



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE GLUTATIONA POR *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZANDO
COPRODUTO INDUSTRIAL E SOB AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

FATIÉLE BONOW

PROF^a. DR^a. LUCIELEN OLIVEIRA DOS SANTOS
Orientadora

RIO GRANDE, RS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE GLUTATIONA POR *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZANDO
COPRODUTO INDUSTRIAL E SOB AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

FATIÉLE BONOW

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

PROF^a. DR^a. LUCIELEN OLIVEIRA DOS SANTOS
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

B719p Bonow, Fatiéle.
Produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando coproduto industrial e sob ação de campos magnéticos / Fatiéle Bonow. – 2016.
84 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2016.
Orientadora: Dr^a. Lucielen Oliveira dos Santos.

1. Antioxidante 2. Fermentação 3. Planejamento experimental
4. Soro do leite I. Santos, Lucielen Oliveira dos II. Título.

CDU 663.1

Dissertação defendida por Fatiéle Bonow e aprovada em 21 de março de 2016, pela
Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof^a. Dr^a. Lucielen Oliveira dos Santos

(FURG)

(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Garda Buffon

(FURG)

Prof^a. Dr^a. Janaina Fernandes de Medeiros Burket

(FURG)

Prof^a. Dr^a. Raquel Cristine Kuhn

(UFSM)

Dedico aos meus pais Elói e Darlei por nunca terem medido esforços para que eu chegasse até aqui, pelo amor, carinho, exemplo e incentivo nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que guia meus passos, que está sempre comigo, que faz todas as coisas acontecerem de forma certa, que me cuida e me protege, e me faz alcançar tudo o que sonho.

Aos meus pais, Elói e Darlei, por serem tudo na minha vida. Por me ouvirem, me ensinarem, me aconselharem e ajudarem. Por estarem comigo em todos os momentos. Amo vocês! Vocês são o meu espelho e meu orgulho.

Ao meu irmão Fabio, por ser um exemplo para mim, por estar ao meu lado durante toda a minha vida e minha cunhada Yziane por todo apoio que me foi dado durante esses dois anos.

A minha orientadora Lucielen, que não mediu esforços para me ajudar em todas as dificuldades que obtive neste trabalho, pelos “puxões de orelha”, que sem os quais, eu não teria chego até aqui, pela paciência e por todo apoio.

As minhas grandes e inseparáveis amigas Cibele, Julia e Vanessa, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, seja nos bons como nos ruins. Agradeço pela amizade de cada uma e pela paciência nos meus momentos de ausência. Amo vocês!

Aos meus amigos de mestrado: Aline, Douglas e Lenon pela amizade que só foi aumentando ao longo do tempo, por nossos encontros, conversas e risadas no deck do CC. Nossa amizade não se findará por aqui, podem ter certeza. Obrigada por tudo!

As minhas amigas de viagem para Rio Grande: Denise, Milene, Kricelle e Letícia, pelos bons momentos nos cafés da manhã no laboratório, pelas conversas descontraídas e pelos chimas. Vou sentir saudades!

Ao professor Jorge Alberto Vieira Costa, por ter me recebido de braços abertos no LEB.

A toda equipe do LEB/Biotecnologia/MIBI por toda ajuda prestada e pelas boas risadas nos churrascos e encontros.

Aos professores da EQA, que sempre estiveram dispostos a auxiliar nas dúvidas e nas dificuldades que surgiam ao longo do mestrado.

Aos técnicos Luisa e Roque, por sempre estarem prontos para me auxiliar quando alguma coisa não estava funcionando bem e pelo humor, sempre me animando quando estava desanimada.

A Bruna Cardias, pelo companheirismo e dedicação, sendo meu braço direito durante boa parte do meu trabalho.

Ao Thalles, por estar sempre disposto a tirar dúvidas na hora de fazer os gráficos, inclusive sábado à noite.

A FURG, uma instituição pública que me proporcionou meios e condições de um aprendizado de qualidade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

E, finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada!

Quando tudo nos parece dar errado, acontecem coisas boas, que não teriam acontecido se tudo tivesse dado certo.

Renato Russo.

RESUMO

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, L-cisteína e glicina, sendo sua principal função atuar como antioxidante. Com a descoberta de mais funções e propriedades, este composto tornou-se de interesse nas indústrias de aditivos para alimentos, cosméticos e fármacos. A GSH é um produto intracelular em *Saccharomyces cerevisiae*, podendo seu conteúdo ser aumentado através da estimulação da síntese com a aplicação de campos magnéticos (CM). Em sistemas biológicos pode ocorrer efeito estimulante, inibitório ou nulo na produção de biocompostos decorrente desta aplicação. Além do mais, a redução do custo do processo com o uso de soro de leite torna-se viável, em virtude da grande produção e da sua composição rica em nutrientes. O objetivo deste estudo foi a produção de glutathiona por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, avaliando a influência da aplicação de campos magnéticos e a adição de soro de leite ao meio de cultivo submerso. O acompanhamento das fermentações foi feito com determinações de pH, concentração celular, de glicose e de GSH. Nos frascos Erlenmeyer (250 mL) foi feito um delineamento composto central rotacional 2², sendo estudados as concentrações de extrato de levedura (10 a 50 g L⁻¹) e de soro de leite (5 a 20 %) no meio de cultivo. As condições de fermentação foram 20°C, 300 rpm, 5 % (v v⁻¹) de inóculo, pH inicial 5,0, durante 96 h e adição após 32 h de fermentação de 4 mmol L⁻¹ de cada um dos aminoácidos precursores da GSH (cisteína, ácido glutâmico e glicina). De acordo com os resultados obtidos nos ensaios em frascos Erlenmeyer, as melhores concentrações dos substratos proteicos no meio de crescimento foram obtidos utilizando 45 g L⁻¹ de extrato de levedura e 18 % de soro de leite para a concentração celular, com 20,4 g L⁻¹ após 96 h e 40 g L⁻¹ de extrato de levedura e 18 % de soro de leite para a concentração de GSH, com 329,8 mg L⁻¹ após 72 h. No fermentador de bancada (5 L) foram realizadas as fermentações com aplicação de CM de 31,7 mT, a fim de avaliar a influência dos CM na produção de GSH por *S. cerevisiae*. Para tal, foram feitas três fermentações variando o período da aplicação do CM: no tempo de 0 a 24 h, de 24 a 48 h e 48 a 72 h de fermentação e uma fermentação controle, sem a aplicação de CM. As condições de fermentação foram as mesmas realizadas em frascos Erlenmeyer, porém, com base no melhor resultado de concentração de GSH, no fermentador de bancada o tempo de fermentação foi 72 h e aeração de 1,0 vvm. De acordo com os resultados desta etapa, as maiores concentrações celular (26,9 g L⁻¹) e de GSH (474,4 mg L⁻¹) foram obtidas após 72 h quando o CM foi aplicado no período de 24 a 48 h de fermentação com aumento de 19,5 e 35,7 %, respectivamente em relação ao ensaio controle. A produção de GSH a partir de *S. cerevisiae* ATCC 7754, enriquecendo o meio de fermentação com soro de leite como substrato proteico, juntamente com a aplicação de CM, promoveu estimulação na síntese de GSH.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidante; fermentação; planejamento experimental; soro de leite.

ABSTRACT

Glutathione (GSH) is a tripeptide consisting of L-glutamate, L-cysteine and glycine. Its major role is to act as an antioxidant. After the discovery of more functions and properties, it drew the attention of additive, cosmetic and pharmaceutical industries. GSH, which is an intracellular product in *Saccharomyces cerevisiae*, can have its content increased by having its synthesis stimulated by magnetic field (MF) application. In biological systems, a stimulating, inhibitory or null effect may occur in the production of biocompounds. Moreover, reduction in the process cost with the use of whey becomes viable due to the large production and its composition, which is rich in nutrients. Therefore, this study aimed at producing GSH with the use of *S. cerevisiae* ATCC 7754 and evaluating the influence of the MF application and the addition of whey to submerged medium. Along the fermentation process, pH, cell concentration, glucose and GSH measurements were carried out. A Central Composite Rotatable Design 2² was conducted in Erlenmeyer flasks (250 mL) to study the effects of concentrations of yeast extract (10 to 50 g L⁻¹) and whey (5 to 20 %) on the submerged medium. Fermentation conditions were 20°C, 300 rpm, 5 % (v v⁻¹) inoculum, initial pH 5.0, for 96 h. After 32 h, 4 mmol L⁻¹ of each of GSH precursor aminoacids (cysteine, L-glutamate and glycine) were added. Results obtained in Erlenmeyer flasks showed that the best concentration of protein substrate in the medium was 45 g L⁻¹ yeast extract and 18 % whey in the case of cell concentration (20.4 g L⁻¹ after 96 h). However, regarding the GSH concentration (329.8 mg L⁻¹ after 72 h), the best concentration was 40 g L⁻¹ yeast extract and 18 % whey. In the bioreactor (5 L) fermentations with MF application (31.7 mT) were carried out to evaluate the influence of the MF. Therefore, three fermentation processes were conducted with varied time periods of MF: from 0 to 24 h, from 24 to 48 and from 48 h to 72 h, besides a control fermentation with no MF application. Fermentation conditions were the same as the ones used in Erlenmeyer flasks. However, based on the best GSH concentration result, 72 h was chosen the fermentation time and 1.0 vvm aeration in bioreactor assays. Results showed that the highest cell concentration (26.9 g L⁻¹) and GSH concentration (474.4 mg L⁻¹) were reached after 72 h, when the MF was applied from 24 to 48 h, with an increase of 19.5 and 35.7 %, respectively, by comparison with the control fermentation. GSH production with the use of *S. cerevisiae* ATCC 7754, in the culture medium with whey as protein substrate, besides the MF application, led to an increase in GSH synthesis.

KEY-WORDS: antioxidant; fermentation; experimental design; whey.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos relacionados com a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i>	27
Tabela 2 - Perfil de aminoácidos do soro de leite.	32
Tabela 3 - Influência dos CM em diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i>	36
Tabela 4 - Composição do meio YM usado na manutenção da cepa e no preparo do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754.	39
Tabela 5 - Composição do meio utilizado para a produção de GSH.	40
Tabela 6 - Matriz dos ensaios do DCCR 2 ²	41
Tabela 7 - Características físico-química do soro de leite líquido.	48
Tabela 8 - Concentração de glicose obtidos nos ensaios do planejamento experimental.	49
Tabela 9 - Valores de pH obtidos nos ensaios do planejamento experimental.	50
Tabela 10 – Resultados de GSH (%) produzida por <i>S. cerevisiae</i> e fatores de conversão para os ensaios do planejamento experimental.	53
Tabela 11 - Produtividade celular e produtividade em GSH para os ensaios do planejamento experimental.	55
Tabela 12 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCCR 2 ² , para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> em 96 h.	56
Tabela 13 - Análise de variância do DCCR 2 ² para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> em 96 h.	56
Tabela 14 – Valores experimentais e previstos por modelo matemático para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i>	57
Tabela 15 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCCR 2 ² , para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> em 96 h.	58
Tabela 16 - Análise de variância do DCCR 2 ² para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> em 96 h.	58
Tabela 17 – Valores experimentais e previstos por modelo matemático para GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i>	60
Tabela 18 - Resultados da concentração celular nos ensaios com variação da concentração de extrato de levedura.	60
Tabela 19 - Resultados da concentração de GSH nos ensaios com variação da concentração de extrato de levedura.	61
Tabela 20 - Resultados da concentração celular e de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i> para os ensaios com aplicação de CM de 31,7 mT e para o ensaio controle após 72 h.	66
Tabela 21 - GSH (%) produzida por <i>S. cerevisiae</i> para os ensaios com aplicação de CM e para o ensaio controle.	67
Tabela 22 - Fatores de conversão para os ensaios com aplicação de CM e para o ensaio controle.	67
Tabela 23 - Produtividade celular e produtividade em GSH para os ensaios com aplicação de CM e para o ensaio controle.	68
Tabela 24 - Diferença de concentração celular (PDX %) e diferença da produção de GSH (PDP %) para os ensaios com aplicação de CM após 72h.	69
Tabela 25 - Resultados da concentração celular obtidos nos ensaios do planejamento experimental em frasco Erlenmeyer.	82
Tabela 26 - Resultados da concentração de GSH obtidos nos ensaios do planejamento experimental, em frasco Erlenmeyer.	82

Tabela 27 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada sem aplicação de CM.	83
Tabela 28 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada com aplicação de CM entre 0 a 24 h de fermentação.....	83
Tabela 29 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada com aplicação de CM 24 a 48 h de fermentação.....	84
Tabela 30 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada com aplicação de CM 48 a 72 h de fermentação.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da glutatona.	20
Figura 2 - Biossíntese da glutatona (GSH).	21
Figura 3 - Metabolismo da GSH nas leveduras.	26
Figura 4 - Esquema do tratamento magnético da suspensão celular em fermentador de bancada.	43
Figura 5 – Imagem do fermentador de bancada com reciclo celular e aplicação de CM.	43
Figura 6 - Magnetizador com par de ímãs para geração de CM.	44
Figura 7 - Acompanhamento da concentração celular (g L^{-1}) de <i>S. cerevisiae</i> durante os ensaios em frasco Erlenmeyer DCCR 2 ² : (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 11.	51
Figura 8 - Acompanhamento da concentração de GSH (mg L^{-1}) produzida por <i>S. cerevisiae</i> durante os ensaios em frasco Erlenmeyer DCCR 2 ² : (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 11.	52
Figura 9 - Curva de contorno para a concentração celular de <i>S. cerevisiae</i>	57
Figura 10 - Curva de contorno para a concentração de GSH produzida por <i>S. cerevisiae</i>	59
Figura 11 - Fermentação controle (sem aplicação de CM) para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.	63
Figura 12 - Ensaio com aplicação de CM nas primeiras 24 h de fermentação para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.	63
Figura 13 - Ensaio com aplicação de CM entre 24 e 48 h de fermentação para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.	64
Figura 14 - Ensaio com aplicação de CM entre 48 e 72 h de fermentação para a produção de GSH por <i>S. cerevisiae</i> : (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.	65

NOMENCLATURA

AMM – Água de maceração de milho

ANOVA – Análise de variância

BA – Batelada alimentada

CDM – *Chemically defined medium*

CM – Campo magnético

DCCR – Delineamento composto central rotacional

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DTNB – Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico

F - Fermentador

FE – Frasco Erlenmeyer

$g_{cél.}$ – Massa de célula em gramas

$g_{glic.}$ – Massa de glicose em gramas

GSH – Glutathiona

GSSG – Glutathiona oxidada

L – Termo linear nos coeficientes de regressão

kHz – Quilo Hertz

mg_{GSH} – Massa de glutathiona em miligramas

m/v – Massa por volume

OD – Oxigênio dissolvido

P_{AC} – Concentração de GSH com aplicação de campo magnético

$P_{controle}$ – Concentração de GSH do ensaio controle

PDP – Diferença da concentração de GSH com aplicação de campos magnéticos em relação aos ensaios controle (%)

PDX – Diferença da concentração celular com aplicação de campos magnéticos em relação aos ensaios controle (%)

P_{final} – Concentração de produto final

$P_{inicial}$ – Concentração de produto inicial

$P_{(P)}$ – Produtividade em produto

$P_{(X)}$ – Produtividade em célula

Q – Termo quadrático nos coeficientes de regressão

R^2 – Porcentagem de variação explicada

rpm – Rotação por minuto

S_{final} – Concentração de substrato final

S_{inicial} – Concentração de substrato inicial

T – Tesla

t_{final} – Tempo final

t_{inicial} – Tempo inicial

vvm – Volume de ar por volume de meio por minuto

v/v – Volume por volume

X_1 – Concentração de extrato de levedura

X_{AC} – Concentração celular com aplicação de campo magnético

X_{controle} – Concentração celular do ensaio controle

X_{final} – Concentração de célula final

X_{inicial} – Concentração de célula inicial

Y – Resposta experimental

\hat{Y} – Resposta prevista pelo modelo

YM – *Yeast extract – malt extract*

$Y_{\text{P/S}}$ – Fator de conversão de substrato em produto

$Y_{\text{P/X}}$ – Fator de conversão de célula em produto

$Y_{\text{X/S}}$ – Fator de conversão de substrato em célula

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 GLUTATIONA	20
3.2 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE GLUTATIONA	23
3.2.1 Produção de glutatona por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.2.2 Fatores que influenciam a produção de glutatona	29
3.3 UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE COMO SUBSTRATO EM BIOPROCESSOS	30
3.4 CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOPROCESSOS	33
3.4.1 Estudos e aplicação de campos magnéticos no cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	39
4.2 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA	39
4.3 PREPARO DO INÓCULO	39
4.4 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE GSH	40
4.5 ENSAIOS EM FRASCO ERLNMEYER PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO	40
4.5.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	40
4.6 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS	42
4.7 METODOLOGIA ANALÍTICA	44
4.7.1 Determinação da concentração celular	44
4.7.2 Determinação de pH	44
4.7.3 Determinação de açúcares redutores	44
4.7.4 Determinação da concentração de glutatona	45
4.8 EQUAÇÕES UTILIZADAS PARA CÁLCULO DOS RESULTADOS	45
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	48

5.2	ENSAIOS EM FRASCO ERLLENMEYER PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO	49
5.3	ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS	62
6.	CONCLUSÃO	71
7.	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	72
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
9.	APÊNDICES	82

1. INTRODUÇÃO

A glutatona (L- γ -glutamil-L-cisteínilglicina, GSH) é um composto sulfurado não proteico mais abundante nas células procarióticas e eucarióticas, sendo sintetizada intracelularmente por reações acopladas dependentes de ATP (LIN et al. 2009). Sua principal função é evitar a oxidação celular, além de outras funções, como na desintoxicação de uma variedade de xenobióticos e na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (ANSCHAU et al. 2013; LIN et al. 2009).

A produção de GSH pode ser realizada por síntese enzimática ou através de fermentação com micro-organismos, porém a síntese enzimática possui algumas desvantagens, tais como custo elevado e baixo rendimento. Desta forma, sugere-se que a produção industrial seja realizada por fermentação utilizando-se leveduras potencialmente produtoras, sendo a mais citada a *Saccharomyces cerevisiae* (GOTOH; IGUCHI; KIKUCHI, 2004; LI; WEI; CHEN, 2004; MUSATTI et al. 2013).

Em processos fermentativos, a composição do meio de cultivo é um dos parâmetros mais importantes para a produção de produtos em escala industrial, visto que grande parte do custo de produção se dá pela composição do meio de crescimento (GOUD; CHAITANYA; REDDY, 2013). Desta forma, entre as possíveis alternativas para reduzir o custo do processo de fermentação, o uso de produtos agrícolas, coprodutos lácteos e resíduos industriais como fontes alternativas de carbono e nitrogênio têm demonstrado grande interesse (AGARWAL et al., 2006).

Alguns trabalhos foram publicados enfatizando a aplicação de campos magnéticos (CM) em processos fermentativos, o qual consiste em um estímulo que visa aumentar ou inibir o crescimento e produção de metabólitos dos organismos vivos (GAO; ZHANG; FENG, 2011; HRISTOV; PEREZ, 2011). Os efeitos de estimulação ou inibição dos CM são atribuídos a mudanças das biomembranas (lipídicas ou plasmáticas), mudanças na síntese de DNA, alterações do fluxo de íons através da membrana plasmática e/ou mudanças na estrutura das proteínas (FOJT et al. 2004; MONTOYA; RAMÍREZ; OSPINA, 2005; STRASÁK et al. 2002; ZAPATA et al. 2002). Em virtude destas considerações, este trabalho teve como foco, a avaliação do meio de cultivo enriquecido com de soro de leite para a produção de GSH por processo fermentativo com *Saccharomyces cerevisiae* sob ação de CM gerados por ímãs.

1. OBJETIVOS

1.1 GERAL

O objetivo deste estudo foi produzir glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, avaliando a influência da aplicação de campos magnéticos e a adição de soro de leite ao meio de cultivo submerso.

1.2 ESPECÍFICOS

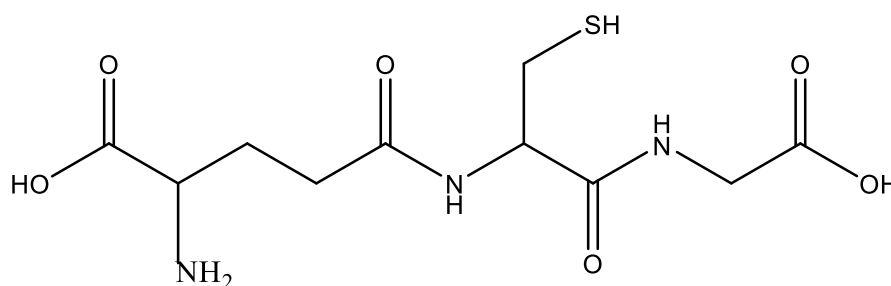
- Determinar a composição do meio de cultivo que promova a máxima produção de GSH em frascos agitados;
- Verificar a influência dos campos magnéticos gerados por ímãs nos cultivos em fermentador de bancada;
- Avaliar o período de aplicação de CM gerado por ímãs nos cultivos em fermentador de bancada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GLUTATIONA

A glutationa (L- γ -glutamil-L-cisteínilglicina, GSH) é um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, L-cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável por suas propriedades bioquímicas (Figura 1) (LIN et al. 2004). Foi descoberta em extrato etanólico de leveduras em 1888 e denominado de “philothion” (LI; WEI; CHEN, 2004), sendo renomeado e isolado pela primeira vez em 1921 por Hopkins, a partir de leveduras, fígado e músculo de animais (LI; WEI; CHEN, 2004; LIU; HWANG; LIAO, 1999).

Figura 1- Fórmula estrutural da glutationa.



Fonte: Adaptado de Rover Júnior et al., (2001).

Este composto sulfurado não proteico é o mais abundante nas células, sendo encontrado em elevadas concentrações (1 a 8 mol L⁻¹) em quase todas as células procarióticas e eucarióticas, estando na maioria das vezes, em maior quantidade no fígado em seres humanos (ANSCHAU et al. 2013; LI; WEI; CHEN, 2004; LIN et al. 2009; MUSATTI et al. 2013; MUSATTI; MANZONI; ROLLINI, 2013; SANTOS et al. 2010; WANG et al. 2012).

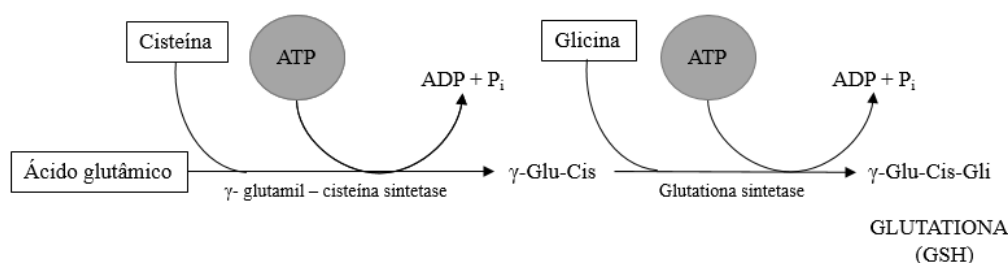
Grant et al. (1996) relataram que as exigências de GSH diferem para organismos eucarióticos e procarióticos. É um componente essencial para os processos metabólicos nas leveduras, o que não ocorre com as bactérias, nas quais não é um metabólito essencial. Li et al. (2005) citaram que a GSH é encontrada principalmente em micro-organismos eucarióticos e em bactérias gram-negativas e raramente em bactérias gram-positivas.

Fahey et al. (1978) quantificaram a GSH em várias bactérias gram-negativas e positivas. A GSH foi detectada em algumas bactérias gram-positivas e na maioria das gram-negativas. Dentre as gram-positivas, a que apresentou a maior concentração foi *Streptococcus*

lactis com 5 $\mu\text{mol g}^{-1}$, e dentre as gram-negativas a *Escherichia coli* com 30 $\mu\text{mol g}^{-1}$ e *Alcaligenes faecalis* com 23 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

A GSH é sintetizada intracelularmente por reações acopladas dependentes de ATP. Na primeira reação a γ -glutamil-cisteína sintetase (GSH I, EC 6.3.2.2) catalisa a formação do dipeptídeo γ -glutamil-cisteína a partir de L-glutamato e L-cisteína. No segundo passo, a glutatona sintetase (GSH II, EC 6.3.2.3) catalisa a formação da GSH com a adição de uma molécula de glicina ao C-terminal da γ -glutamil-cisteína, conforme Figura 2 (DRINGEN, 2000; LI; WEI; CHEN, 2004; LIN et al. 2009; PASTORE et al. 2003; ROLLINI; MUSATI; MANZONI, 2010; WHANG et al. 2012).

Figura 2 - Biossíntese da glutatona (GSH).



Fonte: Adaptado de Shimizu et al. (1991)

Cerca de 90 % da GSH é normalmente encontrada na forma reduzida (GSH), porém várias outras formas estão presentes nas células microbianas, nos tecidos e no plasma. A glutatona oxidada (GSSG), formada pela oxidação da GSH, pode ser reduzida através da glutatona redutase na presença de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Além da GSSG, podem ocorrer outras formas, por exemplo, GS-S-CoA, GS-S-cis e GS-S-proteína (LI; WEI; CHEN, 2004).

A GSH tem a capacidade de proteger as células, durante condições de estresse, mantendo as funções básicas em condições normais (WEI et al., 2003a). 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 GSH possui duas características estruturais indispensáveis para a sua participação em diversas funções: a ligação γ -glutamil e o grupo sulfidríla. Sua principal função é evitar a oxidação celular. Ela não reage somente com o grupo OH^- produzindo H_2O , mas também serve

como doador de elétrons para a enzima GSH peroxidase (FAN et al. 2004), além de outras diversas funções, incluindo a manutenção do ambiente redox, auxiliando no armazenamento de enxofre, na desintoxicação de uma variedade de xenobióticos, transporte de aminoácidos e síntese de proteínas e ácidos nucleicos (LI; WEI; CHEN, 2004; WU et al., 2004).

Este tripeptídeo, não só protege as membranas celulares dos danos oxidativos, mas também ajuda a manter os grupos sulfidríla de muitas proteínas na forma reduzida, que é requisito para a sua função normal. Irreversíveis danos na célula acontecem quando as células não são mais capazes de manter o seu conteúdo de GSH (LIN et al. 2009; PASTORE et al. 2003; SANTOS et al. 2010). Ainda, 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).

Além do mais, a GSH pode atuar como molécula de defesa, 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; MANZONI, 2006).

Com a descoberta de mais funções e propriedades, a GSH tem sido amplamente utilizada em fármacos, e tem o potencial para ser utilizada em aditivos alimentares e nas indústrias de cosméticos. Decorrente disto, os estudos que buscam novas fontes para a sua produção vem tornando-se atrativos (ANSCHAU et al. 2013; LIN et al. 2009; ROLLINI; MUSATI; MANZONI, 2010).

Wu (2014) citou que na China o uso da GSH é permitido como aditivo alimentar, atuando como inibidor da atividade da polifenol oxidase, prevenindo o escurecimento enzimático. Em alimentos têm sido aplicado no controle do escurecimento enzimático da carne de larva *Clanis bilineata* (WU, 2013), em fatias de cogumelos (XIA, 2013), em vinho branco (EL HOSRY et al. 2009) e em lichia (JIANG; FU, 1998).

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.

Oms-Oliu et al. (2008) testaram coberturas em peras a base de alginato (2 %), pectina (2 %) e gelana (0,5 %) adicionados dos antioxidantes N-acetilcisteína (0,75 %) e GSH

(0,75 %) 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, em relação às 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 e GSH na inibição da polifenol oxidase e peroxidase em maçãs Fugi. O estudo demonstrou que a N-acetil-cisteína (1 % m v⁻¹) e GSH (1 % m v⁻¹) foram inibidores eficazes da polifenol oxidase.

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 α -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 à base de leite.

Wu (2014) estudou a utilização da GSH para evitar o escurecimento enzimático e não enzimático em suco de uva. Através dos resultados foi observado que a atividade da enzima polifenol oxidase foi inibida em 99,4 % com concentração de 0,04 % de GSH.

2.2 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE GLUTATIONA

A GSH começou a ser produzida mais ativamente entre 1976 e 1985 no Japão, sendo a produção por processo fermentativo com levedura iniciada em 1980 (LI; WEI; CHEN, 2004).

A produção de GSH pode ser realizada por reação química, enzimática e por fermentação com micro-organismos (ANSCHAU et al. 2013; SANTOS et al. 2010; WEN; ZHANG; TAN, 2004). Na síntese química ocorre o envolvimento de um grupo sulfidrilal altamente suscetível a oxidação, além da adição do peptídeo γ -glutamil que também dificulta a síntese (GOTOH; IGUCHI; KIKUCHI, 2004). Na produção por reação enzimática, o requisito de ATP torna o processo difícil de adaptação, além de ser economicamente inviável a adição de ATP diretamente em escala industrial (GOTOH; IGUCHI; KIKUCHI, 2004; LI; WEI; CHEN, 2004; LIN et al. 2009). 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 melhora da obtenção de GSH por micro-organismos é uma maneira interessante de diminuir o custo deste composto, reduzindo os custos de produção. Dessa forma pesquisas e patentes tem focado principalmente na melhoria dos processos de formação e otimização utilizando, por exemplo, engenharia genética e engenharia metabólica (WEN; ZHANG; TAN, 2005).

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 (LI et al. 2004).

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 ($0,51 \text{ mol L}^{-1}$) e 4 vezes com o NaCl ($0,1$ a $0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Com concentrações de NaCl superiores a $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, 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.

Li et al. (2003) avaliaram a concentração de GSH em várias subespécies e cepas de *Lactococcus lactis*. Para tal, foram utilizadas condições aeróbias e anaeróbias de crescimento e dois meios de crescimento, M17 e CDM (“chemically defined medium”). A GSH não foi detectada nas 21 cepas quando utilizado o meio CDM e nem sempre o acúmulo de GSH estava relacionado com a aeração.

Li et al. (2005) utilizando *Lactococcus lactis* NZ 9000 modificada geneticamente avaliaram a produção de GSH em dois meios de cultura, M17 e CDM (meio definido previamente por Li et al., 2003). Foi observado que no meio M17 a concentração de GSH foi oito vezes maior do que no meio CDM. Isto indicou que a composição do meio de cultura pode afetar significativamente a produção de GSH. Os três aminoácidos precursores da GSH foram adicionados em combinações diferentes, para aumentar a produção utilizando o meio CDM. Nos ensaios com adição de cisteína, ocorreu aumento da atividade da enzima GSH sintetase, promovendo o aumento da conversão da γ -glutamilcisteína em GSH. A cisteína foi um aminoácido fundamental para a síntese da GSH, sendo que a manutenção dos níveis celulares depende da disponibilidade e do transporte até as células.

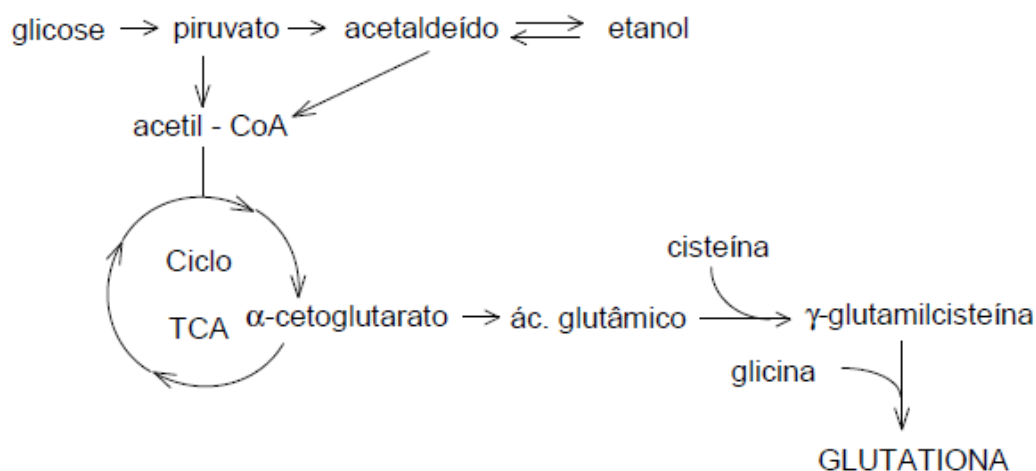
Rollini et al. (2005) investigaram o acúmulo de GSH em 13 espécies de *Candida* e 11 cepas de *Picchia*. As fermentações foram conduzidas em meio suplementado com diferentes fontes de carbono, metanol, etanol e glicose. As maiores concentrações celulares foram evidenciadas com glicose (9,9 g L⁻¹ para *C. nemodendra*) e etanol (9,7 g L⁻¹ para *P. pastoris*), enquanto os menores valores foram observados com metanol (menor que 4,0 g L⁻¹ para 80 % das cepas de *Candida* e para 40 % de *Picchia*). 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.

Wang et al. (2015) estudaram a modificação genética de uma cepa de *E coli*, a fim de melhorar sua produção de GSH. Para tal, quatro sistemas de vetores diferentes foram utilizados pET28a, pUC18, pUC19-P32 e pUC19-Pabb para expressão de gshF que codifica a glutatona sintetase bifuncional de *Streptococcus thermophiles*. Essas quatro construções foram nomeadas como pET28a-gshF, pUC18-gshF, pUC19-P32-gshF e pUC19-Pabb-gshF, respectivamente e em seguida, introduzido em *E coli* BL21 (DE3) para uma investigação mais aprofundada da expressão da proteína e produção de GSH. A produção de GSH por BL21(pUC18-gshF) atingiu 15,21 g L⁻¹, sendo este a mais elevada concentração de GSH já relatada.

2.2.1 Produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae*

O caminho metabólico da GSH dentro das leveduras é apresentado na Figura 3. A glicose primeiramente é transformada em piruvato, que é transformado em acetil-CoA, participando assim do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) com liberação de energia. Para a formação da GSH, o ácido glutâmico provém do α -cetoglutarato, que é um composto do ciclo do TCA. Quando é fornecida a levedura um excesso de glicose ocorre a produção de etanol através do efeito *Crabtree*. Quando há quantidade insuficiente de glicose no meio, o etanol pode ser assimilado e a GSH produzida (SHIMIZU et al. 1991).

A *S. cerevisiae* e *Candida utilis* são os micro-organismos mais comumente utilizados em escala industrial; e o conteúdo de GSH pode representar 0,1 a 1,0 % da biomassa seca, dependendo das condições de crescimento (ANSCHAU et al. 2013; LI; WEI; CHEN, 2004; MUSATTI et al. 2013; PENNINCKX, 2000; SANTOS et al. 2012). Lin et al. (2009) citaram que a via glicolítica da *S. cerevisiae* é o sistema mais simples e capaz de regenerar ATP suficiente para a biossíntese de GSH.

Figura 3 - Metabolismo da GSH nas leveduras.

FONTE: Shimizu et al. (1991).

A GSH é um produto intracelular na *S. cerevisiae* e sua produção pode ser melhorada de duas maneiras: aumentando a concentração de biomassa ou estimulando a síntese intracelular na levedura através de stress (WEN; ZHANG; TAN, 2004). Nie et al. (2005) citaram que a síntese de GSH foi essencial para o crescimento celular em condições de estresse. Dessa forma, se a levedura for submetida a tais condições a produção de GSH possivelmente aumentará.

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).

A produção de GSH por *S. cerevisiae* têm sido foco de interesse para setores industriais, por ser uma técnica simples, eficiente e viável. Na Tabela 1 são mostrados trabalhos que envolvem produção de GSH por fermentação com *S. cerevisiae*.

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.

Tabela 1- Trabalhos relacionados com a produção de GSH por *S. cerevisiae*.

Cepa	Fermentador	Conc. GSH	Adição de aminoácidos	Observações	Referência
KY 5711	FE	23,4 mg L ⁻¹	Sim	-	Alfafara et al. (1992)
ATCC 7754	FE	115,28 mg L ⁻¹	Não	-	Liu, Hwang e Liao (1999)
WSH-J 701	FE	64,7 mg L ⁻¹	Não	-	Wei et al. (2003)
FF-8	FE	204 mg L ⁻¹	Sim	-	Cha et al. (2004)
T 65	FE	153,2 mg L ⁻¹	Sim	-	Wen, Zhang e Tan (2004)
T 65	FE	329,3 mg L ⁻¹	Sim	-	Wen, Zhang e Tan (2005)
T 65	F 5 L	2190 mg L ⁻¹	Sim	BA/control de nível de etanol com adição de glicose/	Wen, Zhang e Tan (2006)
G-14	F 5 L	2020 mg L ⁻¹	Não	Melaço/AMM	Wang, Tan e Song (2007)
ATCC 7754	FE	154,5 mg L ⁻¹	Sim	-	Santos et al. (2007)
ATCC 7754	FE	278,4 mg L ⁻¹	Não	Diferentes meios proteicos	Piedrahíta-Aguirre (2008)
Zeus	FE	1700 mg L ⁻¹	Sim	Testes de permeabilidade celular	Rollini, Musatti e Manzoni (2010)
GB Itália	FE	1700 mg L ⁻¹			
Lievitalia	FE	1100 mg L ⁻¹			
ATCC 7754	F 250 mL	340 mg L ⁻¹	Sim	Aplicação de CM	Santos et al. (2010)
ATCC 7754	F Air-Lift	178,21 mg L ⁻¹	Sim	Pressurização	Gonçalves (2012)
ATCC 7754	F 5 L	271,9 mg L ⁻¹	Sim	Aplicação de CM	Santos et al. (2012)
ATCC 7754	F 5 L	236,1 mg L ⁻¹	Sim	Melaço e glicerol	Anschau et al. (2013)
J-X25	FE	278,9 mg L ⁻¹	Sim	Adição do antibiótico nistatina	Zhao et al. (2013)
Sa-07346	F 5 L	1650,7 mg L ⁻¹	Sim	Alimentação de cisteína com base no quociente respiratório da levedura	Lorenz et al. (2015)

FE: Frasco Erlenmeyer; F: Fermentador; BA: Batelada alimentada; AMM: Água de maceração de milho; CM: Campo magnético

Izawa, Inoue e Kimura (1995) avaliando a adaptação da *S. cerevisiae* S288C ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, observaram que os níveis de GSH encontrados durante a fase estacionária de crescimento ($6,89 \mu\text{mol g}_{\text{célula}}^{-1}$) foram aproximadamente três vezes maiores do que na fase exponencial de crescimento ($2,22 \mu\text{mol g}_{\text{célula}}^{-1}$).

Santos et al. (2007) estudaram a produção de GSH em frascos Erlenmeyer a partir de *S. cerevisiae* ATCC 7754 através de sequência de planejamentos experimentais, sendo as variáveis estudadas: temperatura (20 a 30°C), agitação (100 a 300 rpm), pH inicial (5,0 a 7,0), concentração de inóculo (5 a 15 %) e concentração de glicose (20 a 70 g L⁻¹). Os resultados mostraram que as melhores condições de cultivo foram: 54 g L⁻¹ de glicose, 5 % de inóculo, 300 rpm, 20°C e pH inicial 5. A maior concentração de GSH (154,5 mg L⁻¹) foi obtida após 72 h de fermentação.

Piedrahíta-Aguirre (2008) estudou a otimização do meio de cultivo para a produção de GSH com *S. cerevisiae* ATCC 7754, em frascos Erlenmeyer a partir de fontes proteicas de baixo custo. Para tal, foi utilizada sequência de planejamentos experimentais, sendo as variáveis estudadas as concentrações de: glicose (10 a 98 g L⁻¹), água de maceração de milho (10 a 90 g L⁻¹), extrato de levedura (10 a 90 g L⁻¹), lecitina de soja (3 a 9 g L⁻¹), proteína do soro de leite (10 a 90 g L⁻¹) e MgSO₄ (2 a 10 g L⁻¹). A maior concentração de GSH (278,42 mg L⁻¹) e de biomassa (23,33 g L⁻¹) foram obtidas com a utilização de 90 g L⁻¹ de glicose, 50 g L⁻¹ de água de maceração de milho, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 50 g L⁻¹ de proteína do soro de leite, 5 mmol L⁻¹ de lecitina de soja e 10 g L⁻¹ de MgSO₄.

Anschau (2010) estudou diversas condições de extração da GSH em biorreatores tipo frasco Erlenmeyer, utilizando *S. cerevisiae* ATCC 7754, *Candida tropicalis* CCT 5846, *Candida utilis* CCT 3469, *Pichia anomala* CCT 4373 e *Pichia anomala* CCT 2648. Para a extração da GSH a temperatura foi 30°C sendo testadas diferentes concentrações de etanol (20, 40 e 60 %), tempos (2, 4, 6 e 16 h) e extrações em banho termostaticado, homogeneizador e banho ultrassom (somente 2 h). O melhor resultado (131,24 mg L⁻¹) foi obtido com *S. cerevisiae* ATCC 7754 em banho termostaticado, em 16 h de extração, com 40 % de etanol.

Anschau et al. (2010) investigaram o efeito da adição de aminoácidos na produção de GSH em fermentação descontínua com *S. cerevisiae* ATCC 7754. As fermentações foram realizadas em fermentador de 5 L a fim de obter as melhores condições para a alimentação de fonte de carbono (melaço de cana de açúcar, glicerol ou glicose) e adição de aminoácidos. A maior concentração de GSH observada foi 236,02 mg L⁻¹ após 84 h de fermentação com a adição de aminoácidos no tempo de 32 h.

Anschau et al. (2013) avaliaram o efeito da fonte de carbono na produção de GSH por *S. cerevisiae* ATCC 7754. As fermentações foram realizadas em frasco Erlenmeyer de 250 mL, a 20°C, pH 5 e 300 rpm durante 96 h, utilizando a metodologia de superfície de resposta, para avaliar as concentrações de melação de cana de açúcar e glicerol, na produção de biomassa e GSH. A maior produção de GSH e biomassa foi 119,6 mg L⁻¹ e 22,3 g L⁻¹, respectivamente, utilizando-se 80 g L⁻¹ de melação e 60 g L⁻¹ de glicerol.

Lorenz et al. (2015) estudaram a produção de GSH com *S. cerevisiae* As-07346 através da alimentação de cisteína com base no quociente respiratório da levedura. As fermentações foram realizadas em fermentador de 5 L. Após 30 h de fermentação a alimentação de cisteína foi realizada até a obtenção de concentração final de 8,7 mmol L⁻¹. Com isso, a máxima produção GSH obtida foi 1650 mg L⁻¹.

2.2.2 Fatores que influenciam a produção de glutatona

Estudos têm demonstrado que algumas variáveis como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e adição de aminoácidos exercem grande influência na produção de GSH e que esses devem ser controlados para o bom desempenho do micro-organismo, além da concentração adequada de nutrientes.

De acordo com Wei et al. (2003b), o crescimento celular, a formação de GSH e o seu conteúdo intracelular são influenciados pela temperatura. Segundo esses autores, foi estudado o efeito da temperatura na fermentação em batelada usando *Candida utilis* WSH 02-08. A máxima concentração de GSH foi encontrada 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⁻¹).

O oxigênio dissolvido (OD) é considerado fator limitante para o acúmulo de GSH nas 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 μ (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).

Nie et al. (2005) estudaram o efeito do estresse através do pH baixo em fermentações utilizando *C. utilis* WSH 02-08. Para tal, foi utilizado fermentador de 7 L, com aeração de 5 L min⁻¹, agitação de 300 rpm, 10 % de inóculo e o pH controlado em 5,5 nas primeiras 24 h e em seguida ajustado para 1,2 com H₂SO₄ (3 mol L⁻¹) durante 3 h e por fim, ajustado novamente para 5,5 até o final da fermentação através da adição de NaOH (3 mol L⁻¹) a fim de investigar o efeito da mudança do pH na síntese de GSH. Paralelamente, foram realizados experimentos com e sem controle de pH. A concentração de GSH foi maior nos ensaios com controle de pH (332 mg L⁻¹) em relação aos ensaios sem controle (171 mg L⁻¹). A maior concentração de GSH (737,1 mg L⁻¹) foi observada no ensaio com o estresse através do pH baixo durante 3 h de ensaio.

Certos aminoácidos têm efeitos importantes sobre o acúmulo de GSH em *S. cerevisiae* (WANG et al. 2012; WEN; ZHANG; TAN, 2005). 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.

Wen, Zhang e Tan (2006) estudaram a maximização da produção de GSH em *S. cerevisiae* T65 através da adição de aminoácidos em fermentação tipo batelada alimentada. A fermentação foi realizada em fermentador de 5 L a 30°C e pH 5,5. Três fermentações foram realizadas controlando a concentração de etanol no meio com a adição de solução de glicose 80 % em cada nível. Na primeira fermentação, a concentração de etanol foi mantida em 7,7 %, na segunda entre 1,16 a 2,2 % e na terceira entre 0,08 a 0,65 %. Utilizando-se baixas concentrações de etanol foi observado o favorecimento no acúmulo de GSH na levedura. A fim de obter maiores concentrações de GSH, foi realizada mais uma fermentação com baixa concentração de etanol e adição de aminoácidos precursores nos tempos de 24, 44 e 56 h. Os resultados demonstraram que o melhor rendimento foi 2190 mg L⁻¹ em 60 h de fermentação, obtendo-se aumento de 26,8 % em relação ao experimento sem adição de aminoácidos.

2.3 UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE COMO SUBSTRATO EM BIOPROCESSOS

Muitos esforços têm sido feitos recentemente para a valorização de resíduos através de uma abordagem de biorefinaria, para a recuperação ou produção de produtos de alto valor agregado, tais como enzimas, aditivos para alimentos e biocombustíveis. O interesse centrou-

se principalmente na bioconversão de resíduos líquidos das indústrias de laticínios e açúcar (soro de leite e melaço de cana de açúcar) e resíduos sólidos (principalmente batata e frutas cítricas). Os micro-organismos que têm sido utilizados para este fim incluem leveduras, fungos, bactérias e algas (AGGELOPOULOS et al. 2014).

Em processos fermentativos, a composição do meio de cultivo é um dos parâmetros mais importantes para a produção de produtos em escala industrial, visto que 30 a 40 % do custo de produção ocorre pela composição do meio de crescimento (GOUD; CHAITANYA; REDDY, 2013). Desta forma, entre os possíveis métodos para reduzir o custo do processo de fermentação, o uso de produtos agrícolas, subprodutos lácteos e resíduos industriais como fontes alternativas de carbono e nitrogênio têm demonstrado grande interesse (AGARWAL et al., 2006).

O soro de leite é economicamente e ecologicamente muito interessante como substrato para processos fermentativos, sendo o principal coproduto líquido das indústrias leiteiras (SOUPIONI et al. 2013). Os principais componentes do soro de leite, depois da água são a lactose (70 a 72 % do total de sólidos), proteínas (8 a 10 %) e minerais (12 a 15 %) (JELEN et al., 2003). Cerca de 85 % do total de leite utilizado para a fabricação de queijo e de outros produtos é descartado como soro de leite. Apesar de existir uma legislação rigorosa que regula o descarte de efluentes, a maioria das indústrias de laticínios não possuem sistemas de tratamento adequado para a eliminação do soro de leite, causando sérios problemas de poluição para o meio ambiente, visto que as tecnologias de tratamento biológico de águas residuárias são relativamente caras. Para resolver este problema, a melhor alternativa seria submeter o soro de leite a processos através dos quais produtos de alto valor agregado possam ser fabricados, contribuindo na redução dos custos de produção (PANESAR et al., 2007).

As proteínas do soro do leite apresentam excelente perfil de aminoácidos, caracterizando-as como proteínas de alto valor biológico (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006). Na Tabela 2 é apresentado o perfil de aminoácidos do soro de leite.

Champagne e Goulet (1988) avaliaram o crescimento de *S. cerevisiae* VVR 215 em meio de cultivo contendo hidrolisado de lactose de soro de leite ultrafiltrado. Os autores constataram que a levedura foi capaz de fermentar a galactose imediatamente após o esgotamento de glicose, onde o consumo total de glicose e galactose ocorreu no tempo de 18 h, sem qualquer fase de latência.

Piedrahíta-Aguirre (2008) estudou a produção de GSH com *S. cerevisiae* ATCC 7754, em frascos Erlenmeyer utilizando proteína do soro de leite como uma das fontes proteicas de baixo custo. A maior concentração de GSH (278,42 mg L⁻¹) e de biomassa (23,33 g L⁻¹),

foram obtidas com a utilização de 90 g L⁻¹ de glicose, 50 g L⁻¹ de água de maceração de milho, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 50 g L⁻¹ de proteína do soro de leite, 5 mmol L⁻¹ de lecitina de soja e 10 g L⁻¹ de MgSO₄.

Tabela 2 - Perfil de aminoácidos do soro de leite.

Aminoácido	Concentração (mg 100 g _{proteína} ⁻¹)
Alanina	4900
Arginina	2100
Ácido aspártico	10800
Cisteína	2089
Ácido glutâmico	16700
Glicina	1800
Histidina	2200
Isoleucina	5800
Leucina	10239
Lisina	9600
Metionina	1900
Fenilalanina	3300
Prolina	5800
Serina	4700
Treonina	7200
Triptofano	2100
Tirosina	1800
Valina	5800

FONTE: Kalman (2014).

Gabardo et al. (2016) avaliaram a produção de etanol com cepas de *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 e *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em biorreator de leite fluidizado, utilizando lactose hidrolisada de soro de leite e lactose hidrolisada de permeado de soro de leite. As fermentações foram realizadas utilizando co-culturas das duas leveduras e com as células individuais imobilizadas. O maior rendimento de etanol (0,46 g g⁻¹) foi obtido com a cepa individual imobilizada de *K. marxianus*, utilizando lactose hidrolisada de permeado de soro de leite.

2.4 CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOPROCESSOS

Os CM produzidos pelo homem têm se tornado uma parte crescente do nosso biosistema. Eles se propagam em toda a Terra, para servir ao homem, em seu benefício. Porém, os organismos vivos têm de se adaptar a esse novo fator, pois eles podem influenciar algumas de suas funções biológicas. Grande quantidade de artigos científicos tem sido publicada nos últimos anos, sobre estas influências. Os resultados se mostram controversos e na última década, os efeitos dos CM em sistemas biológicos começaram a ser investigados (NOVÁK et al. 2007).

Segundo Filipic et al. (2012), os CM podem ser classificados em fracos (menor que 1 mT), moderados (1 mT a 1 T), fortes (1 a 5 T) e ultra fortes (maior que 5 T). Ainda, de acordo com Zapata et al. (2002) seu efeito na célula pode ser inibitório, estimulante e nulo, dependendo da intensidade e tempo de exposição.

Os parâmetros físicos do CM (intensidade, frequência e forma da onda), o tipo de célula, temperatura de exposição e o estado biológico da célula podem influenciar os possíveis efeitos destes campos nos sistemas biológicos. Portanto é muito importante ter completo controle dos parâmetros que podem influenciar, fazendo uma exaustiva caracterização do CM, protocolo de exposição, manipulação de amostras, temperatura de exposição, intervalos de tempos antes e depois da exposição, e o que pode ser um dos mais importantes parâmetros: o estado biológico das células (RUIZ-GÓMEZ et al. 2004).

Os pesquisadores têm várias teorias e explicações a cerca de como os CM afetam os micro-organismos e as células. Muitas das teorias envolvendo o mecanismo de interação entre sistemas biológicos e CM sugerem que a membrana plasmática é o local onde o CM exerce seu efeito primário (REPACHOLI; GREENBAUM, 1999).

A aplicação de CM em bioprocessos consiste em um estímulo não-convencional de processos clássicos, visando estimular ou inibir o crescimento e produção de metabólitos dos organismos vivos, através de desvio na via metabólica (GAO; ZHANG; FENG, 2011; HRISTOV; PEREZ, 2011).

Os efeitos de estimulação ou inibição dos CM são atribuídos a mudanças das biomembranas (lipídicas ou plasmáticas), mudanças na síntese de DNA, alterações do fluxo de íons através da membrana plasmática e/ou mudanças na estrutura das biomoléculas (proteínas) (FILIPIC et al. 2012; FOJT et al. 2004; MONTOYA; RAMÍREZ; OSPINA, 2005; SANTOS et al. 2012; STRASÁK et al. 2002; ZAPATA et al. 2002). Os campos afetam a direção da migração e alteram o crescimento e a reprodução dos micro-organismos, gerando modificação

da velocidade de crescimento celular (MONTROYA; RAMÍREZ; OSPINA, 2005; ZAPATA et al. 2002). Também pode ocorrer a formação de radicais livres devido à exposição aos campos (FOJT et al. 2004; STRASÁK et al. 2002).

Baixas frequências (50 ou 60 Hz) e CM de intensidade moderada podem influenciar os processos metabólicos. 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 (BLANK, 1993; FOLOGEA et al. 1998; SANTOS et al. 2010). Quando são utilizados campos elétricos intensos dois processos podem estar envolvidos ao mesmo tempo: a estimulação da taxa de divisão celular nas culturas e a morte das células devido a ação do campo (FOLOGEA et al. 1998).

Os organismos são capazes de responder a uma grande variedade de estímulos ambientais e condições de estresse (incluindo os CM), promovendo mudanças intra e extracelulares que podem ser classificadas como irreversíveis, reversíveis ou resultarem em mudanças nas células e nas suas organelas. As modificações celulares e moleculares induzidas quando os CM interagem com materiais biológicos são, no entanto, dependentes da duração da exposição, da penetração no tecido os quais estão relacionados à sua intensidade e frequência do estímulo. Em adição, respostas celulares dependem não somente da intensidade e frequência do CM, mas também do tipo de CM (estático ou oscilatório), na forma da onda (sinusoidal, quadrada, etc.), na condição biológica e no tipo de célula exposta (DINI; ABRRO, 2005).

A aplicação de CM em processos fermentativos teve início nos anos 90. Porém atualmente, ainda muito limitada sua aplicação em escala industrial. Em muitos estudos científicos verificou-se que os CM podem influenciar os sistemas biológicos como na produção de GSH por *S. cerevisiae* (GONÇALVES, 2012; SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2012), biomassa e etanol por *S. cerevisiae* (BERLOT et al., 2013; DEUTMEYER et al., 2011; MONTROYA; RAMÍREZ; OSPINA, 2005; MUNIZ, 2002; MUNIZ et al., 2007), ácido cítrico e celulase por *Aspergillus niger* (GAO; ZHANG; FENG, 2011), pigmento vermelho e amarelo por *Monascus purpureus* (ZHANG et al., 2014), estímulo da biomassa e invertase por *Rhodotorula glutinis* (CANLI et al., 2011) e melhoramento na produção da enzima inulinase por *Geotrichum candidum* (CANLI; KURBANOGLU, 2011).

Perez et al. (2007) observaram que a utilização de solenoide durante a fermentação do caldo de cana com *S. cerevisiae* aumentou a produção de etanol em até 17 % em relação ao processo convencional, ganho decorrente da redução do tempo gasto com essa tarefa. Enquanto o processo tradicional de fermentação no experimento controle ocorreu em 15 h, com a aplicação dos CM, esse tempo foi reduzido para 12 h.

A influência de CM de baixa intensidade (0 e 7 mT) para a produção de invertase por *Rhodotorula glutinis* foi avaliada por Canli et al. (2011). Para tal, foi utilizada uma bobina cilíndrica de madeira (28 cm de diâmetro externo e 17 cm de diâmetro interno) envolvida com fio de cobre (1 mm de diâmetro). Os resultados mostraram que os CM aplicados proporcionaram aumento na produção de invertase e biomassa, variando de 48 a 67 % e 14 a 28 % em relação ao experimento controle, respectivamente.

Canli e Kurbanoglu (2011) estudaram a aplicação de CM de intensidade moderada (4 e 7 mT) na produção da enzima inulinase por *Geotrichum candidum* através de fermentação em estado sólido, usando alho-poró como fonte de carbono. A fermentação foi conduzida em frascos erlenmeyer (250 mL) e os CM gerados através de bobina cilíndrica de madeira envolvida com fio de cobre (1 mm de diâmetro), sendo utilizado transformador global de dupla alimentação para fornecer a tensão necessária para gerar os CM de baixa frequência. Os resultados mostraram que a maior atividade enzimática foi obtida com 535,2 U g_{substrato seco}⁻¹ com a aplicação de CM (7 mT) comparado com o experimento controle que obteve 412,1 U g_{substrato seco}⁻¹.

Gao, Zhang e Feng (2011) investigaram o efeito de CM de baixa intensidade sobre a produção de ácido cítrico e celulase por *Aspergillus niger* A10. O ensaio foi realizado em frascos agitados, a 30°C e 200 rpm, durante 4, 6 e 8 h. Os CM foram gerados por um conjunto de seis bobinas cilíndricas (diâmetro interno de 100 mm), envolvidas em material de blindagem magnética, alimentados por transformador, sendo o CM de 0 a 1,2 mT com frequência de 50 Hz. Os resultados demonstraram que com a intensidade de 1 mT, o rendimento de ácido cítrico aumentou linearmente com o tempo de exposição, já a atividade da celulase foi maior durante 4 h de exposição. Além do mais, foi constatado pelos autores que o aumento da concentração de ácido cítrico e da atividade da celulase, começou imediatamente após o CM ser aplicado.

Zhang et al. (2014) estudando a produção de pigmentos por *Monascus purpureus* SKY 219 sob a influência de CM de baixa intensidade aplicados no caldo de fermentação e na água destilada estéril, utilizado para a preparação do meio, observaram aumento na produção de pigmentos vermelho e amarelo de 20 e 36 %, respectivamente, após 8 dias, com o caldo de fermentação tratado com 0,4 mT. Para a água destilada estéril, exposta durante 5 h ao CM, um aumento significativo também ocorreu com tratamento de 0,4 mT. Porém, em intensidades de CM maiores, de 0,9 e 1,2 mT no tratamento do caldo de fermentação e água destilada, respectivamente, a produção de pigmentos diminuiu significativamente.

2.4.1 Estudos e aplicação de campos magnéticos no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* é conhecida por desenvolver diferentes mecanismos adaptativos, com intuito de sobreviver mesmo em condições de estresse, sendo que as mais comuns incluem choques de pH e temperatura, estresse oxidativo, choque osmótico e os produtos de fermentação tóxicos, principalmente o etanol (PENNINCKX, 2000).

Grande parte dos estudos de aplicação de CM em processos fermentativos tem utilizado a levedura *S. cerevisiae* como modelo de estudo devido às suas características morfológicas, metabólicas e genéticas bem conhecidas e por sua semelhança no mecanismo molecular associado com processos celulares básicos entre diferentes espécies eucarióticas, incluindo as células humanas (RUIZ-GÓMEZ et al., 2004). O principal objetivo, em processos magneticamente assistidos envolvendo *S. cerevisiae*, é estimular o processo de crescimento da célula ou a atividade metabólica obtendo-se altos rendimentos (HRISTOV; PEREZ, 2011). Na Tabela 3 são mostrados a influência de diferentes intensidades de CM em diversas cepas de *S. cerevisiae*.

Tabela 3 - Influência dos CM em diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	Intensidade de CM	Tempo de exposição (h)	Efeito positivo	Referência
XII	100 mT	0,66	Biomassa	Pichkoe Povalyaeva (1996)
H192	0,5 mT	10	Biomassa e produção de ATP	Mehedintu e Berg (1997)
DAUFPE-1012	220 mT	24	Biomassa e produção de CO ₂	Motta et al. (2001)
DAUFPE-1012	220 mT	24	Biomassa e produção de etanol	Motta et al. (2004)
DAUFPE-1012	220 mT	24	Biomassa	Muniz et al. (2007)
ATCC 7754	25,0 mT	16	GSH	Santos et al. (2010)
ATCC 24859	200 mT	30	Etanol	Deutmeyer et al. (2011)
ATCC 7754	20 mT	72	GSH	Santos et al. (2012)
CH-6300 ZUG	140 mT	24-72	Biomassa, etanol, acetaldeído, 1-propanol	Berlot et al. (2013)

Montoya, Ramírez e Ospina (2005) avaliaram o crescimento de *S. cerevisiae* em melaço, com aplicação de CM de alta frequência e intensidade baixa. O ensaio foi realizado em reatores de 400 mL (25°C e 1 vvm). Para obter os CM foi utilizado sistema de bobinas (diâmetro

de 8,2 cm), sendo o campo de 250 mG (25 μ T) com frequência de 100 kHz e o tempo de aplicação de 200 s. Foram feitos quatro ensaios (A, B, C e D), sendo que os ensaios A (sem aeração) e B (com aeração) realizados com aplicação de CM antes de iniciar o cultivo. O ensaio C (com aeração) foi realizado com duas aplicações de CM antes de iniciar o cultivo e após 4 h de cultivo. O ensaio D (com aeração) ocorreu com três aplicações, antes de iniciar o cultivo, com 2 h e 4 h de cultivo. Os resultados mostraram que o CM pode estimular o crescimento das culturas com ou sem aeração, sendo o melhor resultado obtido no ensaio B após 25 h, obtendo-se crescimento de 14,4 % maior do que o cultivo controle.

Muniz et al. (2007) investigaram a influência de CM estáticos de 220 mT na produção de biomassa de *S. cerevisiae* DAUFPE-1012. A concentração de biomassa nas culturas expostas foi 2,5 vezes maior, quando comparado com as culturas não expostas.

Santos et al. (2010) avaliaram os efeitos dos CM sobre a biomassa e produção de GSH por *S. cerevisiae* ATCC 7754. Para este fim foi utilizado delineamento fatorial completo para determinar a influência do tempo de exposição (8 a 16 h) e a intensidade do CM (25,0 a 34,3 mT), nos níveis de GSH e de produção de biomassa. A análise estatística mostrou que a intensidade do CM foi um fator importante na produção de GSH e biomassa, sendo as maiores concentrações obtidas usando 25 mT durante 16 h.

A literatura têm mostrado resultados conflitantes em relação aos efeitos dos CM sobre a cinética de fermentação e crescimento celular de várias cepas de *S. cerevisiae*, desta forma, Deutmeyer et al. (2011) caracterizaram os efeitos dos CM através de dois experimentos. O primeiro experimento foi concluído após 25 h com concentração de 2 % de dextrose, sob a influência de CM estáticos homogêneos e não homogêneos de 100 e 200 mT, respectivamente, e o segundo experimento concluído após 30 h com concentração de 6 % de dextrose, sob a influência de CM estático não homogêneo de 200 mT. Com os CM homogêneos não foi obtido qualquer efeito significativo sobre o crescimento das leveduras, enquanto que os CM estáticos não homogêneos promoveram aumento de aproximadamente 8 % em relação ao experimento controle.

A produção de GSH usando CM gerados por ímãs foi estudada por Santos et al. (2012). Para tal, foi utilizado sistema de reciclo de células através dos ímãs e o tempo de aplicação dos CM foi 24, 48 e 72 h. Comparando os resultados com e sem aplicação foi observado que os melhores resultados foram obtidos com aplicação de 20 mT durante 72 h, correspondendo a aumento da concentração de biomassa e GSH de 2,63 e 32,1 %, respectivamente.

Berlot et al. (2013) estudaram a aplicação de CM estático homogêneo de 140 mT no inóculo de *S. cerevisiae* (Daystar Ferment AG, CH – 6300 ZUG) para posterior uso em fermentação alcoólica do mosto de uvas *Malvasia*. Os resultados demonstraram que a exposição do inóculo aos CM melhorou a cinética do processo de fermentação, com consumo mais rápido de glicose, aumento do rendimento de biomassa e etanol, além de elevar os níveis de acetaldeído, 1-propanol, 2-butanol, álcool isoamílico e ácido láctico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O soro de leite líquido foi fornecido pela Cooperativa Sul-Rio-Grandense Laticínios Ltda – COSULATI e caracterizado quanto ao teor de proteínas totais, pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,38, lipídios, com hidrólise ácida prévia, extrato seco total, cinzas, pH e acidez em ácido láctico (AOAC, 2000) e açúcares redutores (MILLER, 1959).

3.2 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA

O micro-organismo utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, obtido junto a Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas-SP). A manutenção da cepa foi realizada em ágar inclinado, utilizando-se o meio YM (*yeast extract – malt extract*) e mantidas sob refrigeração (4°C). Na Tabela 4 é mostrada a composição do meio YM.

Tabela 4 - Composição do meio YM usado na manutenção da cepa e no preparo do inóculo de *S. cerevisiae* ATCC 7754.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	10,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Ágar*	20,0

*Usado somente para a manutenção da cepa.

3.3 PREPARO DO INÓCULO

A fermentação para a obtenção do inóculo foi realizada em agitador rotativo (New Brunswick, mod. INNOVA 44 – Nova York - EUA) através da transferência das colônias, mantidas em meio YM, para frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de caldo YM (Tabela 3) esterilizado a 121°C por 15 min. As condições de cultivo foram 30°C e 150 rpm por

24 h (SANTOS, 2008). A concentração do inóculo (determinada de acordo com o item 4.7.1) variou entre 1,9 e 2,4 g L⁻¹.

3.4 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE GSH

Na Tabela 5 é mostrada a composição do meio para a produção de GSH. O extrato de levedura e o soro de leite foram adicionados de acordo com os níveis do planejamento experimental (Tabela 6).

A glicose e o soro de leite foram esterilizados separadamente e antes da inoculação com 5 % de inóculo (SANTOS, 2008), foram misturados aos outros componentes do meio. A glicose foi esterilizada a 121°C por 15 min e o soro de leite, através da exposição em raios UV durante 2 h, com homogeneização manual a cada 40 min. O pH inicial do meio foi ajustado para 5, utilizando-se HCl ou NaOH (1 mol L⁻¹), conforme necessário. Após 32 h de fermentação foram adicionados separadamente 4 mmol L⁻¹ dos seguintes aminoácidos: cisteína, ácido glutâmico e glicina, de acordo com Anschau (2010).

Tabela 5 - Composição do meio utilizado para a produção de GSH.

Composto	Concentração
Glicose	54,0 g L ⁻¹
Extrato de Levedura	10,0 a 50,0 g L ⁻¹
Soro de Leite	5 a 20 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,0 g L ⁻¹
Cisteína	4 mmol L ⁻¹
Ácido Glutâmico	4 mmol L ⁻¹
Glicina	4 mmol L ⁻¹

Fonte: Anschau (2010); Santos (2008)

3.5 ENSAIOS EM FRASCO ERLNMEYER PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO

3.5.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

As fermentações foram realizadas em agitador rotativo (New Brunswick, mod. INNOVA 44 - Nova York - EUA) utilizando frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de fermentação (meio + inóculo) (Tabela 5). O processo foi desenvolvido a 20°C, pH 5,

300 rpm e 5 % de inóculo ($v v^{-1}$) de acordo com Santos (2008), durante 96 h e as amostras retiradas nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, sendo cada tempo de retirada de amostra correspondente a um reator de 250 mL.

Estes ensaios tiveram como propósito, avaliar a melhor concentração de substratos proteicos no meio de cultivo, sendo as variáveis estudadas a concentração de extrato de levedura e soro de leite. Para tal, foi realizado delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 com três pontos centrais totalizando 11 ensaios e tendo como respostas avaliadas a concentração celular ($g L^{-1}$) e de GSH ($mg L^{-1}$).

Na Tabela 6 são apresentados os níveis codificados e reais (entre parênteses) das variáveis estudadas. A análise da matriz das respostas foi realizada através do software Protimiza Experimental Design.

Tabela 6 - Matriz dos ensaios do DCCR 2^2 .

Ensaio	Extrato de levedura ($g L^{-1}$)	Soro de leite (%)
1	- 1 (16)	- 1 (7)
2	+ 1 (44)	- 1 (7)
3	- 1 (16)	+ 1 (18)
4	+ 1 (44)	+ 1 (18)
5	0 (30)	0 (12,5)
6	0 (30)	0 (12,5)
7	0 (30)	0 (12,5)
8	-1,41 (10)	0 (12,5)
9	+1,41 (50)	0 (12,5)
10	0 (30)	-1,41 (5)
11	0 (30)	+1,41 (20)

Após realizar os ensaios do planejamento experimental, foram realizados outros 4 ensaios, fixando-se a concentração de soro de leite em 18 % e variando a concentração de extrato de levedura em 30, 35, 40 e 45 $g L^{-1}$. O processo foi desenvolvido em duplicata para cada concentração. As condições de cultivo foram 20°C, 5 % de inóculo ($v v^{-1}$), pH 5 e 300 rpm de acordo com Santos (2008). Os ensaios foram desenvolvidos durante 96 h e amostras retiradas nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h, sendo cada tempo de retirada de amostra correspondente a um reator de 250 mL.

3.6 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

Após a determinação da melhor composição do meio de cultivo, foi avaliada a influência dos CM gerados por ímãs durante a produção de GSH pela *S. cerevisiae* ATCC 7754 em fermentador de bancada. O meio de cultivo continha glicose (54 g L^{-1}), extrato de levedura (40 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12 g L^{-1}), cisteína (4 mmol L^{-1}), ácido glutâmico (4 mmol L^{-1}), glicina (4 mmol L^{-1}) e soro de leite líquido (18 %).

O volume do meio de fermentação utilizado (meio + inóculo) foi 3 L. Após 32 h de fermentação foram adicionados separadamente 4 mmol L^{-1} dos aminoácidos precursores da GSH: cisteína, ácido glutâmico e glicina. O meio foi esterilizado juntamente com o fermentador (121°C por 25 min), com exceção da glicose e do soro de leite que foram esterilizados separadamente em frascos Erlenmeyer, e dos aminoácidos que foram esterilizados através da exposição em raios UV, durante 40 min. Antes da adição do inóculo, a glicose, o soro de leite foram adicionados ao fermentador e o pH inicial do meio corrigido para 5. O tempo de fermentação foi 72 h com retirada de amostras durante este período.

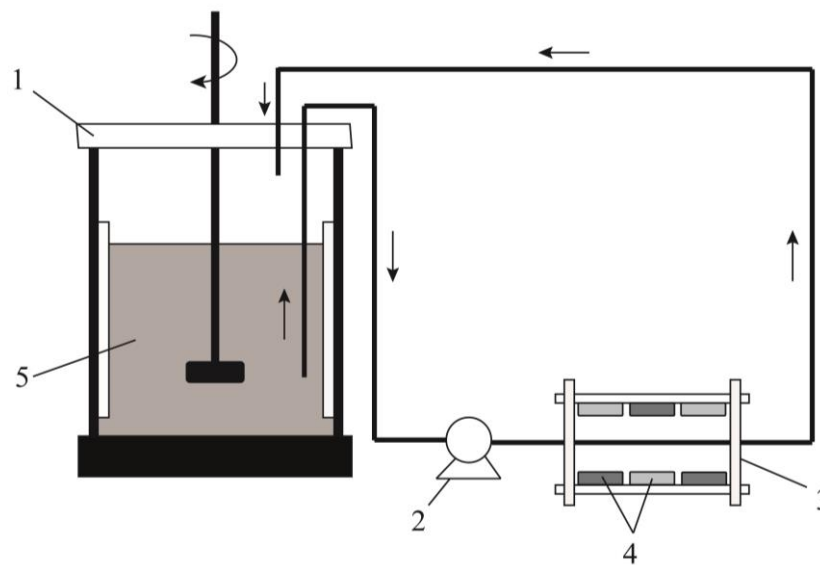
O fermentador de bancada Bioflo New Brunswick (CelliGen 115), com volume útil de 5 L foi adaptado a um sistema de reciclo da suspensão celular através de uma bomba peristáltica (Masterflex 7553-85) em conjunto com um magnetizador com ímãs, conforme mostrado nas Figuras 4, 5 e 6. A velocidade de reciclo celular foi $5,5 \text{ cm s}^{-1}$.

As condições de fermentação foram 20°C , 1,0 vvm, 300 rpm, 5 % de inóculo (v v^{-1}) com duração de 72 h, conforme descrito por Santos (2008) com adaptações.

O ar foi fornecido ao fermentador de bancada através de compressor, tendo sido filtrado com auxílio de filtro acoplado ao aspersor do fermentador. O nível de espuma formado durante a fermentação foi controlado através da injeção de antiespumante (FG – AFE 0010) quando necessário.

A fermentação controle foi feita sem aplicação de CM e com reciclo celular nas mesmas condições dos outros ensaios. Nas fermentações com aplicação de CM, variou-se o período da aplicação do CM, 0 a 24 h, 24 a 48 h e 48 a 72 h. Os ímãs foram colocados a 2,5 cm do tubo de reciclo (0,48 cm de diâmetro); com isso o CM médio aplicado foi 31,7 mT (317 Gauss) medido através de Teslâmetro (GlobalMag – TLMP – HALL).

Figura 4 - Esquema do tratamento magnético da suspensão celular em fermentador de bancada.



Legenda:

1 – Fermentador de bancada Bioflo

2 – Bomba para recirculação da suspensão celular

3 – Magnetizador de indução variável

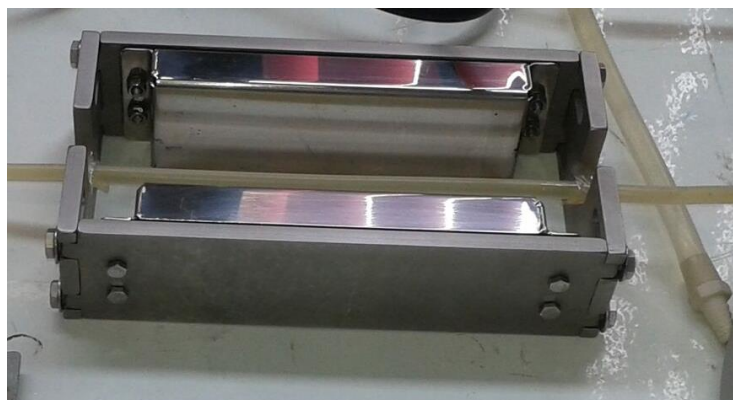
4 – Ímãs

5 – Suspensão celular/meio de cultivo

Figura 5 – Imagem do fermentador de bancada com reciclo celular e aplicação de CM.



Figura 6 - Magnetizador com par de ímãs para geração de CM.



3.7 METODOLOGIA ANALÍTICA

3.7.1 Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular foi feita por massa seca de células segundo descrito por Santos (2008). Para tal, uma alíquota de 5 mL do meio fermentado foi centrifugado (3000 rpm por 20 min.) e o sobrenadante descartado. A massa celular foi lavada com água destilada, seguindo-se de secagem em estufa a 70°C até massa constante. Os resultados foram expressos em g L⁻¹.

3.7.2 Determinação de pH

A determinação de pH de cada amostra foi feita diretamente através de potenciômetro (AOAC, 2000).

3.7.3 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada segundo descrito por Miller (1959). Para tal, foi utilizado o sobrenadante das amostras retiradas durante a fermentação e diluídas com água conforme necessário. Para cada 25 mL de solução foi adicionado 1 mL de carrez I (ferrocianeto de potássio 15 %) e 1 mL de carrez II (sulfato de zinco 30 %) para a precipitação das proteínas. Após precipitação, centrifugou-se por 6000 rpm durante 20 min e o sobrenadante utilizado para a determinação de glicose. Em 0,5 mL de amostra foi adicionado 0,5 mL da solução de ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS), seguido de 5 min de reação em banho

a 100°C. Após, os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionados 8 mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio. A leitura da transmitância foi feita em espectrofotômetro (Quimis) a 540 nm. A concentração de glicose foi calculada através de curva padrão de glicose e os resultados expressos em g L⁻¹.

3.7.4 Determinação da concentração de glutatona

Para a determinação de GSH foi utilizado o método de Owens e Belcher (1965). O meio fermentado foi centrifugado e o sobrenadante separado das células. Uma solução de etanol 40 % (v v⁻¹) foi adicionada às células e feita a extração por 2 h a 30°C. Em 0,5 mL de amostra foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,5 mol L⁻¹; pH 8,0) e 30 µL de DTNB (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico). Após 5 min de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro (Quimis) a 412 nm. A concentração de GSH foi calculada através de curva padrão, sendo utilizada L-glutaciona reduzida e os resultados expressos em mg L⁻¹.

A solução de GSH foi preparada dissolvendo-se 0,01 g de GSH em HCl 0,01 mol L⁻¹ (resfriado) até o volume de 100 mL. A solução foi mantida congelada para não ocorrer oxidação. Para o preparo da solução de DTNB, 0,396 g deste reagente e 0,15 g de NaHCO₃ foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0). O volume foi ajustado para 100 mL e a solução mantida congelada até o momento do uso.

3.8 EQUAÇÕES UTILIZADAS PARA CÁLCULO DOS RESULTADOS

As Equações utilizadas foram descritas por Santos (2008). Através da Equação 1 foi calculada a porcentagem de GSH (%) que correlaciona a massa do composto (g) em relação a massa celular (g) para determinado tempo de fermentação.

$$\text{GSH (\%)} = \frac{\text{massa GSH (g)}}{\text{massa celular (g)}} \cdot 100 \quad (1)$$

As Equações 2, 3 e 4 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.

$$Y_{P/S} = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{S_{\text{inicial}} - S_{\text{final}}} \quad (2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}}{S_{\text{inicial}} - S_{\text{final}}} \quad (3)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}} \quad (4)$$

As Equações 5 e 6 foram utilizadas para cálculos da produtividade em célula (P_x), e produtividade em produto (P_p).

$$P_x = \frac{X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}}{t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}}} \quad (5)$$

$$P_p = \frac{P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}}{t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}}} \quad (6)$$

Através da Equação 7 foi calculado o desvio relativo das respostas obtidas experimentalmente e das previstas pelo modelo. Onde: Y = resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo.

$$\text{Desvio relativo (\%)} = \left(\frac{Y - \hat{Y}}{Y} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

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 8 e 9. Sendo que o valor de PDX representa a diferença da concentração celular com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle e o valor de PDP a diferença da concentração de GSH com a aplicação de CM em relação aos ensaios controle. Onde: X_{AC} = concentração celular com aplicação do CM, X_{controle} = concentração celular do ensaio controle, P_{AC} = concentração de GSH com aplicação do CM e P_{controle} = concentração de GSH do ensaio controle.

$$PDX = \left(\frac{X_{AC} - X_{\text{controle}}}{X_{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

$$PDP = \left(\frac{P_{AC} - P_{\text{controle}}}{P_{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O planejamento experimental foi analisado estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de *Fisher* ($p \leq 0,05$), utilizando o software Protimiza Experimental Design.

Os dados dos experimentos com variação da concentração de extrato de levedura e dos experimentos em fermentador de bancada foram tratados estatisticamente através da ANOVA seguido pelo teste *Tukey* ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Este trabalho teve como propósito estudar a viabilidade de utilizar soro de leite líquido no meio de cultivo, como substrato proteico durante as fermentações para a produção de GSH pela levedura *S. cerevisiae*. A caracterização físico-química do soro de leite líquido, em base úmida é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Características físico-química do soro de leite líquido.

Parâmetro	Concentração*
pH	4,63 ± 0,01
Extrato seco total	5,49 ± 0,02 %
Proteínas totais	0,95 ± 0,04 %
Cinzas	0,49 ± 0,02 %
Acidez	0,28 ± 0,00 %
Açúcares redutores	2,0 ± 0,07 g L ⁻¹
Lipídios	0,18 ± 0,02 %

*± Desvio padrão.

Observa-se na Tabela 7 concentrações superiores de proteínas totais, cinzas e índice de acidez ao encontrado por Soares (2014) em soro de leite proveniente da fabricação de queijo tipo minas frescal com teor de proteína de 0,88 %, cinzas de 0,37 % e acidez em ácido láctico de 0,15 %. Porém em relação a açúcares redutores, pH e ao teor de lipídios, este estudo encontrou valores inferiores ao obtido por Soares (2014), que em seu estudo obteve 3,47 % de açúcares redutores, pH 6,09 e 0,43 % de lipídios.

De acordo com Pintado, Macedo e Malcata (2001), a composição do soro de leite depende de vários fatores, tais como fonte (bovino, caprino ou ovino), composição do leite (raça, estágio da lactação, alimentação do animal), proporção soro/leite e práticas tecnológicas como temperatura e tempo de aquecimento.

O soro de leite tem sido reconhecido como um produto nutritivo, porém poucos setores tem feito um correto aproveitamento deste produto (SILVA et al., 2011). O componente mais valioso do soro são as proteínas, mas sua concentração neste líquido é reduzida, e para

realçar suas propriedades funcionais, tais como solubilidade, emulsificação e formação de espuma, são necessárias etapas de concentração (PAGNO, 2009).

4.2 ENSAIOS EM FRASCO ERLLENMEYER PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO

Estudos têm relatado que fontes de nitrogênio de baixo custo têm sido usados como substituto parcial ou total ao extrato de levedura. Assim, o DCCR 2² foi utilizado para avaliar a influência dos substratos proteicos (extrato de levedura e soro de leite líquido) no meio de cultivo para a produção de GSH. As variáveis utilizadas no DCCR 2², os seus níveis codificados e reais e a matriz dos ensaios realizados estão apresentados na Tabela 6 (item 4.4.1). Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da concentração de glicose durante as 96 h de fermentação.

Tabela 8 - Concentração de glicose obtidos nos ensaios do planejamento experimental.

Ensaio	Glicose* (g L ⁻¹)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	49,45 ± 0,005	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,002
2	51,88 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001
3	48,89 ± 0,007	0,01 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001	0,00 ± 0,001
4	49,91 ± 0,022	0,30 ± 0,001	0,30 ± 0,001	0,10 ± 0,001	0,10 ± 0,001
5	52,81 ± 0,025	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,002	0,01 ± 0,001
6	54,77 ± 0,014	0,05 ± 0,010	0,03 ± 0,003	0,01 ± 0,005	0,01 ± 0,001
7	53,13 ± 0,001	0,06 ± 0,002	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,004	0,13 ± 0,004
8	53,61 ± 0,021	0,02 ± 0,006	0,00 ± 0,001	0,02 ± 0,006	0,02 ± 0,001
9	53,92 ± 0,004	0,06 ± 0,002	0,00 ± 0,003	0,02 ± 0,003	0,04 ± 0,004
10	50,11 ± 0,008	0,07 ± 0,030	0,01 ± 0,004	0,04 ± 0,005	0,03 ± 0,004
11	54,96 ± 0,008	0,01 ± 0,005	0,02 ± 0,005	0,03 ± 0,013	0,02 ± 0,004

*± Desvio padrão.

É possível verificar que a glicose foi totalmente consumida pela levedura durante as primeiras 24 h de fermentação. Fato este semelhante ao observado por Santos (2008), que relatou que depois deste período o crescimento celular pode ser resultante do consumo de outros nutrientes.

Os valores de pH durante as 96 h de fermentação são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de pH obtidos nos ensaios do planejamento experimental.

Ensaio	pH				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	5,0	4,7	4,3	4,2	3,4
2	4,7	3,5	4,7	5,9	4,0
3	5,0	4,8	4,4	4,3	3,5
4	5,0	4,5	4,8	6,3	5,4
5	5,0	4,4	5,1	4,4	4,4
6	5,0	4,4	4,7	5,0	4,3
7	5,1	4,4	4,9	4,7	4,6
8	4,9	3,9	4,0	4,1	3,8
9	5,0	4,5	4,8	5,5	5,1
10	5,0	4,3	5,0	4,4	4,0
11	5,0	4,3	5,2	4,5	4,1

O pH final dos ensaios (3,4 a 4,6) foi menor que o pH inicial (5,0), com exceção dos ensaios 4 e 9 (5,4 e 5,1, respectivamente). A diminuição do pH pode ser decorrente da liberação de endoproteinases da *S. cerevisiae* por lise celular, que hidrolisam proteínas e pequenos peptídeos, liberando aminoácidos no meio como observaram Meisel e Bockelmann (1999) e Verstraete et al. (2003).

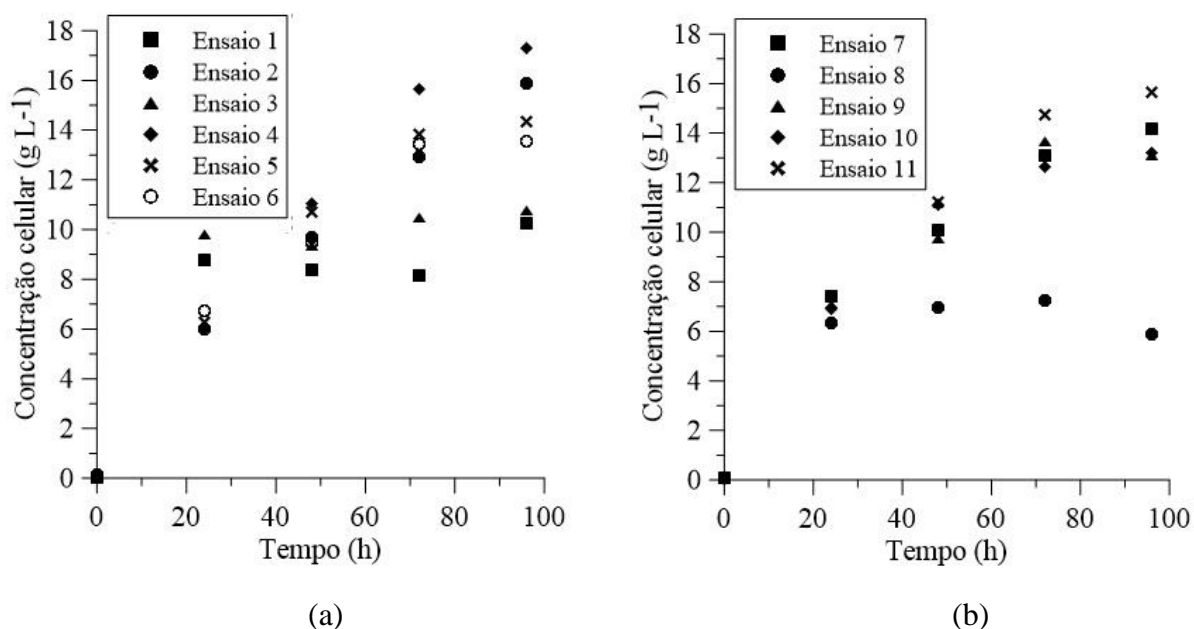
Os resultados da concentração celular podem ser visualizados na Tabela 25 (apêndice) e na Figura 7. Pode ser verificado no ensaio 4 (Figura 7a), onde foi utilizado 44 g L^{-1} de extrato de levedura e 18 % de soro de leite líquido que o maior valor de concentração celular ($17,29 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu em 96 h de fermentação. Nos ensaios 1, 3 e 8 (Figuras 7a e 7b) feitos com menores concentrações de extrato de levedura (16 , 16 e 10 g L^{-1}), foram observados os menores valores de concentração celular ($10,25$, $10,58$ e $5,90 \text{ g L}^{-1}$), respectivamente.

Através destes ensaios realizados em frasco Erlenmeyer foi possível observar que as maiores concentrações de extrato de levedura, promoveram o maior crescimento celular.

Zhang, Wen e Tan (2007) relataram que as fontes de carbono e nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas e outros compostos podem influenciar o crescimento celular e o acúmulo

de produtos metabólicos nas células microbianas. A otimização dos meios é a base para obter altos rendimentos e economia nos processos biotecnológicos.

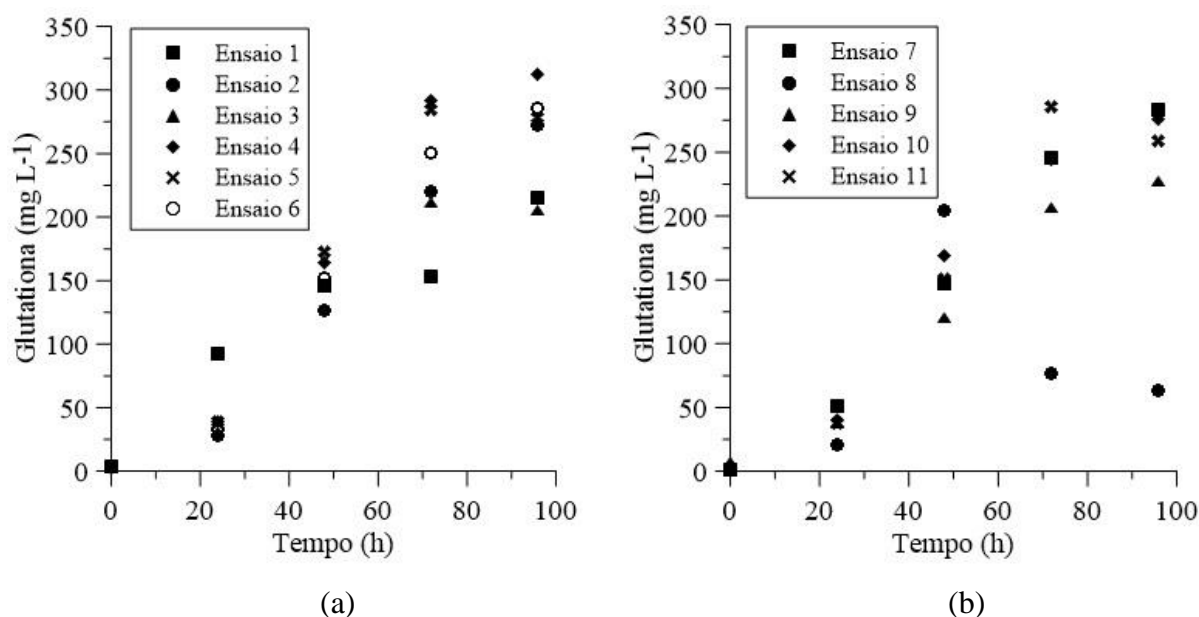
Figura 7 - Acompanhamento da concentração celular (g L^{-1}) de *S. cerevisiae* durante os ensaios em frasco Erlenmeyer DCCR 2²: (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 11.



Os resultados de concentração de GSH são mostrados na Tabela 26 (apêndice) e na Figura 8. Dentre os 11 ensaios realizados, verificou-se que a concentração de GSH no tempo de 96 h variou de 62,97 a 312,44 mg L^{-1} , mostrando a importância de estabelecer as concentrações adequadas e o tipo de fonte de nitrogênio para a produção de GSH. A maior concentração de GSH (312,44 mg L^{-1}) foi obtida no ensaio 4 (44 g L^{-1} de extrato de levedura e 18 % de soro de leite), após 96 h de fermentação. Já a menor concentração de GSH (62,97 mg L^{-1}) foi obtida no ensaio 8 (10 g L^{-1} de extrato de levedura e 12,5 % de soro de leite) evidenciando que a produção de GSH foi maior quando utilizado as maiores concentrações das fontes proteicas.

Cha et al. (2004) estudaram a influência de fontes de nitrogênio na produção de GSH por *S. cerevisiae* FF-8, sendo feitas fermentações em frascos Erlenmeyer de 1 L a 30°C por 72 h e agitação de 100 rpm. Várias fontes de nitrogênio foram testadas (peptona, triptona, extrato de levedura, extrato de malte, extrato de carne, caseína, farinha de soja, NaNO_3 , NH_4Cl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Dentre todas, o melhor resultado (88,4 mg L^{-1}) foi obtido com 1 % (m v^{-1}) de extrato de levedura.

Figura 8 - Acompanhamento da concentração de GSH (mg L^{-1}) produzida por *S. cerevisiae* durante os ensaios em frasco Erlenmeyer DCCR 2²: (a) ensaios 1 a 6 e (b) ensaios 7 a 11.



Piedrahíta-Aguirre (2008) estudando a influência de meios proteicos (água de maceração de milho, extrato de levedura, lecitina e proteína do soro de leite) para a produção de GSH com a mesma cepa utilizada neste trabalho (ATCC 7754), obteve $278,42 \text{ mg L}^{-1}$ em 96 h de fermentação utilizando 50 g L^{-1} de água de maceração de milho, 10 g L^{-1} de extrato de levedura, 5 mmol L^{-1} de lecitina e 50 g L^{-1} de proteína do soro de leite.

Taskin (2013) relatou que para produção de GSH por *S. cerevisiae*, as fontes de carbono são geralmente relacionadas a concentração celular, enquanto que as fontes de nitrogênio estão relacionadas com a síntese do produto. Ainda, alguns estudos reportaram que a composição de aminoácido dos meios proteicos têm grande influência na produção de GSH. Hara et al. (2012) verificaram que a expressão de uma protease na superfície de células de *S. cerevisiae* permite a utilização direta de queratina e proteína de soja como fonte de aminoácidos e que estes teriam reforçado o conteúdo intracelular de GSH na levedura.

Taskin (2013) estudou a produção de GSH a partir de *S. cerevisiae*, utilizando proteína hidrolisada de pena de galinha, como fonte de cisteína e glicina para o meio de cultivo. Constatou-se que o hidrolisado continha alto conteúdo de cisteína e glicina, promovendo aumento da produção de biomassa e GSH em 53 e 115 % respectivamente, em relação ao ensaio controle que continha somente glicose (60 g L^{-1}) e extrato de levedura (4 g L^{-1}). As maiores concentrações de biomassa e GSH ($17,4 \text{ g L}^{-1}$ e 271 mg L^{-1} respectivamente) foram obtidas com 20 g L^{-1} de proteína hidrolisada de pena de galinha.

Os valores de GSH (%) e os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/X}$), substrato em célula ($Y_{X/S}$) e célula em produto ($Y_{P/X}$) para os ensaios do DCCR são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados de GSH (%) produzida por *S. cerevisiae* e fatores de conversão para os ensaios do planejamento experimental.

Ensaio	Glutaciona (%)				Fatores de conversão		
	24 h	48 h	72 h	96 h	$Y_{P/S}$ (mgGSH g _{glic} ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g _{cél} g _{glic} ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (mgGSH g _{cél} ⁻¹)
1	1,0	1,8	1,8	2,0	4,27	0,21	20,62
2	0,5	1,3	1,7	1,7	5,17	0,30	17,03
3	0,9	1,5	2,0	2,0	4,11	0,22	18,67
4	0,6	1,5	1,9	1,8	6,21	0,35	17,91
5	0,6	1,6	2,0	1,9	5,21	0,27	19,18
6	0,4	1,6	1,9	2,1	5,15	0,25	20,91
7	0,7	1,5	1,9	2,0	5,32	0,27	20,02
8	0,3	-	1,1	1,0	1,13	0,11	10,47
9	0,6	1,2	1,5	1,7	4,08	0,24	16,86
10	0,6	1,5	1,9	2,1	5,48	0,26	20,80
11	0,6	1,3	2,0	1,7	4,69	0,28	16,52

Com relação ao conteúdo de GSH (%) na levedura, observa-se que a partir de 48 h ocorre maior acúmulo de GSH. Os resultados (Tabela 8) mostraram que a partir de 24 h a glicose foi completamente consumida e segundo Dong et al. (2007) a redução de nutrientes causa estresse na célula, induzindo a mudanças no metabolismo e ao acúmulo de algumas moléculas protetoras, tais como a GSH. Esse fato é comprovado neste estudo, com o melhor resultado de 2,1 % observado em 96 h nos ensaios 6 (30 g L⁻¹ de extrato de levedura e 12,5 % de soro de leite) e 10 (30 g L⁻¹ de extrato de levedura e 5 % de soro de leite). Em relação aos fatores de conversão, a maior conversão de substrato em produto e substrato em célula foi observado no ensaio 4 (44 g L⁻¹ de extrato de levedura e 18 % de soro de leite) com 6,21 mgGSH g_{glic}⁻¹ e 0,35 g_{cél} g_{glic}⁻¹, respectivamente e célula em produto no ensaio 6 (30 g L⁻¹ de extrato de levedura e 12,5 % de soro de leite) com 20,91 mgGSH g_{cél}⁻¹.

Santos et al. (2007) e Anschau et al. (2013) estudando a produção de GSH com a mesma cepa deste estudo (ATCC 7754), obtiveram valores de porcentagem de GSH entre 0,8

a 2,1% e 0,9 a 2,1 %, respectivamente, sendo estes resultados iguais ao máximo obtido no estudo (2,1 %). Porém, Xiong et al. (2015) ao desenvolverem controle *on line* da velocidade de alimentação de glicose para aumentar a densidade celular durante a fermentação com *S. cerevisiae* T65, obtiveram máximo de 1,2 %.

Fan et al. (2004) utilizando uma cepa de *S. cerevisiae* modificada geneticamente obtiveram 13,1 mg_{GSH} g_{cél.}⁻¹. Liu et al. (2004) utilizaram *S. cerevisiae* de uma indústria cervejeira, obtendo 10 mg_{GSH} g_{cél.}⁻¹. Taskin (2013) avaliando diferentes concentrações de hidrolisado proteico de pena de galinha na fermentação com *S. cerevisiae* obteve 15,5 mg_{GSH} g_{cél.}⁻¹, utilizando 20 g L⁻¹ do hidrolisado. Estes resultados de conversão de célula em produto foram menores que o observado no ensaio 6 (20,91 mg_{GSH} g_{cél.}⁻¹).

Estes resultados mostraram que a concentração dos meios proteicos (extrato de levedura e soro de leite) no meio de cultivo é um parâmetro que influencia a produção de GSH pela levedura *S. cerevisiae*. De acordo com Jelen et al. (2003) o soro de leite retém 55 % dos nutrientes do leite, onde sua composição consiste principalmente de lactose, proteínas e minerais. Estes resultados mostraram a viabilidade em utilizar o soro de leite como um dos componentes do meio de fermentação.

A Tabela 11 mostra os valores de produtividade celular (g L⁻¹ h⁻¹) e produtividade em GSH (mg L⁻¹ h⁻¹). Os maiores valores de produtividade celular foram observados após 24 h de fermentação em todos os ensaios, sendo a máxima produtividade (0,41 g L⁻¹ h⁻¹) obtida no ensaio 3. Em relação a produtividade em GSH, os maiores valores foram observados após 72 h de fermentação, com exceção dos ensaios 1, 3, e 10. A máxima produtividade (4,0 mg L⁻¹ h⁻¹) foi obtida no ensaio 4 após 72 h de fermentação.

Anschau et al. (2013) avaliando o tempo da adição dos aminoácidos precursores de GSH e a concentração de cada um deles no meio de cultivo obtiveram 0,40 g L⁻¹ h⁻¹ de produtividade celular e 3,35 mg L⁻¹ h⁻¹ de produtividade em GSH, adicionando 4 mmol L⁻¹ de cada um dos aminoácidos, ácido glutâmico, cisteína e glicina após 32 h de fermentação. Em relação a produtividade celular, este foi igual ao melhor resultado de produtividade deste estudo (ensaio 3). Já em relação a produtividade em GSH, este foi inferior ao melhor resultado (4,22 mg L⁻¹ h⁻¹) obtido no ensaio 8. Esse fato pode ser decorrente da adição de soro de leite neste estudo, que contém aminoácidos precursores de GSH em sua composição. Haraguchi et al. (2006) citaram que a composição de cisteína, glicina e ácido glutâmico no soro de leite é em média 1,7, 1,7 e 15,4 mg g_{proteína}⁻¹, respectivamente.

Tabela 11 - Produtividade celular e produtividade em GSH para os ensaios do planejamento experimental.

Ensaio	Produtividade celular (g L ⁻¹ h ⁻¹)				Produtividade em GSH (mg L ⁻¹ h ⁻¹)			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	0,36	0,17	0,11	0,11	3,67	2,96	2,07	2,20
2	0,24	0,20	0,18	0,16	1,01	2,54	3,00	2,80
3	0,41	0,19	0,15	0,11	3,70	2,92	2,87	2,09
4	0,25	0,23	0,22	0,18	1,48	3,34	4,00	3,22
5	0,26	0,22	0,19	0,15	1,46	3,52	3,90	2,86
6	0,28	0,20	0,19	0,14	1,22	3,09	3,43	2,94
7	0,31	0,21	0,18	0,15	2,06	3,04	3,38	2,94
8	0,26	0,14	0,10	0,06	0,77	-	1,03	0,63
9	0,26	0,20	0,19	0,14	1,28	2,35	2,77	2,29
10	0,29	0,23	0,18	0,14	1,59	3,50	3,37	2,86
11	0,29	0,23	0,20	0,16	1,51	3,12	3,95	2,68

A análise estatística a partir do DCCR 2² foi realizada para as respostas: concentração celular (g L⁻¹) e GSH (mg L⁻¹) no tempo de 96 h de fermentação, pois nesse tempo, foram observados as maiores concentrações.

No DCCR foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 5 %. Na Tabela 12 estão apresentados os coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios para a concentração celular, através do erro global, sem exclusão dos termos não significativos. A partir dos resultados da análise estatística, constatou-se que os parâmetros do soro de leite e a interação entre a concentração de extrato de levedura e soro de leite não foram significativos.

Na Tabela 13 é apresentada a análise de variância (ANOVA) para os ensaios do DCCR. Optou-se por utilizar o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos, sendo estes, incorporados aos resíduos, com percentual de variação explicada (R²) de 0,86 e o valor de F_{calculado} foi maior que o F_{tabelado}.

O modelo com as variáveis codificadas estatisticamente significativas que representam a concentração celular (g L⁻¹) em função da concentração de extrato de levedura na faixa estudada, é apresentado na Equação 10, onde X representa a concentração de extrato de levedura.

Tabela 12 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCCR 2², para a concentração celular de *S. cerevisiae* em 96 h.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	t (5)	p-valor
Média*	13,61	0,66	20,43	0,000
(1) Extrato de levedura (L)*	2,79	0,41	6,84	0,001
Extrato de levedura (Q)*	-1,66	0,49	-3,42	0,019
(2) Soro de leite (L)	0,67	0,41	1,65	0,159
Soro de leite (Q)	0,81	0,49	1,68	0,155
1 L x 2 L	0,22	0,58	0,39	0,716

*Fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$); L= Termo linear; Q = Termo quadrático

Tabela 13 - Análise de variância do DCCR 2² para a concentração celular de *S. cerevisiae* em 96 h.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calculado}
Regressão	84,63	2	42,32	23,78
Resíduos	14,24	8	1,78	
Total	98,87	10		

Porcentagem de variação explicada (R^2) = 0,86; $F_{0,05;2;8} = 4,46$

$$\text{Concentração celular (g L}^{-1}\text{)} = 14,37 + 2,80 X - 1,90 X^2 \quad (10)$$

A partir da Equação 10 foi obtida a curva de contorno (Figura 9). Pode-se verificar que independente da concentração de soro de leite utilizada, a concentração de extrato de levedura deve ser superior a 30 g L⁻¹, para obtermos maior concentração celular.

A Tabela 14 apresenta os valores experimentais das concentrações celulares e dos valores previstos pelo modelo, que foram validados pela ANOVA, bem como os desvios para cada ensaio do DCCR. Os desvios na região de interesse (ponto central) variaram de 0,1 a 11,7 %.

Na Tabela 15 são apresentados todos os resultados dos coeficientes de regressão e desvio padrão para a concentração de GSH do DCCR, através do erro global sem excluir os termos não estatisticamente significativos com 5 % de significância. Os dados mostram que as variáveis significativas foram os parâmetros relacionados a concentração de extrato de

levedura. O desvio padrão para os ensaios nos pontos centrais foi 3,79, representando a repetitividade do processo.

Figura 9 - Curva de contorno para a concentração celular de *S. cerevisiae*.

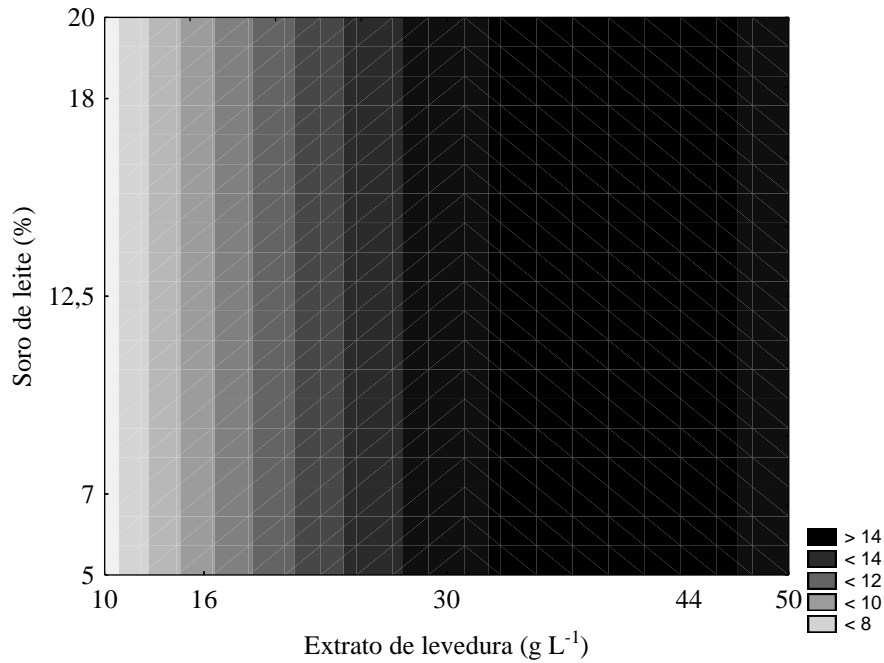


Tabela 14 – Valores experimentais e previstos por modelo matemático para a concentração celular de *S. cerevisiae*.

Ensaio	Conc. celular experimental	Conc. celular prevista	Desvio relativo (%)
	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	
1	10,25	9,67	5,7
2	15,87	15,27	3,8
3	10,78	9,67	10,3
4	17,29	15,27	11,7
5	14,35	14,37	-0,1
6	13,56	14,37	-6,0
7	12,95	14,37	-11,00
8	5,90	6,64	-12,5
9	13,12	14,54	-10,8
10	13,23	14,37	-8,6
11	15,67	14,37	8,3

Tabela 15 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCCR 2^2 , para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* em 96 h.

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	t (5)	p-valor
Média*	282,26	18,39	15,34	0,000
(1) Extrato de levedura (L)*	49,68	11,28	4,40	0,007
Extrato de levedura (Q)*	-57,62	13,46	-4,28	0,008
(2) Soro de leite (L)	0,72	11,28	0,06	0,951
Soro de leite (Q)	3,98	13,46	0,30	0,779
1 L x 2 L	12,46	15,93	0,78	0,469

*Fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$). L = Termo linear. Q = Termo quadrático.

Na Tabela 16 é apresentada a análise de variância (ANOVA) para os ensaios do DCCR, com os parâmetros estatisticamente significativos. Optou-se por utilizar o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos e com porcentagem de variação explicada (R^2) de 0,88. O valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} .

Tabela 16 - Análise de variância do DCCR 2^2 para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae* em 96 h.

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	40838,96	2	20419,48	28,21
Resíduos	5790,15	8	723,77	
Total	46629,11	10		

Porcentagem de variação explicada (R^2) = 0,88; $F_{0,05;2;8} = 4,46$

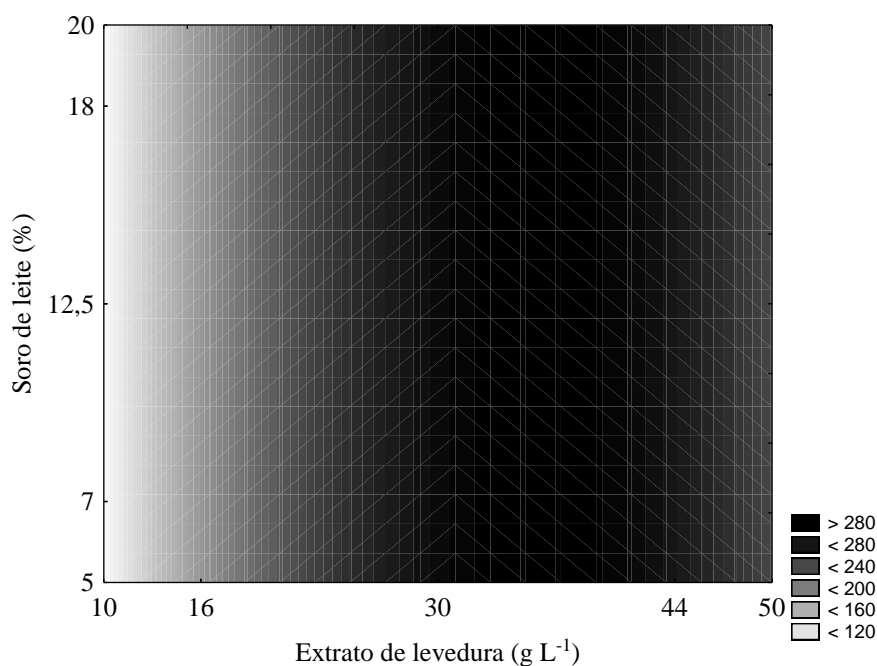
O modelo obtido com as variáveis significativas, que representa a concentração de GSH (mg L^{-1}) em função da concentração de extrato de levedura (X) é apresentado na Equação 11.

$$\text{GSH (mg L}^{-1}\text{)} = 286,00 + 49,68 X - 58,78 X^2 \quad (11)$$

Através das curvas de contorno (Figura 10) obtidas pela Equação 11, verificou-se que a adição de soro de leite no meio de cultivo não influenciou significativamente a produção de GSH pela *S. cerevisiae*, já a concentração de extrato de levedura entre 30 e 44 g L^{-1} , pode

aumentar a produção deste bioproduto pela levedura. Ainda, analisando a Tabela 26 (apêndice) e a Figura 8, o melhor resultado da concentração de GSH ($312,44 \text{ mg L}^{-1}$) foi obtido no ensaio 4, utilizando 44 g L^{-1} de extrato de levedura e 18 % de soro de leite. Portanto, com o propósito de aumentar a produção de GSH nos frascos Erlenmeyer foram realizados outros 4 ensaios, fixando-se a concentração de soro de leite em 18 % e variando a concentração de extrato de levedura em 30, 35, 40 e 45 g L^{-1} .

Figura 10 - Curva de contorno para a concentração de GSH produzida por *S. cerevisiae*.



A Tabela 17 apresenta os valores experimentais das concentrações de GSH e dos valores previstos pelo modelo, que foram validados pela ANOVA, bem como o desvio para cada ensaio do DCCR. Os desvios na região de interesse (pontos centrais) variaram de 0,2 a 2,8 %, demonstrando a repetitividade do processo.

Na Tabela 18, seguem os resultados referentes à concentração celular nos ensaios com variação da concentração de extrato de levedura. Através dos dados observa-se que a maior concentração celular ($20,42 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida no ensaio com 45 g L^{-1} de extrato de levedura e 18 % de soro de leite, sendo este estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) aos resultados obtidos nos demais ensaios. Com relação ao tempo de fermentação, o melhor resultado obtido em 96 h foi estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) aos demais resultados obtidos em outros tempos.

Tabela 17 – Valores experimentais e previstos por modelo matemático para GSH produzida por *S. cerevisiae*.

Ensaio	GSH experimental (mg L ⁻¹)	GSH prevista (mg L ⁻¹)	Desvio relativo (%)
1	214,92	177,54	17,4
2	272,49	276,90	-1,6
3	205,02	177,54	13,4
4	312,44	276,90	11,4
5	278,21	286,00	-2,8
6	285,54	286,00	-0,2
7	283,58	286,00	-0,9
8	62,97	99,09	-57,4
9	227,00	239,19	-5,4
10	276,07	286,00	-3,6
11	258,86	286,00	-10,5

Tabela 18 - Resultados da concentração celular nos ensaios com variação da concentração de extrato de levedura.

Extrato de levedura (g L ⁻¹)	Concentração celular* (g L ⁻¹)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
30	7,66 ± 0,31 ^{b,D}	14,62 ± 0,03 ^{a,C}	16,93 ± 0,13 ^{c,B}	18,19 ± 0,07 ^{c,A}
35	7,92 ± 0,17 ^{a,D}	13,33 ± 0,01 ^{a,C}	17,58 ± 0,03 ^{b,B}	19,07 ± 0,07 ^{c,A}
40	8,14 ± 0,06 ^{a,D}	14,64 ± 0,17 ^{a,C}	18,47 ± 0,07 ^{a,B}	20,14 ± 0,06 ^{b,A}
45	6,94 ± 0,14 ^{b,D}	13,99 ± 0,13 ^{a,C}	18,71 ± 0,21 ^{a,B}	20,42 ± 0,08 ^{a,A}

*± Desvio padrão.

Letras iguais e minúsculas na mesma coluna indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Letras diferentes e maiúsculas na mesma linha indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 19, estão apresentados os resultados de produção de GSH nos ensaios com variação da concentração de extrato de levedura. Observa-se que a maior concentração de GSH (329,84 mg L⁻¹) foi obtido após 72 h de fermentação no ensaio em que foram utilizados 40 g L⁻¹ de extrato de levedura e 18 % de soro de leite, sendo este, estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) aos valores obtidos nos demais ensaios em 72 h de fermentação. Ainda, comparando

os resultados deste ensaio, o melhor resultado de GSH ($329,84 \text{ mg L}^{-1}$) obtido em 72 h foi estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) ao resultado obtido em 96 h ($294,32 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabela 19 - Resultados da concentração de GSH nos ensaios com variação da concentração de extrato de levedura.

Extrato de levedura (g L^{-1})	Glutathiona* (mg L^{-1})			
	24 h	48 h	72 h	96 h
30	$35,67 \pm 0,4^{a,D}$	$181,66 \pm 0,3^{a,C}$	$257,35 \pm 0,4^{c,B}$	$277,47 \pm 0,3^{b,A}$
35	$34,86 \pm 0,3^{a,D}$	$163,79 \pm 0,2^{c,C}$	$286,71 \pm 0,2^{b,B}$	$292,46 \pm 0,4^{a,A}$
40	$33,20 \pm 0,3^{b,D}$	$168,34 \pm 0,2^{b,C}$	$329,84 \pm 0,4^{a,A}$	$294,32 \pm 0,3^{a,B}$
45	$33,03 \pm 0,4^{b,D}$	$158,05 \pm 0,3^{d,C}$	$286,28 \pm 0,3^{b,A}$	$280,78 \pm 0,4^{b,B}$

* \pm Desvio padrão.

Letras iguais e minúsculas na mesma coluna indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Letras diferentes e maiúsculas na mesma linha indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Observa-se através das Tabelas 18 e 19 que a maior concentração de extrato de levedura no meio de cultivo foi mais importante para a produção de biomassa do que a produção de GSH, visto que o melhor resultado de concentração celular foi obtido com 45 g L^{-1} de extrato de levedura, enquanto que o melhor resultado de GSH foi obtido com 40 g L^{-1} de extrato de levedura.

Comparando-se com os resultados de produção de GSH obtidos por outros autores em frasco Erlenmeyer com a mesma cepa de *S. cerevisiae* (ATCC 7754), pode-se afirmar que neste trabalho foram obtidos resultados satisfatórios.

Liu, Hwang e Liao (1999), estudando a otimização do meio para a produção de GSH, obtiveram a concentração máxima de $124,93 \text{ mg L}^{-1}$. Santos et al. (2007) estudando as condições de temperatura, agitação, pH inicial, concentração de inóculo e concentração de glicose para a produção de GSH, obtiveram após 72 h de fermentação $154,5 \text{ mg L}^{-1}$. Piedrahíta-Aguirre (2008) estudando a influência de meios proteicos (água de maceração de milho, extrato de levedura, lecitina e proteína do soro de leite) para a produção de GSH, obteve $278,42 \text{ mg L}^{-1}$ em 96 h de fermentação. Anschau et al. (2013) estudando a otimização do meio com água de maceração de milho e glicerol como fontes de carbono para a produção de GSH em frasco Erlenmeyer obtiveram $119,6 \text{ mg L}^{-1}$ após 72 h de fermentação. Todos estes estudos obtiveram concentrações menores que a máxima obtida neste estudo ($329,84 \text{ mg L}^{-1}$), obtida no ensaio com variação da concentração de extrato de levedura.

A elevada concentração de GSH obtida neste estudo comparado a outros autores, pode estar relacionado ao uso de soro de leite no meio de cultivo como fonte de proteína. De acordo com Kalman (2014) a proteína do soro de leite é constituída de diversos aminoácidos, dentre eles, cisteína, ácido glutâmico e glicina. Vários autores Anschau et al. (2010), Liu et al. (2004), Wen, Zhang e Tan, (2004), Wen, Zhang e Tan, (2005) e Wen, Zhang e Tan, (2006) comprovaram que a biossíntese de GSH requer além de ATP, os três aminoácidos precursores (cisteína, ácido glutâmico e glicina).

A partir dos resultados dos ensaios em frasco Erlenmeyer realizou-se os ensaios no fermentador de bancada com aplicação de CM, utilizando 40 g L⁻¹ de extrato de levedura e 18 % de soro de leite, com tempo total de fermentação de 72 h.

4.3 ENSAIOS EM FERMENTADOR DE BANCADA COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

Os ensaios em fermentador de bancada com aplicação de CM foram realizados a partir do melhor resultado obtido para a produção de GSH em frasco Erlenmeyer, utilizando 40 g L⁻¹ de extrato de levedura e 18 % de soro de leite, como fonte proteica no meio de fermentação.

Nestes ensaios com aplicação de CM, o meio de cultivo foi circulado através de três pares de ímãs nos quais a intensidade de CM média gerada foi 31,7 mT, sendo realizado 3 fermentações variando o tempo de fermentação no qual foi aplicado o CM: de 0 a 24 h, de 24 a 48 h e de 48 a 72 h de fermentação.

Na Tabela 27 (apêndice) e na Figura 11 estão apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose obtidos durante a fermentação controle (sem aplicação de CM), mas com circulação do meio de cultivo através da bomba peristáltica. Em relação ao crescimento celular, observa-se que a maior concentração foi obtida em 72 h, com 22,48 g L⁻¹. O pH após 72 h chegou a 6,27, sendo sua variação ao longo da fermentação entre 4,3 a 6,3. Entre 32 e 48 h de fermentação, a glicose foi totalmente consumida. A produção de GSH atingindo seu valor máximo em 72 h, com 349,70 mg L⁻¹.

Na Tabela 28 (apêndice) e na Figura 12 estão apresentados os resultados obtidos durante a aplicação de CM nas primeiras 24 h de fermentação. Nesta condição o pH atingiu 6,8 em 72 h, sendo sua variação de 4,36 a 6,78. A glicose foi consumida mais rapidamente em relação ao experimento controle, entre 28 e 32 h de fermentação. A aplicação de CM pode alterar o fluxo de íons através da membrana plasmática e mudar a conformação das

biomembranas, aumentando a atividade metabólica, devido ao maior consumo de energia para o transporte de moléculas ao interior da célula e, conseqüentemente, aumentando o consumo de substrato pela levedura. As máximas concentrações celular e de GSH foram obtidas em 72 h, com 25,20 g L⁻¹ e 393,40 mg L⁻¹, respectivamente.

Figura 11 - Fermentação controle (sem aplicação de CM) para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.

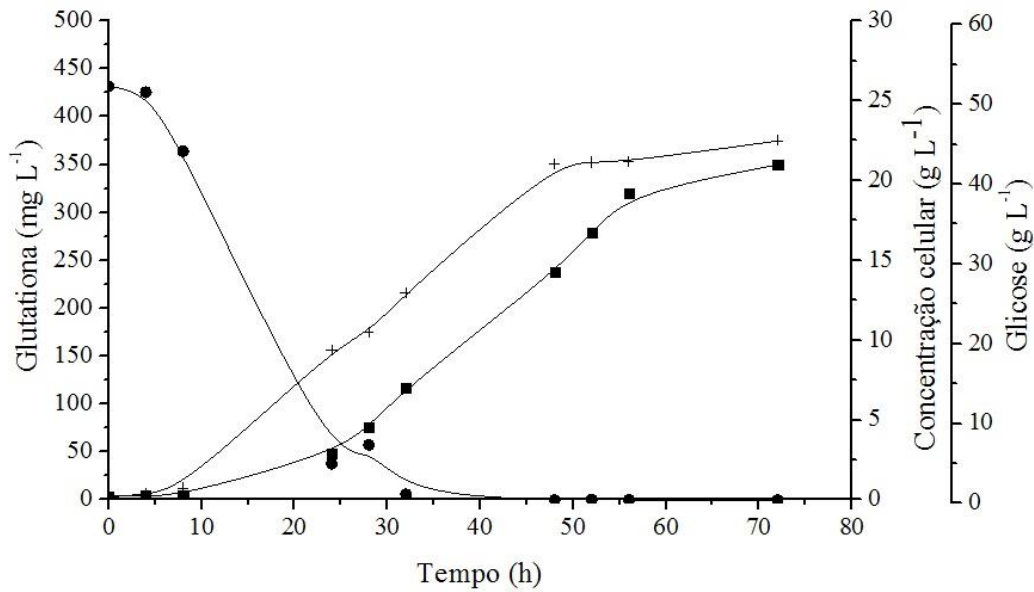
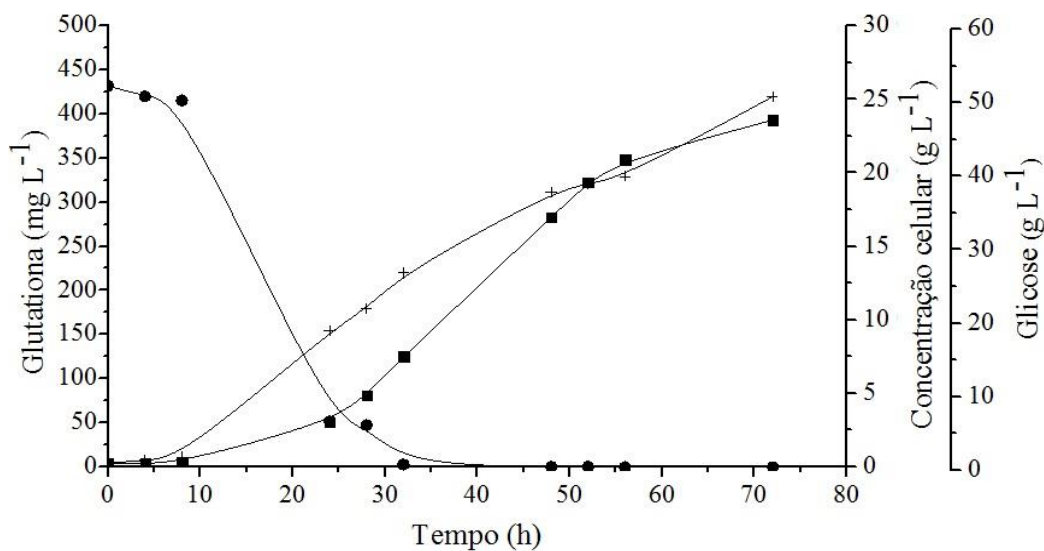


Figura 12 - Ensaio com aplicação de CM nas primeiras 24 h de fermentação para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.

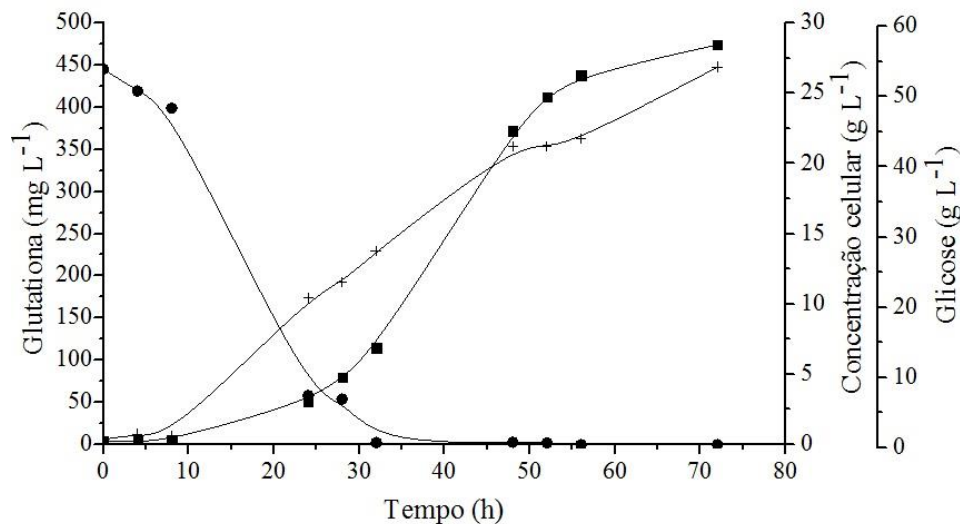


Motta et al. (2004) avaliaram a aplicação de CM de 220 mT durante 24 h na fermentação alcoólica com *S. cerevisiae* DAUFPE-1012. Nos ensaios com aplicação de CM foi observado que a glicose foi totalmente consumida até o final da fermentação, de modo que o consumo foi 1,3 vezes mais rápido em relação ao ensaio controle (sem aplicação de CM).

Berlot et al. (2013) estudaram a influência da aplicação de CM de 140 mT em inóculo de *S. cerevisiae* com subseqüente fermentação do mosto de uva. Os autores também observaram o consumo de glicose mais rápido, em relação ao ensaio controle.

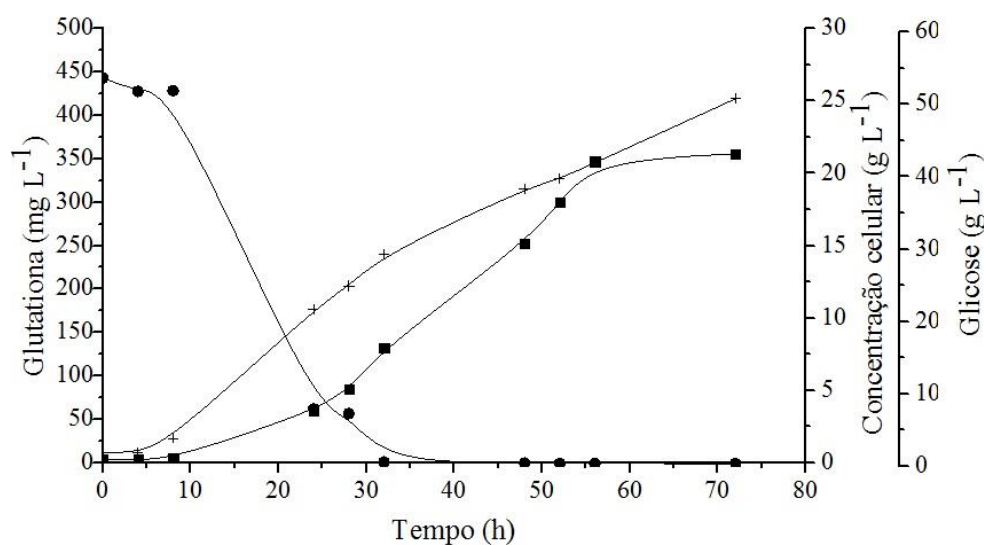
Na Tabela 29 (apêndice) e na Figura 13 pode-se analisar os resultados da concentração celular, GSH e glicose durante a fermentação com aplicação de CM no período de 24 a 48 h. Observa-se através dos dados que o pH comportou-se de forma semelhante aos ensaios anteriores, chegando a 6,50 após 72 h. A glicose foi consumida em até 32 h. O crescimento da levedura e a concentração de GSH foram maiores em relação aos demais ensaios, chegando ao máximo em 72 h de fermentação com 26,86 g L⁻¹ e 474,42 mg L⁻¹ em 72 h, respectivamente.

Figura 13 - Ensaio com aplicação de CM entre 24 e 48 h de fermentação para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.



Na Tabela 30 (apêndice) e na Figura 14 são apresentados os resultados da concentração celular, GSH e glicose do ensaio com aplicação de CM no período de 48 a 72 h de fermentação. Nesta condição o pH variou de 4,40 a 7,31 e o substrato foi consumido entre 28 e 32 h, semelhante comportamento em relação aos demais ensaios com aplicação de CM. A máxima concentração celular e de GSH foram obtidas em 72 h com 25,15 g L⁻¹ e 355,91 mg L⁻¹, respectivamente.

Figura 14 - Ensaio com aplicação de CM entre 48 e 72 h de fermentação para a produção de GSH por *S. cerevisiae*: (■) glutatona, (+) concentração celular e (●) glicose.



Nas Figuras 11, 12, 13 e 14 verificou-se que a levedura comportou-se de forma semelhante. Em todos os ensaios as máximas concentrações celular e de GSH foram obtidas em 72 h de fermentação. Izawa et al. (1995) e Suzuki et al. (1999) relataram que a maior produção de GSH ocorre na fase estacionária de crescimento celular. Esse fato foi confirmado neste estudo. Nas Figuras 11, 12, 13 e 14 observa-se que o açúcar foi completamente consumido em até 48 h de fermentação, após este período ocorreu maior produção de GSH. Segundo Dong et al. (2007) a redução de nutrientes causa estresse na célula, induzindo a mudanças no metabolismo e ao acúmulo de algumas moléculas protetoras, tais como a GSH. Para o pH foi observado, em todos os ensaios, queda em relação ao pH inicial até 24 h de fermentação, após este período houve aumento crescente até o final do processo. A diminuição do pH nas primeiras 24 h pode ser decorrente do consumo de açúcar para a produção de outro composto que não foi avaliado neste trabalho, tal como o CO₂, que em solução aquosa provoca acidificação do meio.

Após as 24 h de fermentação, praticamente não havia mais açúcar no meio de cultivo para a levedura produzir CO₂ acarretando na redução do mesmo e conseqüentemente o aumento do pH até o final do processo.

A Tabela 20 apresenta os resultados de concentração celular e da produção de GSH após 72 h de fermentação do ensaio controle e dos ensaios com aplicação de CM de 31,7 mT.

Tabela 20 - Resultados da concentração celular e de GSH produzida por *S. cerevisiae* para os ensaios com aplicação de CM de 31,7 mT e para o ensaio controle após 72 h.

Ensaio	Concentração celular* (g L ⁻¹)	Glutaciona* (mg L ⁻¹)
Controle	22,48 ^c ± 0,25	349,70 ^c ± 2,40
0-24 h de CM	25,20 ^b ± 0,31	393,40 ^b ± 0,84
24-48 h de CM	26,86 ^a ± 0,51	474,42 ^a ± 2,01
48-72 h de CM	25,15 ^b ± 0,21	355,91 ^c ± 0,39

*± Desvio padrão

Letras diferentes e na mesma coluna indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Através dos resultados apresentados na Tabela 20, verificou-se que a maior concentração celular (26,86 g L⁻¹) e de GSH (474,42 mg L⁻¹) foram obtidas no ensaio com aplicação de CM no período de 24 a 48 h de fermentação, com aumento de 19,5 e 35,7 %, respectivamente em relação ao ensaio controle. Sendo estes estatisticamente diferentes em relação aos demais ensaios a um nível de 95 % de confiança.

Vários estudos mostram que os CM influenciam os processos metabólicos de sistemas biológicos. Neste estudo, entre 24 e 48 h de fermentação, provavelmente a levedura estava em fase exponencial de crescimento. Nessa fase, foi observada maior atividade metabólica da célula, mostrando ser mais vantajoso aplicar os CM neste período de crescimento celular.

Os valores de GSH (%) para os ensaios em fermentador de bancada são mostrados na Tabela 21. Com relação ao conteúdo de GSH na célula, o melhor resultado (1,8 %) foi encontrado após 48 h de fermentação, permanecendo até 72 h no ensaio em que o CM foi aplicado no período de 24 a 48 h, sendo este estatisticamente diferente aos demais ensaios no tempo de 48 e 72 h a um nível de 95 % de confiança.

Os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/X}$), substrato em célula ($Y_{X/S}$) e célula em produto ($Y_{P/X}$) para os ensaios em fermentador de bancada são mostrados na Tabela 22. Observa-se que a aplicação de CM entre 24 e 48 h de fermentação promoveu maiores conversões de substrato em produto (8,80 mg_{GSH} g_{glic}⁻¹), substrato em célula (0,50 g_{cél} g_{glic}⁻¹) e célula em produto (17,76 mg_{GSH} g_{cél}⁻¹), sendo estes valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) aos demais ensaios, com exceção da conversão de substrato em célula, que foi igual ao obtido no ensaio com aplicação de CM entre 0 e 24 h de fermentação.

Tabela 21 - GSH (%) produzida por *S. cerevisiae* para os ensaios com aplicação de CM e para o ensaio controle.

Ensaio	Glutaciona* (%)		
	24 h	48 h	72 h
Controle	0,5 ± 0,00 ^b	1,1 ± 0,02 ^d	1,6 ± 0,01 ^b
0-24 h de CM	0,5 ± 0,00 ^b	1,5 ± 0,01 ^b	1,6 ± 0,02 ^b
24-48 h de CM	0,5 ± 0,01 ^b	1,8 ± 0,04 ^a	1,8 ± 0,03 ^a
48-72 h de CM	0,6 ± 0,00 ^a	1,3 ± 0,01 ^c	1,4 ± 0,01 ^c

*± Desvio padrão

Letras diferentes e na mesma coluna indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

Tabela 22 - Fatores de conversão para os ensaios com aplicação de CM e para o ensaio controle.

Ensaio	Fatores de conversão*		
	Y _{P/S} (mgGSH g _{glic} ⁻¹)	Y _{X/S} (g _{cél} g _{glic} ⁻¹)	Y _{P/X} (mgGSH g _{cél} ⁻¹)
Controle	6,68 ± 0,15 ^c	0,43 ± 0,01 ^c	15,51 ± 0,07 ^b
0-24 h de CM	7,50 ± 0,02 ^b	0,48 ± 0,01 ^{ab}	15,62 ± 0,23 ^b
24-48 h de CM	8,80 ± 0,00 ^a	0,50 ± 0,01 ^a	17,76 ± 0,26 ^a
48-72 h de CM	6,61 ± 0,09 ^c	0,46 ± 0,00 ^b	14,41 ± 0,12 ^c

*± Desvio padrão

Letras diferentes e na mesma coluna indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$).

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. Pois segundo Blank (1993) a aplicação de CM é interpretada como um estresse pela célula.

A Tabela 23 mostra os valores de produtividade celular ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) e produtividade em GSH ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) obtidos nos ensaios em fermentador de bancada. De acordo com os resultados apresentados, verificou-se que a maior produtividade celular ocorreu no tempo de 48 h, com exceção do ensaio em que o CM foi aplicado no período entre 48 e 72 h de fermentação, onde a maior produtividade foi em 24 h, indicando que o CM diminuiu o crescimento celular. Em relação a produtividade em GSH, os melhores resultados também foram observados no tempo de 48 h em todos os ensaios, demonstrando que a produção de GSH é mais rápida quando praticamente não há mais açúcar no meio de cultivo.

Tabela 23 - Produtividade celular e produtividade em GSH para os ensaios com aplicação de CM e para o ensaio controle.

Ensaio	Produtividade celular* (g L ⁻¹ h ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
Controle	0,39 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,31 ± 0,00
0-24 h de CM	0,37 ± 0,00	0,38 ± 0,00	0,35 ± 0,00
24-48 h de CM	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,37 ± 0,01
48-72 h de CM	0,41 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,34 ± 0,00
Ensaio	Produtividade em GSH* (mg L ⁻¹ h ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
Controle	1,87 ± 0,02	4,88 ± 0,01	4,81 ± 0,03
0-24 h de CM	1,93 ± 0,00	5,81 ± 0,02	5,41 ± 0,01
24-48 h de CM	1,98 ± 0,00	7,67 ± 0,00	6,54 ± 0,03
48-72 h de CM	2,32 ± 0,02	5,19 ± 0,02	4,89 ± 0,01

*± Desvio padrão

A Tabela 24 apresenta os resultados de diferença de concentração celular e de produção de GSH, calculado através das Equações 9 e 10, que relaciona a concentração celular e de GSH do ensaio controle com os ensaios com aplicação de CM. Observa-se que a aplicação de CM de 31,7 mT promoveu efeito estimulante, tanto no crescimento celular quanto na produção de GSH em todas as condições estudadas. A maior estimulação foi verificada no ensaio com aplicação de CM no período de 24 a 48 h de fermentação, representando aumento de 19,5 e 35,7 %, respectivamente, em relação ao ensaio controle (sem aplicação de CM). Observa-se ainda que no ensaio com CM aplicados entre 48 e 72 h, o estímulo foi muito inferior aos demais ensaios (1,8 %) para a produção de GSH. Nesta fase, provavelmente a levedura estava em fase estacionária, fase em que a taxa de morte se iguala a taxa de crescimento, mostrando que a levedura não é estimulada a produzir GSH, quando esta é exposta durante este período.

A GSH é um tripeptídeo que tem como principal função, atuar como antioxidante contra os efeitos dos radicais livres e outros compostos oxidantes. Segundo Santos (2008) a aplicação de CM pode gerar radicais livres na levedura, ativando os mecanismos de defesa da levedura, como a produção de GSH. Isto pode ser uma das explicações para os efeitos estimulantes observados em todos os ensaios.

Tabela 24 - Diferença de concentração celular (PDX %) e diferença da produção de GSH (PDP %) para os ensaios com aplicação de CM após 72h.

Ensaio	PDX (%)*	PDP (%)*
0-24 h de CM	+ 12,1	+ 12,5
24-48 h de CM	+ 19,5	+ 35,7
48-72 h de CM	+ 11,9	+ 1,8

*(+) efeito estimulante.

O número de parâmetros que influenciam os processos fermentativos com aplicação de CM, tais como intensidade do CM, frequência, tempo de exposição, tipo de célula, temperatura e estado biológico da célula pode estar relacionado com a discordância dos resultados obtidos nos estudos realizados com aplicação de CM em sistemas biológicos, enfatizando a grande importância de estudar as diferentes condições de aplicação de CM, bem como controlar os parâmetros acima citados, para maior eficiência dos processos biotecnológicos.

Barboza (2002) utilizando *S. cerevisiae* comercial cultivadas em placa de petri com intensidade magnética de 31 mT e tempo de exposição de 30 h, semelhante as condições deste estudo, obteve resposta negativa quanto ao desenvolvimento da levedura, chegando a 30 % de inibição. Muniz et al. (2007) observaram que a aplicação de 220 mT no cultivo de *S. cerevisiae* DAUFPE-1012 promoveu aumento da concentração celular em 2,5 vezes, em relação ao experimento controle. Novak 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 frasco Erlenmeyer. Deutmeyer et al. (2011) observaram aumento de 8 % da concentração de *S. cerevisiae* ATCC 24859 quando esta foi exposta a CM de 200 mT durante 30 h. Berlot et al. (2013) aplicando CM de 140 mT durante 72 h no cultivo de *S. cerevisiae* CH-6300 ZUG observaram aumento da concentração celular de 27,7 % em relação ao experimento controle.

Neste estudo a aplicação de CM promoveu efeito estimulante em todas as condições estudadas, tanto para a concentração celular, quanto para a produção de GSH por *S. cerevisiae*.

Na literatura, apenas dois trabalhos relataram a aplicação de CM para a produção de GSH por fermentação. Santos et al. (2010) avaliaram a aplicação de CM gerados por bobina (25 mT por 16 h) durante o cultivo de *S. cerevisiae* ATCC 7754 obtendo concentração celular e de GSH de 16,26 g L⁻¹ e 340 mg L⁻¹, respectivamente. Santos et al. (2012) estudaram o efeito de CM gerados por ímãs para produção de GSH por *S. cerevisiae* ATCC 7754 em fermentador

de bancada com reciclo celular, sendo utilizado intensidade de CM de 20 mT, avaliando-se o tempo de exposição durante as primeiras 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados mostraram que a exposição durante 72 h promoveu a obtenção de concentração celular de 19,5 g L⁻¹ e de GSH de 271,9 mg L⁻¹, correspondendo a um incremento de 2,63 e 32,1 % em relação ao experimento controle, respectivamente. Estes resultados foram inferiores ao melhor resultado de concentração celular e de produção de GSH obtido no presente estudo, com 26,86 g L⁻¹ e 474,42 mg L⁻¹, respectivamente. Neste estudo foi utilizado soro de leite como substrato proteico no meio de cultivo, o que pode ter influenciado a maior produção de GSH, visto que em sua composição há os três aminoácidos precursores de GSH (cisteína, ácido glutâmico e glicina).

A vantagem da aplicação de CM com ímãs é o reciclo celular, pois este sistema torna mais fácil o *scale up*. Segundo Alvarez et al. (2006) vários dispositivos geradores de CM têm sido desenvolvidos para estudar o efeito de CM em sistemas biológicos, porém, a aplicação em escala industrial é dificultado devido a seus elevados custos, uma vez que foram produzidos para cobrir a totalidade ou grande parte do fermentador. Neste estudo foi utilizado um sistema de reciclo celular com auxílio de uma bomba peristáltica, para a circulação do meio entre pares de ímãs. Desse modo, poderia ser facilmente implementado em escala industrial.

Os resultados deste estudo demonstraram que os CM influenciaram positivamente na concentração celular e na produção de GSH. Ainda é escasso o número de trabalhos que relatam a aplicação de CM durante a produção de GSH por fermentação, sendo necessárias mais pesquisas relacionadas ao tema.

5. CONCLUSÃO

Nos frascos Erlenmeyer foi encontrada a melhor concentração dos substratos proteicos (extrato de levedura e soro de leite) no meio de cultivo. Pode-se concluir que o enriquecimento do meio de cultivo com soro de leite, como substrato proteico, proporcionou resultados satisfatórios para a produção de GSH, utilizando-se 40 g L^{-1} de extrato de levedura e 18 % de soro de leite.

No fermentador de bancada foi avaliada a influência do CM gerado por ímãs na produção de GSH por *S. cerevisiae* e encontrada o melhor período da fermentação, para a aplicação de CM. Conclui-se que a levedura sofre influência positiva na concentração celular e na produção de GSH com a aplicação de CM de 31,7 mT e que o melhor período de aplicação foi após a adaptação da célula no meio e antes da fase estacionária.

6. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Fazer aumento de escala para produzir GSH por *S. cerevisiae* com aplicação de CM;
- Avaliar o efeito dos CM na célula de *S. cerevisiae* através de expressão gênica;
- Estudar outras concentrações de aminoácidos para a produção de GSH por *S. cerevisiae*;
- Realizar ensaios toxicológicos na GSH obtida por processo fermentativo, para aplicação em alimentos;
- Estudar a influência de CM em outros micro-organismos produtores de GSH;
- Estudar as condições de cultivo com o meio de fermentação deste estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, L.; ISAR, J.; MEGHWANSHI, G. K.; SAXENA, R. K. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1348-1354, 2006.
- AGGELOPOULOS, T.; KATSIERIS, K.; BEKATOROU, A.; PANDEY, A.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food Chemistry**, v. 145, p. 710-716, 2014.
- 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, p. 538-540, 1992.
- ALVAREZ, D. C.; PÉREZ, V. H.; JUSTO, O. R.; ALEGRE, R. M. Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1967-1973, 2006.
- ANSCHAU, A. **Produção de glutathione utilizando subprodutos industriais em processos de batelada simples e batelada alimentada**. 2010. 158f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ANSCHAU, A.; SANTOS, L. O.; COELHO, R.; MONTE-ALEGRE, R. Effect of amino acids addition and fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 for glutathione production. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 392, 2010.
- ANSCHAU, A.; SANTOS, L. O.; MONTE-ALEGRE, R. A cost effective fermentative production of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae* with cane molasses and glycerol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 849-857, 2013.
- AOAC. **Official methods of analysis**. 17 ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000.
- ARIYANTI, D.; HADIYANTO, H. Ethanol production from whey by *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation system: kinetics parameters estimation. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering e Catalysis**, v. 7, p. 179-184, 2013.
- 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, p. 561-566, 1986.
- 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.
- BERLOT, M.; REHAR, T.; FEFER, D.; BEROVIC, M. The influence of treatment of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum with a magnetic field on subsequent grape must fermentation. **Chemical Biochemical Engineering**, v. 27, p. 423-429, 2013.

BLANK, M. Biological effects of electromagnetic fields. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 32, p. 203-210, 1993.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149-161, 2015.

CANLI, O.; ERDAL, S.; TASKIN, M.; KURBANOGLU, E. B. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, p. 35-39, 2011.

CANLI, O.; KURBANOGLU, E. B. Application of low magnetic field on inulinase production by *Geotrichum candidum* under solid state fermentation using leek as substrate. **Toxicology and Industrial Health**, p. 1-7, 2011.

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

CHAMPAGNE, C. P.; GOULET, J. Growth of Bakers' Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in lactose-hydrolyzed cheese whey ultrafiltrate. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 21, p. 545-548, 1988.

DEUTMEYER, A.; RAMAN, R.; MURPHY, P.; PANDEY, S. Effect of magnetic field on the fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 207-213, 2011.

DINI, L.; ABRRO, L. Bioeffects of moderate intensity static magnetic field on cell cultures. **Micron**, v. 36, p. 196-217, 2005.

DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 226-230, 2007.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 649-671, 2000.

EL HOSRY, L.; AUEZOVA, L.; SAKR, A.; HAJJ-MOUSSA, E. Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2459-2463, 2009.

FAHEY, R. C.; BROWN, W. C.; ADAMS, W. B.; WORSHAM, M. B. Occurrence of glutathione in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 133, p. 1126-1129, 1978.

FAN, X.; HE, X.; GUO, X.; QU, N.; WANG, C.; ZHANG, B. Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 5, p.415-417, 2004.

FILIPIC, J.; KRAIGHER, B.; TEPUS, B.; KOKOL, V.; MANDIC-MULEC, I. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 225-232, 2012.

FOJT, L.; STRASÁK, L.; VETTERL, V.; SMARDA, J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Lecleria adecarboxilata* and *Staphylococcus aureus*. **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 337-341, 2004.

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, p. 285-287, 1998.

GABARDO, S.; PEREIRA, G. F.; KLEIN, M. P.; RECH, R.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 141-150, 2016.

GAO, M.; ZHANG, J.; FENG, H. extremely low frequency magnetic field effects on metabolite of *Aspergillus niger*. **Bioelectromagnetics**, v. 32, p.73-78, 2011.

GONÇALVES, I. M. **Influência de campos magnéticos na produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator “air-lift” pressurizado**. 2012. 86f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

GOTOH, T.; IGUCHI, H.; KIKUCHI, K. Separation of glutathione and its related amino acids by nanofiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 165-170, 2004.

GOUD, K. G.; CHAITANYA, K.; REDDY, G. Enhanced production of β -D-fructofuranosidase by *Saccharomyces cerevisiae* using agro-industrial wastes as substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 385-392, 2013.

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, p. 511-515, 1996.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010.

HARA, K. Y.; KIM, S.; YOSHIDA, H.; KIRIYAMA, K.; KONDO, T.; OKAI, N.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Development of a glutathione production process from proteinaceous biomass resources using protease-displaying *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1495-1502, 2012.

HARAGUCHI F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição propriedades funcionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista Brasileira de Nutrição**, v. 19, p. 479-488, 2006.

HRISTOV, J.; PEREZ, V. H. Critical analysis of data concerning *Saccharomyces cerevisiae* free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields. **International Review of Chemical Engineering**, v. 3, p. 1-18, 2011.

HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 497-507, 2002.

ILLANES, A. **Biotecnología de enzimas**. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 368, p.73- 76, 1995.

JELLEN, P.; ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. Whey processing. **Encyclopedia of dairy sciences**, v. 4. London: Academic Press, p. 2739-2751, 2003.

JIANG, Y. M.; FU, J. R. Inhibition of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. **Food Chemistry**, v. 62, p. 49-52, 1998.

KALMAN, D. S. Amino acid composition of an organic brown rice protein concentrate and isolate compared to soy and whey concentrates and isolates. **Foods**, v. 3, p. 394-402, 2014.

LI, Y.; HUGENHOLTZ, J.; ABEE, T.; MOLENAAR, D. Glutathione Protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5739-5745, 2003.

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

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

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, p. 19-25, 2004.

LIN, J.; LIAO, X.; DU, G.; CHEN, J. Enhancement of glutathione production in a coupled system of adenosine deaminase-deficient recombinant *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 269-273, 2009.

LIU, C.; HWANG, C.; LIAO, C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 17-23, 1999.

LIU, H.; LIN, J. P.; CEN, P. L.; PAN, Y. J. Co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione from spent brewer's yeast cells. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1993-1997, 2004.

MACCARONE, E.; MACCARONE, A.; RAPISARDA, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 901-904, 1985.

MEHEDINTU, M.; BERG, H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, p. 67- 70, 1997.

MEISEL, H. AND BOCKELMANN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 207-215, 1999.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MONTOYA, J. E. Z.; RAMÍREZ, M. H.; OSPINA, G. M. Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de *Saccharomyces cerevisiae*. **Interciencia**, v. 30, p. 409-413, 2005.

MOTTA, M. A.; MONTENEGRO, E. J.; STAMFORD, T. L.; SILVA, A. R.; SILVA, F. R. Changes in *Saccharomyces cerevisiae* development induced by magnetic fields. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 970-973, 2001.

MOTTA, M. A. MUNIZ, J. B. F.; SCHULER, A.; MOTTA, M. Static Magnetic Fields Enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* Ethanolic Fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 393-396, 2004.

MUNIZ, J. B. N. F. **Influência da ação de campos magnéticos estáticos, não homogêneos, na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. 76f. Dissertação (Mestre em Biofísica) – Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MUNIZ, J. B.; MARCELINO, M.; MOTTA, M.; SCHULER, A.; MOTTA, M. A. Influence of static magnetic fields on *Saccharomyces cerevisiae* biomass growth. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 515-520, 2007.

MUSATTI, A.; DEVESA, V.; CALATAYUD, M.; VÉLEZ, D.; MANZONI, M.; ROLLINI, M. Glutathione-enriched baker's yeast: production, bioaccessibility and intestinal transport assays. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 304-313, 2013.

MUSATTI, A.; MANZONI, M.; ROLLINI, M. Post-fermentative production of glutathione by baker's yeast (*S. cerevisiae*) in compressed and dried forms. **New Biotechnology**, v. 30, p. 219-226, 2013.

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, p. 378-384, 2005.

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

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.

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, p. 87-94, 2008.

OWENS, C. W. I.; BELCHER, R. V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. **Biochemical Journal**, v. 94, p. 705-711, 1965.

- PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V. Obtenção de concentrados proteicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentação e Nutrição**, v. 20, p. 231-239, 2009.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.
- PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.
- PICHKO, V. B.; POVALYAEVA, I. V. Electromagnetic stimulation of microorganism productivity: possible mechanisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 32, p. 425-428, 1996.
- PIEDRAHÍTA-AGUIRRE, C. A. **Estudo da produção de glutathione por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em meios proteicos de baixo custo**. 2008. 56f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X.; Review: technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Science and Technology International**, v.7, p. 105-116, 2001.
- 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, p. 737-742, 2000.
- 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, p. 1091-1094, 2007.
- REPACHOLI, M. H.; GREENBAUM, B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. **Bioelectromagnetics**, v. 20, p. 133-160, 1999.
- 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, p. 267-272, 2008.
- ROLLINI, M. PAGANI, H.; RIBOLDI, S.; MANZONI, M. Influence of carbon source on glutathione accumulation in methylotrophic yeasts. **Annals of Microbiology**, v. 55, p.199-203, 2005
- ROLLINI, M.; MANZONI, M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1501-1505, 2006.
- ROLLINI, M.; MUSATTI, A.; MANZONI, M. Production of glutathione in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 441-445, 2010.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona 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, p. 151-155, 2004.

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, p. 763-769, 2007.

SANTOS, L. O. **Estudo da produção de glutathiona a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações**. 2008. 140f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

SANTOS, L. O.; GONZALES, T. A.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 921-926, 2012.

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.

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.

SILVA, C. A.; GOMES, J. P.; SILVA, F. L. H.; MELO, E. S. R. L.; CALDA, M. C. S. Utilização de soro de leite na elaboração de pães: estudo da qualidade sensorial. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, p.355-362, 2011.

SOUPIONI, M.; GOLFINOPOULOS, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Study of whey fermentation by kefir immobilized on low cost supports using ¹⁴C-labelled lactose. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 326-330, 2013.

SOARES, C. D. M. **Avaliação do leite de cabra cru, cru congelado, queijo minas frescal e do soro por diferentes períodos de tempo**. 2014. 72f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

STEWART, P. R. In: PRESCOTT, D. M. **Methods in Cell Biology**. v. 12. London and New York: Academic Press, p.111-147, 1982.

STRASÁK, L.; VETTERL, V.; SMARDA, J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. **Bioelectrochemistry**, v. 55, p. 161-164, 2002.

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

TASKIN, M. A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine- and glycine-rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 535-541, 2013.

TREVISOL, E. T. V.; PANEK, A. D.; MANNARINO, S. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 697-704, 2011.

VERSTRAETE, W.; VERMEIRSSSEN, V.; VAN CAMP, J.; DECROOS, K.; VAN WIJMELBEKE. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 429-438, 2003.

XIA, Z. Q. Anti-browning of mushroom (*Agaricus bisporus*) slices by glutathione during hot air drying. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 5, p. 1100-1104, 2013.

XIONG, Z. Q.; GUO, M. J.; CHU, J. ZHUANG, Y. P.; ZHANG, S. L. *On-line* specific growth rate control for improving reduced glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, p. 887-893, 2015.

WANG, Z.; TAN, T.; SONG, J. Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 108-111, 2007.

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

WHANG, M.; SUN, J.; XUE, F.; SHANG, F.; WHANG, Z.; TAN, T. The effect of intracellular amino acids on GSH production by high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 198-205, 2012.

WANG, C.; ZHANG, J.; WU, H.; LI, ZHIMIN; YE, QIN. Heterologous gshF gene expression in various vector systems in *Escherichia coli* for enhanced glutathione production. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 63-68, 2015.

WEBBER, V.; DUTRA, S. V.; SPINELLI, F. R.; MARCON, A. R.; CARNIELI, G. J.; VANDERLINDE, R. Effect of glutathione addition in sparkling wine. **Food Chemistry**, v. 159, p. 391-398, 2014.

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

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

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

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, p. 2424-2428, 2006.

WU, S. J. Inhibition of enzymatic browning of the meat of *Clanis bilineata* (Lepidoptera) by glutathione. **Food Science and Technology Research**, v. 19, p. 347-352, 2013.

WU, S. Glutathione suppresses the enzymatic and non-enzymatic browning in grape juice. **Food Chemistry**, v. 160, p. 8-10, 2014.

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

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

ZHANG, J.; ZHOU, K.; WANG, L.; GAO, M. Extremely low frequency magnetic fields affect pigment production of *Monascus purpureus* in liquid state fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 238, p. 157-162, 2014.

ZHAO, Y.; BIAN, X.; YOU, X.; SHAO, F.; XIANG, X.; DENG, X.; ZHAO, G.; XU, J. Nystatin-enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* depends on γ - glutamylcysteine synthase activity and K⁺. **Engineering In Life Sciences**, v. 13, p. 156-162, 2013.

8. APÊNDICES

Tabela 25 - Resultados da concentração celular obtidos nos ensaios do planejamento experimental em frasco Erlenmeyer.

Ensaio	Concentração celular* (g L ⁻¹)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	0,01 ± 0,2	8,76 ± 0,2	8,37 ± 0,3	8,15 ± 0,4	10,25 ± 0,8
2	0,11 ± 0,2	5,97 ± 0,3	9,66 ± 0,1	12,95 ± 0,2	15,87 ± 0,1
3	0,01 ± 0,3	9,81 ± 0,2	9,37 ± 0,2	10,50 ± 0,4	10,78 ± 0,5
4	0,01 ± 0,2	5,97 ± 0,3	11,06 ± 0,3	15,62 ± 0,2	17,29 ± 0,2
5	0,01 ± 0,4	6,28 ± 0,4	10,69 ± 0,2	13,85 ± 0,3	14,35 ± 0,1
6	0,07 ± 0,4	6,73 ± 0,1	9,43 ± 0,2	13,44 ± 0,9	13,56 ± 0,3
7	0,15 ± 0,2	6,79 ± 0,2	8,82 ± 0,3	13,58 ± 0,3	12,95 ± 0,2
8	0,09 ± 0,6	6,30 ± 0,4	6,93 ± 0,2	7,24 ± 0,2	5,90 ± 0,4
9	0,06 ± 0,1	6,41 ± 0,4	9,73 ± 0,3	13,68 ± 0,3	13,12 ± 0,2
10	0,03 ± 0,1	6,91 ± 0,4	11,07 ± 0,3	12,64 ± 0,2	13,23 ± 0,3
11	0,09 ± 0,1	7,12 ± 0,3	11,21 ± 0,2	14,76 ± 0,2	15,67 ± 0,2

*± Desvio padrão.

Tabela 26 - Resultados da concentração de GSH obtidos nos ensaios do planejamento experimental, em frasco Erlenmeyer.

Ensaio	Glutathiona* (mg L ⁻¹)				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
1	3,80 ± 0,3	91,76 ± 0,8	145,65 ± 0,4	152,83 ± 0,6	214,92 ± 0,7
2	4,15 ± 0,7	28,28 ± 0,4	126,21 ± 0,4	220,36 ± 0,7	272,49 ± 0,4
3	4,03 ± 0,3	92,90 ± 0,4	144,17 ± 0,6	211,01 ± 0,4	205,02 ± 0,3
4	3,36 ± 0,3	38,35 ± 0,1	163,48 ± 0,9	291,16 ± 1,5	312,44 ± 0,3
5	3,28 ± 0,5	38,35 ± 0,6	172,23 ± 0,6	284,25 ± 0,7	278,21 ± 0,4
6	3,38 ± 0,8	32,64 ± 0,9	151,75 ± 0,8	250,57 ± 0,5	285,54 ± 0,6
7	1,59 ± 0,3	50,92 ± 0,1	147,29 ± 0,2	245,24 ± 0,3	283,58 ± 0,6
8	2,17 ± 1,0	20,62 ± 0,7	-	76,62 ± 0,4	62,97 ± 0,9
9	3,97 ± 0,8	37,61 ± 0,8	119,96 ± 0,5	206,43 ± 0,6	227,00 ± 0,3
10	1,56 ± 0,5	39,78 ± 0,1	169,44 ± 0,2	244,15 ± 0,7	276,07 ± 0,3
11	1,34 ± 0,3	37,54 ± 0,5	151,03 ± 0,5	286,02 ± 0,3	258,86 ± 0,3

* ± Desvio padrão.

Tabela 27 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada sem aplicação de CM.

Tempo (h)	pH	Concentração celular* (g L ⁻¹)	Concentração de GSH* (mg L ⁻¹)	Concentração de glicose* (g L ⁻¹)
0	5,0	0,16 ± 0,00	3,46 ± 0,03	52,24 ± 0,02
4	5,0	0,35 ± 0,21	3,91 ± 0,25	51,52 ± 0,00
8	4,9	0,73 ± 0,18	4,93 ± 0,24	44,11 ± 0,02
24	4,3	9,40 ± 0,06	48,44 ± 0,38	4,93 ± 0,01
28	5,1	10,49 ± 0,21	76,11 ± 0,16	7,30 ± 0,00
32	5,4	12,96 ± 0,42	116,98 ± 0,13	1,14 ± 0,00
48	6,1	21,04 ± 0,31	237,82 ± 0,36	0,42 ± 0,00
52	6,1	21,14 ± 0,11	278,96 ± 0,92	0,45 ± 0,00
56	6,3	21,21 ± 0,21	319,93 ± 0,71	0,42 ± 0,00
72	6,3	22,48 ± 0,25	349,70 ± 2,40	0,42 ± 0,01

*± Desvio padrão

Tabela 28 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada com aplicação de CM entre 0 a 24 h de fermentação.

Tempo (h)	pH	Concentração celular* (g L ⁻¹)	Concentração de GSH* (mg L ⁻¹)	Concentração de glicose* (g L ⁻¹)
0	5,0	0,26 ± 0,00	3,9 ± 0,19	52,30 ± 0,00
4	5,0	0,43 ± 0,13	3,72 ± 0,01	50,89 ± 0,02
8	4,9	0,64 ± 0,23	5,19 ± 0,04	50,31 ± 0,01
24	4,4	9,23 ± 0,07	50,32 ± 0,00	6,61 ± 0,01
28	5,3	10,74 ± 0,17	80,95 ± 0,58	6,10 ± 0,00
32	5,1	13,19 ± 0,41	124,89 ± 0,00	0,73 ± 0,00
48	5,8	18,67 ± 0,16	282,98 ± 0,62	0,43 ± 0,01
52	5,9	19,26 ± 0,00	322,51 ± 2,05	0,43 ± 0,00
56	6,2	19,76 ± 0,08	348,15 ± 0,01	0,38 ± 0,00
72	6,8	25,20 ± 0,31	393,40 ± 0,84	0,38 ± 0,00

*± Desvio padrão

Tabela 29 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada com aplicação de CM 24 a 48 h de fermentação.

Tempo (h)	pH	Concentração celular* (g L⁻¹)	Concentração de GSH* (mg L⁻¹)	Concentração de glicose* (g L⁻¹)
0	5,0	0,34 ± 0,00	3,52 ± 0,06	53,93 ± 0,00
4	5,0	0,72 ± 0,00	3,63 ± 0,24	50,80 ± 0,01
8	5,0	0,59 ± 0,07	5,03 ± 0,20	48,35 ± 0,01
24	4,5	10,41 ± 0,24	51,16 ± 0,30	7,40 ± 0,00
28	5,1	11,54 ± 0,06	79,21 ± 0,32	6,92 ± 0,01
32	5,3	13,76 ± 0,34	114,43 ± 0,62	0,72 ± 0,02
48	5,9	21,18 ± 0,42	371,88 ± 0,69	0,76 ± 0,01
52	6,0	21,20 ± 0,51	412,29 ± 0,37	0,68 ± 0,01
56	6,2	21,77 ± 0,18	437,85 ± 0,00	0,42 ± 0,00
72	6,5	26,86 ± 0,51	474,42 ± 2,01	0,42 ± 0,01

*± Desvio padrão

Tabela 30 - Resultados do ensaio em fermentador de bancada com aplicação de CM 48 a 72 h de fermentação.

Tempo (h)	pH	Concentração celular* (g L⁻¹)	Concentração de GSH* (mg L⁻¹)	Concentração de glicose* (g L⁻¹)
0	5,0	0,70 ± 0,40	3,63 ± 0,01	53,63 ± 0,01
4	5,1	0,70 ± 0,00	3,82 ± 0,23	51,79 ± 0,00
8	4,9	1,68 ± 0,74	4,54 ± 0,11	51,86 ± 0,00
24	4,4	10,60 ± 0,08	59,38 ± 0,61	7,90 ± 0,00
28	5,3	12,22 ± 0,51	84,47 ± 0,36	7,26 ± 0,01
32	5,4	14,40 ± 0,28	132,67 ± 1,85	0,55 ± 0,01
48	5,1	18,91 ± 0,04	252,54 ± 0,85	0,43 ± 0,00
52	5,5	19,63 ± 0,13	300,35 ± 1,99	0,36 ± 0,00
56	5,7	20,73 ± 0,13	347,25 ± 4,14	0,37 ± 0,00
72	7,3	25,15 ± 0,21	355,91 ± 0,39	0,34 ± 0,00

*± Desvio padrão