foi de 5%(v/v) e DQO de 14200 mgO₂/l. As densidades (g/l) de emulsão de óleo solúvel de corte (antes de sua utilização) determinada com picnômetro (temperatura de 20°C) são as seguintes: 0,9960, 0,9954, 0,9942, 0,9920 para 1, 3, 5 e 10% respectivamente, a densidade d'água determinada foi de 0,9936g/l

3.3 - Meios de Cultura

Foram utilizados nos ensaios de fermentação variações de dois meios de cultura mostrados abaixo :

Meio D: Emulsão de óleo solúvel de corte, Extrato de levedura, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ e (NH₄)₂SO₄.

Meio E: Emulsão de óleo solúvel de corte, Extrato de levedura, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, NH₄Cl e NaCl.

O meio de cultura sólido B (TABELA 3.1) foi utilizado para inocular os meios líquidos D1 a D5 e o meio sólido C (TABELA 3.1) foi utilizado para inocular os meios de cultura líquidos de E1 a E8.

As tabelas 3.3 e 3.4 mostram as variações dos meios D e E utilizados.

TABELA 3.3 - Composição dos meios de cultura líquidos de D1 a D5.

COMPOSIÇÃO	MEIOS				
	D1	D2	D3	D4	D5
Emulsão de óleo solúvel de corte	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Extrato de levedura	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KH ₂ PO ₄	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Na ₂ HPO ₄	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0

Emulsão de óleo solúvel de corte (% v/v)

Concentração dos sais e extrato de levedura - g/l

TABELA 3.4 - Composição dos meios de cultura líquidos de E1 a E8.

COMPOSIÇÃO	MEIOS							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Emulsão de óleo solúvel de corte	5,0	5,0	5,0	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
Extrato de levedura	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
KH ₂ PO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
NH ₄ Cl	0,1	0,5	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0

Emulsão de óleo solúvel de corte (% v/v)

Concentração dos sais e extrato de levedura - g/l

3.4 - Esterilização

Foi feita a esterilização de todos os meios de cultura utilizando-se uma autoclave vertical - modelo - 103 (FABBE), durante 15 minutos à 121°C. A esterilização foi realizada sempre no dia anterior à realização da fermentação.

3.5 - Pré - fermentação

Para inocular o meio de fermentação, parte deste foi separado e esterilizado nas condições do item 3.4. Após o resfriamento, alçadas de leveduras contidas nos meios B e C foram transferidas para os meios de cultura líquidos D e E (Tabelas 3.3 e 3.4) respectivamente. Depois de 24 horas a 30°C e agitação de 200 rpm em uma mesa rotativa (Rotary SHAKER) inoculou-se os erlenmeyers de 500 ml que continham 90 ml de meio, com 10 ml desta cultura.

Todos os meios líquidos de cultura tiveram pH ajustado com HCL, uma vez que o pH inicial dos meios estavam em torno de 7,0.

3.6 - Fermentações:

3.6.1 -Fermentação em erlenmeyers:

Foi preparado o meio de cultura desejado com 5% (v/v) de emulsão de óleo solúvel de corte, ajustou-se o pH, distribuiu-se este em erlenmeyers de 500 ml, 90 ml em cada um, tampou-se e esterilizou-se, tampou-se e esterilizou-se. Após inoculados as fermentações ocorreram a 200 rpm em mesa rotativa (Rotary SHAKER - Fermentation design inc. ALLENTOW PA. 18103), a 30°C em uma estufa FANEM LTDA - SP, Câmara modelo 095 E

3.6.2 -Fermentação em Fermentadores de 1 litro:

Preparou-se 650 ml de meio de cultura desejado, ajustou-se o pH, colocou-se este num fermentador de 1 litro de capacidade (Fermentation Design) e esterilizou-se. Após a inoculação com 65 ml de pré-fermentação, as fermentações ocorreram a 30°C e agitação por magneto.

3.6.3 -Fermentação em Fermentadores de 6 litros:

Preparou-se 4 litros de meio de cultura, ajustou-se o pH, 400ml foram separados para o crescimento do inóculo, e o restante colocado num fermentador de capacidade de 6 litros, no qual foi possível controlar a temperatura, aeração, agitação e registrar o pH. As fermentações ocorreram a 300 rpm, 30°C, pH inicial 5,5 e a aeração de 1 vvm.

3.7 - Determinação de Massa Celular Seca

Inicialmente tarou-se os tubos de centrífuga para a determinação de massa seca. Coletou-se duas alíquotas de 10 ml, uma destinada para o método de massa seca e a outra para a determinação de proteína. Colocou-se as alíquotas em tubos tarados de centrífuga, centrifugou-se a 5000 rpm durante 15 minutos em uma centrífuga Excelsa Baby I modelo 206 (FANEN). Separou-se os sobrenadantes para análise de DQO, lavou-se as células com mistura de butanol-etanol-clorofórmio (10 : 10 : 1, v/v) e centrifugou-se novamente sob as mesmas condições anteriores. Em seguida lavou-se as células com água destilada e centrifugou-se sob as condições anteriores, descartando-se os sobrenadantes. Um dos precipitados foi seco em estufa a vácuo - EIV - 1 (EDG Equipamentos e Controle), com controle de pressão (25 in Hg) e temperatura (63°C), durante 24 horas. A massa celular seca foi determinada por pesagem, e o outro precipitado foi utilizado para a determinação de proteína descrito pelo item 3.9.

3.8 - Determinação do pH.

O pH do meio de cultura mediu-se diretamente com potenciômetro Analyser - Modelo 300.

3.9 - Determinação de proteína.

Para determinação de proteína utilizou-se o método descrito por HERBERT et al. (1971).

As células obtidas no item 3.7 foram ressuspendidas em água destilada até completar um volume de 10 ml. Colocou-se 4 ml desta suspensão de células em um tubo de ensaio, acrescentou-se 2,0 ml de NaOH 3,0 N e aqueceu-se em banho-maria (ebulição) durante 5 minutos. Em seguida resfriou-se em água fria, e após o resfriamento acrescentou-se 2,0 ml de solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,5 %, misturando-se por inversão e deixou-se descansar durante 5 minutos. Centrifugou-se a 5000rpm durante 15 minutos e fez-se a leitura em espectrofotometro Analyser Modelo 88 em 555 nm.

As leituras obtidas foram convertidas em concentração de proteína através de uma curva padrão (Apêndice A) construída com albumina de soro bovino, e posteriormente convertidas em porcentagem de massa celular seca.

3.10 - Determinação da concentração de substrato

A determinação do substrato fez-se indiretamente pela determinação da DQO do sobrenadante obtido no item 3.7. Utilizou-se o método para determinação de DQO descrito por SILVA (1977).

Colocou-se 0,4 g de sulfato de mercúrio em um balão de 500 ml de fundo redondo contendo pérolas de vidro, 20 ml de amostra e 10 ml de solução de dicromato de potássio 0,25 N. Adicionou-se vagarosamente ao balão, 30 ml de solução de ácido sulfúrico - sulfato de prata, e agitou-se com cuidado. O branco fez-se utilizando o mesmo procedimento, trocando-se apenas os 20 ml da amostra por água destilada. Refluxou-se a amostra e o branco durante 30 minutos, que foram titulados com sulfato ferroso amoniacal, utilizando-se ferroína como indicador.

Cálculo da DQO para 20 ml de amostra

$$(a - b) c * 400 = \text{mg/l DQO}$$

onde:

a = ml de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2$ gastos com o branco

b = ml de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2$ gastos com a amostra

c = normalidade da solução de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2$

3.11 - Determinação da velocidade específica do crescimento celular e determinação do rendimento.

Foi feita a determinação da velocidade específica (μ) através da regressão linear de $[\text{Ln}(\text{concentração de massa celular seca}) \times 100] \times \text{tempo}$.

Faz-se a determinação do rendimento utilizando valores de concentração de massa celular seca no tempo de 24 horas e a inicial e valores de Demanda Química de Oxigênio (DQO) inicial e no tempo de 24 horas.

$$Y = (X_2 - X_1) / (DQO_1 - DQO_2)$$

onde:

X_2 = Concentração de massa celular seca máxima encontrada (g/l);

X_1 = Concentração de massa celular seca obtida no tempo inicial (g/l);

DQO_1 = Demanda Química de Oxigênio no tempo inicial (mg de DQO/ l);

DQO_2 = Demanda Química de Oxigênio no tempo de 24 horas (mg de DQO/l).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros ensaios foram feitos para verificar se a *Saccharomyces lipolytica* utilizava emulsão de óleo solúvel de corte como fonte de carbono, utilizando-se os meios de cultura sólidos A e B da Tabela 3.1 (item 3.1), onde foi variada apenas a concentração de extrato de levedura (2 e 10g/l respectivamente). Verificou-se crescimento nos dois meios, porém mais intenso em B. Posteriormente, o crescimento foi realizado utilizando meios de cultura sólidos B e C (item 3.1), meios de composições diferentes que continham 10 g/l de extrato de levedura, não sendo observadas diferenças significativas no crescimento celular.

As figuras 4.1 a 4.5 (Tabelas B1 a B5 do Apêndice B) apresentam os resultados das fermentações de emulsão de óleo solúvel de corte por *Saccharomyces lipolytica*, as quais ocorreram em erlenmeyers (item 3.6.1) e pH inicial 5,5. Estas figuras apresentam as curvas de concentração de massa celular seca (MCS), porcentagem de proteína e variação do pH ao longo das fermentações de emulsão de óleo solúvel de corte por *Saccharomyces lipolytica*. Observa-se que estas curvas possuem o mesmo perfil, mostrando que em 24 horas a cultura atingiu a fase de crescimento estacionário. Para tempos maiores de 24 horas ocorreu autólise celular, causando redução na concentração de MCS. O pH aumentou, em todos os experimentos, cerca de 0,6 unidades. A porcentagem de proteína na MCS em cada experimento aumentou nas horas iniciais de fermentação, oscilando em torno de um valor médio nas horas finais. Em todos os meios, após a esterilização, observou-se a formação de um precipitado, que reduziu a porcentagem de proteína na MCS nas horas iniciais de fermentação, uma vez que foi contado como MCS. Este pequeno precipitado é mais expressivo na massa celular inicial.

A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos no tempo de 24 horas dos experimentos em que foram utilizados os meios de cultura D1 a D5 (item 3.3), onde a concentração da fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) variou de 2,5 até 15 g/l, e o pH inicial foi 5,5. A concentração de MCS aumentou com o aumento da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Comparando-se os resultados de MCS dos experimentos com os meio D2, D4 e D5 (5, 10 e 15 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente), verificou-se que o aumento não foi linear com o aumento da fonte de nitrogênio, ou seja, este aumento passou a ser insignificante. A média do

teor de proteína no tempo de 24 horas destes experimentos foi de 31,62%. Apesar da complexidade do substrato aqui utilizado, os resultados descritos na literatura não demonstraram ser muito diferentes. SHIN-ICHIRO et al. (citado por SADIR, 1972), obtiveram 37,52 % de proteína em base seca quando cultivaram *Saccharomyces lipolytica* em querosene. WHITWORTH (1974), cultivando *Saccharomyces lipolytica* em n- hexadecano como única fonte de carbono, obteve 28,3% de proteína em relação a MCS. Por último, SAMPAIO (1995) obteve um valor médio de 39,3 % de proteína quando fermentou óleo-diesel comercial com *Saccharomyces lipolytica*.

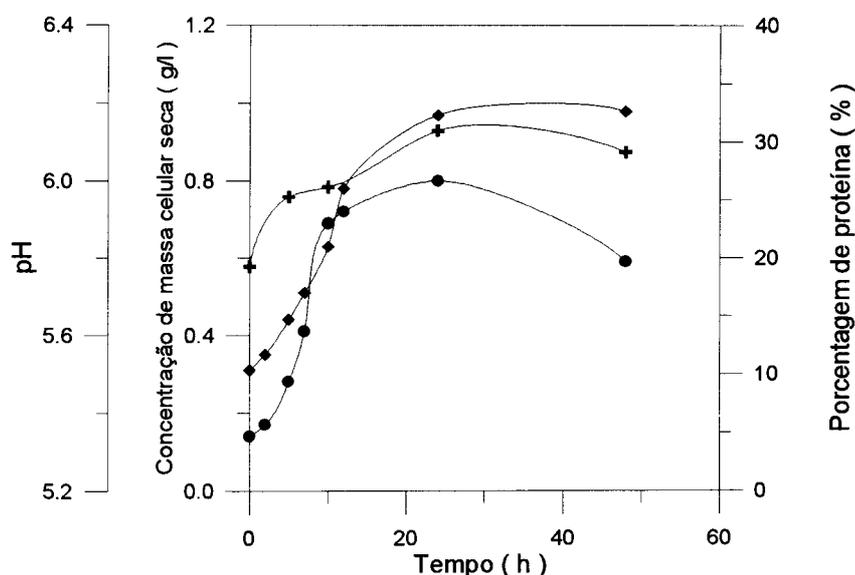


FIGURA 4.1 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D1, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆) e percentagem de proteína (+).

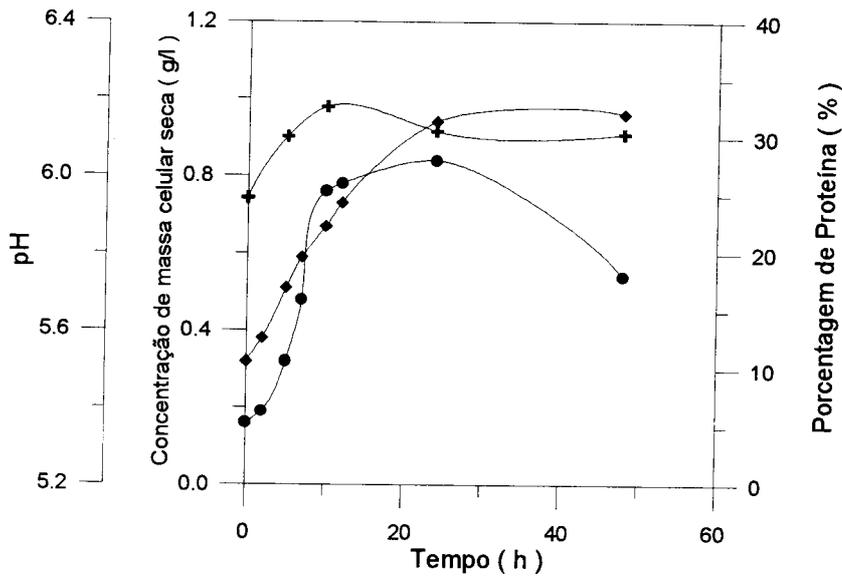


FIGURA 4.2 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D2, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

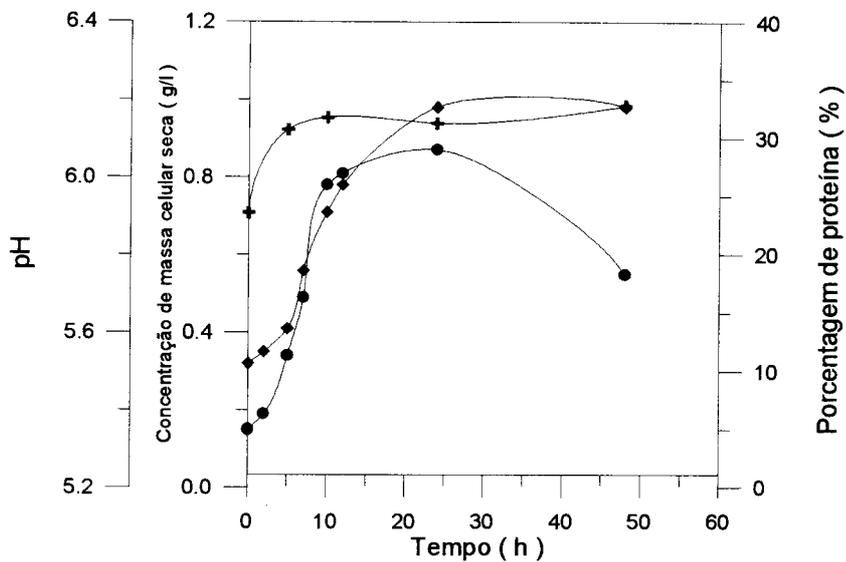


FIGURA 4.3 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D3, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

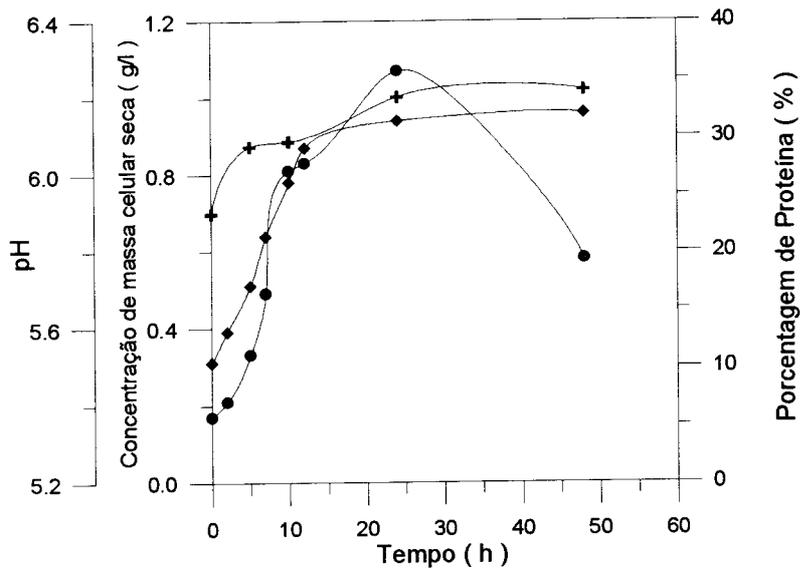


FIGURA 4.4 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D4, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

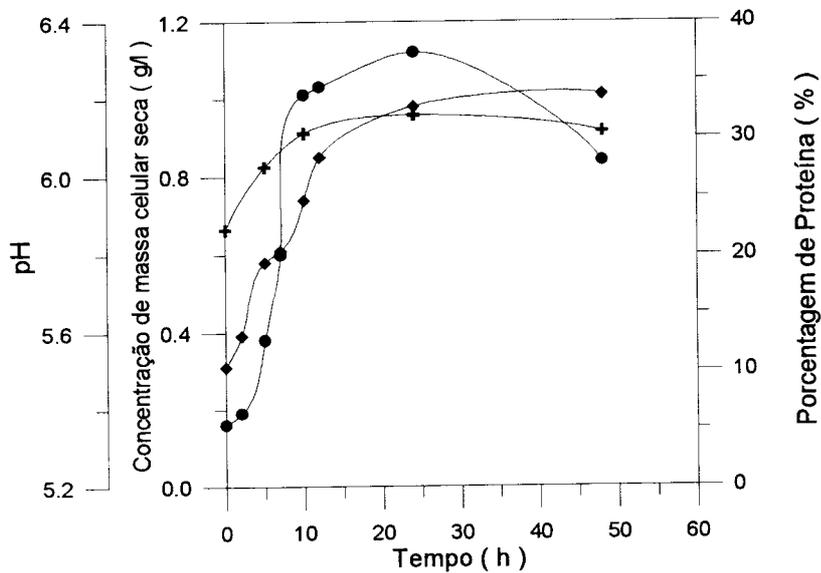


FIGURA 4.5 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D5, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

TABELA 4.1 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em erlenmeyers por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, pH inicial 5,5.

Meio de cultura	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	MCS (g/l)	Proteína (%)	Aumento de MCS* (%)	pH
D1	2,5	0,80	30,98	—	6,17
D2	5,0	0,84	30,51	5,00	6,14
D3	7,5	0,87	31,27	8,75	6,18
D4	10,0	1,07	33,41	33,75	6,14
D5	15,0	1,12	31,92	40,00	6,18

Tempo de fermentação - 24 horas

* Aumento de MCS em relação ao meio D1

As figuras 4.6 a 4.10 (Tabelas B6 a B10 do Apêndice B) apresentam os resultados das fermentações de emulsão de óleo solúvel de corte por *Saccharomyces lipolytica* que ocorreram em erlenmeyers, pH inicial 6,5. Observa-se que as curvas têm comportamento semelhante às curvas das figuras 4.1 a 4.5, isto é, a fase de crescimento estacionário foi atingida em 24 horas e, para tempos maiores, ocorreu autólise das células. A porcentagem de proteína na MCS aumentou rapidamente nas horas iniciais, oscilando em torno de um valor médio nas horas finais.

A tabela 4.2 apresenta os melhores resultados, em 24 horas de fermentação, dos experimentos realizados utilizando-se os meios de cultura D1 a D5, onde as concentrações de (NH₄)₂SO₄ foram variadas e o pH inicial foi 6,5. A concentração de MCS aumentou com o aumento da concentração de (NH₄)₂SO₄ e o teor médio de proteína foi de 31,06% da MSC. O aumento de pH variou de 0,2 a 0,7 unidades.

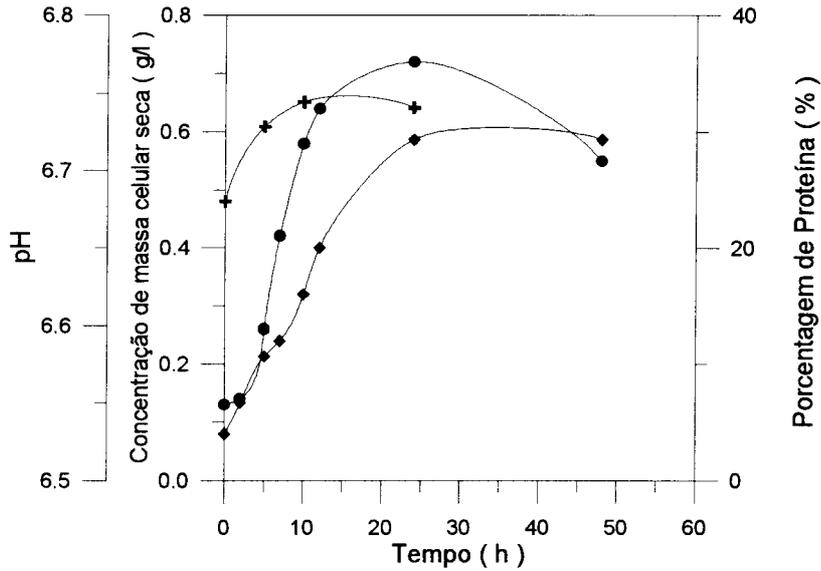


FIGURA 4.6 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D1, pH inicial 6,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

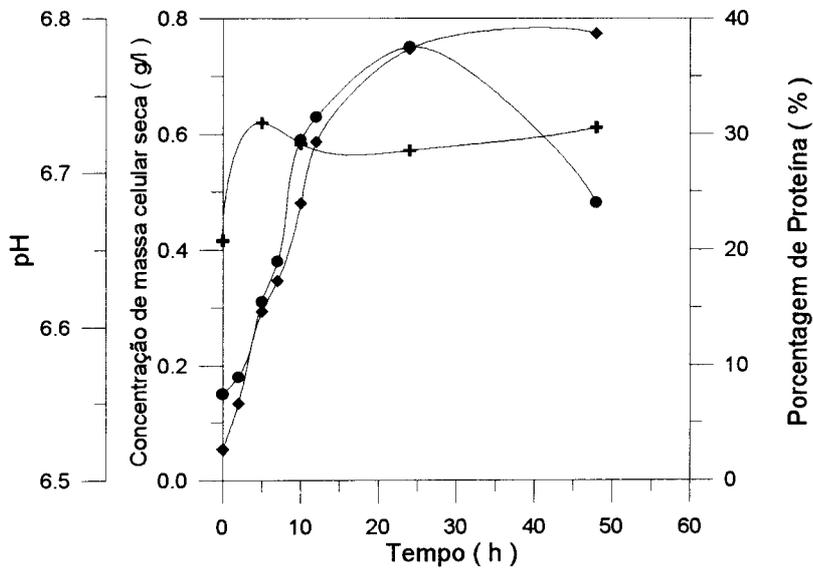


FIGURA 4.7 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D2, pH inicial 6,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

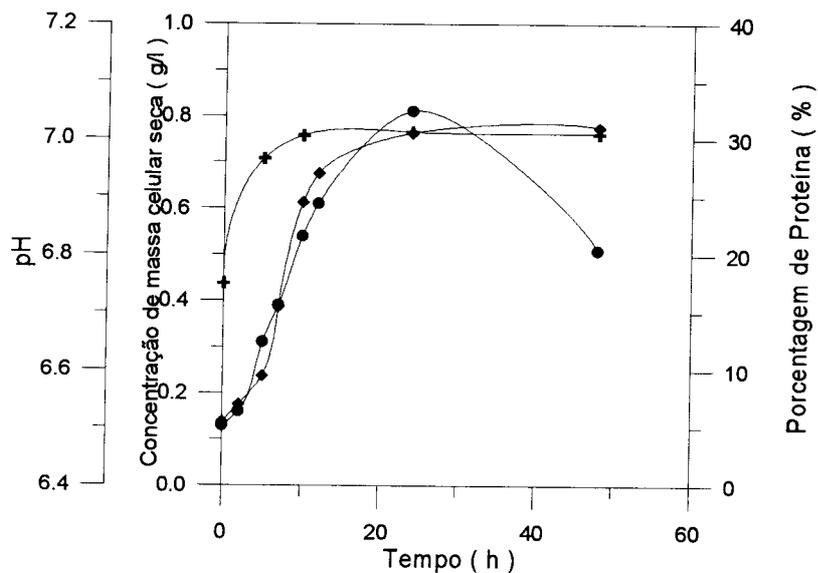


FIGURA 4.8 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D3, pH inicial 6,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

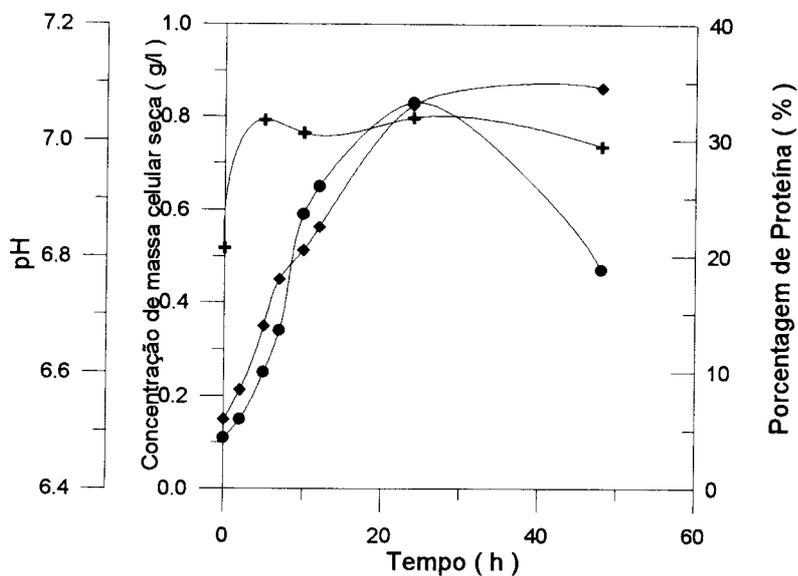


FIGURA 4.9 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D4, pH inicial 6,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

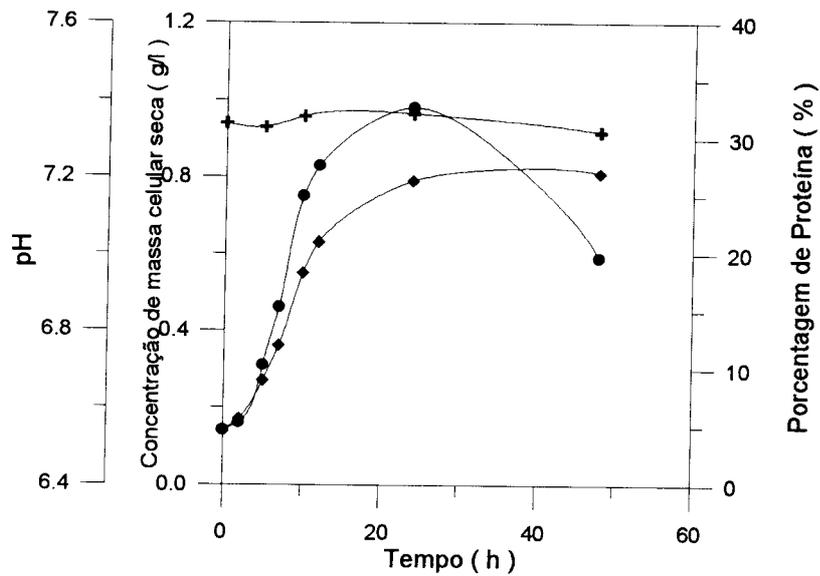


FIGURA 4.10 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura D5, pH inicial 6,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

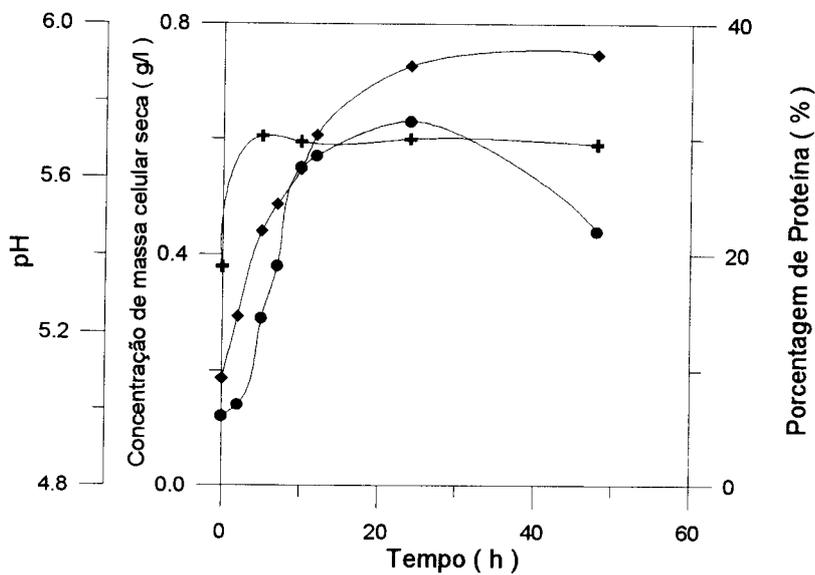


FIGURA 4.11 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura 5, pH inicial 5,0. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆) e porcentagem de proteína (+).

TABELA 4.2 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, pH inicial 6,5.

Meio de cultura	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	MCS (g/l)	Proteína (%)	Aumento de MCS* (%)	pH
D1	2,5	0,72	32,08	—	6,72
D2	5,0	0,75	28,55	4,17	6,78
D3	7,5	0,81	30,60	12,5	7,01
D4	10,0	0,83	31,90	15,28	7,06
D5	15,0	0,98	32,17	36,11	7,19

Comparando-se as tabelas 4.1 e 4.2, observa-se o efeito da concentração de (NH₄)₂SO₄ em pH 5,5 e 6,5, respectivamente. Verificou-se que os resultados de concentração de MCS nos experimentos em que foi utilizado pH 6,5 foram inferiores aos de pH 5,5. O melhor resultado obtido com as diferentes concentrações de fonte de nitrogênio e as duas variações do pH foi 1,12 g/l de massa celular seca e 31,92% de proteína em pH 5,5, com 15 g/l de (NH₄)₂SO₄. Realizou-se também, um ensaio com concentração de 15 g/l de (NH₄)₂SO₄ em pH 5,0, cujos resultados estão na figura 4.11 (Tabela B11 do Apêndice B). Observou-se que em 24 horas obteve-se MCS 43,75% inferior em relação à fermentação apresentada na Figura 4.5 (Tabela B5 do Apêndice B).

As figuras 4.12 a 4.15 (Figuras B12 a B15 do Apêndice B) apresentam os resultados das fermentações em erlenmeyers de emulsão de óleo solúvel de corte por *Saccharomyces lipolytica* em que foram utilizados os meios de cultura E1 a E4, onde foi variada a concentração de NH₄CL, pH inicial 5,5. Observa-se, por estas figuras e através da tabela 4.3, que a substituição do meio de cultura permitiu obter o dobro de MCS, sendo a fase de crescimento estacionário atingida em cerca de 24 horas. A curva de pH subiu rapidamente nas horas iniciais de fermentação, da mesma forma que ocorreu nos experimentos anteriores (Figuras de 4.1 a 4.11).

Nas Tabelas 4.1 e 4.2 observa-se que a massa celular aumentou com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), fato também observado na Tabela 4.3, para NH_4Cl como fonte de nitrogênio. Porém, quando a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumentou de 2,5 para 15 g/l, na tabela 4.1 e 4.2 observa-se o aumento na MCS de 40 e 36% respectivamente, enquanto que utilizando NH_4Cl , um aumento de 0,1 para 1,5 g/l (Tabela 4.3) permitiu que a MCS aumentasse 19,43%, porém com valores maiores de concentração. A redução de DQO diminuiu com o aumento da concentração de NH_4Cl , enquanto a MCS aumentou, em porcentagem, em relação ao meio E1.

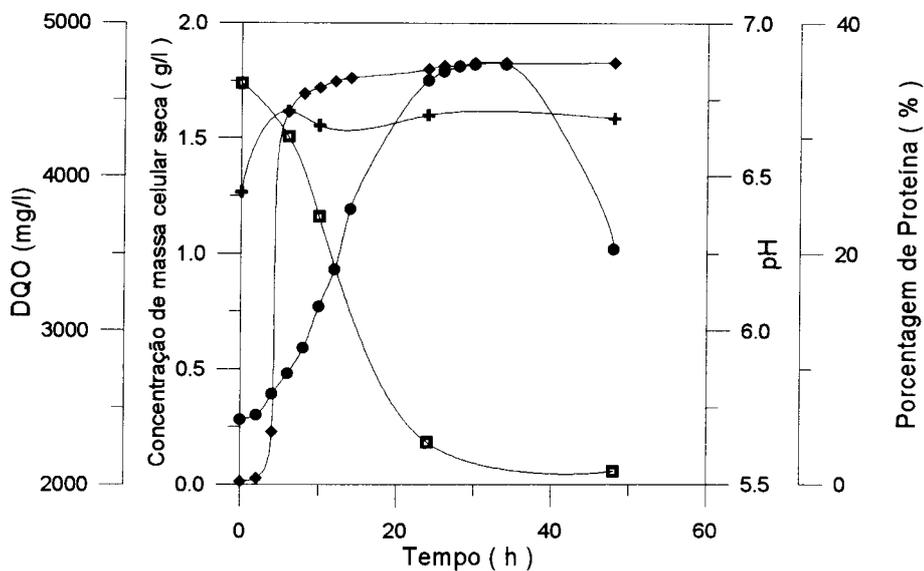


FIGURA 4.12 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E1, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em erlenmeyers.

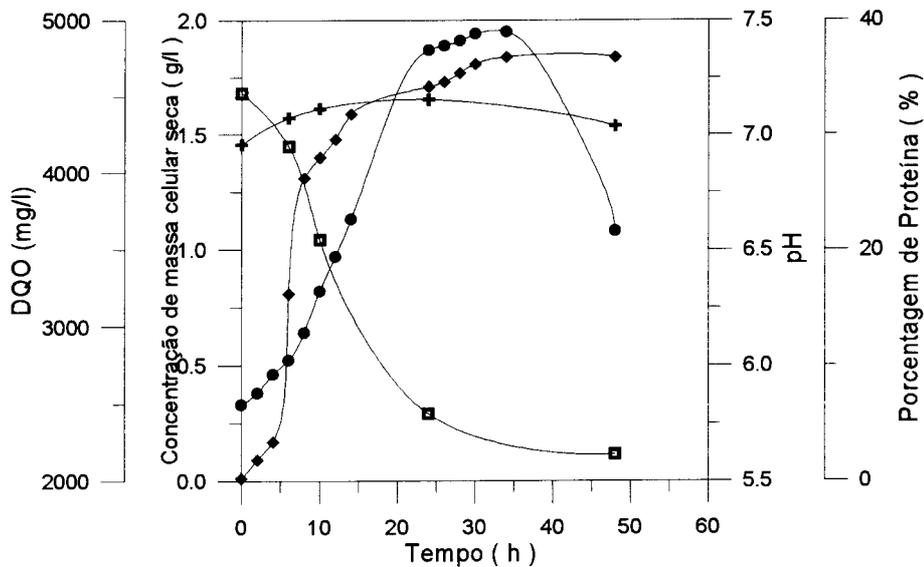


FIGURA 4.13 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E2, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em erlenmeyers.

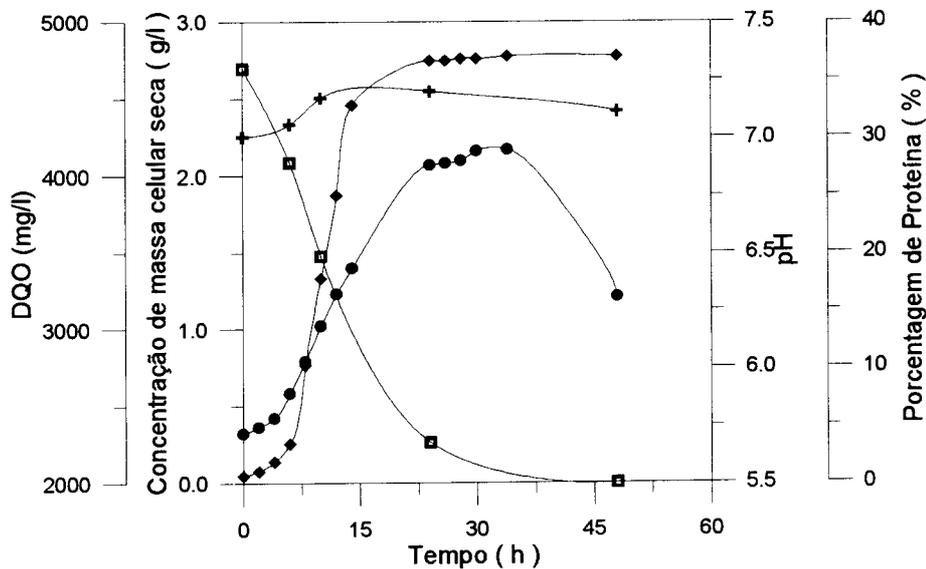


FIGURA 4.14 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E3, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆) e porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em erlenmeyers.

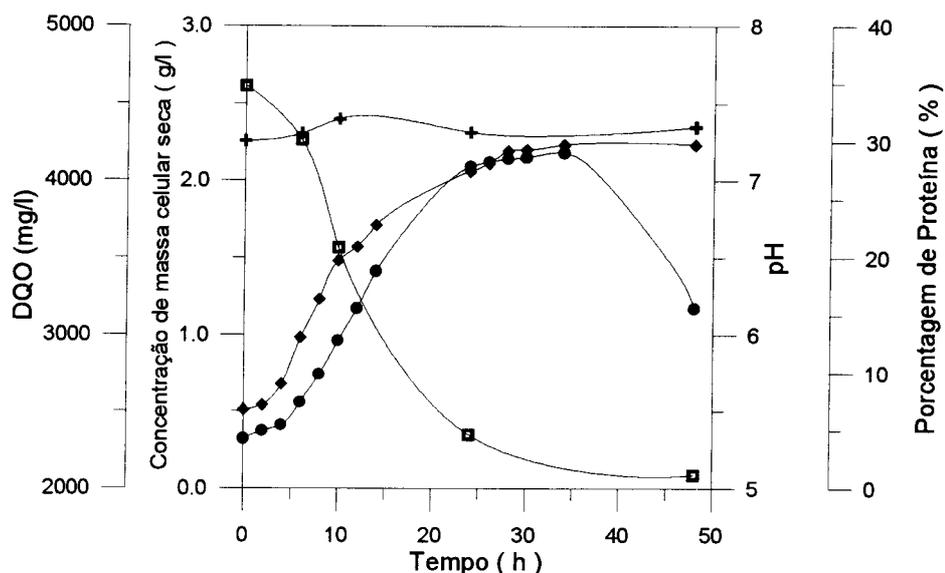


FIGURA 4.15 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E4, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (♦), porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em erlenmeyers.

TABELA 4.3 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em erlenmeyers por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, pH inicial 5,5.

Meio de cultura	NH ₄ CL (g/l)	MCS (g/l)	Proteína (%)	Aumento de MCS* (%)	pH	DQO (mg/l)		Remoção DQO (%)
						(0Horas)	(24 horas)	
E1	0,1	1,75	31,99	---	6,85	4608,69	2272,73	54,72
E2	0,5	1,87	33,09	6,86	7,21	4521,74	2434,78	46,15
E3	1,0	2,07	33,97	18,29	7,33	4695,65	2260,00	51,87
E4	1,5	2,09	30,82	19,43	7,06	4608,69	2347,83	49,06

Tempo de fermentação - 24 Horas

* Aumento de MCS em relação ao meio E1

Como observado na tabela 4.3, a concentração de MCS foi maior em meio com NH₄CL do que com (NH₄)₂SO₄. Assim, utilizando-se os mesmos meios da Tabela 4.3 (Tabela 3.3, item 3.3), foram feitas fermentações em fermentador de 1

litro (item 3.6.2) com taxa de aeração de 1 vvm, cujos resultados estão apresentados nas figuras 4.16 a 4.19, e resumidos na Tabela 4.4.

Comparando-se as Tabelas 4.3 e 4.4, observa-se que a concentração de MCS em 24 horas foi um pouco maior quando se utilizou fermentador de 1 litro, mostrando a maior eficiência da aeração e um pequeno aumento na remoção de DQO.

O aumento de pH até 24 horas variou de 2,1 a 2,4 unidades, valores maiores que os obtidos nas fermentações em erlenmeyers. A média do teor de proteína na MCS permaneceu praticamente constante, comparando-se os ensaios em erlenmeyers e fermentador de 1 litro. Comparando-se as Tabelas 4.1 e 4.2 com a 4.4, observou-se que a utilização de meios com NH_4Cl e fermentador de 1 litro proporcionaram valores de concentração de MCS 50% maiores, se comparados aos meios com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em erlenmeyers.

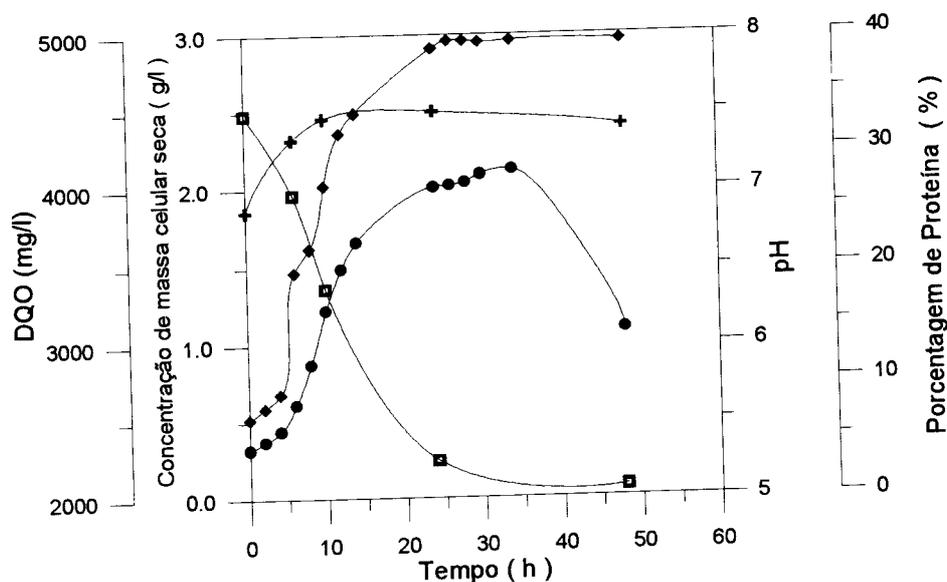


FIGURA 4.16 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E1, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em fermentador de 1 litro.

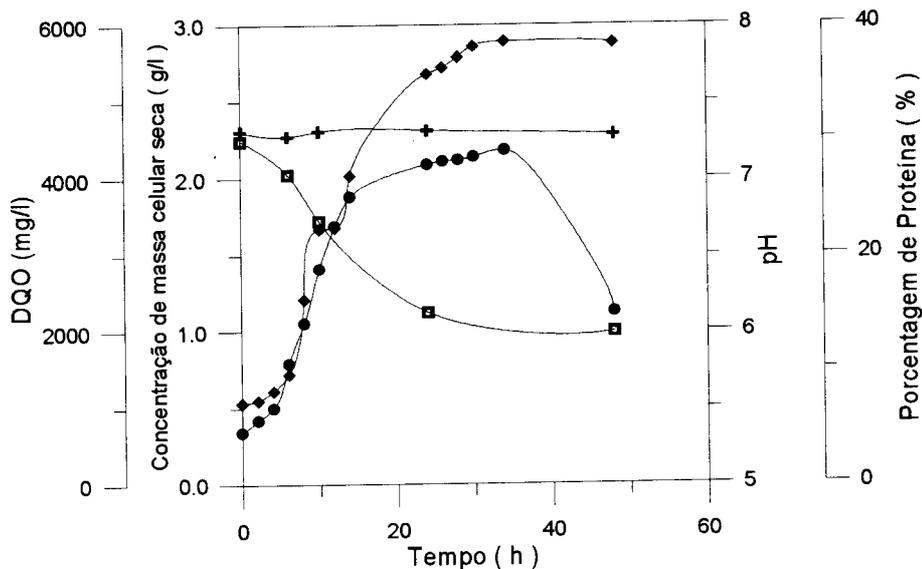


FIGURA 4.17 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E2, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em fermentador de 1 litro.

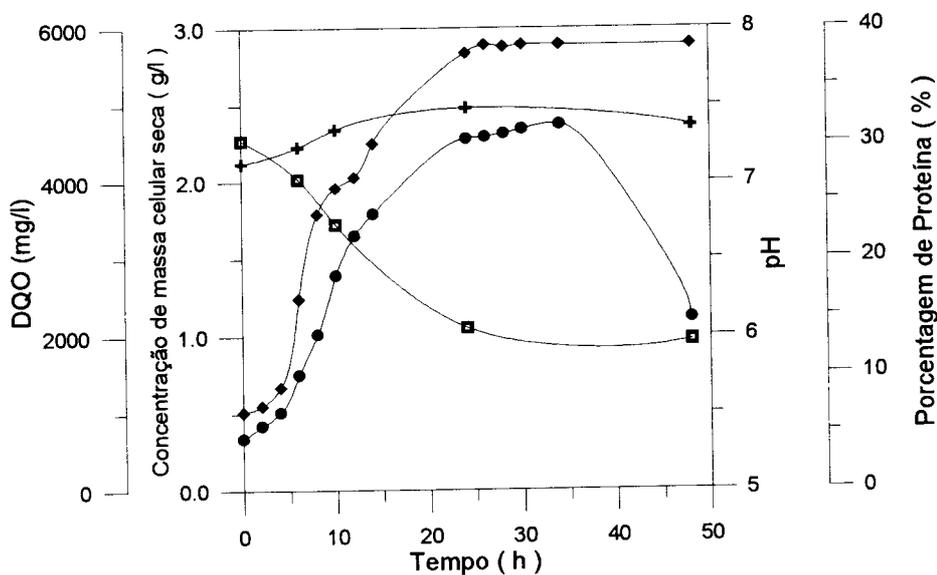


FIGURA 4.18 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E3, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em fermentador de 1 litro.

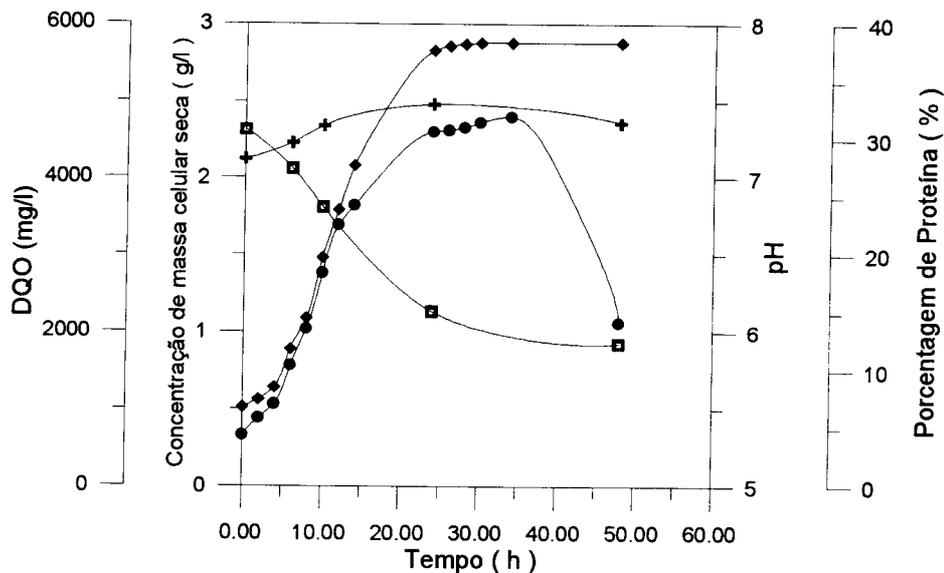


FIGURA 4.19 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E4, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e DQO remanescente (■). Crescimento em fermentador de 1 litro.

TABELA 4.4 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em fermentador de 1 litro por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, pH inicial 5,5.

Meio de cultura	NH ₄ CL (g/l)	MCS (g/l)	Proteína (%)	Aumento de MCS* (%)	pH	DQO (mg/l)		Remoção DQO (%)
						(0Horas)	(24 horas)	
E1	0,1	2,01	33,31	---	7,91	4482,76	2241,38	50,00
E2	0,5	2,09	30,82	3,98	7,68	4537,81	2241,38	50,60
E3	1,0	2,28	33,06	13,43	7,84	4621,85	2100,84	54,55
E4	1,5	2,30	33,51	14,40	7,83	5128,20	2268,90	55,76

Tempo de fermentação - 24 Horas

* Aumento de MCS em relação ao meio E1

As figuras 4.14 e 4.20 a 4.23 (Tabelas B14 e B20 a B23 do Apêndice B) apresentam os resultados de fermentações em erlenmeyers utilizando meio com NH₄CL, onde a porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte no meio de

cultura foi variada de 5 a 40% (v/v). Observa-se nas curvas de MCS que a fase de crescimento estacionário também foi atingida em torno de 24 horas, independentemente da porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte utilizada. A concentração de MCS (Tabela 4.5) passou por um máximo quando a concentração de substrato foi de 20%. A porcentagem de redução de DQO diminuiu com aumento da concentração de substrato e o pH permaneceu, em todos os experimentos, próximo aos observados na Tabela 4.3, quando utilizou-se 5% de substrato em fermentador de 1 litro.

De acordo com a Tabela 4.5 conclui-se que o aumento da porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte causou inibição da levedura, possivelmente causada pelo aumento de agentes bactericidas e germicidas presentes no óleo, que impedem a sua deterioração rápida nas máquinas operatrizes. Esta inibição pode ainda ter sido causada pelo nível de deterioração do óleo, pois apesar da presença de agentes bactericidas e germicidas, com o tempo de uso muitos microrganismos (como bactérias e leveduras) crescem nas máquinas, constituindo-se assim uma emulsão de óleo solúvel de corte parcialmente fermentada, contendo produtos secundários de metabolismo e cadeias de hidrocarbonetos sulfonados parcialmente hidrolizadas, além da presença de ácido sulfúrico gerado por microrganismos que degradam cadeias sulfonadas.

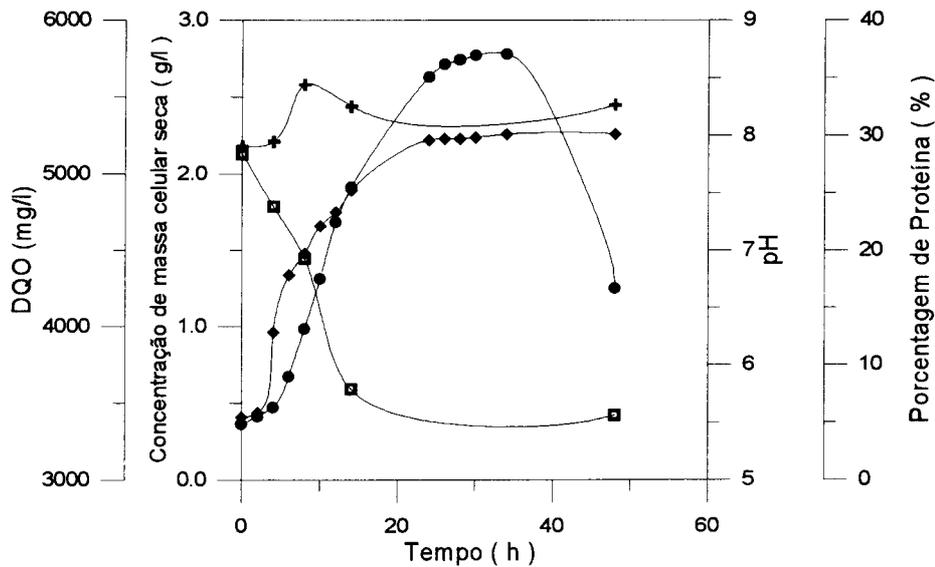


FIGURA 4.20 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E10, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em fermentador de 1 litro.

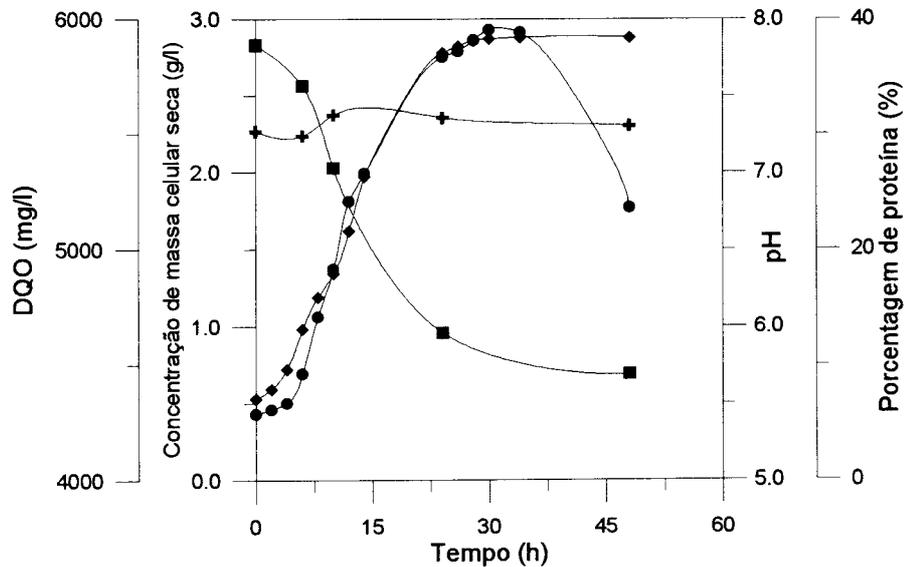


FIGURA 4.21 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E11, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em fermentador de 1 litro.

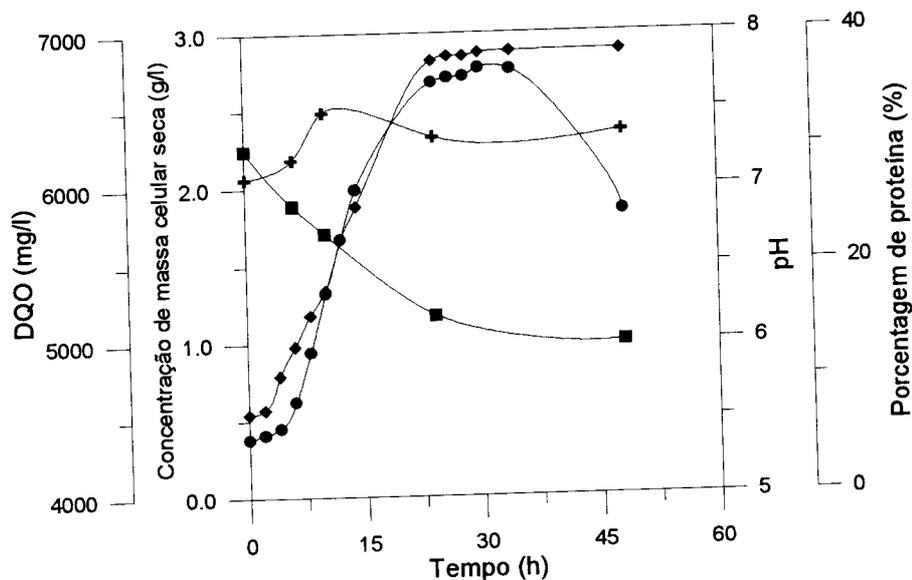


FIGURA 4.22 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E12, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), percentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em erlenmeyers.

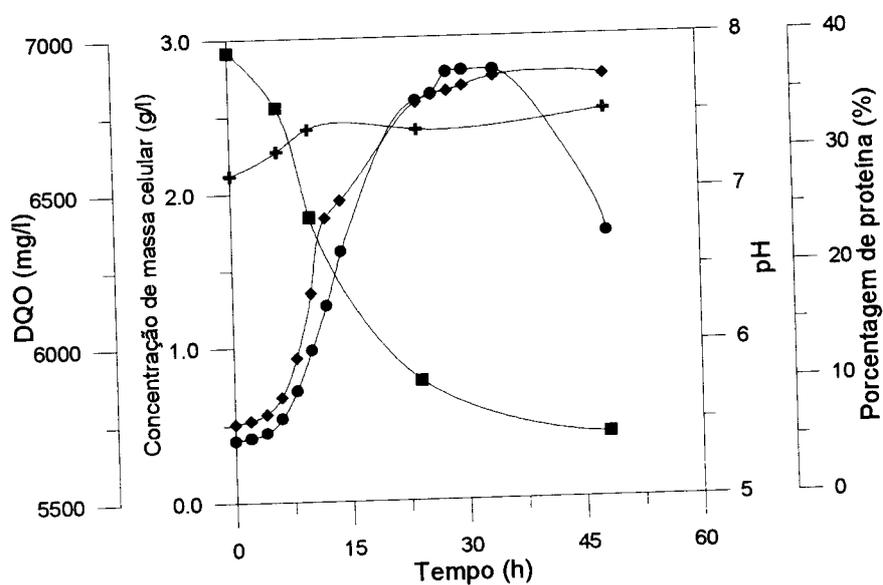


FIGURA 4.23 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E13, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular (•), pH (◆), percentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em erlenmeyers.

TABELA 4.5 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em erlenmeyers por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, pH inicial 5,5.

Meio de cultura	EOSC	MCS	Proteína	Aumento de MCS*	pH	DQO (mg/l)		Remoção DQO (%)
	(% - v/v)	(g/l)	(%)	(%)		(0 Hora)	(24 horas)	
E3	5,0	2,07	33,97	---	7,84	4695,65	2260,00	51,87
E5	10	2,63	32,51	27,05	7,96	5128,20	3589,74	30,00
E6	20	2,75	31,39	32,85	7,78	5887,20	4460,00	24,24
E7	30	2,68	30,96	29,46	7,82	6244,20	4995,20	20,00
E8	40	2,59	32,03	12,13	7,58	6957,60	5708,80	17,95

Tempo de fermentação - 24 Horas

* Aumento de MCS em relação ao meio E3

As Figuras 4.24 a 4.28 (Tabelas B24 a B28 do Apêndice B) mostram os resultados das fermentações utilizando meio com NH_4CL , porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte variando de 5 a 40% (v/v) no meio de cultura, e fermentador de 6 litros. Os valores de concentração de MCS obtidos no tempo de 24h apresentados na Tabela 4.6 foram maiores que os da Tabela 4.5, mostrando que no fermentador de 6 litros as condições empregadas permitiram aumentar a eficiência de fermentação e, conseqüentemente, obter maiores porcentagens de redução de DQO. Observou-se que quando foi utilizado 20% de emulsão de óleo solúvel de corte, obteve-se o maior valor de concentração de MCS (3,12 g/l), e a variação da concentração MCS em relação à porcentagem de óleo solúvel de corte foi menos acentuada, quando comparada com fermentação em erlenmeyers (Tabela 4.5). Para porcentagens de emulsão de óleo solúvel de corte acima de 20% não houve aumento da concentração de MCS, mostrando que houve inibição. Entretanto, em todos estes experimentos a fase de crescimento estacionário também foi atingida em 24h de fermentação. Os valores de porcentagem de proteína na MCS foram próximos aos obtidos em erlenmeyers (Tabela 4.5). Não houve diferença significativa entre os valores de pH, em 24 horas de fermentação, em fermentador de 6 litros, fermentador de 1 litro e em erlenmeyers, Tabelas 4.6, 4.5 e 4.4 respectivamente.

Utilizando-se 1,0 g/l de NH_4Cl e 5% de emulsão de óleo solúvel de corte (meio E3), observou-se através das Figuras 4.14, 4.17 e 4.24 (Tabelas B14, B17 e B24 do Apêndice B) que a massa celular seca aumentou com a melhora das condições de fermentação.

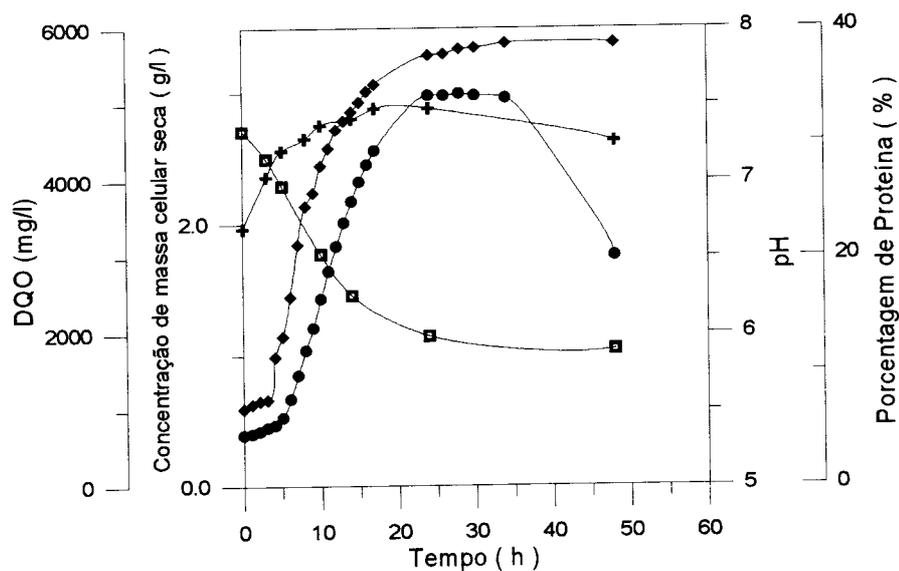


FIGURA 4.24 -Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E3, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (●), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em fermentador de 6 litros.

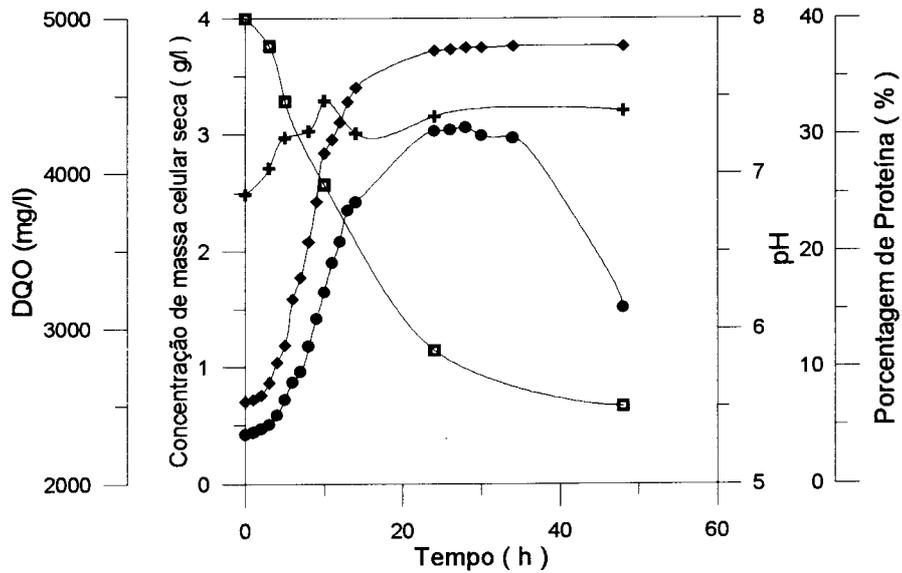


FIGURA 4.25 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E5, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em fermentador de 6 litros.

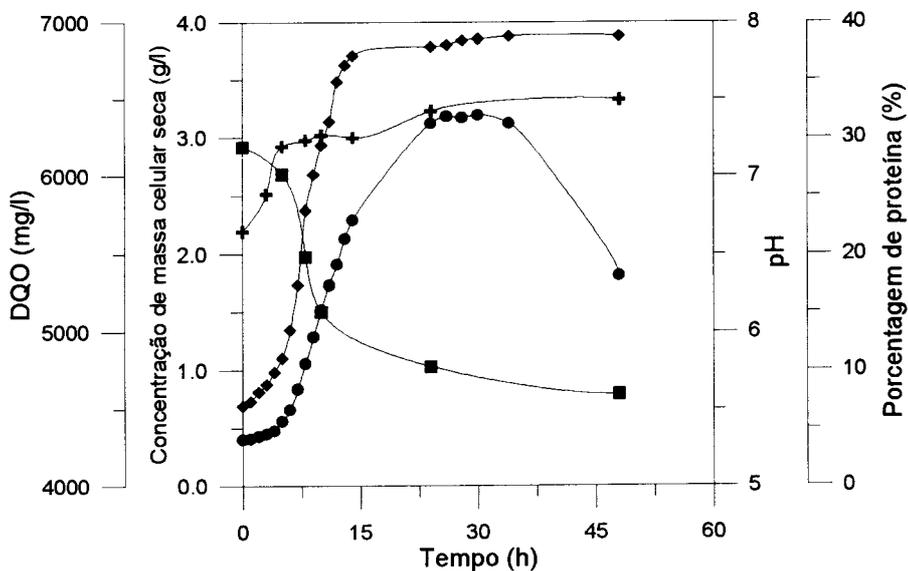


FIGURA 4.26 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E6, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente(■). Crescimento em fermentador de 6 litro.

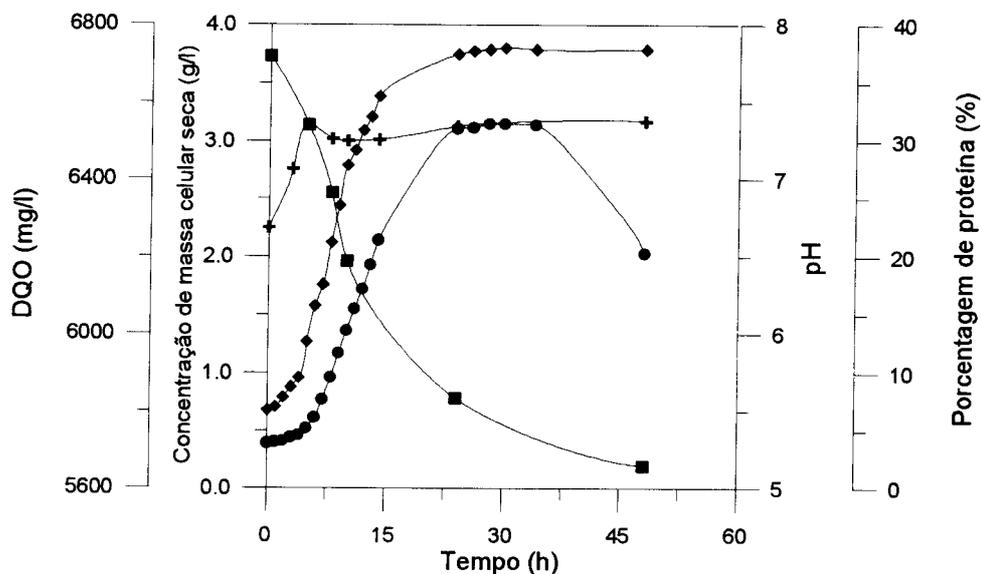


FIGURA 4.27 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E12, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em fermentador de 6 litros.

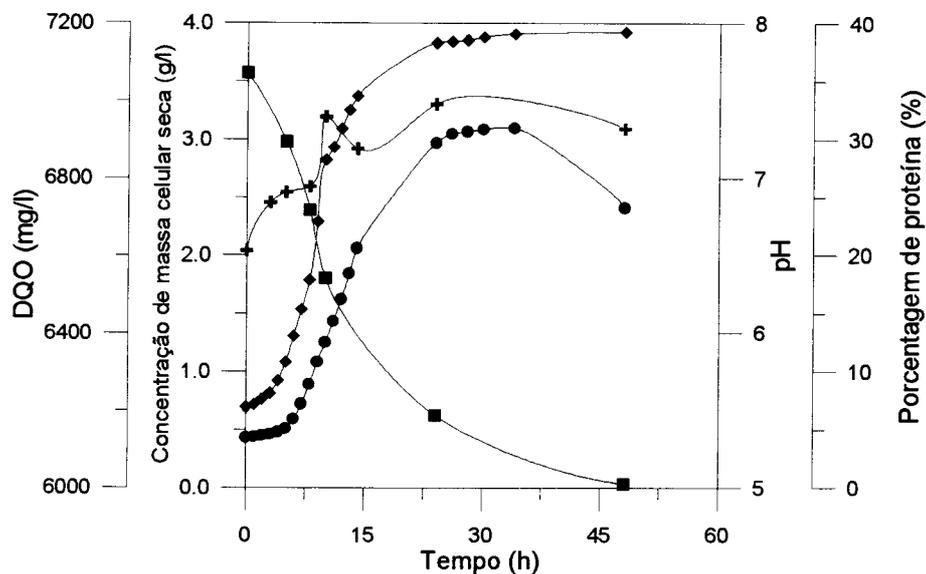


FIGURA 5.28 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% (v/v)) por *Saccharomyces lipolytica* em meio de cultura E8, pH inicial 5,5. Concentração de massa celular seca (•), pH (◆), porcentagem de proteína (+) e D.Q.O. remanescente (■). Crescimento em fermentador de 6 litros.

TABELA 4.6 - Massa celular seca (MCS) e porcentagem de proteína na MCS de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte em erlenmeyers por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, pH inicial 5,5.

Meio de cultura	EOSC (% - v/v)	MCS (g/l)	Proteína (%)	Aumento de MCS* (%)	pH (24 Horas)	DQO (mg/l)		Remoção DQO (%)
						(0 Hora)	(24 horas)	
E3	5	2,98	32,94	---	7,82	4642,86	1964,00	57,65
E5	10	3,03	31,56	1,68	7,79	5000,00	2857,14	42,86
E6	20	3,12	32,27	4,69	7,84	6188,00	4596,80	25,71
E7	30	3,11	31,29	4,36	7,81	6718,40	5657,60	15,79
E8	40	2,97	33,05		7,87	7072,00	6011,20	15,00

Tempo de fermentação - 24 Horas

* Aumento de MCS em relação ao meio E3

A Tabela 4.7 mostra os valores de taxa específica de crescimento e rendimento celular calculados na fase de crescimento exponencial (de 5 a 12 horas de fermentação) das fermentações conduzidas em fermentador de 6 litros (Figuras 4.24 a 4.28). A taxa específica de crescimento aumentou com o aumento da porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte até o limite de 20%, diminuindo para porcentagens maiores. O rendimento celular aumentou com o aumento da porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte até 30% e diminuiu para 40%.

De acordo com PROKOP et al. (1971), no crescimento da *Saccharomyces lipolytica* utilizando n-hexadecano como substrato, a taxa de crescimento linear aumenta com o aumento da concentração de substrato. Comparando seus resultados com os obtidos no presente trabalho, verifica-se também um aumento da taxa de crescimento com o aumento da porcentagem de substrato (óleo solúvel de corte) até 20 %. Segundo PROKOP a taxa de crescimento linear ocorreu no intervalo de 1,5 à 9,5 horas. No presente trabalho não foi observada uma fase de crescimento linear.

SING et al. (1990) cultivaram *Saccharomyces tropicalis* utilizando n-hexadecano como fonte de carbono e obtiveram taxa de crescimento específica de 0,38/h, enquanto que no presente trabalho a maior taxa de crescimento obtida foi de 0,183/h, 52 % menor que a obtida por SING. Este fato é devido à inibição causada por componentes da emulsão de óleo solúvel de corte.

MUNK et al. (1969), citados na revisão bibliográfica, verificaram também que com o aumento da concentração de substrato o rendimento diminui.

TABELA 4.7 Taxa específica de crescimento (μ) e rendimento celular (Y) de fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte por *Saccharomyces lipolytica* em diferentes porcentagens de óleo.

PORCENTAGEM DE ÓLEO (%)	μ (1/h)	Y [(g/l)/(mg O ₂ / l)] x 10 ³
5	0.177	0,97
10	0.181	1,22
20	0.183	1,92
30	0.178	3,00
40	0.170	2,87

Apesar dos baixos valores de concentração de massa celular seca, os resultados mostram que é possível reaproveitar parcialmente emulsão de óleo solúvel de corte para produção de proteína microbiana, embora a redução de DQO não tenha atingido limites desejáveis. Observou-se durante os experimentos que a cor do meio de cultura ficou branco (opaco) após a fermentação, indicando que a levedura utilizou apenas algumas frações do óleo como substrato, restando outras no meio.

A utilização de microrganismos adaptados ao meio de cultura poderá melhorar este processo, eliminando a inibição causada pela emulsão de óleo solúvel de corte. Outros fatores a serem estudados são: relação carbono-

nitrogênio para altas concentrações de emulsão de óleo solúvel de corte no meio de cultura; concentração de sais nutrientes; e fatores de crescimento.

5 - CONCLUSÕES

1) Foi possível produzir massa celular de *Saccharomyces lipolytica* e reduzir a DQO de meio contendo emulsão de óleo solúvel de corte.

2) O aumento da porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte acima de 20% na composição do meio de cultura, causou inibição da levedura e a concentração de massa celular diminuiu à medida em que a porcentagem de óleo aumenta.

3) A redução da DQO do meio de cultura diminuiu à medida em que a porcentagem de emulsão de óleo solúvel de corte aumenta.

4) Os altos valores de DQO remanescente no final das fermentações indicam que algumas frações do óleo solúvel de corte não foram metabolizadas.

5) A concentração limitante de NH_4Cl acima da qual não há aumento da concentração de massa celular é 1,0 g/l, enquanto que para $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a concentração limitante é 10 g/l.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS, R. M. Microorganisms and Petroleum Pollutants. Bioscience, 18 (6): 387-391, 1978.
- BELLO, J., LARRALDE, J., LILLANUEVA, R. Estudios sobre la calidad nutritiva de leveduras alimentos. Anal. bromat., 25 (2) : 215-234, 1973.
- BELLO, J., LARRALDE, J., LILLANUEVA, R. Contribucion al estudio de la digestibilidad proteica de las leveduras alimenticias: *Sacchareomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*. Anal. Bromatol., 25 (2): 197-178, 1973.
- BLANCH, H.W. & EINSELE, A. The Kinetics of Yeast Growth on Pure Hydrocarbons. Biotechnology and Bioengineering, 15: 861-877, 1973
- BLANCH, H.W. & FIETCHER, A. Dispersion and Coalescence Phenomena in the Hydrocarbon Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 16: 539-543, 1974.
- COLIN R., Production of Fatty Acids and Lipid by a *Candida* sp. Growing on a Fraction of n-Alkanes Predominating in Tridecane. Biotechnology and Bioengineering, 10 : 511-533, 1968
- DOSTÁLEK, M., MUNK, V., VOLJOVÁ, O., FENCL, Z. Cultivation of the Yeast *Candida lipolytica* on Hydrocarbons. Biotechnology and Bioengineering, 10: 865-875, 1968.
- EINSELE, A. Biomass from Higher n-Alkanes. in DELLWEG, H. Biotechnology. Florida: Deesfield Beach: c. 1, 44-81, 1983.
- ERTOLA, R. J., LILLY, M.D., WEBB, F.C. Production of Cell Tissue from Hydrocarbons by a Microbiological Process. Biotechnology and Bioengineering, 3: 309-319, 1965.
- ERTOLA, R. J., NAZZA, L. A., BALATTI, A. P. Composition of Cell Material and Biological Value of the Cellular Protein of a *Micrococcus* Strain Grown on Hydrocarbons. Biotechnology and Bioengineering, 11: 409-416, 1969.
- HERBERT, D., PHIPPS, P.J., STRANGE, R. E. Chemical Analysis of Microbial Cells, in: NORRIS, J.R., RIBBON, D. METHODS in MICROBIOLOGY, vol. 5b, c.3, Academic Press London and New York : 209-344, 1971.
- LLEWELYN, D.A.B. The Production of Protein Concentrate Biomass from Hydrocarbons. Microbiology, 1: 63-84, 1967.
- MUNK, V., DOSTÁLEK, M., VOLJOVÁ, O. Cultivation of Yeast on Gas-oil. Biotechnology and Bioengineering, 11: 383-391, 1969.

- PFAMMATTER, N., HOCHKOPPLER, A. LUISI, P. L. Solubilization and Growth of *Candida pseudotropicalis* in Water-in-oil Microemulsions. Biotechnology and Bioengineering, 40: 162-172, 1992.
- PROKOP, A., ERICKSON, L. E. Growth Models of Cultures with Two Liquid Phases. VII. Substrate Dissolved in Dispersed Phases; Effect of Dispersed Phase Volume and Temperature. Biotechnology and Bioengineering, 14: 571-586, 1972.
- PROKOP, A., ERICKSON, L. E., LOPEZ, O. P. Growth Models of cultures with Two Liquid Phases. V. Substrate Dissolved in Dispersed Phase- Experimental Observations. Biotechnology and Bioengineering, 13: 241-256, 1971.
- SADIR, R. Produção de Proteínas por fermentação de querosene; influência do meio de cultura e das variáveis físico-químicas sobre o rendimento celular; composição química da proteína. Tese de Mestrado de livre docência. Faculdade de Tecnologia de alimentos. Campinas, 1972.
- SAMPAIO, R. M. Estudo da produção de Bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação de óleo-diesel comercial. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, 1995.
- SILVA, M. O. S. Demanda Química de Oxigênio (D.Q.O.) in: Análises Físico-químicas para Controle das Estações de Tratamento de Esgotos. São Paulo, CETESB: 33-34, 1977.
- SINGH, M., SAINI, V. S., ADHIKARI, D. K. DESAI, J. D., SISTA, V. R. Production of Bioemulsifier by a SCP-Producing Strain of *Candida tropicalis* During Hydrocarbon Fermentation. Biotechnol. Lett., 12(10): 743-746, 1990.
- VELANKAR, S. K., BARNETT, S. M., HOUSTON, C. W. Microbial Growth on Hydrocarbons - Some Experimental Results. Biotechnology and Bioengineering, 17: 241-251, 1975.
- WAGNER, F., KLEEMANN, T. H., ZAHN, W. Microbial Transformation of Hydrocarbons. Biotechnology and Bioengineering, 11: 393-408, 1969.
- WALKER, J. D., AUSTIN, H. F., COLWELL, R. R. Utilization of mixed hydrocarbon substrate by petroleum-degrading microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol., 21 (1): 27-39, 1974.
- WANG, D. I. C. & OCHOA, A. Measurements on the Interfacial Areas of Hydrocarbon in Yeast Fermentations and Relationships to Specific Growth Rates. Biotechnology and Bioengineering, 14: 245-360, 1972.
- WHITWORTH, D. A. Hydrocarbon Fermentation: Protein and Enzyme Solubilization from *C. lipolytica* Using an Industrial Homogenizer. Biotechnology and Bioengineering, 16: 1399-1406.
- YOSHIDA, F., YAMANE, T., YAGE, H. Mechanism of Liquid Hydrocarbons by Microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 13: 215-228, 1971.

YOSHIDA, F., YAMANE, T., NAKAMOTO, K. I. Fed-Batch Hydrocarbon Fermentation with Colloidal Emulsion Feed. Biotechnol. Bioeng. 15: 257-270, 1973.

APÊNDICE A

TABELA A1 - Dados de Concentração de Proteína e Absorbância para curva de calibração:

Concentração (mg de proteína/ 4 ml)	Absorbância (555 nm)
0.0	0.000
0.5	0.014
1.0	0.027
2.0	0.053
5.0	0.138
10.0	0.297
15.0	0.438
20.0	0.592

Curva de Calibração de proteína:

$$C = (ABS + 3.396572058E^{-3}) / 2,96480855E^{-2}$$

C = Concentração de Proteína (mg de proteína/ 4 ml de solução)

A = Absorbância a 555 nm

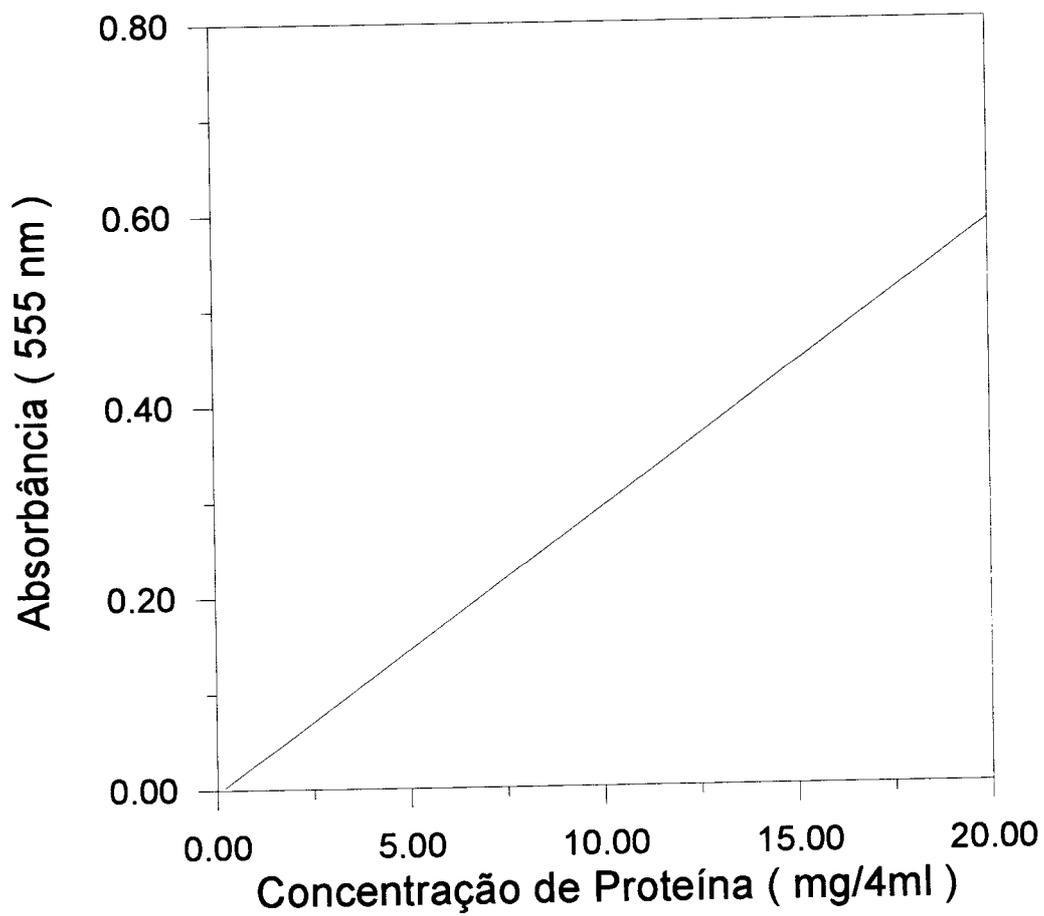


GRÁFICO A1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA.

APÊNDICE B

TABELA B.1 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D1 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.14	5.51	19.26
2	0.17	5.55	
5	0.28	5.64	25.28
7	0.41	5.71	
10	0.69	5.83	26.14
12	0.72	5.98	
24	0.80	6.17	30.98
48	0.59	6.18	29.15

TABELA B.2 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D2 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.16	5.52	24.76
2	0.19	5.58	
5	0.32	5.71	30.03
7	0.48	5.79	
10	0.76	5.87	32.61
12	0.78	5.93	
24	0.84	6.14	30.51
48	0.54	6.16	30.29

TABELA B.3 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D3 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.15	5.52	23.60
2	0.19	5.55	
5	0.34	5.61	30.74
7	0.49	5.76	
10	0.78	5.91	31.77
12	0.81	5.98	
24	0.87	6.18	31.27
48	0.55	6.18	32.80

TABELA B.4 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D4 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.17	5.51	23.30
2	0.21	5.59	
5	0.33	5.71	29.12
7	0.49	5.84	
10	0.81	5.98	29.56
12	0.83	6.07	
24	1.07	6.14	33.41
48	0.58	6.16	34.01

TABELA B.5 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D5 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.16	5.51	22.13
2	0.19	5.59	
5	0.38	5.78	27.50
7	0.60	5.81	
10	1.01	5.94	30.38
12	1.03	6.05	
24	1.12	6.18	31.92
48	0.84	6.21	30.51

TABELA B.6 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D1 com pH inicial 6,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.13	6.53	23.99
2	0.14	6.55	
5	0.26	6.58	30.47
7	0.42	6.59	
10	0.58	6.62	32.56
12	0.64	6.65	
24	0.72	6.72	32.08
48	0.55	6.72	

TABELA B.7 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D2 com pH inicial 6,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína. (%)
0	0.15	6.52	20.79
2	0.18	6.55	
5	0.31	6.61	30.99
7	0.38	6.63	
10	0.59	6.68	29.15
12	0.63	6.72	
24	0.75	6.78	28.55
48	0.48	6.79	30.56

TABELA B.8 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D3 com pH inicial 6,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.13	6.51	17.50
2	0.16	6.54	
5	0.31	6.59	28.28
7	0.39	6.71	
10	0.54	6.89	30.28
12	0.61	6.94	
24	0.81	7.01	30.60
48	0.51	7.02	30.42

TABELA B.9 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D4 com pH inicial 6,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.11	6.52	20.68
2	0.15	6.57	
5	0.25	6.68	31.69
7	0.34	6.76	
10	0.59	6.81	30.58
12	0.65	6.85	
24	0.83	7.06	31.90
48	0.47	7.09	29.42

TABELA B.10 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D5 com pH inicial 6,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.14	6.54	31.31
2	0.16	6.57	
5	0.31	6.67	31.00
7	0.46	6.76	
10	0.75	6.95	31.93
12	0.83	7.03	
24	0.98	7.19	32.17
48	0.59	7.21	30.58

TABELA B.11 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura D5 com pH inicial 5,0.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)
0	0.12	5.08	18.96
2	0.14	5.24	
5	0.29	5.46	30.23
7	0.38	5.53	
10	0.55	5.62	29.74
12	0.57	5.71	
24	0.63	5.89	29.98
48	0.44	5.92	29.51

TABELA B.12 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E1 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.28	5.51	25.29	4608.69
2	0.30	5.52		
4	0.39	5.67		
6	0.48	6.71	32.32	4260.87
8	0.59	6.77		
10	0.77	6.79	31.09	3739.13
12	0.93	6.81		
14	1.90	6.82		
24	1.75	6.85	31.99	2272.73
26	1.79	6.86		
28	1.81	6.86		
30	1.82	6.87		
34	1.82	6.87		
48	1.02	6.87	31.74	2086.96

TABELA B.13 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E2 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.33	5.51	29.12	4521.74
2	0.38	5.59		
4	0.46	5.67		
6	0.52	6.30	31.45	4173.91
8	0.64	6.81		
10	0.82	6.90	32.28	3565.22
12	0.97	6.98		
14	1.13	7.09		
24	1.87	7.21	33.09	2434.78
26	1.89	7.23		
28	1.91	7.27		
30	1.94	7.31		
34	1.95	7.34		
48	1.08	7.34	30.76	2173.91

TABELA B.14 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E3 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.32	5.53	30.03	4695.65
2	0.36	5.55		
4	0.42	5.59		
6	0.58	5.67	31.11	4086.96
8	0.79	6.01		
10	1.02	6.39	33.39	3478.26
12	1.23	6.75		
14	1.40	7.14		
24	2.07	7.33	33.97	2260.00
26	2.08	7.33		
28	2.10	7.34		
30	2.16	7.34		
34	2.17	7.35		
48	1.21	7.35	32.33	2000.00

TABELA B.15 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E4 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.32	5.51	30.03	4608.69
2	0.37	5.54		
4	0.41	5.68		
6	0.56	5.98	30.71	4260.87
8	0.74	6.23		
10	0.96	6.48	31.97	3565.21
12	1.17	6.57		
14	1.41	6.71		
24	2.09	7.06	30.82	2347.83
26	2.12	7.11		
28	2.14	7.19		
30	2.15	7.20		
34	2.18	7.23		
48	1.17	7.23	31.28	2086.96

TABELA B.16 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 1 litro. Meio de cultura E1 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.32	5.52	24.76	4482.76
2	0.37	5.59		
4	0.44	5.68		
6	0.61	6.47	30.96	3965.51
8	0.87	6.62		
10	1.22	7.02	32.76	3362.06
12	1.49	7.36		
14	1.66	7.49		
24	2.01	7.91	33.31	2241.38
26	2.02	7.96		
28	2.04	7.96		
30	2.09	7.95		
34	2.12	7.96		
48	1.09	7.96	32.02	2068.96

TABELA B.17 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 1 litro. Meio de cultura E2 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.34	5.53	30.74	4482.76
2	0.42	5.55		
4	0.50	5.61		
6	0.79	5.72	30.31	4051.72
8	1.05	6.21		
10	1.41	6.67	30.74	3448.27
12	1.69	6.68		
14	1.88	7.02		
24	2.09	7.68	30.82	2241.38
26	2.11	7.72		
28	2.12	7.79		
30	2.14	7.86		
34	2.18	7.89		
48	1.12	7.88	30.41	1982.76

TABELA B.18 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 1 litro. Meio de cultura E3 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.34	5.51	28.26	4537.81
2	0.42	5.55		
4	0.51	5.67		
6	0.75	6.24	29.68	4033.61
8	1.01	6.79		
10	1.39	6.96	31.18	3445.38
12	1.65	7.03		
14	1.79	7.25		
24	2.28	7.84	33.06	2100.84
26	2.29	7.89		
28	2.31	7.88		
30	2.34	7.89		
34	2.37	7.89		
48	1.11	7.89	31.45	1932.77

TABELA B.19 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 1 litro. Meio de cultura E4 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.33	5.51	26.56	4621.85
2	0.44	5.56		
4	0.53	5.64		
6	0.78	5.89	31.78	4117.65
8	1.02	6.09		
10	1.38	6.48	31.40	3613.44
12	1.69	6.79		
14	1.82	7.08		
24	2.30	7.83	33.51	2268.91
26	2.31	7.86		
28	2.33	7.87		
30	2.36	7.88		
34	2.40	7.88		
48	1.06	7.88	30.54	1848.73

TABELA B.20 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E5 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.36	5.54	29.04	5128.20
2	0.41	5.58		
4	0.47	6.28		
6	0.67	6.78	29.44	4786.32
8	0.98	6.97		
10	1.31	7.21	34.37	4444.44
12	1.68	7.33		
14	1.91	7.52		
24	2.63	7.96	32.51	3589.74
26	2.71	7.97		
28	2.74	7.97		
30	2.77	7.98		
34	2.78	8.01		
48	1.25	8.01	32.64	3418.80

TABELA B.21 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E6 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa celular seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.43	5.53	30.19	5887,20
2	0.46	5.59		
4	0.50	5.72		
6	0.69	5.98	29.81	5708,80
8	1.06	6.19		
10	1.37	6.34	31.63	5352,00
12	1.81	6.62		
14	1.99	6.97		
24	2.75	7.78	31.39	4638,40
26	2.79	7.82		
28	2.86	7.86		
30	2.93	7.87		
34	2.91	7.88		
48	1.77	7.88	30.68	4460,00

TABELA B.22 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E7 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0	5.54	27.50	6244,00
2	0.41	5.57		
4	0.45	5.79		
6	0.62	5.98	29.10	5887,20
8	0.94	6.18		
10	1.32	6.34	33.19	5708,80
12	1.67	6.67		
14	1.99	6.88		
24	2.68	7.82	30.96	5173,60
26	2.71	7.85		
28	2.72	7.85		
30	2.77	7.87		
34	2.76	7.88		
48	1.84	7.88	31.34	4995,20

TABELA B.23 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em erlenmeyers. Meio de cultura E8 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.40	5.51	28.24	6957,60
2	0.42	5.53		
4	0.45	5.57		
6	0.54	5.68	30.29	6779,20
8	0.72	5.93		
10	0.98	6.35	32.18	6422,40
12	1.27	6.84		
14	1.62	6.95		
24	2.59	7.58	32.03	5887,20
26	2.63	7.63		
28	2.77	7.65		
30	2.78	7.68		
34	2.78	7.74		
48	1.72	7.74	33.53	5708,80

TABELA B.24 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (5% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 6 litros. Meio de cultura E3 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.39	5.51	22.48	4642.86
1	0.40	5.54		
2	0.42	5.56		
3	0.45	5.57	26.98	4285.71
4	0.47	5.85		
5	0.53	5.98	29.27	3928.57
6	0.67	6.24		
7	0.85	6.58		
8	1.04	6.83	30.32	
9	1.21	6.92		
10	1.43	7.10	31.49	3035.00
11	1.64	7.21		
12	1.83	7.33		
13	2.01	7.39		
14	2.17	7.45	32.02	2500.00
15	2.32	7.51		
16	2.45	7.58		
17	2.56	7.63		
24	2.98	7.82	32.94	1964.28
26	2.98	7.83		
28	2.99	7.86		
30	2.98	7.87		
34	2.96	7.90		
48	1.75	7.90	30.06	1785.70

TABELA B.25 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (10% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 6 litros. Meio de cultura E5 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.42	5.53	24.89	5000.00
1	0.44	5.54		
2	0.47	5.57		
3	0.51	5.65	27.11	4821.42
4	0.59	5.78		
5	0.72	5.89	29.74	4464.28
6	0.87	6.19		
7	0.96	6.33		
8	1.18	6.56	30.30	
9	1.42	6.82		
10	1.65	7.13	32.91	3928.57
11	1.90	7.22		
12	2.08	7.33		
13	2.35	7.46		
14	2.42	7.55	30.10	
24	3.03	7.79	31.56	2857.14
26	3.04	7.80		
28	3.06	7.81		
30	2.99	7.81		
34	2.97	7.82		

TABELA B.26 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (20% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 6 litros. Meio de cultura E6 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.40	5.52	21.92	6188,00
1	0.41	5.55		
2	0.43	5.61		
3	0.45	5.66	25.10	
4	0.48	5.74		
5	0.56	5.83	29.20	6011,20
6	0.66	6.01		
7	0.84	6.30		
8	1.06	6.78	29.75	5480,80
9	1.29	7.01		
10	1.52	7.20	30.18	5127,20
11	1.73	7.35		
12	1.91	7.61		
13	2.13	7.72		
14	2.29	7.78	29.97	
24	3.12	7.84	32.27	4773,60
26	3.18	7.85		
28	3.17	7.88		
30	3.19	7.89		
34	3.12	7.91		
48	1.81	7.91	33.26	4596,80

TABELA B.27 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (30% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 6 litros. Meio de cultura E7 com pH inicial 5,5.

Tempo	Massa	pH	Proteína	DQO
(h)	Celular Seca (g/l)		(%)	(mg/l)
0	0.39	5.51	22.48	6718,4
1	0.40	5.53		
2	0.41	5.59		
3	0.44	5.66	27.56	
4	0.46	5.72		
5	0.52	5.95	31.45	6541,60
6	0.61	6.18		
7	0.77	6.32		
8	0.96	6.59	30.21	6364,80
9	1.17	6.83		
10	1.36	7.09	30.01	6188,00
11	1.55	7.19		
12	1.72	7.32		
13	1.93	7.41		
14	2.14	7.54	30.10	
24	3.11	7.81	31.29	5834,40
26	3.12	7.83		
28	3.15	7.84		
30	3.15	7.85		
34	3.14	7.84		
48	2.03	7.84	31.73	5657,60

TABELA B.28 - Fermentação de emulsão de óleo solúvel de corte (40% - v/v) por *Saccharomyces lipolytica* em fermentador de 6 litros. Meio de cultura E8 com pH inicial 5,5.

Tempo (h)	Massa Celular Seca (g/l)	pH	Proteína (%)	DQO (mg/l)
0	0.43	5.52	20.39	7072,00
1	0.44	5.54		
2	0.45	5.57		
3	0.46	5.61	24.56	
4	0.48	5.69		
5	0.51	5.81	25.46	6895,20
6	0.59	5.98		
7	0.72	6.15		
8	0.89	6.34	25.96	6718,40
9	1.08	6.72		
10	1.25	7.12	31.97	6541,60
11	1.43	7.20		
12	1.62	7.32		
13	1.84	7.44		
14	2.06	7.53	29.22	
24	2.97	7.87	33.05	6188,88
26	3.05	7.88		
28	3.07	7.89		
30	3.09	7.91		
34	3.10	7.93		
48	2.41	7.94	30.93	6011,20