

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DOS ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS NA PRODUÇÃO DE  
GLUTATIONA POR *Saccharomyces cerevisiae* EM BIORREATOR “AIR-  
LIFT” PRESSURIZADO**

**INGRID DA MATA GONÇALVES**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS NA PRODUÇÃO DE  
GLUTATIONA POR *Saccharomyces cerevisiae* EM BIORREATOR “AIR-  
LIFT” PRESSURIZADO**

**INGRID DA MATA GONÇALVES**

*Sob a orientação da*  
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucielen Oliveira dos Santos**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de Grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Engenharia de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

660.28443

G635i

T

Gonçalves, Ingrid da Mata, 1980-  
Influência de campos magnéticos na  
produção de glutathione por *Saccharomyces*  
*cerevisiae* em biorreator "Air-lift"  
pressurizado / Ingrid da Mata Gonçalves -  
2012.

86 f.: il.

Orientador: Lucielen Oliveira dos Santos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Bibliografia: f. 59-70.

1. Antioxidantes - Teses. 2. Glutathione  
- Teses. 3. *Saccharomyces cerevisiae* -  
Teses. 4. Campos magnéticos - Teses.  
I. Santos, Lucielen Oliveira dos, 1977-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**INGRID DA MATA GONÇALVES**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2012.

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Lucielen Oliveira dos Santos  
(Orientadora)

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Mônica Camarez Trichez Damaso  
(MEMBRO INTERNO)

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Janine Passos Lima da Silva  
(MEMBRO EXTERNO)

“Certa vez, um homem estava tentando descobrir meios de como fazer acender seu experimento. Na 2000ª tentativa, finalmente ele conseguiu. Ao observar este homem, um rapaz o perguntou qual o sentido de uma invenção que levou a inúmeras derrotas. O homem respondeu prontamente dizendo que a luz é algo tão sublime, tão especial, tão maravilhosa, que ele levou 1999 passos para chegar até ela.”

Thomas Edson, o inventor da lâmpada.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar nos sonhos que se têm, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém. Confie em si mesmo. Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo.

Dedico e divido esta conquista com papai *in Memorian* e a mamãe por nunca terem medido esforços para me criar. Aos meus irmãos Lincoln e Leonardo, pela certeza que tenho de sempre poder contar com vocês. Família, um projeto de Deus.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao Senhor Deus, por suas promessas cumpridas em minha vida. Continuarei anunciando Teu nome por onde passar. Louvores.

Agradeço a papai por mais esta conquista. Infelizmente ele nos deixou deste plano terreno, mas não deixei de seguir seu legado de força, luta e determinação. Saudades.

À mamãe que não mediu esforços pra que eu conseguisse chegar até o fim. Sempre me fazendo sentir segura e me ouvindo pacientemente. Amor incondicional.

Aos meus irmãos Lincoln pelo dom de escrever e Leonardo pelo dom da pesquisa. Continuemos adiante neste caminho. Exemplos.

À minha orientadora Lucielen pela paciência em me ajudar nas dificuldades, questionamentos e por sempre “apertar as rédeas” no ensino. Percebo que está dando seu “sangue” pelo curso. Que bom que existem pessoas verdadeiramente comprometidas com o trabalho. A universidade precisa disso. Admiração.

Ao Wilson Júnior pela inteligência e criatividade, sendo meu braço direito durante a primeira fase deste trabalho. Além de me tirar muitas gargalhadas. Amizade.

À Flor de Jasmim, Juliane pela ajuda, comprometimento, conselhos, maturidade e serenidade em todas as etapas deste trabalho e em minha vida pessoal. Presente.

Aos técnicos Edlene, Daniel e Cristiane pela grande ajuda pelos auxílios no laboratório em tudo que precisasse. A companhia e bate papos com vocês foi essencial para mim. Profissionalismo.

Ao professor Rômulo pelas conversas sobre questões espirituais e comportamento humano que me fazem refletir até hoje... Minhas intuições continuam. Deus tem algo maravilhoso direcionado a você! Obrigada por ter me motivado para a sala de aula. Gratidão.

Ao Engenheiro Mecânico Luís por estar sempre pronto em me auxiliar quando alguma coisa não estava funcionando corretamente no reator. Sempre com seu bom humor e inteligência nunca permitiu que eu desanimasse. Generosidade.

Às meninas do F4 205 (Aline, Bianca, Carlota, Ingrid, Isabela, Jennifer, Melissa, Karine e Rízia), pela amizade, carinho, diálogos pelo quarto e por me amparar durante toda a fase do mestrado que passei trabalhando noite sim, noite não. E até mesmo quando fui contemplada com a bolsa. Foi maravilhoso “ruralizar” com vocês durante esses dois anos. Obrigada por tudo, podem contar comigo, para o que precisarem. Diamantes.

Aos amigos que conheci no mestrado: Regiane Ribeiro, Felipe Trombete e Renata Rocha pela amizade ao longo do tempo e por dividir todas as aflições e limitações de cada, um ajudando ao outro. Nossa amizade não se findará por aqui, podem ter certeza. Obrigada por tudo. Companheirismo.

Aos irmãos da igreja: Iata e Roberta pelas orações e palavras de incentivo. Carinho.

À equipe do MEPES/ALFREDO-CHAVES/ES que permitiu todas as minhas saídas para o RJ na fase final de defesa e em tão pouco tempo vocês me fizeram sentir acolhida por todos da equipe. Obrigada pelas palavras de incentivo. Tesouros.

Aos amigos do peito Alice Melo, Bruno Duarte, Dani Xavier, Frank Machado, Silas Nunes, Silvio Jacinto e Vagner Lopes, por compreenderem minha ausência pacientemente durante esses dois anos e por acreditar em mim. Esteio.

A Capes e à FAPERJ pelos recursos financeiros.

**MUITO OBRIGADA A TODOS!**

## RESUMO

GONÇALVES, Ingrid da Mata. **INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS NA PRODUÇÃO DE GLUTATIONA POR *Saccharomyces cerevisiae* EM BIORREATOR “AIR-LIFT” PRESSURIZADO.** 2012. 84p. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ – 2012.

## RESUMO

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo hidrossolúvel composto por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. É o mais eficiente antioxidante intracelular presente em todos os sistemas biológicos (animais e vegetais). Atualmente, relatam-se inúmeras aplicações da GSH nas indústrias em diferentes segmentos, sendo eles: nas indústrias de alimentos como aditivo alimentar; no campo farmacêutico; no segmento desportivo como suplemento alimentar e ainda no tratamento de efluentes industriais, pois tem a capacidade de adsorver metais pesados. A aplicação de campos magnéticos (CM) em processos fermentativos pode causar efeitos estimulantes ou inibitórios, porém ainda é pouco reportada na literatura. Desta forma o principal objetivo deste trabalho foi estudar a influência de CM na produção de glutathione em reator “air-lift” pressurizado, o micro-organismo utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754. Durante as fermentações foi feito o acompanhamento do pH, concentração celular (g/L), GSH (mg/L) e glicose (g/L). Na primeira etapa foi estudada apenas a variação da pressão no reator (0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>). As condições das fermentações foram: 20°C, tempo total 96 h e pH<sub>inicial</sub> 5,0. De acordo com os resultados desta etapa, as duas melhores pressões em estudo foram 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>, apresentando 17,25 g/L de concentração celular e 141,30 mg/L de GSH (72 h) e 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, com 13,51 g/L de concentração celular e 178,21 mg/L de GSH (96 h). Na segunda etapa, na qual se aplicou os CM, foi realizado um delineamento fatorial 2<sup>2</sup>, onde foram realizados 7 ensaios, incluindo 3 pontos centrais, nos quais as variáveis independentes testadas foram: pressão (kgf/cm<sup>2</sup>) e velocidade de reciclo celular (cm/s). O nível de significância de 90% (p < 0,1) foi utilizado na análise estatística dos dados de concentração celular e de GSH. De acordo com os resultados desta etapa, o maior resultado quanto ao crescimento celular (7,26 g/L) foi obtido a 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> e reciclo de 15 cm/s após 72 h de fermentação. Em relação a concentração de GSH, o maior resultado foi a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup> e reciclo de 3,0 m/s com 67,24 mg/L a 94 h. A análise estatística mostrou que não houve variáveis significativas em ambas as respostas (concentração celular e GSH). A produção de GSH a partir de *S. cerevisiae* ATCC 7754 em sistema pressurizado apresentou-se como uma tecnologia eficiente e promissora, porém a influência de CM juntamente com a velocidade de reciclo celular, levou a mecanismos que promoveram determinada inibição em sua síntese, levando a diminuição na sua concentração final.

**Palavras-chaves:** antioxidante, biorreator, ímãs, pressão de operação.



GONÇALVES, Ingrid da Mata. **INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS NA PRODUÇÃO DE GLUTATIONA POR *Saccharomyces cerevisiae* EM BIORREATOR “AIR-LIFT” PRESSURIZADO.** 2012. 84p. Dissertation. (Master in Science and Technology of Foods). Institute of Technology. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ – 2012.

### ABSTRACT

Glutathione (GSH) is a tripeptide, soluble in water; it consists of three amino acids: L-glutamate, L-cysteine and glycine. It is the most efficient intracellular antioxidant present in the all biologics systems (animals and vegetables). Currently, it is reported many applications of GSH in different segments, like in food industries as food additive; in the sports segment, in the pharmaceutical field; it is used as food supplement; and is also used in the treatment of industrial effluents due to ability to absorb heavy metals. The application in magnetic fields (MF) inside the fermentative process can cause stimulants or inhibitory effects. However, it is not that reported in the literature. Thus, the main objective of this work is to study the influence of magnetic fields in the production of glutathione in reactor “air-lift” pressurized and the microorganism used was *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754. During the fermentations were analyzed the pH, concentrations of cell (g/L), glucose (g/L) and GSH (mg/L). Firstly, it was evaluated at different pressures (0; 0.25; 0.50; 0.75; 1.00; 1.25 e 1.50 kgf/cm<sup>2</sup>). In this context, conditions fermentation were 20°C, total time of 96 h e pH<sub>initial</sub> 5.0. The results showed that the best two pressures were 1.50 kgf/cm<sup>2</sup>, concentration of cell 17.25 g/L and 141.30 mg/L of GSH (72 h) and 0.50 kgf/cm<sup>2</sup>, with 13.51 g/L concentration of cell and 178.21 mg/L of GSH (96 h). Secondly, was realized experimental factorial design 2<sup>2</sup> with the two best results of pressures obtained in the first step. In the planning seven tests were done including three central points, in which the variables investigated were: pressure and velocity of cell recycling. The percent of variation of 90% (p < 0.1) was used to statistical analysis of results of concentration of cell and GSH. Therefore, according to the results of the second step, the highest concentration of cell (7.26 g/L) was obtained with 1.5 kgf/cm<sup>2</sup> and recycle of 15 cm/s at 72 h of fermentation. In relation to production of GSH, the highest result was 67.24 mg/L at 0.50 kgf/cm<sup>2</sup> and recycle of 3.0 m/s with 67.24 mg/L at 94 h. There was no significant response in both responses to the variables (concentration of cell and GSH), according to the table of estimated effects. The production of GSH by *S. cerevisiae* ATCC 7754 on a pressurized system presented as an efficient and promising technology. However the influence of MF and the velocity of cell recycling led to mechanisms that promoted particular synthesis inhibition leading to a decrease in its final concentration.

**Keywords:** antioxidant, bioreactor, magnetic, pressure of operation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Evolução das pesquisas para a produção de GSH .....	9
<b>Tabela 2:</b> Resultados de diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> para produção de GSH.....	16
<b>Tabela 3:</b> Efeitos dos CM na concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> obtidos por diferentes autores.....	22
<b>Tabela 4:</b> Diferentes respostas às pressões aplicadas no cultivo de diversos micro-organismos.....	25
<b>Tabela 5:</b> Composição do meio para manutenção da cepa em g/L.....	27
<b>Tabela 6:</b> Composição do meio utilizado para a produção de glutatona. ....	27
<b>Tabela 7:</b> Ensaios sem aplicação de campos magnéticos (controle) .....	29
<b>Tabela 8:</b> Matriz do planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).....	29
<b>Tabela 9:</b> Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) nos tempos 72 e 96 h de processo. ....	42
<b>Tabela 10:</b> Porcentagem de GSH nos tempos 24, 48, 72 e 96 h e seus fatores de conversão em 96 h de processo. ....	43
<b>Tabela 11:</b> Resultados da concentração celular nos ensaios controle.....	44
<b>Tabela 12:</b> Resultados da produção de GSH nos ensaios controles. ....	44
<b>Tabela 13:</b> Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) nos tempos 72 e 96 h de processo, nos ensaios com aplicação de CM. ....	51
<b>Tabela 14:</b> Porcentagem de GSH nos tempos 24, 48, 72 e 96 h e seus fatores de conversão a 96 h de processo para os ensaios com aplicação de CM. ....	52
<b>Tabela 15:</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão dos ensaios com aplicação de CM para a resposta concentração celular em 72 h. ....	54
<b>Tabela 16:</b> Coeficiente de regressão e desvio padrão dos ensaios PF para a resposta produção de GSH em 72 h. ....	54
<b>Tabela 17:</b> Porcentagem de diferença de concentração celular (PDC) produzida para os tempos 24, 48, 72 e 96 h no planejamento fatorial com aplicação de CM e sem CM. ....	55
<b>Tabela 18:</b> Porcentagem de diferença da produção de GSH (PDG) entre os ensaios controles (sem CM) e os ensaios realizados no planejamento fatorial com CM para os tempos de 24, 48, 72 e 96 h. ....	56
<b>Tabela 19:</b> Resultados médios das absorbâncias e concentração celular (g/L), referente a curva padrão. ....	71
<b>Tabela 20:</b> Resultados médios das absorbâncias e concentração celular (mg/L), referente a curva padrão da glutatona.....	71
<b>Tabela 21:</b> Resultados no biorreator “air-lift” despressurizado. ....	72
<b>Tabela 22:</b> Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 0,25 kgf/cm <sup>2</sup> .....	72
<b>Tabela 23:</b> Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 0,50 kgf/cm <sup>2</sup> .....	73
<b>Tabela 24:</b> Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 0,75 kgf/cm <sup>2</sup> .....	73
<b>Tabela 25:</b> Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 1,00 kgf/cm <sup>2</sup> .....	74
<b>Tabela 26:</b> Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 1,25 kgf/cm <sup>2</sup> .....	74
<b>Tabela 27:</b> Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 1,50 kgf/cm <sup>2</sup> .....	75
<b>Tabela 28:</b> Resultados obtidos no delineamento fatorial 2 <sup>2</sup> do ensaio 1PF, a pressão de 0,50 kgf/cm <sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 3,0 cm/s, com aplicação de CM. ....	76
<b>Tabela 30:</b> Resultados obtidos no delineamento fatorial 2 <sup>2</sup> do ensaio 3PF, a pressão de 0,50 kgf/cm <sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 15,0 cm/s, com aplicação de CM. ....	77
<b>Tabela 31:</b> Resultados obtidos no delineamento fatorial 2 <sup>2</sup> do ensaio 4PF, a pressão de 1,50 kgf/cm <sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 15,0 cm/s, com aplicação de CM. ....	78

<b>Tabela 32:</b> Resultados obtidos no delineamento fatorial $2^2$ no ensaio 5PF, a pressão de 1,00 kgf/cm <sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 9,0 cm/s, com aplicação de CM. ....	79
<b>Tabela 33:</b> Resultados obtidos no delineamento fatorial $2^2$ no ensaio 6PF, a pressão de 1,00 kgf/cm <sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 9,0 cm/s, com aplicação de CM. ....	80
<b>Tabela 34:</b> Resultados obtidos no delineamento fatorial $2^2$ no ensaio 7PF, a pressão de 1,00 kgf/cm <sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 9,0 cm/s, com aplicação de CM. ....	81
<b>Tabela 35:</b> Ensaio controle a 0,50 kgf/cm <sup>2</sup> , com reciclo celular de 3,0 cm/s e sem aplicação de CM. ....	82
<b>Tabela 36:</b> Ensaio controle a 0,50 kgf/cm <sup>2</sup> , com reciclo celular de 15,0 cm/s e sem aplicação de CM. ....	82
<b>Tabela 37:</b> Ensaio controle com pressão de 1,0 kgf/cm <sup>2</sup> com velocidade de reciclo celular de 9,0 cm/s e sem aplicação de CM. ....	83
<b>Tabela 38:</b> Ensaio controle com pressão de 1,5 kgf/cm <sup>2</sup> com velocidade de reciclo celular de 3,0 cm/s e sem aplicação de CM. ....	84
<b>Tabela 39:</b> Ensaio controle a 1,5 kgf/cm <sup>2</sup> com velocidade de reciclo celular de 15 cm/s, sem aplicação de CM. ....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fórmula estrutural da glutatona.....	4
<b>Figura 2:</b> Esquema geral da biossíntese da glutatona.....	5
<b>Figura 3:</b> Metabolismo da glutatona nas leveduras.....	12
<b>Figura 4:</b> Efeito da pressão na atividade microbiana. A atividade é analisada pela densidade de células expressa em número de células por mililitro (N) e a concentração de células (X), ou pelas taxas de crescimento e reprodução.....	24
<b>Figura 5:</b> Foto do biorreator “air-lift”.....	28
<b>Figura 6:</b> Layout simplificado das fermentações no “air lift” com aplicação de campos magnéticos.....	30
<b>Figura 7:</b> Foto do “air-lift” conectado às mangueiras em conjunto com a bomba peristáltica, passando por entre o par de ímãs nos ensaios com aplicação de campos magnéticos.....	30
<b>Figura 8:</b> Reciclo celular através da bomba peristáltica (0 a 30 rpm) com aplicação de campos magnéticos.....	31
<b>Figura 9:</b> Magnetizador com par de ímãs para geração dos campos magnéticos.....	31
<b>Figura 10:</b> Fermentações no “air-lift” despressurizado, durante 96 h por <i>S. cerevisiae</i> , sem aplicação de CM. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L), (■) e concentração de GSH (mg/L).....	35
<b>Figura 11:</b> Fermentações no “air-lift” a 0,25 kgf/cm <sup>2</sup> , durante 96 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i> , sem aplicação de CM. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	36
<b>Figura 12:</b> Fermentações no “air-lift” a 0,50 kgf/cm <sup>2</sup> , durante 96 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i> , sem aplicação de CM. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	37
<b>Figura 13:</b> Fermentações no “air-lift” a 0,75 kgf/cm <sup>2</sup> , durante 96 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i> , sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	38
<b>Figura 14:</b> Fermentações no “air-lift” a 1,00 kgf/cm <sup>2</sup> , durante 96 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i> , sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	38
<b>Figura 15:</b> Fermentações no “air-lift” a 1,25 kgf/cm <sup>2</sup> , durante 96 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i> , sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	39
<b>Figura 16:</b> Fermentações no “air-lift” a 1,50 kgf/cm <sup>2</sup> , durante 96 h de fermentação por <i>S. cerevisiae</i> , sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	40
<b>Figura 17:</b> Resultados da concentração celular (g/L) obtidos nos ensaios com variação de pressão.....	41
<b>Figura 18:</b> Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos nos ensaios com variação de pressão.....	41
<b>Figura 19:</b> Fermentações no “air-lift” 1PF (0,50 kgf/cm <sup>2</sup> e 3,0 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	45
<b>Figura 20:</b> Fermentações no “air-lift” 2PF (1,50 kgf/cm <sup>2</sup> e 3,0 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	45

<b>Figura 21:</b> Fermentações no “air-lift” 3PF (0,50 kgf/cm <sup>2</sup> e 15 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	46
<b>Figura 22:</b> Fermentações no “air-lift” 4PF (1,50 kgf/cm <sup>2</sup> e 15 m/s), com aplicação de CM durante a 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	47
<b>Figura 23:</b> Fermentações no “air-lift” 5PF (1,00 kgf/cm <sup>2</sup> e 9 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	47
<b>Figura 24:</b> Fermentações no “air-lift” 6PF (1,00 kgf/cm <sup>2</sup> e 9 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	48
<b>Figura 25:</b> Fermentações no “air-lift” 7PF (1,00 kgf/cm <sup>2</sup> e 9 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).....	49
<b>Figura 26:</b> Resultados comparativos da concentração celular (g/L) das fermentações com aplicação de campos magnéticos.....	50
<b>Figura 27:</b> Resultados comparativos da produção de GSH (mg/L) das fermentações com aplicação de campos magnéticos.....	50

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ABS – absorvância  
ADP – adenosina difosfato  
ATP – adenosina trifosfato  
BA – batelada alimentada  
CM – campos magnéticos  
CoA – coenzima A  
DP – desvio padrão  
DTNB – 5,5`-dithiobis-2-nitrobenzoic acid  
EROS – espécies reativas de oxigênio  
FB – fermentador de bancada  
FE – frascos Erlenmeyer  
 $g_{cl}$  – massa de células em grama  
GCS – glutaciona sintetase  
 $g_{glic}$  – massa de glicose em grama  
GOD – glicose oxidase  
GS – glutaciona sintetase  
GSH – glutaciona ou glutaciona reduzida  
GSSG – glutaciona oxidada  
GST – glutaciona S-transferase  
 $mg_{GSH}$  – massa de glutaciona em miligrama  
 $mg_{GSH}/g_{cl}$  – massa de glutaciona em miligrama por massa de célula em grama  
mM – milimoles  
NAC – N-acetil-L-cisteína  
OD – oxigênio dissolvido  
 $P_{0h}$  – concentrao de produto em 0 h  
 $P_{96h}$  – concentrao de produto em 96 h  
PDC – diferença na produo de células  
PDG – diferença na produo de GSH  
POD – peroxidase  
 $P_p$  – Produtividade em produto  
PPO – polifenoloxidase  
 $P_x$  – Produtividade em célula  
RNA m – cido ribonucléico mensageiro  
RPM – rotaes por minuto  
 $S_{0h}$  – concentrao de substrato em 0 h  
 $S_{96h}$  – concentrao de substrato em 96 h  
t – tempo  
TCA – cido- telúrio  
TEG – glutaciona extracelular  
TIG – glutaciona intracelular  
UFC – unidades formadoras de colnias  
v/v – volume por volume  
VRC – velocidade de reciclo celular  
 $X_{0h}$  – concentrao celular em 0 h  
 $X_{96h}$  – concentrao celular em 96 h  
YM – *yeast extract-malt extract* (meio extrato de levedura-extrato de malte)  
 $Y_{p/s}$  – fator de conversão de substrato em produto

$Y_{p/x}$  – fator de conversão de célula em produto  
 $Y_{x/s}$  – fator de conversão de substrato em célula  
 $\gamma$ -GS –  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase  $\gamma$ -GS  
 $\mu$  – velocidade específica de crescimento  
 $\mu$ M – micromoles  
% GSH – porcentagem de glutatona

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
	2.1 Objetivo Geral.....	3
	2.2 Objetivos Específicos.....	3
3	REVISÃO DE LITERATURA .....	4
	3.1 Glutathione.....	4
	3.2 Produção de Glutathione.....	8
	3.3 Produção de Glutathione a partir da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	12
	3.4 Aplicação de Campos Magnéticos em Processos Fermentativos .....	15
	3.5 Campos Magnéticos no Cultivo da Levedura <i>Saccharomyces</i> .....	18
	3.6 Utilização do Biorreator “Air-lift” em Processos Fermentativos .....	22
	3.7 Efeitos da Pressão no Cultivo de Micro-organismos.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
	4.1 Meio de Cultivo e Manutenção da Cepa Escolhida Para Produção de GSH .....	27
	4.2 Preparo do Inóculo .....	27
	4.3 Composição do Meio de Cultivo para Produção de GSH.....	27
	4.4 Ensaios com Diferentes Pressões.....	27
	4.5 Ensaios Sem Aplicação de Campos Magnéticos (Controle).....	28
	4.6 Ensaios com Aplicação de Campos Magnéticos .....	29
	4.6.1 Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> .....	29
	4.7 Metodologia Analítica .....	31
	4.7.1 Determinação da concentração celular .....	31
	4.7.2 Determinação de pH .....	32
	4.7.3 Determinação da concentração de glicose residual (consumo de substrato)..	32
	4.7.4 Determinação da concentração de glutathione .....	32
	4.7.5 Determinação da indução magnética.....	33
	4.8 Cálculos e fórmulas utilizadas durante as análises .....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
	5.1 Fermentação no “Air-lift” Somente com Variação de Pressão em Aplicação de Campos Magnéticos .....	35
	5.1.1 Ensaios com variação de pressão no “air-lift”.....	35
	5.1.2 Produtividade celular e produtividade em GSH.....	42
	5.1.3 Porcentagem de GSH e seus fatores de conversão .....	43
	5.2 Produção de GSH Com Aplicação de Campos Magnéticos .....	43
	5.2.1 Resultados da determinação da indução magnética .....	43



5.2.2	Ensaio controle (sem aplicação de CM) .....	43
5.2.3	Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> .....	44
5.2.4	Produtividade celular e produtividade em GSH nos ensaios com CM .....	51
5.2.5	Porcentagem de GSH e seus fatores de conversão nos ensaios com CM.....	52
5.2.6	Resultados da análise estatística do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	53
5.2.7	Comparação entre os ensaios com e sem aplicação de CM .....	55
6	CONCLUSÕES .....	57
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9	ANEXOS.....	71
	A - RESULTADOS CURVA PADRÃO GLUTATIONA E CONCENTRAÇÃO CELULAR .....	71
	B - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES SOB DIFERENTES PRESSÕES.....	72
	C - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES COM APLICAÇÃO DE CM.....	76

# 1 INTRODUÇÃO

A incidência de doenças relacionadas ao estresse tem se tornado um grande problema para a população de um modo geral. As reações de oxidação desencadeiam o acúmulo de compostos tóxicos nos organismos, sendo nocivos às estruturas celulares acarretando danos por vezes irreversíveis tais como: envelhecimento, doenças neurodegenerativas, imunológicas, gástricas e cancerígenas. Pesquisas que envolvem a produção de compostos estabilizantes com funções antioxidantes vêm recebendo bastante destaque na comunidade científica na área biotecnológica.

A glutathione (GSH) é um antioxidante composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupamento tiol da cisteína o local ativo responsável por suas propriedades bioquímicas. É um tripeptídeo hidrossolúvel, presente na maioria das células animais e em vegetais. Pode ser encontrado na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), existindo uma correlação de grande importância na razão entre essas duas formas GSH/GSSG, pois é normalmente utilizada na avaliação do estado redox dos sistemas biológicos em geral.

Além de sua principal função como agente de defesa antioxidante, pesquisas apontam inúmeras aplicações em diversos segmentos industriais para a GSH, tais como: ambiental, farmacêutico, alimentício e desportivo, seja atuando como parâmetro de avaliação na contaminação ambiental, como aditivo alimentar, estendendo o tempo de prateleira de carnes e frutos, na estabilização de pigmentos, na formulação de reagentes químicos, biológicos, e em forma de cápsulas como suplemento alimentar.

A produção industrial de GSH pode ser realizada por diferentes métodos seja por síntese química, enzimática ou através de fermentação com micro-organismos potencialmente produtores. Entretanto, a síntese química e enzimática são processos que apresentam desvantagens, tais como, custos, instabilidade e tempo, dificultando seu escalonamento industrial. A fermentação realizada por micro-organismos é uma aproximação eficiente e promissora em tecnologias que envolvem produção de compostos com interesses industriais.

A utilização de tecnologias que envolvem pressões em processos fermentativos vem aumentando a cada dia. Quando um tipo de aeração é conferido ao sistema, a tendência é aumentar e/ou a conversão do substrato a produto, pois ocorre um aumento gradativo de transferência de massa e calor, obtendo resultados satisfatórios em menor tempo, sendo economicamente viável em escala industrial.

Alguns trabalhos foram publicados enfatizando a aplicação de Campos Magnéticos (CM) na tecnologia fermentativa. A estimulação ou inibição dos processos celulares por este processo é de interesse notável na biotecnologia, não somente para estabelecer os mecanismos básicos desta interação, mas também para determinar seu potencial em futuras aplicações industriais.

A aplicação de CM em processos fermentativos ainda é uma área recente, em virtude de poucos trabalhos reportados a respeito desta tecnologia. Uma das razões seria o grande número de variáveis que influenciam, tais como: o micro-organismo responsável pela biotransformação, pela composição do meio, tempo, temperatura, aeração, agitação, intensidade de aplicação e o desconhecimento sobre os fatores limitantes existentes nos micro-organismos em questão.

Pesquisas acerca da produção de GSH em escala industrial buscam alternativas viáveis. Frente a estas questões, é interessante utilizar técnicas que requerem baixo custo e rapidez em sua síntese. A escolha de equipamentos que ocupem menor área, que permitam fácil controle, manuseio e configuração adequada é uma ferramenta inovadora. Por este motivo, foi proposto neste trabalho o biorreator do tipo “air-lift” de circulação interna para a produção de GSH.

Devido ao número limitado de trabalhos a respeito da aplicação de CM na produção de GSH, sua vasta aplicabilidade em diferentes segmentos industriais, a existência de uma tecnologia promissora que utiliza como modelo a *Saccharomyces cerevisiae* em processos fermentativos e sua influência frente aos CM, torna-se atrativo, justificável e promissor a abordagem deste tema.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de campos magnéticos na produção de glutatona sob fermentação submersa por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em biorreator “air-lift” sob diferentes pressões.

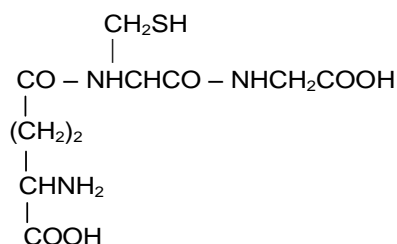
### 2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a produção de GSH variando a pressão de trabalho no biorreator “air-lift” e verificar a que proporcione a máxima produção;
- Determinar a influência da aplicação de campos magnéticos em concomitância com diferentes pressões e variando a velocidade de reciclo celular;
- Obter os rendimentos, produtividades e fatores de conversão dos processos fermentativos sem CM e com CM.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Glutationa

A glutathiona ou GSH (L-γ-glutamil-L-cisteínilglicina) é um tripeptídeo linear, hidrossolúvel constituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável por suas propriedades bioquímicas. Esta presente na maioria das células animais e vegetais em concentrações compreendidas entre 1 e 8 mM, estando na maioria das vezes, em maior quantidade no fígado. Em nível extracelular, sua concentração é entorno de 5-50 μM (LI et al., 2004).

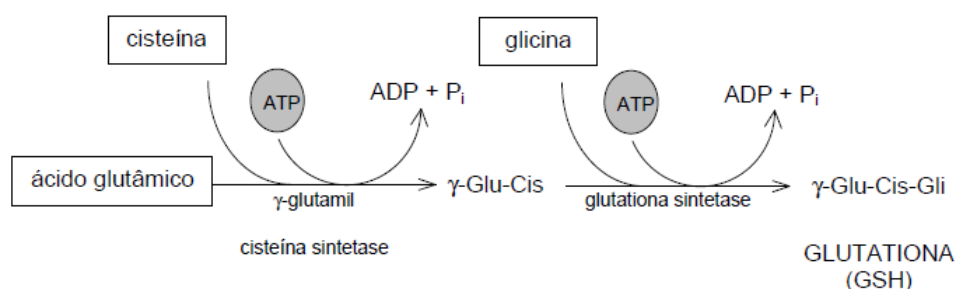


**Figura 1:** Fórmula estrutural da glutathiona  
(Fonte: SANTOS, 2008).

A GSH tem sido alvo de estudos em diversos segmentos desde a sua descoberta por Rey-Pailhade em 1888. Segundo o autor, foi observado que as células continham uma substância responsável pela formação de sulfetos na presença de enxofre e que essa mesma substância estava presente em quase todas as células animais. Em virtude da alta afinidade em reagir com o enxofre, Rey-Pailhade nomeou esta substância de “philothion” (philo=atração; thion=enxofre). Em 1921, Hopkins observou que a substância denominada “philothion” era constituída por glutamato e cisteína, sendo um dipeptídeo denominado glutathiona (PENNINCKX, 2002).

Anos mais tarde em 1978, Kosower e Kosower descreveram a GSH como “o mais importante tiol não-protéico”. A GSH possui duas características estruturais indispensáveis para a sua participação em diversas funções: a ligação γ-glutamil e o grupo sulfidril. Mais tarde, um grupo de pesquisadores descobriu que a GSH é um tripeptídeo composto por três aminoácidos: glutamina, cisteína e glicina e que seu sítio ativo era representado por um grupo tiol, sulfidril ou SH de um resíduo de cisteína. A GSH é sintetizada intracelularmente pela ação consecutiva das enzimas dependentes de ATP: γ-glutamilcisteína sintetase (γ-GS) e glutathiona sintetase (GS). O primeiro passo para a formação deste tripeptídeo é a utilização de glutamato e cisteína em uma reação catalisada pela γ-GS formando o dipeptídeo γ-glutamilcisteína. O segundo passo é a adição de uma molécula de glicina ao dipeptídeo γ-glutamilcisteína, reação esta catalisada pela GS (SHAN, 1990). A Figura 2 mostra o esquema da biossíntese.

Em sua síntese, ocorre uma reação não específica entre o grupo sulfidril da GSH e o oxidante, sendo que o produto reduzido liberado não apresenta toxicidade (SCHMIDT e KONETZKA, 1986).



**Figura 2:** Esquema geral da biossíntese da glutatona  
(Fonte: PIEDRAHÍTA-AGUIRRE, 2008).

A biossíntese de GSH em humanos acontece em todos os tipos de células, porém o órgão responsável por sua produção e exportação é o fígado. O aminoácido limitante responsável pela síntese de GSH em humanos, ratos, porcos e frangos é a cisteína (WU et al., 2004). É encontrada principalmente em micro-organismos eucarióticos, em bactérias gram-negativas e raramente em bactérias gram-positivas (LI et al., 2005).

A GSH existe no organismo em sua forma reduzida, em torno de 90% dos casos, e sob várias outras formas, podendo ser encontradas nas células microbianas, nos tecidos e no plasma sanguíneo. A GSH oxidada (GSSG) pode ser reduzida através da GSH redutase na presença de NADPH. Além da GSH ocorrer na forma reduzida e oxidada, outras formas podem ocorrer através da “glutathionilação”, como por exemplo, GS-S-CoA, CS-S-cis e GS-S-proteína (LI et al., 2004).

Em condições patológicas a forma reduzida é 10 a 100 vezes maior do que na forma oxidada. Mudanças na concentração deste tripeptídeo podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas, como anemias causadas por infecção ou seguidas pela administração de algumas drogas oxidantes (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

A oxidação é essencial para a produção de energia, que serve como combustível para diversos processos biológicos em organismos vivos. Entretanto, a produção contínua de oxigênio derivado de radicais livres está envolvida no início de várias doenças como o câncer, artrite reumatóide e arteriosclerose, assim como processos degenerativos associados ao envelhecimento (MAU et al., 2002).

É sabido que a oxidação é oriunda das espécies reativas ao oxigênio (EROS), sendo a principal causa da morte celular. Pequenas moléculas antioxidantes que contêm enxofre e/ou selênio em sua estrutura molecular são capazes de amenizar os danos oxidativos. Além disso, as células empregam múltiplos mecanismos antioxidantes para evitar possíveis danos celulares (BATTIN, 2009).

Embora quase todos os organismos possuam mecanismos de defesa antioxidante e um sistema de reparo que os protege contra danos provocados pela oxidação, esses sistemas são insuficientes para a sua prevenção total (TURKOGLU et al., 2006).

Os mais importantes antioxidantes encontrados nos seres vivos são: ascorbato (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) e os carotenoides, que estão presentes nas plantas em altas concentrações e a GSH que é encontrada em maiores quantidades em mamíferos (DEMMING e ADAMS 1993).

A GSH tem sido identificada como essencial para muitos processos celulares, principalmente na dextoxificação dos peróxidos de hidrogênios, orgânicos, xenobióticos e radicais livres. Essa funcionalidade ocorre através da conjugação com agentes eletrofílicos,

uma reação catalisada pela enzima GST (glutathione S-transferase) (ELSKENS et al., 1991; PENNINCKX, 2000; PENNINCKX, 2002; ROLLINI E MANZONI, 2006).

A GSH peroxidase, encontrada em muitos tecidos de origem animal, participa de importante sistema de defesa enzimático que atua contra o aumento de radicais livres. Outra enzima que age conjuntamente é a GSH redutase. Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radiculares, porém é responsável pela regeneração da GSH a sua forma reduzida (GSH) na presença de NADPH, tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo da GSH. Ela e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico, apresentando associações com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo. Estas alterações implicam em lesões de DNA, gerando processos pré-mutagênicos e podendo levar, em alguns casos, ao câncer (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

De forma complementar ao sistema de defesa enzimático, no qual participam enzimas, tais como a catalase, superóxido dismutase, GSH peroxidase e GSH redutase todas as células possuem um sistema de defesa não enzimático para proteger os constituintes celulares dos radicais livres e formas reativas do oxigênio e manter o potencial redox da célula (STEPHEN e JAMIESON, 1996). Além disso, a inibição da síntese de GSH causa danos mitocondriais, aumento da liperoxidação, perda de catecolaminas e formação de processos distróficos em neurônios nigroestriatais (ANDERSON, 1998).

Em particular, os problemas na síntese e metabolismo de GSH estão associados a algumas doenças, nas quais os seus níveis e das enzimas que atuam no seu metabolismo, podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Há alguns anos, foi reportada a diminuição dos níveis da GSH em hemácias e plasma de pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência (HIV-1), associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Tem sido bem estabelecido que a diminuição dos níveis de GSH possa estar associada ao envelhecimento e patogênese de muitas doenças, incluindo: artrite reumatóide, distrofia muscular, esclerose lateral amniótica, doença de Alzheimer e esquizofrenia (SCOTH et al., 2008).

De acordo com a Shimizu et al. (1991) a GSH atua como purificador de toxinas, tendo sido descoberta mais tarde por outros autores (SAKATO e TANAKA, 1992) como coadjuvante no tratamento de doenças hepáticas segundo.

Uma das atividades antioxidantes da GSH consiste em eliminar, indiretamente, o tocoferol oxidado, importante para a reciclagem e manutenção de níveis fisiológicos de vitamina E, essenciais para o combate ao estresse oxidativo (NWOSE et al., 2000).

Pode ser usada como fonte endógena de enxofre na levedura *S. cerevisiae* (ELSKENS, 1991; GHARIEB e GADD, 2004; PENNINCKX, 2000) e de nitrogênio (GHARIEB e GADD, 2004). A maior parte do excesso de enxofre é incorporada na GSH como nutriente na presença de sulfato (PENNINCKX, 2000).

Possui importante papel na atividade imunológica estimulando a medula óssea na produção dos leucócitos, sendo posteriormente liberados na corrente sanguínea, além de ser um dos agentes antiviróticos mais potentes (LI et al., 2004; WU et al., 2004).

A GSH pode ser considerada como uma poderosa e importante molécula de defesa e utilizada com grande potencial minimizando os sinais do envelhecimento e como importante droga no tratamento de algumas doenças, tais como: infecções em geral, câncer, HIV, cirrose hepática e inflamações de ordens pancreáticas (ROLLINI e MANZONI, 2006).

A busca de alternativas promissoras na produção de GSH, bem como sua gama de aplicações nas indústrias em diferentes segmentos, vem tornando atrativo os estudos que buscam novas fontes de sua produção. A GSH é largamente utilizada na indústria

farmacêutica e tem o potencial de ser usada em larga escala nas indústrias alimentícias e a de cosméticos (ZHANG et al., 2007).

Maccarone et al. (1985) estudaram a estabilidade de antocianinas em suco de laranja através da adição de antioxidantes. A GSH foi utilizada para reduzir as oxidações químicas e enzimáticas. No estudo, foi observado que a GSH, em conjunto com o ácido tartárico é capaz de estabilizar a cor, sendo que o melhor resultado foi observado quando a amostra foi pasteurizada e, em 100 mL de suco, foram adicionados 250 mg de ácido tartárico e 100 mg de GSH.

O acúmulo e hidrólise por bactérias ácido lácticas são de grande interesse para o segmento alimentício. Estudos comprovaram que a GSH desempenha importante papel no desenvolvimento do “flavor” em queijos. A adição de GSH durante a produção de queijos favoreceu o crescimento das bactérias, a proteólise, a estabilidade, a atividade das esterases, a formação de metanetiol e de sulfito de hidrogênio, possibilitando na melhoria do “flavor” do queijo Cheddar (FERNÁNDES e STEELE, 1993; WIEDERHOLT e STEELE, 1994).

A GSH é encontrada em quantidades significativas em soro de leite bovino, esta molécula é responsável pelo efeito sequestrante de radicais livres que são também inibidores da lipoxidação das lipoproteínas e artérias, justificando intensas pesquisas relacionadas a novas formulações de bebidas a base de soro de leite bovino (LÉONIL et al., 2001).

Segundo Gharieb e Gadd (2004), a GSH tem a capacidade de proteger as células contra biocidas e certos íons metálicos. Apresenta a peculiaridade de acumular e desintoxicar metais pesados como Cd (Cádmio) e Se (Selênio). Porém, com outros metais mostrou independência à tolerância na *S. cerevisiae*. Dentre estes podemos citar o Te (Telúrio), Zn (Zinco), Co (Cobalto), Cu (Cobre), Mn (Manganês), Ni (Níquel) e Cr (Cromo).

Oms-Oliu et al. (2008) testaram coberturas a base de alginato (2%), pectina (2%) e gelana (0,5%) adicionados dos antioxidantes N-acetilcisteína (0,75%) e GSH (0,75%) em peras e verificaram que as coberturas atuaram como barreira ao vapor de água e a produção de etileno. A incorporação dos antioxidantes reduziu o crescimento microbiano e o processo de amadurecimento, aumentando o tempo de vida de prateleira das frutas, comparada com amostras sem adição de antioxidantes e também foi eficaz na prevenção ao escurecimento das mesmas.

Rojas-Grau et al. (2008) estudaram o efeito do uso combinado de ácido ascórbico, 4-hexil-resorcinol, N-acetil-cisteína (NAC) e GSH na inibição da polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) em maçãs Fuji. O estudo demonstrou que a N-acetilcisteína (1% p/v) e GSH (1%, p/v) foram inibidores eficazes da PPO.

No trabalho de Wang et al. (2011), a aplicação de diferentes concentrações de GSH em soro de leite bovino, impediu a fibrilação e a formação de  $\alpha$ -lactoalbumina, proteínas que são responsáveis pela aglutinação e formação de agregados no soro, sob condições de pH ácido e elevadas temperaturas. A partir disto, percebeu-se que a GSH tem a peculiaridade de modificar as propriedades reológicas de um fluido, tais como: viscosidade, força do gel, módulo de elasticidade e firmeza. Tendo como base estas características, há uma abordagem importante para utilização da GSH no segmento alimentício, principalmente na formulação de iogurtes e bebidas a base de leite.

Os processos industriais, bem como a mineração, as atividades agrícolas (fertilizantes fosfatados), a geração de efluentes industriais e domésticos, dispersam no solo quantidades consideráveis de poluentes metálicos que podem ser letais para o crescimento das plantas. A GSH destaca-se na área ambiental como importante parâmetro biológico, sendo um dos mais importantes indicadores do estresse oxidativo, atuando como biomarcador de protocolo no monitoramento ambiental na contaminação aquática por metais pesados, dentre eles cádmio e chumbo (GARG e AGGARWAL, 2011).



### 3.2 Produção de Glutathiona

Alguns micro-organismos são excelentes fontes produtoras de GSH e uma alternativa eficiente para a produção industrial de compostos com diversas aplicações, pois possuem menor tempo de geração, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação genética de sua capacidade produtiva e de suas condições de cultivo (ILLANES, 1994).

A necessidade de GSH difere entre os organismos eucarióticos e procarióticos. É componente essencial durante os processos metabólicos normais nas leveduras, o que não ocorre com as bactérias, nas quais não é metabólito essencial (GRANT et al., 1996).

A produção de GSH por fermentação com leveduras, bem como sua comercialização, teve seu início no Japão, no final da década de 70 e início dos anos 80. Pesquisas destinadas a produção enzimática apresentavam alguns entraves impossibilitando o seu avanço, devido a elevados custos em sua produção, tornando-se inviável a sua execução (LI et al., 2007).

Liu et al. (2004) afirmaram que a biossíntese de GSH requer além de ATP, os três aminoácidos precursores (ácido glutâmico, cisteína e glicina). Sem a suplementação destes no meio, as concentrações intracelulares serão mantidas nos seus níveis fisiológicos e a síntese de GSH poderá ser inibida.

Esta molécula pode ser sintetizada a partir de metodologias que envolvem reações químicas, enzimáticas e através da tecnologia fermentativa por micro-organismos potencialmente produtores, tais como: *Saccharomyces* e *Candida* (WEN et al., 2004). A composição do meio de cultivo para o crescimento de células pode afetar de modo significativo o conteúdo intracelular de GSH, mas não a sua presença ou ausência (FERNÁNDES e STELEE, 1993).

Wen et al. (2006) comprovaram que a concentração de etanol no meio tem grande efeito na concentração de GSH, sendo que altas concentrações inibem o crescimento celular, por isso, os níveis de etanol devem ser mantidos baixos.

A fermentação em batelada alimentada é um dos métodos mais eficientes para alcançar altos níveis de densidade celular com leveduras. Entretanto, a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) durante a batelada alimentada, deve ser cuidadosamente controlada para evitar declínio da concentração intracelular da GSH (LI et al., 2007).

Alguns métodos químicos e enzimáticos têm sido alvos de estudos, porém não apresentam aplicação prática. Em relação à metodologia enzimática, de acordo com Hoshida et al. (2011), a biossíntese enzimática da GSH ocorre em duas etapas consecutivas de regeneração de ATP, que são consumidos constantemente nas reações catalisadas por  $\gamma$ -glutamilcisteína (GCS) e GSH sintetase. A síntese de aminoácidos e ATP ocorre na etapa da glicólise, o que acarreta demora e instabilidade na produção de GSH. As enzimas envolvidas no processo requerem bastante ATP, além de um sistema eficiente de regeneração para um desempenho favorável.

A baixa eficiência de regeneração de ATP (MURATA et al., 1981) e a elevada degradação da GSH pela  $\gamma$ -glutamiltranspeptidase (LI et al., 2010), são os principais entraves apresentados para a produção de GSH através de tecnologias enzimáticas.

Na metodologia que requer sínteses químicas, ocorre o envolvimento de um grupo sulfrídila altamente susceptível à oxidação, além da adição do peptídeo  $\gamma$ -glutamil o que acaba tornando complexa a síntese de GSH (GOTOH et al., 2004).

Na bactéria *Escherichia coli*, foi encontrado GSH em cultivos aeróbios, os maiores valores foram encontrados na fase estacionária, porém durante a formação dos esporos não foi encontrada (FAHEY et al., 1978). Suzuki et al. (1999) relataram que no cultivo de *E. coli* a

GSH foi acumulada durante a fase exponencial e sua concentração chegou ao seu valor máximo na fase estacionária.

A produção de GSH por métodos fermentativos pode ser subdividida em três fases: I, II e III. Sendo que na fase I (0-8 h), ocorre o consumo de glicose (substrato) e a produção de etanol. Nesta fase os níveis de glicose decrescem gradualmente e a de etanol e GSH aumentam. Na fase II (8-14 h) ocorre a assimilação do etanol: o crescimento celular ocorre de forma mais lenta e o etanol é utilizado como fonte de carbono para crescimento celular e para síntese de GSH. Na fase III entre 14 e 24 h, ocorre a fase estacionária onde a glicose e o etanol são consumidos completamente e as células param de crescer. O acúmulo de GSH ocorre na fase exponencial de crescimento, ou seja, nas fases I e II (WEN et al., 2005).

O stress causa aumento no consumo de energia nas leveduras, que induz mudanças no metabolismo e acúmulo de algumas moléculas protetoras. A trealose e a GSH são exemplos destas moléculas protetoras produzidas pela *S. cerevisiae* sobre condições de estresse, tais como, redução de nutrientes, choque osmótico e aumento da temperatura (DONG et al., 2007).

Com o avanço de tecnologias que envolvem produção de compostos a partir de micro-organismos, tem-se observado crescentes evoluções neste segmento, visto que se torna a cada dia foco de interesse para setores industriais, por ser uma técnica simples, eficiente e viável. Na Tabela 1, observa-se a evolução das pesquisas que envolvem produção de GSH através de micro-organismos potencialmente produtores.

**Tabela 1:** Evolução das pesquisas para a produção de GSH

<b>Desenvolvimento na produção de GSH</b>	<b>Período</b>
Identificação de sistemas regenerativos em plantas	1888
Descoberta e identificação de sua fórmula estrutural	1920
Métodos fermentativo-enzimáticos utilizando leveduras ( <i>S. cerevisiae</i> e <i>Candida</i> )	1976-1985 1998 até presente data
Purificação da GSH em sistemas biológicos	1976-1985
Produção enzimática utilizando bactéria	1976-1987/1993-1998
Sistemas de regeneração de ATP para aumentar produção	1978-1982
Biologia molecular através da biossíntese e construção de genes recombinantes em <i>E. coli</i>	1982-1990
Construção de genes recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	1986-1990/1996-1998
Otimização e controle de processo	1991-1994/1997 até presente data
Produção por bactérias lácticas	2001 até presente data

Fonte: LI et al., 2004.

A GSH pode ser produzida a partir de micro-organismos como a cianobactéria *Phormidium lapideum*. De acordo com os resultados, foi observado que cerca de 20% de GSH foi acumulada a nível intracelular e os outros 80% a nível extracelular (SAWA et al., 1986).

Ohwada e Sagisaka (1990) observaram aumento nos níveis de GSH quando as células de *E. coli* foram submetidas a estresse osmótico, através da adição de NaCl ou sacarose. Os níveis de GSH aumentaram 2,5 vezes com a sacarose (0,51 M) e 4 vezes com o NaCl (0,1-0,4 M). Com concentrações de NaCl superiores a 0,6 M, a GSH foi excretada da célula para o meio. No ensaio em que foram adicionados aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico e glicina) foi obtida concentração de GSH 10 vezes maior que nos ensaios sem a adição.

Nas leveduras, a GSH encontra-se no interior da célula. Desta forma, o aumento da produção pode ocorrer de duas formas: aumentando amplamente a concentração celular obtida ou promovendo o aumento do conteúdo intracelular (WEN et al., 2004; WEN et al., 2006). Comparativamente é mais fácil aumentar a concentração celular através das tecnologias de fermentação desenvolvidas, do que aumentar o conteúdo intracelular de GSH. Porém, a segunda opção é mais interessante, pois além de aumentar a concentração de GSH pode ocorrer a facilitação nas etapas de “downstream” (WEN et al., 2004).

A excreção da GSH no meio é uma etapa a mais durante o processo de produção. Para isto, devem ser estudadas formas de aumentar os níveis de GSH extracelular, mas poucos trabalhos têm sido realizados neste sentido (WEI et al., 2003b).

De acordo com Wei et al. (2003a), o crescimento celular, a formação de GSH e o seu conteúdo intracelular são influenciados pela temperatura. Segundo esses autores, foram estudados os efeitos da temperatura na fermentação em batelada usando *Candida utilis* WSH 02-08. A máxima concentração de GSH foi a 26°C e o crescimento celular foi a 30°C. Como a temperatura necessária para obter os máximos valores de concentração celular e de GSH foram diferentes, foi utilizada estratégia de manter a temperatura a 30°C nas primeiras 8 h e depois diminuir para 26°C, a fim de aumentar a produção de GSH. Nestas condições foi alcançada a maior concentração de GSH (385 mg/L).

O oxigênio dissolvido (OD) é considerado fator limitante para o acúmulo de GSH nas células de leveduras. Nas células destes micro-organismos, sua síntese requer a participação de moléculas de ATP. Altos níveis de OD favorecem a produção de ATP e a regeneração de ADP a ATP, favorecendo assim a produção de GSH. Durante a fermentação a produção do etanol é desfavorável, pois limita o crescimento celular. Elevadas concentrações de etanol e baixos níveis de OD são fatores que influenciam de modo negativo o processo de fermentação do tipo batelada. Valores de  $\mu$  (velocidade específica de crescimento) relativamente baixos, nutrientes em quantidade suficiente e elevados valores de OD, impedem o acúmulo de etanol no meio, favorecendo de modo positivo na produção de GSH (LIN et al., 2004).

Segundo Rollini et al. (2005) foram investigados o acúmulo de GSH em algumas espécies de *Candida* (13 cepas) e *Pichia* (11 cepas). As fermentações foram conduzidas em meio suplementado com diferentes fontes de carbono, metanol, etanol e glicose. As maiores concentrações celulares foram evidenciadas com glicose (9,9 g/L para *C. nemodendra*) e etanol (9,7 g/L para *P. pastoris*), enquanto os menores valores foram observados com metanol (menor que 4,0 g/L para 80% das cepas de *Candida* e para 40% de *Pichia*). Entretanto, as porcentagens de GSH foram maiores utilizando metanol como fonte de carbono, 3,9 e 3,5% para *C. pini* e *P. philodendri*, respectivamente.

Nie et al. (2005) citaram que a síntese de GSH é essencial para o crescimento celular em condições de estresse. Se a levedura for submetida a tais condições, a produção de GSH deve aumentar. Neste estudo foram feitas fermentações utilizando *Candida utilis* WSH-02-08 e o efeito que o estresse, através do pH baixo e da adição de glicose durante a fermentação, foram estudados. Foi utilizado fermentador de 7 L, com aeração de 5 L/min, agitação 300 rpm e 10% de inóculo. Paralelamente, foram realizados experimentos com controle de pH. Pôde-se verificar que a concentração de GSH foi maior nos ensaios com controle de pH (332 mg/L) do que nos sem controle (171 mg/L). Quando as células foram submetidas a pH baixo, ocorreu a excreção da GSH para o meio e este fato é importante, pois simplifica os processos de extração do produto. A maior concentração de GSH (737,1 mg/L) foi observada no ensaio que o pH foi mantido em 5,5 por 24 h, após este período foi diminuído para 1,2 durante 3 h e em 27 h de fermentação foi adicionado 30 g/L glicose e o pH elevado para 5,5.

Li et al. (2005), utilizando *Lactococcus lactis* NZ 9000 modificada geneticamente, avaliaram a produção de GSH em dois diferentes meios de cultura: M17 e CDM. No meio

M17 a concentração de GSH produzida foi oito vezes maior que no meio CDM. Isto indicou que a composição do meio de cultura pode afetar bastante a produção de GSH. Os três aminoácidos precursores da GSH (ácido glutâmico, cisteína e glicina) foram adicionados em combinações diferentes, para aumentar a concentração de GSH utilizando o meio CDM. Nos ensaios em que a cisteína foi adicionada, ocorreu aumento da atividade da enzima GSH sintetase promovendo o aumento da conversão da GCS em GSH. Porém, o mecanismo pelo qual ocorre este fato não foi elucidado. A cisteína é o aminoácido fundamental para a síntese da GSH e a manutenção de seus níveis celulares depende da sua disponibilidade e do transporte até as células.

A concentração de etanol no meio tem grande efeito na síntese de GSH, sendo que altas concentrações inibem o crescimento celular, por isso os níveis de etanol devem ser mantidos baixos (WEN et al., 2006).

Liang et al. (2008c) estudaram a adição de aminoácidos na produção de GSH em fermentador de 7 L utilizando *Candida utilis* WSH 02-08. No ensaio sem adição de aminoácidos, a concentração de GSH foi de 215,4 mg/L após 30 h. Com adição de 6 mM de glicina em 4 h, a concentração de GSH chegou a 266,4 mg/L em 30 h. Já em ensaio adicionando 6 mM de ácido glutâmico, 5,5 mM de glicina e 6,5 mM de cisteína em 12 h, a concentração de GSH obtida foi de 314,4 mg/L em 30 h. Foi feito ainda outro ensaio com adição dos aminoácidos em 2 etapas (4 h e 12 h nas concentrações acima citadas) e obtiveram 383,1 mg/L e 2,28% de GSH em 30 h. A adição de glicina mostrou melhor efeito sobre o crescimento celular e a produção de GSH do que cisteína e ácido glutâmico. Os autores sugeriram que a glicina adicionada na fase de crescimento exponencial e adição dos três aminoácidos durante a fase estacionária pode trazer melhor efeito sobre a produção de GSH.

Wei et al. (2008) avaliaram a adição do aminoácido L-cisteína e diferentes temperaturas para produção eficiente de GSH a partir de *C. utilis* WSH 02-08. As condições de cultivo foram: 50 h, fermentador de 7 L, 10% de inóculo, glicose 30 g/L, sulfato de amônia 8 g/L, sulfato de magnésio 0,25 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, pH 6,0 e 200 rpm. Segundo os resultados a mudança de temperatura de 30°C para 26°C e adição em 16 h de 8,0 mM/L de L-cisteína, promoveram aumento significativo da GSH intracelular, chegando a 1312 mg/L em 33 h de fermentação.

Em estudo realizado por Liang et al. (2008a) foram pesquisados o efeito da adição de cisteína e controle de OD na produção de GSH por *C. utilis* WSH 02-08. Os resultados indicaram que diferentes níveis de OD exerceram grandes efeitos na oxidação da cisteína e na produção de GSH. Altos níveis de OD promoveram aumento na produção de GSH, mas aceleraram a oxidação da cisteína no meio, enquanto que baixos níveis de OD retardaram a produção de GSH, mas reduziram a oxidação do aminoácido. Não houve diferença na produção de GSH quando utilizado de 20 a 40% de OD, sugerindo que este afeta significativamente a produção de GSH quando a concentração esta na faixa de 5-20%.

Em outro estudo realizado por Liang et al. (2008b) foram desenvolvidas estratégias para aumentar a produção de GSH utilizando *C. utilis* WSH 02-08 através da adição dos três aminoácidos precursores juntamente com ATP. Sem a adição dos aminoácidos e de ATP a produção de GSH foi de 1123 mg/L em 60 h de fermentação. No ensaio com adição dos três aminoácidos, obtiveram 1841 mg/L. Entretanto, adicionando os três aminoácidos combinados com ATP, a produção de GSH foi de 2043 mg/L após 72 h de fermentação, aumentando em 11% em relação ao ensaio sem adição de ATP.

Ubiyvovk et al. (2011) otimizaram a produção de GSH sob cultivo em batelada alimentada com glicose e metanol, através da utilização da cepa selvagem da levedura recombinante *Hansenula polymorpha*. Os resultados da GSH intracelular nos cultivos com glicose chegaram a 2300 mg/L. Com metanol, a GSH extracelular chegou a 250 mg/L. Seu

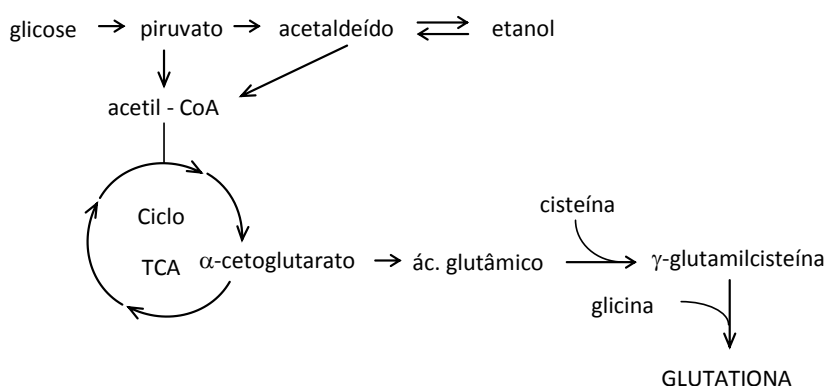
diferencial está na possibilidade de cultivos em biorreatores com altas densidades celulares, tendo relevância na área industrial. Porém, apresenta elevados custos de produção, por se tratar de métodos ligados a engenharia genética, dificultando as pesquisas e seu posterior escalonamento industrial.

Chen et al. (2011) avaliaram a produção de GSH utilizando cascas de bananas hidrolisadas. A levedura utilizada foi *C. utilis* SZU 07-01, no qual a xilose foi a principal fonte de carbono. As condições e o meio de cultivo foram: xilose 20 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  9,59 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L, L-metionina 5,72 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,20 g/L, pH 5,5, 30°C e tempo de 30 h. A melhor concentração celular foi de 7,68 g/L e de GSH foi 111,33 mg/L. Os resultados foram satisfatórios e os autores comprovaram que a levedura consegue utilizar a xilose, açúcar presente em maior quantidade na casca de banana, de forma simples.

Devido à grande expansão do uso industrial de aditivos e estabilizantes, torna-se necessário a realização de estudos que desenvolvam processos fermentativos de produção e de purificação destes compostos visando sua obtenção para que sejam eficientes e apropriados à ampliação em escala industrial (ZHANG et al., 2007).

### 3.3 Produção de Glutaciona a partir da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O caminho metabólico da GSH dentro das leveduras é apresentado na Figura 3. A glicose inicialmente é transformada em piruvato, que é transformado em acetil-CoA, participando assim do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) com liberação de energia. Para a formação da GSH, o ácido glutâmico provém do  $\alpha$ -cetogluturato, que é um composto do ciclo do TCA. Quando é fornecido à levedura excesso de glicose ocorre a produção de etanol através do efeito Crabtree. Havendo quantidades insuficientes de glicose no meio, o etanol pode ser assimilado e a GSH produzida (SHIMIZU et al., 1991).



**Figura 3:** Metabolismo da glutaciona nas leveduras  
(Fonte: SHIMIZU et al., 1991)

A levedura *S. cerevisiae* possui membrana celular contendo duas camadas de fosfolipídios, e somente moléculas pequenas (por exemplo:  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ) conseguem passar através da membrana livremente. Em geral, a GSH não pode ser excretada no meio a partir de células vivas. A excreção somente pode ser provocada através da ruptura da membrana celular (WEI et al., 2003b).

Diversos autores relataram o grande potencial da produção de GSH através do cultivo de algumas cepas de leveduras, em especial a *Saccharomyces* e *Candida* (ALFAFARA et al.,

1992a; ALFAFARA et al., 1992b; GOTOH et al., 2004; LI et al., 2004; WEI et al., 2003a; WEI et al., 2003b; WEN et al., 2004; WEN et al., 2005).

Murata et al. (1981) estudaram a produção de GSH utilizando células imobilizadas de *S. cerevisiae* IFO 2044 em gel de poliacrilamida e compararam com células não imobilizadas. As melhores condições foram: glicose 0,5 M, tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), cloreto de magnésio 0,02 M e 0,025 M de cada um dos três aminoácidos precursores. Nas células imobilizadas, a GSH foi excretada no meio, enquanto nas células não imobilizadas a GSH foi acumulada na célula. As maiores concentrações de GSH foram encontradas após 24 h de incubação com as células imobilizadas.

Bauer (1986) verificou que utilizando *S. cerevisiae* para produção de GSH, as temperaturas nas quais foram obtidas a mínima e a máxima concentração foram 26°C e 28,8°C, respectivamente. Altas concentrações de GSH foram observadas quando se aumentou o nível dos aminoácidos cisteína e ácido glutâmico no meio de cultivo.

Shimizu et al. (1991) testaram a otimização da produção de GSH através do controle da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) em fermentação em batelada alimentada, utilizando *S. cerevisiae* KY5711. Estes autores citaram que a produtividade depende da fonte de carbono utilizada. Da mesma forma, o valor máximo de  $\mu$  coincidiu com o máximo  $\rho_G$  (velocidade específica de produção de GSH) que decresceu quando houve produção de etanol ou quando a concentração de glicose presente foi muito alta. Para valores de  $\mu$  de 0,3 h<sup>-1</sup> o conteúdo de GSH foi constante e para valores de  $\mu$  maiores que 0,3 h<sup>-1</sup> o conteúdo de GSH diminuiu.

De acordo com os estudos de Sakato e Tanaka (1992) o cultivo de leveduras visando a produção de GSH é influenciado diretamente a partir do tempo de consumo de etanol no meio que quando se findou, não foi observado aumento nas concentrações de GSH. A partir disto, pode-se concluir que a concentração intracelular de GSH está diretamente relacionada com a morfologia celular das leveduras e que a presença de etanol exerce papel importante na mudança desta morfologia. Neste trabalho foi avaliado o processo de fermentação em batelada alimentada para obtenção de GSH em fermentador de 30 L. O micro-organismo utilizado foi *S. cerevisiae* KY 6186 e as condições da fermentação foram: pH 5,0, temperatura de 30°C, aeração de 11 L/min e 350 rpm. O meio usado para a alimentação foi melaço de cana de açúcar (100 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5 g/L) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,5 g/L). Comparando-se com o processo convencional foi obtido aumento de cerca de 40% na concentração de GSH.

Alfafara et al. (1992a) estudaram o efeito da adição de 7,4 mM de cisteína, glicina e ácido glutâmico na produção de GSH utilizando *S. cerevisiae* KY5711 em frascos Erlenmeyer. Foi utilizado glicose (10 g/L), temperatura de 30°C e pH inicial 5,0. Em todos os ensaios após 6 h de fermentação, a glicose foi completamente consumida e após este período o crescimento celular pode ter ocorrido devido ao consumo do etanol. Nos ensaios com adição de cisteína foram obtidas concentrações maiores de GSH e não foi observado crescimento celular na segunda fase (fase de consumo do etanol), o que indicou que este foi o aminoácido “chave” durante a síntese da GSH e que a cisteína pode inibir de alguma forma a assimilação do etanol. Não há uma explicação de como a cisteína inibiu a assimilação do etanol e a forma de como ela atuou na síntese da GSH é aparentemente complexa, pois foi observado que o seu modo de atuação foi diferente de como um precursor atua. Quando a concentração inicial de cisteína foi de 2 a 3 mM foram obtidas 7 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cel</sub>/h e concentrações maiores não promoveram aumento do produto.

Em outro estudo os mesmos autores, Alfafara et al. (1992b) analisaram a produção de GSH com *S. cerevisiae* KY5711 e para tal utilizaram temperatura de 30°C e pH 5,4. Durante a fermentação, a concentração de cisteína foi mantida em 3 mM através de alimentação constante, porém foi verificado que houve declínio nos valores da velocidade específica de

crescimento e velocidade de produção de GSH após longos períodos de exposição à cisteína. A máxima conversão de célula em produto foi de 12-14 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél.</sub>. Quando a alimentação de cisteína foi feita em pontos isolados durante a fermentação os resultados foram melhores em relação a alimentação constante (aproximadamente 22 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél.</sub>). Uma das opções para aumentar a produção seria dividir a fermentação em duas etapas: crescimento celular e produção de GSH.

Izawa et al. (1995) avaliaram a adaptação da *S. cerevisiae* S288C ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, observaram que os níveis de GSH encontrados na fase estacionária (6,89 μmol/g<sub>cél.</sub>) foram aproximadamente três vezes superiores do que na fase logarítmica (2,22 μmol/g<sub>cél.</sub>). Com este estudo, pode-se concluir que a produção de GSH, ocorre na fase estacionária.

Santos (2008) avaliou diferentes condições para produção de GSH por *S. cerevisiae* ATCC 7754 em frascos Erlenmeyer através de uma sequência de planejamentos experimentais estudando as variáveis: temperatura (20 – 30°C), agitação (100 – 300 rpm), pH inicial (5,0 – 7,0), concentração de inóculo (5 – 15%) e concentração de glicose (20 – 70 g/L). De acordo com os resultados, as condições ótimas de cultivo foram: 54 g/L de glicose, 5% de inóculo, 300 rpm, 20°C e pH<sub>inicial</sub> 5. A maior concentração de GSH (154,5 mg/L) foi obtida após 72 h de fermentação.

De acordo com Rollini et al. (2009) a produção máxima de GSH chegou a 170 mg/L, utilizando-se a cepa *S. cerevisiae* ZEUS. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer a 28°C durante 48 h.

Segundo Fei et al. (2009), a produção de GSH foi estimulada através de mecanismos enzimáticos ligados a expressão gênica de proteínas heterólogas utilizando como vetor, a levedura *Pichia pastoris* D18. A metodologia baseava-se na adição de dois genes responsáveis pela síntese de GSH, a gsh 1 e a gsh 2, presente em cepas selvagens de *S. cerevisiae*. O cultivo foi conduzido através de batelada alimentada após 16 h com 2,9 mg/L de glicose, em fermentador de 5 L, a 30°C, com adição de cisteína, glicina e ácido glutâmico após 44 h de fermentação, ambos em concentrações de 15 mmol/L. A glicose foi escolhida como principal fonte de carbono e extrato de levedura como principal fonte de nitrogênio. O processo indicou que a levedura recombinante apresentou eficiência na síntese de GSH, através da conversão dos três aminoácidos precursores, e é capaz de aumentar a produtividade de GSH em cultivos com elevadas densidades celulares, obtendo altos rendimentos por processo a baixo custo. De acordo com os resultados a melhor produção de GSH foi a 50 h de processo com 217 mg/L e 4,15 g/L de biomassa.

O trabalho de Piedrahíta-Aguirre (2008) avaliou a produção de GSH com *S. cerevisiae* ATCC 7754, em frascos Erlenmeyer a partir de fontes proteicas de baixo custo, tais como: carbono, nitrogênio e aminoácidos. As condições de cultivo nas três etapas foram: pH 5,0, 20°C, 300 rpm, durante 96 h. Na primeira etapa foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2<sup>5-1</sup>, no qual obteve-se 264,49 mg/L de GSH, com 54 g/L de glicose, 50 g/L de água de maceração de milho (AMM), 50 g/L extrato de levedura, 50 g/L de proteína de soro e 6 mM de lecitina. Na segunda etapa foi realizado planejamento Plackett Burman, no qual se diminuiu a quantidade do extrato de levedura, devido a elevados custos e se adicionou MgSO<sub>4</sub>, obtendo-se excelente rendimento, com 23,33 g/L de crescimento celular e 278,42 mg/L de GSH, com 90 g/L de glicose, 50 g/L de AMM, 10 g/L de extrato de levedura, 50 g/L de soro de leite, 5 mM de lecitina de soja e 10 g/L de MgSO<sub>4</sub>. Na terceira etapa realizou-se outro planejamento, conseguindo uma produção de 166,84 mg/L de GSH e 18,75 g/L de concentração celular, com 60 g/L de glicose, 30 g/L de AMM, 4 g/L extrato de levedura, 0,5 mM de lecitina e 2 g/L de MgSO<sub>4</sub>.

Anschau (2010) estudou o meio para produção de GSH através da metodologia de superfície de resposta a partir de diferentes concentrações de melaço de cana-de-açúcar (75 a 90 g/L) e glicerol (40 a 60 g/L), os melhores resultados foram 119,6 mg/L e 25,3 g/L, respectivamente. Foram estudadas ainda neste trabalho, diversas condições de extração da GSH em frascos Erlenmeyer, utilizando cinco espécies diferentes, o melhor resultado foi obtido com *S. cerevisiae* ATCC 7754 em banho termostático, com 16 h de extração, utilizando 40% de etanol (131,24 mg/L de GSH). Em testes no fermentador de bancada (5 L), a maior produção de GSH foi obtida sem alimentação e sem adição de aminoácidos em 96 h (241,28 mg/L).

Nos estudos de Yoshida et al. (2010) foi utilizada a cepa de *S. cerevisiae* YPH 499, que expressa os genes de  $\alpha$ -amilase e glicoamilase, sendo capaz de consumir amido cru, como fonte direta de carbono para uma produção eficiente de GSH, buscando eliminar o efeito *Crabtree* gradualmente, a partir do fornecimento da glicose oriundo de materiais amiláceos. As condições de cultivo foram: 30°C, 24 h, aeração 0,2 L/min e pH 5,0. O amido foi cozido a elevadas temperaturas e realizada a hidrólise subsequente. Segundo os resultados, a produção de GSH aumentou em torno de 1,4 vezes (89,7 mg/L) se comparado com resultados que não utilizaram amido cru (8,04 mg/L). Porém, existe grande entrave neste método, pois as etapas de cozimento e hidrólise elevariam os custos na sua produção, sendo ainda um método inviável em termos industriais.

Os dois genes envolvidos de forma direta na superexpressão da GSH pelas leveduras são *pep12* e *ubp6*. Tais genes são encontrados nas células da *S. cerevisiae* e mecanismos ligados a engenharia metabólica, estimularam aproximadamente 1,2 vezes a produção de GSH. Da mesma forma foi estimulada a produção de GSH em *C. utilis* através da superexpressão dos genes *GSH1*, *CYS4* e *DEF1* (SUZUKI et al., 2011). De acordo com os autores, a caracterização e identificação dos genes que atuam na produção de GSH por leveduras, se tomados em conjunto, contribuem de forma positiva na melhoria do mecanismo enzimático que envolve a biossíntese.

Na Tabela 2 encontram-se o resumo dos trabalhos mais recentes referentes à produção de GSH por fermentação com a levedura *S. cerevisiae*.

### **3.4 Aplicação de Campos Magnéticos em Processos Fermentativos**

Os efeitos dos CM sobre o crescimento celular podem ser classificados em inibitório, estimulante ou nulo (ZAPATA et al., 2002). Os pesquisadores têm várias teorias e explicações a cerca de como os CM afetam os micro-organismos e as células.

Os campos afetam a direção da migração e alteram o crescimento e a reprodução dos micro-organismos, gerando modificação da velocidade de crescimento celular (ZAPATA et al., 2002; ZAPATA et al., 2005).

Foloea et al. (1998) citaram que o mecanismo da eletro-estimulação não é bem conhecido, mas pode estar ligado a mudanças na membrana, pois durante a eletro-estimulação sabe-se que ocorre o aumento dos fluxos na membrana plasmática. Outra explicação pode estar baseada no eletro-ativação de alguns sistemas enzimáticos ou caminhos metabólicos relacionados a alguns processos que acontecem em nível de membrana.



**Tabela 2:** Resultados de diferentes cepas de *S. cerevisiae* para produção de GSH.

Cepa	Fermentador*	Conc. GSH	Observações**	Referências
KY5711	FE	11,78 mgGSH/g <sub>cél</sub> /h <sup>-1</sup>	BA	Shimizu et al. (1990)
KY6186	F 30 L	+ 40%	BA, adição de aa	Sakato e Tanaka et al. (1992)
KY5711	FE	7 mgGSH/g <sub>cél</sub> /h <sup>-1</sup>	adição de aa	Alfafara et al. (1992)
S288C	FE	18,47 μmol/g <sub>cél</sub>	adição de aa	Isawa et al. (1995)
ATCC 7754	FE	115,28 mg/L	-	Liu et al. (1999)
WSH-J701	FE	64,7 mg/L	-	Wei et al. (2003)
ZJUS1	F	0,81 g/L	BA	Lin et al. (2004)
FF-8	FE	204 mg/L	adição de cisteína	Cha et al. (2004)
T65	FE	153,2 mg/L	adição de aa	Wen et al. (2004)
T65	F 5 L	1875 mg/L	BA, adição de aa	Wen et al. (2004)
T65	F 5 L	170,14 mg/L	-	Wen et al. (2005)
T65	F 5 L	329,3 mg/L	adição de aa	Wen et al. (2005)
CBS 117	FE	1,85%	-	Rollini e Manzoni (2006)
T65	F 5 L	2190 mg/L	BA, glicose, aa mantendo os níveis de etanol baixo	Wen et al. (2006)
-	F 300 mL	103mgGSH/g <sub>célula</sub>	pressurização	Dong et al. (2007)
ATCC 7754	FE	154,5 mg/L	adição de cisteína	Santos et al. (2007)
G14	FE	530 mg/L	adição de aa	Wang et al. (2007)
G14	F 5 L	2020 mg/L	adição de aa e glicose	Wang et al. (2007)
T65	FE	74,6 mg/L	-	Zhang et al. (2007)
ATCC 7754	FE	278,4 mg/L	diferentes meios protéicos	Piedrahíta-Aguirre (2008)
ZEUS	FE	1700 mg/L	-	Rolinni et al. (2009)
ATCC 7754	F 5 L	241,28 mg/L	melaço/glicerol	Anschau (2010)
YPH 499	F 1 L	89,7 mg/L	cepas recombinantes	Yoshida et al. (2010)

\*FE: frascos Erlenmeyer, F: fermentador, \*\*BA: batelada alimentada, CI: células imobilizadas.

A estimulação ou inibição dos processos celulares por CM é de interesse considerável tanto na biologia celular quanto na biotecnologia, não só para estabelecer os mecanismos básicos desta interação, mas também para determinar seu potencial em aplicações práticas. Diferentes aspectos têm sido investigados com respeito às suas alterações devido à energia eletromagnética, em relação ao crescimento celular, às reações enzimáticas, à síntese de biopolímeros e ao transporte na membrana nas células (LEI e BERG, 1998).

A resposta biológica não é linear, de forma que somente para alguns valores de frequência e indução magnética ocorre uma “janela” onde uma resposta significativa pode ser observada. Dependendo da forma e valores dos parâmetros característicos (intensidade,

frequência, comprimento ou tempo constante no caso dos pulsos) podem ocorrer diferentes efeitos (FOLOGEA et al., 1998).

Rao et al. (1997) estudaram a influência do CM na cultura submersa de micro-organismos para a degradação de fenol utilizando dois tipos de reatores, colunas de bolha e reator “air-lift”. No estudo, foi demonstrado que a degradação do fenol no reator “air-lift” foi mais rápida e que o CM aumentou a velocidade específica de crescimento dos micro-organismos, sendo o valor máximo com 22 mT.

Em outra pesquisa, realizada por Hirano et al. (1998) foi avaliada a taxa de fotossíntese e crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis*, quando aplicada indução magnética de 0,5 a 700 Gauss. O valor de  $\mu$  foi mais alto a 100 Gauss, sendo 1,5 vezes maior do que em 0,5 Gauss, enquanto que a indução de 700 Gauss provocou inibição do crescimento. A existência do CM não ocasionou efeito algum quando as bactérias eram cultivadas no escuro em meio contendo 0,3% de glicose. A produção de oxigênio durante a fotossíntese aumentou com a intensificação da indução magnética aplicada, sendo a máxima concentração intracelular de açúcar atingida a 100 Gauss. Esses resultados sugerem que o CM acelera a excitação da clorofila, a reação de transferência de elétrons, síntese de açúcar e a conversão da energia da luz para energia química.

No estudo dos efeitos de CM na fermentação da bactéria *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203 sob condições anaeróbias, foi observado que a utilização da intensidade de campo 1300-3000 Gauss ocasionou aumento da produção, sendo 5,3 vezes maior (na intensidade de 3000 Gauss), comparada ao processo isento da presença de campo (UTSUNOMIYA et al., 2003).

Os efeitos dos CM no crescimento de *Escherichia coli* foram investigados por Okuno et al. (1993). Nesse contexto, duas cepas foram expostas ao CM de 11700 Gauss. Foi notado que em meio nutriente complexo, o crescimento celular foi estimulado em comparação ao sistema controle, sem aplicação de CM. Porém, quando a bactéria foi submetida ao CM em meio nutriente sintético, a velocidade de crescimento foi reduzida significativamente. Com a adição de aminoácidos ao meio sintético, o crescimento passou a ser acelerado, sugerindo que os aminoácidos possuem influência no fenômeno. Além disso, foi notado que independentemente do meio em que eram colocadas as culturas de *E. coli*, a presença do CM facilitou o crescimento da bactéria em temperaturas mais baixas que as temperaturas consideradas ótimas ao crescimento.

Al-Qodah (1999) realizou diversos experimentos que demonstraram os resultados da produção de penicilina utilizando CM aplicado em fermentador “air-lift” com *Penicillium chrysogenum* imobilizado. Cem horas após o início do processo, a concentração máxima de penicilina aumentou 48%, quando a intensidade de CM aumentou de 0 para 350 Gauss devido à maior velocidade de consumo do substrato (lactose) e ao efeito positivo do CM na área interfacial fluido-sólido, sendo encontrado na fase líquida apenas 5% da biomassa. Nenhum efeito adverso nas propriedades fisiológicas dos micro-organismos foi observado.

No campo do tratamento de águas residuárias, Hattori et al. (2001), estudaram a aplicação de CM externo em lodo ativado. Foi observado que a presença de CM permite maior floculação e sedimentação do lodo ativado, sendo ainda mais efetivo na adição de  $\text{FeCl}_3$ . Quando uma indução magnética de 800 Gauss foi aplicada, a sedimentação do lodo aumentou quando  $\text{FeCl}_3$  foi adicionado. O efeito era maior ainda quando o sistema era exposto à indução magnética de 1300 Gauss. Esses resultados sugerem que a magnetização do lodo ativado por CM pode ser aumentada pela adição de ferro, o que torna ainda mais interessante a sua aplicação.

Bie e Wusun (2003) estudaram o efeito dos CM no crescimento e metabolismo de células de *Rodotorula sp.* RG-98. Os resultados mostraram que diferentes efeitos biológicos

foram gerados por diferentes intensidades de CM. A produção de carotenoide aumentou 25% quando CM de 1000 Gauss foi aplicado por 2 h e também foi observado aumento da produção de biomassa.

Justo et al. (2006) estudaram a influência dos CM em culturas de *Escherichia coli*, sendo o processo efetuado com recirculação externa do meio de cultura através de tubo de aço inoxidável inserido em gerador de CM. O tempo de exposição e a indução eletromagnética variaram de 1 a 12 h e 100 a 1000 Gauss, respectivamente. Os resultados analisados foram crescimento da biomassa, viabilidade celular e velocidade de conversão do substrato no processo. Em todos os casos, a aplicação dos CM possibilitou viabilidade celular semelhante ou superior ao controle (sem CM). Além disso, os resultados apontaram que o crescimento celular e a conversão do substrato são influenciados pelo CM e que quando expostas à indução magnética de 1000 Gauss durante 6,5 h, as culturas de *E. coli* exibiram mudanças na viabilidade 100 vezes maior comparada à cultura não exposta ao CM. Os resultados deixaram claro o interesse em sua aplicação industrial.

Em outro experimento, Alvarez et al. (2006) estudaram o efeito do CM na fermentação do *Lactococcus lactis*, usando permeado de soro de queijo na fermentação em batelada. A recirculação da suspensão celular foi feita externamente em tubo de aço inoxidável inserido entre as barras magnéticas. O tempo da exposição ao campo, a velocidade de recirculação e a intensidade do campo, variaram de 4-12 h, 0,85-1,50 m/s, 50-200 Gauss, respectivamente. Em todos os experimentos, a produção de biomassa foi praticamente constante. Contudo, na melhor condição (4 h, 1,50 m/s e 50 Gauss), a produção em relação ao consumo de substrato e formação de biomassa foi de 3 a 5 vezes maior do que o processo convencional.

Ainda no estudo da influência de CM em processos biológicos, a aplicação de partículas adsorventes em combinação com técnicas de separação magnética tem recebido atenção nos últimos anos. A natureza sensível das partículas magnéticas permite sua manipulação e separação seletiva na presença de outros sólidos suspensos. Assim, torna possível selecionar espécies-alvo magneticamente distintas de processos biológicos, eliminando algumas fases de tratamento prévio de amostras, como centrifugação, filtração e separação por membrana. As separações magnéticas são rápidas e possibilitam separações impossíveis de serem obtidas por outras técnicas. Elas têm demonstrado credibilidade em ampla gama de processos, como tratamento de minerais e tratamento de águas residuárias (FRAZREB, 2006).

### **3.5 Campos Magnéticos no Cultivo da Levedura *Saccharomyces***

Os estudos da influência de CM em processos biológicos ainda estão em desenvolvimento, por este motivo, há certa escassez de trabalhos na linha de pesquisa que se refere à levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Van Nostran et al. (1967) avaliaram durante o crescimento de *S. cerevisiae*, o efeito da aplicação de CM a diferentes pressões osmóticas e temperaturas. O CM foi gerado através de bobina e o campo aplicado foi de 0,46 T. As concentrações celulares foram medidas nos tempos de 24, 48 e 72 h. A análise estatística mostrou que o maior efeito foi dos CM, que reduziram a concentração celular ao longo do tempo. Também foram observadas interações significativas entre a temperatura e o CM em 24 h e entre a temperatura e a pressão osmótica em todos os tempos.

A influência da aplicação de CM de 1,5 T por 15 h no crescimento de *S. cerevisiae* ATCC 7752 foi avaliada por Malko et al. (1994). Para tal, foi usado um “*clinical magnetic resonance imager*”, comparando os resultados com e sem a aplicação de CM, foi observado

que não houve diferença estatística entre os ensaios. Ou seja, a aplicação do CM de 1,5 T não aumentou a taxa de crescimento da levedura.

Através da utilização de dispositivo comercial gerador de CM, Pichko e Povalyaeva (1996) verificaram o efeito dos CM de baixa frequência (50 Hz e 0,1 T) em alguns micro-organismos. Com a *S. cerevisiae* XII ocorreu aumento de 12% no acúmulo de biomassa com uma exposição ao CM de 40 min.

Ivanova et al. (1996) analisaram a viabilidade da aplicação do CM máximo de 540 Oe no processo de fermentação contínua para a produção de etanol, com células de *S. cerevisiae* imobilizadas e meio de cultura composto por glicose (concentração de 110 g/L) e nutrientes na temperatura de 32°C. O processo de fermentação foi realizado com CM transversal ao escoamento do fluido. Como resultado, houve aumento na concentração de etanol e velocidade de consumo de substrato, comparando-se ao processo convencional.

Mehedintu e Berg (1997) estudaram a resposta do crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* H192 à aplicação de CM, numa região de indução magnética de 0,2 a 0,5 mT, produzidos por par de bobinas Helmholtz (5 cm de diâmetro) e com frequência entre 10 e 100 Hz. Os experimentos tiveram duração de 10 h, com amostras a cada 2 h. Os autores observaram que a 50 Hz e 0,2 mT ocorreu inibição no crescimento celular de aproximadamente 16%, em relação ao controle, enquanto que a 50 Hz e 0,5 mT, foi observado efeito estimulante no crescimento celular de 25 %, aumentando também a produção de ATP. A temperatura influenciou o efeito do CM aplicado, demonstrando que o número de parâmetros envolvidos na eletroestimulação é maior do que o inicialmente estimado.

Binninger e Ungvichian (1997) estudaram os efeitos do CM de baixa frequência (60 Hz) na expressão genética da *S. cerevisiae*. Para isto, utilizaram exposições contínuas de 20  $\mu$ T durante um período de 15 gerações (aproximadamente 24 h). Como a exposição ao CM não afetou significativamente a taxa de crescimento, foram investigados os efeitos celulares menos evidentes. As mudanças na quantidade de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) foram determinadas por eletroforese em gel. Na maior parte do RNAm examinado (44 a 67%), os efeitos nos níveis transcritos não foram diferentes daqueles observados nos experimentos expostos. Porém, uma proporção significativa de RNAm (26 a 38%) foi aumentada em duas vezes nas células expostas ao CM, e só uma pequena porcentagem de RNAm (7 a 18%) mostrou níveis inferiores aos das células controle (inferior a 50%).

Motta et al. (2001) estudaram a mudança no desenvolvimento de *S. cerevisiae* DAUFPE- 1012 na presença de CM. As culturas foram expostas a CM de 1100 e 2200 Gauss para que fossem observadas eventuais alterações no crescimento celular e na atividade metabólica do micro-organismo, estimada pelo dióxido de carbono produzido e pelas alterações do pH do meio. Para análise do crescimento da biomassa, frascos de vidro contendo 10 mL do meio de fermentação (glicose 2%) e inoculados com 10% de suspensão celular foram incubados a 25°C por 24 h. A cada 2 h, uma alíquota era retirada para análise do crescimento celular. Um sistema de reatores idêntico foi montado para a determinação da produção de CO<sub>2</sub>, estando os frascos fechados e na presença de um manômetro. Os resultados apresentaram incremento no crescimento celular de 1,84% e na produção de CO<sub>2</sub> de 36,1% quando na presença da indução magnética de 2200 Gauss, comparadas com o grupo de controle (sem CM). Além disso, notou-se maior acidificação nas culturas magnetizadas, provocada pelo aumento da atividade metabólica.

Barboza (2002) verificou o comportamento da variação da população de *S. cerevisiae* (fermento liofilizado) em placas de Petri submetidas a CM de 31 mT, produzido através de ímãs colocados em cima e embaixo de cada placa. Para os ensaios controle algumas placas foram deixadas nas mesmas condições, mas sem a influência dos CM. O ensaio foi conduzido

por 30 h e alíquotas foram retiradas para análise de microscopia. A contagem realizada no microscópio óptico foi 50% menor para o grupo tratado com CM, em relação ao grupo controle.

Zapata et al. (2002) estudaram os efeitos dos CM no crescimento de *S. cerevisiae* 1320 (Laboratórios Alfred Jorgesen). O crescimento do micro-organismo em meio líquido foi feito durante 15 a 18 h. Os CM foram gerados através de bobinas (diâmetro interno 3,8 cm) e a determinação da concentração celular foi feita através da medida do peso seco. Foram feitos alguns planejamentos experimentais para avaliar a influência do tempo de aplicação do CM (5 a 325 s), da frequência (10 a 100 kHz) e do fluxo deste campo (2 a 62  $\mu$ T). A combinação destas variáveis na qual foi obtida a maior concentração celular foi 30 s, 100 kHz e 20 mG (2  $\mu$ T). Nestas condições os valores foram 30% maiores que no cultivo controle. Estes mesmos autores citaram que no trabalho de Galar e Martínez (1985) foi observado que CM com frequências de 120, 60 e 0 Hz têm efeitos diferentes sobre o crescimento de *S. cerevisiae*, sendo estimulantes, inibitórios e nulos, respectivamente.

Iwasaka et al. (2004) avaliaram o efeito dos CM no comportamento da levedura *S. cerevisiae* IAM7148 cultivada em meio líquido e exposta a campo de 5 a 14 T (gerado através de ímã supercondutor). Após 16 h de incubação a velocidade de crescimento diminuiu. As propriedades físicas do meio de cultura foram avaliadas com o objetivo de descobrir o mecanismo responsável pelo decréscimo celular com a aplicação do CM. A mudança dos processos de transporte gasoso, a pressão hidrostática exercida na levedura e a mudança na sedimentação da levedura, podem ser os efeitos do CM sobre o sistema de respiração da levedura que causaram as mudanças observadas no comportamento desta.

Motta et al. (2004) também estudaram o efeito do CM na fermentação alcoólica, utilizando-se glicose como substrato. O sistema era composto por dois reatores de 200 mL de capacidade nominal, agitados mecanicamente e a 23°C. Cinco pares de magnetos foram colocados diametralmente opostos ao redor da parede de um dos reatores, possibilitando exposição da *S. cerevisiae* à indução magnética de 2200 Gauss. Amostras do meio de cultura, composto por extrato de levedura e glicose (2 %), foram retiradas em intervalos de 2 h durante 24 h para determinação da concentração celular, de glicose e de etanol. Os resultados apontaram acréscimo da concentração celular em 2,5 vezes e da concentração de etanol em 3,4 vezes, nas culturas magnetizadas comparadas as que não foram expostas ao campo.

Ruiz-Gómez et al. (2004) observaram o comportamento da *S. cerevisiae* WS8105-1C quando as culturas foram expostas a CM obtidos através de um par de bobinas Helmholtz (40 cm de diâmetro). Os ensaios foram conduzidos a 50 Hz, com 0,35 ou 2,45 mT e o tempo de incubação foi de 24 ou 72 h. Paralelamente, foi conduzido ensaio controle e nas condições avaliadas não houve alterações no crescimento celular. Estes resultados estão em discordância com os trabalhos de Mehedintu e Berg (1997) e Motta et al. (2004). São muitos os parâmetros que influenciam os ensaios: intensidade do CM, frequência, tempo de exposição, tipo de célula, temperatura e estado biológico das células. A discordância dos resultados pode ser explicada através das diferentes condições de produção dos CM, bem como o controle de todos os parâmetros acima citados.

Zapata et al. (2005) utilizaram leveduras comerciais de panificação (*S. cerevisiae*) adquiridas na cidade de Medellín, Colômbia. Os ensaios foram feitos em fermentadores de 400 mL, a 25°C e com 1 vvm. Para obter os CM foi utilizado um sistema de bobinas (diâmetro 8,2 cm), sendo o campo de 250 mG (25  $\mu$ T) e o tempo de aplicação de 200 s. Foram feitos quatro ensaios (A, B, C e D). Os ensaios A e B foram realizados com aplicação de CM antes de iniciar o cultivo, porém o ensaio A foi feito sem aeração e o ensaio B com aeração. O ensaio C foi com aeração e com duas aplicações de CM antes de iniciar o cultivo e após 4 h de cultivo. O ensaio D com aeração e com três aplicações, antes de iniciar o cultivo, com 2 h e 4

h de cultivo. O melhor resultado foi obtido no ensaio B após 25 h de cultivo, a concentração celular chegou a aproximadamente 27 g/L, 14,4% maior em relação ao cultivo sem CM.

Novák et al. (2007) testaram a aplicação de CM com auxílio de uma bobina (diâmetro de 23,5 cm) no cultivo de *S. cerevisiae* CCY 21-4-59. A corrente elétrica aplicada foi de 1,9 A, gerando um CM de 10 mT e o tempo de aplicação foi de 60 min. Foram observados efeitos inibitórios nos ensaios em placas de petri com ágar, como em meio líquido em frascos Erlenmeyer. A inibição ocorreu logo no início da aplicação do CM. Os autores comparam os resultados deste trabalho com *S. cerevisiae* com outros trabalhos feitos com bactérias (*E. coli*, *L. adecarboxylata* e *S. aureus*) e concluíram que as bactérias são mais sensíveis à aplicação de CM do que as leveduras.

Perez et al. (2007) estudaram o efeito de CM na produção de etanol durante a fermentação em batelada, utilizando-se caldo de cana como substrato. O meio de cultura do fermentador fazia reciclo externamente por um tubo de aço inoxidável inserido em dois geradores de CM. A velocidade de recirculação e a intensidade do CM variaram de 0,6-1,4 m/s e 50-200 Gauss, respectivamente. Como resultado foi observado aumento de 17% na produtividade, na melhor condição de tratamento (0,9-1,2 m/s e 200 Gauss) comparado ao processo convencional. Enquanto o processo tradicional de fermentação demorou 15 h, com a aplicação dos ímãs acoplados ao biorreator esse tempo foi reduzido para 13 h. Segundo os autores, o ganho de produção foi possível porque o CM alterou o metabolismo das leveduras e aumentou a produtividade, sendo tal efeito justificado pela influência do CM sobre as membranas celulares, alterando a permeabilidade à passagem de nutrientes. Assim, a permeabilidade aumenta, o transporte de substrato no interior da célula também aumenta, resultando em maior produção de etanol. Embora o resultado tenha sido comprovado pelos pesquisadores, esses efeitos biológicos dos CM ainda não foram completamente elucidados. Outra hipótese atribuiu ao CM à capacidade de atingir, de alguma forma, as enzimas que são os catalisadores biológicos, deixando-as numa conformação mais apropriada para atuar no substrato e nos outros compostos do processo.

Santos (2008) com a aplicação dos CM utilizando um magnetizador observou efeitos estimulantes para a produção de GSH e de biomassa. A maior concentração celular (19,5 g/L) e de GSH (271,9 mg/L) foram conseguidas no ensaio com aplicação de CM durante 72 h de fermentação, representando incremento de 2,63% e 32,1% em relação ao ensaio controle.

De acordo com Santos et al. (2010), a aplicação de CM por bobinas gerou estímulos satisfatórios na produção de GSH e de biomassa em cultivo de *S. cerevisiae* ATCC 7754. A maior concentração de GSH foi de 340 mg/L, quando foi aplicado 25 mT por 16 h e nas seguintes condições de cultivo: 20°C, 200 rpm, pH<sub>inicial</sub> 5,0, 54 g/L de glicose e 50 g/L de extrato de levedura, 12 g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5% de inóculo (v/v), 3,2 vvm e com adição dos aminoácidos precursores durante a fermentação.

Em relação aos trabalhos com *S. cerevisiae* na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos por diferentes autores com respeito a aplicação de CM; pode-se observar que dependendo da intensidade do campo e do tempo de exposição foram observados efeitos nulos, estimulantes ou inibitórios quanto ao crescimento celular.

**Tabela 3:** Efeitos dos CM na concentração celular de *S. cerevisiae* obtidos por diferentes autores.

Cepa	Intensidade (mT)	Tempo de exposição (h)	Efeitos na concentração celular*	Autores
XII	100	0,67	+ 12 %	Pichko e Povalyaeva (1996)
H 192	0,2 (50 Hz) 0,5 (50 Hz)	10	- 16% + 25%	Mehedintu e Berg (1997)
DAUFPE-1012	220	24	+ 30%	Motta et al. (2001)
Fermento comercial	31	30	- 50%	Barboza (2002)
1320	0,002	0,0083	+ 30%	Zapata et al. (2002)
DAUFPE-1012	220	24	+ 250%	Motta et al. (2004)
WS8105-1C	0,35-2,45	24-72	sem efeito	Ruiz-Gómez et al. (2004)
Fermento comercial	0,025	0,055	+ 14,4%	Zapata et al. (2005)
DAUFPE-1012	220	24	+ 135%	Muniz et al. (2007)
CCY 21-4-59	10	1	inibitório	Novák et al. (2007)
ATCC 7754	25	16	+ 43,1%	Santos (2008)

\* (+) efeito estimulante (-) efeito inibitório

### 3.6 Utilização do Biorreator “Air-lift” em Processos Fermentativos

Os biorreatores nos processos fermentativos devem criar ambiente propício para o crescimento e a atividade dos micro-organismos. Para isto, deve ser projetado de forma a permitir o estreito contato entre o meio e o micro-organismo, durante o cultivo. Um biorreator, para ser considerado ideal, deve ser construído com material atóxico, sendo capaz de suportar altas pressões, para o caso das esterilizações ou no caso de trabalhos pressurizados; possuir sistema de agitação e/ou aeração, bem como permitir a retirada periódica de amostras, sem comprometer o processo; possuir um mecanismo de resfriamento, de forma a controlar a temperatura do ambiente de reação e, por fim, ser capaz de operar em condições assépticas (THIEMANN, 2001).

Muitos processos biológicos requerem oxigênio; devido a sua baixa solubilidade o abastecimento contínuo é requerido à taxas suficientes para manter a reação, porém quando existe uma limitação no processo como, por exemplo, a necessidade de maior transferência de massa gás-líquido, outros tipos de biorreatores, tais como o “air-lift”, são considerados eficiente (CHISTI, 1993).

Quando usados para processos biológicos têm a vantagem, em relação a reatores convencionais, de contarem com altos coeficientes de transferência de oxigênio e sua geometria oferecerem inúmeras vantagens, incluindo construção e operação simples, baixa

potência requerida por não conterem partes móveis e circulação direcionada do fluido (WANG BANG et al., 1998).

A simples construção dos biorreatores “air-lift” possibilita manutenção fácil e barata. Como não existem partes mecânicas móveis necessárias para a agitação, há redução do perigo de contaminação, pois facilita a limpeza e a esterilização. A injeção do gás serve para agitar e aerar, eliminando o gasto de energia para agitação, e promovendo aumento na capacidade de transferência de massa, calor e diminuindo a tensão de cisalhamento do fluido (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

Muitas aplicações em escala de bancada e em escala piloto têm sido estudadas para uma variedade de micro-organismos e culturas celulares. A maioria enfoca na cinética de crescimento e não no fenômeno de transporte durante as fermentações.

Alguns autores estudaram o “air-lift” como um biorreator potencial para o tratamento de vários resíduos industriais. Huppe et al. (1990) utilizaram uma planta piloto de dois estágios para tratar biologicamente efluentes de refinaria de carvão. Tyagi et al. (1990) utilizaram “air-lift” com circulação externa para estudar a digestão aeróbica mesofílica e termofílica de lodos municipais primários e secundários.

Frohlich et al. (1991), Wu e Wu (1991) e Pollard et al. (1996) estudaram o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em biorreatores “air-lift” testando diversas configurações físicas e conseguiram melhorar o desempenho dos próprios biorreatores.

Bonnarme et al. (1993) relataram a superioridade dos biorreatores “air-lift” e coluna de bolhas em relação ao de tanque agitado, na produção de metabólitos por micro-organismos sensíveis ao cisalhamento provocado pelos agitadores mecânicos (STR).

No trabalho de Bonnarme et al. (1993) foi utilizado com sucesso o biorreator “air-lift” para produção do peptídeo lignina, manganês peroxidases e proteína extracelular do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

Yuguo et al. (1999) demonstraram a vantagem do biorreator “air-lift” de circulação externa na produção de ácido cítrico, a partir da mistura de batata doce desidratada com massa seca de *Aspergillus niger*. E no ano seguinte, os mesmos autores Yuguo et al. (2000), testaram outro tipo de micro-organismo com sucesso no “air-lift” com circulação externa e com o biorreator STR para a produção de  $\alpha$  amilase a partir de *Bacillus subtilis* e comprovaram a superioridade na produção da enzima no reator “air-lift”.

Segundo Klein et al. (2002) o sistema de biotransformação de glicose em ácido glucônico por *Aspergillus niger* pode ser bem sucedido se utilizada a determinação da taxa de transferência de oxigênio no “air-lift”, devido sua configuração hidráulica.

Cheng et al. (2002) conseguiram bons resultados no cultivo de *Acetobacter xylinum* para a produção de celulose em reator “air-lift” modificado.

A produção de ácido itacônico (OKABE et al., 1993), de *S. cerevisiae* (GHOSH e BHETTACHARYYA, 1993), de bactérias lácticas (TRYSTAM e PIGACHE, 1993), de proteinase (ALEKISIEVA e PEEVA, 2000), produção de PHB (TAVARES e PRADELA, 2000), bem como o tratamento de águas residuárias com utilização de partículas imobilizadas (HEIJNEM et al., 1992) têm sido estudados em reatores “air-lift”.

Entretanto, na literatura ainda não existe pesquisas quanto à produção de GSH com os reatores “air-lift”. Deste modo, a utilização deste tipo de biorreator para a produção de GSH torna-se uma recente tecnologia a ser explorada.



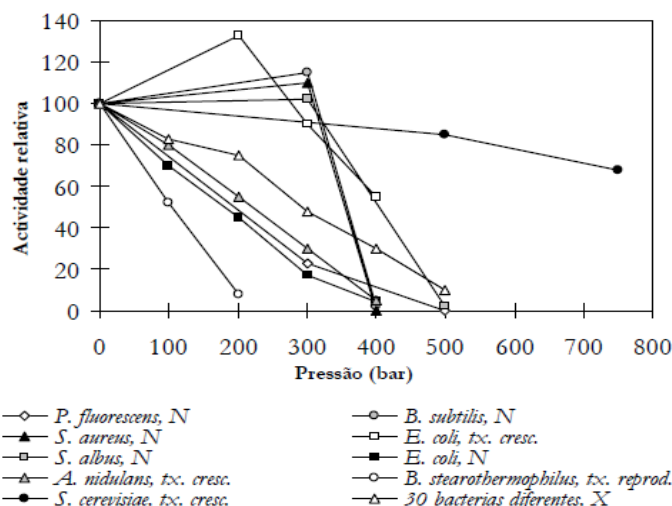
### 3.7 Efeitos da Pressão no Cultivo de Micro-organismos

A classificação da pressão em alta ou moderada é relativa, dependendo da área de investigação e da área de aplicação tecnológica. Quer seja na natureza ou em processos industriais, a pressão pode apresentar valores entre 1 bar e 1.000.000 bar. A separação da gama de pressão foi adotada em biologia por Johnson et al. (1954), que classificou em “muito altas” as pressões acima de 1000 bar e em “moderadas ou altas” as pressões com valores compreendidos entre a pressão atmosférica e 1000 bar.

Altas pressões causam mudanças morfológicas, bioquímicas e genéticas, principalmente na membrana e na parte intracelular dos micro-organismos. Além disso, provocam mudanças no funcionamento e na reprodução (CHEFTEL, 1992), porém as seguintes mudanças morfológicas das células foram observadas: compressão dos vacúolos gasosos (WALSBY, 1972), alongamento das células, contração da parede celular com formação de poros, modificação do núcleo (CHEFTEL, 1992), modificações nas organelas intracelulares e no citoesqueleto, separação da membrana da parede celular, coagulação de proteínas citoplasmáticas e liberação de constituintes intracelulares para fora da célula (CHEFTEL, 1995).

A pressão acelera as reações químicas, envolvendo mudanças de volume em nível molecular, que constituem a chave para entender os efeitos biológicos nas macromoléculas e micro-organismos (HUGAS et al., 2002). Outros autores acrescentam que a eficiência da tecnologia está nas alterações morfológicas e bioquímicas, assim como nos mecanismos genéticos e na funcionalidade das membranas e paredes celulares dos micro-organismos (HOOVER et al., 1989; CHEFTEL, 1995). Entretanto, o principal efeito causado pela pressão ocorre na membrana celular (HOOVER et al., 1989).

O modo com que cada micro-organismo responde às pressões está relacionado com o seu crescimento, tipo de estrutura, mecanismos ligados a genética e formação de produtos, como está sendo exemplificado na Figura 4.



**Figura 4:** Efeito da pressão na atividade microbiana. A atividade é analisada pela densidade de células expressa em número de células por mililitro (N) e a concentração de células (X), ou pelas taxas de crescimento e reprodução.

(Fonte: CHEFTEL, 1995).

Pôde-se observar que para pressões superiores a 300 bar, existe uma tendência geral para a inibição do crescimento, embora alguns micro-organismos possam contrariar esta tendência, como é o caso da levedura *S. cerevisiae*. Esta última apresenta comportamento estável e elevado para pressões superiores a 700 bar.

O efeito da pressão sobre o crescimento e o metabolismo dos micro-organismos também está dependente dos métodos e sistemas de pressurização utilizados. A pressão pode ser aplicada hidrostáticamente (compressão de um líquido) e hiperbaricamente (compressão de gases).

Por exemplo, no caso da produção de ácido cítrico a partir de culturas de *Aspergillus niger* em cultivo descontínuo, em culturas ricas em melaço, Clark e Lentz (1961) observaram que, com uma pressão parcial de oxigênio (1,7 bar) era possível aumentar a produtividade máxima deste ácido. Neste trabalho a limitação de oxigênio era bastante acentuada.

Outro exemplo da utilização da pressão é o aumento de um constituinte celular. No trabalho realizado por Young (1969) com células de bactéria de *Pseudomonas saccharophila*, o aumento da pressão de oxigênio puro até 1 bar aumentou o conteúdo em polissacarídeos das células desta bactéria. A Tabela 4 mostra as diferentes respostas frente à aplicação de pressão no cultivo de diversos micro-organismos.

**Tabela 4:** Diferentes respostas às pressões aplicadas no cultivo de diversos micro-organismos.

Micro-organismos	Pressão (bar)	Efeitos*	Referências
<i>Staphylococcus aureus</i>	1-30	Inibição do CC	Hedén e Malmberg (1961)**
<i>Escherichia coli</i>	1-60	Inibição do CC	Hedén e Malmberg (1961)**
<i>Candida utilis</i> e <i>S. cerevisiae</i>	10	Inibição do CC	Gifford e Pritchard (1969)
<i>Candida utilis</i>	1-7	Diminuição do CC; não afetou o $\mu_{m\acute{a}x}$	Onken et al. (1984)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1-8	Inibição do CC	Onken e Jostmann (1984)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1-6	Diminuição do CC; diminuição do $\mu_{m\acute{a}x}$	Kataoka et al. (1986)
<i>S. cerevisiae</i>	7,0	Inibição da produção de etanol	Thibault et al., (1987)
<i>Candida tropicalis</i>	8,1	Aumento no rendimento em ácido cítrico	Okoshi et al., (1987)
<i>Escherichia coli</i> TB1	4,8	Aumento na produtividade da proteína recombinante em cultura semi-contínua	Belo e Mota, (1998)
<i>Thermus</i> sp. RQ-1	5,6	Aumento da produtividade em biomassa	Belo, Pinheiro e Mota (2000)

\* CC crescimento celular

\*\* citado por Onken e Liefke (1989)

É de grande interesse industrial maximizar a produtividade, assim como a taxa de formação de produto. Devido a este fato, torna-se imperativo estudar qual o efeito da pressão de gases na produtividade de algumas espécies, nomeadamente as de interesse industrial, a partir desta necessidade, inúmeros investigadores têm utilizado reatores hiperbáricos para simular, em laboratório, ambientes de alta pressão (TAYLOR, 1979; STURN et al., 1987; MILLER et al., 1988; NELSON et al., 1991).

Quando os processos biotecnológicos em foco se situam na área da tecnologia das fermentações, é claro que os efeitos da alta pressão não são relevantes nos processos aeróbios, uma vez que, os biorreatores industriais operam à pressão atmosférica ou ligeiramente sobre pressão, podendo suportar valores de pressão de 3 a 4 vezes o valor de operação (margem de segurança). É sabido que a atividade microbiana é afetada por oscilação de pressão, ainda que de forma ligeira. A partir destes resultados, é bastante claro que o aumento da pressão parcial de oxigênio tem efeitos bastante distintos. Os efeitos positivos da pressão podem estar diretamente relacionados com o melhoramento da taxa de transferência de oxigênio, ou podem ser estar de alguma forma relacionada com a indução do metabolismo celular, enquanto os efeitos negativos estão apenas relacionados com mecanismos metabólicos (ONKEN e LIEFKE, 1989).

Nelson et al. (1992) demonstraram que os efeitos da pressão hidrostática e hiperbárica sobre o crescimento de bactéria marinha são consideravelmente diferentes, variando o tempo e a quantidade de pressão aplicada.

A utilização da pressão de gases pode também ser aplicada na otimização da produção de proteína recombinante. Belo e Mota (1998) demonstraram que a utilização de ar hiperbárico até 4,8 bar permitiu aumento de cerca de 4 vezes na produtividade em citocromo b5, relativamente a cultura realizada à pressão atmosférica, em processo descontínuo de *Escherichia coli* TB1.

Belo, Pinheiro e Mota (2000) obtiveram aumento de produtividade da estirpe termófila de *Thermus sp.* RQ-1 quando usaram ar hiperbárico a 5,6 bar em biorreator de pressão.

Dong et al. (2007) avaliaram o efeito de altas pressões no acúmulo de GSH e trealose em *S. cerevisiae*. O tempo de cultivo foi de 36 h, sendo que pressões de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 MPa foram aplicadas por 2 h. Numa etapa posterior pressões de 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 MPa foram aplicadas por tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 h. O melhor resultado foi observado com pressão de 1,0 MPa por 6 h, a concentração de GSH foi de 103 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub> e este valor foi 68,8% maior em relação ao cultivo a pressão atmosférica.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Meio de Cultivo e Manutenção da Cepa Escolhida Para Produção de GSH

O micro-organismo utilizado para a produção de GSH foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, obtido junto à coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas-SP). Para a manutenção da cepa foi usado ágar inclinado utilizando o meio YM (yeast extract-malt extract) e os tubos foram mantidos sob refrigeração (4°C). Na Tabela 5 é apresentada a composição do meio YM.

**Tabela 5:** Composição do meio para manutenção da cepa em g/L.

Composto	Concentração
Glicose	10
Peptona	5
Extrato de Levedura	3
Extrato de Malte	3
Ágar	20

### 4.2 Preparo do Inóculo

A obtenção do inóculo foi realizada em “shaker” (CERTOMAT<sup>®</sup> BS-1 ALEMANHA), utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL de meio YM sem ágar (Tabela 5) esterilizado a 121°C por 15 min. As condições de cultivo para o preparo do inóculo foram 30°C e 150 rpm durante 24 h.

### 4.3 Composição do Meio de Cultivo para Produção de GSH

Na Tabela 6 é mostrada a composição do meio de cultivo utilizada nas fermentações para produção de GSH, de acordo com Santos (2008). A glicose foi esterilizada a 121°C por 15 min à parte, para não ocorrer reação de Mayllard. Os ajustes de pH foram realizados antes e depois da esterilização, com HCl ou NaOH 2 N, conforme necessário.

**Tabela 6:** Composição do meio utilizado para a produção de glutatona.

Composto	Concentração
Glicose	54 g/L
Extrato de Levedura	50 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	12 g/L

### 4.4 Ensaios com Diferentes Pressões

As fermentações foram realizadas no biorreator “air-lift” de tubos concêntricos construído em aço inox, dotado de camisa de aquecimento ou resfriamento, com volume total

de 4,5 L e útil de 3,5 L (Figura 5). A pressão no sistema estudado variou em 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; e 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>, para se determinar em qual pressão a levedura produz a maior concentração de GSH e concentração celular. A leitura da pressão foi realizada em manômetro com capacidade de medição de 0-2 kgf/cm<sup>2</sup>.

A aeração no biorreator foi obtida através de compressor (WAYNE<sup>®</sup>, São Paulo/Brasil), sendo 2 filtros de drenos na linha de aeração e 1 válvula reguladora de pressão de linha foram utilizados para que o sistema se mantivesse pressurizado e estável. A temperatura foi mantida a 20°C através de banho termostatzado (TE 2005 TECNAL<sup>®</sup>, São Paulo/Brasil) que foi acoplado ao fermentador. O volume de meio da fermentação utilizado (meio + inóculo) foi de 1,5 L. Antes da adição de 5% (v/v) de inóculo, a glicose foi misturada aos outros componentes e o pH<sub>inicial</sub> do meio ajustado para 5,0. O tempo total das fermentações foi de 96 h com retirada de amostras em intervalos pré-determinados.

A adição de 2 mM de cisteína foi feita após 6 h de iniciada a fermentação e após 28 h foram acrescentados mais 3,35 mM de cisteína, 10 mM de ácido glutâmico e 18 mM de glicina. Os aminoácidos foram dissolvidos em quantidades suficientes de água destilada e esterilizados separadamente em frascos Erlenmeyer.

Na Figura 5 é mostrada a foto do biorreator “air-lift” utilizado nos ensaios.



**Figura 5:** Foto do biorreator “air-lift”.

#### **4.5 Ensaios Sem Aplicação de Campos Magnéticos (Controle)**

Com o objetivo de avaliar somente a influência dos CM na produção de GSH, primeiramente foi necessário realizar alguns ensaios controle. Estes ensaios foram realizados nas mesmas condições de pressão e velocidade de reciclo celular dos ensaios do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com aplicação de CM. Nestes ensaios, o que diferenciou para o planejamento fatorial foi à ausência de exposição aos ímãs (CM).

Na Tabela 7 são apresentados os valores reais da pressão e velocidade de reciclo celular dos ensaios controle.

**Tabela 7:** Ensaios sem aplicação de campos magnéticos (controle)

Ensaios	Pressão (kgf/cm <sup>2</sup> )	Reciclo Celular (cm/s)
1	0,5	3,0
2	1,5	3,0
3	0,5	15,0
4	1,5	15,0
5	1,0	9,0

#### 4.6 Ensaios com Aplicação de Campos Magnéticos

##### 4.6.1 Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup>

Com o propósito de avaliar a influência de CM na produção de GSH, nesta segunda etapa, foi proposto um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, contendo 4 ensaios e 3 pontos centrais, totalizando 7 ensaios, utilizando as pressões nas quais foram obtidos os melhores resultados de GSH na primeira etapa.

As variáveis estudadas foram a pressão e a velocidade de reciclo celular. Após a primeira etapa (ensaios somente com variação de pressão), foram dispostos junto ao “air-lift” 2 pares de ímãs compostos por ferrite com dimensões (16 x 2 cm) distanciados a 1,0 cm entre si. Ao longo das fermentações, o meio circulou entre os ímãs, através da utilização de mangueiras de silicone (D<sub>externo</sub> 7,0 mm e D<sub>interno</sub> 5,0 mm), acopladas na entrada e saída da parte inferior e superior do “air-lift”, promovendo reciclo contínuo através de bomba peristáltica (BP- 600, MILLAN<sup>®</sup>, BRASIL), com variações de 0 a 30 rpm (0-15 cm/s), permitindo o ajuste do reciclo.

As condições de concentração de inóculo, meio de cultivo, pH, tempo e temperatura foram mantidas. Na Tabela 8, tem-se a matriz do delineamento experimental 2<sup>2</sup>, com seus níveis codificados e reais (entre parênteses) para cada variável estudada.

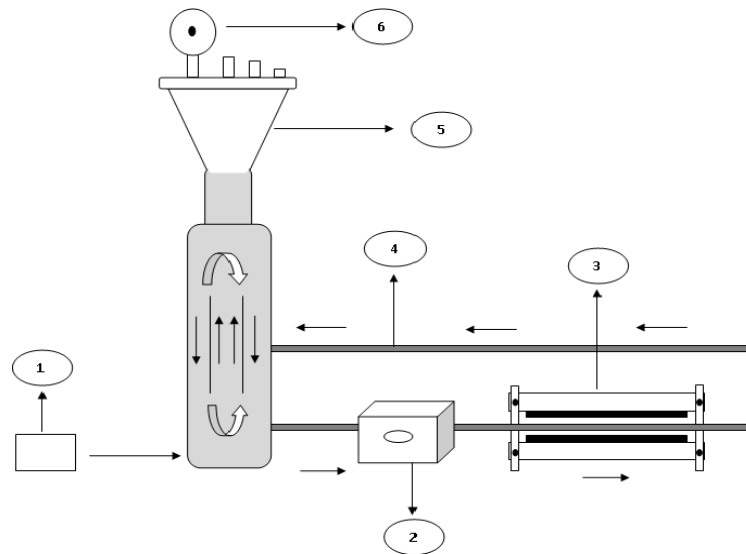
**Tabela 8:** Matriz do planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> com seus níveis codificados e reais (entre parênteses).

Ensaios	Pressão (kgf/cm <sup>2</sup> )	Reciclo celular (cm/s)
1PF	-1 (0,5)	-1 (3,0)
2PF	+1 (1,5)	-1 (3,0)
3PF	-1 (0,5)	+1 (15,0)
4PF	+1 (1,5)	+1 (15,0)
5PF	0 (1,0)	0 (9,0)
6PF	0 (1,0)	0 (9,0)
7PF	0 (1,0)	0 (9,0)

Os níveis de indução magnética aplicados sobre o meio variaram entre 1,01 a 6,63 mT. O valor médio de indução aplicado sobre o meio foi de 3,02 mT.

Como variáveis de resposta (dependentes) foram avaliados o crescimento celular (g/L) e a produção de GSH (mg/L). A análise da matriz das respostas foi realizada através do software *Statistica* versão 7.0.

Na Figura 6, segue o esquema geral das fermentações com o “air-lift” na segunda etapa dos ensaios, com reciclo celular e com aplicação de CM.



**Legenda:**

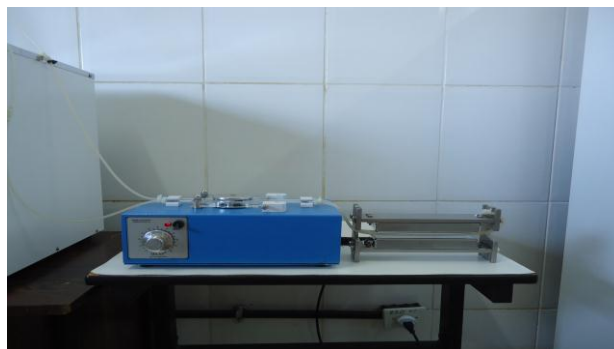
- 1- Compressor de ar
- 2- Bomba peristáltica
- 3- Ímãs

- 4- Mangueiras de silicone
- 5- Biorreator “air-lift”
- 6- Manômetro

**Figura 6:** Layout simplificado das fermentações no “air lift” com aplicação de campos magnéticos.



**Figura 7:** Foto do “air-lift” conectado às mangueiras em conjunto com a bomba peristáltica, passando por entre o par de ímãs nos ensaios com aplicação de campos magnéticos.



**Figura 8:** Reciclo celular através da bomba peristáltica (0 a 30 rpm) com aplicação de campos magnéticos



**Figura 9:** Magnetizador com par de ímãs para geração dos campos magnéticos.

## 4.7 Metodologia Analítica

### 4.7.1 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi feita por espectrofotometria, através da leitura da absorbância do meio de cultura a 600 nm utilizando o espectrofotômetro (BEL photonics 1105, TECNAL<sup>®</sup>, Campinas/Brasil). Todas as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 min e colocadas em cubetas de vidro para leitura direta no espectrofotômetro. Quando necessário (apresentando turbidez acentuada), a amostra foi diluída com água destilada. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado como branco para eliminar a interferência de coloração do meio de cultivo. As análises foram realizadas em triplicata.

Para obter a concentração celular (g/L) foi feita uma curva padrão (anteriormente), sendo a levedura cultivada nas mesmas condições do inóculo. Após 24 h de incubação, 5 mL do meio foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min e o sobrenadante descartado. O centrifugado (massa celular) foi lavado três vezes com água destilada seguindo de secagem em estufa a 105°C até seu peso constante. No restante do meio fermentado foram realizadas diferentes diluições com água destilada e em cada uma delas foi determinada a absorbância por espectrofotometria. Com base nos resultados de massa celular seca foi determinada a concentração celular para cada diluição. A partir destes dados foi plotado o gráfico da absorbância *versus* concentração celular e obtida a curva padrão para cálculo da concentração celular (g/L).



#### 4.7.2 Determinação de pH

A determinação do pH de cada amostra foi realizada através da leitura direta no potenciômetro de bancada (PHS-3B PHTEK®, São Paulo/Brasil), após calibração do aparelho com os padrões 4,0 e 7,0, respectivamente.

#### 4.7.3 Determinação da concentração de glicose residual (consumo de substrato)

A concentração de glicose foi determinada pelo método da glicose oxidase-peroxidase utilizando o “kit” enzimático e colorimétrico (LABORLAB®, Guarulhos/Brasil). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro (BEL photonics 1105, TECNAL®, Campinas/Brasil).

Para a determinação da glicose residual foi utilizado o sobrenadante das alíquotas centrifugadas que foram retiradas durante as fermentações. As amostras foram diluídas em água destilada de acordo com a sua concentração. Em tubo de ensaio, colocou-se 10 µL da solução diluída e 1,0 mL do reativo: glicose oxidase (GOD)-peroxidase (POD). A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 15 min, as medições das absorvâncias foram realizadas a 505 nm, sendo o branco constituído de 10 µL de água destilada e 1,0 mL de reativo GOD-POD. Paralelamente, foi feita a determinação do padrão de concentração conhecida (10 µL do padrão e 1,0 mL do reativo GOD-POD). A concentração de glicose foi obtida dividindo-se a absorvância da amostra pela do padrão, multiplicada pela diluição, quando esta era realizada. As análises foram realizadas em duplicatas e os resultados da concentração expressos em g/L.

#### 4.7.4 Determinação da concentração de glutatona

Para a determinação de GSH foi utilizado o método proposto segundo Owens e Belcher (1965). O meio fermentado foi centrifugado (5 mL) a 3000 rpm por 20 min, o sobrenadante separado das células e armazenado congelado para posterior avaliação da glicose residual. As células foram lavadas com água destilada por três vezes e centrifugadas a 3000 rpm por 15 min. Uma solução de etanol P.A a 40% (v/v) foi adicionada às células e feita a extração de GSH por 2 h a 30°C. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas 3000 rpm por 15 min.

Em tubos de ensaios foram adicionados 0,5 mL do sobrenadante destas amostras referentes à extração de GSH, 1,5 mL do tampão fosfato de potássio (0,5 M; pH 8,0) e 30 µL de solução de DTNB (5,5`-dithiobis-2-nitrobenzoic acid). Após 3 min de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro (BEL photonics 1105, TECNAL®, Campinas/Brasil) a 412 nm. Paralelamente foi feito o branco da reação (duplicata) utilizando a solução de etanol a 40% (v/v).

A quantidade de GSH foi calculada através de uma curva padrão, construída com L-glutathiona reduzida (FLUKA®, JAPÃO) as análises foram realizadas em quadruplicatas e seus resultados expressos em mg/L. Para realização da curva padrão de GSH foi preparada uma solução de L-glutathiona reduzida, dissolvendo-se 0,01 g em HCl 0,01 N (resfriado) avolumado a 100 mL.

A solução de DTNB (FLUKA®, JAPÃO) foi preparada adicionando 0,396 g deste reagente e 0,15 g de NaHCO<sub>3</sub> dissolvidos em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). A solução foi avolumada para 100 mL e armazenada congelada (-15°C) até o momento do seu uso.

#### 4.7.5 Determinação da indução magnética

Nos ensaios feitos com aplicação de CM, foi utilizado um gaussímetro (PHYNE TESLAMETER<sup>®</sup>, 127 V 50-60 HZ 10 VA ALEMANHA), para mensurar os níveis de indução magnética entre os ímãs, de acordo com a disposição das linhas de magnetismo que foram aplicadas sob o meio ao longo das fermentações.

#### 4.8 Cálculos e fórmulas utilizadas durante as análises

As Equações 1 e 2 referem-se às curvas padrões realizadas inicialmente para fins de cálculos da concentração celular e da concentração de GSH. Os valores da correlação ( $R^2$ ) de ambos foram de 0,99.

$$\text{Concentração celular (g/L)} = \text{Abs} + \frac{0,1296}{1,7598} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{Concentração GSH (mg/L)} = \text{Abs} + \frac{0,069}{7,8718} \quad (\text{Equação 2})$$

Através da Equação 3 foi calculada a porcentagem da produção de GSH (%) que relaciona a massa celular de GSH (g) em relação a massa celular (g) para determinado tempo de fermentação.

$$\text{GSH (\%)} = \frac{\text{massa GSH (g)}}{\text{massa celular (g)}} * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

As Equações 4, 5, e 6 foram utilizadas para calcular os fatores de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ) e célula em produto ( $Y_{P/X}$ ), respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{P_{96h} - P_{0h}}{S_{0h} - S_{96h}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{96h} - X_{0h}}{S_{0h} - S_{96h}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_{96h} - P_{0h}}{X_{96h} - X_{0h}} \quad (\text{Equação 6})$$

As Equações 7 e 8 foram utilizadas para cálculos da produtividade em célula ( $P_x$ ), que relaciona a concentração celular sobre determinado tempo e em produto ( $P_p$ ), que relaciona a formação do produto sobre determinado tempo.

$$P_x = \frac{X - X_{0h}}{t \text{ (h)}} \quad (\text{Equação 7})$$

$$P_p = \frac{P - P_{0h}}{t \text{ (h)}} \quad (\text{Equação 8})$$

Para comparar os resultados de concentração celular e de GSH obtidos nos ensaios com aplicação de CM, em relação aos ensaios controle, sem aplicação de CM, foram utilizadas as equações 9 e 10. Sendo que o valor de PDC representa a porcentagem de diferença da concentração celular com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle e o valor de PDG a porcentagem de diferença da concentração de GSH com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle.

$$PDC = \left( \frac{C_C - C_{cc}}{C_{cc}} \right) * 100 \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde:  $C_C$  = concentração celular com aplicação do CM  
 $C_{cc}$  = concentração celular do ensaio controle

$$PDG = \left( \frac{C_G - C_{CG}}{C_{CG}} \right) * 100 \quad \text{(Equação 10)}$$

Onde:  $C_G$  = concentração de GSH com aplicação do CM  
 $C_{CG}$  = concentração de GSH do ensaio controle

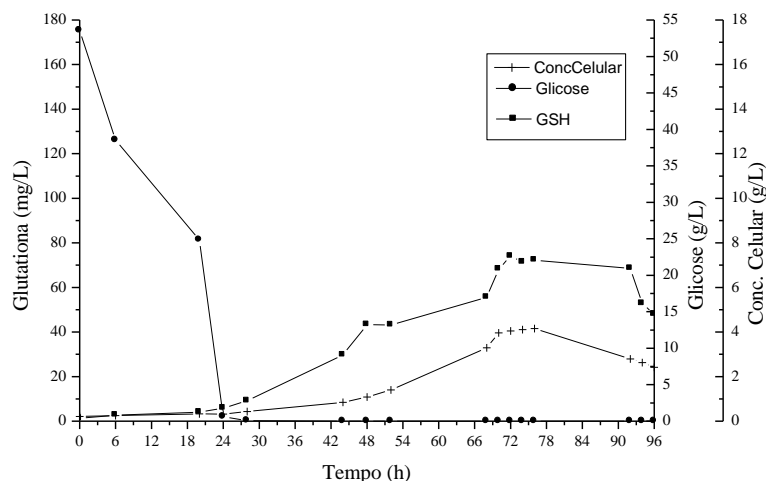
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fermentação no “Air-lift” Somente com Variação de Pressão em Aplicação de Campos Magnéticos

#### 5.1.1 Ensaio com variação de pressão no “air-lift”

O objetivo principal desta etapa foi avaliar as respostas quanto ao crescimento celular das células (g/L), produção de GSH (mg/L) e consumo de substrato (g/L) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, sob diferentes condições de pressão, no biorreator “air-lift” e sem aplicação de CM.

Na Figura 10 são apresentados os resultados da concentração de GSH, celular e consumo de glicose, realizado no biorreator “air-lift” despressurizado. Na Tabela 21 (anexos) além destes resultados é apresentado também o acompanhamento do pH ao longo da fermentação.



**Figura 10:** Fermentações no “air-lift” despressurizado, durante 96 h por *S. cerevisiae*, sem aplicação de CM. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L), (■) e concentração de GSH (mg/L).

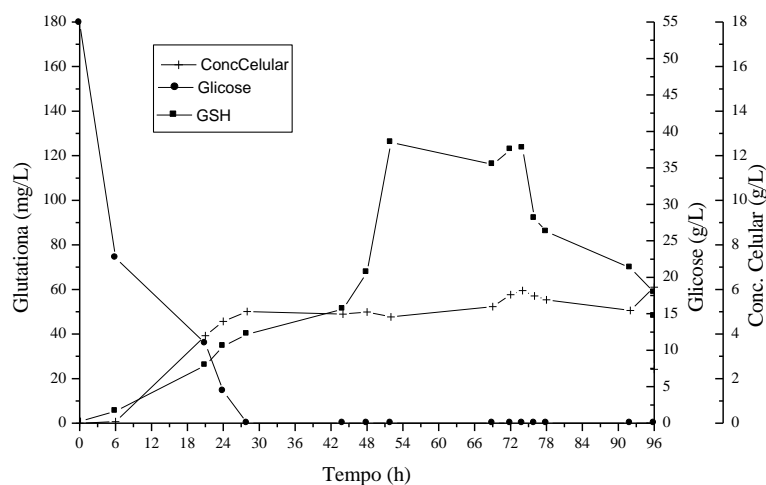
Na Figura 10 pôde-se observar que a glicose foi totalmente consumida pela levedura até 28 h de fermentação. O pH variou de 4,10 a 5,06.

Quanto ao crescimento celular, seus maiores/estáveis valores foram encontrados nos intervalos entre 70 a 92 h, obtendo sua máxima concentração a 76 h de processo (fase estacionária) com 4,15 g/L, sendo esta considerada baixa.

Em relação à produção de GSH, o aumento da produção só começou de fato a partir de 44 h de fermentação. A adição de aminoácidos ocorreu em 28 h, justificando o aumento dos valores. Nos pontos entre 72 e 76 h, houve pouca variação, sendo que em 72 h, foi conseguido seu máximo valor de 74,05 mg/L.

De acordo com os resultados apresentados, o baixo suprimento de ar deste ensaio, inibiu de certa forma o crescimento celular da levedura, bem como na formação da molécula de GSH, pois em cultivos aerados, ocorre uma maior eficiência na transferência de massa e calor.

Na Figura 11 são apresentados os resultados das concentrações de GSH, celular e consumo de glicose, realizado no biorreator a 0,25 kgf/cm<sup>2</sup>. Na Tabela 22 (anexos) também podem ser visualizados todos os valores de pH durante a fermentação.



**Figura 11:** Fermentações no “air-lift” a 0,25 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 96 h de fermentação por *S. cerevisiae*, sem aplicação de CM. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

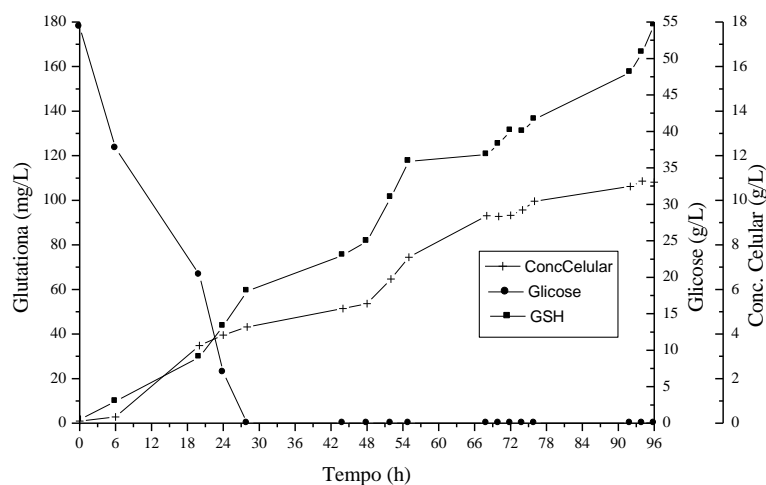
De acordo com os resultados apresentados na Figura 11, observa-se que a glicose foi totalmente consumida pela levedura até 28 h de fermentação. O pH variou ao longo da fermentação de 4,20 a 5,14. Observa-se que a fase lag foi curta, se comparado ao ensaio anterior (despressurizado). Na fase estacionária, observam-se os maiores valores de crescimento celular, permanecendo estáveis até o final da fermentação, não sendo observada a fase de declínio. O valor máximo de concentração celular chegou a 6,10 g/L.

Na fase de latência o crescimento da biomassa foi nulo devido à adaptação das células ao meio de cultura, justificando o pequeno e lento crescimento celular. Na fase exponencial pôde-se observar que a curva apresentou inclinação acentuada, atribuída a fatores e condições favoráveis ao metabolismo, onde a formação de unidades funcionais celulares é máxima. Estes resultados sugerem que a eficiência de oxigenação conferida ao meio foi responsável pelo aumento do crescimento celular no biorreator pressurizado.

Esta comparação também é reportada na literatura nos experimentos de Miller et al. (2007) que avaliou a cinética de crescimento de *Saccharomyces boulardii* em biorreator “air-lift” sob diferentes aerações (1,0 e 1,5 vvm). De acordo com os autores, as velocidades de crescimento foram superiores nos ensaios com 1,5 vvm, encontrando 3,69 g/L em 12 h, comparando-se aos ensaios em shaker (sem aeração) e com aeração de 1,0 vvm, indicando que existe possibilidades de se conseguir maiores velocidades de crescimento celular, dependendo da eficiência de oxigenação fornecida.

Quanto à produção de GSH, os melhores valores foram encontrados a partir de 52 h, permanecendo constante até 74 h. Sua máxima concentração chegou a 125,98 mg/L em 52 h de processo. A partir de 74 h, começou a diminuir a síntese de GSH ou esta foi degradada. Este comportamento confirma o que é exposto na literatura, que a produção de GSH não está diretamente ligada ao crescimento celular do micro-organismo, pois nesta mesma fase onde a concentração de GSH diminuiu o crescimento celular permaneceu elevado e constante.

Na Figura 12 são apresentados os resultados da concentração de GSH, celular e consumo de glicose, no ensaio a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>. Na Tabela 23 (anexos) encontram-se também os valores de pH monitorados durante a fermentação.



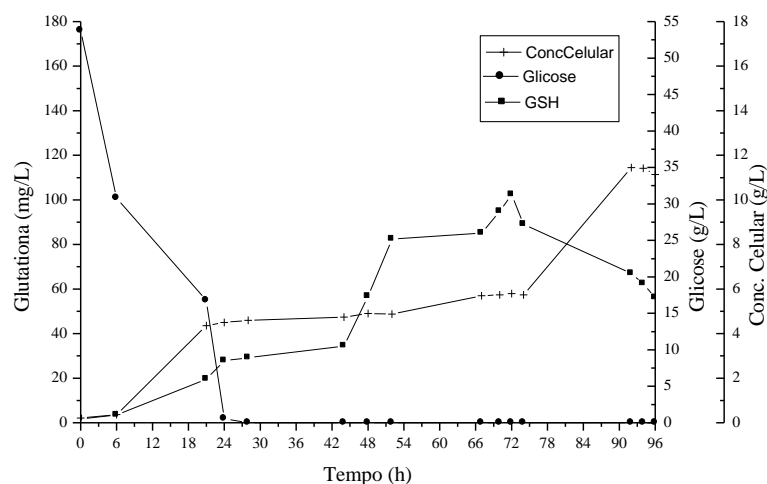
**Figura 12:** Fermentações no “air-lift” a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 96 h de fermentação por *S. cerevisiae*, sem aplicação de CM. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Nos dados visualizados na Figura 12 o consumo total de substrato (glicose) ocorreu entre 24 e 28 h de fermentação. O pH apresentou bastante variação, de 4,57 a 7,60. O valor máximo de concentração celular foi de 10,83 g/L em 94 h. Para a concentração de GSH observa-se que após 28 h, correspondente a adição dos três aminoácidos, houve aumento da concentração e manteve-se ao longo da fermentação, apresentando valor máximo a 96 h, com 178,72 mg/L.

Na Tabela 24 (anexos) encontram-se todos os valores monitorados ao longo da fermentação realizado no biorreator “air-lift” a 0,75 kgf/cm<sup>2</sup> e na Figura 13 são apresentados estes resultados.

De acordo com os valores graficados observa-se que o consumo total de glicose foi entre 24 e 28 h. Os valores de pH oscilaram de 4,30 a 5,12, não se diferenciando muito dos outros ensaios. Os maiores valores para concentração celular foram a 92 h (11,46 g/L) e 94 h (11,49 g/L). Neste ensaio, a fase estacionária foi prolongada, sendo este comportamento diferente em relação aos outros ensaios, (com exceção ao ensaio com 0,25kgf/cm<sup>2</sup>), porém na fase final (92, 94 e 96 h) houve aumento no crescimento celular.

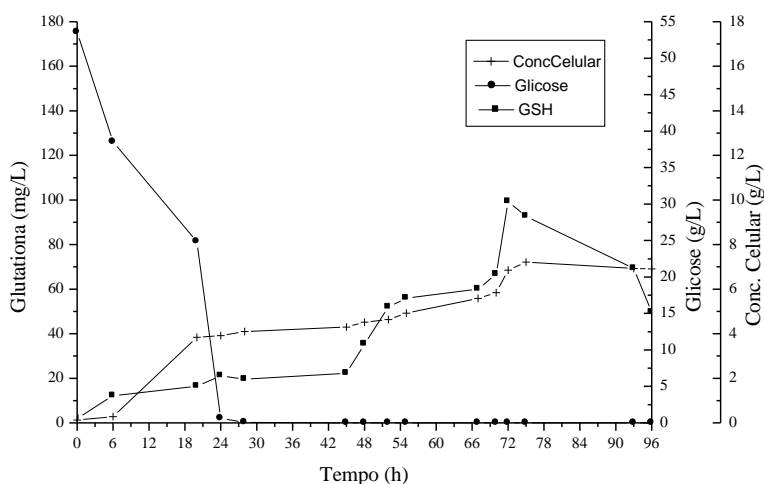
A produção máxima de GSH chegou a 72 h, com 102,39 mg/L e partir deste tempo, seus valores começaram a decair.



**Figura 13:** Fermentações no “air-lift” a 0,75 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 96 h de fermentação por *S. cerevisiae*, sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

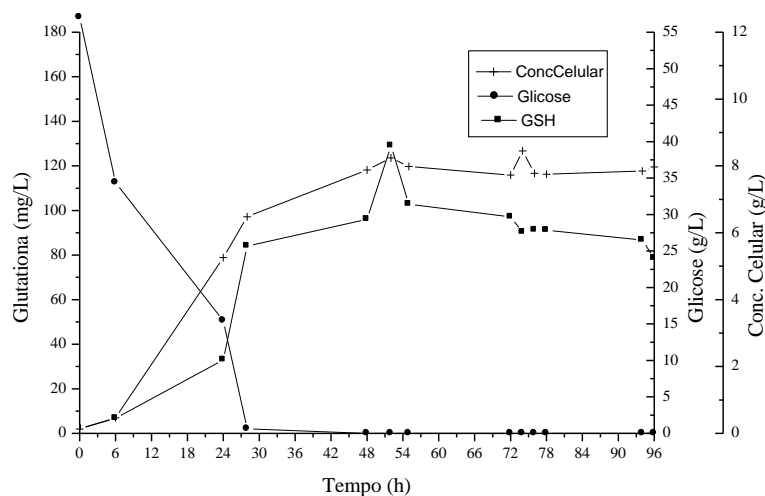
Na Figura 14 são apresentados os resultados da concentração de GSH, celular e consumo de glicose, realizado no biorreator “air-lift” a 1,00 kgf/cm<sup>2</sup>. Na Tabela 25 (anexos), encontram-se todos os valores observados durante esta fermentação.

De acordo com o exposto na Figura 14, a glicose foi completamente consumida até 28 h e o pH oscilou entre 4,18 a 5,36. O maior valor de concentração celular foi encontrado a 75 h com 7,22 g/L, sendo que os valores diminuíram após esse tempo. A concentração de GSH chegou a 99,33 mg/L em 72 h.



**Figura 14:** Fermentações no “air-lift” a 1,00 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 96 h de fermentação por *S. cerevisiae*, sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Os resultados da concentração de GSH, celular e consumo de glicose, dos ensaios a 1,25 kgf/cm<sup>2</sup> podem ser visualizados na Figura 15 e na Tabela 26 (anexos).



**Figura 15:** Fermentações no “air-lift” a 1,25 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 96 h de fermentação por *S. cerevisiae*, sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Com base nestes resultados a concentração celular apresentou seu maior valor de 8,45 g/L em 94 h. Neste ensaio, os valores de crescimento celular mantiveram-se estáveis e com poucas variações a partir de 48 h, podendo-se afirmar que neste tempo ocorreu o início da fase estacionária.

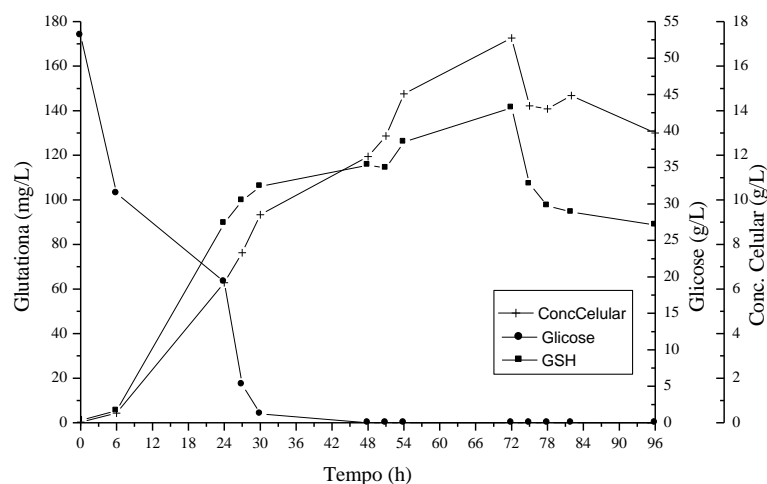
O maior valor encontrado para a produção de GSH foi ao tempo de 52 h com 129 mg/L, após seus valores foram caindo gradativamente. Nesta fermentação, o maior valor encontrado para GSH, foi em tempo mais curto, diferenciando-se das outras fermentações, que obtiveram os maiores valores a partir de 70 h de processo.

Em outro estudo também realizado sob diferentes pressões no biorreator “air-lift” e com o (STR), Pedrosa (2003), avaliou o desempenho dos dois biorreatores para produção de vinagre de maçã por fermentação. Quanto ao crescimento celular, o cultivo no “air-lift” destacou-se com resultados satisfatórios, obtendo uma velocidade específica de crescimento médio de 0,14 d<sup>-1</sup> e no STR obteve-se uma média de 0,10 d<sup>-1</sup>, confirmando a superioridade dos biorreatores de leito fluidizado nas tecnologias que envolvem pressões no cultivo de micro-organismos, em processos fermentativos.

Na Tabela 27 (anexos) pôde-se verificar todos os valores da fermentação a 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> e estes valores foram plotados e apresentados na Figura 16. A partir dos dados desta figura, percebe-se um aumento considerável no crescimento celular da levedura em estudo. Os melhores valores foram obtidos a partir de 72 h, permanecendo estáveis até o final do processo. No tempo de 82 h, foi conseguido a maior resultado para concentração celular, 18,24 g/L. Observou-se neste ensaio que a maior pressão conferida ao sistema, foi eficiente quanto aos mecanismos de reprodução da *S. cerevisiae*. Comparando-o com os ensaios anteriores este foi o melhor resultado de concentração celular.

Quanto ao consumo de substrato, este foi totalmente consumido entre 27 e 30 h, segundo os resultados apresentados. Os valores de pH variaram de 4,93 a 7,73.





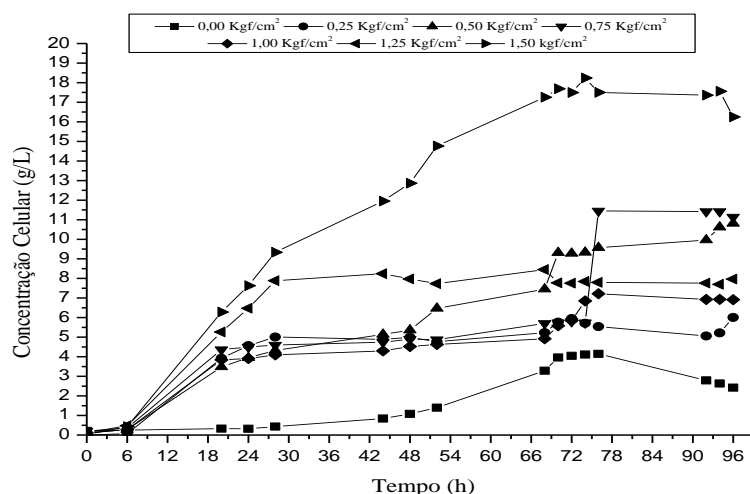
**Figura 16:** Fermentações no “air-lift” a 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 96 h de fermentação por *S. cerevisiae*, sem aplicação de CM. Resultados de: (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Neste ensaio a produção de GSH se mostrou eficiente, pois seu melhor resultado foi obtido a 72 h de processo com 141,35 mg/L. Em termos industriais, obter o maior resultado em menor tempo, representa viabilidade econômica, comparando-se com a pressão de 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, na qual o melhor resultado foi obtido em 96 h de processo. Pode-se perceber que algumas pressões afetam tanto de modo positivo, quanto negativo no crescimento da levedura em estudo. Sabe-se que a aeração é um dos fatores mais importantes para que se obtenha maior formação de massa celular durante um processo fermentativo. A entrada de ar facilita na agitação e aeração do meio, promovendo aumento na capacidade de transferência de massa e calor.

Dentre todos os ensaios sem aplicação de CM, a pressão de 0,5 kgf/cm<sup>2</sup> foi a que se apresentou mais eficiente na síntese da GSH. A aplicação de diferentes pressões no cultivo de *S. cerevisiae*, promove uma certa tensão, aumentando o consumo de energia pelas leveduras, o que induz a mudanças no metabolismo e conseqüentemente o acúmulo de moléculas responsáveis pela proteção celular, referentes à formação de oxigênio singlete (reativo), em condições aeróbias. A GSH é um exemplo dessas moléculas e é produzida intracelularmente e em condições extremas de oxigênio, temperatura e pressão podendo influenciar de modo significativo sua síntese.

Alguns autores utilizaram o cultivo pressurizado em processos fermentativos. Como no caso de Dong et al. (2007), que obtiveram em seus experimentos, maior produção de GSH a 1,0 Mpa por 6 h, se comparado ao cultivo sob pressão atmosférica. A produção de GSH em biorreator “air-lift” se mostrou eficiente, pois sua configuração permite maior transferência de massa e calor, possibilitando uma conversão mais rápida de substrato a produto.

Na Figura 17, seguem os resultados referentes à concentração celular (g/L) nos ensaios com variação de pressão.

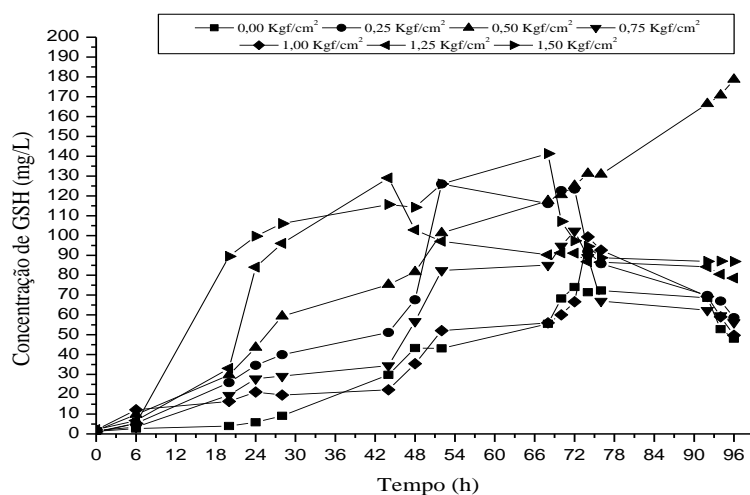


**Figura 17:** Resultados da concentração celular (g/L) obtidos nos ensaios com variação de pressão.

Como se pode verificar os resultados apresentados na Figura 17, a pressão no qual foi produzida a maior concentração celular (17,25 g/L) foi a de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> no tempo de 72 h. Vale ressaltar, que no mesmo tempo obtivemos uma concentração de 141,35 mg/L de GSH. Na fermentação a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup> obteve-se concentração celular de 13,51 g/L.

Acredita-se que em pressões adequadas, o mecanismo responsável pela reprodução das leveduras, pode ser estimulado, através da aeração e pelo aumento no consumo de energia.

Na Figura 18, seguem os resultados referentes à produção de GSH (mg/L) nos ensaios com variação de pressão.



**Figura 18:** Resultados da concentração de GSH (mg/L) obtidos nos ensaios com variação de pressão.

Como se pode observar nos resultados apresentados na Figura 18, todas as fermentações tiveram o comportamento semelhante, iniciando a produção de GSH a partir de 6 h de fermentação, tendo um aumento considerável em torno de 15 h, elevando gradativamente até que certo momento inicia-se a queda, que sucedeu a partir das 72 h. Porém o tratamento que apresentou estabilidade até o final de iniciado processo, foi com a pressão de 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, chegando a 178,72 mg/L, no tempo de 96 h.

### 5.1.2 Produtividade celular e produtividade em GSH

Na Tabela 9 são apresentados todos os valores de produtividade celular e em GSH para os tempos de 72 e 96 h, que foram calculados utilizando as equações 7 e 8.

**Tabela 9:** Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) nos tempos 72 e 96 h de processo.

Pressões (kgf/cm <sup>2</sup> )	Produtividade Celular (g/L.h)		Produtividade em GSH (mg/L.h)	
	72 h	96 h	72 h	96 h
0,00	0,05	0,02	1,01	0,49
0,25	0,08	0,06	1,69	0,60
0,50	0,13	0,11	1,80	1,84
0,75	0,08	0,11	1,40	1,09
1,00	0,09	0,07	1,35	0,50
1,25	0,11	0,08	1,32	0,80
1,50	0,24	0,17	1,95	0,89

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, a maioria dos melhores valores encontrados quanto à produtividade celular (g/L.h), foram nos tempos de 72 h, com exceção à pressão de 0,75 kgf/cm<sup>2</sup>.

O maior valor encontrado foi a 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>, com 0,24 g/L.h e o menor no cultivo sem pressão, com o valor de 0,05 g/L.h. No tempo de 96 h, o maior e menor resultado foram encontrados também a 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> e 0,00 kgf/cm<sup>2</sup>, sendo estes 0,17 g/L.h, e 0,02 g/L.h, respectivamente.

Quanto à produtividade em GSH (mg/L.h), os maiores valores encontrados foram a 72 h de processo, com exceção da pressão de 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>. O maior valor ficou com a pressão de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>, com 1,95 mg/L.h, seguido da pressão de 0,50 kgf/cm<sup>2</sup> (1,80 mg/L.h). Com estes dados, pode-se perceber que a máxima produtividade de GSH ocorre na fase estacionária de crescimento celular da levedura, e que a pressão de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>, foi superior se comparado a todas as outras pressões aplicadas.

Os melhores valores encontrados foram nas maiores pressões de trabalho, fato que pode ser justificado pela eficiência de aeração conferida nas maiores pressões, aumentando a eficiência de oxigenação e conseqüentemente aumentando o crescimento celular e a conversão de substrato a produto e acelerando o crescimento celular.

### 5.1.3 Porcentagem de GSH e seus fatores de conversão

Na Tabela 10 são apresentados os valores da porcentagem de GSH e seus fatores de conversão, tais como:  $Y_{P/S}$  ( $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$ ),  $Y_{X/S}$  ( $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{glic}}$ ),  $Y_{P/X}$  ( $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ ), obtidos nas diferentes pressões estudadas sem aplicação de CM.

**Tabela 10:** Porcentagem de GSH nos tempos 24, 48, 72 e 96 h e seus fatores de conversão em 96 h de processo.

Pressões ( $\text{kgf}/\text{cm}^2$ )	Glutaciona (%)				Fatores de Conversão		
	24 h	48 h	72 h	96 h	$Y_{P/S}$ ( $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$ )	$Y_{X/S}$ ( $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{glic}}$ )	$Y_{P/X}$ ( $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ )
0,00	2,50	4,44	1,87	2,03	0,87	0,04	19,77
0,25	0,76	1,36	2,13	0,96	1,05	0,11	9,49
0,50	1,10	1,52	1,41	1,65	3,26	0,20	16,52
0,75	0,62	1,16	1,76	0,50	1,01	0,20	4,98
1,00	0,54	0,78	1,45	0,72	0,89	0,13	7,02
1,25	0,63	1,22	1,26	0,99	1,34	0,14	9,74
1,50	1,42	0,82	0,97	0,53	2,64	0,34	14,14

Quanto ao percentual de produção de GSH, o cultivo à pressão atmosférica foi superior a todos as outras pressões, nos tempos de 24, 48 e 96 h, com 2,50, 4,44 e 2,03%, respectivamente. No tempo de 72 h, o melhor resultado ficou com a pressão de 0,25  $\text{kgf}/\text{cm}^2$  com 2,13%.

Em relação à conversão de produto a substrato ( $Y_{P/S}$ ), o melhor resultado foi à pressão de 0,50  $\text{kgf}/\text{cm}^2$ , sendo o valor de 3,26  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$ , seguido com a pressão de 1,50  $\text{kgf}/\text{cm}^2$ , obtendo 2,64  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$ .

Quanto ao crescimento de célula em relação ao consumo de substrato ( $Y_{X/S}$ ), o melhor resultado foi obtido a pressão de 1,50  $\text{kgf}/\text{cm}^2$ , com 0,34  $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{glic}}$ , seguindo das pressões de 0,50 e 0,75  $\text{kgf}/\text{cm}^2$  ambas apresentando valor de 0,20  $\text{g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{glic}}$ .

E a conversão de produto por célula ( $Y_{P/X}$ ), o melhor resultado foi encontrado sob cultivo à pressão atmosférica, com 19,77  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ , seguido pela pressão de 0,50  $\text{kgf}/\text{cm}^2$ , com 16,52  $\text{mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ .

## 5.2 Produção de GSH Com Aplicação de Campos Magnéticos

### 5.2.1 Resultados da determinação da indução magnética

Os níveis de indução magnética variaram entre 1,01 a 6,63 mT. A média aplicada sobre o meio foi de 3,02 mT.

### 5.2.2 Ensaios controle (sem aplicação de CM)

Na Tabela 11, segue os resultados da concentração celular ( $\text{g}/\text{L}$ ) nos ensaios controle (sem aplicação de CM). Todos os valores podem ser encontrados nas Tabelas 35 a 39 (anexos).

**Tabela 11:** Resultados da concentração celular nos ensaios controle.

Ensaio	Pressão/ VRC*	Concentração Celular (g/L)				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	0,5/3,0	0,12	2,22	5,36	10,32	10,06
2	1,5/3,0	0,07	4,35	10,78	15,22	14,00
3	0,5/15,0	0,06	3,23	5,86	10,34	9,77
4	1,5/15,0	0,03	5,18	12,34	15,78	15,09
5	1,0/9,0	0,09	2,44	2,70	3,09	2,08

\*VRC – velocidade de reciclo celular (cm/s) e pressão (kgf/cm<sup>2</sup>)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, para o crescimento celular (g/L), o maior resultado foi encontrado no ensaio 4, com 15,78 g/L a 72 h. Resultados similares foram obtidos no ensaio 2 (15,22 g/L – 72 h) e também no ensaio 4 (15,09 g/L – 96 h).

Na Tabela 12, seguem os resultados da produção de GSH (mg/L) nos ensaios controles (sem CM). Todos os valores podem ser encontrados em anexo nas Tabelas 35 a 39.

**Tabela 12:** Resultados da produção de GSH nos ensaios controles.

Ensaio	Pressão/ VRC*	Produção de GSH (mg/L)				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	0,5/3,0	0,09	44,59	83,67	155,54	162,92
2	1,5/3,0	1,86	34,84	110,65	135,56	70,55
3	0,5/15,0	0,96	32,55	72,55	135,77	155,21
4	1,5/15,0	2,33	34,66	89,66	113,77	112,88
5	1,0/9,0	1,07	7,55	22,66	89,66	80,67

\*VRC – velocidade de reciclo celular (cm/s) e pressão (kgf/cm<sup>2</sup>)

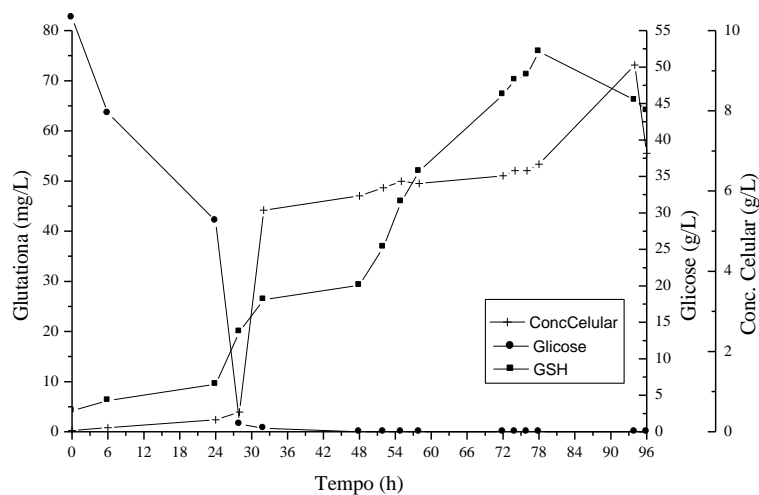
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12 para produção de GSH, os maiores valores foram alcançados no ensaio 1 (162,92 mg/L) em 96 h e no ensaio 3 (155,54 mg/L) em 72 h.

### 5.2.3 Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup>

O planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> foi realizado a partir dos melhores resultados obtido para a produção de GSH na primeira etapa (sem CM), utilizando as duas melhores pressões de trabalho (0,50 e 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>), para verificar a influência de CM na produção de GSH em sistema pressurizado.

As variáveis independentes testadas foram pressão e velocidade de reciclo celular e seus níveis reais e codificados estão na Tabela 8. As condições de fermentação nesta fase tais como: pH<sub>inicial</sub>, temperatura, concentração de inóculo, adição de aminoácidos e tempo total de fermentação, mantiveram-se iguais as fermentações da primeira etapa (sem CM).

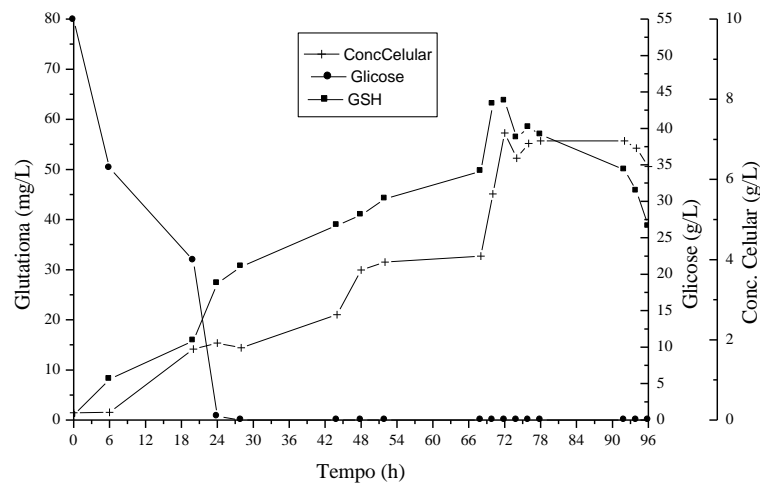
Na Figura 19 e Tabela 28 (anexos) são apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose do ensaio 1PF.



**Figura 19:** Fermentações no “air-lift” 1PF ( $0,50 \text{ kgf/cm}^2$  e  $3,0 \text{ m/s}$ ), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Com relação ao crescimento celular, a maior concentração foi em 94 h, com 9,14 g/L. O pH variou de 4,46 a 5,12. O consumo total de glicose foi atingido entre 32 e 48 h de fermentação. A curva de produção de GSH foi crescente, atingindo seu valor máximo em 78 h, com 75,81 mg/L.

Na Figura 20 e Tabela 29 (anexos) pode-se analisar os resultados do ensaio 2PF.

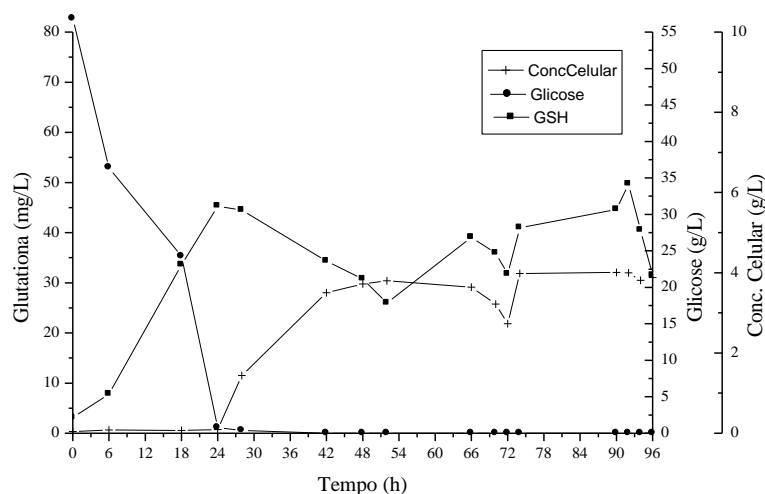


**Figura 20:** Fermentações no “air-lift” 2PF ( $1,50 \text{ kgf/cm}^2$  e  $3,0 \text{ m/s}$ ), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Pode-se observar nos dados graficados referentes à concentração celular, que houve certa instabilidade na curva de crescimento da levedura, não permitindo distinguir as fases de crescimento. A pressão elevada, em conjunto com o CM, interferiu no desenvolvimento

celular, de acordo com os resultados. O maior valor encontrado foi de 7,16 g/L em 72 h, permanecendo com valores próximos até o final do processo. O valor de pH variou de 4,00 a 5,12 e o consumo total de glicose foi observado até 24 h de fermentação. Quanto a produção de GSH, o maior valor foi atingido no mesmo tempo que foi encontrado maior crescimento celular em 72 h, sendo estes 63,66 mg/L e 7,16 g/L.

Na Figura 21 são apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose do ensaio 3PF, realizado no biorreator “air-lift” e estes valores podem ser mais bem visualizados na Tabela 30 (anexos).

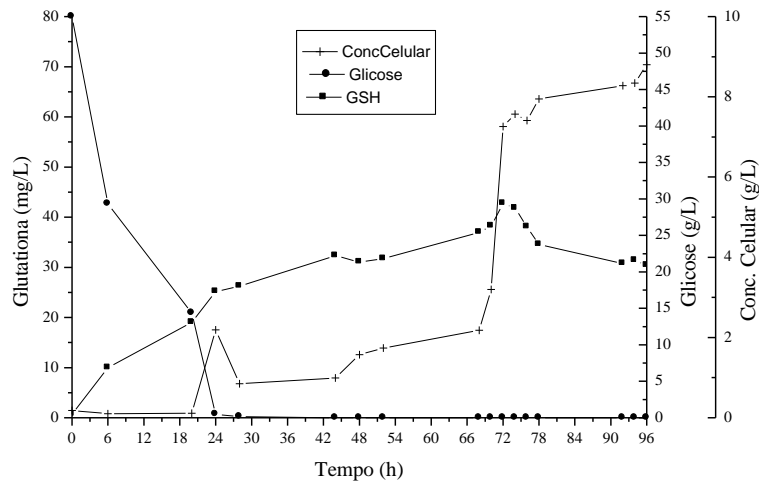


**Figura 21:** Fermentações no “air-lift” 3PF ( $0,50 \text{ kgf/cm}^2$  e  $15 \text{ m/s}$ ), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

De acordo com os resultados na Figura 21, o maior resultado de concentração celular chegou a 4,01 g/L a 90 h, demonstrando uma certa inibição, provocado possivelmente pela velocidade de reciclo celular ( $15 \text{ cm/s}$ ). O pH variou de 4,06 a 5,20. A glicose foi completamente consumida até 28 h. A maior produção de GSH foi observada a 92 h com 49,70 mg/L.

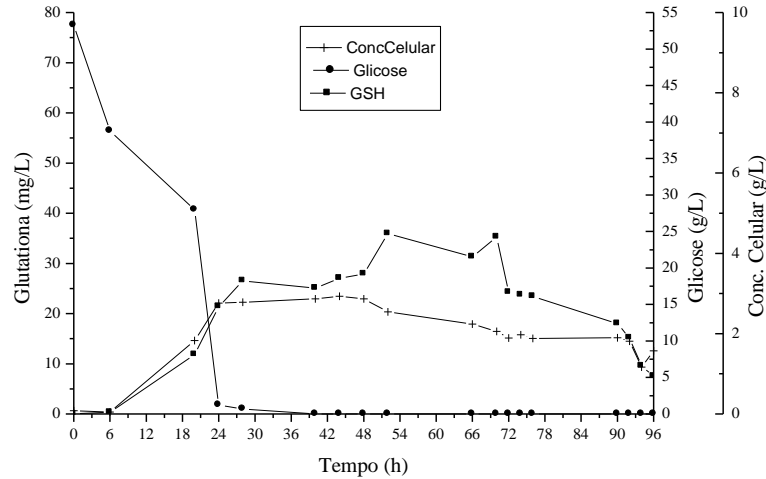
Na Tabela 31 (anexos) e Figura 22 são apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose do ensaio 4PF, realizado no biorreator “air-lift”.

De acordo com os resultados, o crescimento da levedura foi lento e estável até 72 h, apresentando rápido aumento a partir deste tempo, chegando a concentração de 8,80 g/L em 96 h. A concentração de GSH foi praticamente constante durante todo o processo e seu valor máximo foi a 72 h com 42,72 mg/L. Quanto ao total consumo de glicose foi observado até 28 h. Os valores de pH variaram entre 4,11 a 5,12.



**Figura 22:** Fermentações no “air-lift” 4PF (1,50 kgf/cm<sup>2</sup> e 15 m/s), com aplicação de CM durante a 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Na Figura 23 são apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose do ensaio 5PF e podem ser observados na Tabela 32 (anexos). Este ensaio corresponde a um dos pontos centrais do delineamento fatorial.



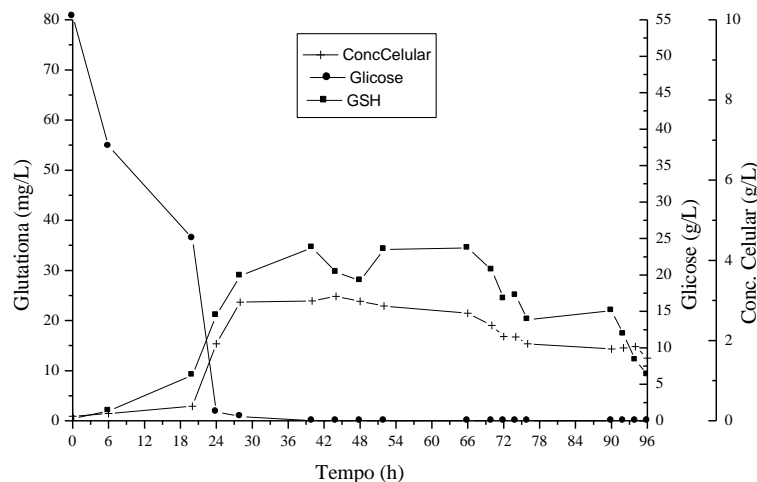
**Figura 23:** Fermentações no “air-lift” 5PF (1,00 kgf/cm<sup>2</sup> e 9 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

De acordo com os resultados, a concentração celular foi inferior neste ensaio comparando-se aos outros ensaios com aplicação de CM. O maior valor encontrado foi de 2,92 g/L a 44 h de fermentação. O valor de pH variou entre 4,37 a 5,26. O consumo do substrato ocorreu completamente até 28 h de fermentação. A concentração de GSH teve seu



valor máximo em 52 h com 35,97 mg/L, continuando seu valor estável até 70 h aproximadamente.

Na Figura 24 (e anexos Tabela 33) são apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose do ensaio 6PF.



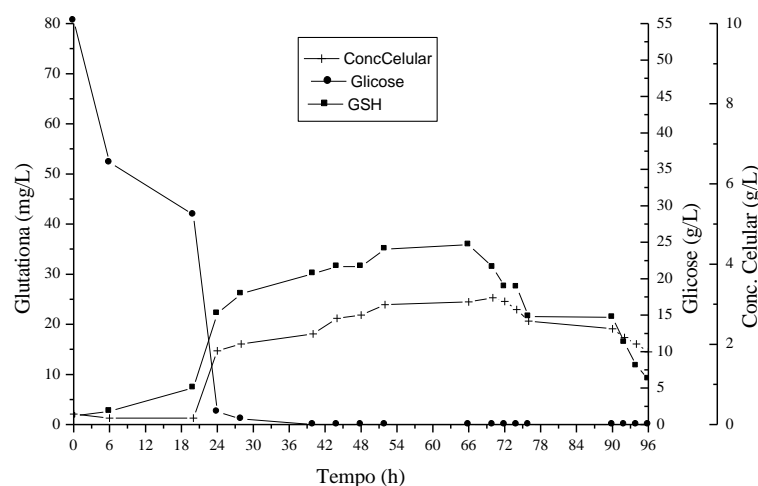
**Figura 24:** Fermentações no “air-lift” 6PF (1,00 kgf/cm<sup>2</sup> e 9 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Nos resultados do ensaio 6PF houve uma clara distinção entre as fases de crescimento celular e os valores quanto a concentração celular permaneceram bem próximos do ensaio 5PF. A fase *lag* durou de 0 a 20 h, a exponencial de 20 a 28 h e a estacionária, a partir deste tempo até o final do processo. A máxima concentração celular ocorreu em 44 h, com 3,10 g/L.

O pH variou de 4,32 a 5,26 e o substrato foi completamente consumido até 28 h. O maior valor encontrado para a produção de GSH foi de 34,56 mg/L em 40 h de fermentação.

Na Figura 25 e Tabela 34 (anexos) são apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose do ensaio 7PF. Neste ensaio, o comportamento quanto ao crescimento celular não se diferiu do ensaio 6PF, sua fase *lag* durou de 0 a 20 h, a exponencial 20 a 28 h e a fase estacionária permaneceu até o final da fermentação. Seu valor máximo de concentração celular foi em 70 h, com 3,16 g/L.

Seus valores de pH foram de 4,50 a 5,29. O consumo de glicose foi completo até 28 h de fermentação. O valor de produção máxima de GSH foi de 35,85 mg/L em 66 h de processo.



**Figura 25:** Fermentações no “air-lift” 7PF (1,00 kgf/cm<sup>2</sup> e 9 m/s), com aplicação de CM durante 96 h de fermentação. Resultados de (+) concentração celular (g/L), (●) concentração de glicose (g/L) e (■) concentração de GSH (mg/L).

Ainda é pouco encontrado na literatura, estudos que verificam a influência de CM em processos fermentativos. Existem muitas contradições quanto a este tema e estas ocorrem pelo número de parâmetros que influenciam os testes, tais como: intensidade do CM, frequência, tempo de exposição, tipo de célula, tipo de magnetizador, temperatura e estado biológico das células.

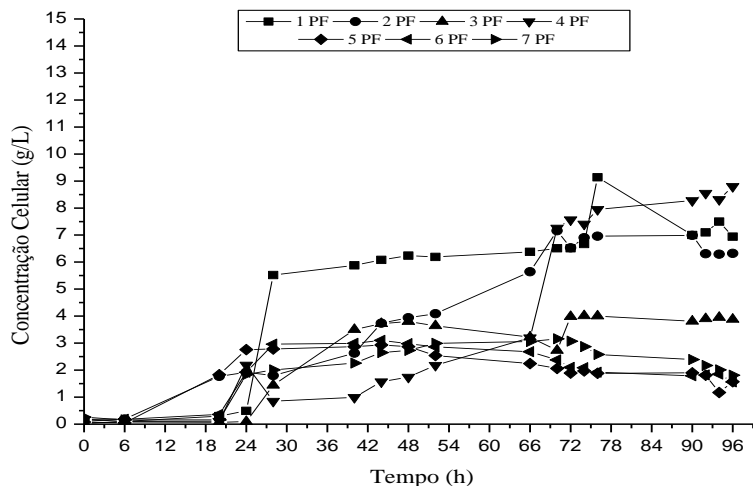
Os resultados deste trabalho foram de suma importância, pois demonstraram que a aplicação de CM em sistema pressurizado, influenciou de modo negativo no crescimento celular e na produção de GSH. Isso possibilitaria posteriormente o avanço de pesquisas relacionadas aos métodos relacionados à conservação de alimentos, inibindo o crescimento e ação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos.

Nos ensaios realizados por Lopes (2008), testando a influência de CM na fermentação alcoólica descontínua e utilizando tubo de ensaio como biorreator, foi verificado que a presença de CM pela indução magnética máxima, não resultou em diferença significativa nas condições estudadas. A variação do rendimento do processo também não apresentou diferença significativa entre os ensaios realizados com a presença do CM em ensaios com diferentes condições de concentrações de glicose e de levedura.

O único trabalho encontrado na literatura com aplicação de CM para produção de GSH foi o de Santos (2008), que utilizando um magnetizador, foram observados efeitos estimulantes para a produção de GSH e de biomassa. As maiores concentrações celular (19,5 g/L) e de GSH (271,9 mg/L) foram conseguidas no ensaio com aplicação de CM durante as 72 h de fermentação, representando incremento de 2,63% e 32,1% em relação ao ensaio controle (sem CM), respectivamente. No mesmo trabalho utilizando bobina para aplicação de CM para a produção de GSH foram observados alguns efeitos estimulantes. A máxima concentração celular foi 16,3 g/L quando foram aplicados 25 mT por 16 h, isto representou efeito estimulante de 19,6% em relação ao ensaio controle sem aplicação de CM. Nas faixas estudadas do tempo de exposição (8 a 16 h) e indução magnética (25,0 a 34,3 mT) não ocorreu efeito inibitório para concentração celular nas 72 h de fermentação. Para os resultados de GSH após 72 h, um incremento de 39% foi observado, quando aplicado 25 mT por 16 h. A maior concentração de GSH nestas condições foi de 340 mg/L. Em todos os ensaios até 48 h

de fermentação, foram observados efeitos estimulantes devido à aplicação de CM nas faixas estudadas. Para 72 h de fermentação foram encontradas três janelas eletromagnéticas positivas para a produção de GSH: 25 mT por 8 h; 25 mT por 16 h e 34,3 mT por 16 h.

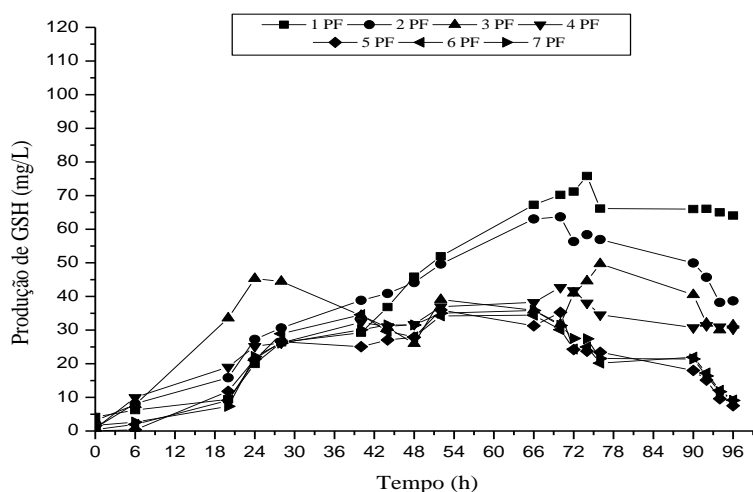
Na Figura 26 tem-se o acompanhamento da concentração celular referente a todos os ensaios nos quais foram aplicados campos magnéticos.



**Figura 26:** Resultados comparativos da concentração celular (g/L) das fermentações com aplicação de campos magnéticos.

De acordo com o gráfico apresentado na Figura 26, o melhor resultado para o crescimento celular (g/L), com aplicação de CM ficou com o ensaio 1PF, no qual se utilizou a menor pressão e velocidade de reciclo celular ( $0,50 \text{ kgf/cm}^2$  e  $3,0 \text{ m/s}$ ), apresentando  $9,14 \text{ g/L}$  de concentração celular às 94 h de processo.

Na Figura 27, segue os resultados referentes à produção de GSH (mg/L) nos ensaios com aplicação de campos magnéticos.



**Figura 27:** Resultados comparativos da produção de GSH (mg/L) das fermentações com aplicação de campos magnéticos.

Para uma melhor visualização comparativa de todos os ensaios que envolveram CM e velocidade de reciclo celular, foi construído esse gráfico.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 27, em relação à concentração de GSH, o melhor resultado foi a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup> e reciclo celular de 3,0 m/s (1PF) com 67,24 mg/L a 94 h de processo.

#### 5.2.4 Produtividade celular e produtividade em GSH nos ensaios com CM

Na Tabela 13 têm-se os valores de produtividade celular e de GSH nos ensaios com aplicação de CM.

**Tabela 13:** Produtividade celular (g/L.h) e produtividade em GSH (mg/L.h) nos tempos 72 e 96 h de processo, nos ensaios com aplicação de CM.

Ensaio (CM)	Produtividade Celular (g/L.h)		Produtividade em GSH (mg/L.h)	
	72 h	96 h	72 h	96 h
1PF	0,09	0,07	0,88	0,62
2PF	0,10	0,06	0,87	0,39
3PF	0,05	0,04	0,40	0,30
4PF	0,10	0,09	0,58	0,31
5PF	0,03	0,02	0,34	0,08
6PF	0,03	0,02	0,33	0,09
7PF	0,04	0,02	0,36	0,08

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, todos os valores de produtividade celular no tempo de 72 h, foram superiores aos de 96 h. Dentre eles, os ensaios 2PF e 4PF apresentaram os maiores valores de 0,10 g/L.h, sendo estes ensaios realizados a maior pressão (1,5 kgf/cm<sup>2</sup>), afirmando que neste trabalho a utilização de pressão em cultivo de *S. cerevisiae* não afeta a estrutura celular. Em 96 h os dois maiores resultados foram nos ensaios 1PF (0,07 g/L.h) e 4PF (0,09 g/L.h).

A influência da aplicação de CM de 1,5 T por 15 h no crescimento de *S. cerevisiae* ATCC 7752 foi avaliada por Malko et al. (1994). Comparando os resultados com e sem a aplicação de CM, foi observado que não houve diferença significativa entre os ensaios, ou seja, a aplicação do CM de 1,5 T não aumentou a concentração celular.

Pichko e Povalyaeva (1996) obtiveram aumento de 12% na concentração celular de *S. cerevisiae* XII utilizando dispositivo comercial gerador de CM (0,1 T e 40 min). Mehedintu e Berg (1997) observaram inibição de 16% utilizando 0,2 mT e 10 h de aplicação e estímulo de 25% com 0,5 mT e 10 h.

Motta et al. (2001) constataram o aumento de 1,84% no crescimento celular da *S. cerevisiae* DAUFPE-1012, quando aplicado CM de 220 mT através de ímãs. Nos ensaios feitos por Zapata et al. (2002) o ensaio que proporcionou a maior concentração celular foi 30 s, 100 kHz e 2 µT. Nestas condições as concentrações foram 30% maiores que no cultivo controle.

Quanto a produtividade de GSH, os melhores resultados também foram encontrados no tempo de 72 h, isso demonstra que, a produção de GSH ocorre na fase estacionária de crescimento celular. Esta mesma afirmação, foi comprovada nos trabalhos de Izawa et al

(1995) e Suzuki et al (1999). Em escala industrial, seria viável manter os micro-organismos nesta fase, pois a formação de produto é máxima e isso reduziria custos.

As maiores produtividades em GSH foram nos ensaios 1PF (0,88 mg/L.h) e 2PF (0,87 mg/L.h), nos quais ambos tiveram baixa velocidade de reciclo celular, 3,0 cm/s, podendo afirmar que quanto menor a velocidade de escoamento, menor será a turbulência e consequentemente maior será a produção de GSH. No tempo de 96 h, os dois maiores resultados também ficaram com os ensaios 1PF (0,62 mg/L.h) e 2PF (0,39 mg/L.h).

A vantagem da aplicação de CM com o uso de ímãs é o reciclo celular, pois este sistema facilita o “scale-up”. Alvarez et al (2006) citaram que são vários os dispositivos desenvolvidos para a aplicação de CM em processos fermentativos, mas estes apresentam dificuldades para fazer o “scale-up”, devido a seus elevados custos, uma vez que foram produzidos para cobrir a totalidade ou grande parte do fermentador. A vantagem do uso de ímãs é a flexibilidade para controlar o tempo de exposição, pois os ímãs atuam somente sobre o meio que é reciclado independente do tamanho do fermentador. Desta forma, a construção de grandes magnetizadores pode ser evitada.

Motta et al. (2004) avaliaram a aplicação de CM estáticos (220 mT por 24 h) gerados por ímãs durante o cultivo de *S. cerevisiae* DAUFPE-1012; a produção de biomassa foi 3 vezes maior.

Ruiz-Gómez et al. (2004) observaram o comportamento da *S. cerevisiae* WS8105- 1C quando exposta a CM de 0,35 ou 2,45 mT e tempo de exposição de 24 ou 72 h, não houve alterações no crescimento celular. Zapata et al. (2005) utilizando aplicação de CM de 25 mT antes de iniciar a fermentação com leveduras comerciais de panificação (*S. cerevisiae*), conseguiram aumento de 14,4% na concentração celular. Novák et al. (2007) aplicando CM de 10 mT por 60 min no cultivo de *S. cerevisiae* CCY 21-4-59, observaram efeitos inibitórios tanto nos experimentos feitos em placas de petri com ágar, como em meio líquido em frascos Erlenmeyer.

### 5.2.5 Porcentagem de GSH e seus fatores de conversão nos ensaios com CM

Na Tabela 14, são apresentados os valores da porcentagem de GSH e seus fatores de conversão, tais como:  $Y_{P/S}$  (mg<sub>GSH</sub>/g<sub>glic</sub>),  $Y_{X/S}$  (g<sub>cél</sub>/g<sub>glic</sub>) e  $Y_{P/X}$  (mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub>), obtidos no delineamento fatorial nos ensaios com aplicação de CM.

**Tabela 14:** Porcentagem de GSH nos tempos 24, 48, 72 e 96 h e seus fatores de conversão a 96 h de processo para os ensaios com aplicação de CM.

Ensaio (CM)	Glutationa (%)				Fatores de Conversão		
	24 h	48 h	72 h	96 h	$Y_{P/S}$ (mg <sub>GSH</sub> /g <sub>glic</sub> )	$Y_{X/S}$ (g <sub>cél</sub> /g <sub>glic</sub> )	$Y_{P/X}$ (mg <sub>GSH</sub> /g <sub>cél</sub> )
1PF	3,18	0,50	1,05	0,92	1,05	0,12	8,67
2PF	1,41	1,09	0,89	0,61	0,69	0,10	6,14
3PF	-	0,83	1,16	0,81	0,50	0,07	7,37
4PF	1,15	1,98	0,59	0,35	0,54	0,16	3,45
5PF	0,77	0,97	1,28	0,48	0,14	0,03	4,99
6PF	1,09	0,94	1,16	0,59	0,16	0,03	6,07
7PF	1,20	1,15	0,90	0,50	0,13	0,03	4,77

De acordo com os resultados apresentados quanto à porcentagem de GSH, os maiores valores foram encontrados em diferentes tempos. No tempo de 24 h, o maior resultado foi encontrado no ensaio 1PF, com 3,18%; em 48 h no ensaio 4PF, com 1,98%; no tempo de 72 h no ensaio 5PF, com 1,28%, e por fim, no tempo de 96 h, o maior resultado foi no ensaio 1PF, com 0,92 %.

Comparando estes resultados com o trabalho de Santos (2008), que encontrou 1,4% de GSH nos tempos de 24 e 48 h em seus ensaios, aplicando CM por ímãs, estes valores foram inferiores com exceção dos ensaios 1PF, que apresentou 3,18% em 24 h e no ensaio 4PF, que apresentou 1,98 % em 48 h

Para a conversão de produto a substrato ( $Y_{P/S}$ ), o melhor resultado foi no ensaio 1PF com  $1,05 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$ . Quanto ao crescimento de célula por consumo de substrato ( $Y_{X/S}$ ) o melhor resultado foi no ensaio 4PF, atingindo  $0,16 \text{ g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{glic}}$ . Para a conversão de produto por célula ( $Y_{P/X}$ ) o melhor resultado foi no ensaio 1PF, com  $8,67 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ , sendo este inferior comparando com os resultados da primeira fase (sem CM), os maiores valores encontrados foram em cultivo a  $0,00 \text{ kgf}/\text{cm}^2$  com  $19,77 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ .

No trabalho de Liu et al (2004) que cultivaram *S. cerevisiae* da indústria cervejeira, em fermentador de 15 L, a maior porcentagem encontrada de célula em produto foi  $18 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ , chegando bem próximo aos valores encontrados na primeira fase dos ensaios (sem CM).

Todos os resultados dos fatores de conversão encontrados neste trabalho, foram inferiores, se comparados com o trabalho de Santos (2008), que aplicou 16 h de CM através de bobinas. Os três maiores fatores de conversão de substrato em produto, substrato em célula e célula em produto foram:  $6,19 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$ ,  $0,30 \text{ g}_{\text{cél}}/\text{g}_{\text{glic}}$  e  $20,62 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$ , respectivamente.

Neste mesmo trabalho, também foram aplicados CM através de ímãs, e seus resultados foram comparados aos ensaios controles. Os ensaios com CM foram superiores ao ensaio controle, os maiores valores chegaram a  $4,88 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{glic}}$  para 72 h de CM e  $14,00 \text{ mg}_{\text{GSH}}/\text{g}_{\text{cél}}$  para 48 h de CM, e quanto aos valores de conversão substrato em célula não houve diferença entre os resultados.

## 5.2.6 Resultados da análise estatística do planejamento fatorial $2^2$

A análise estatística realizada a partir do planejamento experimental fatorial  $2^2$  foi realizada para as respostas: concentração celular (g/L) e GSH (mg/L), no tempo de 72 h de fermentação, pois neste tempo foram observados as maiores concentrações. Os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios estão apresentados na Tabela 15. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,3824 para a resposta: concentração celular, sendo este um valor pouco satisfatório para fins preditivos.

De acordo com a análise do coeficiente de regressão para a resposta concentração celular (g/L), as variáveis pressão, velocidade de reciclo celular e a interação entre as duas não foram significativas, pois como se pode observar o valor de p foi maior que 0,10 para um nível de confiança de 90%. Somente a média obteve valor estatisticamente significativo,  $p < 0,10$ . Por esse motivo, não foi possível apresentar a ANOVA, pois não tendo resultados significativos, não existe termos a ser incorporada a regressão para o cálculo da análise de variância (ANOVA), não apresentando uma equação que se ajustasse ao modelo e consequentemente a superfície de resposta.

**Tabela 15:** Coeficiente de regressão e desvio padrão dos ensaios com aplicação de CM para a resposta concentração celular em 72 h.

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t (3)</b>	<b>p-valor</b>
Média*	4,37	1,03	4,26	0,02
Pressão	1,33	1,36	0,98	0,40
VRC**	-0,89	1,36	-0,65	0,56
Pressão x VRC**	0,94	1,36	0,69	0,54

\*Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança).

\*\* VRC velocidade de reciclo celular

O resultado da análise da produção de GSH foi realizado em 72 h de fermentação, porque neste tempo foram alcançadas as maiores respostas para os diversos ensaios realizados. Os coeficientes de regressão para o modelo linear foram determinados e expostos na Tabela 16. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,4258 para produção de GSH, sendo este valor baixo e pouco satisfatório para fins preditivos.

**Tabela 16:** Coeficiente de regressão e desvio padrão dos ensaios PF para a resposta produção de GSH em 72 h.

	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>t (3)</b>	<b>p-valor</b>
Média*	40,21	7,44	5,40	0,01
Pressão	1,85	9,85	0,19	0,86
VCR**	-14,11	9,85	-1,43	0,25
Pressão x VRC**	3,64	9,85	0,37	0,74

\*Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança).

\*\* VRC velocidade de reciclo celular

De acordo com os resultados da Tabela 16, as variáveis: pressão, velocidade de reciclo celular e suas interações tiveram  $p > 0,10$ , ou seja, são variáveis estatisticamente não significativas no nível de confiança de 90%. O valor da média foi significativo  $p < 0,10$ . Para esse resultado, não foi realizado a análise de variância (ANOVA), pois não tendo valores estatisticamente significativos, não existe termos a serem incorporados a regressão. Outro ponto a se destacar, é que não foi possível obter a equação na qual se ajustasse ao modelo, e consequentemente, não foi gerado o gráfico de superfície de resposta.

Frente a estes resultados, sugere-se a realização de um novo planejamento para este processo, com uma maior amplitude, utilizando os pontos axiais, aumentando a pressão de trabalho e alternando o tempo de exposição aos ímãs. Com isso, pode-se chegar bem próximo a uma resposta que gere uma equação que se ajuste ao modelo proposto.

### 5.2.7 Comparação entre os ensaios com e sem aplicação de CM

Na Tabela 17 são observados os valores em porcentagem da diferença de concentração celular (g/L), entre os ensaios controles (sem CM) e os ensaios realizados no planejamento fatorial com CM.

**Tabela 17:** Porcentagem de diferença de concentração celular (PDC) produzida para os tempos 24, 48, 72 e 96 h no planejamento fatorial com aplicação de CM e sem CM.

Ensaio	PDC (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1PF	-86,61	+ 9,73	-38,20	-31,02
2PF	-55,76	-65,32	-52,95	-54,83
3PF	-55,42	-36,52	-73,62	-60,25
4PF	-57,72	-87,32	-53,99	-41,71
5PF	+13,11	+ 6,30	-38,83	-24,52
6PF	-21,25	+10,37	-32,04	-25,00
7PF	-24,61	+1,11	-0,65	-12,92

De acordo com a Tabela 17, a aplicação de CM promoveu inibição na maioria das condições estudadas. No tempo de 24 h, houve o maior estímulo de +13,11% no ensaio 5PF e maior inibição foi no ensaio 1PF (-86,61 %). No tempo de 48 h o maior estímulo ocorreu no ensaio 6PF, com + 10,37 % e a maior inibição foi no ensaio 4PF (-87,32 %). Nos tempos de 72 e 96 h, não foi constatado nenhum estímulo, em todos os ensaios houve inibição.

Poucos foram os trabalhos que reportaram a inibição do crescimento celular através dos ímãs. Com exceção temos o trabalho de Barboza (2002), que utilizando *S. cerevisiae* comercial, com intensidade magnética de 31 mT e tempo de exposição de 30 h, obteve uma resposta negativa quanto ao desenvolvimento da levedura, chegando a - 30% de inibição.

Outro trabalho que merece destaque é o de Mehedintu e Berg (1997), que cultivando a cepa de *S. cerevisiae* H192, com uma intensidade de CM 0,2 mT (50 Hz) e 0,5 mT (50 Hz), durante 10 h de fermentação, obtiveram inibição de - 16% ao final do processo.

Em outra pesquisa que recentemente contribuiu de forma positiva para o enriquecimento literatura, foi o de Novák et al. (2007), que utilizando a cepa de CCY 21-4-59, obtiveram resposta inibitória, sem dados precisos, de acordo com os resultados apresentados. Este trabalho, veio em contrapartida quanto aos resultados de Santos (2008), que cultivando a mesma cepa utilizada neste trabalho, e aplicando CM através de bobinas e ímãs estáticos (neste caso, o mesmo utilizado nesta dissertação), foi encontrado efeito estimulante + 43,1 %, com intensidade de 25 mT e tempo de exposição de 16 h.

Pode-se dizer que a inibição ocorreu devido ao stress causado à célula devido a aplicação do CM em concomitância com a pressão e reciclo celular, alterando mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento celular.

Na Tabela 18, são observados os valores em porcentagem da produção de GSH (mg/L), entre os ensaios controles (sem CM) e os ensaios realizados no planejamento fatorial com CM.



**Tabela 18:** Porcentagem de diferença da produção de GSH (PDG) entre os ensaios controles (sem CM) e os ensaios realizados no planejamento fatorial com CM para os tempos de 24, 48, 72 e 96 h.

Ensaio	PDG (%)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1PF	-78,81	-65,08	-56,77	-60,67
2PF	-21,84	-63,04	-53,04	-45,19
3PF	+39,17	-57,62	-76,62	-79,74
4PF	-27,38	-65,38	-62,45	-73,07
5PF	+182,91	+22,99	-72,98	-90,69
6PF	+178,28	+23,52	-72,84	-88,58
7PF	+192,98	+39,06	-69,31	-88,72

Como se pode perceber na Tabela 18, quanto à diferença de produção de GSH, entre os ensaios com e sem a aplicação de CM, observa-se que na maioria dos resultados, as respostas foram inibitórias a partir de 72 h de processo. No tempo de 24 h, o melhor resultado quanto ao estímulo foi no ensaio 7PF (+192,98%). No tempo de 48 h, o maior estímulo foi no 7PF (-39,06%). Para os tempos de 72 e 96 h todos os ensaios apresentaram inibição. O mecanismo que estimula a produção de GSH está diretamente relacionado ao estresse causado por fatores externos, tais como, elevadas temperaturas, estresse osmótico, altas concentrações de sais, metais pesados e elevadas pressões.

Neste caso, o estresse que promoveu a produção de GSH na primeira etapa do trabalho pode ter sido a pressurização do fermentador. Na segunda etapa do trabalho com a aplicação de CM, o micro-organismo foi submetido a mais dois tipos de estresse que em conjunto com a pressão, poderia desencadear rotas metabólicas que estimulariam a síntese das enzimas GSI e GSII, que são responsáveis pela síntese de GSH, porém não foi isso o que ocorreu. O conjunto: pressão, reciclo celular e aplicação de CM promoveram reduções drásticas na síntese de GSH.

No trabalho de Dong et al, (2007) foi utilizada cepa de *S. cerevisiae* em cultivo pressurizado em frascos Erlenmeyer, para produção das moléculas responsáveis pela proteção celular, sendo elas a trealose e GSH. De acordo com os autores, houve aumento considerável na produção em cultivo pressurizado em contrapartida em ar atmosférico, resultando em uma % de GSH de 103 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>célula</sub>.

De fato é certo que ainda na literatura, os artigos que tratam a respeito de CM em processos fermentativos, bem como a aplicação de diferentes pressões, ainda são bastante escassos, sendo necessárias mais pesquisas relacionadas ao tema.

## 6 CONCLUSÕES

Na primeira fase dos ensaios foram encontradas as melhores pressões de trabalho. A pressão na qual foi obtida a maior concentração celular foi de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> com 17,25 g/L (72 h). Porém, a fermentação a qual se obteve a maior produção de GSH foi a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, com 178,21 mg/L. De acordo com os resultados da primeira etapa, a melhor pressão em estudo foi a de 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, pois foi a que foi obtida a maior concentração de GSH. Ainda na primeira fase, as maiores taxas de porcentagem de GSH foram encontradas em cultivo despressurizado com 4,44 % em 48 h. Os maiores fatores de conversão foram:  $Y_{P/S}$  3,26 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>glic</sub> a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>,  $Y_{X/S}$  a 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> com 0,34 g<sub>cél</sub>/g<sub>glic</sub> e  $Y_{P/X}$  com 19,77 mg<sub>GSH</sub>/g<sub>cél</sub>. Quanto a produtividade celular, o maior valor encontrados a 72 h foi na pressão de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> 0,24 g/L.h. Quanto a produtividade em GSH o maior valor foi na pressão de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> com 1,95 mg/L.h em 72 h.

Com esses resultados, pode-se concluir que a utilização do reator “air-lift” pressurizado, para a produção de GSH, pode ser considerada como uma ferramenta inovadora e eficiente, visto que ainda não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que utilize esta configuração de reator para produção de GSH. A pressão conferida ao sistema, proporcionou resultados satisfatórios, devido à eficiência de oxigenação e homogeneização.

Na segunda fase dos ensaios no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com aplicação de CM, os melhores resultados foram obtidos a 0,5 kgf/cm<sup>2</sup> e com velocidade de reciclo celular de 3 cm/s, apresentando 9,14 g/L de concentração celular em 94 h e 75,81 mg/L de GSH em 78 h de processo. Conclui-se a partir disso que, menores valores de pressão e de reciclo celular, podem influenciar de modo positivo na reprodução do micro-organismo envolvido e na produção de compostos. Acredita-se que a baixa pressão não altera a estrutura celular da levedura e a baixa velocidade de reciclo celular, não permite regime de escoamento turbulento, o que poderá causar uma elevada perda de carga e conseqüentemente a diminuição na produção de GSH.

No cultivo sob pressão e sem aplicação de CM o maior resultado encontrado quanto ao crescimento celular, foi de 17,25 g/L, em contrapartida, quando houve a aplicação de CM, o maior valor foi encontrado no ensaio 1PF com 9,14 g/L, demonstrando redução em 52,98%.

Quanto a produção de GSH, no cultivo sob pressão sem aplicação de CM, o maior resultado foi de 178,21 mg/L, e quando aplicado CM, o maior valor encontrado foi de 75,81 mg/L no ensaio 1PF, comprovando uma redução de 42,54%. Com esses dados, pode-se concluir que houve inibição no crescimento celular da levedura e ausência de mecanismos adaptativos gerados a partir de estresses, levando a diminuição na produção de GSH.

Com os resultados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> realizado neste trabalho, verificou-se que nenhuma variável (pressão e velocidade de reciclo celular) foi significativa não sendo possível gerar uma superfície de resposta e nem propor um modelo que se ajustasse aos parâmetros.

A produção de GSH em sistema pressurizado se mostrou eficiente e promissora. Seus resultados quanto à concentração celular e produção de GSH foram próximos aos trabalhos reportados por outros autores na literatura, apresentando-se como uma nova tecnologia a ser explorada.

Este trabalho contribuiu para o enriquecimento da literatura a respeito da aplicação de CM em processos fermentativos na produção de compostos com interesse industrial.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Medir a atividade antioxidante da GSH antes e após exposição de CM;
- Produzir GSH no biorreator “air-lift” a partir de resíduos agroindustriais, tais como melaço, água de maceração de milho, soro de leite e de queijo;
- Verificar a morfologia celular das leveduras após exposição a diferentes pressões e aplicação de CM;
- Produzir GSH em biorreator “air-lift” com pressões superiores a  $1,50 \text{ kgf/cm}^2$  em batelada alimentada com CM;
- Testar outras cepas de *S. cerevisiae* para produção de GSH.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 402-405, 2000.
- ALFAFARA, C. G.; KANDA, A.; SHIOI, T.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA K. Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 538-540, 1992a.
- ALFAFARA, C.; MIURA, K.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA K. Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 141-146, 1992b.
- AL-QODAH, Z. Continuous production of antibiotics in an airlift fermentor utilizing a transverse magnetic fields. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 87, p. 37-55, 2000.
- ALVAREZ, D. C.; PÉREZ, V. H.; JUSTO, O. R.; ALEGRE, R. M. Effect of the extremely low frequency electromagnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis subsp. Lactis* using cheese whey permeate. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1967-1973, 2006b.
- ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemio-Biology Interact**, v. 111-112, p. 1-14, 1998.
- ANSCHAU, A. **Produção de glutathione utilizando subprodutos industriais em processos de batelada simples e batelada alimentada**. 158f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2010.
- BARBOZA, M. A. **Ação de campos magnéticos em alguns sistemas químicos e biológicos**. 2002. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2002.
- BATTIN, E. E.; BRUMAGHIM, J. L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 55, p. 1–23, 2009.
- BAUER, W. A comparison between a conventional submerged culture fermenter and a new concept gas/solid fluid bed bioreactor for glutathione production. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 64, n. 4, p. 561-566, 1986.
- BELO, I.; MOTA, M. Batch and fed-batch cultures of *E. coli* TB1 at different oxygen transfer rates. **Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 451-455, 1998.
- BELO, I.; PINHEIRO, R.; MOTA, M. Response of the thermophile *Thermus* sp. RQ-1 to hyperbaric air in batch and fed-batch cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 517-524, 2000.
- BIE, C.; WUSUN, S. Effects of magnetic field on *Rhodotorula* sp. RG-98 growth and biosynthesis of carotenoid. **Weishengwuxue Zazhi**, v. 23, p. 17-19, 2003.

BINNINGER, D. M.; UNGVICHIAN, V. Effects of 60 Hz AC magnetic fields on gene expression following exposure over multiple cell generations using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 83-89, 1997.

BOGATIN, J.; BONDARENKO, N.; GAK, E. Z.; ROKHINSON, E. E; ANANYEV, P. I. Magnetic treatment of irrigation water: experimental results and application conditions. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 1280-1285, 1999.

BONNARME, P.; DELATTRE, M.; DROUET, H.; CORRIEU, G.; ASTHER, M. Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 440-450, 1993.

BURCHARD, J. F.; NGUYEN, D.H.; RICHARD, L.; BLOCK, E. Biological effects of electric and magnetic fields on productivity of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1549-1554, 1996.

CHA, J.; PARK J.; JEON, B.; LEE, Y.; CHO, Y. Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. **The Journal of Microbiology**, v.42, n. 1, p. 51-55, 2004.

CHACÓN, A. D.; HABER, P. V.; FONG, R. A.; MÁS, D. S.; SERGUERA, N. M.; RODRIGUEZ, J. O. Influencia del campo electromagnético en el crecimiento de la levadura *Candida utilis* Y-660. **Revista Tecnología Química**, v. 15, n. 2, p. 52-60, 1995.

CHEFTEL, J. C. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview. In: High pressure research in the biosciences and biotechnology, Montrouge. **Proceeding Moutrouge**: John Libbey Eurotext, 1992, p. 195.

CHEFTEL, J. C. High pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v. 1, p.75-90, 1995.

CHEN, X, D.; WEI, G. Y.; ZHANG, J. L.; YING-YING DONG. Efficient production of glutathione using hydrolyzate of banana peel as novel substrate. **Korean Journal Chemical Engineering**, v. 28, n. 7, p. 1566-1572, 2011.

CHENG, H. P.; WANG, P. M.; CHEN, J.W.; WU, W. T. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, p. 125-132, 2002.

CHISTI, M. Y.; MOO-YOUNG, M. Improve the performance of airlift reactors. **Chemical Engineering Progress**, v. 12, p. 38-45, 1993.

CLARK, D. S.; LENTZ, C. P. Submerged citric acid fermentation of sugar beet molasses: effect of pressure and recirculation of oxygen. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 7, p. 447-453, 1961.

DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS III, W.W. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 599-626, 1992.

- DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 226-230, 2007.
- DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 113-125, 2003.
- ELSKENS, M. T.; JASPERS, C. J.; PENNINGKX, M. J. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 637-644, 1991.
- FAHEY, R. C.; BROWN, W. C.; ADAMS, W. B.; WORSHAM, M. B. Occurrence of glutathione in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1126-1129, 1978.
- FEI, L.; WANG, Y.; CHEN, S. Improved glutathione production by gene expression in *Pichia pastoris*. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 32, p. 729-735, 2009.
- FERNÁNDES, L.; STEELE, J. L. Glutathione content of lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, v. 76, n. 5, p. 1233-1242, 1993.
- FOLOGEA, D.; VASSU-DIMOV, T.; STOICA, I.; CSUTAK, O.; RADU, M. Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, n. 2, p. 285-287, 1998.
- FRANZREB, M.; SIEMANN-HERZBERG, M.; HOBLEY, T. J.; THOMAS, O. R. T. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 5, p. 505-516, 2006.
- FRÖHLICH, S.; LOTZ, M.; KORTE, T.; LÜBBERT, A.; SCHÜGERL, K.; SEEKAMP, M. Characterization of a pilot plant airlift tower loop bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 43-45, 1991.
- GARG, N.; AGGARWAL, N. Effects of interactions between cadmium and lead on growth, nitrogen fixation, phytochelatin and glutathione production in *Mycorrhizal Cajanus cajan* (L.) Millsp. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 30, p. 286-300, 2011.
- GEBARA, D.; DALL'AGLIO SOBRINHO, M.; RUGGERI JR., H. C.; MILANEZ, D. H. E.; HERNANDES, T. N. **Desempenho de dois tipos de injetores de ar na transferência de oxigênio em reator aeróbio de leito fluidizado**. In: Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental, 21, João Pessoa, 2001. Anais CD-ROM - Rio de Janeiro: ABES, 2004. II-154, 6p.
- GHARIEB, M. M.; GADD, G. M. Role of glutathione in detoxification of metal (loid) s by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biometals**, v. 17, n. 2, p. 183-188, 2004.
- GHOSH, T. K.; BHATTACHARYYA, B. C. Effect of inlet oxygen concentration on continuous cultivation of baker's yeast in a converging-diverging tube air-lift fermentor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 2, p.153-156, 1993.

- GIFFORD, G. D.; PRITCHARD, G. G. Toxicity of hyperbaric oxygen to yeasts displaying periodic enzyme synthesis. **Journal of General Microbiology**, v. 56, p. 143-149, 1969.
- GOLDSWORTHY, A.; WHITNEY, H.; MORRIS, E.; Biological effects of physically conditioned water. **Water Research**, v. 33, p. 1618, 1999.
- GOTOH, T.; IGUCHI, H.; KIKUCHI, K. Separation of glutathione and its related amino acids by nanofiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 165-170, 2004.
- GRANT, C. M.; MACIVER, F. H.; DAWES, I. W. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 29, n. 6, p. 511-515, 1996.
- HATTORI, S.; WATANABE, M.; TOGII, H.; ENDO, T.; SASAKI, K. Effects of an external magnetic field on the sedimentation of activated sludge. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 279-285, 2001.
- HAYASHI, R. An overview of the use of high pressure in bioscience and biotechnology. In: High Pressure Bioscience and Biotechnology: **Progress in Biotechnology**, Hayashi, R., Balny, C (eds.), Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands, 1996.
- HEIJNEM, J. J.; LOOSDRECHT, M. C. M.; MULDER, A.; TIJHUIS, L. Formation of biofilms in a biofilm air-lift suspension reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 647-654, 1992.
- HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 313-316, 1998.
- HOOVER, D. G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A. M.; FARKAS, D. F.; KNORR, D. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganism. **Food Technology**, v. 43, p. 99-107, 1989.
- HUGAS, M.; GARRIGA, M.; MONFORT, J. M. New mild technologies in meat processing: high pressure is a model technology. **Meat Science**, v. 62, p. 359-371, 2002.
- HULTERBERG, B.; ANDERSSON, A.; ISAKSSON, A. Lipoic acid increases glutathione production and enhances the effect of mercury in human cell lines. **Toxicology**, v. 175, n. 1-3, p. 101-110, 2002.
- HUPE, P.; HÖKE, H.; HEMPEL, D. C. Biological treatment of effluents from coal tar refinery using immobilized biomass. **Chemical Engineering Technology**, v. 13, p. 3-79, 1990.
- ILLANES, A. **Biotechnología de enzimas**. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

IVANOVA, V.; HRISTOV, J.; DOBREVA, E.; AL-HASSAN, Z.; PENCHEV, I. Performance of a magnetically stabilized bed reactor with immobilized yeast cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, n. 2, p. 187-198, 1996.

JOHNSON, F. H.; EYRING, J.; POLISSAR, M. J. The Kinetic Basis of Molecular Biology. John Wiley e Sons, Inc., New York, 1954.

JUSTO, O. R.; PÉREZ, V. H.; ALEGRE, R. M.; ALVAREZ, D. C. Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic fields. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, p. 155-163, 2006.

KATAOKA, H.; SATO, S.; MUKATAKA, S.; NAMIKI, A.; YOSHIMURA, K.; TAKAHASHI, J. Effects of periodic change in pressure and dissolved-oxygen concentration on the incubation characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 663-667, 1986.

KLEIN, J.; ROSENBERG, M.; MARKOS, J.; DOLGOS, O.; KROSLÁK, M.; KRISTOFIKOVÁ, L. Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* – study of mass transfer in an airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 197-205, 2002.

LEI, C.; BERG, H. Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 2, p. 261-265, 1998.

LI, Y.; HUGENHOLTZ, J.; SYBESMA, W.; ABEE, T.; MOLENAAR, D. Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 83-90, 2005.

LI, Y.; WEI, G.; CHEN, J. Glutathione: a review on biotechnological production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 3, p. 233-242, 2004.

LI, Z.; GUO, S.; LI, L.; CAI, M. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 700-705, 2007.

LIANG, G. B.; DU, G. C.; CHEN, J. A novel strategy of enhanced glutathione production in high cell density cultivation of *Candida utilis*– cysteine addition combined with dissolved oxygen controlling. **Enzyme Microbiology Technology**, v.42, p. 284–289, 2008a.

LIANG, G.; LIAO, X.; DU, G.; CHEN, J. Elevated glutathione production by adding precursor amino acids coupled with ATP in high cell density cultivation of *Candida utilis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1432-1440, 2008b.

LIANG, G.; LIAO, X.; DU, G.; CHEN, J. Optimization of amino acids addition for efficient production of glutathione in *Candida utilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 3, p. 234-240, 2008c.

LIN, J.; TIAN, J.; YOU, J.; JIN, Z.; XU, Z.; CEN, P. An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 1, p. 19-25, 2004.



- LIU, H.; LIN, J. P.; CEN, P. L.; PAN, Y. J. Co-production of S-adenozyl-L-methionine and glutathione from spent brewer's yeast cells. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1993-1997, 2004.
- LIU, C.; HWANG, C.; LIAO, C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 17-23, 1999.
- LOPES, P. **Influência de campos magnéticos na fermentação alcoólica descontínua**. 128 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos. São Caetano do Sul, São Paulo, 2008.
- MACCARONE, E.; MACCARONE, A.; RAPISARDA, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 4, p. 901-904, 1985.
- MALKO, J. A.; CONSTANTINIDIS, I.; DILLEHAY, D.; FAJMAN, W. A. Search for influence of 1.5 tesla magnetic field on growth of yeast cells. **Bioelectromagnetics**, v. 15, n. 6, p. 495-501, 1994.
- MARQUIS, R. E. High Pressure Microbiology. In: Basic and Applied High Pressure Biology. Bennett, P. B, Marquis, R. E. (eds.), University of Rochester Press, New York, USA, 1-14, 1994.
- MAU, J. L.; LIN, H. C.; SONG, S. F. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. **Food Research International**, v. 35; p. 519-526; 2002.
- MEHEDINTU, M.; BERG, H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 67-70, 1997.
- MILLER, J. F.; SHAH, N. N.; NELSON, C. M.; LUDLOW, J. M.; CLARK, D. S. Pressure and temperature effects on growth and methane production of the extreme thermophile *Methanococcus jannaschii*. **Applied Environment Microbiology**, v. 54, p. 3039-3042, 1988.
- MILLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker*. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 688-693, 2007.
- MOTTA, M. A.; MONTENEGRO, E. J. N.; STAMFORD, T. L. M.; SILVA, A. R.; SILVA, F. R. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 970-973, 2001.
- MURATA, K.; TANI, K.; KATO, J.; CHIBATA, I. Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 72-77, 1981.
- NELSON, C.; SCHUPPENHAUER, M., CLARK, D. High-pressure, high temperature biorreactor for comparing effects of hyperbaric and hydrostatic pressure on bacterial growth. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1789-1793, 1992.

NELSON, C.; SCHUPPENHAUER, M.; CLARK, D. Effects of hyperbaric pressure on a deepsea Archaeobacterium in stainless steel and glass-lined vessels. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3576-3580, 1991.

NIE, W.; WEI, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J. Enhanced intracellular glutathione synthesis and excretion capability of *Candida utilis* by using a low pH-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 378-384, 2005.

NOVÁK, J.; STRASÁK, L.; FOJT, L.; SLANINOVÁ, I.; VETERL, V. Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 1, p. 115-121, 2007.

NWOSE E. U.; JELINEK H. F.; RICHARDS R. S.; KERR P. G.; The 'vitamin E regeneration system' (VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes - A hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 70, n. 5, p. 1002-1008, 2008.

OHWADA, T.; SAGISAKA, S. An increase in levels of glutathione in *Escherichia coli* B caused by osmotic stress. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 3371-3372, 1990.

OKABE, M.; OHTHA, N.; PARK, Y. S. Itaconic acid production in an air-lift bioreactor using a modified draft tube. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 2, p. 117-122, 1993.

OKUNO, K.; TUCHIYA, K.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli* under various medium compositions and temperatures. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 103-106, 1993.

OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. **Postharvest Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 87-94, 2008.

ONKEN, U.; JOSTMANN, T. Influence of pressure on growth of *Pseudomonas fluorescens*. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 413-418, 1984.

ONKEN, U.; LIEFKE, E. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 40: Bioprocess and Engineering, Fiechter, A. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 137-169, 1989.

OWENS, C. W. I.; PENNINCKX, M. J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9/10, p. 737-742, 2000.

PEDROSO, R. F. P. **Produção de vinagre de maçã em biorreator Air-lift**. 85 p. Dissertação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Centro Tecnológico. Santa Catarina, 2003.

PENNINCKX, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 295-305, 2002.

PEREZ, V. H; REYES, A. F; JUSTO, O. R; ALVAREZ, D. C; ALEGRE, R. M. Bioreactor coupled with electromagnetic field generator: effects of extremely low frequency electromagnetic fields on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, v. 23, n.5, p.1091-1094, 2007.

PICHKO, V. B.; POVALYAEVA, I. V. Electromagnetic stimulation of microorganism productivity: possible mechanisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 425-428, 1996.

PIEDRAHIA-AGUIRRE, C. A. **Estudo da produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em meios proteicos de baixo custo.** Dissertação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

POLLARD, D. J.; SHANLOU, P. A.; LILLY, M. D.; ISON, A. P. *Saccharomyces cerevisiae* fermentations in a pilot scale airlift bioreactor: comparison of air sparger configurations. **Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 5, p. 279-290, 1996.

RAO, T. B. M. L. R.; SONOLIKAR, R. L.; SAHEB, P. S. Influence of magnetic field on the performance of bubble columns and airlift bioreactor with submersed microorganisms. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 21/22, p. 4155-4160, 1997.

ROJAS-GRAU, M. A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. effect of natural antibrowning agents on color and related enzymes in fresh-cut fuji apples as an alternative to the use of ascorbic acid. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. 267-272, 2008.

ROLLINI, M.; MANZONI, M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1501-1505, 2006.

ROSSI, M. J. **Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator tipo airlift.** 188f. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Santa Catarina, 2001.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

RUIZ-GÓMEZ, M. J.; PRIETO-BARCIA, M. I.; RISTORI-BOGAJO, E.; MARTÍNEZ-MORILLO, M. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 2, p. 151-155, 2004.

SAKATO, K.; TANAKA, H. Advanced control of glutathione fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 8, p. 904-912, 1992.

SANTOS, L. O. **Estudo da produção de glutatona a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações.** 140f. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Campinas, SP: [s.n.]. 2008.

SANTOS, L. O.; ALEGRE, R. M.; DIEGO, C. G.; CUELLAR, J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1362-1367, 2010.

SANTOS, L. O.; GONZALES, T. A.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Influence of culture conditions on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 4, p. 763-769, 2007.

SAWA, Y.; SHINDO, H.; NISHIMURA, S.; OCHIAI, H. Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 50, n. 5, p. 1361-1363, 1986.

SCHMIDT, M. G.; KONETZKA, W. A. Glutathione overproduction by selenite-resistant *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 825-827, 1986.

SHAN, X.; TY, A. W.; JONES, D. P. Glutathione dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n.1, p. 61-71, 1990.

SHIMIZU, H.; ARAKI, K.; SHIOYA, S.; SUGA, K. Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 2, p. 196-205, 1991.

SIDAWAI, G. H. Influence of electrostatic fields on seed germination. **International Journal of Biometeorology**, n. 4-4, v. 13, p. 219-230, 1969.

SIEGEL, M. H.; MERCHUK, J. C. Mass transfer in a rectangular air-lift reactor: effects geometry and gas recirculation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 9, p. 1128-1137, 1987.

SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C. W. Application of *air-lift* gas-liquid-solid reactors in Biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 13-14, p. 3215-3229, 1992.

SOUZA, E. M. M. **Contribuição ao conhecimento do comportamento da flora microbiana em resposta ao condicionamento magnético de águas de irrigação de roseiras**. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia Mauá, São Caetano do Sul, 2006.

STEPHEN, D. W. S.; JAMIESON, D. J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2/3, p. 207-212, 1996.

STURN, F. J., HURWITZ, S. A., DEMING, J. W., KELLY, R. M. Growth of the extreme thermophile *Sulfolobus acidocaldarius* in a hyperbaric helium bioreactor. **Biotechnology Bioengineering**, v. 29, p. 1066-1074, 1987.

SUZUKI, H.; HASHIMOTO, W.; KUMAGAI, H. Glutathione metabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, n. 3, p. 175-184, 1999.

SUZUKI, T.; YOKOYAMA, A.; TSUJI, T.; IKESHIMA, E.; KEIKO NAKASHIMA, K.; IKUSHIMA, S.; KOBAYASHI, C.; YOSHIDA, S. Identification and characterization of

genes involved in glutathione production in yeast. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 107-113, 2011.

TAVARES, L. Z.; PRADELLA, J. G. C. Cálculo das constantes de tempo em biorreator “air-lift” na produção de polihidroxibutirato, In: **Anais do Simpósio Nacional de Fermentações**, SINAFERM, 2000.

TAYLOR, C. D. Growth of a bacterium under high-pressure oxy-helium atmosphere. **Applied Environment Microbiology**, v. 37, p. 42-49, 1979.

THIBAULT, J.; LEDUY, A.; CÔTÉ, F. Production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under high-pressure conditions, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 74-80, 1987.

THIEMANN, J. E. Construção de equipamentos de fermentação. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Eds.), **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, SP, v.2, p.179-190, 2001.

TRYSTAM, G.; PIGACHE, S. Modeling and simulation of a large scale air-lift fermenter. **European Symposium on Computer Aided Process Engineering**, v. 2, p.171-176, 1993.

TURKOGLU, A.; DURU, M. E.; MERCAN, N.; KIVRAK, I.; GEZER, K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sphureus* (Bull.) Murrill. **Food Chemistry**, 2006.

TYAGY, Z. R. D.; TRAN, F. T.; AGBEBAVI, T. J. Mesophilic e thermofilic digestion of municipal sludge in an airlift U-shape bioreactor. **Biology Wastes**, v. 31, p. 251-266, 1990.

UBIYVOVK, V. M.; ANANIN, V. M.; MALYSHEV, A. Y.; KANG, H. A.; SIBIRNY, A. A. Optimization of glutathione production in batch and fed-batch cultures by the wild-type and recombinant strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL-1. **BMC Biotechnology**, p. 1-12, 2011.

UTSUNOMIYA, T.; YAMANE, Y.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Stimulation of porphyrin production by application of an external magnetic field to a photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 4, p. 401-404, 2003.

VAN NOSTRAN, F. E.; REYNOLDS, R. J.; HEDRICK, H. G. Effects of a high magnetic field at different osmotic pressures and temperatures on multiplication of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 561-563, 1967.

VIAL, C.; PONCIN, S.; WILD, G.; MIDOUX, N. Experimental and theoretical analysis of the hydrodynamics in the riser of an external loop airlift reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 4745-4762, 2002.

WALSBY, A. E. Gas filled structures providing buoyancy in photosynthetic organisms. In: SLEIGH, M.A.; MACDONALD, A.G. (Eds.). The effect of pressure on living organisms. New York: **Academic Press**, 1972. p. 233-239.

WANG BANG, I. N., DELMAS, H.; AIME, B. Gas liquid mass transfer in a new phase “air-lift” reactor. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, p.137-142, 1998.

WANG, S. S. S.; LIU, K. N.; WEN, W. S.; WANG, P. Fibril formation of bovine  $\alpha$ -lactalbumin is inhibited by glutathione. **Food Biophysics**, v. 33, n. 6, p. 138-151, 2011.

WEI, G.; LI, Y.; DU, G.; CHEN, J. Application of two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 11, p. 887-890, 2003a.

WEI, G.; LI, Y.; DU, G.; CHEN, J. Effect of surfactants on extracellular accumulation of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1133-1138, 2003b.

WEI, G.; LI, Y.; WANG, D.; CHEN, J. Overproduction of glutathione by L-cysteine addition and a temperature-Shift strategy. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 38, p. 347-353, 2008.

WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2424-2428, 2006.

WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3474-3479, 2005.

WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 6/7, p. 501-507, 2004.

WIEDERHOLT, K. M.; STEELE, J. L. Glutathione accumulation in *Lactococcus*. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 5, p. 1183-1188, 1994.

WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.

WU, J. Y.; WU, W.T. Fed-Batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in an *air lift* reactor with net draft tube. **Biotechnology Progress**, v. 2, p. 230-233, 1991.

YOSHIDA, H.; ARAI, S.; HARA, K. Y.; YAMADA, R.; OGINO, C.; HIDEKI FUKUDA, H.; KONDO, A. Efficient and direct glutathione production from raw starch using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 89, p. 1417-1422, 2010.

YOSHIDA, H.; HARA, K. Y.; KIRIYAMA K.; NAKAYAMA, H.; OKAZAKI, F.; MATSUDA, F.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic glutathione production using metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* as a whole-cell biocatalyst. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, p. 1001-1006, 2011.

YOUNG, H. L. Physiological and biochemical changes in bacterial cells exposed to oxygen. **Journal Bacteriology**, v. 97, p. 1498-1499, 1969.

YUGUO, Z., ZHAO, W., XIAOLONG, C. Citric acid production from the mash of dried sweet potato with its dregs by *Aspergillus niger* in an external-loop airlift bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 237-242, 1999.

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C.  $\alpha$ -Amilase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p.115-121, 2000.

ZAPATA, J. E.; HOYOS, M.; MORENO, G. Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de *Saccharomyces cerevisiae*. **Interciência**, v. 30, n. 7, p. 409- 413, 2005.

ZAPATA, J. E.; MORENO, G.; MÁRQUEZ, E. J. Efectos de los campos magnéticos sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. **Interciência**, v. 27, n. 10, p. 544- 550, 2002.

ZHANG, T.; WEN, S.; TAN, T. Optimization of the medium for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 454-458, 2007.

## 9 ANEXOS

### A - RESULTADOS CURVA PADRÃO GLUTATIONA E CONCENTRAÇÃO CELULAR

**Tabela 19:** Resultados médios das absorvâncias e concentração celular (g/L), referente a curva padrão.

<b>Diluições</b>	<b>Média das absorvâncias</b>	<b>Concentração celular (g/L)*</b>
1	0,151	0,19 ± 0,00
2	0,307	0,38 ± 0,01
3	0,415	0,57 ± 0,00
4	0,515	0,76 ± 0,01
5	0,705	0,95 ± 0,02
6	0,728	1,15 ± 0,01
7	0,810	1,33 ± 0,00
8	0,948	1,52 ± 0,01
9	1,046	1,73 ± 0,00
10	1,155	3,80 ± 0,04

\* ± Desvio padrão.

**Tabela 20:** Resultados médios das absorvâncias e concentração celular (mg/L), referente a curva padrão da glutatona.

<b>Diluições</b>	<b>Média das absorvâncias</b>	<b>Concentração GSH (mg/L)*</b>
1	0,135	0,014 ± 0,01
2	0,283	0,028 ± 0,00
3	0,451	0,042 ± 0,02
4	0,531	0,056 ± 0,01
5	0,640	0,070 ± 0,03
6	0,725	0,084 ± 0,00
7	0,825	0,097 ± 0,01
8	0,913	0,111 ± 0,01
9	1,076	0,126 ± 0,05

\* ± Desvio padrão.



## B - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES SOB DIFERENTES PRESSÕES

**Tabela 21:** Resultados no biorreator “air-lift” despressurizado.

Tempo (h)	pH	Concentração celular*(g/L)	GSH* (mg/L)	Glicose* (g/L)
0	5,06	0,07 ± 0,005	1,29 ± 0,001	53,57 ± 0,001
6	5,00	0,25 ± 0,003	2,70 ± 0,003	38,53 ± 0,006
20	4,80	0,33 ± 0,002	3,99 ± 0,003	24,87 ± 0,004
24	4,92	0,32 ± 0,005	5,87 ± 0,003	0,63 ± 0,000
28	5,00	0,43 ± 0,002	9,15 ± 0,004	0,07 ± 0,007
44	4,80	0,84 ± 0,003	29,75 ± 0,002	0,00
48	4,60	1,08 ± 0,004	43,30 ± 0,002	0,00
52	4,36	1,40 ± 0,004	43,13 ± 0,053	0,00
68	4,20	3,29 ± 0,002	55,51 ± 0,003	0,00
70	4,22	3,96 ± 0,002	68,24 ± 0,004	0,00
72	4,17	4,05 ± 0,001	74,05 ± 0,004	0,00
74	4,11	4,11 ± 0,003	71,41 ± 0,002	0,00
76	4,10	4,15 ± 0,002	72,29 ± 0,003	0,00
92	4,13	2,79 ± 0,001	68,53 ± 0,008	0,00
94	4,15	2,63 ± 0,001	52,81 ± 0,004	0,00
96	4,10	2,42 ± 0,004	48,00 ± 0,006	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 22:** Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 0,25 kgf/cm<sup>2</sup>.

Tempo (h)	pH	Concentração celular*(g/L)	GSH* (mg/L)	Glicose* (g/L)
0	5,14	0,00 ± 0,004	0,76 ± 0,002	54,88 ± 0,004
6	5,05	0,07 ± 0,016	5,34 ± 0,005	22,65 ± 0,003
21	4,53	3,92 ± 0,010	25,88 ± 0,004	10,94 ± 0,006
24	4,55	4,57 ± 0,002	34,56 ± 0,002	4,40 ± 0,005
28	4,47	5,01 ± 0,003	39,96 ± 0,003	0,00
44	4,45	4,89 ± 0,003	51,11 ± 0,001	0,00
48	4,43	4,99 ± 0,002	67,65 ± 0,020	0,00
52	4,38	4,77 ± 0,002	125,98 ± 0,005	0,00
69	4,32	5,23 ± 0,006	116,12 ± 0,005	0,00
72	4,28	5,77 ± 0,003	122,69 ± 0,002	0,00
74	4,20	5,95 ± 0,005	123,40 ± 0,008	0,00
76	4,33	5,71 ± 0,003	91,95 ± 0,014	0,00
78	4,35	5,54 ± 0,004	85,84 ± 0,010	0,00
92	4,39	5,06 ± 0,002	69,77 ± 0,009	0,00
96	4,24	6,10 ± 0,003	58,62 ± 0,013	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 23:** Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,16	0,09 ± 0,003	1,94 ± 0,002	54,36 ± 0,004
6	5,07	0,27 ± 0,026	9,68 ± 0,011	37,69 ± 0,005
20	4,87	3,47 ± 0,009	29,62 ± 0,005	20,36 ± 0,028
24	4,65	3,95 ± 0,002	43,59 ± 0,003	6,98 ± 0,001
28	4,57	4,32 ± 0,017	59,32 ± 0,002	0,00
44	4,75	5,13 ± 0,005	75,28 ± 0,005	0,00
48	4,80	5,36 ± 0,002	81,67 ± 0,002	0,00
52	5,06	6,47 ± 0,004	101,33 ± 0,004	0,00
55	5,16	7,44 ± 0,006	117,52 ± 0,005	0,00
68	5,32	9,36 ± 0,004	120,52 ± 0,002	0,00
70	5,49	9,27 ± 0,003	125,21 ± 0,012	0,00
72	5,94	9,32 ± 0,002	131,25 ± 0,006	0,00
74	6,00	9,56 ± 0,002	130,84 ± 0,004	0,00
76	6,50	9,95 ± 0,027	136,36 ± 0,003	0,00
92	6,80	10,61 ± 0,001	157,48 ± 0,004	0,00
94	7,36	10,83 ± 0,001	166,45 ± 0,010	0,00
96	7,60	10,81 ± 0,001	178,72 ± 0,007	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 24:** Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 0,75 kgf/cm<sup>2</sup>.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,12	0,20 ± 0,003	1,70 ± 0,001	53,76 ± 0,000
6	5,08	0,36 ± 0,002	3,46 ± 0,005	30,81 ± 0,000
21	4,58	4,36 ± 0,006	19,54 ± 0,006	6,78 ± 0,000
24	4,46	4,49 ± 0,003	27,87 ± 0,003	0,57 ± 0,000
28	4,40	4,59 ± 0,006	29,16 ± 0,001	0,00
44	4,30	4,74 ± 0,003	34,44 ± 0,005	0,00
48	4,36	4,89 ± 0,002	56,74 ± 0,002	0,00
52	4,40	4,80 ± 0,002	82,44 ± 0,003	0,00
67	4,60	5,74 ± 0,006	85,14 ± 0,005	0,00
70	4,63	5,74 ± 0,003	94,76 ± 0,003	0,00
72	4,62	5,80 ± 0,002	102,39 ± 0,002	0,00
74	4,66	5,74 ± 0,003	89,01 ± 0,007	0,00
92	4,65	11,46 ± 0,004	66,95 ± 0,012	0,00
94	4,67	11,49 ± 0,003	62,37 ± 0,004	0,00
96	4,70	11,13 ± 0,004	56,15 ± 0,002	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 25:** Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 1,00 kgf/cm<sup>2</sup>.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,10	0,11 ± 0,011	1,99 ± 0,001	53,56 ± 0,001
6	4,71	0,27 ± 0,006	12,17 ± 0,001	38,52 ± 0,006
20	4,36	3,84 ± 0,010	16,32 ± 0,001	24,87 ± 0,004
24	4,47	3,90 ± 0,003	21,12 ± 0,002	0,63 ± 0,007
28	4,56	4,09 ± 0,006	19,59 ± 0,004	0,07 ± 0,000
45	4,18	4,29 ± 0,014	22,23 ± 0,001	0,00
48	4,47	4,52 ± 0,004	35,38 ± 0,004	0,00
52	4,20	4,63 ± 0,002	52,04 ± 0,002	0,00
55	4,31	4,91 ± 0,006	55,97 ± 0,003	0,00
67	4,60	5,58 ± 0,003	60,02 ± 0,004	0,00
70	4,66	5,84 ± 0,002	66,65 ± 0,005	0,00
72	4,90	6,85 ± 0,003	99,33 ± 0,019	0,00
75	5,12	7,22 ± 0,002	92,64 ± 0,010	0,00
93	5,19	6,92 ± 0,005	69,23 ± 0,009	0,00
96	5,36	6,91 ± 0,002	49,69 ± 0,007	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 26:** Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 1,25 kgf/cm<sup>2</sup>.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,14	0,12 ± 0,002	2,17 ± 0,003	57,04 ± 0,003
6	5,20	0,47 ± 0,002	6,75 ± 0,001	34,39 ± 0,004
24	4,60	5,26 ± 0,003	33,00 ± 0,005	15,44 ± 0,018
28	4,69	6,47 ± 0,003	84,08 ± 0,009	0,77 ± 0,003
48	4,40	7,88 ± 0,010	96,04 ± 0,005	0,00
52	4,30	8,24 ± 0,005	129,00 ± 0,006	0,00
55	4,36	7,97 ± 0,006	102,86 ± 0,004	0,00
72	4,40	7,73 ± 0,003	97,11 ± 0,008	0,00
74	4,31	8,45 ± 0,007	90,30 ± 0,005	0,00
76	4,36	7,77 ± 0,006	91,24 ± 0,002	0,00
78	4,40	7,75 ± 0,002	91,12 ± 0,002	0,00
94	4,46	7,84 ± 0,008	86,78 ± 0,009	0,00
96	4,50	7,96 ± 0,002	78,57 ± 0,006	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 27:** Resultados obtidos no biorreator “air-lift” a 1,50 kgf/cm<sup>2</sup>.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,16	0,03 ± 0,002	1,11 ± 0,004	54,88 ± 0,006
6	4,93	0,42 ± 0,006	5,34 ± 0,007	22,65 ± 0,011
24	4,98	6,28 ± 0,005	89,41 ± 0,002	10,93 ± 0,003
27	5,20	7,62 ± 0,003	99,69 ± 0,020	4,39 ± 0,002
30	5,22	9,33 ± 0,002	106,07 ± 0,010	0,00
48	6,00	11,98 ± 0,004	115,65 ± 0,008	0,00
51	6,35	12,86 ± 0,001	114,24 ± 0,002	0,00
54	7,00	14,72 ± 0,002	125,97 ± 0,002	0,00
72	7,12	17,26 ± 0,002	141,35 ± 0,001	0,00
75	7,16	17,69 ± 0,004	107,08 ± 0,003	0,00
78	7,22	17,50 ± 0,002	97,34 ± 0,005	0,00
82	7,36	18,24 ± 0,005	94,52 ± 0,003	0,00
94	7,50	17,56 ± 0,008	88,77 ± 0,004	0,00
96	7,76	17,25 ± 0,006	86,89 ± 0,002	0,00

\* ± desvio padrão

C - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES COM APLICAÇÃO DE CM

**Tabela 28:** Resultados obtidos no delineamento fatorial 2<sup>2</sup> do ensaio 1PF, a pressão de 0,50 kgf/cm<sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 3,0 cm/s, com aplicação de CM.

Tempo (h)	pH	Concentração celular*(g/L)	GSH* (mg/L)	Glicose* (g/L)
0	5,10	0,03 ± 0,010	4,17 ± 0,002	56,80 ± 0,006
6	5,12	0,10 ± 0,010	6,22 ± 0,006	43,68 ± 0,013
24	5,09	0,30 ± 0,007	9,45 ± 0,001	28,93 ± 0,014
28	5,00	0,49 ± 0,012	19,95 ± 0,007	1,07 ± 0,001
32	4,92	5,52 ± 0,006	26,35 ± 0,009	0,46 ± 0,004
48	4,82	5,88 ± 0,004	29,22 ± 0,006	0,00
52	4,68	6,08 ± 0,004	36,85 ± 0,006	0,00
55	4,52	6,24 ± 0,006	45,89 ± 0,002	0,00
58	4,50	6,19 ± 0,007	51,93 ± 0,005	0,00
72	4,52	6,38 ± 0,001	67,24 ± 0,008	0,00
74	4,49	6,51 ± 0,007	70,18 ± 0,002	0,00
76	4,46	6,51 ± 0,001	71,17 ± 0,005	0,00
78	4,50	6,67 ± 0,007	75,81 ± 0,005	0,00
94	4,52	9,14 ± 0,003	66,13 ± 0,003	0,00
96	4,51	6,94 ± 0,002	64,07 ± 0,005	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 29:** Resultados obtidos no delineamento fatorial 2<sup>2</sup> do ensaio 2PF, a pressão de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 3,0 cm/s, com aplicação de CM.

Tempo (h)	pH	Concentração celular*(g/L)	GSH* (mg/L)	Glicose*(g/L)
0	4,97	0,08 ± 0,008	0,94 ± 0,002	54,88 ± 0,008
6	5,00	0,19 ± 0,002	8,16 ± 0,005	34,56 ± 0,008
20	5,05	1,77 ± 0,009	15,84 ± 0,008	21,91 ± 0,002
24	4,89	1,92 ± 0,011	27,23 ± 0,005	0,49 ± 0,006
28	4,76	1,80 ± 0,008	30,63 ± 0,003	0,00
44	4,33	2,63 ± 0,002	38,84 ± 0,006	0,00
48	4,20	3,74 ± 0,003	40,90 ± 0,009	0,00
52	4,16	3,94 ± 0,010	44,13 ± 0,004	0,00
68	4,00	4,09 ± 0,004	49,63 ± 0,003	0,00
70	4,05	5,64 ± 0,005	63,02 ± 0,005	0,00
72	4,18	7,16 ± 0,005	63,66 ± 0,007	0,00
74	4,27	6,53 ± 0,019	56,33 ± 0,007	0,00
76	4,50	6,90 ± 0,005	58,38 ± 0,005	0,00
78	4,55	6,96 ± 0,008	56,92 ± 0,005	0,00
92	4,87	6,98 ± 0,005	49,93 ± 0,001	0,00
94	5,00	6,78 ± 0,003	45,71 ± 0,003	0,00
96	5,12	6,32 ± 0,004	38,67 ± 0,010	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 29:** Resultados obtidos no delineamento fatorial 2<sup>2</sup> do ensaio 3PF, a pressão de 0,50 kgf/cm<sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 15,0 cm/s, com aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,20	0,04 ± 0,002	3,11 ± 0,002	56,84 ± 0,006
6	5,18	0,08 ± 0,006	7,81 ± 0,003	36,41 ± 0,004
18	5,00	0,07 ± 0,004	33,56 ± 0,005	24,25 ± 0,016
24	4,81	-	45,30 ± 0,006	0,76 ± 0,012
28	4,76	1,44 ± 0,002	44,48 ± 0,004	0,37 ± 0,008
42	4,30	3,50 ± 0,013	34,33 ± 0,005	0,00
48	4,12	3,72 ± 0,007	30,75 ± 0,005	0,00
52	4,16	3,80 ± 0,013	25,99 ± 0,006	0,00
66	4,06	3,64 ± 0,005	39,08 ± 0,003	0,00
70	4,10	3,22 ± 0,011	35,91 ± 0,004	0,00
72	4,18	2,73 ± 0,080	31,74 ± 0,013	0,00
74	4,24	3,98 ± 0,008	40,96 ± 0,011	0,00
90	4,24	4,01 ± 0,006	44,59 ± 0,006	0,00
92	4,29	4,00 ± 0,004	49,70 ± 0,011	0,00
94	4,37	3,81 ± 0,005	40,49 ± 0,009	0,00
96	4,40	3,88 ± 0,009	31,45 ± 0,012	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 30:** Resultados obtidos no delineamento fatorial 2<sup>2</sup> do ensaio 4PF, a pressão de 1,50 kgf/cm<sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 15,0 cm/s, com aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,06	0,18 ± 0,007	0,71 ± 0,002	55,0 ± 0,007
6	5,12	0,10 ± 0,010	9,98 ± 0,001	29,3 ± 0,010
20	5,00	0,11 ± 0,003	19,01 ± 0,004	14,4 ± 0,008
24	4,59	2,19 ± 0,006	25,17 ± 0,002	0,5 ± 0,006
28	4,70	0,85 ± 0,010	26,23 ± 0,010	0,1 ± 0,001
44	4,32	0,99 ± 0,002	32,33 ± 0,005	0,00
48	4,11	1,57 ± 0,006	31,04 ± 0,002	0,00
52	4,24	1,74 ± 0,006	31,74 ± 0,002	0,00
68	4,32	2,18 ± 0,028	36,97 ± 0,006	0,00
70	4,30	3,20 ± 0,004	38,26 ± 0,002	0,00
72	4,37	7,26 ± 0,012	42,72 ± 0,005	0,00
74	4,46	7,57 ± 0,007	41,78 ± 0,003	0,00
76	4,59	7,41 ± 0,004	38,08 ± 0,004	0,00
78	4,67	7,95 ± 0,006	34,56 ± 0,004	0,00
92	4,70	8,28 ± 0,006	30,75 ± 0,003	0,00
94	4,74	8,34 ± 0,006	31,39 ± 0,003	0,00
96	4,87	8,80 ± 0,007	30,40 ± 0,004	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 31:** Resultados obtidos no delineamento fatorial 2<sup>2</sup> no ensaio 5PF, a pressão de 1,00 kgf/cm<sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 9,0 cm/s, com aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,16	0,08 ± 0,003	0,06 ± 0,002	53,27 ± 0,004
6	5,10	0,05 ± 0,001	0,35 ± 0,002	38,78 ± 0,011
20	5,12	1,83 ± 0,003	11,80 ± 0,003	27,98 ± 0,004
24	5,00	2,76 ± 0,008	21,36 ± 0,008	1,22 ± 0,008
28	4,92	2,78 ± 0,005	26,52 ± 0,003	0,68 ± 0,005
40	4,42	2,87 ± 0,009	25,06 ± 0,006	0,00
44	4,37	2,93 ± 0,007	27,05 ± 0,004	0,00
48	4,40	2,87 ± 0,005	27,87 ± 0,004	0,00
52	4,38	2,54 ± 0,003	35,97 ± 0,010	0,00
66	4,42	2,24 ± 0,006	31,28 ± 0,003	0,00
70	4,56	2,06 ± 0,002	35,27 ± 0,102	0,00
72	4,72	1,89 ± 0,003	24,23 ± 0,004	0,00
74	5,00	1,97 ± 0,009	23,71 ± 0,002	0,00
76	5,16	1,88 ± 0,001	23,41 ± 0,004	0,00
90	5,18	1,90 ± 0,011	18,01 ± 0,003	0,00
92	5,21	1,81 ± 0,004	15,14 ± 0,004	0,00
94	5,26	1,17 ± 0,006	9,57 ± 0,002	0,00
96	5,23	1,57 ± 0,004	7,51 ± 0,005	0,00

\* ± desvio padrão



**Tabela 32:** Resultados obtidos no delineamento fatorial 2<sup>2</sup> no ensaio 6PF, a pressão de 1,00 kgf/cm<sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 9,0 cm/s, com aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,08	0,11 ± 0,007	0,41 ± 0,011	55,49 ± 0,048
6	5,10	0,18 ± 0,010	1,98 ± 0,005	37,67 ± 0,004
20	5,11	0,36 ± 0,008	9,10 ± 0,010	25,05 ± 0,009
24	5,19	1,92 ± 0,005	21,01 ± 0,007	1,22 ± 0,007
28	5,00	2,96 ± 0,006	28,93 ± 0,013	0,59 ± 0,005
40	4,90	2,99 ± 0,008	34,56 ± 0,011	0,00
44	4,72	3,10 ± 0,004	29,63 ± 0,005	0,00
48	4,60	2,98 ± 0,004	27,99 ± 0,006	0,00
52	4,40	2,86 ± 0,006	34,21 ± 0,008	0,00
66	4,32	2,68 ± 0,010	34,44 ± 0,007	0,00
70	4,50	2,38 ± 0,011	30,10 ± 0,007	0,00
72	4,71	2,10 ± 0,006	24,35 ± 0,003	0,00
74	4,76	2,09 ± 0,005	25,00 ± 0,007	0,00
76	5,16	1,92 ± 0,005	20,19 ± 0,010	0,00
90	5,16	1,79 ± 0,017	21,95 ± 0,005	0,00
92	5,30	1,82 ± 0,002	17,25 ± 0,011	0,00
94	5,26	1,85 ± 0,009	12,09 ± 0,009	0,00
96	5,24	1,56 ± 0,010	9,21 ± 0,007	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 33:** Resultados obtidos no delineamento fatorial 2<sup>2</sup> no ensaio 7PF, a pressão de 1,00 kgf/cm<sup>2</sup> e velocidade de reciclo de 9,0 cm/s, com aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	4,96	0,26 ± 0,007	1,70 ± 0,002	55,40 ± 0,008
6	4,75	0,16 ± 0,010	2,64 ± 0,004	35,95 ± 0,003
20	4,50	0,16 ± 0,005	7,34 ± 0,003	28,78 ± 0,005
24	4,94	1,84 ± 0,002	22,12 ± 0,003	1,73 ± 0,006
28	4,90	2,01 ± 0,006	26,11 ± 0,005	0,76 ± 0,008
40	4,87	2,26 ± 0,011	30,10 ± 0,003	0,00
44	5,00	2,65 ± 0,006	31,51 ± 0,003	0,00
48	5,06	2,73 ± 0,006	31,51 ± 0,009	0,00
52	5,28	2,99 ± 0,002	35,03 ± 0,002	0,00
66	5,12	3,06 ± 0,005	35,85 ± 0,003	0,00
70	5,20	3,16 ± 0,003	31,39 ± 0,006	0,00
72	5,10	3,07 ± 0,005	27,52 ± 0,005	0,00
74	5,19	2,87 ± 0,002	27,40 ± 0,003	0,00
76	5,22	2,58 ± 0,006	21,54 ± 0,003	0,00
90	5,26	2,39 ± 0,006	21,42 ± 0,001	0,00
92	5,20	2,17 ± 0,004	16,37 ± 0,002	0,00
94	5,29	2,01 ± 0,006	11,68 ± 0,002	0,00
96	5,26	1,81 ± 0,003	9,10 ± 0,001	0,00

\* ± desvio padrão

D - RESULTADOS DAS FERMENTAÇÕES CONTROLE SEM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

**Tabela 34:** Ensaio controle a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, com reciclo celular de 3,0 cm/s e sem aplicação de CM.

Tempo (h)	pH	Concentração celular*(g/L)	GSH* (mg/L)	Glicose* (g/L)
0	5,08	0,12 ± 0,006	0,09 ± 0,002	55,66 ± 0,004
6	5,12	0,34 ± 0,012	4,68 ± 0,011	39,40 ± 0,005
20	4,90	1,47 ± 0,020	12,62 ± 0,005	23,52 ± 0,028
24	4,87	2,22 ± 0,016	44,59 ± 0,003	10,27 ± 0,001
28	4,88	3,10 ± 0,015	62,38 ± 0,002	2,08 ± 0,000
44	4,80	4,33 ± 0,008	77,21 ± 0,005	0,00
48	4,86	5,36 ± 0,009	83,67 ± 0,002	0,00
52	4,90	5,77 ± 0,016	112,03 ± 0,004	0,00
68	5,03	6,66 ± 0,003	129,62 ± 0,002	0,00
70	5,00	10,27 ± 0,002	133,04 ± 0,012	0,00
72	5,12	10,32 ± 0,003	155,54 ± 0,006	0,00
74	5,29	10,20 ± 0,002	166,77 ± 0,004	0,00
92	5,30	10,12 ± 0,011	160,21 ± 0,004	0,00
96	5,38	10,06 ± 0,010	162,92 ± 0,007	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 35:** Ensaio controle a 0,50 kgf/cm<sup>2</sup>, com reciclo celular de 15,0 cm/s e sem aplicação de CM.

Tempo (h)	pH	Concentração celular*(g/L)	GSH* (mg/L)	Glicose* (g/L)
0	4,94	0,06 ± 0,003	0,96 ± 0,002	53,91 ± 0,020
6	5,01	0,10 ± 0,026	1,90 ± 0,011	38,80 ± 0,011
20	5,06	2,44 ± 0,009	20,14 ± 0,005	24,45 ± 0,009
24	4,90	3,23 ± 0,002	32,55 ± 0,003	16,77 ± 0,005
28	4,92	4,33 ± 0,017	37,44 ± 0,002	2,07 ± 0,000
44	4,98	5,00 ± 0,005	56,71 ± 0,005	0,00
48	5,00	5,86 ± 0,002	72,55 ± 0,002	0,00
52	5,12	6,85 ± 0,004	96,66 ± 0,004	0,00
68	5,11	9,24 ± 0,004	112,79 ± 0,002	0,00
70	5,21	9,32 ± 0,003	125,21 ± 0,012	0,00
72	5,16	10,34 ± 0,002	135,77 ± 0,006	0,00
74	5,11	-	167,88 ± 0,008	0,00
92	5,10	10,00 ± 0,001	170,05 ± 0,004	0,00
94	5,08	9,81 ± 0,001	160,03 ± 0,010	0,00
96	5,02	9,77 ± 0,001	155,21 ± 0,007	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 36:** Ensaio controle com pressão de 1,0 kgf/cm<sup>2</sup> com velocidade de reciclo celular de 9,0 cm/s e sem aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	4,99	0,09 ± 0,009	1,07 ± 0,008	55,07 ± 0,008
6	4,87	0,16 ± 0,016	2,77 ± 0,007	40,77 ± 0,010
20	4,75	0,23 ± 0,012	5,68 ± 0,019	20,12 ± 0,020
24	4,70	2,44 ± 0,035	7,55 ± 0,008	9,50 ± 0,012
28	4,87	2,23 ± 0,007	9,66 ± 0,006	3,67 ± 0,010
40	4,93	3,67 ± 0,020	12,88 ± 0,004	0,70 ± 0,000
44	5,12	2,67 ± 0,006	18,44 ± 0,005	0,00
48	5,11	2,70 ± 0,012	22,66 ± 0,010	0,00
52	5,22	2,87 ± 0,008	37,66 ± 0,011	0,00
66	5,24	3,01 ± 0,012	66,77 ± 0,012	0,00
70	5,33	3,05 ± 0,011	79,83 ± 0,018	0,00
72	5,45	3,09 ± 0,010	89,66 ± 0,020	0,00
74	5,34	2,99 ± 0,007	105,89 ± 0,001	0,00
76	5,22	2,65 ± 0,007	121,54 ± 0,002	0,00
90	5,30	2,57 ± 0,005	135,42 ± 0,002	0,00
92	5,29	2,20 ± 0,003	122,37 ± 0,004	0,00
94	5,15	2,25 ± 0,005	111,80 ± 0,004	0,00
96	5,17	2,08 ± 0,003	80,67 ± 0,006	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 37:** Ensaio controle com pressão de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup> com velocidade de reciclo celular de 3,0 cm/s e sem aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,05	0,07 ± 0,008	1,86 ± 0,009	52,78 ± 0,002
6	4,98	0,26 ± 0,010	4,88 ± 0,012	29,77 ± 0,009
24	4,90	4,35 ± 0,011	34,84 ± 0,009	18,77 ± 0,008
28	4,82	6,55 ± 0,011	57,33 ± 0,005	5,66 ± 0,004
44	4,80	8,66 ± 0,008	98,07 ± 0,004	0,00
48	4,70	10,78 ± 0,004	110,65 ± 0,006	0,00
52	4,59	15,77 ± 0,005	123,87 ± 0,007	0,00
70	4,68	16,43 ± 0,006	127,90 ± 0,005	0,00
72	4,76	15,22 ± 0,005	135,56 ± 0,009	0,00
74	4,79	15,08 ± 0,005	130,77 ± 0,005	0,00
78	4,85	15,00 ± 0,003	100,65 ± 0,006	0,00
90	5,07	14,29 ± 0,002	90,21 ± 0,003	0,00
92	5,12	14,23 ± 0,009	89,56 ± 0,002	0,00
96	5,33	14,00 ± 0,008	70,55 ± 0,001	0,00

\* ± desvio padrão

**Tabela 38:** Ensaio controle a 1,5 kgf/cm<sup>2</sup> com velocidade de reciclo celular de 15 cm/s, sem aplicação de CM.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração celular*(g/L)</b>	<b>GSH* (mg/L)</b>	<b>Glicose* (g/L)</b>
0	5,14	0,03 ± 0,007	2,33 ± 0,009	55,22 ± 0,009
6	5,00	0,34 ± 0,005	4,56 ± 0,007	38,63 ± 0,06
24	4,96	5,18 ± 0,003	34,66 ± 0,002	14,90 ± 0,013
28	4,89	7,90 ± 0,002	56,77 ± 0,013	1,89 ± 0,010
44	4,71	9,69 ± 0,006	77,89 ± 0,011	0,50 ± 0,000
48	4,66	12,34 ± 0,004	89,66 ± 0,011	0,00
52	4,70	12,89 ± 0,002	98,69 ± 0,008	0,00
70	4,78	14,00 ± 0,002	108,60 ± 0,007	0,00
72	4,90	15,78 ± 0,006	113,77 ± 0,002	0,00
74	4,99	15,23 ± 0,010	126,66 ± 0,008	0,00
78	5,08	15,06 ± 0,011	138,99 ± 0,005	0,00
90	5,08	15,14 ± 0,013	135,77 ± 0,006	0,00
92	5,12	15,18 ± 0,012	127,66 ± 0,004	0,00
96	5,23	15,09 ± 0,009	112,88 ± 0,006	0,00

\* ± desvio padrão