

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE DE  
*Saccharomyces lipolytica* POR FERMENTAÇÃO DE  
ÓLEO-DIESEL COMERCIAL

Attestar

Este exemplar corresponde a redação final  
da tese defendida por Romildo Martins Sampaio  
e aprovada pela Comissão Julgadora em 08.05.95

Ranulfo Monte Alegre

ROMILDO MARTINS SAMPAIO  
ENGENHEIRO QUÍMICO

Prof. Dr. RANULFO MONTE 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  
ABRIL/95



UNIDADE	3C
N.º CHAMADA:	TUNICAMP SA47E
V.	Ex.
TOMBO BC	24805
PROC.	433/95
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/06/95
N.º CPD	

CM-00070696-3

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

Sa192e Sampaio, Romildo Martins  
Estudo da produção de biomulsificante de *saccharomyces lipolytica* por fermentação de óleo-diesel comercial / Romildo Martins Sampaio. -- Campinas, SP : [s.n], 1995.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.\*Bioemulsificante. 2. *Saccharomyces lipolytica*.  
3.Hidrocarboneto - Fermentação. I. Monte Alegre, Ranulfo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

## BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre - Orientador

  
Profa. Dra. Lucia Regina Durrant - Membro

  
Profa. Dra. Maria Helena A. Santana - Membro

  
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra - Membro

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A DEUS pela vida;

Aos meus pais, Romildo e Dorzinha, pelo amor, carinho e compreensão. A eles tudo devo;

Aos meus irmãos Lauro, Guilherme e Marco;

A toda a minha família, em especial a minha tia Loura, pelo carinho e amizade;

A todos os amigos que fiz ao longo desta jornada. O apoio, ajuda e incentivo deles foi fundamental para eu alcançar o meu objetivo;

A Newton e Abigail, pessoas maravilhosas pelas quais eu nutro uma grande admiração;

A Bianca, minha grande incentivadora, pelos momentos maravilhosos. O seu amor e carinho sempre me ajudaram nas horas mais difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Ranulfo Monte Alegre pela sua orientação, paciência, dedicação e amizade durante todo o transcorrer do trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de estudos;

Ao Fundo de Apoio a Pesquisa da UNICAMP - FAEP, pelo auxílio financeiro;

A Professora Maria Angela pelo empréstimo dos equipamentos e vidrarias do Laboratório de Separações Físicas;

A Engenheira Fátima do Laboratório de Bioengenharia, pelo empréstimo de equipamentos e vidrarias;

Aos Professores Nadja, Armando, Castor e Arivaldo pela amizade e incentivo desde a graduação;

Aos amigos Roberto e Ronaldo pela grande ajuda.

## ÍNDICE

RESUMO .....	i
SUMMARY .....	ii
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - OBJETIVOS .....	3
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 - Microrganismos que Degradam Hidrocarbonetos .....	4
3.2 - Caracterização Química de um Bioemulsificante .....	7
3.3 - Mecanismos de Ataque e Assimilação do Hidrocarboneto .....	11
3.4 - Fermentação de Hidrocarbonetos: Condução e Fatores de Influência .....	14
3.5 - Aspectos Ecológicos da Biodegradação no Meio-Ambiente .....	17
3.5.1 - Considerações e Comparações Acerca da Biodegradação de Hidrocarbonetos .....	17
3.6 - A Fermentação de Hidrocarbonetos e a Produção de Proteína Unicelular .....	20
3.6.1 - Introdução .....	20
3.6.2 - Seleção do Microrganismo .....	21
3.6.3 - Substrato e Conteúdo Protéico .....	23
3.6.4 - Produção Industrial de SCP a Partir de Hidrocarbonetos .....	26
4 - MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1 - Microrganismo e Meio de Cultura .....	29
4.2 - Fermentação .....	30
4.3 - Substrato .....	30
4.4 - Equipamentos .....	31
4.5 - Metodologia Analítica .....	32
4.5.1 - Determinação do Crescimento Celular .....	32
4.5.2 - Determinação da Atividade do Bioemulsificante .....	33
4.5.3 - Determinação de Proteína .....	33
4.5.4 - Determinação do pH .....	33
4.5.5 - Determinação do Consumo de Substrato .....	34
4.5.6 - Cálculo dos Parâmetros Cinéticos .....	34
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1 - Experimentos em Frascos Agitados .....	36
5.1.1 - Atividade do Bioemulsificante .....	37
5.1.1.1 - Influência do Meio de Cultura .....	37
5.1.1.2 - Influência do pH e da Concentração de Substrato .....	38
5.1.2 - Produção de Biomassa .....	44
5.1.2.1 - Influência do Meio de Cultura .....	44
5.1.2.2 - Influência do pH e da Concentração de Substrato .....	44

5.1.3 - Teor de Proteína .....	47
5.2 - Experimentos em Fermentador .....	48
5.2.1 - Aspectos Gerais .....	48
5.2.2 - Consumo de Substrato .....	49
5.2.3 - Influência do pH .....	50
5.2.4 - Influência da Concentração de Substrato .....	55
5.3 - Cálculo dos Parâmetros Cinéticos .....	58
6 - CONCLUSÕES .....	60
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
APÊNDICE .....	66
APÊNDICE A .....	67
APÊNDICE B .....	75

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1-Estabilização de Emulsões de Óleos Vegetais pelo Liposan .....	8
TABELA 3.2-Comparação das Propriedades de Emulsificação e de Estabilização .....	8
TABELA 3.3-Bioemulsificantes - Algumas Estruturas Químicas e Seus Microrganismos de Origem.....	9
TABELA 3.4-Composição de Óleos Crus e Refinados .....	18
TABELA 3.5-Percentual dos Componentes de Cada Óleo Após a Biodegradação .....	18
TABELA 3.6-Percentual de Degradação de um Óleo Cru Com Microrganismos de Três Diferentes Portos e do Fundo do Mar.....	19
TABELA 3.7-Comparação Entre a Composição de Aminoácidos de Leveduras e Outros Alimentos .....	22
TABELA 3.8-Custos Comparativos de Produção .....	28
TABELA 3.9-Custos de Investimentos Comparativos .....	28
TABELA 5.1-Produção Celular Máxima Conseguída em Frascos Agitados. pH inicial 5,00 e concentração de substrato 3%.....	46
TABELA 5.2-Comparação dos Melhores Valores de Atividade do Bioemulsificante e de Produção de Massa Celular Seca, Obtidos em Frascos Agitados e em Fermentador .....	49
TABELA 5.3-Taxa de Degradação de Óleo-Diesel Após 120 Horas de Fermentação .....	50
TABELA 5.4-Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato 3%, pH inicial 5,00, sem controle.....	51
TABELA 5.5-Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato 3%, pH inicial 5,00, com controle .....	51
TABELA 5.6-Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato 5%, pH inicial 5,00, sem controle.....	52
TABELA 5.7-Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato 5%, pH inicial 5,00, com controle .....	53
TABELA 5.8-Taxa Específica de Crescimento e de Rendimento, para Concentrações de Substrato de 3% e 5%, em fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> .....	58
TABELA A1-Análises em Frascos Agitados (Meio 1, Concentração de Substrato de 3%, pH 5,00) .....	67

TABELA A2-Análises em Frascos Agitados (Meio 2, Concentração de Substrato de 3%, pH 5,00) .....	67
TABELA A3-Análises em Frascos Agitados (Meio 3, Concentração de Substrato de 3%, pH 5,00) .....	67
TABELA A4-Análises em Frascos Agitados (Meio 1, Concentração de Substrato de 3%, pH 4,50) .....	68
TABELA A5-Análises em Frascos Agitados (Meio 2, Concentração de Substrato de 3%, pH 4,50) .....	68
TABELA A6-Análises em Frascos Agitados (Meio 3, Concentração de Substrato de 3%, pH 4,50) .....	68
TABELA A7-Análises em Frascos Agitados (Meio 1, Concentração de Substrato de 3%, pH 4,00) .....	69
TABELA A8-Análises em Frascos Agitados (Meio 2, Concentração de Substrato de 3%, pH 4,00) .....	69
TABELA A9-Análises em Frascos Agitados (Meio 3, Concentração de Substrato de 3%, pH 4,00) .....	69
TABELA A10-Análises em Frascos Agitados (Meio 1, Concentração de Substrato de 5%, pH 5,00) .....	70
TABELA A11-Análises em Frascos Agitados (Meio 2, Concentração de Substrato de 5%, pH 5,00) .....	70
TABELA A12-Análises em Frascos Agitados (Meio 3, Concentração de Substrato de 5%, pH 5,00) .....	70
TABELA A13-Análises em Frascos Agitados (Meio 1, Concentração de Substrato de 5%, pH 4,50) .....	71
TABELA A14-Análises em Frascos Agitados (Meio 2, Concentração de Substrato de 5%, pH 4,50) .....	71
TABELA A15-Análises em Frascos Agitados (Meio 3, Concentração de Substrato de 5%, pH 4,50) .....	71
TABELA A16-Análises em Frascos Agitados (Meio 1, Concentração de Substrato de 5%, pH 4,00) .....	72
TABELA A17-Análises em Frascos Agitados (Meio 2, Concentração de Substrato de 5%, pH 4,00) .....	72
TABELA A18-Análises em Frascos Agitados (Meio 3, Concentração de Substrato de 5%, pH 4,00) .....	72
TABELA A19-Análises em Fermentador (Meio 2, Concentração de Substrato de 3%, pH 5,00 Sem Controle) .....	73
TABELA A20-Análises em Fermentador (Meio 2, Concentração de Substrato de 5%, pH 5,00 Sem Controle) .....	73
TABELA A21-Análises em Fermentador (Meio 2, Concentração de Substrato de 3%, pH 5,00 Com Controle).....	73

TABELA A22-Análises em Fermentador  
(Meio 2, Concentração de Substrato de 5%, pH 5,00 Com Controle)..... 74

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1-Estruturas de Bioemulsificantes.....	10
FIGURA 3.2-Ilustração de Possíveis Formas de Consumo de Um Hidrocarboneto Líquido Pelas Células.....	15
FIGURA 5.1-Produção de Bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 4,50 e concentração de substrato 3% .	38
FIGURA 5.2-Produção de Bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 5,00 e concentração de substrato 3% .	40
FIGURA 5.3-Variação do pH de Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> . pH inicial 5,00 e concentração de substrato 3% .	40
FIGURA 5.4-Produção de Bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 4,00 e concentração de substrato 5% .	41
FIGURA 5.5-Variação do pH de Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> . pH inicial 4,00 e concentração de substrato 5% .	41
FIGURA 5.6-Variação da Atividade do Bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. Tempo de 24 horas e concentração de substrato 3%.....	42
FIGURA 5.7-Variação da Atividade do Bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. Tempo de 24 horas e concentração de substrato 5%.....	42
FIGURA 5.8-Produção de Bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 5,00 e concentração de substrato 5% .	43
FIGURA 5.9-Produção de Biomassa de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 5,00 e concentração de substrato 3% .	45
FIGURA 5.10-Produção de Biomassa de <i>Saccharomyces lipolytica</i> por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 4,00 e concentração de substrato 5% .	45
FIGURA 5.11-Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular e Consumo de Substrato na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de Substrato de 3%, pH inicial 5,00 sem controle .....	52
FIGURA 5.12-Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular e Consumo de Substrato na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de Substrato de 3%, pH inicial 5,00 com controle.....	53
FIGURA 5.13-Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular e Consumo de Substrato na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de Substrato de 5%, pH inicial 5,00 sem controle .....	54

FIGURA 5.14-Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular e Consumo de Substrato na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador de Bancada. Concentração de Substrato de 5%, pH inicial 5,00 com controle.....	54
FIGURA 5.15-Atividade do Bioemulsificante na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial de <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador. Concentração de substrato 3%, pH inicial 5,00 com e sem controle.....	56
FIGURA 5.16-Atividade do Bioemulsificante na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial de <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador. Concentração de substrato 5%, pH inicial 5,00 com e sem controle.....	56
FIGURA 5.17-Produção de Massa Celular Seca na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial de <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador. Concentração de substrato 3%, pH inicial 5,00 com e sem controle.....	57
FIGURA 5.18-Produção de Massa Celular Seca na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial de <i>Saccharomyces lipolytica</i> em Fermentador. Concentração de substrato 5%, pH inicial 5,00 com e sem controle.....	57
FIGURA A1-Variação da Absorbância em Função da Concentração Celular (Meio 1).....	75
FIGURA A2-Variação da Absorbância em Função da Concentração Celular (Meio 2).....	76
FIGURA A3-Variação da Absorbância em Função da Concentração Celular (Meio 3).....	77
FIGURA A4-Curva de Calibração de Proteína.....	78
FIGURA A5-ln (Densidade Ótica) em Função do Tempo (Meio 2, Concentração de Substrato de 3%, pH 5,00).....	79
FIGURA A6-ln (Densidade Ótica) em Função do Tempo (Meio 2, Concentração de Substrato de 5%, pH 5,00).....	80

## RESUMO

Grande número de leveduras, bactérias e fungos, são conhecidos pela capacidade que possuem em consumir diversos tipos de hidrocarbonetos, produzindo biomassa de rica composição protéica. Neste tipo de fermentação, esses microrganismos são também responsáveis pela biodegradação do substrato utilizado, através da produção de um bioemulsificante extracelular no meio de fermentação. Esse mecanismo é importante na limpeza e remoção de poluentes de petróleo de ecossistemas contaminados. A biodegradação é acompanhada pela emulsificação do substrato no meio de crescimento, devido à produção de lipoproteínas e lipopolissacarídeos que atuam reduzindo a tensão interfacial e aumentando a área interfacial do substrato no meio.

No presente trabalho, a levedura *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 (NCYC 825), foi cultivada em meios de cultura contendo óleo-diesel comercial como principal fonte de carbono. A influência de três meios de diferentes composições, três níveis de pH (4,00, 4,50 e 5,00) e duas diferentes concentrações de substrato (3 e 5% de óleo-diesel) na produção do bioemulsificante e no rendimento celular, foram estudados. As fermentações foram primeiramente conduzidas em frascos agitados, e depois, já com as melhores condições operacionais selecionadas, em um fermentador de bancada.

Nos frascos agitados, o bioemulsificante produzido apresentou uma maior atividade quando se utilizou pH 5,00 e concentração de substrato de 3%. Para essas condições, os valores de rendimento celular foram de 4,7 g/l, 5,7 g/l e 6,3 g/l para os diferentes meios utilizados. O teor de proteína variou de 39,1% a 39,8% em base seca. Os meios de cultura que continham cloreto de amônio como fonte nitrogenada, mostraram maior eficiência que o meio que continha sulfato de amônio.

No fermentador de bancada, as condições operacionais foram pH 5,00, com e sem controle ao longo da fermentação, concentração de substrato de 3% e 5%. Obteve-se uma melhora acentuada na produção de biomassa e do bioemulsificante, e uma redução no tempo total de fermentação. O melhor rendimento celular (8,1 g/l), foi conseguido com pH 5,00 controlado e concentração de substrato de 3%. Por sua vez, as maiores atividades do bioemulsificante foram obtidas com pH 5,00 sem controle, e concentração de substrato de 5%.

## SUMMARY

Many yeasts, bacteria and fungi are known for their capacity of assimilating hydrocarbons producing Single Cell Protein (SCP) of rich protein composition. In this type of fermentation these microorganisms are also capable of emulsifying these hydrocarbons due to the production of extracellular bioemulsifier in the fermentation medium. This mechanism is important in the cleaning and removal of petroleum pollutants of contaminated areas. Biodegradation is due the production of lipoproteins and lipopolysaccharides which reduce the interfacial tension and increase the interfacial area of the substrate in the medium.

In the present work, the yeast *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 (NCYC 825) was cultured in a medium containing commercial diesel-oil as the main carbon source. The influence of three different compositions of the fermentation medium (medium 1,2 and 3), three levels of pH (4.00, 4.50 and 5.00) and two different substrate concentrations (3 and 5% of diesel-oil) in the production of the bioemulsifier and cellular yield were studied. The fermentations were first conducted in shake flasks. With the best conditions obtained in this system, a run was made in a 6 liters fermentation unit.

The bioemulsifier produced in the shake flasks showed the higher activity when medium 2 with pH 5.00 and substrate concentration of 3% was utilized. Values for cellular yields under these conditions were 4.7 g/l, 5.3 g/l and 6.3 g/l for medium 1, 2 and 3 respectively. Culture medium containing ammonium chloride were more efficient than medium containing ammonium sulphate. Protein yield was 39,1% to 39,8 % (dry basis).

Operational conditions in the 6 liters fermentor were pH 5.00 (controlled and not controlled during the fermentation), substrate concentration 3 and 5% and culture medium 2. The best results in the cellular production and the bioemulsifier and also a reduction in the fermentation total time was achieved. The best cellular yield (8.1 g/l) was obtained with the maintenance of pH 5.00 during fermentation and substrate concentration of 3%. The higher bioemulsifier activity were obtained with pH 5.00, not controlled during fermentation, and substrate concentration of 5%.

## 1 - INTRODUÇÃO

O crescimento de microrganismos que degradam hidrocarbonetos é acompanhado pela emulsificação do substrato no meio de crescimento (BELSKY et al.,1979). A emulsificação é devido à produção de lipoproteínas e lipopolissacarídeos extracelulares que reduzem a tensão superficial no meio (CIRIGLIANO & CARMAN,1984). Numerosos trabalhos têm descrito a capacidade de bactérias, leveduras e fungos em degradar hidrocarbonetos (WALKER et al.,1975).

A habilidade dos microrganismos em utilizarem hidrocarbonetos é conhecida desde o início do século passado (ATLAS,1978). Recentemente, a síntese de bioemulsificantes extracelulares têm recebido atenção devido às suas propriedades de superfície ativa e aplicação em recuperação de óleo, produção de proteína unicelular (SCP) e limpeza de tanques de navios que transportam petróleo (GUTNICK & ROSENBERG,1977). COLWELL & WALKER (1977) e ATLAS (1978), consideram que os microrganismos são os melhores agentes para destruição de materiais orgânicos originários de derramamentos de petróleo. Praticamente todos os tipos de hidrocarbonetos gasosos, líquidos e sólidos nas séries alifáticas, aromáticas, olefinicas e naftênicas parecem ser suscetíveis à oxidação por microrganismos (ZOBELL,1946).

Durante este século, a demanda de petróleo como fonte de energia e como matéria-prima para a indústria química, tem resultado em um aumento na produção mundial de 29 para mais de 2400 milhões de toneladas por ano. Este dramático crescimento na produção, refino e distribuição de óleo cru, tem levado a um crescente problema de poluição ambiental. Grande parte desse problema, resulta do fato que os maiores países produtores de petróleo não são os maiores consumidores. Este massivo movimento de óleo tem de ser feito de áreas de alta produção, para aquelas de alto consumo. Segundo ATLAS (1978), aproximadamente 0,5% (12 milhões de toneladas por ano) do transporte de óleo cru vai parar no mar, em função de derramamentos acidentais e descargas deliberadas de águas de lavagem de tanques de navios. A toxicidade deste óleo cru e refinado para a ecologia marinha, e até mais diretamente para o homem, é comprovada, já que o mesmo contém frações mutagênicas, carcinogênicas, químicas inibitórias do crescimento, e até mesmo pequenas quantidades (5-100 µg/l) de certas frações que destroem microalgas e formas juvenis de muitos organismos marinhos (GUTNICK & ROSENBERG,1977).

Há um conceito generalizado que as forças bióticas e abióticas, que prevalecem no meio-ambiente marinho, não têm capacidade infinita de remoção de hidrocarbonetos de petróleo (COLWELL & WALKER,1977). O que acontece então com todos esses contaminantes? Em muitos casos, eles podem ser fisicamente recuperados por métodos como limpeza e sorção. Porém, a evaporação e a biodegradação são os maiores processos de remoção de poluentes de petróleo de ecossistemas contaminados (ATLAS,1978). A evaporação transfere hidrocarbonetos para a atmosfera, enquanto a biodegradação os converte para compostos contendo oxigênio, ou dióxido de carbono e água, no caso da biodegradação completa (mineralização). A biodegradação de misturas complexas de hidrocarbonetos é geralmente incompleta e seletiva em relação a algumas frações de petróleo. Apesar disso, segundo GUTNICK & ROSENBERG (1977), os microrganismos podem ser usados para produzir agentes emulsificantes efetivos para limpeza de compartimentos de navios e de derramamentos de óleo.

## **2 - OBJETIVOS**

Sabendo-se que é grave o problema da poluição ambiental causada por derivados de petróleo, e que a fermentação de hidrocarbonetos pode, além de dar uma valorosa contribuição para a solução deste tipo de problema, ser útil como meio produtor de biomassa de rica composição protéica, os principais objetivos deste trabalho são:

- Estudar a produção de um bioemulsificante extracelular, observando as condições operacionais (pH, concentração de substrato e nutrientes) que permitam maximizar a atividade do mesmo.
- Quantificar a biomassa produzida e o seu teor protéico.

### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - Microrganismos que Degradam Hidrocarbonetos

Segundo CIRIGLIANO & CARMAN (1984) o número de microrganismos capazes de assimilar hidrocarbonetos, também são capazes de emulsificá-los durante o processo de degradação do substrato.

A habilidade para utilizar hidrocarbonetos, não é restrito a poucas espécies de microrganismos. ZOBELL (1946), listou mais de 100 tipos de bactérias, leveduras e fungos aptos a atacar hidrocarbonetos. Espécies representativas de 30 gêneros microbianos têm sido descritas como aptas a degradar um ou mais tipos de hidrocarbonetos. Largamente distribuídos na natureza, esses microrganismos, também conhecidos como oxidadores de hidrocarbonetos ou hidrocarbonoclasticos, ocorrem no solo, na água e em sedimentos. Eles são especialmente abundantes em áreas que historicamente têm sido expostas a algum tipo de hidrocarboneto.

Os gêneros mais representativos desses microrganismos são :

**BACTÉRIAS** - *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acromonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Vibrio*;

**LEVEDURAS** - *Candida*, *Debaryomices*, *Hansenulas*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis* e *Trichosporium*;

**FUNGOS** - *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Cuminghamella*, *Fusarium*, *Morticrella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Sporotrichum* e *Verticillium*.

WALKER et al.(1975) realizaram o primeiro estudo comparativo de leveduras, bactérias e fungos petróleo-degradantes, e suas habilidades para degradar uma mistura de hidrocarbonetos como substrato. Dentre 30 diferentes tipos de microrganismos estudados, encontrou-se ser a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Acinetobacter* sp, a *Sporobolomyces* sp, a *Rhodotorula glutinis*, a *Candida* sp e o *Penicillium* sp os mais efetivos. Alcanos normais mostraram ser mais suscetíveis à degradação por bactérias e leveduras, quando o comprimento da cadeia carbônica cresce de 10

até 20. Já os fungos mostraram pequena correlação entre comprimento da cadeia normal de alcanos e a suscetibilidade à biodegradação. Outros hidrocarbonetos mais complexos como cumenos, naftalenos, fenantrenos, pristanos, 1,2 bezantraceno, pirilenos e pirenos, também foram degradados pelos microrganismos. Um interessante resultado obtido por WALKER et al.(1975), foi a utilização de hidrocarbonetos de petróleo pela *Leucothrix mucor*, uma bactéria marinha associada com a decomposição de algas. Esta observação pode provar significativamente, a diminuição da quantidade de algas nos oceanos, devido a poluição por óleo.

HARVEY et al.(1990), testaram um bioemulsificante glicolípido produzido por *P. aeruginosa* e sua habilidade para remover óleo de amostras de areia contaminada do Alasca sobre várias condições, incluindo, concentração do emulsificante, temperatura da água e tempo de contato. Os resultados demonstraram ser o emulsificante microbiológico de duas a três vezes mais efetivo na remoção do óleo, do que a água. O aumento na concentração do bioemulsificante (até 1%) e na temperatura (até 50°C), levou a uma significativa melhora na remoção. Já o tempo de contato demonstrou um valor ótimo em torno de 1 minuto. Além da melhoria quantitativa na remoção, os autores salientaram a não-toxicidade e a biodegradabilidade do emulsificante microbiológico.

SAR & ROSENBERG (1983), estudaram a produção de um bioemulsificante de alta atividade na degradação de hidrocarbonetos, em 16 diferentes sublinhagens de *Acinetobacter calcoaceticus*. PINES & GUTNICK (1986), obtiveram resultados semelhantes com *A. calcoaceticus* RAG-1 crescendo em óleo cru.

ROSENBERG et al.(1979-a), obtiveram um fator emulsificante extracelular puro, produzido por *Arthrobacter* RAG-1(EF-RAG), que emulsificou óleo de petróleo, óleo-diesel e uma variedade de óleos crus e gasóleos. Embora querosene e gasolina tivessem sido pobremente emulsificados pelo EF-RAG, eles foram convertidos em bons substratos para emulsificação, pela adição de compostos aromáticos, como o 2-metilnaftaleno. Nenhuma fração aromática ou alifática de óleo cru foi emulsificada. Entretanto, misturas contendo ambas frações foram emulsificadas. ROSENBERG et al. (1972 b) e SINGH & DESAI (1988), também produziram bioemulsificante extracelular a partir de *Arthrobacter* RAG-1.

Segundo JOHNSON et al.(1992), as leveduras são conhecidas por produzir emulsificantes extracelulares, quando crescem em substratos imiscíveis ou pouco miscíveis em água, como alcanos e óleos. *Candida guilliermondii*, demonstrou produzir emulsificantes quando cresce em óleo-diesel (CONCONE et al.,1972). BLANCH & EINSELE (1973), examinaram a cinética de crescimento da *Candida tropicalis*, usando n-hexadecano puro como substrato da fase

dispersa. YOSHIDA & YAMANE (1974), também observaram a formação de bioemulsificantes, e propuseram um modelo cinético para *C. tropicalis* crescendo sobre n-hexadecano. SINGH et al.(1990), notaram que a *C. tropicalis* usada para produção de Proteína Unicelular (SCP), exibia a produção de um bioemulsificante extracelular quando crescia em batelada alimentada utilizando n-hexadecano como fonte de carbono. O bioemulsificante mostrou atividade contra vários hidrocarbonetos: máxima com aromáticos e mínima com parafinas normais. Quando cresce em presença de n-hexadecano, a *Candida lipolytica* produz agentes emulsificantes que reduzem a tensão interfacial do meio, aumentando significadamente o grau de emulsificação (CIRIGLIANO & CARMAN,1984 e GUTNICK & ROSENBERG,1977). Segundo CIRIGLIANO & CARMAN (1984), a *C. lipolytica* tem demonstrado utilizar uma grande variedade de substratos hidrocarbonados imiscíveis em água. Eles isolaram um bioemulsificante a partir da *C. lipolytica*, e notaram que uma desprezível atividade de emulsificação foi produzida quando a levedura cresceu em meio contendo glicose como fonte de carbono. Já em culturas suplementadas com n-hexadecano, percebeu-se um crescente aumento da atividade emulsificante. GUTIERREZ & ERICKSON (1977) discutiram o efeito da tensão superficial e consumo de substrato, dentre outros, no crescimento de *C. lipolytica* sobre n-hexadecano. Eles atribuem a diminuição da tensão superficial à produção pelas células de materiais de superfície ativa. Outros autores (PROKOP et al.,1971, MOO-YOUNG et al.,1971-a e 1971-b, e GOMA et al.,1974) também descreveram a atividade emulsificante da *C. lipolytica* quando cresce sobre os mais diversos substratos hidrocarbonados, tais como: dodecano, gasóleo, gasóleo desparafinado e frações específicas de n-C12 a n-C17.

### 3.2 - Caracterização Química de um Bioemulsificante

Emulsificantes e surfactantes são classificados como aniônicos, catiônicos ou não-aniônicos. O número de HLB (Balanço Hidrófilo-Lipófilo) é também usado como guia inicial na formulação das emulsões. Numerosos microrganismos excretam fatores emulsificantes dentro do meio de cultura quando crescem sobre hidrocarbonetos. GUTNICK & ROSENBERG (1977), encontraram que a *Candida petrophilum* produziu um fator emulsificante composto de peptídeos e ácidos graxos. ROSENBERG et al.(1979-a) encontraram lipídeo-trialose na fase olea de caldos de cultura de *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Nocardia*. Este composto contém aproximadamente 1 mol de  $\alpha,\alpha$ -trialose por 2 mol de  $\alpha$ -ramificado,  $\beta$ -hidroxi-ácido graxo. *A. calcoeticus* RAG-1 mostrou produzir um bioemulsificante heteropolissacarídeo aniônico com um peso molecular médio de  $9,9 \times 10^5$ , consistindo basicamente de D-galactosamina, ácido D-galactosamina urônico e uma hexosamina não-identificada. As propriedades anfifáticas da emulsão são devidas em parte à presença de ácidos graxos unidos ao polissacarídeo, por ligações de éster e amido. SAR & ROSENBERG (1983) e BELSKY et al.(1979), também isolaram bioemulsificantes de *A. calcoeticus* RAG-1, com composições semelhantes. CIRIGLIANO & CARMAN (1984) relataram que um emulsificante extracelular produzido por *C. lipolytica* era composto primariamente por carboidratos. O bioemulsificante chamado de Liposan, foi relativamente estável entre 30 e 90 °C. Sua máxima atividade foi conseguida entre pH 2,0 e 5,0. Ao contrário de bioemulsificantes produzidos por bactérias, a atividade do Liposan não foi influenciada pela presença de íons metálicos. Já a presença de algumas concentrações de sais, reduziram a sua atividade.

CIRIGLIANO & CARMAN (1985), purificaram e caracterizaram o Liposan, bioemulsificante por eles produzido, e composto de 83% de carboidratos (heteropolissacarídeos consistindo de glicose, galactose, galactosamina e ácido galacturônico) e 17% de proteínas. A purificação foi feita através de filtrações sucessivas e pervaporação, em tubos de diálise, a baixas temperaturas. Nas Tabelas 3.1 e 3.2, os autores comparam as propriedades de estabilização e de emulsificação do Liposan com outros agentes emulsificantes comerciais. Dos 13 emulsificantes testados, o Liposan foi o sexto colocado em atividade de emulsificação, e o oitavo em propriedades de estabilização. Vale salientar que a medida da atividade do emulsificante se refere ao Liposan já purificado. Houve uma queda significativa entre a medida da atividade do filtrado livre de células (172 U), do filtrado concentrado (159 U) e do bioemulsificante purificado (0,75 U).

Segundo GERSON & ZAJIC (1979), os microrganismos têm sido extremamente úteis no controle da poluição e na degradação e emulsificação de óleos combustíveis. A produção de compostos de superfície ativa por fermentação de hidrocarbonetos, pode levar à criação de novos surfactantes a custos mais baixos do que aqueles produzidos por vias sintéticas tradicionais. A produção de bioemulsificantes por fermentação de hidrocarbonetos têm demonstrado grande utilidade na melhoria dos efeitos de recuperação de óleo, sendo que a sua aplicabilidade vai da emulsificação até a desemulsificação para umedecimento, detergentes e espumas.

**TABELA 3.1 - Estabilização de Emulsões de Óleos Vegetais pelo Liposan (a)**

ÓLEO VEGETAL	CONSTANTE DE DECAIMENTO ( $K_D$ )		
	COM LIPOSAN	SEM LIPOSAN	DIFERENÇA
CAROÇO DE ALGODÃO	-8,6	-2,6	6,0
MILHO	-7,7	-2,6	5,1
SOJA	-7,3	-2,3	5,0
AMENDOIM	-8,2	-3,3	4,9
OLIVA	-5,4	-2,7	2,7
SAFFLOWER	-6,6	-4,3	2,3
GIRASSOL	-6,2	-4,1	2,1

(a) - Quanto menor o valor de  $K_D$ , maior a estabilidade

Fonte : CIRIGLIANO & CARMAN (1985).

**TABELA 3.2 - Comparação das Propriedades de Emulsificação e de Estabilização (a)**

EMULSIFICANTE	ATIVIDADE (U)	ESTABILIZANTE	$K_D$ (10)
CARAGENINA	1,75	TWEEN 80	-2,1
TWEEN 80	1,60	HPMC	-2,1
TWEEN 20	1,35	TWEEN 20	-2,9
PECTINA	1,21	GELATINA	-3,8
TRITON X-100	1,20	ALGINATO	-5,2
LIPOSAN	0,75	CARAGENINA	-5,7
CASEÍNA	0,65	GOMA ARÁBICA	-5,9
ALGINATO	0,60	TRITON X-100	-5,9
GOMA ARÁBICA	0,59	LIPOSAN	-6,0
GOMA GATI	0,47	CASEÍNA	-7,2
HPMC	0,30	GOMA GATI	-7,6
DEXTRANA	0,22	PECTINA	-8,9
GELATINA	0,08	DEXTRANA	-21,0

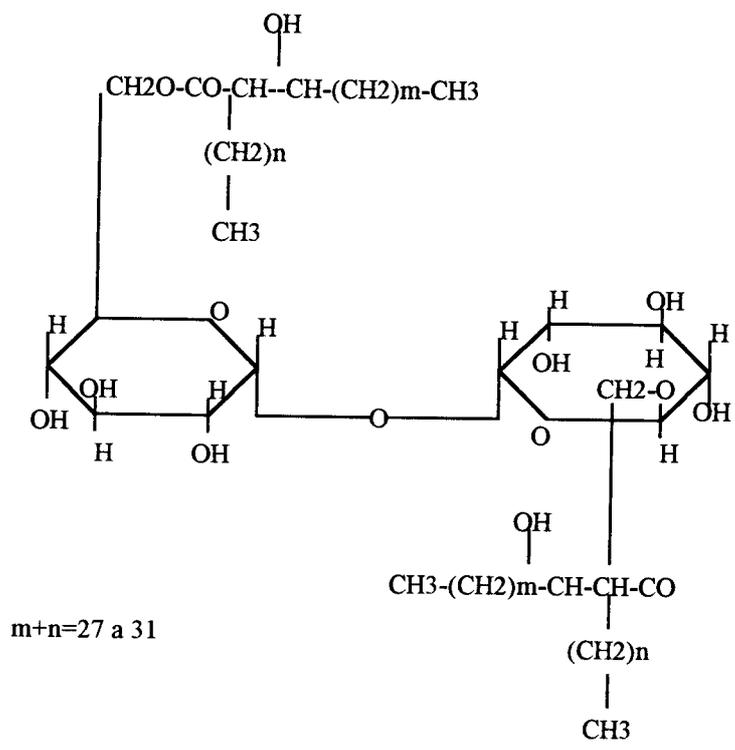
(a) - A atividade de emulsificação (U), foi descrita como a quantidade de bioemulsificante que provoca uma absorbância de 1,0 a 540 nm, usando n-hexadecano como hidrocarboneto.

Fonte : CIRIGLIANO & CARMAN (1985)

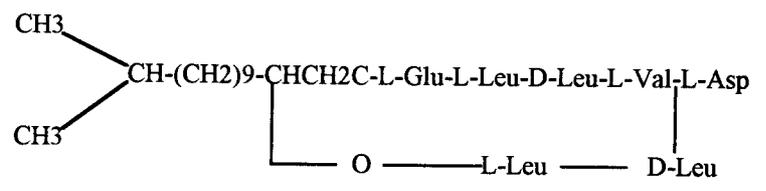
**TABELA 3.3** - Bioemulsificantes - Algumas Estruturas Químicas e Seus Microrganismos de Origem.

SUBSTÂNCIA	MICROORGANISMO
TRIALOSELIPÍDEO	<i>Arthrobacter paraffinus, Nocardia asteroides Brevibacterium vitarumen, Corynebacterium ovis Propionibacterium shermanii, Mycobacterium spp Rhodococcus erythropolis, Corynebacterium diptheriae Micromonosporo sp,</i>
TRIALOSELIPÍDEO (com açúcar substituído.)	<i>Arthrobacter sp, Corynebacterium sp, Nocardia sp</i>
RAMNOLIPÍDEO	<i>Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas sp</i>
SOFORESELIPÍDEO	<i>Torulopsis magnoliae, T. grapengiesseri, T. bombicola</i>
DIGLICOSIL-DIGLICERÍDEO	<i>Lactobacillus fermenti</i>
POLISSACARILIPÍDEO(Proteína) COMPLEXO	<i>Arthrobacter calcoaceticus, Acinetobacter calcoaceticus, Candida lipolytica, Candida tropicalis</i>
LIPOPEPTÍDEO	<i>Bacillus subtilis, Candida petrophilum Corynebacterium lepus, Streptomyces canes</i>
ORNITINA-LISINA LIPÍDEO	<i>Agrobacterium tumefaciens, Thiobacillus thiooxidans Gluconobacter cerineus, Pseudomonas rubescem</i>
PROTEÍNA(como ativado)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FOSFOLIPÍDEO	<i>Thiobacillus thiooxidans, Corynebacterium alkannus Corynebacterium lepus</i>
ÁCIDOS GRAXOS	<i>Micrococcus cerificans</i>
ÁCIDO CORINOMICÓLICO	<i>Corynebacterium lepus</i>
ALCOÓIS GRAXOS	<i>Arthrobacter paraffineus, Mycobacterium lacticolum</i>
GLICERÍDEOS E ÉSTERES	<i>Acinetobacter sp, Mycobacterium rhodochrous Corynebacterium fascicam, Clostridium pasteurianum</i>

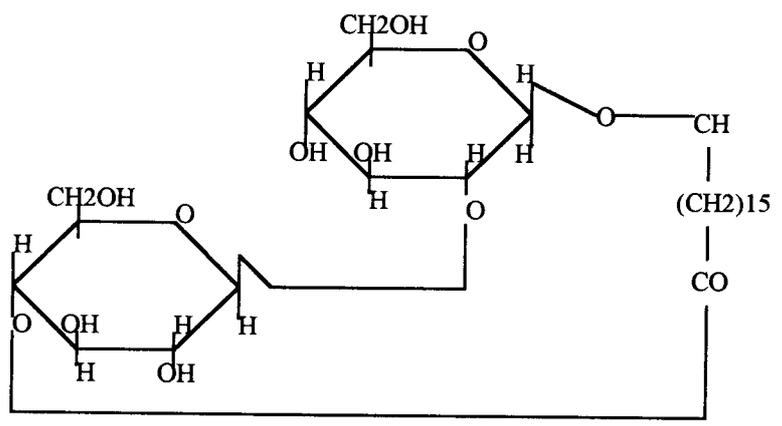
Fonte: BÜLLER & SCHINDLER, 1984. Biotransformations. Vol. 6a, p. 335-336.



a-) Trialose Dimicolato de *Rhodococcus erythropolis*



b-) Surfactina ou Subtilis, lipopeptídeo isolado do *Bacillus subtilis*



c-) Soforesilipídeo Diacetilado de *Torulopsis sp*

**FIGURA 3.1** - Algumas estruturas de bioemulsificantes.

Fonte: BÜLLER & SCHINDLER, 1984. Biotransformations, Vol.6a, p.334.

### 3.3 - Mecanismos de Ataque e Assimilação do Hidrocarboneto pelo Microrganismo

O mecanismo pelo qual o hidrocarboneto é utilizado pela *Candida lipolytica*, ocorre da seguinte maneira: as células produzem materiais de superfície ativa, que reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa. Como a tensão interfacial decresce, o diâmetro médio das gotas de óleo decresce e a área interfacial cresce. Algumas células atacam grandes gotas de óleo e alimentam-se delas. Paralelamente, começa a formação de mais microgotas, através da explosão de bolhas de ar que envolvem o filme óleo, na superfície líquida. Essas microgotas são então carregadas para dentro da fase aquosa, por células que se soltam das grandes gotas, e lá são adsorvidas (GUTIERREZ & ERICKSON, 1978). É importante salientar que quando a tensão interfacial do meio decresce, a pseudosolubilização (solubilização das microgotas mais solubilidade real do hidrocarboneto) cresce. Alguns pesquisadores (EVANS, JOHNSON, McKENNA & KALIO, e VAN DER LINDEN & THUISSE, citados por ATLAS, 1978) estabeleceram passos metabólicos para um número de estruturas alifáticas e aromáticas. O caminho geral para a degradação de um alcano envolve formação sequencial de um álcool, um aldeído e um ácido graxo. O ácido graxo é então quebrado, formando dióxido de carbono e um ácido graxo com duas unidades de carbono a menos. Este processo é conhecido como beta-oxidação. O ataque enzimático inicial, envolve uma classe de enzimas chamadas oxigenases. Na oxidação de n-parafinas, a oxidação terminal e a beta-oxidação, tendem a produzir unidades de C-2. Já o caminho para degradação de um hidrocarboneto aromático, envolve hidroxilação da estrutura do anel benzênico, formando um diol (catecol). O anel é então quebrado, formando um ácido dicarboxílico (ácido mucônico). A degradação de compostos aromáticos substituídos geralmente procede por beta-oxidação inicial da cadeia lateral, seguido por divisão da estrutura do anel benzênico (dihidroxilação). A substituição alquil geralmente retarda a taxa de degradação dos alcanos. Uma importante descoberta destes estudos metabólicos, foi que alguns hidrocarbonetos podem ser degradados por cooxidação. Na cooxidação, um hidrocarboneto serve como substrato para o crescimento, e, um segundo hidrocarboneto que não pode servir como substrato para o crescimento, é gratuitamente degradado. Logo, alguns hidrocarbonetos que são individualmente resistentes ao ataque microbiológico, podem ser degradados em uma mistura, tal qual óleo-diesel. Por exemplo, um microrganismo que pode degradar fenildecano mas não tolueno sozinho, pode estar apto a degradar tolueno em uma mistura de hidrocarbonetos que também contenha fenildecano. Alguns compostos de petróleo que resistem ao ataque microbiológico, e acumulam como poluentes, são removidos por degradação cooxidativa. Embora os hidrocarbonetos possam ser degradados por cooxidação, alguns podem ser poupados de um ataque microbiológico, enquanto outros da mistura são preferencialmente atacados, num fenômeno conhecido como diauxia. Juntos, cooxidação e diauxia podem ocorrer em uma mistura

de hidrocarbonetos, facilitando a degradação de compostos mais complexos, tais como óleos refinados (ATLAS,1978). O metabolismo de degradação de muitos hidrocarbonetos pesados e complexos, como alcanos de alto peso molecular, cicloalcanos de múltiplos anéis e aromáticos polinucleares, não foram ainda adequadamente explicados.

A taxa de degradação de alcanos de cadeia longa, dependerá da disponibilidade de hidrocarbonetos para os microrganismos. A baixa solubilidade e a área de superfície dos alcanos de cadeia longa (acima de C-17), diminuirão essa disponibilidade. Extensivas quebras na cadeia carbônica, tendem a reduzir as taxas de degradação. A quebra da cadeia pode também mudar o caminho metabólico na utilização de um hidrocarboneto. Por exemplo, compostos como pristano ou fitano, podem ser degradados por omega-oxidação, com a formação de um ácido dicarboxílico em lugar do ácido monocarboxílico como na beta-oxidação.

A degradação de poluentes de petróleo dependerá também da qualidade da mistura de hidrocarbonetos. A viscosidade dos óleos poluentes é uma importante propriedade que determina em parte, a velocidade e a dispersão das misturas hidrocarbonadas, e por conseguinte, a área de superfície disponível para o ataque microbiano. Há algumas diferenças entre óleos crus e óleos refinados. Alguns óleos contém hidrocarbonetos tóxicos, que podem impedir ou atrasar o ataque por parte dos microrganismos. Mais, alguns óleos refinados contém aditivos como o chumbo, que podem inibir a degradação. Em geral, os óleos possuem variadas proporções de frações parafínicas, aromáticas e asfálticas. A taxa e a extensão da biodegradação, dependerá então da proporção relativa destes hidrocarbonetos. Segundo ZOBELL (1946), existe uma certa seletividade na utilização de óleos crus, em virtude da larga variação de composição. Ele propôs que :

- a- Parafinas e alifáticos são mais diretamente degradados que hidrocarbonetos aromáticos;
- b-Parafinas de cadeias longas são degradadas preferencialmente às de cadeia curta;
- c-Compostos saturados são degradados mais diretamente do que compostos insaturados;
- d-Cadeias ramificadas são decompostas menos facilmente que cadeias lineares.

Na fermentação de hidrocarbonetos, as espécies microbiológicas e a natureza química do substrato, tem um importante papel na decisão de que tipo de interação célula-substrato é usada. BUHLER & SCHINDLER (1984), relataram três modos de ataque:

- 1-Contato direto através do ataque de células a grandes gotas de óleo;
- 2-Contato direto através da acomodação de microgotas de óleo na superfície da célula;
- 3-Consumo do hidrocarboneto dissolvido na fase aquosa.

O contato direto entre as gotas de óleo e as células parece ser o mecanismo pelo qual a maior parte do substrato é consumido. A área superficial do óleo a ser contactada, inclui as gotas maiores nas quais as células aderem, e as microgotas, que são adsorvidas pelas células (Figura 3.2).

O fenômeno da emulsificação na fermentação de hidrocarbonetos não é completamente compreendido. GUTIERREZ & ERICKSON (1977), relataram que microrganismos que podem utilizar hidrocarbonetos mostram uma maior afinidade para com o óleo do que aqueles inaptos a degradarem-no. Eles atribuem esta afinidade a compostos lipofílicos celulares. Para todos possíveis mecanismos de consumo de hidrocarbonetos, o crescimento celular seria afetado pelo grau de emulsificação: ou por governar a área interfacial de contato, ou por controlar a taxa de transferência de substrato dentro da solução aquosa.

A importância de microgotas de óleo na fermentação de hidrocarbonetos, foi relatado por alguns pesquisadores (PROKOP & ERICKSON, 1972, MOO-YOUNG & SHIMIZU, 1971, YOSHIDA & YAMAHA, 1974). Presumivelmente, as microgotas são adsorvidas na superfície celular e permanecem lá até serem consumidas. É importante salientar que a contribuição relativa dessas microgotas, varia com as diferentes condições experimentais. Ela também varia com diferentes espécies, por causa das diferenças na composição, na lipofobicidade da parede celular, e na produção de emulsificantes extracelulares (GUTIERREZ & ERICKSON, 1977).

GOMA et al. (1973, 1974) relataram que a solubilidade aparente do óleo, cresce durante a fermentação, e que os hidrocarbonetos usados como substrato, foram sempre os mais solúveis. Esta solubilidade não é a solubilidade real, mas a pseudosolubilidade que é responsável pela acomodação das gotas de óleo no caldo de fermentação. Destes resultados, eles concluíram que a solubilização foi o primeiro passo na assimilação de hidrocarbonetos pela *Candida lipolytica*.

### 3.4 - Fermentação de Hidrocarbonetos - Condução e Fatores de Influência

Um dos maiores problemas na fermentação é prover os microrganismos em crescimento, de todas as suas necessidades essenciais reprodutivas. A fermentação de hidrocarbonetos não é uma exceção a essa regra. Até mais; ela adiciona uma maior complicação devido ao fato do hidrocarboneto estar presente como uma fase separada. Dentre os inconvenientes deste tipo de fermentação, dois têm recebido maior atenção: a limitada solubilidade dos hidrocarbonetos em água, e a grande demanda de oxigênio quando comparada a uma fermentação de carboidratos (GUTIERREZ & ERICKSON,1977). A solubilidade das parafinas em água tem sido investigado por alguns pesquisadores. Sabe-se que esta solubilidade decresce com o aumento do número de átomos da cadeia carbônica. SUTTON & CALDER (citados por GUTIERREZ & ERICKSON,1977), encontraram que a solubilidade de várias n-parafinas, foram maiores em água destilada do que em água do mar. Já a alta demanda de oxigênio, é própria da composição das parafinas (alta fração mássica de carbono, e ausência de oxigênio). Segundo GUTIERREZ & ERICKSON (1977), o consumo de oxigênio numa fermentação de hidrocarbonetos chega a ser três vezes maior do que numa fermentação de carboidratos.

BLANCH & EINSELE (1973), dividem a fermentação de hidrocarbonetos em dois tipos distintos: aquela onde somente o substrato puro está envolvido (considerada a mais simples), e a que o substrato está dissolvido em uma fase dispersa inerte. Segundo eles, utilizando substrato puro como fase dispersa, observações experimentais mostraram que:

a-Culturas em bateladas exibem duas regiões de crescimento; primeiro uma exponencial, e então uma fase de crescimento linear;

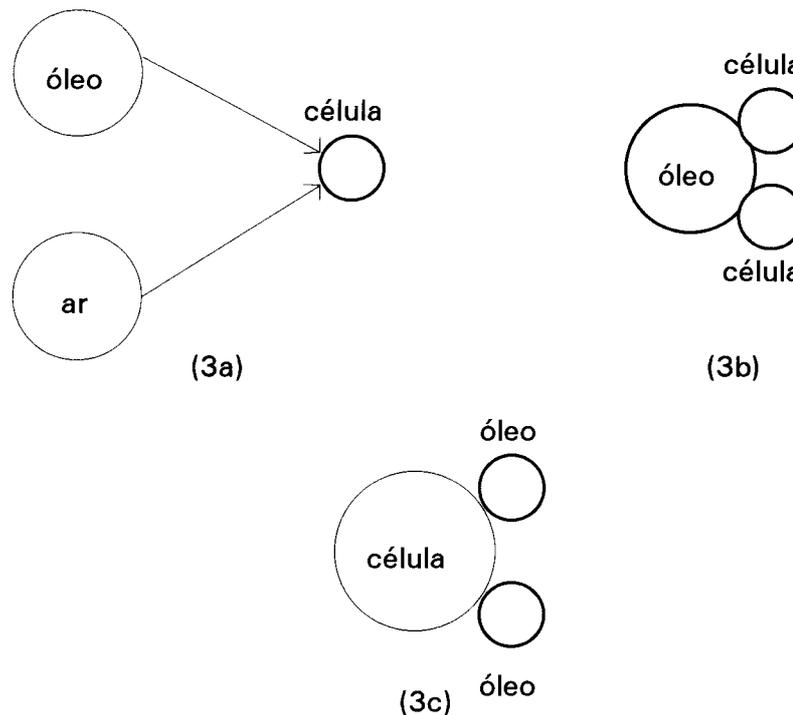
b-A taxa específica de crescimento aumenta com a adição de surfactantes (geralmente utilizados na proporção de 0,01 a 0,1%);

c-Existe uma forte afinidade entre o microrganismo e o substrato por ele degradado.

VELANKAR et al. (1975), chegaram as seguintes conclusões para *Pseudomonas aeruginosa* crescendo sobre heptano:

a-A taxa exponencial de crescimento cresce com o aumento da taxa de agitação;

b- A taxa de crescimento linear ocorre em altas concentrações celulares para as altas taxas de agitação.



(3a)-Ataque entre células separadas das gotas de óleo por uma fase aquosa.

(3b e 3c)-Consumo do substrato por células diretamente aderidas às gotas de óleo.

**FIGURA 3.2** - Ilustração de possíveis formas de consumo de um hidrocarboneto líquido pelas células.

Fonte: MOO-YOUNG & SHIMIZU (1971)

Na fase de crescimento linear, hidrocarbonetos de cadeia curta são solubilizados mais rapidamente do que os de cadeia longa. MOO-YOUNG & SHIMIZU (1971), encontraram que para a *Candida lipolytica* crescendo em n-dodecano, a taxa de crescimento exponencial foi uma função da concentração de hidrocarboneto e da taxa de agitação. Eles não relataram nenhuma taxa de crescimento linear. Já PROKOP et al.(1971), relataram que na região onde o crescimento linear é observado, cresce a quantidade de células na superfície de grandes gotas, e, decresce na superfície de pequenas gotas, devido a essas se tornarem rapidamente exaustas em virtude da segregação e da sua relativamente alta proporção superfície-volume.

A temperatura é outro fator que exerce uma grande influência na fermentação de hidrocarbonetos. PROKOP & ERICKSON (1972), relataram que para *C. lipolytica* crescendo em gasóleo, a taxa de crescimento aumenta quando a temperatura varia de 23 a 32°C, e então rapidamente decresce quando a temperatura chega a 34°C. Segundo eles, a temperatura de 31 - 32°C pode ser considerada como ótima, em relação ao consumo de substrato.

Numerosos autores (PROKOP et al.,1971, MOO-YOUNG et al.,1971, PROKOP & ERICKSON,1972, BLANCH & EINSELE,1973, GUTIERREZ & ERICKSON,1977, FERRER & ERICKSON,1980) têm trabalhado com um intervalo de pH que vai de 4,00 a 5,50 para culturas de *C. lipolytica*. O ajuste desse pH é feito pelo uso de soluções como NaCl, NH<sub>4</sub>OH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH.

A adição de determinados nutrientes ao meio de crescimento, é considerado por vários autores como essencial à fermentação de hidrocarbonetos (FOGHT et al.,1989, SINGH et al.,1990,JOHNSON et al.,1992, CONCONE et al.,1972). Esses nutrientes vão desde sais inorgânicos como fontes de nitrogênio e fósforo, até vitaminas. JOHNSON et al.(1992), demonstraram ser o nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), a fonte de nitrogênio que permitiu a maior atividade de um bioemulsificante produzido por *Rhodotorula glutinis* P-30, crescendo sobre gasóleo.

### **3.5 - Aspectos Ecológicos da Biodegradação no Meio-Ambiente**

Os acidentes com derramamento de óleo tem levado os pesquisadores a uma preocupação quanto ao impacto que os mesmos podem causar no meio-ambiente. Entre 1967 e 1969, três grandes derramamentos estimularam a pesquisa e o desenvolvimento de métodos para limpeza, bem como o de microrganismos para a degradação. Parte dos componentes do óleo são diretamente evaporados ou biodegradados, mas outros permanecem no meio-ambiente, sendo portanto importante caracterizar aqueles degradáveis e os que são recalcitantes. Os n-alcenos são diretamente utilizados dentro de pouco tempo, mas todo o óleo não desaparecerá em tempo proporcional, já que existem frações remanescentes que são resistentes ao ataque microbiológico. Na natureza, as condições raramente são favoráveis à máxima biodegradação. Por exemplo, no fundo do mar a temperatura da água geralmente é menor que 4 °C, e a maioria dos nutrientes estão presentes na concentração de miligramas por litro. Com isto, a taxa de degradação pode ser marcadamente lenta no meio-ambiente natural, e o óleo pode permanecer no oceano por um longo período.

COLWELL & WALKER (1977), mostram nas Tabelas 3.4 e 3.5, os resultados de um estudo realizado com duas variedades de óleo cru e duas de óleo refinado, expostos a microrganismos. Depois de sete semanas, encontrou-se que respectivamente, 78% e 51% dos óleos crus haviam sido consumidos, ao passo que no caso dos óleos refinados, que continham um alto teor de aromáticos e asfaltos, a taxa de degradação caiu para 41% e 11%, respectivamente. A comparação do consumo de componentes seletivos nas quatro amostras de óleo levam a clara indicação que há diferenças na suscetibilidade para degradação de cada um dos componentes.

#### **3.5.1 - Considerações e Comparações Acerca da Biodegradação de Hidrocarbonetos**

A seguir são feitas algumas comparações em relação à capacidade de biodegradação de alguns hidrocarbonetos, bem como, considerações acerca da influência de algumas variáveis na extensão da mesma.

#### **MEIO-AMBIENTES POLUÍDOS E NÃO-POLUÍDOS**

Embora os locais poluídos com óleo, como as áreas de portos, contenham um grande número de microrganismos aptos a degradarem petróleo, tais áreas podem ser geograficamente

diferentes na eficiência de populações microbianas em relação a capacidade biodegradativa. As diferenças geográficas, incluindo clima e tipos de afluentes que são descarregados nos portos devem ser considerados no potencial degradativo. A Tabela 3.6 mostra claramente a diferença na eficiência, extensão e taxa de biodegradação, quando uma amostra de óleo foi inoculada com culturas originárias de três diferentes portos americanos e do fundo do oceano.

### ÁGUAS COSTEIRAS x FUNDO DO MAR

Diferenças detectáveis têm sido observadas na flora microbiana de amostras coletadas em águas costeiras quando comparadas com amostras do fundo do mar. Diferenças que ocorrem principalmente na pressão e temperatura, podem em geral ter um efeito marcante na degradação dos hidrocarbonetos. COLWELL & WALKER (1977), descreveram um experimento no qual uma amostra de hidrocarboneto que foi utilizada como substrato a 1 atm e 4 °C, teve a fase estacionária (máximo crescimento da cultura) alcançada em quatro semanas, ao passo que quando a pressão foi mudada para 500 atm, o máximo de crescimento só foi alcançado em trinta e duas semanas de incubação. Da mesma forma, 94% do substrato foi consumido em oito semanas a 1 atm, enquanto que a 500 atm, a mesma taxa de consumo só foi obtida depois de quarenta semanas. Estes dados sugerem que um resíduo de petróleo que esteja no fundo do oceano, será degradado a uma taxa relativamente mais lenta do que quando o mesmo se encontrar em águas costeiras.

**TABELA 3.4 - Composição dos Óleos Crus e Refinados**

FRAÇÃO	PERCENTUAL DE CADA FRAÇÃO			
	ÓLEO CRU 1	ÓLEO CRU 2	ÓLEO REFIN. 1	ÓLEO REFIN. 2
SATURADOS	47	24	23	15
AROMÁTICOS	37	49	56	39
RESINAS	15	20	21	24
ASFALTOS	1	7	0	22

Fonte - COLWELL & WALKER (1977)

**TABELA 3.5 - Percentual dos Componentes de Cada Óleo Após a Biodegradação**

FRAÇÃO	PERCENTUAL DE CADA FRAÇÃO			
	ÓLEO CRU 1	ÓLEO CRU 2	ÓLEO REFIN. 2	ÓLEO REFIN. 2
SATURADOS	27	60	48	24
AROMÁTICOS	10	41	15	90
RESINAS	0	50	0	100
ASFALTOS	80	57	100	64

Fonte - COLWELL & WALKER (1977)

**TABELA 3.6 - Percentuais de degradação de um óleo cru com microrganismos de três diferentes portos e do fundo do mar**

FRAÇÕES	PORTO DA BAI DO LESTE	PORTO DE BALTIMORE	PORTO DE SAN JUAN	FUNDO DO OCEANO
SATURADOS	42	78	59	62
Alcanos	40	89	85	69
ciclo-alcanos de 1 anel	42	88	56	51
ciclo-alcanos de 4 anéis	19	62	35	45
AROMÁTICOS	5	38	0	18
Monoaromáticos	9	51	0	30
tetraromáticos	0	0	0	0
sulfoaromáticos	0	28	0	17
RESINAS	0	0	47	61
ASFALTOS	0	0	0	0
RESÍDUO	16	50	38	48
TOTAL DEGRADADO				

Fonte - COLWELL & WALKER (1977)

#### NECESSIDADE DE NUTRIENTES

A limitação de nutrientes, especialmente nitratos e fosfatos, é o principal fator que afeta a taxa e a extensão da degradação de petróleo no meio-ambiente marinho. O oxigênio pode também ser um fator limitante, quando o meio se encontra contaminado com gasolina. Segundo ATLAS & BARTHA (citado por COLWELL & WALKER, 1977), um crescimento de oito a nove vezes na extensão da biodegradação de misturas água-óleo provenientes de descargas de tanques de navios no mar, foi observada quando se acrescentou sais de nitrogênio e fósforo. Não há dúvidas, que a fertilização de áreas de derramamentos melhora consideravelmente a biodegradação microbiana.

## 3.6 - A Fermentação de Hidrocarbonetos e a Produção de Proteína Unicelular

### 3.6.1 - Introdução

Proteína unicelular (SCP), é o termo internacionalmente usado para material celular microbiano, usado como alimento ou alimentação. Já a algum tempo, tanto na cultura oriental como na ocidental, que os microrganismos têm sido usados, para transformar ou produzir alimentos, fazendo parte da dieta dos homens e animais. Entretanto, segundo OLSEN & ALLERMANN (1987), a primeira produção industrial de um microrganismo com o propósito nutricional, aconteceu na Alemanha durante a I Guerra Mundial quando a levedura *Torula* foi produzida. Após a guerra, o interesse alemão decresceu, mas foi revivido nos anos 30, e durante a II Guerra Mundial aproximadamente 15000 ton./ano de leveduras foram produzidas e incorporadas à dieta dos civis e militares, principalmente em sopas e salsichas. O interesse de se produzir ração de levedura também cresceu nos Estados Unidos e Inglaterra, e continuou depois do fim da II Guerra Mundial em todo o mundo. A partir de 1973, muitas companhias começaram a produção em larga escala por diversas vias técnicas.

Quando comparado com os métodos tradicionais para produção de proteína para alimentação, a produção de biomassa microbiana apresenta algumas vantagens características:

- os microrganismos em geral têm uma alta taxa de multiplicação e um alto conteúdo protéico (em termos de peso seco podem conter de 30% a 75% de proteína), podendo utilizar um grande número de fontes de carbono (algumas das quais descartadas como rejeitos ou poluentes);
- as cadeias com alto rendimento e boa composição podem ser selecionadas ou produzidas com relativa facilidade;
- as instalações industriais para a produção ocupam áreas limitadas e dão altos rendimentos;
- a produção microbiana é independente de variações climáticas e sazonais.

A Tabela 3.7 mostra uma comparação da composição de aminoácidos de diversos tipos de proteína, incluindo aquelas produzidas por microrganismos.

### 3.6.2 - Seleção de microrganismos

O uso de microrganismos como produto de fonte de proteína para a alimentação humana ou animal, requer certas características. As mais desejáveis são: não ser patogênico para plantas, animais e homens, ter bom valor nutricional, ter aceitabilidade como alimento ou complemento de alimentação, não possuir compostos tóxicos e ter baixos custos de produção. A seguir são descritos as características desejáveis às algas, bactérias, leveduras e fungos, utilizados como produtores de biomassa.

- **Algas** - as algas usadas para produção de biomassa são principalmente dos gêneros *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina*. Elas podem crescer fotossinteticamente e autotroficamente (luz e fontes de carbono inorgânico) ou heterofilicamente (compostos orgânicos como fonte de carbono e energia). O método mais racional para produção de biomassa de algas, é o fotossintético, usando águas iluminadas diretamente pela luz do sol. Em sistemas de larga-escala, as condições assépticas não podem ser mantidas, adicionando um alto risco de contaminação. Um outro problema é o baixo rendimento celular (em sistemas de larga-escala 1 a 2 g.célula seca / l.). A composição macromolecular das algas é muito dependente das condições de crescimento. O conteúdo de proteína crua (N total x 6,25) pode ser maior que 60%, e o perfil de aminoácidos de SCP de algas é geralmente bom, embora um pouco baixo em aminoácidos contendo enxofre. As algas contêm uma alta taxa de pigmentos fotossintéticos indesejáveis para o consumo humano.

- **Bactérias** - A alta taxa de crescimento que as bactérias em geral apresentam, tornam-as de grande interesse na produção de SCP. Como o pH de muitas fermentações de bactérias para a produção de proteína unicelular é controlado entre 5,00 e 7,00, é importante o controle da esterilidade durante o processo, visto que o risco de contaminação com bactérias patogênicas existe. O conteúdo de proteína crua das bactérias é geralmente alto, podendo chegar até a 80% em base seca, porém, o conteúdo normal de ácidos nucleicos, especialmente RNA, é também alto (aproximadamente 20%) precisando ser reduzido. O perfil de aminoácidos de SCP de bactérias é geralmente bom, embora possua uma pequena deficiência de aminoácidos que contenham enxofre. A possibilidade de produção de endotoxinas por muitas bactérias gram-negativas deve ser considerada se elas forem escolhidas para a produção da proteína unicelular.

- **Leveduras** - A tecnologia de produção de SCP em grande escala, tem sido estudada principalmente utilizando espécies do gênero *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Candida*. Em geral, como nas bactérias, as taxas de crescimento das leveduras são altas. O pH da fermentação é usualmente mantido entre 3,50 e 5,00, sendo que estes valores reduzem o risco de contaminação por bactérias. As células de leveduras podem ser recuperadas diretamente do meio de fermentação por centrifugação, e o conteúdo de proteína crua pode chegar à 55-60%. Porém, o

teor de ácidos nucleicos também é alto, podendo ir a 15%. O perfil em termos de aminoácidos (mostrado na Tabela 3.7) é geralmente bom, embora deficiente em aminoácidos que contenham enxofre.

- **Fungos** - Embora a taxa de crescimento dos fungos seja geralmente menor, é possível isolar algumas espécies com taxas de crescimento próximas às de leveduras e bactérias. Muitos fungos filamentosos crescem bem em um intervalo de pH de 3,00 a 8,00, e de novo é possível operar em pH abaixo de 5,00 com esterilização, minimizando assim o risco de contaminação por bactérias e leveduras. O conteúdo protéico dos fungos varia largamente, mas pode alcançar 50-55%. Quando crescem a altas taxas, os fungos apresentam alto conteúdo de ácidos nucleicos (RNA>15%). Um exame minucioso deve preceder a escolha das linhagens para produção de proteína unicelular, já que muitos fungos podem produzir compostos tóxicos (micotoxinas) (OLSEN & ALLERMAN,1987).

**TABELA 3.7 - Comparação Entre a Composição de Aminoácidos de Leveduras e Outros Alimentos**

AMINOÁCIDOS	CONTEÚDO (g./16 g.N) DE AMINOÁCIDOS						
	SCP			FONTES		PROTEINAS ALIMENTARES	
	TOPRINA-USSR-PEKILO			PROT. TRADIC. PEIXE	SOJA	OVO	PROT. FAO/ONU
ISOLEUCINA	5,1	5,9	4,8	4,6	5,4	6,7	4,2
LEUCINA	7,4	7,2	7,4	7,3	7,7	8,9	4,8
FENILALANINA	4,3	4,4	4,0	4,0	5,1	5,8	2,8
TIROSINA	3,6	4,0	3,5	2,9	2,7	4,2	2,8
TREONINA	4,9	5,2	4,1	4,2	4,0	5,1	2,8
TRIPTÓFANO	1,4	1,1	1,1	1,2	1,5	1,6	1,4
VALINA	5,9	6,3	5,1	5,2	5,0	7,3	4,2
ARGININA	5,1	5,0	5,3	5,0	7,7	-	-
HISTIDINA	2,1	2,4	1,9	2,3	2,4	-	-
LISINA	7,4	7,6	6,5	7,0	6,5	6,5	4,2
CISTINA	1,1	0,9	1,0	1,0	1,4	2,4	2,0
METIONINA	1,8	1,6	1,9	2,6	1,4	5,1	2,8
AMINOÁCIDOS COM ENXOFRE	2,9	2,5	2,9	3,6	2,8	7,5	4,8

Fonte - OLSEN & ALLERMANN (1987)

### 3.6.3 - Substrato e Conteúdo Protéico

A fermentação de hidrocarbonetos é conhecida pela capacidade que possui em produzir biomassa de rica composição protéica. A proteína de origem microbiana, em geral, possui um bom perfil de aminoácidos essenciais, sendo porém deficiente em aminoácidos que contenham enxofre. Considera-se que todo o tipo de proteína produzida por via microbiana deve reunir requisitos de caráter tecnológico e de natureza fisiológica, para que possa ser destinada para fins alimentares. Dentre esses requisitos, há de se destacar a ausência de toxicidade, aceitável palatabilidade e boa digestibilidade. Segundo BELLO et al. (1973), no caso da produção de SCP por leveduras, o principal problema reside na limitada digestibilidade por ela apresentada, visto que somente o nitrogênio extracelular parece ser disponível de um modo absoluto, ao passo que o restante da estrutura da parede celular é pouco assimilável pelo intestino do homem e dos animais.

Segundo SADIR (1974), neste tipo de fermentação, o hidrocarboneto residual não consumido pelo microrganismo durante o processo, tem a propriedade de reter parte das células microbianas obtidas na fase aquosa. Assim sendo, após a centrifugação, as células de levedura se separam em duas fases: aquosa e oleosa (células mais óleo). Esta separação de fases e distribuição não-proporcional da levedura nas mesmas, impossibilita a quantificação da massa celular e o uso do espectrofotômetro para determinação do crescimento celular, já que é necessária uma turbidez homogênea para obtenção correta dos dados.

Muitos autores têm produzido SCP a partir das mais diversas fontes de hidrocarbonetos. Os maiores rendimentos têm sido conseguidos com hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis e com aqueles com alto teor de n-parafinas. ERTOLA et al. (citado por SADIR, 1972), cultivaram *Micococcus cerificans* em gasóleo, visando a produção de proteína. Eles verificaram que o teor de n-parafinas foi sensivelmente reduzido depois da fermentação. A fração protéica e o conteúdo de lipídeos do tecido celular variou de 68 a 75,5% e de 6,8 a 11,6% (base seca), respectivamente.

ERTOLA (citado por SADIR, 1972), estudou a possibilidade de variar a composição química dos aminoácidos contidos nas proteínas microbianas, usando hidrocarbonetos como matéria-prima, de maneira a melhorar o valor potencial da proteína. A variação foi conseguida mudando as condições físico-químicas da fermentação, principalmente o pH. MUNK et al. (citado por SADIR, 1972), cultivaram *Candida lipolytica* em gasóleo destilado entre 180 °C e 400 °C, contendo de 10 a 20% de n-alcenos de cadeia com comprimento de 10 a 25 átomos de carbono por molécula. Eles verificaram que a medida que se aumenta a taxa de diluição, diminui-se a concentração de biomassa no fermentador, bem como o grau de desparafinação do gasóleo. A

máxima produtividade do fermentador foi conseguida com taxas de diluição variando de 0,16 a 0,19. Sob estas condições, a concentração de biomassa alcançou 9,0 gramas de células por litro de meio. O experimento foi realizado a uma concentração de gasóleo de 73 g/l com 20% de n-alcenos. Em outras experiências, os autores aumentaram a concentração de gasóleo no meio de cultura de 73 g/l até 170 g/l, com a finalidade de se examinar as condições de cultivo do ponto de vista econômico, quando se usam altas concentrações de gasóleo no meio. Verificaram que houve apenas um ligeiro aumento da concentração de biomassa até 12,6 g/l. Além disso, houve uma queda no coeficiente de rendimento e no grau de desparafinação do gasóleo, o que mostra não ser interessante, do ponto de vista da produção celular, esse aumento de concentração do substrato.

SHIN-ICHIRO et al. (citado por SADIR,1972), obtiveram condições favoráveis de desenvolvimento da *Candida lipolytica* YO-148 em querosene, trabalhando com pH=7,00 controlado, e adicionando ao meio de fermentação um surfactante. Nas melhores condições de fermentação conseguiram rendimento de 11 gramas de células secas por litro de meio de cultura. O meio continha inicialmente 10% (v/v) de querosene, sendo que o tempo de fermentação foi de 30 h. O teor de proteína na biomassa produzida foi 37,52 % em base seca.

SADIR (1972) trabalhando com *Candida lipolytica* fermentando querosene, com teor de 76% de n-parafinas, obteve o seguinte perfil de aminoácidos da levedura hidrolisada:

AMINOÁCIDOS <sup>a</sup>	%
<b>Leucina</b>	<b>2,32</b>
<b>Isoleucina</b>	<b>2,80</b>
<b>Valina</b>	<b>2,53</b>
<b>Treonina</b>	<b>3,40</b>
<b>Metionina</b>	<b>0,49</b>
<b>Cistina</b>	<b>4,44</b>
<b>Lisina</b>	<b>2,55</b>
<b>Triptófano</b>	<b>1,13</b>
<b>Fenilalanina</b>	<b>1,77</b>
Arginina	1,55
Ácido Glutâmico	2,20
Ácido Aspártico	2,10
Glicina	1,70
Alanina	2,33
Prolina	2,23
Tirosina	1,88
Serina	2,48
Histidina	0,10

a- Os aminoácidos em negrito correspondem aqueles essenciais ao homem.

AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS <sup>a</sup> QUEROSENE (%) PROT./FAO (%)

Metionina	1,02	2,20
Cistina	9,30	2,00
Lisina	5,34	4,20
Treonina	7,11	2,80
Isoleucina	6,00	4,20
Leucina	4,40	4,80
Valina	5,30	4,20
Fenilalanina	3,70	2,80
Triptófano	2,36	1,40

a- Levedura seca (g/100 g de proteína)

Ele atribuiu a diferença de composição em relação à proteína produzida por outros autores, devido ao fato que a composição dos aminoácidos pode variar quando se varia a matéria-prima, o microrganismo e as condições operacionais da fermentação. Vale ressaltar, como visto acima, que a proteína por ele obtida possui, com excessão da metionina, todos os aminoácidos essenciais e em porcentagem maior que a proteína padrão da FAO/ONU. A levedura seca obtida forneceu a seguinte composição:

Composição da Célula	% base seca
Cinza	5,10
Fibra Crua	6,41
Proteína Crua	47,80
Martéria-Graxa	13,50

Em relação à fonte nitrogenada, ele concluiu que a adição de úreia e cloreto de amônio ao meio de cultura, deu melhores rendimentos em termos de massa celular, do que quando se usou sulfato de amônio ou nitrato de amônio.

### 3.6.4 - Produção Industrial de SCP a Partir de Hidrocarbonetos

De um lado há as fontes tradicionais de proteína que são dependentes do solo, água, fertilizantes, inseticidas e pesticidas, clima, tecnologia e investimentos. Do outro lado há a possibilidade de se produzir biomassa com qualidade reprodutível, e bons teores de proteína, carboidratos, gorduras e vitaminas, a partir de microrganismos cultivados por meio de processos industriais independentes de climas, solo, água e pesticidas.

A biotecnologia para produção de SCP a partir de hidrocarbonetos, é baseada em processos conduzidos em reatores agitados e aerados, usando óleos ou n-parafinas como fonte de carbono, amônia como fonte de nitrogênio, mais ácido fosfórico e sais (KNECHT et al., 1977).

Segundo KNECHT et al. (1977), três grandes empresas químicas alemãs, Hoechst, Uhde e Gelsenberg, desenvolveram um processo eficaz para produção de biomassa de levedura a partir de n-parafinas. Foi feito um "screening" com aproximadamente 500 diferentes amostras de leveduras isoladas do solo, água e amostras de ar, e se encontrou ser a *Candida lipolytica* FH-H-5027 a mais efetiva. O "scale-up" para a produção contínua em escala de 4000 l., foi feita a partir de frascos agitados, reator de 30 l. e de 300 l.. A biomassa produzida revelou toxicidade negativa em testes feitos com ratos, sendo que a maior qualidade protéica foi conseguida com alimentação de parafinas de C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>, enquanto que a maior produtividade foi obtida quando se utilizou alcanos de C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>. As condições operacionais foram: T=30 °C, pH=5,50, taxa de aeração=1,1 VVM e velocidade de agitação=175 rpm.

MOO-YOUNG (1977), num estudo conduzido para países desenvolvidos (EUA, Inglaterra e Japão), chegou as seguintes conclusões a respeito da parte econômica da produção de SCP a partir de hidrocarbonetos:

Conclusões Gerais:

- 1 - O custo de produção de proteína na forma de SCP ou outras formas não-convencionais, pode ser muito menor do que aquela produzida a partir de carne;
- 2 - Com as relevantes melhoras na tecnologia, parece ser a SCP a forma mais barata de proteína para alimentação e aplicação em alimentos;

3 - A maioria dos processos comercialmente viáveis de produção de SCP, são destinados ao mercado de alimentação animal, por causa principalmente da relativa dificuldade de se introduzir novos produtos alimentares que não venham da agricultura;

4 - Apesar das vantagens econômicas para o processo em particular, tendências culturais ou fisiológicas podem tornar-se importantes na escolha de um processo para aplicação em gêneros alimentícios;

5 - Em termos econômicos, a escolha do processo dependerá fortemente da localização, principalmente com respeito à disponibilidade de substrato e utilidades;

6 - Tem se dado mais atenção a fontes de hidrocarbonetos abundantes e de ampla distribuição geográfica.

#### Conclusões Específicas:

1 - Como pode ser visto na Tabela 3.8, na implantação de uma unidade industrial de produção de SCP, o custo mais significativo é da matéria-prima (43-77%), primariamente para o substrato (29-64%), seguido pelo custo de utilidades, exceto quando o substrato é um rejeito, na qual a ordem é invertida: substrato (17-26%) e utilidades (25-37%);

2 - Para substratos não-sólidos, do custo de investimento total (Tabela 3.9), o mais alto é para fermentação (43-52%), seguido pela secagem (17-23%), cultivo (8-14%) e preparação (1,1-16%). Com substratos sólidos, os dados esperados mostram custos maiores para preparação do meio (22%) e cultivo (35%), com valores menores para a secagem (4%);

3 - O uso de suposta alta aeração em fermentadores do tipo "air-lift" melhoraria a análise de custo de fermentação para outros processos. Entretanto, a aplicabilidade desses fermentadores para caldos muito viscosos é desconhecida;

4 - Do custo total de utilidades, a fermentação requer a maior necessidade de gastos (53-77%), seguida pela secagem (15-29%) e cultivo (3-16%);

5 - Para os equipamentos de fermentação, o mais alto custo é para o maquinário básico (11-21%), seguido de perto por resfriamento (11-19%) e compressão de ar (7-10%);

6 - A maior parte do custo de preparação do produto é para secagem de utilidades (10-21%) e equipamentos (11-18%). Custos de separação mecânica como centrifugação e filtração são secundários;

7 - Custos de preparação de produtos (equipamentos e utilidades) são significativamente reduzidos quando a centrifugação é evitada.

**TABELA 3.8 - Custos Comparativos de Produção (total=100%)**

TIPO DE CUSTO	LEVEDURA PARAFINA	BACTÉRIA METANOL	LEVEDURA ETANOL	MICROFUNGO REJEITOS	BACTÉRIA BAGAÇO
DEPRECIÇÃO	9,3	5,8	5,8	9,1	11,5
MAT. PRIMA	58,5	73,8	77,1	55,1	43,6
Substrato	29,4	47,4	63,9	17,0	25,0
Ác. Fosfórico	11,1	11,8	3,2	16,2	5,7
Amônia	9,9	12,0	4,8	13,3	3,6
Sais Minerais	2,9	2,6	1,9	4,2	4,2
Outros	5,2	-	3,3	4,4	4,4
UTILIDADES	23,8	14,2	12,0	24,8	36,6
TRABALHO	8,4	6,2	5,1	11,0	8,3

Fonte - MOO -YOUNG (1977)

**TABELA 3.9 - Custos de Investimentos Comparativos (Total = 100%)**

TIPO DE CUSTO	LEVEDURA PARAFINA	BACTÉRIA METANOL	LEVEDURA ETANOL	MICROFUNGO REJEITO	BACTÉRIA BAGAÇO
ESTOCAGEM SUBSTRATO	3,3	4,9	4,0	4,9	8,4
PREPARAÇÃO DO MEIO	1,1	1,5	1,2	1,6	21,9
PREPARAÇÃO DO INÓCULO	0,9	1,1	0,9	1,3	-
FERMENTAÇÃO	51,2	43,4	50,0	50,6	29,8
CULTIVO	14,2	11,0	13,1	7,6	35,4
SECAGEM	17,8	23,1	18,7	17,0	4,0
ESTOCAGEM DO PRODUTO	11,5	15,0	12,1	17,0	0,50

Fonte - MOO-YOUNG (1977)

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Microrganismo e Meio de Cultura

Foi utilizado a levedura *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 (NCYC 825) obtida junto a Coleção de Cultura Tropical da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello (FTPT).

Foram utilizados três meios de cultura de diferentes composições, descritos na literatura como efetivos para a produção de biomassa e de atividade de bioemulsificante. O primeiro meio de cultura, descrito por CONCONE et al. (1972), foi por ele utilizado para fermentar óleo-diesel utilizando *Candida guilliermondii* Y-8. A sua composição é a seguinte:

Meio 1:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 5,00 \text{ g/l}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 2,83 \text{ g/l}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 3,50 \text{ g/l}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0,68 \text{ g/l}$

Extrato de Levedura = 1,00 g/l

Água Destilada

O segundo meio de cultura, foi utilizado por PROKOP & ERICKSON (1972), para fermentar óleo cru russo com *Candida lipolytica*, tendo a seguinte composição:

Meio 2:

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 7,00 \text{ g/l}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0,40 \text{ g/l}$

$\text{NaCl} = 0,10 \text{ g/l}$

$\text{NH}_4\text{Cl} = 5,00 \text{ g/l}$

Extrato de Levedura = 1,00 g/l

Água Destilada

O terceiro meio de cultura utilizado, foi descrito por SADIR (1974) que o utilizou para produzir proteína unicelular (SCP), a partir de querosene comercial, empregando *Candida lipolytica* ATCC 8661 como microrganismo. É a seguinte a composição deste meio de cultura:

Meio 3:  
NH<sub>4</sub>Cl = 10,00 g/l  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 5,00 g/l  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 0,30 g/l  
NaCl = 0,10 g/l  
Extrato de Levedura = 1,00 g/l  
Água Destilada

Todos os três meios de cultura foram suplementados com 3% ou 5% de óleo-diesel comercial como principal fonte de carbono.

A ativação da cultura deu-se utilizando os meios de cultura anteriores, acrescidos de 2% de óleo-diesel comercial e, 2,5 g/l de extrato de levedura. O microrganismo foi armazenado em tubos de ensaio contendo os meios de cultura mais 3% de ágar.

#### 4.2 - Fermentação

As fermentações foram conduzidas primeiramente em erlenmeyers e depois em fermentador de bancada. Na preparação do inóculo foram utilizados erlenmeyers de 500 ml, contendo cada um 100 ml do meio de cultura, inoculados com *Saccharomyces lipolytica* e deixados fermentar por 72h a 31<sup>0</sup>C e 300 rpm. Após, 10 ml do inóculo foram retirados e inoculados em novos erlenmeyers para fermentar por mais 120 h sob as mesmas condições anteriores. As análises eram efetuadas a cada intervalo de 24 h. Este procedimento foi descrito por PROKOP et al. (1971) e CIRIGLIANO & CARMAN (1984).

No fermentador de bancada, foram utilizadas as melhores condições de pH e concentração do substrato, visando maximizar a atividade do bioemulsificante e da massa celular produzida. A temperatura foi controlada por resistência elétrica, o pH através da adição de ácido ou base, e a taxa de aeração foi dada em termos de VVM (Volume de Ar / Volume de Meio por Minuto). A fermentação foi conduzida da mesma maneira descrita para erlenmeyers.

#### 4.3 - Substrato

Foi utilizado como substrato, óleo-diesel comercial proveniente da Refinaria de Paulínia (REPLAN), e adquirido em um único lote. Segundo a Refinaria de Paulínia, este óleo-diesel é

produzido a partir de petróleo originário da Bacia de Campos e do Exterior. A composição química média é a seguinte:

Parafinas .....	18-27% (v/v)
Aromáticos.....	23-34% (v/v)
Naftênicos.....	35-45% (v/v)
Saturados.....	60-70% (v/v)
Olefinas.....	30-40% (v/v)

As principais propriedades físicas são:

Densidade Relativa .....	0,856 g/cm <sup>3</sup>
Ponto Inicial de Ebulição.....	140 °C
% Máxima Enxofre .....	0,32

A composição química e as propriedades físicas do óleo-diesel usado neste trabalho não devem ser tomadas como padrão, pois o teor de parafinas, naftênicos e aromáticos pode variar, a depender do tipo de craqueamento e da origem do petróleo refinado. Vale ressaltar que o lote utilizado, ainda estava isento de qualquer aditivo, que neste caso poderia atuar como inibidor da fermentação.

#### 4.4 - Equipamentos

Para os experimentos em erlenmeyers agitados, utilizou-se uma estufa tipo "Fanem", com controle de temperatura variável de 0 °C a 60 °C, contendo em seu interior um agitador rotativo tipo "Fermentation Design", com velocidade de agitação controlável de 0 a 500 rpm. Os experimentos foram conduzidos a 31 °C e 300 rpm.

Nas experiências em fermentador de bancada, foi utilizado um "LSL - Biolafitte SA", com capacidade de 6 litros, e controle de temperatura, pH, agitação e aeração. Trabalhou-se com temperatura de 31 °C, agitação de 300 rpm e aeração de 1,5 VVM.. Todas as variáveis foram continuamente monitoradas, visando um controle efetivo das mesmas. A esterilização dos meios de cultura foi efetuada com temperatura de 121 °C por 15 min, em autoclave vertical tipo "Fabbe-Primar".

## 4.5 - Metodologia Analítica

### 4.5.1 - Determinação do Crescimento Celular e da Massa Celular Seca

O crescimento celular foi obtido, medindo a turbidez do meio de cultura, a tempos pré determinados de fermentação, com um espectrofotômetro "Spetronic 20", da Baush and Lomb, com absorvância de 610 nm. Os valores obtidos foram expressos em termos de densidade ótica (O.D.).

A metodologia usada para a determinação da densidade ótica foi a seguinte: o meio de cultura contendo células de levedura em fase aquosa e oleosa foi centrifugado a 6000 rpm por 10 min. Após, foram obtidos três fases: no fundo do tubo, a levedura que estava na fase aquosa; depois uma fase aquosa livre de levedura, e por último a fase contendo óleo mais levedura. A fase aquosa foi cuidadosamente extraída do tubo com o auxílio de uma pipeta automática. Ao creme de leveduras mais a fase oleosa que permaneceu no fundo do tubo, foi adicionado uma mistura de etanol - butanol - clorofórmio (10:10:1 v/v) até completar o volume original do meio. Essa mistura foi novamente centrifugada a 6000 rpm por 10 min. O sobrenadante, contendo a mistura de solventes mais o óleo residual foi descartada. As células, agora livres do óleo-diesel, são então resuspensas em água destilada e centrifugadas mais duas vezes a 6000 rpm e 10 min. Esse procedimento visa eliminar os restos de solvente. A levedura obtida é resuspensa em água destilada até completar o volume original do meio. Dilui-se a suspensão na relação 1:10 (uma parte de suspensão em dez partes de água) e determina-se a densidade ótica.

Um volume conhecido de uma suspensão concentrada de levedura com densidade ótica conhecida, foi centrifugada e o creme de células obtido foi seco à vácuo a 60<sup>0</sup>C em -25 inHg por 24 h. Por diferença do peso do tubo com e sem levedura, calcula-se a massa seca, expressando-a em termos de concentração (g/l). De acordo com o procedimento acima, foram plotados gráficos de absorvância 610 nm x concentração celular (g/l), para cada um dos três meios de cultura.

A recuperação das células em maiores quantidades, quando não era requerida determinação de rendimento, foi feita através do uso de uma centrífuga de maior capacidade (frascos de 300 ml) e de posterior secagem à vácuo nos próprios frascos.

O procedimento acima descrito é uma adaptação de FERRER & ERICKSON (1980) e SADIR (1972).

#### **4.5.2 - Determinação da Atividade do Bioemulsificante**

Retira-se uma alíquota do meio de fermentação em intervalos de tempo pré-determinado, submetendo-a a centrifugação a 6000 rpm por 10 min. A fase aquosa intermediária contendo o bioemulsificante, é cuidadosamente retirada com o auxílio de uma pipeta automática. O líquido extraído é novamente submetido a centrifugação a 6000 rpm por 10 min, quando então é filtrado à vácuo com papel de filtro tipo "Whatman 52", visando evitar a presença de células ou gotículas de óleo. Do filtrado resultante, retira-se uma alíquota de 5 ml misturando-a com 2% (0,1 ml.) de óleo-diesel. Após agitação vigorosa, a emulsão estável resultante é deixada em repouso por 10 min, tendo sua absorbância lida a 540 nm contra o branco (filtrado sem adição de óleo-diesel). Uma unidade de atividade do bioemulsificante é então definida como a quantidade de emulsificante extracelular que provoca uma absorbância de 1,0 a 540 nm. Essa determinação segue o método descrito por JOHNSON et al. (1992) e CIRIGLIANO & CARMAN (1984)

#### **4.5.3 - Determinação de Proteína**

A dosagem de proteína na massa celular foi feita pelo método do Biureto descrito por GORNALL et al.(1949). 0,1 a 0,2 g do material celular previamente seco foi submetido a lavagem com água destilada, visando a retirada de impurezas e de sais contendo nitrogênio. Após o descarte do sobrenadante, as células foram postas com 5,0 ml de água destilada permanecendo em repouso por 12 h. Foram então adicionados mais 5,0 ml de NaOH 2N, homogeneizando e aquecendo em banho-maria a 100 °C por 10 min. A suspensão é centrifugada por 5000 rpm por 10 min guardando o sobrenadante. Esse passo é repetido por mais duas vezes. Toma-se então 1,0 ml da mistura dos três sobrenadantes, adiciona-se 3,0 ml de NaOH 1,0N levando ao aquecimento a 100 °C por 10 min. Após esfriar, adiciona-se 1,0 ml de solução de CuSO<sub>4</sub> 2,5 %. Deixa-se em repouso por 5 min e centrifuga-se a 5000 rpm por 15 min para permitir a precipitação do sulfato de cobre que não reagiu. Lê-se então a absorbância a 555 nm contra o branco (4,0 ml de NaOH 1N + 1,0 ml de solução de CuSO<sub>4</sub> 2,5 %). O valor da proteína é obtido em termos de concentração, de uma curva padrão Absorbância (555 nm) x Albumina Bovina Padrão (g/l).

#### **4.5.4 - Determinação do pH**

Todas as determinações de pH foram feitas diretamente no meio de fermentação através de um potenciômetro.

#### 4.5.5 - Determinação do Consumo de Substrato

Para determinar a concentração de óleo-diesel, amostras homogeneizadas foram tomadas do fermentador e misturadas por agitação intensa com igual volume de n-hexano. As amostras contendo n-hexano e óleo-diesel, foram então centrifugadas e filtradas para eliminar as células presentes. O n-hexano foi evaporado a 60 °C sob vácuo, e o resíduo (óleo-diesel) pesado. Essa metodologia descrita por MOO-YOUNG et al. (1971), funciona bem para concentrações de hidrocarbonetos maiores que 1 g/l. Esse procedimento só foi empregado para fermentações conduzidas em fermentador de bancada, já que não havia possibilidades de retirar alíquotas grandes (100 ml) dos erlenmeyers agitados.

#### 4.5.6 - Cálculo dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram calculados para concentrações de substrato de 3% e 5%. A taxa específica de crescimento máximo ( $\mu$  máx.), foi calculada na fase linear de crescimento da curva obtida quando se plotou  $\ln(D.O.)$  em função do tempo. Foram tomadas amostras de hora em hora do fermentador, sob as condições acima descritas. Essas amostras eram lavadas e centrifugadas, visando eliminar os restos de óleo, quando então tinham sua densidade ótica lida a 610 nm. Esse procedimento para o cálculo de  $\mu$  máx. baseia-se no conhecimento experimental que a taxa de crescimento celular é proporcional à concentração celular, ou seja:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4.1)$$

As constantes de rendimento ( $Y_{X/S}$ ), foram todas calculadas levando-se em conta a concentração inicial de substrato, e o máximo rendimento celular alcançado no período de fermentação, ou seja:

$$Y_{X/S} = \frac{X_{MÁX}}{S_0} \quad (4.2)$$

$$Y_{SP} = \frac{X_{MÁX}}{S_P} = \frac{X_{MÁX}}{S_0 \cdot \text{Conc. Parafinas}} \quad (4.3)$$

onde  $X_{MÁX}$  é a concentração celular máxima,  $S_0$  é a concentração inicial de substrato, e  $S_P$  é a concentração inicial de parafinas no substrato.

Este procedimento foi utilizado devido ao fato que não se conseguiu obter valores de consumo de substrato, em intervalos regulares de tempo. As constantes de rendimento foram reportadas em termo da concentração inicial de óleo-diesel ( $Y_{x/sg}$ ), e da concentração inicial de parafinas no óleo-diesel ( $Y_{x/sp}$ ).

## **5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No presente trabalho, toda a parte experimental foi conduzida em frascos agitados, com erlenmeyers de 500 ml, e em um fermentador de bancada de 6 litros (fermentação descontínua). Nos frascos, selecionou-se as condições operacionais que levaram a uma máxima atividade do bioemulsificante e maior rendimento celular, empregando-as posteriormente no fermentador. As condições operacionais foram as seguintes:

Frascos agitados - Três níveis de pH (4,00, 4,50 e 5,00), três meios de cultura (meio 1, meio 2 e meio 3), duas concentrações de substrato (3 e 5% de óleo-diesel), temperatura de 31 °C e agitação de 300 rpm.

Fermentador de bancada - Duas concentrações de substrato (3 e 5% de óleo-diesel), um meio de cultura (meio 2), um nível de pH (5,00), temperatura de 31 °C, agitação de 300 rpm e aeração de 1,5 VVM.

Foram feitas, dezoito fermentações em erlenmeyers e quatro fermentações em fermentador de bancada, todas com 120 horas. Todas as análises foram feitas em duplicatas. Neste capítulo estão apresentados e discutidos alguns resultados. Os demais encontram-se descritos no Apêndice A.

### **5.1 - Experimentos em Frascos Agitados**

Os experimentos em frascos agitados, foram conduzidos conforme descrito previamente no item 4.2 do capítulo de "Material e Métodos". Os resultados são mostrados nas Figuras 5.1 a 5.10, Tabela 5.1 e Tabelas A1 a A18 (Apêndice A).

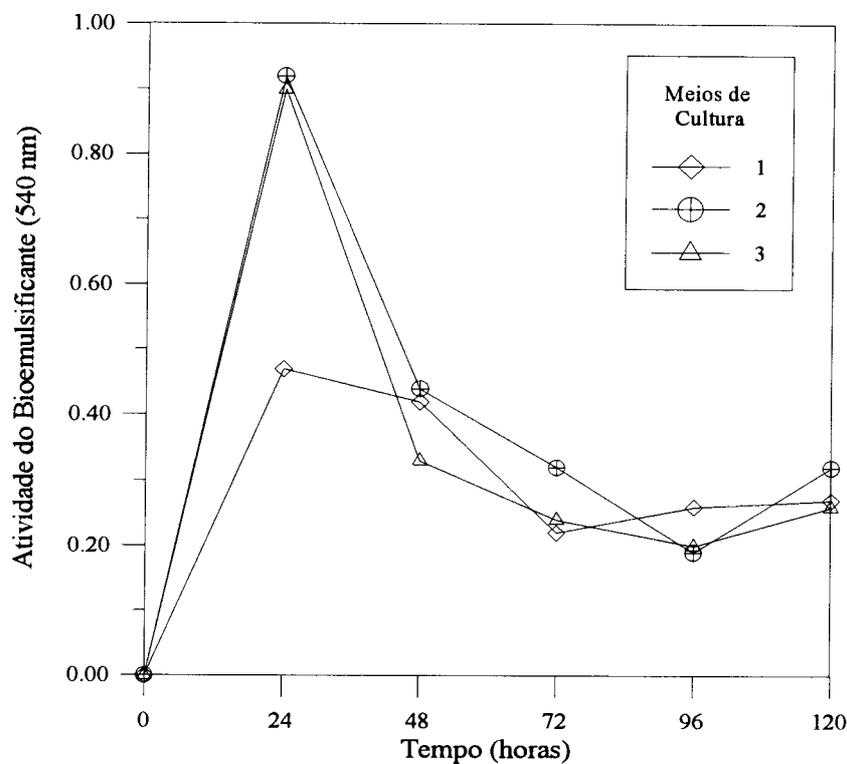
## 5.1.1 - Atividade do Bioemulsificante

### 5.1.1.1 - Influência do Meio de Cultura

Os três meios de cultura utilizados neste trabalho, foram descritos na literatura como eficazes para fermentação de hidrocarbonetos, produzindo quantidades efetivas de bioemulsificante e/ou de biomassa. Dentre os três meios de cultura descritos, para todos os experimentos em frascos agitados, as maiores atividades do bioemulsificante foram conseguidas com o meio 2 (ver Apêndice A). Essa eficiência demonstra uma concordância com PROKOP & ERICKSON (1972), que utilizaram a composição desse meio com sucesso, para fermentar óleo cru russo com *Candida lipolytica*. De acordo com as Figuras 5.1 e 5.2 (Tabelas A1 e A2), as maiores atividades foram obtidas nas primeiras horas de fermentação. Isso foi explicado por muitos autores, como fruto de uma maior disponibilidade de frações de hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis, como as n-parafinas. O meio de cultura 1, usado por CONCONE et al. (1972), para fermentar óleo-diesel com *Candida guilliermondii* visando a produção de biomassa, também apresentou bons valores de atividade do bioemulsificante, tendo algumas vezes valores de atividade melhores que aqueles do meio 2 (Figura 5.1 - tempo de 24 horas e Figura 5.2 - tempo de 96 horas). Em semelhança com o meio de cultura 2, houve uma tendência de queda na atividade nos tempos finais de fermentação, fato também observado por CIRIGLIANO & CARMAN (1984), que produziram um bioemulsificante a partir da fermentação de n-hexadecano com *Candida lipolytica*, e por SINGH et al. (1990), que fermentaram n-parafinas com *Candida tropicalis*. Porém, JOHNSON et al. (1992), observaram um comportamento contrário, com uma alta acentuada na atividade do bioemulsificante nos tempos finais de fermentação (96 horas e 120 horas), quando utilizaram a levedura *Rhodotorula glutinis* II P-30 para fermentar vários tipos de hidrocarbonetos. O meio de cultura 3, ao contrário dos anteriores, não apresentou bons valores de atividade para as diversas fermentações (excessão feita à medida de atividade do tempo de 24 horas na Figura 5.1).

Não houve em todas as corridas, um comportamento uniforme da medida da atividade do bioemulsificante, ocorrendo oscilações e picos, em diferentes tempos de fermentação. Isso pode ser explicado principalmente, como devido a passos metabólicos como a cooxidação e a diauxia, na qual determinadas frações dos hidrocarbonetos são primeiramente consumidas pelo microrganismo por estarem mais facilmente disponíveis, ao passo que outras são poupadas do ataque microbiológico naquele determinado momento, levando a menores valores de atividade. Os máximos valores de atividade provavelmente correspondem às frações mais facilmente degradáveis, como os alcanos de cadeias lineares, enquanto os valores mínimos estão

relacionados com a degradação de frações mais complexas, como os aromáticos. Uma outra hipótese proposta pelos pesquisadores, é que como a biodegradação é geralmente um processo seletivo e incompleto, os hidrocarbonetos mais complexos, e que não são completamente degradados, só são atacados por último, levando a uma queda gradual na atividade do bioemulsificante ao longo da fermentação. Essa queda será maior, quanto maior for a complexidade do substrato utilizado. No caso óleo-diesel, um complexo refinado de petróleo, esse comportamento de queda é esperado, principalmente quando comparado à degradação de hidrocarbonetos mais simples. Essas variações nas medidas da atividade, foram também observadas por CIRIGLIANO & CARMAN (1984).



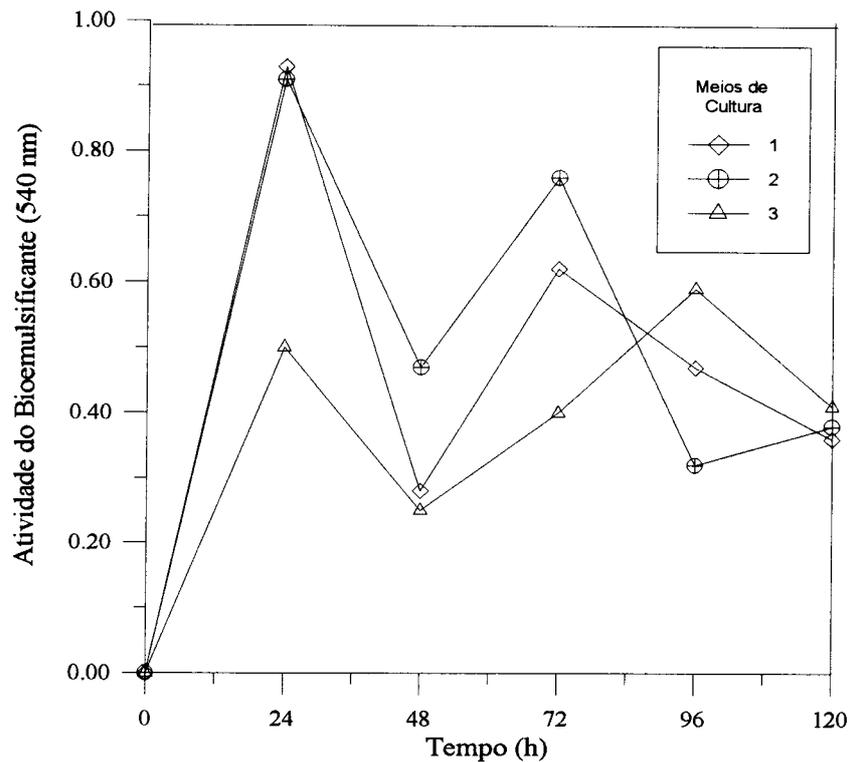
**FIGURA 5.1** - Produção de Bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 4,50 e concentração de substrato 3%.

### 5.1.1.2 - Influência do pH e da Concentração de Substrato

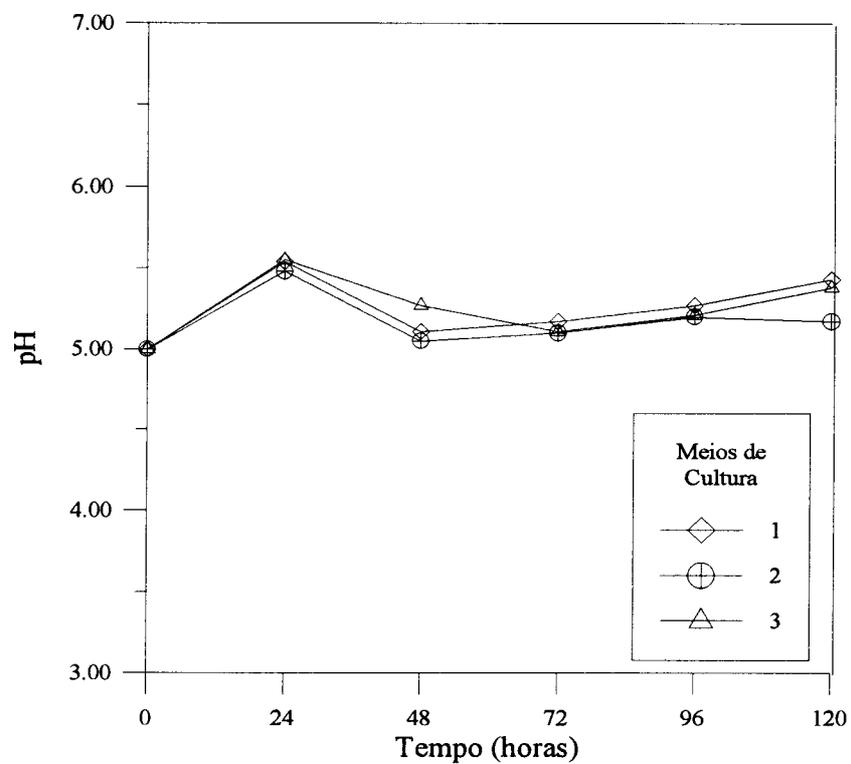
O valores de pH utilizado na condução dos experimentos (4,00, 4,50 e 5,00), foi descrito por muitos autores (PROKOP et al.,1971, PROKOP & ERICKSON,1972 e FERRER &

ERICKSON,1980) como o mais indicado para a fermentação de hidrocarbonetos, por não ser inibitório ao crescimento do microrganismo, e por ser útil na prevenção do risco de contaminação por bactérias. Dos três níveis de pH empregados, o pH 5,00 foi o que propiciou os melhores valores de atividade do bioemulsificante ao longo da fermentação. Esses valores de atividade, de acordo com as Figuras 5.2 e 5.3 (Tabelas A1 e A3), foram acompanhados de uma pequena variação do pH ao longo da fermentação, mostrando, para esses experimentos, que a manutenção do valor do mesmo é um importante parâmetro na melhoria da atividade. PROKOP & ERICKSON (1972), salientaram a importância de se trabalhar com pH 5,00, quando fermentaram óleo cru russo. Já CIRIGLIANO & CARMAN (1984), encontraram as maiores atividades do bioemulsificante por eles produzido, quando empregaram um intervalo de pH de 2,00 a 5,00. No presente trabalho, o valor de pH 4,00 não levou às melhores medidas da atividade do bioemulsificante, devido provavelmente a uma grande variação do pH ao longo da fermentação, chegando próximo a níveis considerados inibitórios (Figuras 5.4 e 5.5 e Tabelas A16, A17 e A18). No caso do pH inicial de 4,50 houve bons valores de atividade, principalmente para o tempo de 24 horas, quando o nível de pH elevou-se chegando a valores em torno de 5,00 (Tabelas A5 e A6). Nos demais tempos de fermentação as medidas de atividade não foram semelhantes. Nas Figuras 5.6 e 5.7 estão representados as atividades do bioemulsificante em função dos três níveis de pH, para o tempo de fermentação de 24 horas, onde foram conseguidos os maiores valores de atividade. Verifica-se que dentre os valores de atividade mostrados, o nível de pH 5,00 foi responsável por alguns dos maiores valores, porém como foi dito anteriormente, o pH 4,50 também produziu bons valores para este tempo de fermentação.

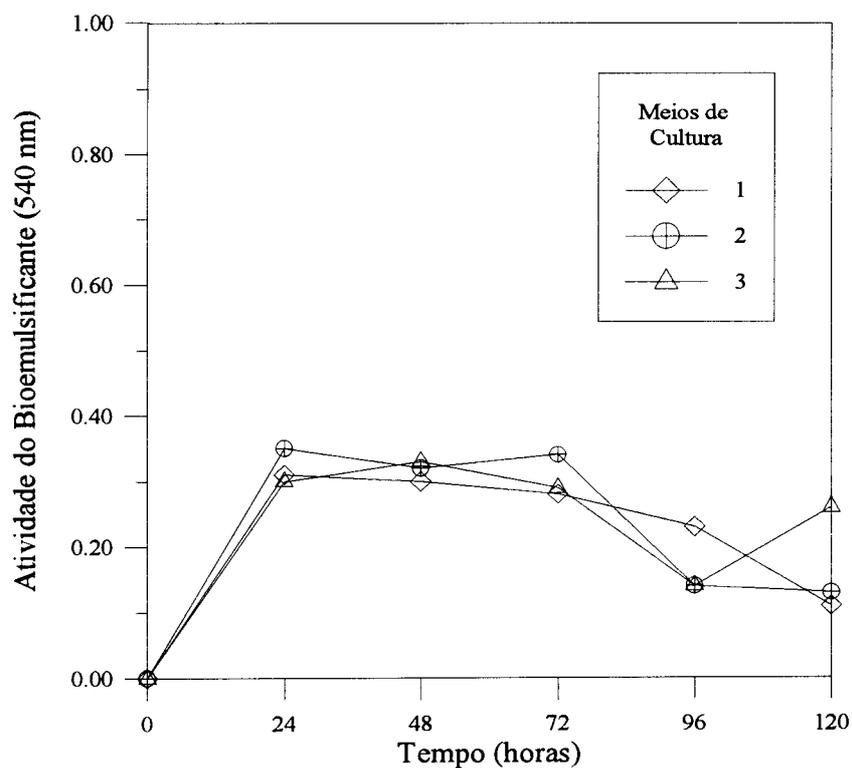
CIRIGLIANO & CARMAN (1984), não encontraram variações na atividade do bioemulsificante quando trabalharam com concentrações de substrato de 1 a 5%. No nosso caso, de acordo com as Figuras 5.2 e 5.8 (Tabelas A1, A2, A3, A10, A11 e A12), verificou-se melhores atividades do bioemulsificante para os três meios de cultura, quando se empregou uma concentração de substrato de 3%. Para um mesmo nível de pH, os valores de atividade obtidos com concentração de substrato de 3% (Figura 5.2) foram maiores do que aqueles conseguidos com 5% (Figura 5.8). Nas Figuras 5.6 e 5.7, para o tempo de 24 horas, também os valores de atividade do bioemulsificante foram sempre superiores com concentrações de 3%, independente do pH utilizado. Essa constatação está em acordo com o que foi descrito por PALEJWALA & DESAI (1989), que ao produzirem um bioemulsificante extracelular a partir de etanol, encontraram a maior atividade do mesmo em concentrações de etanol de 3%, e as menores com concentração de 1,0, 3,5 e 4,0%.



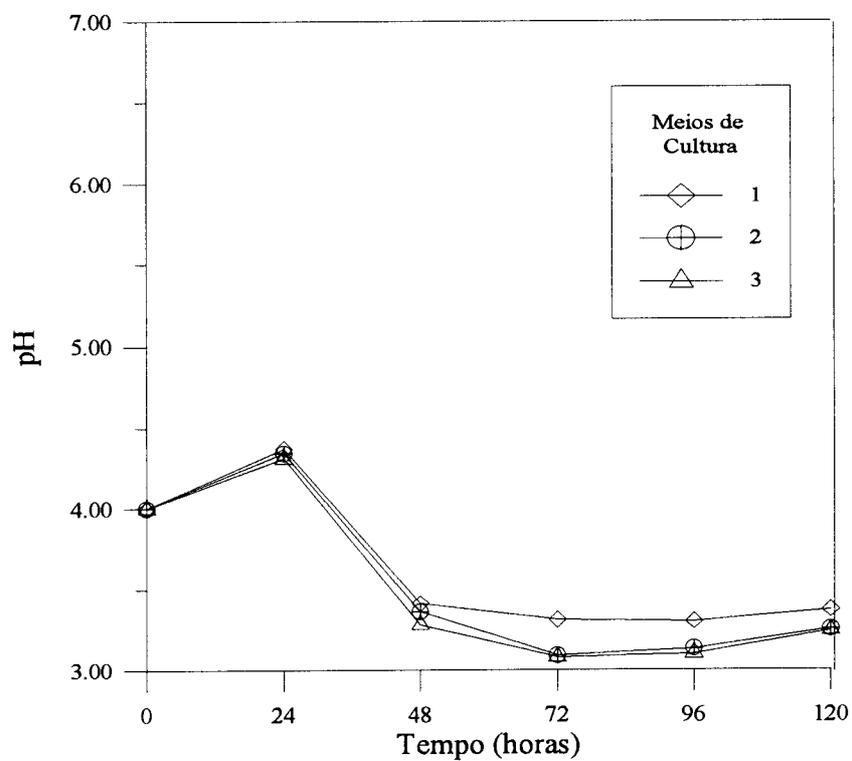
**FIGURA 5.2** - Produção de Bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 5,00 e concentração de substrato 3%.



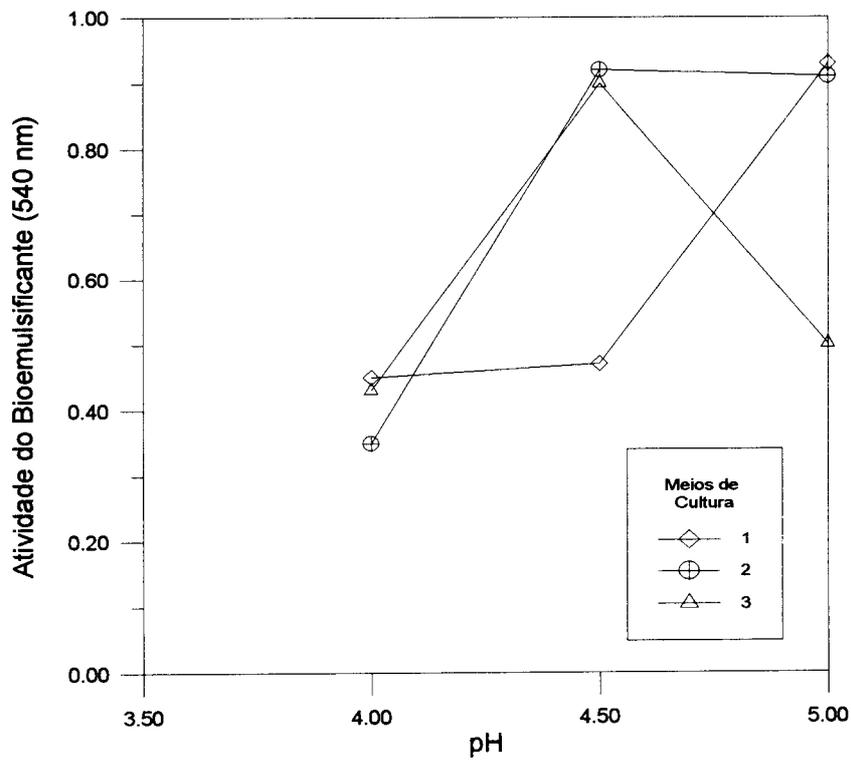
**FIGURA 5.3** - Variação do pH de Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica*. pH inicial 5,00 e concentração de substrato 3%.



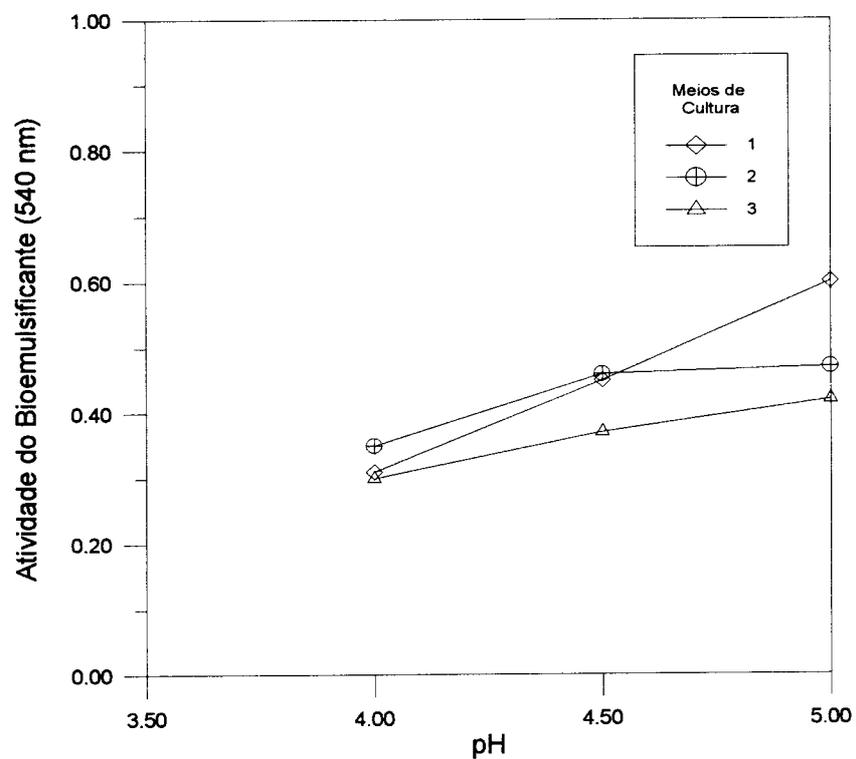
**FIGURA 5.4** - Produção de Bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 4,00 e concentração de substrato 5%.



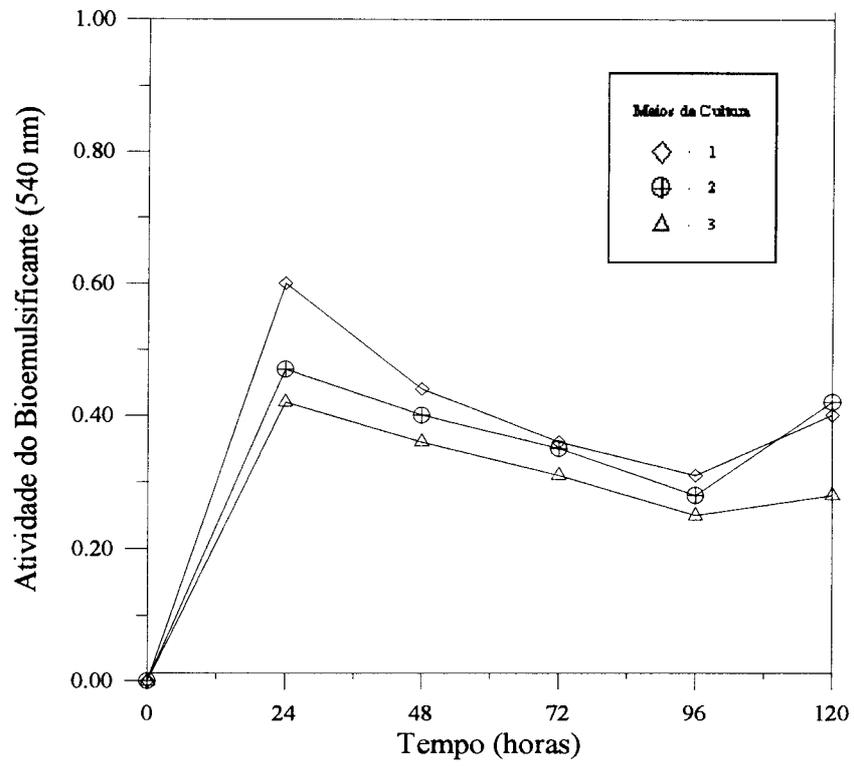
**FIGURA 5.5** - Variação do pH de Fermentação de Óleo-diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica*. pH inicial 4,00 e concentração de substrato 5%.



**FIGURA 5.6** - Variação da Atividade do Bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. Tempo de 24 h e concentração de substrato 3%.



**FIGURA 5.7** - Variação da Atividade do Bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. Tempo de 24 h e concentração de substrato 5%.



**FIGURA 5.8** - Produção de Bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 5,00 e concentração de substrato 5%.

## **5.1.2 - Produção de Biomassa**

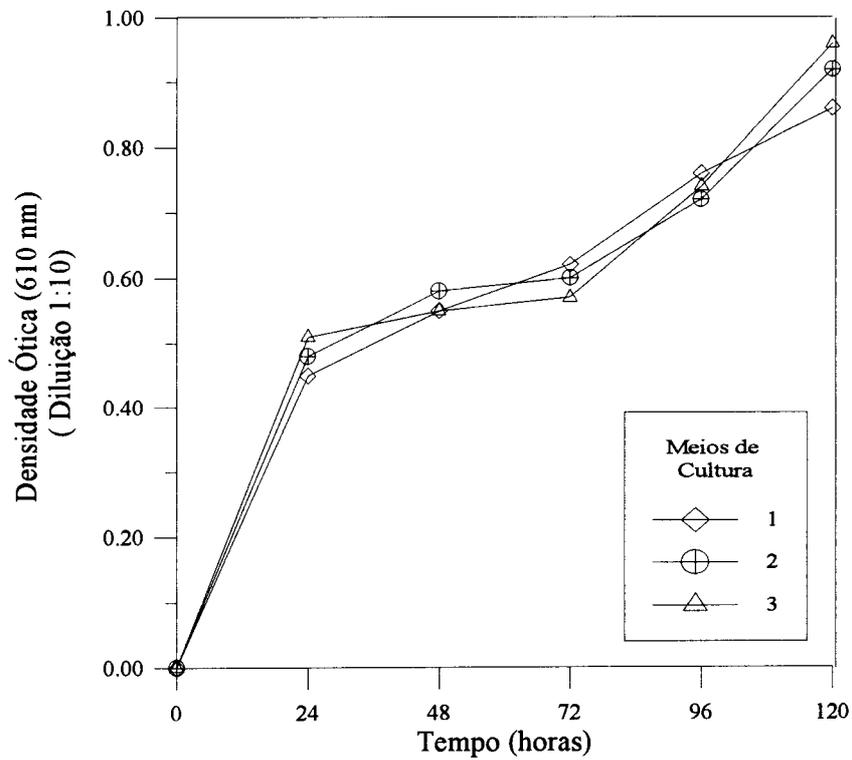
### **5.1.2.1 - Influência do Meio de Cultura**

Dos três meios de cultura utilizados (Tabelas A1, A2 e A3), o de número 3 mostrou ser o mais efetivo em termos de rendimento celular máximo (Figura 5.9). Esse comportamento foi observado praticamente em todas as fermentações. A composição do meio foi utilizada por SADIR (1972), para fermentar querosene com *Candida lipolytica* visando a produção de proteína unicelular. A eficiência do mesmo segundo ele, está no fato que o cloreto de amônio utilizado produz melhores rendimentos em termos de massa celular, do que outras fontes nitrogenadas, como o sulfato de amônio e nitrato de amônio.

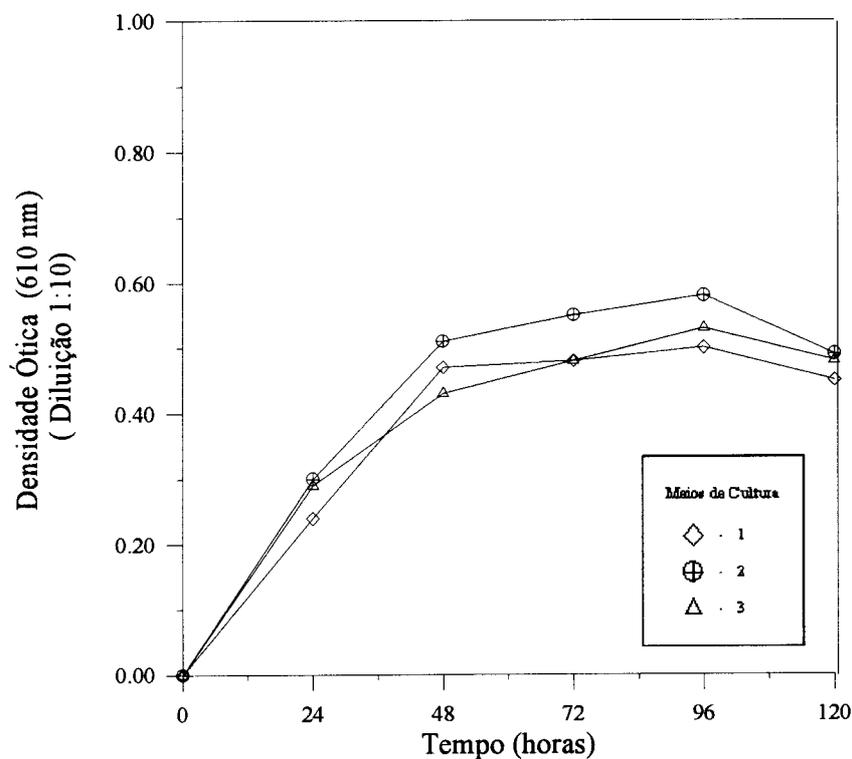
Apesar do terceiro meio de cultura apresentar em todas as fermentações os valores mais altos em termos de rendimento celular, os outros dois meios não demonstraram ser tão menos eficientes (Para os maiores valores de produção de biomassa, o meio de cultura 3 produziu 25% a mais que o meio de cultura 1, e 9 % a mais que o meio 2). O comportamento apresentado pela Figura 5.9 (maiores taxas de crescimento dentre todas as fermentações) ratifica essa afirmação, mostrando que as diferenças entre as taxas de crescimento são pequenas. Isso, aliado ao fato que, conforme descrito anteriormente, o meio de cultura 3 não apresentou as melhores atividades do bioemulsificante, levou à escolha e utilização do meio 2 para os experimentos conduzidos em fermentador.

### **5.1.2.2 - Influência do pH e da Concentração de Substrato**

Houve uma concordância com o que se observou na medida da atividade do bioemulsificante. Novamente se encontrou que os valores de pH 5,00 e concentração de substrato de 3%, foram aqueles que resultaram em melhores níveis de crescimento celular. Um exemplo disso, é que os valores apresentados na Figura 5.10 (Tabelas A16, A17 e A18), cujas condições de fermentação foram pH 4,00 e concentração de substrato de 5%, foram inferiores. Como o óleo-diesel é composto de frações complexas, provavelmente ocorreu para essa concentração, uma inibição pelo substrato. SADIR (1972), também encontrou no pH 5,00 e concentração de substrato de 3%, as condições que permitiram-no obter os melhores rendimentos. Porém, ERTOLA et al. (citado por SADIR,1972), afirma ter conseguido numa fermentação de gasóleo, os melhores rendimentos com pH 7,00 e concentração de substrato de 2%.



**FIGURA 5.9** - Produção de Biomassa de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 5,00 e concentração substrato 3%



**FIGURA 5.10** - Produção de Biomassa de *Saccharomyces lipolytica* por Fermentação de Óleo-Diesel Comercial. pH inicial 4,00 e concentração substrato 5%

Em algumas corridas, o microrganismo apresentou crescimento até as 72 horas de fermentação, em outras esse tempo foi de 96 horas, e em uma corrida chegou-se a 120 horas. SADIR (1972), também observou essa heterogeneidade nos tempos máximos de crescimento, quando variou as condições operacionais e as composições dos meios de cultura das suas fermentações.

Os rendimentos obtidos para as melhores condições, são mostrados na tabela 5.1.

**TABELA 5.1 - Produção Celular Máxima Conseguída em Frascos Agitados.  
pH inicial 5,00 e concentração celular 3%**

MEIO DE CULTURA	MASSA CELULAR SECA (g/l)
1	4,7
2	5,7
3	6,3

Não foram encontrados na literatura dados comparativos de produção celular em fermentação usando óleo-diesel comercial como substrato. Porém, os valores aqui apresentados (experimentos conduzidos em frascos agitados e fermentador - item 5.2) mostraram-se bastantes razoáveis quando comparados aos rendimentos obtidos por outros autores utilizando querosene (4,0 a 8,2 g. célula seca / l. meio de cultura) e de gasóleo (8,0 a 10,0 g. célula seca / l. meio de cultura) (SADIR, 1972; SHIN-ICHIRO citado por SADIR, 1972 e KNETCHT et al., 1977).

### 5.1.3 - Teor de Proteína

No presente trabalho, o teor protéico da massa celular resultante, foi quantificado através do método do Biureto (ítem 4.5.3 - Material e Métodos). Os conteúdos médios de proteína para cada um dos três meios de cultura, foram bastante semelhantes, situando-se na faixa de 39% (Meio 1 - 39,1%, Meio 2 - 39,3% e Meio 3 - 39,8% em base seca). SADIR (1972), também não encontrou diferenças efetivas nos teores de proteína, quando variou as condições operacionais e a composição dos meios de cultura na fermentação de querosene com *Candida lipolytica*. As diferenças segundo ele, foram notadas apenas nos teores de cada um dos aminoácidos presentes. Os valores percentuais de proteína obtidos neste trabalho, podem ser considerados bons quando comparados com os valores descritos na literatura. SADIR (1972), obteve um teor de 47,80% de proteína em base seca, porém com um alto teor de materiais graxos. SINGH (citado por SADIR, 1972), obteve de 39,2 a 41,2% de proteína trabalhando com altas concentrações de gasóleo fermentado por *Thichosporon pollulans*. SHIN-ICHIRO et al. (citado por SADIR, 1972), obtiveram um teor de 37,22% de proteína cultivando *Candida lipolytica* em querosene com alto teor de n-parafinas. E por fim, BIRCKENSTAEDT et al. (1977), conseguiu 58,4% de proteína, utilizando a levedura *Endomycopsis lipolytica* FH-H-5027 para consumir n-parafinas.

## 5.2 - Experimentos em Fermentador

De acordo com os comentários anteriores, os experimentos conduzidos no fermentador de bancada, foram feitos utilizando as melhores condições operacionais obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados. O meio de cultura escolhido (meio 2), foi o que apresentou as melhores atividades para o bioemulsificante, além de bons valores de rendimento celular. A temperatura, pH, aeração e agitação, foram continuamente monitoradas. Trabalhou-se em todos os experimentos com um volume de meio de 4 litros, inóculo de 72 horas de idade e volume de inóculo igual a 10% do volume total, descontados do volume final.

Os resultados completos dos experimentos realizados em fermentador de bancada estão mostrados nas Tabelas de A19 a A22 do Apêndice A.

### 5.2.1 - Aspectos Gerais

Como era esperado, os resultados obtidos nos experimentos realizados no fermentador foram melhores do que aqueles apresentados nos frascos agitados. Conseguiu-se valores de atividade do bioemulsificante melhores e com menor variação, valores de rendimento celular maiores, além de uma diminuição no tempo total de fermentação (máximo de crescimento celular). Enquanto nos erlenmeyers o microrganismo apresentava valores máximos de crescimento sempre acima de 72 horas, no fermentador esse tempo foi reduzido para 48 horas e 24 horas. A Tabela 5.2 faz uma comparação dos melhores resultados de atividade do bioemulsificante e de rendimento celular para frascos agitados e fermentador de bancada. Os valores apresentados confirmam essa melhoria, que em grande parte é devida, a um melhor controle das variáveis e a uma aeração conveniente, visto que as necessidades de oxigênio de uma fermentação de hidrocarbonetos chega a ser de duas a três vezes maior quando comparada a uma fermentação de carboidratos. A razão disto está na própria composição dos hidrocarbonetos, que possuem uma alta fração mássica de carbono e ausência de oxigênio na cadeia na maioria dos compostos.

Tanto nos experimentos em frascos agitados como no fermentador, foi observado que mesmo após o início da autólise da levedura, o bioemulsificante ainda apresentava valores efetivos de atividade, devido provavelmente ao fato que o mesmo, por ser uma substância extracelular, vai sendo excretado no meio de fermentação onde se acumula e mantém assim sua atividade, mesmo após o fim do período de crescimento celular.

**TABELA 5.2** - Comparação dos Melhores Valores de Atividade do Bioemulsificante e de Produção de Massa Celular Seca, Obtidos em Frascos Agitados e Fermentador.

	RESULTADOS	
	FRASCOS AGITADOS	FERMENTADOR
ATIVIDADE DO BIOEMULSIFICANTE	0,95	1,10
MASSA CELULAR SECA (g/l)	6,3	8,1

### 5.2.2 - Consumo de Substrato

Conforme foi descrito no capítulo de "Material e Métodos" (item 4.5.5), o procedimento aqui empregado para a determinação do consumo de substrato, não é o mais usado para fermentação de hidrocarbonetos. MOO-YOUNG et al. (1971), que o descreveu, alertou para a baixa precisão desse método quando se deseja determinar concentrações pequenas de substrato. Além disso, sempre há a possibilidade de interferência nos resultados, quando pequenas quantidades de célula conseguem passar através da filtração e centrifugação. Daí o fato que neste tipo de fermentação, sempre que possível, o substrato deve ser dosado por cromatografia gasosa, permitindo se identificar o consumo de cada fração do hidrocarboneto usado. No nosso caso, como isto não foi possível, tomou-se todo o cuidado a fim de que os resultados tentassem reproduzir o verdadeiro substrato consumido, com uma razoável precisão.

Os resultados do consumo de substrato são mostrados na Tabela 5.3. Obteve-se valores de degradação bastante razoáveis, considerando-se um óleo refinado. Em relação às condições de fermentação, houve um melhor consumo do óleo-diesel quando se usou uma concentração de substrato de 5%. Da mesma forma, as corridas em que não se efetuou controle do pH, apresentaram valores de consumo melhores que aquelas em que esse tipo de controle foi efetuado. COLWELL & WALKER (1977), obtiveram valores de degradação de 78% e 51% para óleos crus, e de 41% e 11% para óleos refinados. A diferença na taxa de degradação se dá principalmente em virtude do aumento da composição de aromáticos, resinas e asfaltos, nos óleos refinados. Esses compostos, além de tóxicos são de difícil degradação.

**TABELA 5.3 - Taxa de Degradação do Óleo-Diesel após 120 horas de Fermentação**

CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	% DE DEGRADAÇÃO DO ÓLEO-DIESEL (p/v)
Conc. Subst.=3%, pH 5,00 (com controle)	23,74
Conc. Subst.=3%, pH 5,00 (sem controle)	29,96
Conc. Subst.=5%, pH 5,00 (com controle)	43,20
Conc. Subst.=5%, pH 5,00 (sem controle)	49,30

Um outro autor, HARVEY et al. (1990), também fez uso de microrganismos para produção de bioemulsificante visando a limpeza de área contaminada. Ele utilizou *Pseudomonas aeruginosa* para remover óleo originário de um derramamento do navio petroleiro "Exxon Valdez" no Alaska, e obteve valores de degradação de óleo de até 70%.

É importante salientar, que o óleo-diesel que foi usado como substrato possui um teor médio de parafinas (22,5% v/v). Essas frações são consideradas como as mais facilmente degradáveis pelos microrganismos, além de serem importantes na degradação de frações mais complexas, através da cooxidação.

### 5.2.3 - Influência do pH

Foi utilizado um único nível de pH (pH 5,00), porém os experimentos foram conduzidos com e sem controle do mesmo. Nas fermentações com pH controlado, o controle foi feito pela adição de ácido clorídrico e hidróxido de sódio.

Em concordância com alguns autores (SADIR,1972, SINGH et al.,1990 e PROKOP & ERICKSON,1972), verificou-se que o controle do pH no nível desejado ao longo da fermentação, produziu melhorias no rendimento celular e na atividade do bioemulsificante, embora as maiores atividades do bioemulsificante, tivessem na maioria das vezes, sido conseguidas nas fermentações sem controle de pH. Nas Tabelas 5.4 e 5.5 e Figuras 5.11 e 5.12, pode ser visto que os valores obtidos com pH controlado, foram na maioria das vezes superiores aqueles, em que não se efetuou este tipo de controle.

**TABELA 5.4** - Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato de 3%, pH inicial 5,00 sem controle.

TEMPO (h)	ATIVIDADE DO BIOEMULSIFICANTE	CRESCIMENTO CELULAR (g/l)	pH	CONCENT. DE SUBSTRATO (g/l)
0	0,00	0,0	5,00	25,7
24	0,58	4,4	4,23	-
48	0,47	4,9	4,05	22,8
72	0,72	3,9	4,04	-
96	0,49	3,5	4,20	-
120	0,59	3,0	4,60	19,6

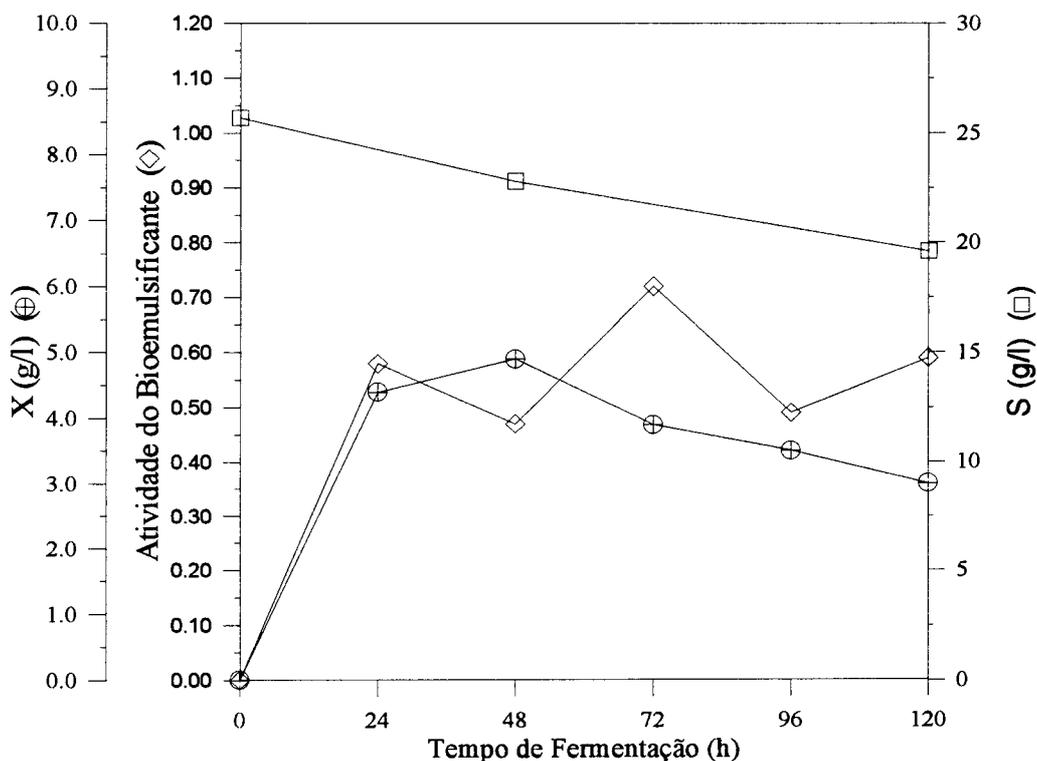
**TABELA 5.5** - Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato de 3%, pH inicial 5,00 com controle.

TEMPO (h)	ATIVIDADE DO BIOEMULSIFICANTE	CRESCIMENTO CELULAR (g/l)	pH	CONCENT. DE SUBSTRATO (g/l)
0	0,00	0,0	5,00	25,7
24	0,64	5,2	5,00	-
48	0,62	7,0	5,00	20,8
72	0,39	8,1	5,00	-
96	0,50	7,0	5,00	-
120	0,61	3,2	5,00	18,0

Em relação ao bioemulsificante, as maiores atividades foram obtidas sem que houvesse controle de pH. Porém, observou-se que as variações de atividade em torno de um valor médio, foram menores nas fermentações em que se efetuou o controle do pH. Esse comportamento foi observado tanto para concentrações de substrato de 3%, como para 5% (Tabelas 5.6 e 5.7 e Figuras 5.13 e 5.14).

Na produção de biomassa, os resultados foram muito superiores quando comparados com aqueles obtidos em frascos agitados, sendo que as fermentações em que se efetuou controle de pH, mostraram valores de rendimento celular maiores que aquelas sem controle. Nas Figuras 5.13 e 5.14, é interessante notar as diferenças na produção celular quando se controla o pH. Na Figura 5.13, os valores de rendimento sem controle, para os tempos de fermentação de 72 horas e 96 horas, estão entre os menores (3,4 g/l e 3,0 g/l respectivamente). Nestes tempos, os valores de

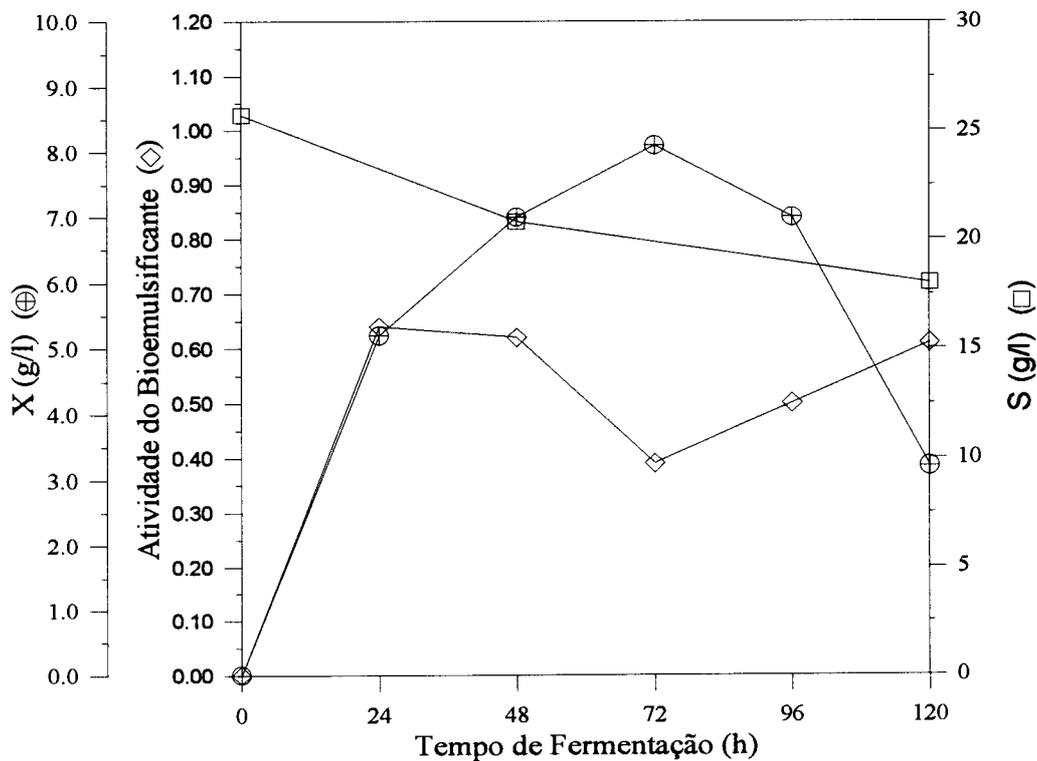
pH por sua vez, são também os menores (pH 3,21 e pH 3,40), chegando próximo a níveis considerados inibitórios por alguns autores, para este tipo de fermentação. Por outro lado, na Figura 5.14 em que o pH foi controlado, nota-se claramente que para estes mesmos tempos de fermentação (72 horas e 96 horas), os valores de produção celular estão entre os maiores. Essa constatação mostra a estreita relação entre o controle de pH e a maximização da produção de biomassa.



**FIGURA 5.11** - Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular (X) e Consumo de Substrato (S) na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 3%, pH inicial 5,00 sem controle.

**TABELA 5.6**- Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato de 5%, pH inicial 5,00 sem controle.

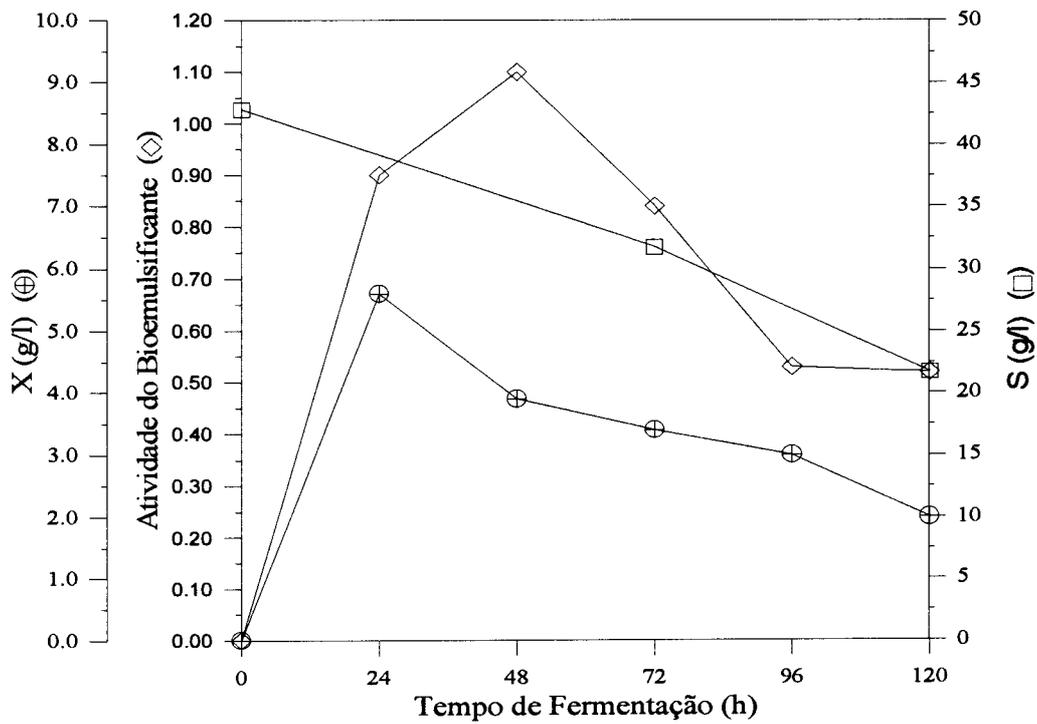
TEMPO (h)	ATIVIDADE DO BIOEMULSIFICANTE	CRESCIMENTO CELULAR (g/l)	pH	CONCENT. DE SUBSTRATO (g/l)
0	0,00	0,0	5,00	42,8
24	0,90	5,6	3,70	-
48	1,10	3,9	3,33	-
72	0,84	3,4	3,21	31,7
96	0,53	3,0	3,40	-
120	0,52	2,0	3,64	21,7



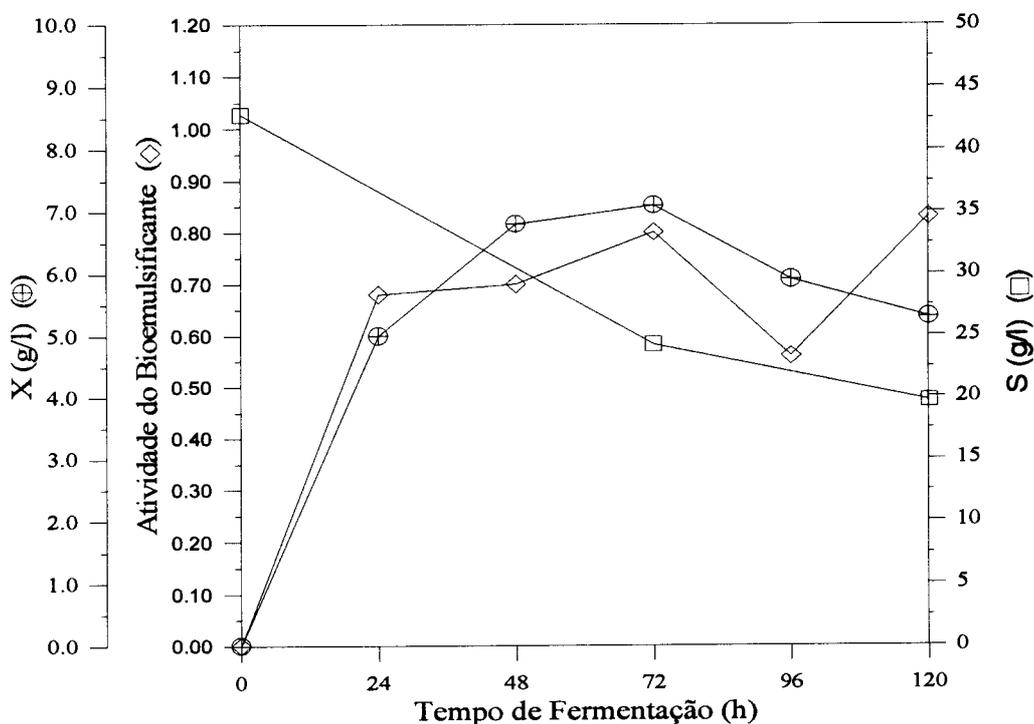
**FIGURA 5.12** - Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular (X) e Consumo de Substrato (S) na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 3%, pH inicial 5,00 com controle.

**TABELA 5.7-** Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador de Bancada. Concentração de substrato de 5%, pH inicial 5,00 com controle.

TEMPO (h)	ATIVIDADE DO BIOEMULSIFICANTE	CRESCIMENTO CELULAR (g/l)	pH	CONCENT. DE SUBSTRATO (g/l)
0	0,00	0,0	5,00	42,8
24	0,68	5,0	5,00	-
48	0,70	6,8	5,00	-
72	0,80	7,1	5,00	35,8
96	0,56	5,9	5,00	-
120	0,83	5,3	5,00	24,3



**FIGURA 5.13-** Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular (X) e Consumo de Substrato (S) na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 5%, pH inicial 5,00 sem controle.



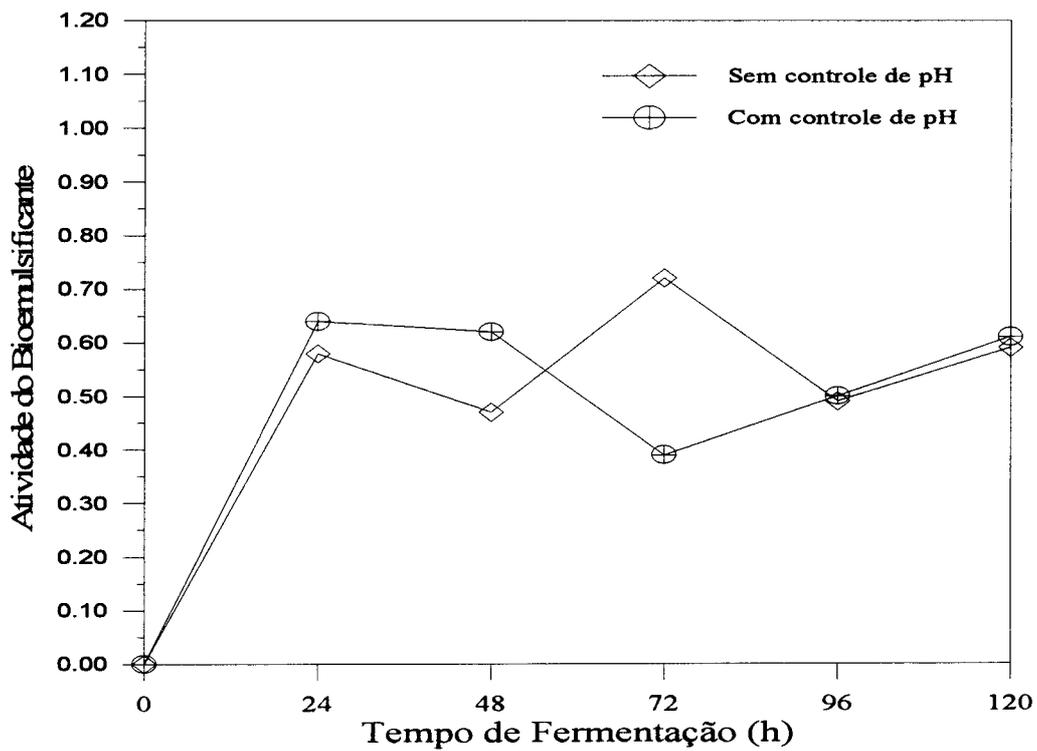
**FIGURA 5.14-** Atividade do Bioemulsificante, Rendimento Celular (X) e Consumo de Substrato (S) na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 5%, pH inicial 5,00 com controle.

Um fato interessante ocorreu em relação ao pH em todos os experimentos: ele apresentava uma queda no seu valor a medida que a fermentação ia se processando, mas a partir de um certo ponto, ele parava de cair e começava a subir. SADIR (1972), observou este mesmo comportamento, atribuindo-o ao início da autólise da levedura, que libera grupos nitrogenados alcalinos no meio de fermentação, levando assim ao aumento do pH.

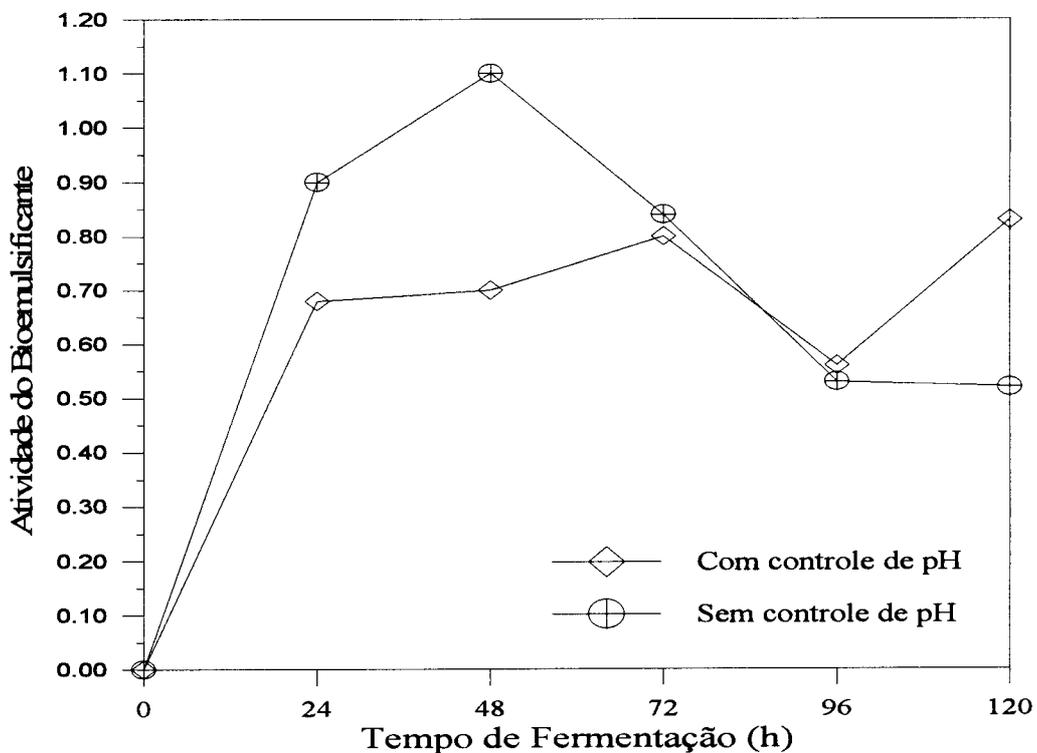
No caso de um "scale-up" ou produção industrial para este trabalho, conforme resultados obtidos e de acordo com as Figuras 5.15, 5.16, 5.17 e 5.18, é necessário se tomar uma decisão: Para a produção do bioemulsificante, os valores foram maiores quando não se efetuou o controle de pH, ao passo que quando a intenção for produzir massa celular, é importante que se faça um controle de pH, tendo em vista o aumento de rendimento ocorrido.

#### **5.2.4 - Influência da Concentração de Substrato**

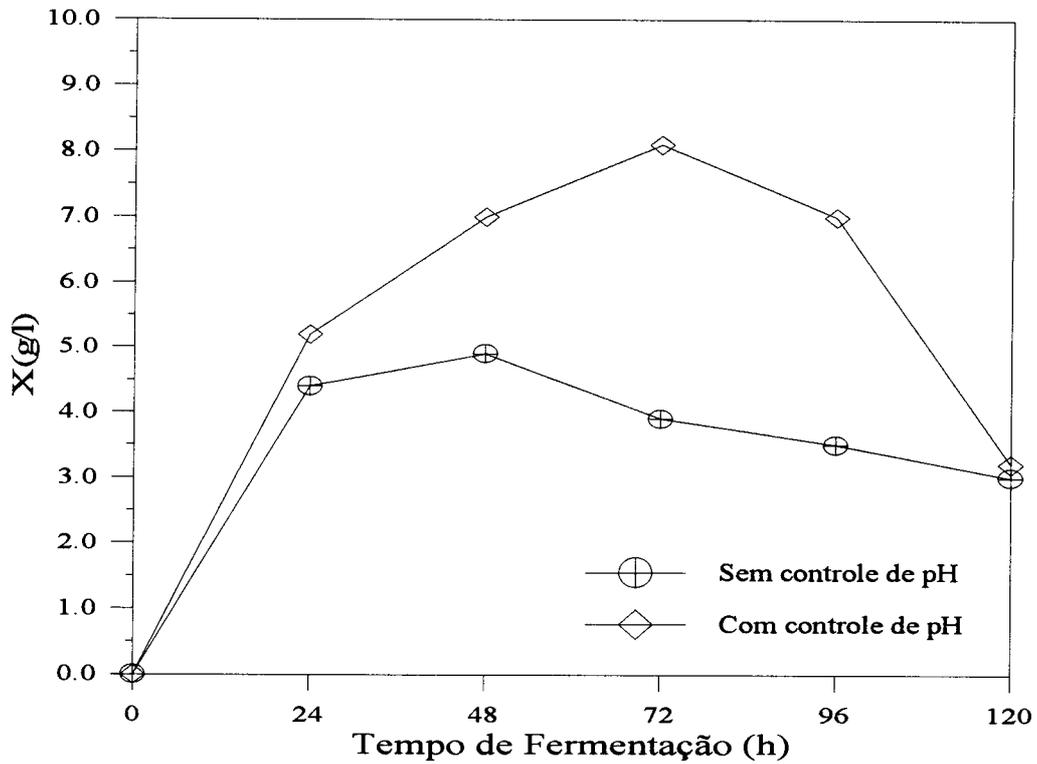
A concentração de substrato não repetiu o comportamento observado quando se trabalhou em frascos agitados. De acordo com as Figuras 5.15 e 5.16, a atividade do bioemulsificante apresentou os maiores valores tanto para pH controlado como para pH sem controle, quando a concentração de substrato foi de 5%. Para frascos agitados, as melhores atividades tinham sido conseguidas com concentração de substrato de 3%. Para a produção de biomassa (Figuras 5.17 e 5.18), a concentração de substrato de 3% mostrou resultados melhores. Porém, o rendimento obtido com concentração de substrato de 3% com pH controlado, possui uma maior taxa de autólise em relação à concentração de 5% de óleo-diesel com pH controlado. Isso, do ponto de vista industrial, pode não ser interessante.



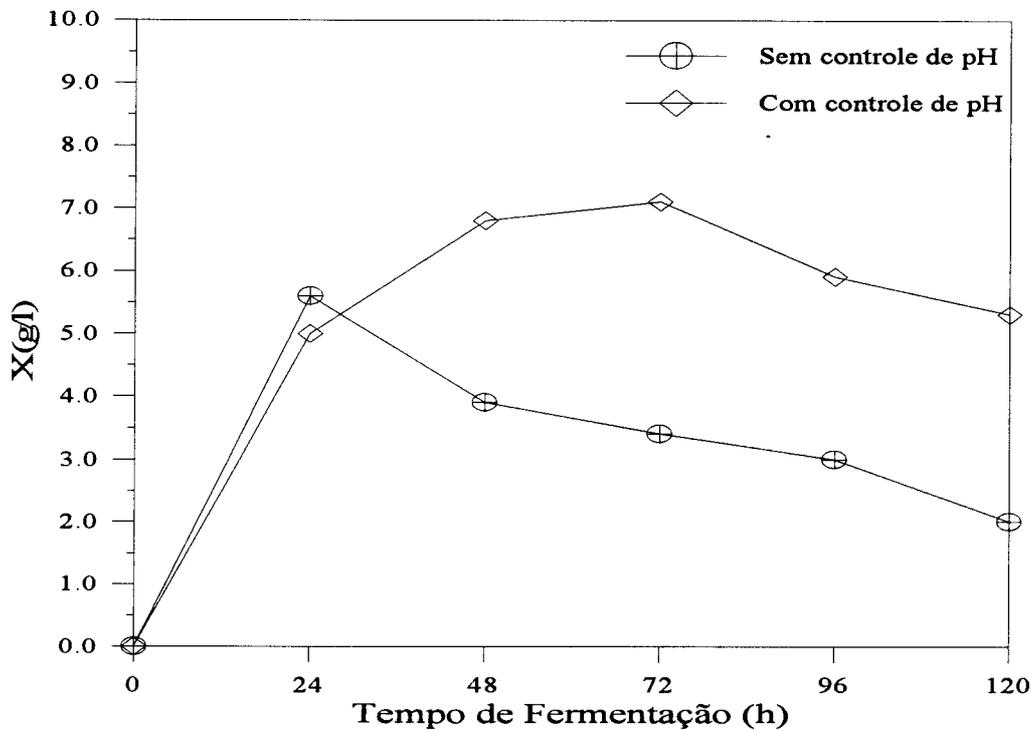
**FIGURA 5.15** - Atividade do Bioemulsificante na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 3%, pH inicial 5,00 com e sem controle.



**FIGURA 5.16** - Atividade do Bioemulsificante na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 5%, pH inicial 5,00 com e sem controle.



**FIGURA 5.17** - Produção de Massa Celular Seca na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 3%, pH inicial 5,00 com e sem controle.



**FIGURA 5.18** - Produção de Massa Celular Seca na Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica* em Fermentador. Concentração de substrato de 5%, pH inicial 5,00 com e sem controle.

### 5.3 - Cálculo dos Parâmetros Cinéticos

Os valores obtidos são mostrados na Tabela 5.8. Os resultados da taxa específica de crescimento máximo ( $\mu_{\text{máx}} = 0,14 \text{ h}^{-1}$  e  $\mu_{\text{máx}} = 0,09 \text{ h}^{-1}$ ), para concentrações de óleo-diesel de 3% e 5 % respectivamente, a primeira vista parecem baixos, mas estão em concordância com aqueles descritos na literatura para este tipo de fermentação. MOO-YOUNG et al.(1971), obtiveram valores de taxa específica de crescimento variando de 0,06 a 0,18  $\text{h}^{-1}$  quando trabalharam com *Candida lipolytica* degradando n-dodecano em fermentação em batelada. FERRER & ERICKSON (1980), também trabalhando com fermentação em batelada de *Candida lipolytica* em n-hexadecano, obtiveram como valor  $\mu_{\text{máx}} = 0,168 \text{ h}^{-1}$ . Finalmente, SADIR (1972), conseguiu obter  $\mu_{\text{máx}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$  fermentando querosene com *Candida lipolytica*. O valor de taxa específica de crescimento para concentração de substrato de 5% foi inferior ao observado para concentração de 3%. Novamente há uma concordância com os resultados obtidos com relação ao rendimento celular, demonstrando que o teor de óleo-diesel de 5%, atuou como inibidor do crescimento celular.

**TABELA 5.8** - Taxa Específica de Crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e Rendimento ( $Y_{\text{X/S}}$ ), para concentrações de substrato de 3% e 5%, em Fermentação de Óleo-Diesel Comercial por *Saccharomyces lipolytica*.

FERMENTAÇÕES	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$Y_{\text{X/SG}}$	$Y_{\text{X/SP}}$
Concentração de Substrato de 3%	0,14	0,190	0,848
Concentração de Substrato de 5%	0,09	0,131	0,582

As constantes de rendimento médio em relação a concentração inicial de óleo-diesel ( $Y_{\text{X/SG}}$ ), apresentaram valores inferiores aqueles reportados na literatura, porém razoáveis, quando se leva em consideração o tipo de substrato empregado. SADIR (1972), obteve um valor de  $Y_{\text{X/SG}} = 0,66$ , mas utilizou um substrato de melhor degradabilidade (querosene). Já os valores obtidos para as concentrações de rendimento médio em relação ao teor inicial de parafinas ( $Y_{\text{X/SP}}$ ), mostraram-se melhores, revelando a maior aptidão dos microrganismos em consumir

frações mais facilmente degradáveis, como as parafinas. SADIR (1972), obteve novamente um valor melhor ( $Y_{x/sp} = 0,86$ ), porém o querosene por ele usado continha um teor de parafinas de 76% (v/v), muito maior quando comparado ao óleo-diesel.

O aumento na concentração de substrato de 3% para 5%, provocou uma queda nos valores de rendimento obtidos, comprovando a inibição pelo substrato no microrganismo.

## 6 - CONCLUSÕES

O óleo-diesel comercial usado como substrato, um complexo produto da refinação de petróleo, apesar da degradabilidade seletiva e de não produzir resultados semelhantes aos hidrocarbonetos mais simples, demonstrou que pode ser degradado pela levedura *Saccharomyces lipolytica*, podendo produzir quantidades razoáveis de bioemulsificante e de biomassa com alto teor protéico.

Os resultados obtidos, demonstraram a existência de um valor de pH (pH 5,00), que permitiu obter os maiores valores de atividade de bioemulsificante e de produção de biomassa.

Os meios de cultura contendo cloreto de amônio como fonte nitrogenada, mostraram ser mais eficientes na produção do bioemulsificante e da massa celular, do que o meio que continha sulfato de amônio.

Os experimentos conduzidos no fermentador de bancada produziram resultados superiores aqueles obtidos nos frascos agitados. A atividade do bioemulsificante melhorou em até 16%, e o rendimento celular apresentou valores até 29% superiores aos dos erlenmeyers. Além disso, houve uma redução considerável no tempo total de fermentação.

A concentração de substrato que produziu os maiores rendimentos celulares foi de 3% v/v, enquanto que as maiores atividades do bioemulsificante e as maiores taxas de degradação do óleo-diesel foram conseguidas com uma concentração de 5% v/v.

O rendimento médio em relação a concentração inicial de óleo-diesel ( $Y_{X/Sg}$ ) e o rendimento médio em relação a concentração inicial de parafinas ( $Y_{X/Sp}$ ), apresentaram valores inferiores em relação aos apresentados na literatura. Esse comportamento justifica-se em função de o substrato utilizado ser de difícil degradação.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS,R.M.Microorganisms and Petroleum Pollutants.Bioscience,28 (6): 387-391,1978.

BELLO,J.,LARRALDE,J.,VILLANUEVA,R.Contribucion al estudio de la digestibilidad proteica de las leveduras alimenticias: *Sacchareomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*.Anal.Bromatol., 25, (2): 197-214,1973.

BELSKY,I.,GUTNICK,D.L.,ROSENBERG,E.Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1:determination of emulsifier-bound fatty acids.Febs.Lett., 101 (1): 175-178,1979.

BIRCKENSTAEDT,J.W.,FAUST,U.,SAMBETH,W.Production of SCP from n-paraffin - Process and products.Process Biochem., 12 (9): 7-10,1977.

BLANCH,H.W. & EINSELE,A.The kinetics of yeast growth on pure hydrocarbon.Biotechnol.Bioeng., 15 : 861-877,1973.

BULLER,M.& SCHINDLER,J.S.Aliphatic hydrocarbons.in:KIESLICH,K.Biotransformations. Flórida:Deersfield Beach,1984.v.6a,c.9,p.329-385.

CIRIGLIANO,M.C. & CARMAN,G.M.Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*.Appl.Environ.Microbiol.,48 (4): 747-750,1984.

CIRIGLIANO,M.C. & CARMAN,G.M.Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*.Appl.Environ.Microbiol.,50 (4): 846-850,1985.

COLWELL,R.R. & WALKER,J.D.Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environmental.CRC.Crit.Rev.Microbiol.,5 (4): 423-445,1977.

- CONCONE,B.R.V.,HISS,H.,PILAR,M.D.,PAZ,G.,PATRICIO,C.G., BORZANI,W.  
Measurement of yeasts concentrations in liquid hydrocarbon fermentations:influence of experimental conditions and statistical significance of the results obtained.Biotech.Bioeng.,14: 609-615,1972.
- FERRER,A. & ERICKSON,L.E.Data consistency,yeld,maintenance,and histeresis in batch cultures of *Candida lipolytica* cultured on n-hexadecane.Biotech.Bioeng.,22 :421-450,1980.
- FOGHT,J.M.,GUTNICK,D.L. ,WESTLAKE,D.W.S.Effect of emulsan on Biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures.Appl.Environ.Microbiol.,55 (1): 36-42,1989.
- GERSON,D.F. & ZAJIC,J.E.Microbial surfactants.Process.Biochem.,14 (7): 20-22,29,1979.
- GOLDMAN,S.,SHABTAI,Y.,RUBINOVITZ,C.,ROSENBERG,E.,GUTNICK,D.L. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1:distribution of cell- free and cell-associated cross-reacting material.Appl.Environ.Microbiol.,44 (1): 165-170,1982.
- GOMA,G.,PAREILLEUX,A., DURAND,G.Specific hidrocarbon solubilization during growth *Candida lipolytica*.J.Ferment.Technol.,51 (8): 616-618,1973.
- GOMA,G.,PAREILLEUX,A., DURAND,G.Aspests physico-chimiques de l'assimilation des hydrocarbures par *Candida lipolytica*.Agr.Biol.Chem.,38 (7): 1273-1280,1974.
- GORNALL,A.G.,BARDAWILL,C.J.,DAVID,M.M.Determiation of serum protein by means of the biuret reaction.J.Biol.Chem.,177: 751-766,1949.
- GUTIERREZ,J.R. & ERICKSON,L.E.Hidrocarbon uptake in hidrocarbon fermentations.Biotechnol.Bioeng.,19: 1331-1349,1977.
- GUTIERREZ,J.R. & ERICKSON,L.E.Continuous culture of *Candida lipolytica* on n-hexadecane.Biotechnol.Bioeng.,20: 1833-1848,1978.
- GUTNICK,D.L. & ROSENBERG,E.Oil tankers and pollution:a microbiological approach.Annu.Rev.Microbiol.,31: 379-396,1977.

- HARVEY, S., ELASHVILI, I., VALDES, J. J., KAMELY, D., CHAKRABARTY, A. M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. Biotechnology, **8** (3): 228-230, 1990.
- JOHNSON, V., SINGH, M., SAINI, V. S., ADHIKARI, D. K., SISTA, V., YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. Biotechnol. Lett., **14** (6): 487-490, 1992.
- KNECHT, R., PRAVE, P., SEIPENBUSH, R., SUKATSCH, D. A. Microbiology and biotechnology of SCP produced from n-paraffin. Process Biochem., **12** (4): 11-14, 1977.
- MOO-YOUNG, M., SHIMIZU, T., WITHWORTH, D. A. Hydrocarbon fermentations using *Candida lipolytica*. I. Basic growth parameters for batch and continuous culture conditions. Biotechnol. Bioeng., **13**: 741-760, 1971.
- MOO-YOUNG, M., SHIMIZU, T. Hydrocarbon fermentations using *Candida lipolytica*. II. A model for cell growth kinetics. Biotechnol. Bioeng., **13**: 761-778, 1971.
- MOO-YOUNG, M. Economics of SCP production. Process Biochem., **12** (4): 6-10, 1977.
- OLSEN, J. & ALLERMANN, K. Microbial biomass as a protein source. in: BULLOCK, J. & CRISTIANSEN, B. Basic Biotechnology London: Academic Press, 1987, p. 285-308.
- PALEJWALA, S. & DESAI, J. D. Production of an extracellular emulsifier by a gram negative bacterium. Biotechnol. Lett., **11** (2): 115-118, 1989.
- PFAMMATTER, N., HOCKKOPPLER, A., LUISI, P. L. Solubilization and growth of *Candida pseudotropicalis* in water-in-oil microemulsions. Biotechnol. Bioeng., **40** (1): 167-172, 1992.
- PINES, O. & GUTNICK, D. Role for emulsan in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* strains. Appl. Environm. Microbiol., **51** (3): 661-663, 1986.
- PROKOP, A., ERICKSON, L. E., PAREDES-LOPES, O. Growth models of cultures with two liquids phases. V. Substrate dissolved in dispersed phase-experimental observations. Biotechnol. Bioeng., **13**: 241-256, 1971.

- PROKOP,A. & ERICKSON,L.E.Growth models of cultures with two liquids phases.VII.Substrate dissolved in dispersed phase;effect of dispersed phase volume and temperature.Biotechnol.Bioeng.,14: 571-586,1972.
- RAMBELOARISOA,E.,RONTANI,J.F.,GIUSTI,G.,DUVNJAK,Z.,BERTRAND,J.C.Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams.Mar.Biol.,83 (1): 69-81,1984.
- ROSENBERG,E.,ZUCKERBERG,A.,RUBINOVITZ,C., GUTNICK,D.L.Emulsifier of *Arthrobacter*RAG1:Isolation and emulsifying properties.Appl.Environm.Microbiol.,37, (3): 402-408,1979a.
- ROSENBERG,E.,PERRY,A.,GIBSON,D.T., GUTNICK,D.L.Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1:Specificity of hydrocarbon substrate.Appl.Environm.Microbiol.,37 (3): 409-413,1979b.
- 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 Livre-Docência.Faculdade de Tecnologia de Alimentos.Campinas,1972.
- SAR,N. & ROSENBERG,E.Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains.Curr.Microbiol.,9 (6): 309-314,1983.
- SHABTAI,Y. & GUTNICK,D.L.Tolerance of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide:Role of the bioemulsifier emulsan.Appl.Environm.Microbiol.,44 (1): 165-170,1985.
- SINGH,M. & DESAI,J.D.Hydrocarbon emulsifying activity of bacterial strins:Potencial of *Arthrobacter paraffineus*.Curr.Sci.,57 (23): 1307-1308,1988.
- 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.,BARNET,S.M.,HOUSTON,C.W.,THOMPSON,A.R.Microbial growth on hydrocarbons-some experimental results.Biotechnol.Bioeng.,17 (2): 241-251,1975.

WALKER,J.D.,AUSTIN,H.F., COLWELL,R.R.Utilization of mixed hydrocarbon substrate by petroleum-degrading microorganisms.J.Gen.Appl.Microbiol.,21 (1): 27-39,1975.

WILKINSON,M.A. & COOPER,D.G.Testing of microbial demulsifiers with heavy crude emulsions.Biotechnol.Lett.,7 (6): 406-408,1985.

YOSHIDA,F. & YAMANE,T.Continuous hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed.A kinetic model for two-liquid phases culture.Biotechnol.Bioeng.,16: 635-657,1974.

YOSHIDA,F. & YAMANE,T.,YAGI,H.Mechanisms of uptake of liquid hidrocarbons by microorganisms.Biotechnol.Bioeng.,13: 215-228,1971

YOSHIDA,F.,YAMANE,T.,NAKAMOTO,K.Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed.Biotechnol.Bioeng.,15: 257-270,1973.

ZOBELL,C.E.Action of microorganisms on hydrocarbons.Bacteriol.Rev.,10: 1-49,1946.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### TABELA A1

FERMENTAÇÃO 1-Frascos Agitados                      pH 5,00  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%                      MEIO DE CULTURA 1

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,93	0,45	5,54
48	0,28	0,62	5,11
72	0,61	0,55	5,17
96	0,47	0,76	5,27
120	0,39	0,85	5,43

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

### TABELA A2

FERMENTAÇÃO 2-Frascos Agitados                      pH 5,00  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%                      MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,91	0,48	5,48
48	0,47	0,58	5,05
72	0,76	0,60	5,10
96	0,32	0,72	5,20
120	0,40	0,96	5,17

OBS : Valores médios de análises em duplicata

### TABELA A3

FERMENTAÇÃO 3-Frascos Agitados                      pH 5,00  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%                      MEIO DE CULTURA 3

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,50	0,51	5,55
48	0,25	0,55	5,27
72	0,40	0,57	5,11
96	0,60	0,74	5,21
120	0,41	0,98	5,38

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A4**

FERMENTAÇÃO 4-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 4,50  
 MEIO DE CULTURA 1

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,50
24	0,47	0,35	5,84
48	0,42	0,40	4,46
72	0,22	0,45	4,48
96	0,26	0,48	4,65
120	0,27	0,46	4,75

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A5**

FERMENTAÇÃO 5-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 4,50  
 MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,50
24	0,92	0,35	5,40
48	0,44	0,38	4,56
72	0,32	0,46	4,40
96	0,21	0,53	4,80
120	0,32	0,50	4,91

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A6**

FERMENTAÇÃO 6-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 4,50  
 MEIO DE CULTURA 3

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,50
24	0,90	0,39	5,16
48	0,33	0,48	4,22
72	0,21	0,52	4,45
96	0,20	0,60	4,72
120	0,26	0,57	4,73

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A7**

FERMENTAÇÃO 7-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 4,00  
 MEIO DE CULTURA 1

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,00
24	0,45	0,32	4,46
48	0,52	0,34	3,77
72	0,19	0,37	3,67
96	0,15	0,31	3,98
120	0,05	0,30	4,21

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A8**

FERMENTAÇÃO 8-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 4,00  
 MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,00
24	0,35	0,34	4,66
48	0,40	0,45	3,49
72	0,35	0,48	3,57
96	0,31	0,39	3,98
120	0,34	0,35	4,10

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A9**

FERMENTAÇÃO 9-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 4,00  
 MEIO DE CULTURA 3

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,00
24	0,43	0,33	4,38
48	0,50	0,42	3,53
72	0,43	0,50	3,51
96	0,31	0,39	3,94
120	0,34	0,38	4,10

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A10**

FERMENTAÇÃO 10-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 5,00  
 MEIO DE CULTURA 1

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,60	0,31	4,88
48	0,44	0,48	3,90
72	0,36	0,49	4,04
96	0,31	0,53	4,11
120	0,40	0,52	4,12

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A11**

FERMENTAÇÃO 11-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 5,00  
 MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,47	0,27	4,99
48	0,40	0,43	3,64
72	0,35	0,47	4,00
96	0,28	0,57	3,71
120	0,42	0,52	3,91

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A12**

FERMENTAÇÃO 12-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 5,00  
 MEIO DE CULTURA 3

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,42	0,25	4,99
48	0,36	0,46	4,03
72	0,31	0,57	3,53
96	0,25	0,58	3,99
120	0,28	0,50	4,08

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A13**

FERMENTAÇÃO 13-Frascos Agitados  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 4,50  
MEIO DE CULTURA 1

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,50
24	0,45	0,28	4,65
48	0,36	0,38	3,53
72	0,37	0,50	3,55
96	0,16	0,51	3,40
120	0,28	0,49	3,39

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A14**

FERMENTAÇÃO 14-Frascos Agitados  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 4,50  
MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,50
24	0,46	0,26	4,61
48	0,31	0,45	3,56
72	0,23	0,57	3,38
96	0,30	0,54	3,31
120	0,60	0,48	3,43

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A15**

FERMENTAÇÃO 15-Frascos Agitados  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 4,50  
MEIO DE CULTURA 3

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,50
24	0,37	0,24	4,58
48	0,33	0,41	3,52
72	0,32	0,44	3,19
96	0,37	0,55	3,15
120	0,27	0,51	3,37

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A16**

FERMENTAÇÃO 16-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 4,00  
 MEIO DE CULTURA 1

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,00
24	0,31	0,24	4,37
48	0,30	0,47	3,41
72	0,28	0,48	3,31
96	0,23	0,50	3,30
120	0,11	0,45	3,37

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A17**

FERMENTAÇÃO 17-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 4,00  
 MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,00
24	0,35	0,30	4,34
48	0,32	0,51	3,36
72	0,34	0,55	3,09
96	0,14	0,58	3,13
120	0,13	0,49	3,25

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A18**

FERMENTAÇÃO 18-Frascos Agitados  
 CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 4,00  
 MEIO DE CULTURA 3

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	4,00
24	0,30	0,29	4,31
48	0,33	0,43	3,28
72	0,29	0,48	3,08
96	0,14	0,53	3,10
120	0,26	0,48	3,24

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A19**

FERMENTAÇÃO 19-Fermentador de Bancada  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 5,00 (sem controle)  
MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,58	0,77	4,23
48	0,47	0,85	4,05
72	0,72	0,68	4,04
96	0,49	0,62	4,20
120	0,59	0,54	4,60

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A20**

FERMENTAÇÃO 20-Fermentador de Bancada  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 5,00 (sem controle)  
MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,90	0,97	3,70
48	1,10	0,68	3,33
72	0,84	0,60	3,21
96	0,53	0,54	3,40
120	0,52	0,37	3,66

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A21**

FERMENTAÇÃO 21-Fermentador de Bancada  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 3%

pH 5,00 (com controle)  
MEIO DE CULTURA 2

TEMPO (horas)	ANÁLISES		
	ATIV. BIOEMULSIF.	DENSIDADE ÓTICA	pH
0	0,00	0,00	5,00
24	0,64	0,90	5,00
48	0,62	1,20	5,00
72	0,39	1,35	5,00
96	0,50	1,20	5,00
120	0,61	0,56	5,00

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

**TABELA A22**

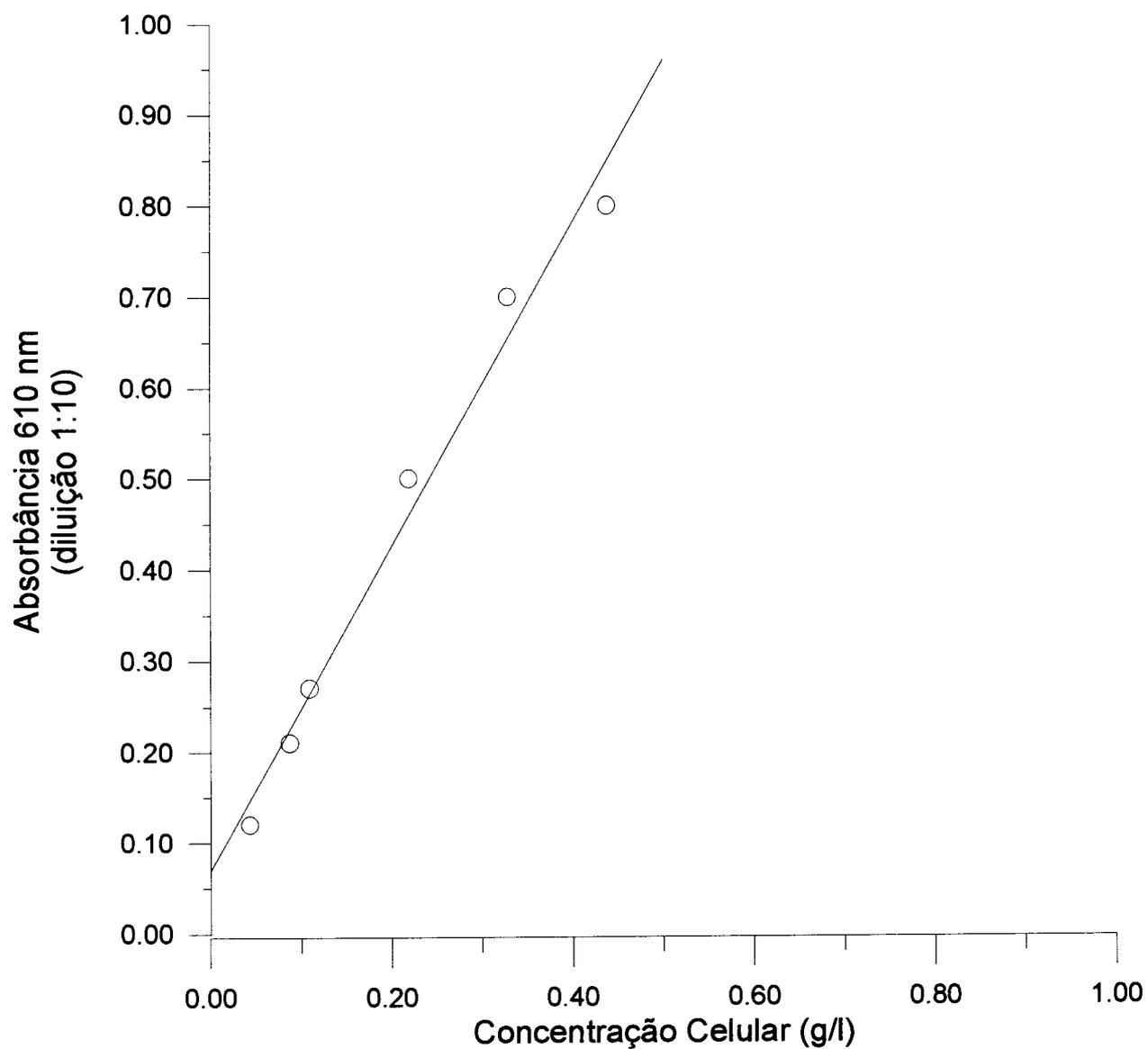
FERMENTAÇÃO 22-Fermentador de Bancada  
CONCENTRAÇÃO DE ÓLEO-DIESEL 5%

pH 5,00 (com controle)  
MEIO DE CULTURA 2

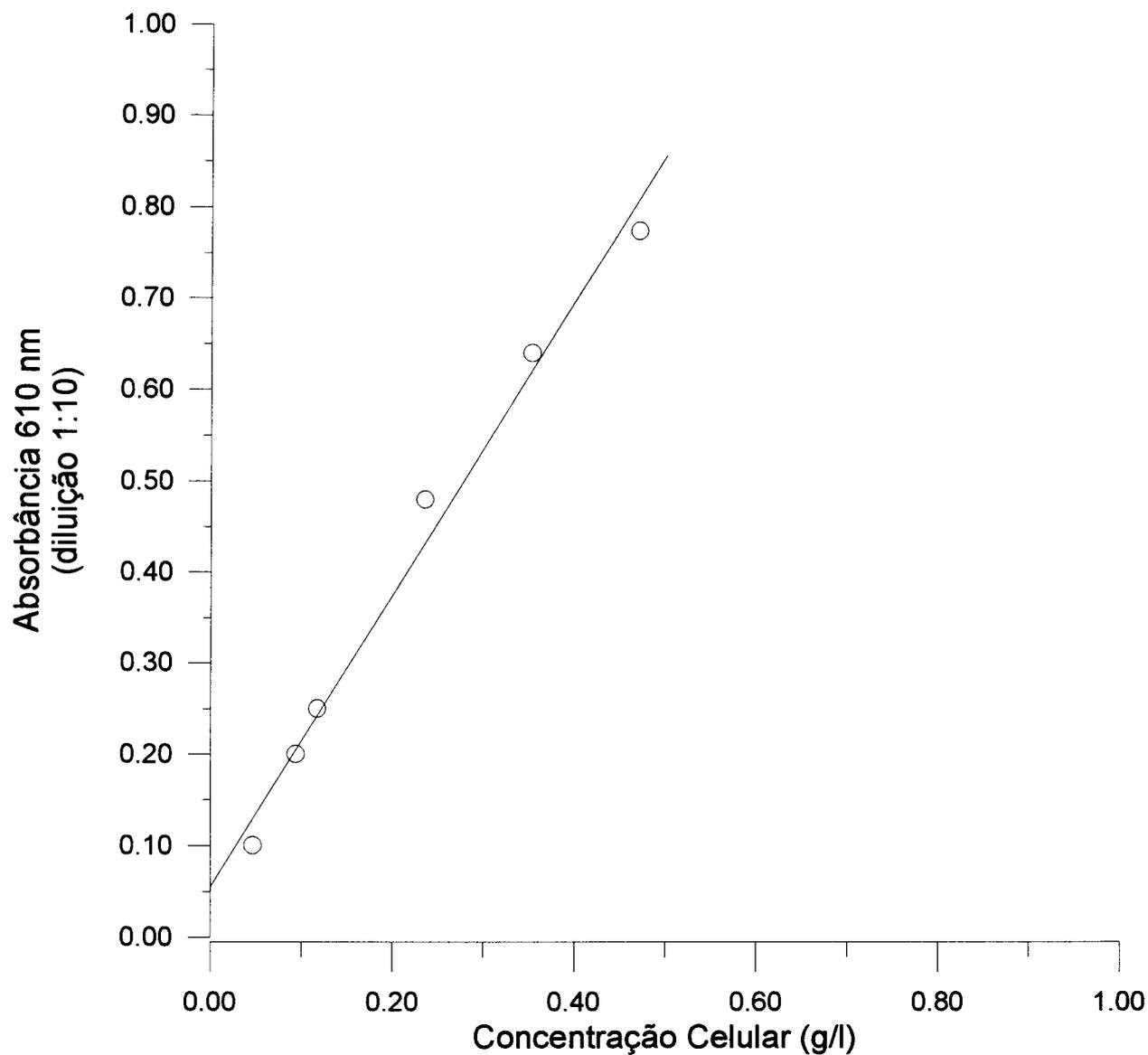
<b>TEMPO (horas)</b>	<b>ANÁLISES</b>		
	<b>ATIV. BIOEMULSIF.</b>	<b>DENSIDADE ÓTICA</b>	<b>pH</b>
0	0,00	0,00	5,00
24	0,68	0,86	5,00
48	0,70	1,15	5,00
72	0,80	1,20	5,00
96	0,56	1,00	5,00
120	0,83	0,90	5,00

OBS : Valores médios de análises em duplicata. Densidade Ótica (1:10)

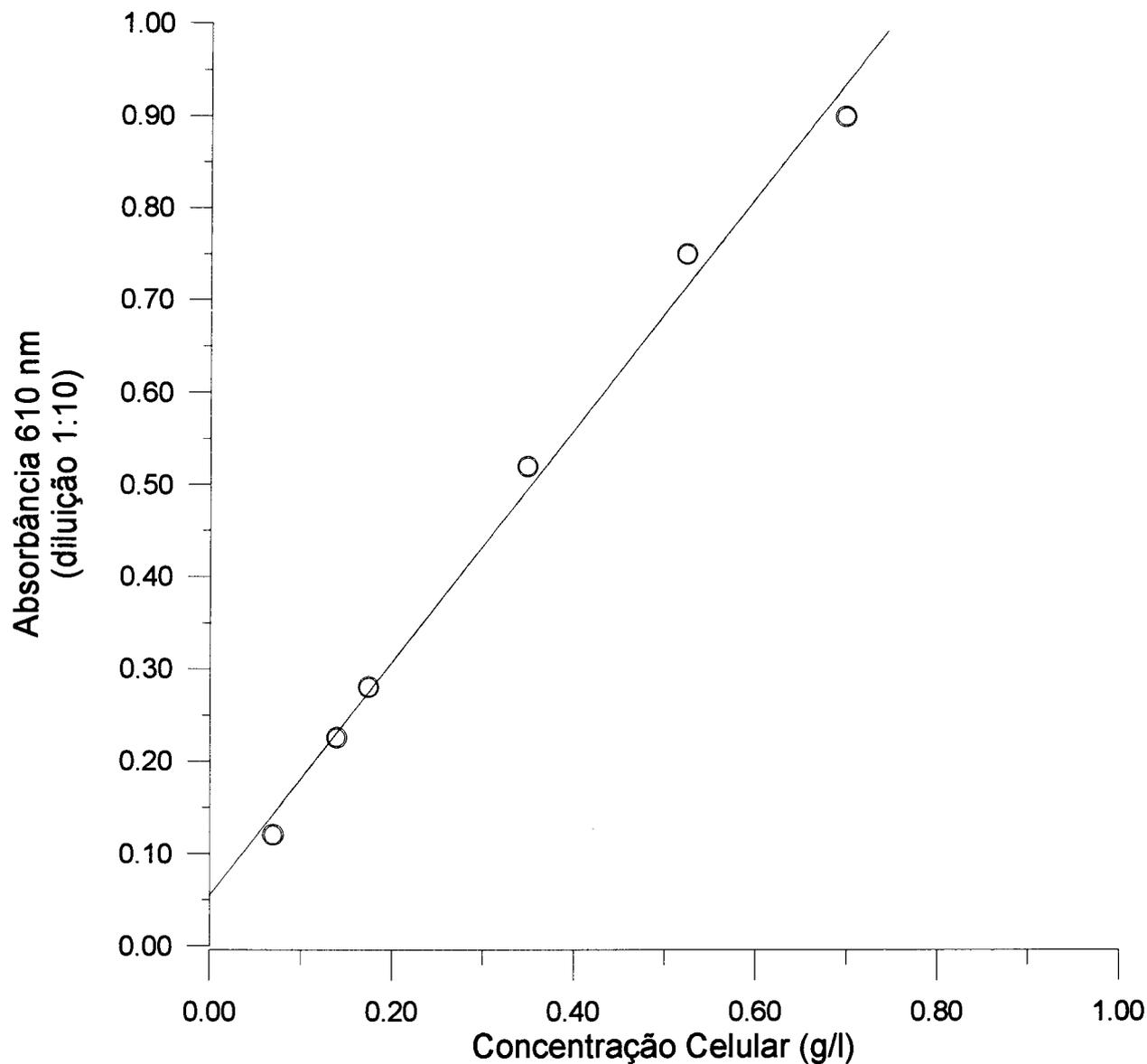
## APÊNDICE B



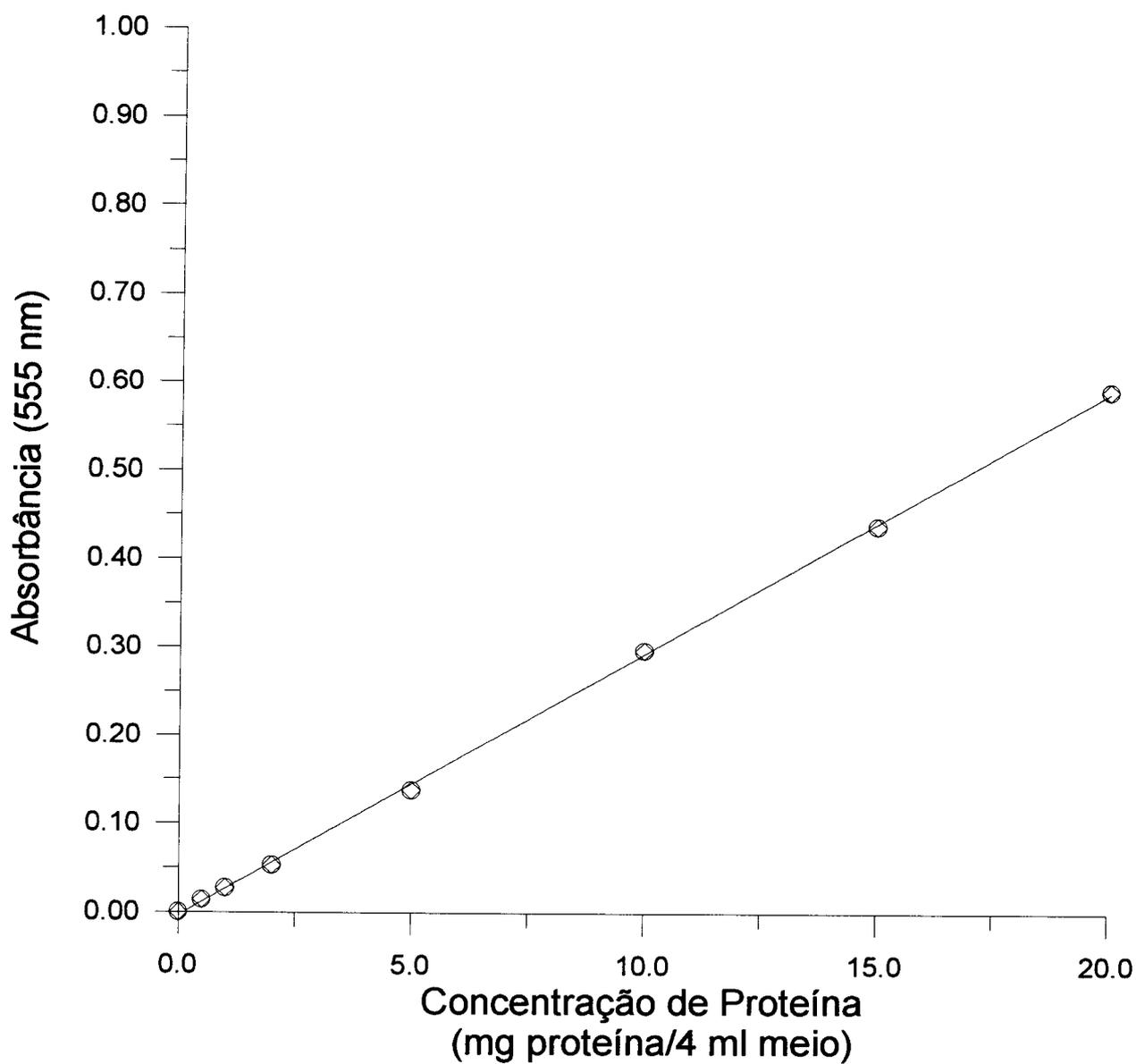
**FIGURA B1** - Absorbância em função da Concentração Celular (meio de cultura 1)  
Equação de Ajuste -  $Abs. = 1,78321 \cdot Conc. Cel. + 0,0686792$   
Coeficiente de Correlação (R) = 0,990617



**FIGURA B2-** Absorbância em função da Concentração Celular (meio de cultura 2)  
Equação de Ajuste - Abs. = 1,603484.Conc.Cel.+ 0,0554245  
Coeficiente de Correlação (R) = 0,993197



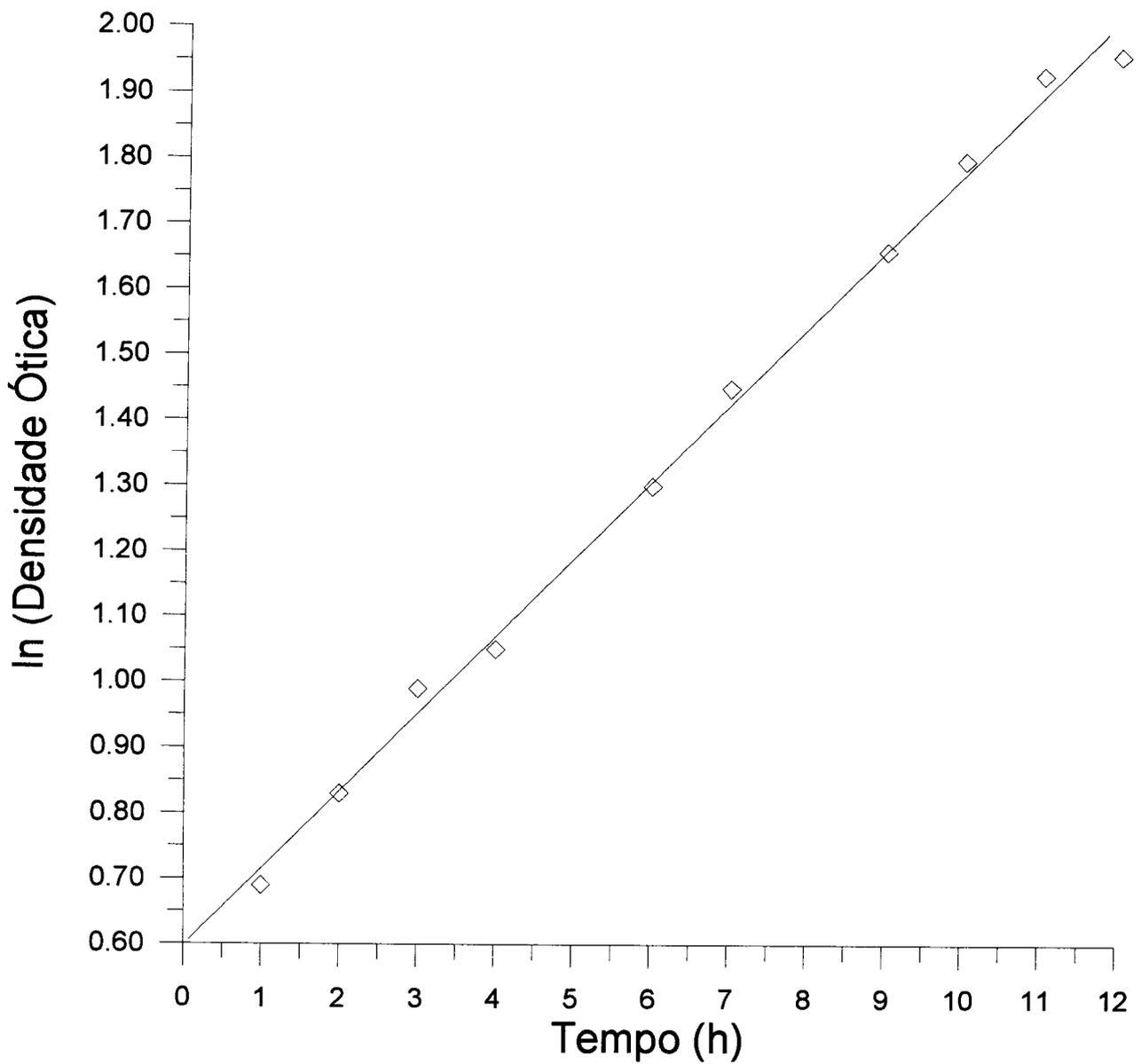
**FIGURA B3-** Absorbância em função da Concentração Celular (meio de cultura 3)  
Equação de Ajuste - Abs. = 1,26314.Conc.Cel.+ 0,0543868  
Coeficiente de Correlação (R) = 0,996211



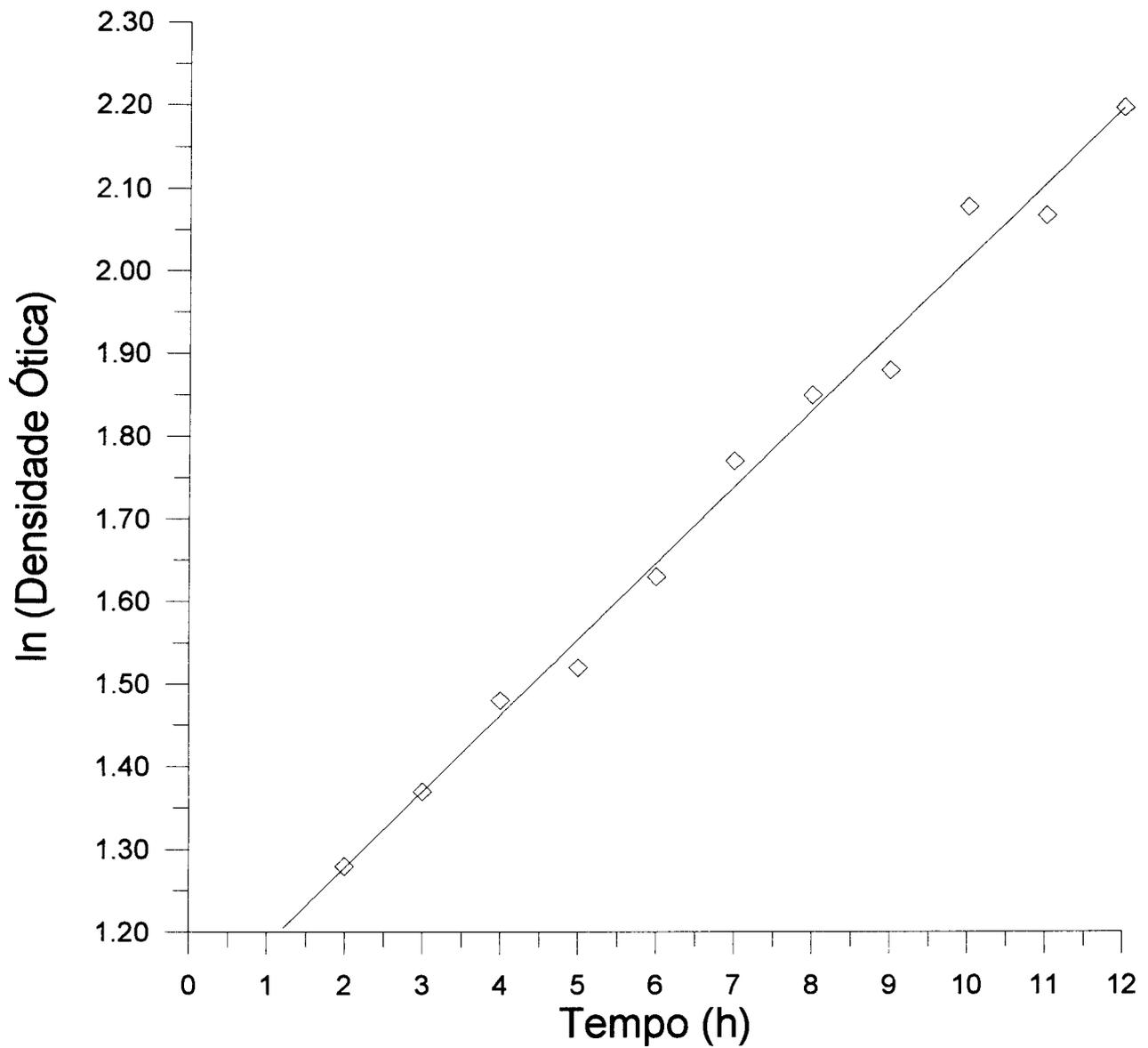
**FIGURA B4** - Absorbância em função da Concentração de Proteína.

Equação de Ajuste - Abs. = 0,0296481.Concent.Prot. - 0,00339657

Coefficiente de Correlação (R) = 0,9999



**FIGURA B5** - Cálculo do  $\mu$ : ln (Densidade Ótica) em Função do Tempo  
(Meio 2, Concentração de Substrato de 3%, pH 5,00)  
Equação de Ajuste -  $Y = 0,118195.X + 0,597733$   
Coeficiente de Correlação (R) - 0,998



**FIGURA B6** - Cálculo do  $\mu$ : ln (Densidade Ótica) em Função do Tempo  
(Meio 2, Concentração de Substrato de 5%, pH 5,00)  
Equação de Ajuste -  $Y = 0,0921818.X + 1,09282$   
Coeficiente de Correlação (R) - 0,995