

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DENISE HONDA KITAMURA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA PROBIÓTICA E ENRIQUECIDA COM SELÊNIO
DE *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

CURITIBA

2013

DENISE HONDA KITAMURA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA PROBIÓTICA E ENRIQUECIDA COM SELÊNIO
DE *Saccharomyces boulardii* UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a: Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Dr.^a Cristine Rodrigues

CURITIBA

2013

AO THIAGO, meu marido e melhor amigo, pelo seu esforço e amor a todo momento ao meu lado. A meu pai, RUBENS, e a meu avô, KAZUO, que não estão mais presentes entre nós, pelo menos fisicamente. E a minha família e amigos pelo encorajamento, auxílio e amor dedicados.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus-Parens, sem O qual nada seria possível.

Aos meus irmãos Fernanda e Thiago, e às minhas tias Elza e Regina, que sempre estiveram presentes, me apoiando e incentivando.

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela oportunidade de cursar a pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e por ser o mentor do projeto.

À Professora Dr.^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe pela orientação, dedicação e incentivo.

À Dr.^a Cristine Rodrigues pela co-orientação, dedicação e conselhos.

Aos químicos Alexsandro Gregório e Luciana Prado pela realização das análises de micronutriente no espectrofotômetro de absorção atômica – LPH.

Aos membros do colegiado do programa da pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus amigos e colegas que me apoiaram dentro e fora do Laboratório: Pamela, Camila, Fernanda, Paulo, Maria Rosa, Mitiyo, Vanessa, Denise, Leandro, Juliana, Ana Carolina, Tiemi, Michelle, Daniela, Márcio, Allan, Dérick, Valesca, Franciele, Eduardo e Alessandra.

Ao Eduardo Sydney pelo auxílio nos cultivos em biorreatores.

A todas as pessoas, que de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade, o meu agradecimento.

'Creia em si, mas não duvide sempre dos outros.'

Machado de Assis

RESUMO

Os probióticos são micro-organismos vivos que produzem efeitos benéficos à saúde do indivíduo, quando administrados em quantidades adequadas. A maioria são bactérias, sendo a *Saccharomyces boulardii* uma das leveduras que apresentam propriedades probióticas. O micromineral selênio possui efeitos nutricionais e é um elemento traço essencial necessário para o adequado funcionamento do sistema antioxidante do organismo. Uma das formas mais usadas de suplementação nutricional de selênio é a levedura rica em selênio, fonte rica do selênio orgânico selenometionina, a melhor fonte para os organismos. Todos os produtos existentes no mercado de levedura rica em selênio são produzidos com a levedura *S. cerevisiae* e os estudos sobre a produção de probióticos são voltados para bactérias, não sendo encontrados estudos sobre a produção biotecnológica da levedura probiótica *S. boulardii*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um bioprocesso para a produção de biomassa probiótica *S. boulardii* e também desta levedura enriquecida com selênio (Se) orgânico, através de fermentação submersa utilizando o subproduto agroindustrial melaço de cana-de-açúcar. Duas cepas de *S. boulardii*, SbM e Sb4308, passaram pelos estudos de otimização do meio de cultivo. A cepa Sb4308 foi selecionada por apresentar maior produção de biomassa e foi utilizada nos estudos de bioacúmulo de Se. Os crescimentos das cepas a 30°C e 37°C foram comparados, sendo selecionada 30°C como temperatura de cultivo. Iniciou-se a otimização dos componentes do meio de cultivo com um *screening* de 11 componentes em um Planejamento tipo Plackett & Burman, no qual 5 foram significativos, e seguiram para um planejamento fatorial incompleto $2^{(5-2)}$, sendo selecionadas 3 variáveis significativas. A terceira etapa da otimização foi realizada com o suporte de um planejamento do tipo DCCR 2^3 . Neste planejamento tipo DCCR foi encontrada a região ótima das concentrações das variáveis para a cepa SbM, sendo glicose 40 g/L, melaço de cana 50 g/L e extrato de levedura 12 g/L, cuja produção de biomassa foi de 9,66 g/L. Seguiu-se os estudos para a cepa Sb4308 com aumento da concentração da fonte de carbono, pelos quais foram encontradas as condições selecionadas: melaço de cana 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L, obtendo-se uma produção de 11,03 g/L de biomassa seca. Após a definição do meio de cultivo e da cepa, foram realizados os estudos das cinéticas de produção do inóculo e da biomassa; os tempos de cultivos determinados foram 20 h e 24 h, respectivamente. Prosseguiu-se com o estudo da fermentação em batelada em biorreator BioFlo[®] 110, obtendo-se uma produção de 11,37 g/L de biomassa seca, com o cultivo a 30°C, 30% OD, agitação mínima de 300 rpm e pH inicial de 5,5. Posteriormente foram realizados estudos do processo em batelada alimentada em frascos de Erlenmeyer e as melhores condições encontradas foram: alimentação no tempo de 4 h com melaço de cana a 100 g/L. Nesta etapa, a produção de biomassa seca foi de 13,18 g/L em 10 h de cultivo, com uma produtividade de 1,32 g/L.h. Obteve-se assim, um aumento de produtividade de 1624% em relação às condições iniciais (0,08 g/L.h em meio YM líquido). Iniciaram-se os estudos de bioacúmulo de Se e os valores ótimos encontrados foram: adição de 100 ppm de Se no cultivo no tempo de 10 h. Foi testada uma adaptação prévia de Sb4308 a concentrações crescentes de Se no meio, para uma comparação entre a cepa selvagem e a cepa adaptada. A cepa selvagem teve um maior

crescimento e melhor bioacúmulo. A determinação de Se inorgânico total livre foi realizada através de espectrofotometria da reação colorimétrica com Azure B e a determinação de Se total bioacumulado foi realizada através de espectrofotometria de absorção atômica. Um estudo da cinética de crescimento e bioacúmulo de selênio pela levedura Sb4308 em fermentação em batelada alimentada foi realizado em biorreator BioFlo[®] 110, obtendo-se uma produção de 12,73 g/L de biomassa seca e 3.053,00 µg de Se/g de biomassa. Foram iniciados estudos de especiação e quantificação de Se orgânico bioacumulado através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

Palavras-chave: Levedura, *Saccharomyces boulardii*, probiótico, selênio orgânico, fermentação submersa.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that produce beneficial effects on the health of the individual, when administered in adequate amounts. Most are bacterias, being *Saccharomyces boulardii* one of yeasts that have probiotic properties. Selenium has nutritional effects and is an essential trace element necessary for the proper functioning of the body's antioxidant system. One of the most widely used forms of nutritional supplementation of selenium is the yeast rich in selenium, a rich source of the organic selenium selenomethionine, the best source for the organisms. All products on the market of yeast rich in selenium are produced with the yeast *S. cerevisiae* and studies about the production of probiotics are facing bacterias, did not find studies about the biotechnological production of the probiotic yeast *S. boulardii*. Thus, the aim of this study was to develop a bioprocess for the production of probiotic biomass *Saccharomyces boulardii* and also this yeast enriched with organic selenium (Se) through submerged fermentation using the agroindustrial byproduct sugarcane molasses. Two strains of *S. boulardii*, SbM and Sb4308, passed by the optimization studies of the medium. Sb4308 was selected due to its higher biomass production and has been used in studies of selenium bioaccumulation. The growths at 30°C and 37°C were compared, determining that the cultivation temperature was 30°C. The optimization of the components of the culture medium began with a screening of 11 components in Plackett & Burman design, in which 5 components were significant. Then an incomplete factorial design $2^{(5-2)}$ was performed, being selected three significant variables. The third step of optimization was performed with the support of a DCCR 2^3 design. In DCCR was found the optimal region of concentrations of the variables for strain SbM, being glucose 40 g/L, sugarcane molasses 50 g/L and yeast extract 12 g/L, whose biomass was 9.661g/L. Followed studies for Sb4308 strain with increased concentration of carbon source, whereby selected conditions were found: sugarcane molasses 150 g/L and yeast extract 12 g/L, yielding of 11.03 g/L dry biomass. After defining the culture medium and the strain, kinetic studies of the inoculum and biomass production were conducted, and the times were determined for 20 h and 24 h, respectively. Proceeded with the study of the fermentation batch in the bioreactor Bioflo[®]110, the dry biomass obtained was 11.37 g/L, by cultivating at 30°C, DO 30%, minimum agitation of 300 rpm and pH initial 5.5. Subsequent studies about fed fermentation were conducted in flasks Erlenmeyers, being the fed in time of 4 h of sugarcane molasses 100 g/L the best conditions found. At this stage the dry biomass was 13.18 g/L in 10 h of cultivate, with a productivity of 1.32 g/L.h. There was thus obtained a productivity increase of 1624% in relation of the initial conditions (0.08 g/L.h in liquid YM medium). Followed then for selenium bioaccumulation studies and the optimum values found were: addition of 100 ppm of Se in cultivation at the time of 10 h. A prior adaptation was tested to Sb4308 in increasing concentrations of Se for a comparison between the wild strain and the adapted strain. The wild strain had higher growth and better bioaccumulation. The determination of free total Se was performed by spectrophotometry of color reaction with Azure B and determination of Se bioaccumulated was performed by atomic absorption spectrophotometry. The study of the kinetics of growth and bioaccumulation of selenium by yeast Sb4308 in the fed-batch fermentation was performed in a

bioreactor Bioflo[®] 110, that gave a yield of 12.73 g/L dry biomass and 3053.00 µg of Se/g biomass. Speciation studies and quantification of organic selenium in biomass were initiated through liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Keywords: yeast, *Saccharomyces boulardii*, probiotic, organic selenium, submerged fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA <i>Saccharomyces boulardii</i> EM SUSPENSÃO AQUOSA	27
Figura 2 - FLUXOGRAMA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA PROBIÓTICA <i>S. boulardii</i>	45
Figura 3 - FLUXOGRAMA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> ENRIQUECIDA COM SELÊNIO ORGÂNICO .	46
Figura 4 - REAÇÃO DO SELÊNIO INORGÂNICO COM KI EM MEIO ÁCIDO, ALTERANDO A COLORAÇÃO DO REAGENTE AZURE B	52
Figura 5 – EQUIPAMENTO DE ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA.....	54
Figura 6 – EQUIPAMENTO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA	55
Figura 7 - SISTEMA DE DIGESTÃO DA BIOMASSA SECA POR REFLUXO .	56
Figura 8 – CULTIVO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER COM AGITAÇÃO EM AGITADOR DO TIPO <i>SHAKER</i>	57
Figura 9 - BIORREATOR TIPO TANQUE AGITADO	68
Figura 10 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Saccharomyces boulardii</i> SbM E Sb4308.....	74
Figura 11 - DIAGRAMA DE PARETO – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NO MEIO DE CULTIVO ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO PLACKETT E BURMAN.....	78
Figura 12 - DIAGRAMA DE PARETO – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NO MEIO DE CULTIVO ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA SbM.....	80
Figura 13 - DIAGRAMA DE PARETO – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NO MEIO DE CULTIVO ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA Sb4308.....	82
Figura 14 - DIAGRAMA DE PARETO – PLANEJAMENTO DCCR APRESENTANDO AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SbM	85

Figura 15 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (MELAÇO E GLICOSE) - SbM.....	85
Figura 16 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E GLICOSE) - SbM.....	86
Figura 17 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E MELAÇO) - SbM.....	86
Figura 18 - DIAGRAMA DE PARETO – PLANEJAMENTO DCCR - Sb4308...	89
Figura 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (MELAÇO E GLICOSE) - Sb4308.....	89
Figura 20 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E GLICOSE) - Sb4308.....	90
Figura 21 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E MELAÇO) - Sb4308.....	90
Figura 22 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DO INÓCULO DA CEPA <i>S. boulardii</i> Sb4308.....	96
Figura 23 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER.....	97
Figura 24 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BATELADA EM BIORREATOR STR – CEPA Sb4308	98
Figura 25 - ANÁLISE DOS TEMPOS DE ALIMENTAÇÃO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E GLICOSE.	100
Figura 26 - ANÁLISE DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DO TEMPO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	102
Figura 27 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM SELÊNIO DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 EM BIORREATOR STR POR FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA	115
Figura 28 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES SeCis, Met E SeMet (50 ppm)	116
Figura 29 - ESPECTRO DE MASSA DOS PADRÕES SeCis, Met E SeMet..	117
Figura 30 - VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO DE CÉLULAS DE <i>Saccharomyces boulardii</i> Sb4308 NÃO SELENIZADAS (A) E SELENIZADAS (B)	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) DE SELÊNIO.....	32
Tabela 2 - COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICILICO (DNS).....	49
Tabela 3 - PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO TOTAL - AAS.....	54
Tabela 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO INICIAL PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i>	59
Tabela 5 - MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN	60
Tabela 6 - NÍVEIS DECODIFICADOS DE CADA VARIÁVEL DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN	60
Tabela 7 - MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$	61
Tabela 8 - NÍVEIS DECODIFICADOS DE CADA VARIÁVEL DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$	62
Tabela 9 - MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3	63
Tabela 10 - NÍVEIS DECODIFICADOS DE CADA VARIÁVEL DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3	63
Tabela 11 - ENSAIOS PARA A VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3	64
Tabela 12 - ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELAÇO DE CANA	65
Tabela 13 – ENSAIOS PARA A ANÁLISE DO RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA (g/L) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELAÇO DE CANA	65
Tabela 14 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA NOS CULTIVOS DAS CEPAS SbM E Sb4308 A 30°C E 37°C	75
Tabela 15 – RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO PLACKETT & BURMAN – CEPA Sb4308.....	76
Tabela 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO PLACKETT & BURMAN – CEPA Sb4308.....	77

Tabela 17 – RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA SbM	79
Tabela 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA SbM	80
Tabela 19 - RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA Sb4308	81
Tabela 20 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA Sb4308	82
Tabela 21- RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3 – CEPA SbM.....	83
Tabela 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3 – CEPA SbM.....	84
Tabela 23 - RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3 – CEPA Sb4308.....	87
Tabela 24 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3 – CEPA Sb4308.....	88
Tabela 25 – RESULTADO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO DCCR 2^3	92
Tabela 26 – RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA OBTIDA COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO DE CANA – CEPA Sb4308	93
Tabela 27 - ANÁLISE DE RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELAÇO DE CANA.....	94
Tabela 28 - pH DO MEIO DE CULTIVO: APÓS AUTOCLAVAGEM, NO INÍCIO E NO FINAL DA FERMENTAÇÃO.....	94
Tabela 29 - ANÁLISE DO RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE DAS FERMENTAÇÕES EM BATELADA ALIMENTADA COM MELAÇO DE CANA E FINALIZADAS APÓS 24 HORAS DA ALIMENTAÇÃO	101
Tabela 30 - ANÁLISE DO RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE DAS FERMENTAÇÕES EM BATELADA ALIMENTADA COM MELAÇO DE CANA E FINALIZADOS NOS TEMPOS 8 E 10 HORAS	103
Tabela 31 - PARÂMETROS FÍSICOS DETERMINADOS PARA O CULTIVO DA CEPA <i>S. boulardii</i> Sb4308	104

Tabela 32 - RESUMO DA EVOLUÇÃO DOS RESULTADOS DE BIOMASSA, PRODUTIVIDADE E GANHOS DE PRODUTIVIDADE DAS ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE <i>S. boulardii</i> Sb 4308	104
Tabela 33 – ANÁLISE DA TOLERÂNCIA DAS CEPAS <i>S. boulardii</i> SbM E Sb4308 AO SELÊNIO	107
Tabela 34 – TESTE DE ADAPTAÇÃO DAS CEPAS <i>S. boulardii</i> SbM e Sb4308 AO SELÊNIO	108
Tabela 35 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 COM ADIÇÃO DE Se 50 E 75 ppm NOS TEMPOS 4 E 10 HORAS.....	109
Tabela 36 – COMPARAÇÃO DO ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA REAÇÃO COM AZURE B COM O ENSAIO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA	111
Tabela 37 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM ADIÇÃO DE Se 100, 125 E 150 ppm NO TEMPO DE 10 HORAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA .	112
Tabela 38 - REUNIÃO DOS RESULTADOS DA ADIÇÃO DE 50, 75, 100, 125 E 150 ppm DE Se NO TEMPO DE 10 HORAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	112
Tabela 39 - RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE Se DA CEPA Sb4308 ADAPTADA	113
Tabela 40 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE Se PELAS CEPAS <i>S. boulardii</i> Sb4308 SELVAGEM E ADAPTADA...	114
Tabela 41 - RESUMO DOS TESTES REALIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ORGÂNICO NA BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 POR LC-MS	117
Tabela 42 - RESUMO DOS TESTES REALIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ORGÂNICO NA BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 POR LC-MS	119
Tabela 43 – RESULTADOS DE Se BIOACUMULADO ADSORVIDO E ABSORVIDO EM AMOSTRAS DE BIOMASSA E ÁGUA DE LAVAGEM..	120
Tabela 44 - PRODUÇÃO DE LEVEDURA RICA EM SELÊNIO POR DIFERENTES AUTORES.....	121

Tabela 45 - RESUMO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO UTILIZADAS POR
OUTROS AUTORES QUE PRODUZIRAM LEVEDURA RICA EM SELÊNIO
..... 122

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	<i>Atomic absorption spectroscopy</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Conab	Companhia Nacional de abastecimento
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
ICIDCA	Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LPH	Laboratório de Pesquisa Hidrogeológicas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Met	Metionina
OD	Oxigênio dissolvido
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
Se	Selênio
Secis	Selenocisteína
SeMet	Selenometionina
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
WHO	<i>World Health Organization</i>
YM	<i>Yeast malt extract</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVO GERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 PROBIÓTICOS	23
2.1.1 Mecanismo de ação dos probióticos	24
2.2 <i>Saccharomyces boulardii</i>	26
2.2.1 Comparação entre <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. boulardii</i>	27
2.3 SELÊNIO	28
2.3.1 Benefícios do selênio para a saúde animal e humana	31
2.4 BIOMASSA DE LEVEDURA COMO FONTE DE SELÊNIO ORGÂNICO	32
2.4.1 Utilização de leveduras para consumo animal e humano	33
2.4.2 Suplementação com minerais orgânicos	34
2.4.3 Levedura rica em selênio orgânico	34
2.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	36
2.5.1 Valorização de subproduto agroindustrial	37
2.6 PLANIFICAÇÃO EXPERIMENTAL	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 MICRO-ORGANISMOS	41
3.2 MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	41
3.3 MEIO DE CULTIVO	41
3.3.1 Meio <i>Yeast Malt extract</i> (YM) Líquido	41
3.3.2 Meio YM sólido	41
3.4 MANUTENÇÃO DAS CEPAS	42
3.5 PREPARO DO INÓCULO	42
3.6 BIOPROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA PROBIÓTICA E ENRIQUECIDA COM SELÊNIO DE <i>S. boulardii</i>	42
3.7 ETAPAS DE DOWNSTREAM	47
3.7.1 Centrifugação	47
3.7.2 Liofilização	47
3.7.3 Secagem em estufa com circulação de ar	47

3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS QUÍMICO-MICROBIOLÓGICAS	48
3.8.1 Químicas	48
3.8.2 Microbiológicas.....	50
3.9 DETERMINAÇÕES DE SELÊNIO	51
3.9.1 Espectrofotometria UV/Vis	51
3.9.2 Espectrometria de Absorção atômica.....	53
3.9.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.....	55
3.10 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS SbM E Sb4308.....	57
3.11 ESTUDO DA TEMPERATURA DE CULTIVO.....	58
3.12 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO.....	58
3.12.1 Seleção de variáveis significativas por Planejamento Experimental tipo Plackett & Burman.....	59
3.12.2 Segunda etapa de seleção de variáveis por Planejamento Fatorial Incompleto $2^{(5-2)}$	61
3.12.3 Terceira etapa de otimização do meio de cultivo por Planejamento Experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3	62
3.12.4 Análise Estatística	63
3.12.5 Validação da otimização do meio de cultivo	63
3.12.6 Análise da influência do aumento da concentração de melaço de cana no rendimento da produção de biomassa Sb4308	64
3.13 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>S. boulardii</i> Sb4308.....	66
3.14 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	67
3.15 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 EM BATELADA EM BIORREATOR DO TIPO STR.....	67
3.16 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 EM BATELADA ALIMENTADA EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	68
3.17 ANÁLISE DO BIOACUMÚLO DE SELÊNIO	69
3.17.1 Análise prévia da capacidade das cepas SbM e Sb4308 de tolerância e adaptação ao selênio no meio de cultivo	69
3.17.2 Análise da concentração de selenito de sódio Na_2SeO_3 a ser adicionada no meio de cultura para bioacúmulo	70
3.18 ESTUDO DO CRESCIMENTO E BIOACUMÚLO DE SELÊNIO PELA CEPA SB4308 ADAPTADA	71

3.19 CINÉTICA DO CRESCIMENTO E BIOACÚMULO DE SELÊNIO PELA Sb4308 EM FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR.....	72
3.20 QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ADSORVIDO NA BIOMASSA	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS SbM E Sb4308.....	74
4.2 ESTUDO DA TEMPERATURA DE CULTIVO.....	75
4.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO.....	76
4.3.1 Seleção de variáveis significativas - Planejamento Experimental tipo Plackett & Burman.....	76
4.3.2 Segunda etapa de seleção de variáveis - Planejamento Fatorial Incompleto 2 ⁽⁵⁻²⁾	79
4.3.3 Terceira etapa de otimização - Planejamento Experimental DCCR 2 ³	83
4.3.4 Validação da otimização do meio de cultivo.....	91
4.3.5 Análise da influência do aumento da concentração de melaço de cana no rendimento da produção de biomassa Sb4308	92
4.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>S. boulardii</i> Sb4308.....	95
4.5 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	97
4.6 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb 4308 EM BATELADA EM BIORREATOR DO TIPO STR.....	98
4.7 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. boulardii</i> Sb4308 EM BATELADA ALIMENTADA EM FRASCOS DE ERLLENMEYER	99
4.8 ANÁLISE DO BIOACÚMULO DE SELÊNIO	106
4.8.1 Análise prévia da capacidade das cepas SbM e Sb4308 quanto à tolerância e adaptação ao Se adicionado no meio de cultivo.....	106
4.8.2 Análise da concentração de Na ₂ SeO ₃ a ser adicionada no meio de cultivo para bioacúmulo.....	109
4.9 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE Se PELA CEPA <i>S. boulardii</i> Sb4308 ADAPTADA	113
4.10 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE SELÊNIO POR <i>S. boulardii</i> SB4308 EM FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR	114
4.10.1 Testes de metodologia de análise da amostra selenizada no LC-MS.....	116

4.10.2 Testes de digestão da biomassa da levedura Sb4308 rica em selênio	118
4.11 QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ADSORVIDO NA BIOMASSA	119
5 CONCLUSÕES	125
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	127
REFERÊNCIAS.....	128

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas científicas comprovam que os probióticos trazem benefícios para saúde humana e animal por apresentarem diversas propriedades importantes, como contribuir com o balanço da flora intestinal, apresentar efeito anti-inflamatório, antialérgico, auxiliar no aumento da imunidade, entre outros. Dessa forma, são intensamente estudados e explorados comercialmente sob várias formas de produtos no mundo. O principal grupo de probióticos são os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium*, porém outros micro-organismos também têm propriedades probióticas como *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* e leveduras, como a *Saccharomyces boulardii* (SOCCOL *et al.*, 2010).

A venda global em 2010 de ingredientes, suplementos e alimentos probióticos foi de \$21,6 bilhões e em 2015 é esperado que se alcance \$31,1 bilhões. Os suplementos probióticos correspondem cerca de 6,4% do total das vendas. Em 2010 foi faturado \$1,3 bilhões e para 2015 é esperado um faturamento de \$2,07 bilhões (AGHEYISI, 2010).

As leveduras têm um alto valor nutritivo como também apresentam vantagens tecnológicas em relação a outros micro-organismos. A sua biomassa é de fácil separação, possui rápido crescimento e também alta capacidade de assimilar grandes variedades de substratos. Motivos que vêm levando o aumento de sua utilização em muitos processos fermentativos e de produtos resultantes (BOURGEOIS e LARPENT, 1995; ICIDCA, 1999).

Em condições apropriadas, as leveduras são capazes de acumular grandes quantidades de selênio e incorporá-los como compostos contendo selênio orgânico, principalmente na forma de selenometionina, a qual é a melhor fonte de selênio para os organismos (DERMICI *et al.*, 1999; SUHAJDA *et al.*, 2000).

O selênio é um não-metal que atua como micronutriente em diversas formas de vida. Possui funções na proteção dos tecidos contra estresse oxidativo, na manutenção das defesas contra infecções e na modulação do crescimento e desenvolvimento (FAO/WHO, 2002).

A suplementação nutricional de selênio tem se tornado cada vez mais comum e uma das formas mais utilizadas de suplementação é através de leveduras ricas em selênio. As leveduras são reconhecidas por seu alto conteúdo proteico, assim, mais selênio pode ser incorporado em substituição do enxofre nas proteínas, se comparadas com as plantas. Além disso, a produção industrial de leveduras é mais versátil do que a produção industrial de plantas ricas em selênio (PONCE de LÉON, *et al.* 2002). Fatores que têm levado a um aumento no interesse em se desenvolver técnicas de produção que permitem máxima redução e incorporação de selênio inorgânico pela levedura (OUERDANE e MESTES, 2008).

Muitos processos fermentativos industriais têm aproveitado o potencial de matérias-primas renováveis, como o resíduo agroindustrial melaço de cana-de-açúcar (SERAFINI, BARROS E AZEVEDO, 2002). O fato de o Brasil ser o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com perspectiva da safra do ano de 2013 chegar a 595,13 milhões de toneladas, segundo a Conab (2012), se faz necessário o reaproveitamento desse resíduo, do ponto de vista ambiental. Além disso, a utilização dessa fonte renovável torna o processo fermentativo menos dispendioso, como também proporciona a produção de compostos de maior valor agregado.

Os trabalhos existentes relacionados com a produção biotecnológica de probióticos se voltam principalmente para as bactérias, estando os trabalhos sobre a levedura *S. boulardii* voltados apenas para sua atuação como probiótico e não para sua produção. Todos os trabalhos sobre as leveduras ricas em selênio, como também os produtos existentes no mercado, utilizam a levedura *S. cerevisiae* para o bioacúmulo de selênio.

Diante desses estudos e da importância dos probióticos e das leveduras ricas em selênio para o bem-estar e para a saúde animal e humana, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um bioprocessamento utilizando o resíduo agroindustrial melaço de cana-de-açúcar para a produção de biomassa da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* como também desta levedura enriquecida com selênio orgânico.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um bioprocesso para a produção de biomassa da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* através de fermentação submersa utilizando o subproduto agroindustrial melaço de cana-de-açúcar e também um bioprocesso para a produção desta levedura rica em selênio.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção de biomassa de levedura através da seleção dos componentes do meio de cultivo, incluindo o subproduto agroindustrial melaço de cana-de-açúcar;
- Estudar condições físico-químicas para a produção da biomassa;
- Selecionar cepa de *S. boulardii* para a produção de biomassa com e sem selênio orgânico;
- Estudar a cinética de produção do inóculo e a cinética de produção de biomassa em frascos de Erlenmeyer;
- Estudar a cinética de produção de biomassa em biorreator do tipo tanque agitado (STR), nas condições otimizadas para operação em batelada;
- Estudar a alimentação com melaço de cana da fermentação em batelada em frascos de Erlenmeyer;
- Determinar qual a melhor concentração e o melhor tempo para a adição de selenito de sódio no processo em batelada alimentada;
- Verificar se a técnica de adaptação aplicada à levedura selecionada, em um meio rico em selênio, aumenta seu bioacúmulo;
- Estudar a cinética do bioacúmulo de selênio e produção de biomassa em biorreator STR em operação de batelada alimentada;
- Quantificar a concentração de selênio bioacumulado por metodologia espectrofotométrica e por espectrometria de absorção atômica;
- Estudar o bioacúmulo de selênio orgânico por metodologia em cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC-MS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

Os probióticos já foram definidos como suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Com o passar dos anos e das descobertas, outras definições foram sendo aplicadas aos probióticos e a definição atualmente aceita internacionalmente é dada pela *Food and Agriculture Organization of United Nations/World Health Organization*, que os define como micro-organismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a definição de probióticos é: micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002).

A observação original dos benefícios desempenhados por alguns micro-organismos selecionados é atribuída a Eli Metchnikoff, microbiologista e zoonólogo russo nascido em 1845, que sugeriu a possibilidade de se adotar medidas para modificar a flora nos organismos, substituindo micro-organismos patogênicos por não nocivos, através da observação da influência da alimentação sobre a flora intestinal (FIORAMONTI, THEODOROU e BUENO, 2003).

O desenvolvimento da flora intestinal de mamíferos se inicia a partir do nascimento e é influenciado pela exposição contínua aos micro-organismos do ambiente, da dieta e também por fatores genéticos (LARSEN E MONIF, 2001; ZOETENDAL *et al.*, 2001). Nesse desenvolvimento se estabelece um alto grau de interdependência entre o hospedeiro e os micro-organismos comensais, e dentre as 500 diferentes espécies de micro-organismos que vivem no trato gastrointestinal, algumas apresentam importantes funções para a saúde como o melhoramento do sistema imunológico do hospedeiro, auxiliando no reconhecimento dos micro-organismos patogênicos dentre os benignos e, conseqüentemente levando a uma proteção imunológica sem excesso da

resposta inflamatória, agressiva à mucosa gastrointestinal (ALVAREZ-OLMOS e OBERHELMAN, 2001).

Uma microbiota saudável é definida como a microbiota normal que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente do trato gastrointestinal (ISOLAURI, SALMINEN e OUWEHAND, 2004). Porém a composição da flora intestinal pode ser afetada, desbalanceada, pelo uso de antibióticos, terapia imunossupressora e irradiação, diminuindo a resistência à doenças e aumentando a predisposição à infecções, inflamações, condições degenerativas e neoplásicas (BENGMARK, 1998). Assim sendo, a correção das propriedades de uma microbiota normal em desequilíbrio constitui a base da terapia por probióticos (ISOLAURI, SALMINEN e OUWEHAND, 2004; SANDERS, 2008).

2.1.1 Mecanismo de ação dos probióticos

As primeiras pesquisas sobre o mecanismo de ação dos probióticos investigaram a supressão do crescimento de patógenos, especialmente em infecções agudas. Posteriormente, foram investigados a alta regulação de fatores anti-inflamatórios, imunomodulação através da supressão de mediadores pró-inflamatórios, aumento da imunidade, proliferação e diferenciação de células epiteliais, e promoção da função de barreira intestinal (FUJIYA e KOHGO, 2010).

Fuller (1989) já havia atribuído aos probióticos três possíveis mecanismos de atuação, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis, que pode ser através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, através da competição por nutrientes e ainda através da competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

De acordo com Saad (2006), alguns dos benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas são: controle da flora intestinal e estabilização desta após a utilização de antibióticos; aumento da

resistência gastrointestinal perante colonização de patógenos; produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos que diminuem a população de patógenos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas e estimulação do sistema imune.

Os probióticos auxiliam a recomposição da microbiota intestinal através da adesão e colonização da mucosa intestinal, impedindo a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais (dependendo do mecanismo de patogenicidade) por bactérias patogênicas. Além disso, os probióticos competem com os micro-organismos indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico, que são fornecidos pelo hospedeiro em quantidades limitadas, necessária apenas aos micro-organismos simbióticos, desfavorecendo o estabelecimento de patógenos. Os probióticos podem também impedir a multiplicação de seus competidores através da produção de compostos antimicrobianos, principalmente as bacteriocinas (KOPP-HOOLIHAN, 2001; CALDER e KEW, 2002).

De acordo com estudos *in vitro* e *in vivo*, os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto específica, através da ativação dos macrófagos, de um aumento nos níveis de citocinas, de um aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK – “*natural killer*) e/ou dos níveis de imunoglobulinas. Tal fato ocorre sem, contudo, desencadear uma resposta inflamatória em excesso, o que seria prejudicial ao hospedeiro (KOPP-HOOLIHAN, 2001; CALDER e KEW, 2002).

Outros efeitos sugeridos atribuídos aos probióticos, ainda não comprovados, são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doenças cardiovascular, a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (SAAD, 2006).

A atuação dos probióticos na redução do risco de aparecimento de câncer é, possivelmente, realizada através da neutralização dos efeitos genotóxicos e mutagênicos (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

2.2 *Saccharomyces boulardii*

A maioria dos micro-organismos probióticos são bactérias, como as cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* e até mesmo algumas bactérias não-láticas. Apenas duas leveduras são usadas como probióticos, *S. boulardii* na medicina humana e *S. cerevisiae* na medicina veterinária. *S. boulardii* (Figura 1) é uma levedura não patogênica e apresenta propriedades que a tornam um agente probiótico, como resistência ao trato gastrointestinal e crescimento a 37°C (na qual muitos micro-organismos patogênicos não resistem). É amplamente prescrita em diversos países na forma liofilizada, como agente preventivo e terapêutico para diarreia e outras desordens gastrointestinais (CZERUCKA, 2007; BUTS, 2009).

Devido ao fato de ser uma célula eucariótica, *S. boulardii* apresenta algumas especificidades como probiótica que a diferenciam das bactérias que são células procarióticas, como possuir um tamanho dez vezes maior, apresentando um obstáculo esteárico às bactérias; apresentar resistência natural a antibióticos e ainda não transferir material genético, propriedade inerente às células procarióticas que ocasiona a troca de genes resistentes a antibióticos, podendo ser aplicada em combinação com antibioterapia (CZERUCKA, 2007).

A primeira publicação a respeito dos benefícios à saúde do hospedeiro proporcionada pela *S. boulardii* foi realizada em 1982, embora sua descoberta tenha ocorrido em 1920 por Henri Boulard na Indochina (BUTS, 2009). A partir de então, o número de publicações só tem aumentado, chegando a 15 publicações ao ano, sendo a maioria delas sobre a ação da *S. boulardii* contra doença associada ao *Clostridium difficile*, às diarreias associadas a antibióticos e às diarreias agudas infecciosas (BUTS, 2009).

Estudos clínicos e experimentais indicam que *S. boulardii* pode interferir com vias de sinalização celular comum em muitas condições inflamatórias, pois têm demonstrado sua eficácia em doenças gastrointestinais com predominante componente inflamatório (POTHOULAKIS, 2009).

De acordo com Im e Pothoulakis (2010), os principais mecanismos de ação de *S. boulardii* incluem desde a inibição do crescimento, aderência e ação de produtos de bactérias patogênicas, por exemplo, a clivagem da toxina A de

C. difficile pela produção de serina protease, como a modificação de vias de sinalização do hospedeiro envolvidas em doenças intestinais inflamatórias e não-inflamatórias. Auxilia na regulação da resposta imunológica inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias através da inibição de reguladores principais da inflamação, incluindo o fator nuclear kB (NF-kB, *nuclear factor kB*) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*), ERK 1/2 e p38, e estimulando a produção de moléculas anti-inflamatórias como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ , *speroxisome proliferator-activated receptor-gamma*). Além disso, *S. boulardii* pode interferir na patogênese de Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), agindo nas células T e nas condições diarreicas por melhorar as condições de bioestrutura fecal em pacientes com diarreia.

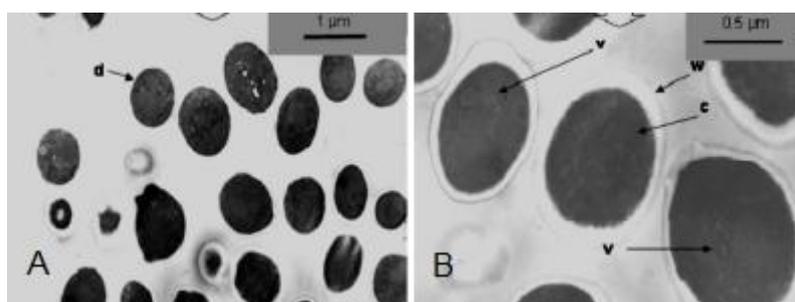


Figura 1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA *Saccharomyces boulardii* EM SUSPENSÃO AQUOSA (A x4000; B x10000) (c: citoplasma; d: densidade do citoplasma; v: vacúolo; w: parede celular). FONTE: GRAFF *et al.* (2008).

2.2.1 Comparação entre *S. cerevisiae* e *S. boulardii*

A taxonomia do gênero *Saccharomyces* é baseada em métodos fenotípicos e genotípicos. Esse gênero no complexo *sensu stricto* inclui quatro espécies relacionadas: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus* (CARDINALI e MARTINI, 1994). Com base em parâmetros metabólicos e moleculares, McFarland (1996) sugeriu que *S. boulardii* deveria ser considerada uma espécie a parte. Cardinali e Martini (1994) classificam *S. boulardii* fora de espécies de *Saccharomyces* utilizando cariotipagem eletroforética comparativa e análise multivariada do polimorfismo observado em eletroforese em campo pulsado (PFGE). Entretanto, Mallié *et al.* (2001) através de tipagem utilizando eletroforese de enzimas de multilocus e estudo de polimorfismo de restrição do DNA mitocondrial relatam sua inclusão no

complexo *sensu stricto* e propõem a denominação de *S. cerevisiae* var. *boulardii*.

Hennequin *et al.* (2001) identificaram um alelo microssatélite único e específico capaz de identificar *S. boulardii* e distingui-la de uma linhagem de *S. cerevisiae*.

Fietto *et al.* (2004) avaliaram as respostas de viabilidade celular de cepas de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* diante de diferentes condições de estresses, como aumento de temperatura e pH extremos, simulando os meios gástrico e intestinal, como também realizaram a comparação molecular dessas cepas através de cariotipagem eletroforética. Eles concluíram que ambas são geneticamente semelhantes, porém metabolicamente e fisiologicamente muito diferentes, particularmente no que se refere ao crescimento e à resistência à temperatura de 37°C e estresse ácido, apresentados pela *S. boulardii*, que são importantes características de um microrganismo usado como probiótico.

2.3 SELÊNIO

Até a década de 50, o micromineral selênio (Se) era conhecido pelos seus efeitos tóxicos. A partir daí passou-se a conhecer seus efeitos nutricionais e foi reconhecido como elemento traço essencial na prevenção das lesões hepáticas, musculares e vasculares em animais alimentados com dietas contendo selênio (COMBS, 2001).

Segundo Battin e Brumagim (2009), a oxidação causada por espécies reativas de oxigênio é a maior causa do dano e morte celular, levando a problemas como câncer e doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Moléculas antioxidantes contendo selênio podem atenuar esses danos oxidativos através de vários mecanismos antioxidantes empregados pelas células.

O organismo contém sistemas complexos antioxidantes que requerem adequada ingestão de selênio para uma normal função fisiológica. A dose diária recomendada é de aproximadamente 55 µg/dia e pode ser obtida através da ingestão de alimentos como cenoura, repolho, alho, cogumelos, queijo,

carnes, grãos e suplementos contendo selênio (MORRIS, 1970; FOSTER, 1995).

O Se na forma de selenocisteína é um constituinte de 25 classes de selenoproteínas, incluindo glutathione peroxidase, selenoproteínas P, W e R, e tireodoxinas (MUGESH *et al.*, 2001; TAPIERO, TOWNSEND e TEW, 2003; DIWARKAR-NAVSARIWALA *et al.*, 2006). As glutathione peroxidases atuam como antioxidantes através da redução de peróxidos como H_2O_2 . O ciclo catalítico da glutathione peroxidase envolve a reação do ácido selênico com a glutathione gerando um aduto selenenil sulfeto que reage com uma glutathione adicional para gerar um selenol ativo que reduz peróxido (MUGESH *et al.*, 2001).

Outras selenoenzimas importantes dos mamíferos são as iodotironina desidases que catalisam a 5,5'-monodesiodação do pro-hormônio tiroxina para o hormônio ativo da tireoide, e as tireodoxinas redutases, que catalisam a redução da tireodoxina (BROWN e ARTHUR, 2001; STADTMAN, 2006).

Segundo Combs (2001), a presença de selênio no sistema alimentar é influenciada pela sua concentração no solo, proveniente da decomposição de rochas vulcânicas, pelo uso de fertilizantes contendo selênio ou ainda pela água. Vegetais e micro-organismos são capazes de removê-lo do solo, sendo essa mobilização influenciada pelo pH e umidade do solo. Todos esses fatores levam a uma grande variação da concentração de selênio nos alimentos vegetais, animais e seus subprodutos.

Os alimentos vegetais e animais, como também leveduras cultivadas em meios ricos em selênio, são fontes de selênio orgânico; seu consumo também pode ser feito na sua forma inorgânica, como selenato de sódio (Na_2SeO_4) e o selenito de sódio (Na_2SeO_3) (BIRD *et al.*, 1997 e IP, 1998). A forma predominante de suplementação de selênio é realizada pelo Na_2SeO_3 , porém a forma de ocorrência natural nos alimentos é a L-selenometionina, um análogo do aminoácido metionina (SCHRAUZER, 2000). Os vegetais, as bactérias e as leveduras podem sintetizar ambos (metionina e selenometionina), porém os animais não podem.

Leveduras ricas em selênio são estáveis durante a estocagem, enquanto que o Se inorgânico pode ser reduzido especialmente sob condições de alta

umidade (CARMELI *et al*, 2008). O Se absorvido pela levedura é mais biodisponível do que na forma inorgânica.

Os principais selenocomponentes identificados nos vegetais incluem selenato, selenocistina, selenometionina (SeMet), selenohomocisteína, Selenometilselenocisteína (SeMCis) e glutamilselenocistationa, dentre outros. Com exceção do selenato todos esses selenocomponentes são selenoaminoácidos não proteicos. Devido ao fato de o RNA transportador da metionina (Met) não diferenciar entre Met e SeMet, mais de 50% destes selenocomponentes observados nos vegetais estão na forma de SeMet, devido sua incorporação dentro da proteína no lugar da Met (SCHRAUZER, 2000).

Segundo Buckley (2000), a absorção de selênio consumido na forma de selenito é de 84%, e deste, 58% retorna ao intestino delgado via bile, sendo reabsorvido e 90% é conduzido ao fígado, sendo que após o percurso para os tecidos periféricos, perdem-se 18% nas fezes e 17% na urina. Já a SeMet pode apresentar uma absorção de 98%, sendo que muito pouco retorna ao intestino delgado, resultando em uma maior taxa de absorção. Do absorvido, 43% chega aos tecidos periféricos muito lentamente, o que não é conseguido pelo Se na forma de selenito. As perdas observadas após 12 dias da dose inicial foram de 4% e 11% nas fezes e urina, respectivamente. De acordo com os mesmos autores essas diferenças estão ligadas à meia vida entre estas duas formas de selênio, sendo de 252 dias para as SeMet e 102 dias para o selenito. Tal fato indica que a SeMet é utilizada e reutilizada extensivamente.

Similarmente à absorção de Met, a SeMet ingerida é absorvida no intestino delgado pelo sistema Na^+ dependente. Quando essa SeMet não é imediatamente metabolizada é incorporada em órgãos com altas taxas de síntese proteica tais como os músculos esqueléticos, pâncreas, fígado, rim, estômago e mucosa gastrintestinal. Já o Se inorgânico não é transportado ativamente e sua incorporação só é possível nas selenoproteínas (SCHRAUZER, 2000).

2.3.1 Benefícios do selênio para a saúde animal e humana

A produtividade animal é regida por muitos fatores, dentre eles está o balanço entre antioxidantes e pro-oxidantes, importante para a manutenção da saúde, desenvolvimento embrionário, índices produtivos e reprodutivos. A formação de radicais livres ocasiona o surgimento de várias doenças, como cardiovascular, câncer, catarata, degeneração muscular e queda de produtividade animal e qualidade da carcaça (SURAI e SPARKS, 2001). Logo após o nascimento dos animais inicia-se a demanda por proteção antioxidante, a qual é realizada por antioxidantes naturais (vitamina E, carotenoides, ácido ascórbico), enzimas antioxidantes (superoxi dismutase, glutathione peroxidase e catalase) e cofatores de enzima (Se, Zn, Mn e Fe); esses nutrientes, em especial o Se, são primariamente provenientes da dieta materna.

A revisão de Whanger (2004) indicou que em 100 estudos sobre animais mostraram o efeito do selênio na incidência de tumores. Dois terços mostraram a ação anticarcinogênica do selênio. Vários estudos também demonstraram os efeitos de proteção do selênio em modelo animal para doenças cardiovascular e neurodegenerativa (TOUFEKTSIN *et al.*, 2000; BALJINNYAM *et al.*, 2006; OSTADALOVA *et al.*, 2007).

A presença de selênio em dietas para animais promove de alguma forma, direta ou indiretamente, a melhora de desempenho animal, a manutenção da qualidade de produtos comercializados e possibilita o reforço da saúde humana, justificado pela sua deposição na carcaça.

De acordo com Prevenção Nutricional do Câncer (NPC) um ensaio clínico demonstrou efeitos significantes quimioprotetores do selênio em humanos, no qual os resultados indicaram que uma suplementação diária de leveduras enriquecidas com selênio de 200 µg/dia ocasionou uma redução de 63% de câncer de próstata, de 58% de câncer colorretal e de 46% de câncer do pulmão (CLARK *et al.*, 1996).

Estudos epidemiológicos têm sugerido que o risco de certas doenças em humanos, inclusive o câncer, estaria relacionado com o baixo consumo de Se (KAKIZOE, 2003; WHANGER, 2004). Dentre os vários mecanismos propostos para o efeito anticarcinogênico estão a supressão da atividade da enzima P450, ativa na fase de iniciação tumoral e, ainda, a redução da capacidade da

divisão celular - G1, G2 e S (IP, 1998); aumento da atividade da tireodioxina redutase e da ativação do sinal de transdução raf-1, que regulam a expressão do gene p53, gene ativo quando o DNA está danificado, como no câncer de próstata (STRATON *et al.*, 2003). Existe também a proposta de que o Se possui a propriedade de inibir a angiogênese, efeito de muita importância para a inibição do crescimento dos tumores sólidos (JIANG *et al.*, 1999).

A Doença de Keshan, uma cardiomiopatia endêmica que aparece em bebês do sexo feminino e em crianças de idade pré-escolar, ocorre nas áreas onde as concentrações de iodo e de selênio no solo, nas fontes de alimentos e no plasma humano são todas baixas. O consumo médio de Se em áreas endêmicas da doença de Keshan foi estimado em 10 µg/dia. Um vírus Coxsackie foi associado com a patogênese dessa doença (TAPIERO, TOWNSEND e TEW, 2003). Outra doença resultante do baixo consumo de Se e iodo é a Doença de Kashin-Beck, uma osteoartropatia endêmica, caracterizada pelo alargamento de ossos e deformidade de juntas, aparecendo durante a infância ou puberdade, progredindo até cessar o crescimento (TAPIERO, TOWNSEND e TEW, 2003).

A ANVISA segundo a RDC N.º 269, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005 recomenda que a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de selênio seja conforme descrito na Tabela 1 (ANVISA, 2005), esses valores são próximos dos recomendados pela *World Health Organization* (2002).

Tabela 1 - INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (IDR) DE SELÊNIO

LACTENTE		CRIANÇAS			GESTANTE	LACTANTE	ADULTOS
0-6 MESES	7-11 MESES	1-3 ANOS	4-6 ANOS	7-10 ANOS			
6 µg	10 µg	17 µg	21 µg	21 µg	30 µg	35 µg	34 µg

FONTE: ANVISA (2005)

2.4 BIOMASSA DE LEVEDURA COMO FONTE DE SELÊNIO ORGÂNICO

As leveduras são micro-organismos eucariotas que constituem um grupo de organismos pertencentes ao reino Fungi, com predominância da forma

unicelular, com células ovais que se multiplicam assexuadamente comumente por brotamento ou gemulação.

As leveduras constituem um grupo de micro-organismos com ampla utilização, com aplicação em um grande número de processos fermentativos e de produtos resultantes, como também no campo dos alimentos, devido ao seu valor nos aspectos nutritivo e aromático (BOURGEOIS e LARPENT, 1995). Devido seu alto teor de proteínas, composição balanceada de aminoácidos e rica em vitaminas do complexo B, são usadas como aditivos na alimentação humana e em forragens (ICIDCA, 1999).

Possuem vantagens em relação a outros micro-organismos, do ponto de vista tecnológico, principalmente devido à sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos, de sua alta velocidade de crescimento e facilidade de separação de sua biomassa (ICIDCA, 1999).

2.4.1 Utilização de leveduras para consumo animal e humano

Há milhares de anos as leveduras têm sido usadas pelos seres humanos em tradicionais processos de fermentação, como produção de cerveja, vinho e pão. Hoje em dia, elas são empregadas também como fontes alternativas de alto valor nutricional de proteínas, enzimas e vitaminas; como suplemento alimentares; para a produção de extratos e meios de cultura microbiológicos; bem como para a produção de novas linhagens para satisfazer as demandas específicas das indústrias alimentícias (BEKATOROU, PSARIANOS e KOUTINAS, 2006).

Segundo esses mesmos autores, o uso de leveduras como fonte de proteínas tem grandes vantagens sobre as fontes convencionais, como a soja e carne, pois têm alto teor de proteínas e elevada velocidade de crescimento, o que proporciona uma rápida produção de biomassa, sendo que esta pode ser contínua e independente de condições ambientais, além de serem facilmente cultivadas utilizando matérias-primas baratas e de serem facilmente separadas devido ao seu maior tamanho e habilidade de precipitação. A aceitabilidade de um micro-organismo em particular para o uso na alimentação humana e animal depende de seu valor nutricional e sua segurança, incluindo o teor de ácidos

nucleicos, presença de toxinas e compostos residuais indesejáveis (BEKATOROU, PSARIANOS e KOUTINAS, 2006).

2.4.2 Suplementação com minerais orgânicos

Segundo Baruselli (2005), o fornecimento de suplementos começou a ser adotado há mais de 2000 anos. O cloreto de sódio, por exemplo, já era fornecido aos animais domésticos desde 40 a 120 anos a.C., com o objetivo de complementar a dieta.

O uso de suplementos minerais orgânicos vem sendo destaque na nutrição animal no mundo inteiro, em função de diversos fatores, dos quais cabe ressaltar: absorção próxima a 100%, alta estabilidade, alta disponibilidade biológica, maior tolerância do organismo do animal (menor toxicidade), ausência de problemas de interação com outros macro e microminerais da dieta, o que pode acarretar na insolubilização de parte dos minerais, ausência de problemas de interação com outros componentes da dieta, como gorduras e fibra, que podem formar ligações indesejáveis com os metais (BARUSELLI, 2005).

Segundo esse mesmo autor, no campo científico da suplementação mineral, esta nova revolução da nutrição animal está sustentada por dois pontos básicos que são: a menor toxicidade e a maior biodisponibilidade dos complexos de minerais orgânicos, fatores que proporcionam uma suplementação com elevada margem de segurança, tanto para o animal como para o consumidor de carne e leite.

2.4.3 Levedura rica em selênio orgânico

As leveduras são capazes de acumular grandes quantidades de selênio e incorporá-lo na forma de Se orgânico, principalmente a selenometionina (SeMet), a qual é a melhor fonte de selênio para os organismos, quando cultivadas em condições apropriadas (DERMICI e PORMETTO, 1999; SUHAJDA *et al.*, 2000).

Segundo a EFSA (2008), os produtos existentes no mercado de levedura rica em selênio orgânico, que utilizam selenito de sódio como fonte de selênio, não apresentam mais do que 2,5 mg de selênio/g levedura seca. A espécie de selênio orgânico predominante é a SeMet com concentração entre 60 e 85% do total de selênio no produto, a concentração de selenocisteína (SeCis) não passa de 10% e a de selênio inorgânico não passa de 1%. A levedura usada pelos produtores de leveduras rica em selênio é a *Saccharomyces cerevisiae*.

A SeMet é prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal. Vários estudos em humanos e animais, particularmente naqueles a respeito de dietas com deficiência de selênio, mostraram que a biodisponibilidade de selênio de levedura rica em selênio e a de SeMet é de aproximadamente 1,5 a 2 vezes maior do que na forma de selênio inorgânico. Depois de absorvida, a SeMet é metabolizada para outras formas funcionais de selênio, como a SeCis, ou direcionada para vias do metabolismo da metionina e estocada como selenoproteína. O estado platô é alcançado a partir de 6-12 meses de suplementação com Se na forma de SeMet ou levedura rica em Se (EFSA, 2008).

Embora a biodisponibilidade de Se proveniente de levedura rica em Se seja alta, vários estudos com animais mostraram que sua toxicidade é menor do que as formas inorgânicas selenito e selenato. Um recente estudo clínico com levedura rica em Se mostrou que não há evidência de toxicidade com ingestão de Se acima de 343 $\mu\text{g}/\text{dia}$ e um nível de 441 μg de Se por litro de sangue, para um período de mais de 4 anos (EFSA, 2008).

Pesquisa realizada pela biópsia de músculo de voluntários do sexo masculino que usaram suplementos de selênio na forma de levedura rica em Se e/ou SeMet por um período de 1 a 24 anos, mostrou que ocorre um aumento de concentração de Se no músculo conforme o aumento da dose de suplemento de Se numa faixa de 62,5 a 262,4 μg de Se por dia. O aumento relativo de Se no músculo foi menor do que o aumento da dose de Se, e os resultados indicaram que o nível de Se no músculo não depende da duração da suplementação (1-24 anos). Os pesquisadores argumentaram que a suplementação com levedura rica em Se não leva a uma estocagem permanente de Se, mas sim a uma situação de estado platô no qual o excesso

é excretado e que esses dados excluem de maneira eficaz a probabilidade de que a suplementação com levedura rica em Se a longo prazo ocasione um aumento na concentração de Se nos tecidos a níveis tóxicos (EFSA, 2008).

2.5 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A fermentação submersa, entre as técnicas de fermentação, é a mais utilizada. Nessa técnica de cultivo os micro-organismos se desenvolvem em um meio líquido e todas as variáveis do processo podem ser facilmente controladas, diferentemente do que ocorre na fermentação em estado sólido, na qual os processos de transferência de massa, como a difusão de gases e nutrientes, além da temperatura, são prejudicados (BOKHARI, FAROOG e RAJOKA, 2008). Possui a vantagem da etapa de recuperação celular ser facilmente realizada, e também do meio de cultivo estar qualitativamente e quantitativamente mais equilibrado e homogêneo, devido o substrato estar dissolvido na fase líquida. Segundo Wentzel *et al.* (2012), a fermentação submersa também proporciona uma excelente reprodutibilidade nas réplicas, acompanhadas de perto por análises aplicadas *on-line* e *off-line*.

A fermentação submersa pode ser realizada pelos modos batelada, batelada alimentada ou contínua. A fermentação em batelada é um sistema de cultivo fechado que contém quantidades limitadas de nutrientes, podendo levar a baixos rendimentos e produtividades, porém apresenta a vantagem de menor risco de contaminação; na fermentação em batelada alimentada o substrato é adicionado ao fermentado em condições controladas até atingir o volume do biorreator, proporcionando uma produtividade alta devido ao grande número de células viáveis no meio de fermentação; já na fermentação contínua, a alimentação é realizada de modo contínuo a uma determinada vazão, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada contínua do caldo fermentado, pode proporcionar uma maior produtividade que os outros modos, porém é mais suscetível à contaminação bacteriana (STANBURY, WHITAKER, e HALL, 1995).

2.5.1 Valorização de subproduto agroindustrial

Muitos processos fermentativos industriais vêm sendo introduzidos ou aperfeiçoados aproveitando o potencial de matérias-primas renováveis como diversos resíduos agroindustriais e sub-produtos tais como casca e bagaço de frutas e legumes, melaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, melaço de soja e outros que podem ser utilizados como substratos para produção de compostos de maior valor agregado. Dentre alguns dos produtos obtidos tem-se: enzimas, proteínas, etanol, ácidos orgânicos, hormônios, compostos de aroma, *single cell protein*, entre outros (MEDEIROS *et al.*, 2000; SERAFINI, BARROS E AZEVEDO, 2002; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2009; YIN *et al.*, 2009; LETTI *et al.*, 2012; SALMON *et al.*, 2012).

2.5.1.1 Melaço de cana-de-açúcar

O Brasil além de ser o maior produtor de cana-de-açúcar, é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol, e está cada vez mais conquistando o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o Brasil deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, e colher 47,34 milhões de toneladas do produto, o que corresponde a um acréscimo de 14,6 milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas (MAPA, 2013).

De acordo com o terceiro levantamento da safra 2012/2013 de cana-de-açúcar realizada pela Companhia Nacional de abastecimento (Conab), no âmbito de um programa de cooperação com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a produção de cana-de-açúcar na safra 2012/13 deve aumentar 6,5%, passando de 560,36 milhões de toneladas na safra anterior para 595,13 milhões de toneladas na atual. Em relação à produção de açúcar, espera-se um incremento de 4,72%, totalizando 37,66 milhões.

Quando observada a indústria açucareira da cana-de-açúcar no mundo, constata-se que essa indústria, no Brasil, tem características próprias que a

diferenciam de suas congêneres em outros países, uma delas está na tradicional diversidade dos produtos comerciais que são fabricados a partir do caldo da cana-de-açúcar e dos resíduos sólidos e líquidos da moagem. Destacam-se nesta lista de produtos, além do açúcar e do álcool etílico, a cachaça e a rapadura, produtos extraídos do caldo e produzidos em pequenas fábricas especializadas nesta atividade e a cogeração de energia elétrica gerada com a queima do bagaço (CONAB, 2012).

O melaço da cana-de-açúcar é o licor resultante da cristalização final do açúcar, do qual não pode mais ser extraído o açúcar sacarose pelos métodos convencionais. Aproximadamente 60% dos sólidos são compostos por sacarose, glicose e frutose. Os principais componentes do melaço são a água e os carboidratos, além de compostos que não são carboidratos de origem orgânica como: aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos e olefínicos, vitaminas, proteínas, fenóis e outros. O melaço de cana-de-açúcar é constituído por uma fração de origem mineral de grande importância, na qual estão presentes mais de 20 metais e não-metais em diferentes proporções. Entre os cátions encontrados, o potássio, o cálcio e o magnésio ocupam mais de 98% do total (ICIDCA, 1999).

Do nitrogênio presente no melaço somente 35% são assimilados, na forma de proteína pura, contando com um adicional de 7% de componentes nitrogenados na forma de ácidos nucleicos, aminoácidos livres e outros compostos. A composição de aminoácidos no melaço é de 1%, entre os quais se destacam os ácidos aspártico e glutâmico, que constituem mais de 70% do total (ICIDCA, 1999).

2.6 PLANIFICAÇÃO EXPERIMENTAL

Em um processo fermentativo industrial se busca maximizar a concentração de produtos, o rendimento e seletividade, e ao mesmo tempo minimizar o custo das matérias-primas e do processo; além de tornar o processo robusto, tornando-o menos influenciável por variáveis externas. Os processos fermentativos microbiológicos e enzimáticos são dependentes de vários fatores, como do meio de cultura (fonte de carbono e nitrogênio, sais minerais, fatores de crescimento, entre outros), das condições do processo (temperatura,

pH, taxa de aeração, velocidade de agitação, entre outros), de fatores que implicam na mudança de escala, como da escala de bancada em frascos agitados em *shakers* para a escala industrial em biorreatores; e ainda dos modos de cultivo, podendo ser batelada, batelada-alimentada ou contínua (PANDEY *et al.*, 2008).

De acordo com Rodrigues e Iemma (2005) o planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos é uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolvimento de produtos dentro das especificações desejadas ou simplesmente para avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas. Várias estratégias podem ser utilizadas para se atingir esse objetivo, sendo os delineamentos fatoriais incompletos ou os de Plackett & Burman excelentes para uma avaliação prévia das variáveis e seleção daquelas que devem ser consideradas, até se chegar ao delineamento composto central rotacional (DCCR).

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

De acordo com Mandenius e Brundin (2008), o planejamento experimental estatístico, design fatorial e o delineamento de experimentos (DOE) são mais ou menos conceitos parecidos utilizados para investigar relacionamentos matemáticos entre variáveis de entrada e saída do sistema.

Segundo Rodrigues e Iemma (2005), dentre as vantagens de se utilizar o Planejamento Experimental tem-se:

- redução do número de experimentos ou repetições e a melhoria da qualidade de informação obtida através dos resultados;
- os fatores são analisados simultaneamente, sendo possível verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse;
- é possível otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo, podendo maximizar variáveis como rendimento, produtividade e pureza, e/ou minimizar as variáveis custo e contaminação, entre outras;

- permite calcular e avaliar o erro experimental, que é de fundamental importância para especificar o nível de confiança estatística com o qual se pode estimar a reprodutibilidade do resultado desejado.

No trabalho de Yin *et al.* (2009) foi realizada a otimização dos componentes do meio de cultivo para produção da levedura *S. cerevisiae* rica em selênio. Para a otimização os autores utilizaram a metodologia de superfície de resposta e obtiveram uma produção de biomassa de 8,5 g/L e 3,53 mg/L de Se incorporado. Posteriormente, Yin, Fan e Gu (2010) continuaram os estudos de otimizações e utilizaram também a metodologia de superfície de resposta para analisarem as condições de cultivo (temperatura, pH inicial e volume), obtendo no final uma biomassa de 9,23 g/L e 5,90 mg/L de Se incorporado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas neste trabalho 2 cepas de *Saccharomyces boulardii*:

- a) a cepa denominada de SbM isolada do medicamento Floratil®100-*Saccharomyces boulardii*-17 liofilizado 100 mg, da empresa Merck, Lote:BR27458, Fab.: 02/11, Val.: 02/13;
- b) a cepa denominada de Sb4308 proveniente do banco de cepas André Tosello, CCT4308, Lote: 10.94, localizada em Campinas-SP.

3.2 MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O resíduo agroindustrial testado como fonte de carbono nos experimentos foi o melaço de cana-de-açúcar, uma fonte de açúcares metabolizados por leveduras. O melaço de cana-de-açúcar utilizado nos testes, com 95°B, foi doado pela empresa Ourofino Agronegócio situada na cidade de Ribeirão Preto, SP, sendo proveniente da Usina São Manoel, localizada no município de São Manuel- SP.

3.3 MEIO DE CULTIVO

3.3.1 Meio *Yeast Malt extract* (YM) Líquido

O meio YM líquido, utilizado para o preparo do inóculo e para a produção de biomassa nos estudos iniciais, é composto por: Extrato de Levedura, 3 g/L; Extrato de Malte, 3 g/L; Peptona, 5 g/L; Glicose, 10 g/L; Água, qsp.

3.3.2 Meio YM sólido

O meio YM sólido, utilizado para a manutenção das cepas, é composto pelos seguintes ingredientes: Extrato de Levedura, 3 g/L; Extrato de Malte, 3 g/L; Peptona, 5 g/L; Glicose, 10 g/L; Ágar, 20 g/L; Água, qsp.

3.4 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

As cepas das leveduras liofilizadas foram reativadas com 50 mL de meio de cultivo YM líquido esterilizado distribuído em frascos de Erlenmeyer de 125 mL e incubadas a 30°C, 120 rpm por 48 horas. Após este período a solução de micro-organismos foi fracionada e conservada em YM líquido e glicerol a -20°C, -80°C e em nitrogênio líquido. As culturas de trabalho foram mantidas em tubos contendo meio YM sólido inclinado a 4°C e foram repicadas para um novo meio de cultivo YM sólido a cada 2 semanas.

3.5 PREPARO DO INÓCULO

Procedeu-se a transferência de uma alçada de células contidas em um tubo inclinado (cultura de trabalho) para cada 50 mL de meio YM líquido contido em frasco de Erlenmeyer. O frasco foi incubado sob agitação em incubador do tipo *Shaker* a 30°C e 120 rpm inicialmente por 24 horas. Após o estudo cinético do inóculo, esse tempo de incubação foi diminuído para 20 horas.

Depois de otimizado o meio de cultivo, o inóculo foi preparado como descrito acima, porém utilizando o meio de cultivo otimizado e não o YM líquido.

3.6 BIOPROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA PROBIÓTICA E ENRIQUECIDA COM SELÊNIO DE *S. boulardii*

Os componentes do meio de cultivo utilizados foram pesados em balança semi-analítica da marca BEL Engineering - modelo MARK 3500 ou em balança analítica da marca BEL Engineering - modelo MARK 210^a e, após o preparo com água destilada foram acondicionados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo no total 50 mL de meio cada, ou em biorreator, contendo 9 L de meio. Em seguida, o material foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

A fonte de selênio inorgânico utilizada para o bioacúmulo foi o selenito de sódio (Na_2SeO_3) da marca Synth, lote: 135100, validade: 20/07/2013. Uma solução estoque de Na_2SeO_3 foi preparada separadamente para evitar que o sal se complexasse com alguma substância do meio de cultivo durante o tratamento térmico. A concentração desta foi de 13750 ppm e o volume adicionado ao meio de cultivo foi definido conforme a concentração final desejada de Se para cada teste, sendo realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar. No caso do cultivo em biorreator essa adição foi realizada através de seringa e agulha estéreis.

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o item 3.5. A adição do inóculo, na taxa de 10% v/v, também foi conduzida em condições assépticas. O processo foi realizado em batelada e em batelada alimentada com melaço de cana-de-açúcar. Essa solução de melaço de cana foi preparada e esterilizada separadamente e adicionada ao fermentado (taxa de 10% v/v) nas concentrações e tempos a serem testados.

Após o processo de cultivo da biomassa, o fermentado foi centrifugado conforme subitem 3.7.1.

O sobrenadante separado foi utilizado para as análises de açúcares totais e redutores, descritas nos subitens 3.8.1.2. e 3.8.1.3, respectivamente, e para a análise de selênio inorgânico não bioacumulado (absorvido/adsorvido) pela *S. boulardii*, descrito no subitem 3.9.1.1.

A quantidade de biomassa seca de *S. boulardii* obtida na fermentação foi avaliada conforme subitem 3.8.2.1. e a concentração de selênio total e orgânico na biomassa foi avaliada conforme itens 3.9.2 e 3.9.3, respectivamente.

As metodologias de digestão da biomassa utilizadas para análise de selênio total por espectrometria de absorção atômica e por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa estão descritas nos itens 3.9.2.1. e 3.9.3.1.

A produção de *S. boulardii* otimizada nesse trabalho pode seguir dois caminhos: produção de biomassa a ser utilizada como probiótico e também a produção de levedura rica em selênio orgânico. Dependendo da finalidade, a biomassa concentrada por centrifugação é seca através de liofilização ou

através de estufa a 60°C com circulação de ar. Esse dois produtos podem ser utilizados separadamente ou juntos, conforme a necessidade do cliente.

A Figura 2 ilustra o fluxograma do bioprocesso de produção de biomassa de *S. boulardii* para ser utilizada pela sua propriedade probiótica. Em escala laboratorial os testes foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, com agitação em agitador do tipo *Shaker* e, depois de otimizadas as condições, passou-se a realizar o cultivo em Biorreator New Brunswick Scientific – Bioflo 110.

A Figura 3 ilustra o fluxograma do bioprocesso de produção de biomassa de *S. boulardii* rica em selênio orgânico. Em escala laboratorial utilizou-se frascos de Erlenmeyer de 125 mL, com agitação em agitador do tipo *Shaker* e, posteriormente, o cultivo foi realizado em Biorreator New Brunswick Scientific – Bioflo 110.

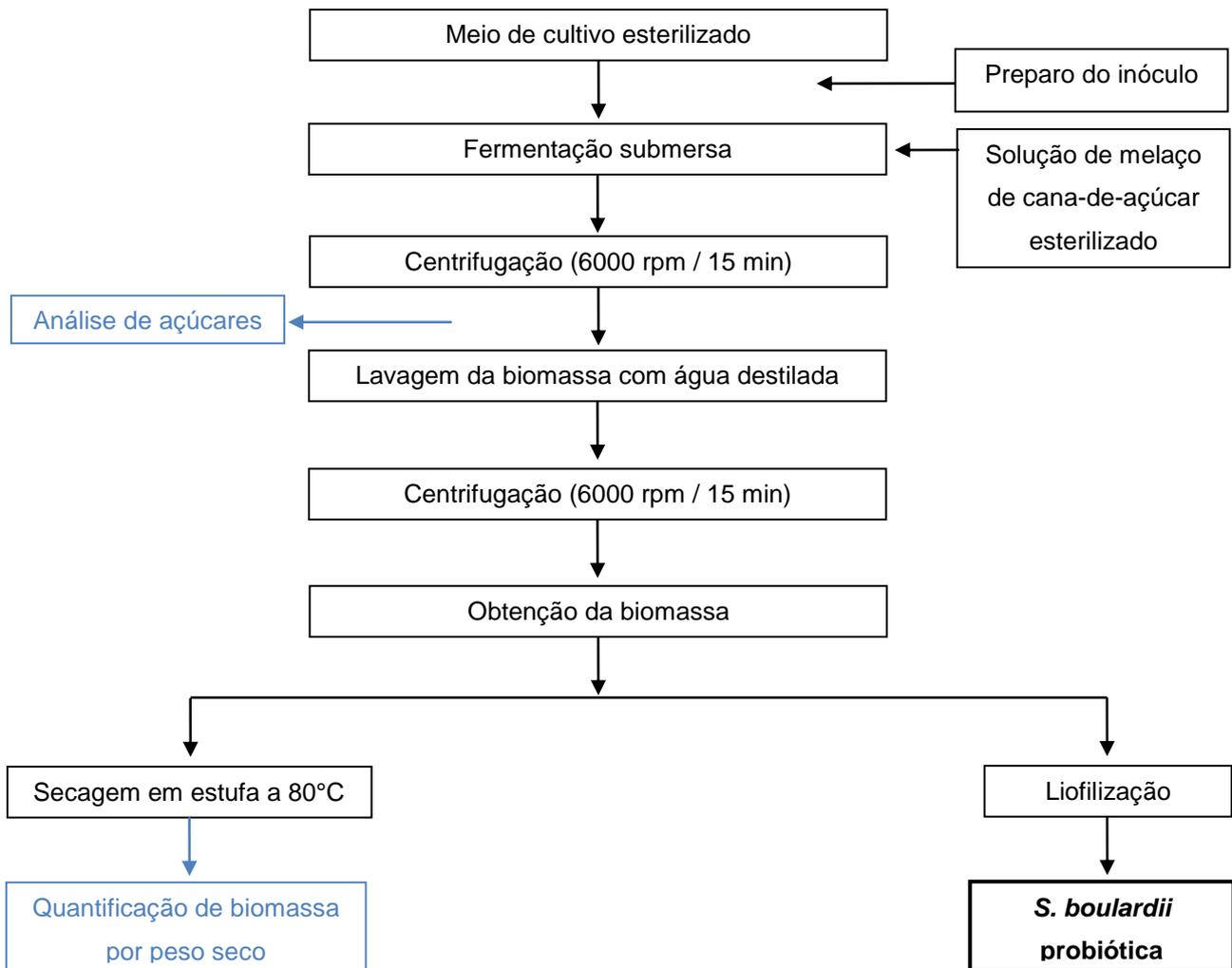


Figura 2 - FLUXOGRAMA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA PROBIÓTICA *S. boulardii*. FONTE: O AUTOR (2012).

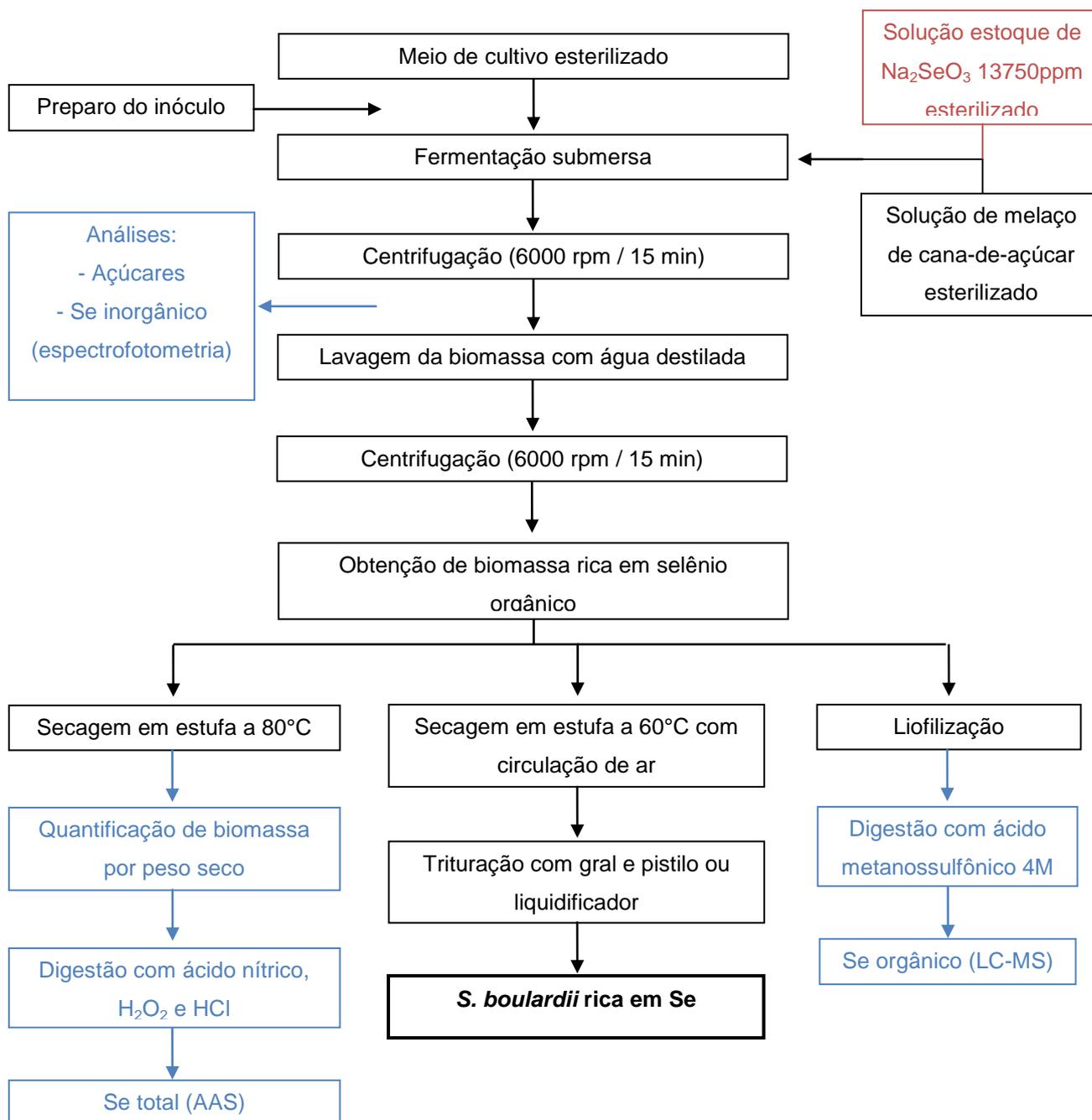


Figura 3 - FLUXOGRAMA DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* ENRIQUECIDA COM SELÊNIO ORGÂNICO. FONTE: O AUTOR (2012)

3.7 ETAPAS DE DOWNSTREAM

3.7.1 Centrifugação

Após o término da fermentação, seguiu-se para as etapas de separação e concentração celular do fermentado por centrifugação em centrífuga da marca Sorvall-Legend Mach 1.6R a 6000 rpm refrigerada a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e a biomassa restante foi lavada com água destilada. A mistura foi submetida novamente à centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante separado foi utilizado nas análises de açúcares totais e redutores, como também para análise de selênio livre restante no meio de cultura através do método espectrofotométrico da reação com Azure B (conforme subitem 3.9.1.1).

A biomassa precipitada foi seca em estufa a 80°C até obtenção de peso constante para análise de biomassa por peso seco.

3.7.2 Liofilização

A liofilização da biomassa concentrada foi realizada no liofilizador Thermo-Electron Corporation- Modulyo D Freeze Dryer.

O método de secagem por liofilização também foi utilizado para análise de selênio orgânico bioacumulado por método de LC-MS, conforme subitem 3.9.3.

3.7.3 Secagem em estufa com circulação de ar

A biomassa rica em selênio orgânico, a qual foi separada e concentrada por centrifugação, foi seca em estufa da marca Tecnal, modelo TE-394/3, a 60°C com renovação e circulação de ar e, posteriormente, foi triturada com auxílio de pistilo e gral ou de liquidificador, conforme escala de produção.

3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS QUÍMICO-MICROBIOLÓGICAS

3.8.1 Químicas

3.8.1.1 Determinação do pH

O pH do meio de cultivo utilizado foi determinado através de um potenciômetro digital da marca MSTecnopon Instrumentação e modelo mPA210.

3.8.1.2 Determinação de açúcares totais

O método utilizado para a dosagem de açúcares totais no meio de cultivo foi o método do fenol sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) que preconiza o uso de meio fortemente ácido e é um método simples, rápido, sensível e com resultados reprodutíveis. A reação é baseada na desidratação do carboidrato na presença do ácido sulfúrico, produzindo um aldeído que é capaz de se condensar com duas moléculas de fenol resultando no composto colorido. (DUBOIS *et al.*, 1956).

Essa técnica dispensa hidrólise da amostra, visto que utiliza ácido sulfúrico concentrado. A reação compreende 1,0 mL da amostra ou de padrão e 1,0 mL de fenol 5% (0,53 Mol/L), ao qual se adiciona, rapidamente, 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação é exotérmica, sendo necessário o resfriamento à temperatura ambiente antes de fazer a leitura da absorbância a 490 nm (DUBOIS, *et al.* 1956).

Para as análises realizadas nesse trabalho os volumes utilizados foram adaptados para: 0,5 mL de amostra ou de padrão, 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo este último adicionado rapidamente com auxílio de um pipetador automático. A leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro da marca Spectrum UV-Vis spectrophotometer, modelo Série-SP-2000UV. Todas as análises foram realizadas em triplicata e para a calibração do equipamento foi utilizada água destilada como amostra e os demais reagentes, processando da mesma maneira.

A curva padrão de calibração dos açúcares totais foi realizada partindo-se de uma solução estoque de glicose de 200 µg/mL a partir da qual se obteve as soluções de trabalho nas concentrações de 40 µg/mL, 80 µg/mL, 120 µg/mL e 160 µg/mL do açúcar.

Os resultados foram expressos em g/L de açúcares totais.

3.8.1.3 Determinação de açúcares redutores

A dosagem dos açúcares redutores no meio de cultivo foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por (MILLER,1959) que tem como princípio o fato dos açúcares reduzirem o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) na presença de hidróxido de sódio, para o composto 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor laranja-avermelhado, que pode ser facilmente mensurado em 540 nm. A redução do reagente DNS ocorre a quente.

O reagente de DNS foi preparado conforme consta na Tabela 2. As frações A e B foram levadas ao aquecimento separadamente até completa solubilização dos sais. Após a solubilização, as duas frações foram homogeneizadas e o volume acertado com água destilada para 500 mL de solução final. Este reagente foi armazenado a temperatura ambiente em frasco âmbar.

Tabela 2 - COMPOSIÇÃO REAGENTE DINITROSALICILICO (DNS)

PARTE	REAGENTE/SOLUÇÃO	MASSA (g)/ VOLUME (mL)
A	Ácido 3,5-dinitrosalicílico	5,0 g
	Solução NaOH 2M (8,0g NaOH/100,0mL água)	100,0 mL
B	Tartarato duplo de sódio e potássio	150,0 mL
	Água destilada	250,0 mL

NOTA: O VOLUME FINAL DEVE SER COMPLETADO COM ÁGUA DESTILADA q.s.p. 500,0 mL. FONTE: O AUTOR (2012)

Após o preparo das amostras em triplicata, foram adicionados 100 µL de reagente DNS em 100 µL de amostra e levados a fervura em banho-maria durante 5 minutos. Decorrido este tempo, esperou-se o resfriamento e foram adicionados 500 µL de água destilada seguido de homogeneização. Foram pipetados 200 µL da amostra em poços de microplaca de ELISA e procedeu-se a leitura das absorbâncias no leitor de ELISA da marca Biotek-Power Wave XS. O equipamento foi calibrado com uma amostra contendo apenas água

destilada e reagente DNS, processada da mesma forma que as demais amostras.

A curva padrão de calibração dos açúcares redutores foi realizada partindo-se de uma solução estoque de glicose de 2 g/L a partir da qual se obteve as soluções de trabalho nas concentrações de 0,2 g/L, 0,6 g/L, 1,0 g/L, 1,4 g/L, 1,8 g/L do açúcar.

Os resultados foram expressos em g/L de açúcares redutores.

3.8.2 Microbiológicas

3.8.2.1 Determinação do peso seco de biomassa produzida

A quantidade de biomassa produzida durante a fermentação foi determinada através do método direto, que consiste na secagem do material produzido e determinação do peso seco.

A biomassa de levedura foi colhida por centrifugação, etapa descrita no subitem 3.6.1. em tubos Falcon previamente tarados e colocados em estufa de secagem a aproximadamente 80°C por 24 horas (peso constante). Os tubos foram transferidos para um dessecador até o resfriamento à temperatura ambiente e foram então pesados em balança analítica.

A biomassa obtida foi calculada através da equação:

$$\text{Peso seco (g/L)} = \frac{(\text{peso tubo com biomassa (g)} - \text{peso tubo vazio (g)}) \times 1000}{\text{volume de fermentado utilizado (mL)}} \quad (1)$$

A biomassa seca por esse método foi utilizada para análise de selênio total por espectrometria de Absorção Atômica, conforme subitem 3.9.2.

3.8.2.2 Contagem de células totais

Para a contagem de células totais o cultivo foi diluído em diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} e realizou-se a contagem utilizando a câmara de Neubauer.

A diluição adequada foi homogeneizada e um pequeno volume da mesma foi transferido para câmara de Neubauer com o auxílio de uma pipeta

de Pasteur encostando-se cuidadosamente a ponta da pipeta na borda da lamínula e levou-se a mesma para contagem em microscópio óptico em objetiva de 40 vezes (aumento de 400 vezes). Contou-se aproximadamente 40 células por campo ou três células por retículo, escolhendo dois limites em cada quadrado, nos quais foram contadas as células que estão nos limites superior e lateral esquerdo do quadrado, e desprezadas as do limite inferior e lateral direito.

Os resultados foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ células totais/mL} = (\text{média do n}^\circ \text{ de células contadas} \times \text{diluição}) / 4 \times 10^{-6} \quad (2)$$

3.8.2.3 Viabilidade celular

Para a determinação de células viáveis foi realizada uma diluição inicial de 1:10 na qual 1,0 mL das suspensões celulares foi diluído em 9,0 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,85%) e, assim, procedeu-se uma diluição seriada até uma diluição de 10^{-6} . 0,1 mL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram utilizadas para cultivo em superfície em placa de Petri contendo meio YM sólido. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. As diluições foram plaqueadas em triplicatas e a média do n° colônias das três placas foi utilizada para o cálculo para obtenção das unidades formadoras de colônia (UFC)/mL:

$$\text{UFC/mL} = (\text{média do n}^\circ \text{ colônias} \times \text{fator de diluição}) \times 10 \quad (3)$$

3.9 DETERMINAÇÕES DE SELÊNIO

O sal de selênio utilizado para o bioacúmulo de selênio pela levedura foi o selenito de sódio (Na_2SeO_3), da marca Synth, lote: 135100, validade: 20/07/2013.

3.9.1 Espectrofotometria UV/Vis

A análise de selênio inorgânico restante no sobrenadante do fermentado foi realizado por método espectrofotométrico para leitura da reação

colorimétrica da amostra com o reagente Azure B segundo subitem 3.9.1.1 abaixo. A leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro Spectrum UV-Vis spectrophotometer – Série SP-2000UV no comprimento de onda de 644 nm.

3.9.1.1 Determinação de selênio inorgânico por Reação com Azure B

A dosagem de selênio inorgânico residual no meio fermentado, e assim não absorvido/adsorvido pela levedura, foi realizada através do método espectrofotométrico da reação com Azure B, desenvolvido por Mathew e Narayana (2006). Segundo os autores, o princípio desse método consiste em: o selênio (SeO_3^{2-}) reage com iodeto de potássio (KI) em meio ácido e libera iodo (I_2), este por sua vez altera a cor violeta do azure B para menos colorido, segundo o esquema abaixo (Figura 4):

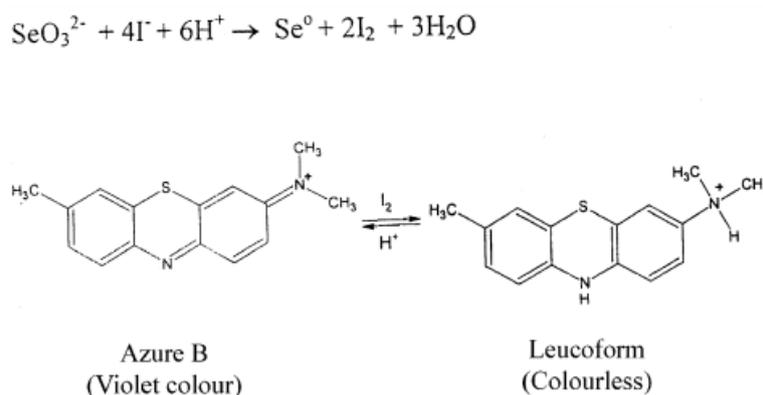


Figura 4 - REAÇÃO DO SELÊNIO INORGÂNICO COM KI EM MEIO ÁCIDO, ALTERANDO A COLORAÇÃO DO REAGENTE AZURE B. FONTE: MATHEW & NARAYANA (2006)

Nesse método, a oxidação do iodeto para iodo pelo Se é realizada em pH 1,0 – 1,5. Sendo que 1,0 mL de KI 2% e 1,0 mL de HCl 2M são suficientes para a liberação de I_2 . A leitura da absorção é realizada no comprimento de onda 644 nm.

Os reagentes utilizados na reação são: Solução estoque de Na_2SeO_3 (1000 $\mu\text{g/L}$) para curva de calibração, HCl 2M, KI 2% e Solução de Azure B 0,1% em metanol-água (1:1). O limite de detecção do método está entre 2,0 a 10,0 $\mu\text{g/L}$ de Se.

No procedimento desenvolvido por Mathew e Narayana (2006) adicionam-se 1,0 mL de KI 2% e 1,0 mL de HCl 2% em 1,0 mL de amostra, mistura-se e, posteriormente, adicionam-se 0,5 mL da solução de Azure B 0,1% e agita-se por 2 min. A solução é diluída para 10 mL com água destilada e faz-se a leitura da absorbância a 644 nm.

Foram realizados vários testes para a adequação desse método às amostras desse trabalho, sendo o procedimento modificado. Houve uma diminuição da solução de Azure B 0,1% adicionada, de 0,5 mL para 0,3 mL; a agitação da solução foi realizada em agitador tipo Vortex e após diluição para 10 mL com água destilada, foi realizada a filtração das amostras utilizando-se papel filtro.

A calibração do equipamento foi realizada com o branco, no qual se substitui a solução de Na_2SeO_3 /amostra por água destilada.

Para a curva de calibração foi preparada uma solução estoque de Na_2SeO_3 de 100 ppm a partir da qual foram obtidas as soluções de trabalho nas concentrações de 2,0 ppm, 5,0 ppm, 7,5 ppm e 10,0 ppm.

3.9.2 Espectrometria de Absorção atômica

A leitura da concentração de selênio total bioacumulada (absorvida/adsorvida) na biomassa foi realizada no equipamento de espectrometria de absorção atômica (AAS- *Atomic absorption spectroscopy*) de chama da marca Varian SpectrAA 100-200 (Figura 5) do Laboratório de Pesquisa Hidrogeológicas (LPH) situado na UFPR. Utilizou-se para produzir a chama a combinação oxidante-combustível de ar-acetileno e lâmpada de cátodo oco de selênio. Na Tabela 3 são apresentadas as condições operatórias utilizadas. Esses parâmetros foram estabelecidos de acordo com o manual do equipamento.

Tabela 3 - PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO TOTAL - AAS

Comprimento de onda	196,0 nm
Fenda do monocromador	1,0 nm
Intensidade da lâmpada	10,0 Ma
Tempo de leitura	10 seg
Tempo entre as leituras	35 seg
Fluxo do ar	13,5 dm ³ .min ⁻¹
Fluxo do acetileno	2,10 dm ³ .min ⁻¹
Introdução da amostra	Manual



Figura 5 – EQUIPAMENTO DE ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA. FONTE: O AUTOR (2012).

3.9.2.1 Digestão da biomassa para determinação de selênio total

Para análise de selênio total bioacumulado, através da espectrometria de absorção atômica, a biomassa produzida foi submetida a um processo de digestão ácida na qual se pesou 0,3 g de biomassa seca e adicionou-se 2,5 mL de ácido nítrico. Essa mistura permaneceu em temperatura ambiente por 12 horas. Após esse tempo, a amostra foi colocada em banho-maria a 65°C por 1 hora. Após o desprendimento de vapores nitrosos, acrescentou-se 1,0 mL de peróxido de hidrogênio permanecendo por mais 1 hora a 65°C em banho-maria. Posteriormente, foi adicionado 15 mL de água ultra pura e 25 mL de ácido clorídrico 6M, a amostra foi aquecida por 1 hora a 90°C em banho-maria. Depois desta etapa, foi realizada a aferição do volume em balão volumétrico para 50 mL com água ultra pura. Finalmente, a amostra foi filtrada a vácuo com membrana de ésteres de celulose MF-Millipore, hidrofílica, de 0,45 µm de porosidade (MIEKELEY, DIAS CARNEIRO e PORTO DA SILVEIRA, 1998).

3.9.3 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

Com o objetivo de quantificar e realizar a especiação de selênio orgânico bioacumulado pela levedura *S. boulardii*, nas formas de SeMet ou SeCis, foram realizados testes de metodologias de análise pelo equipamento de Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS - *Liquid chromatography-mass spectrometry*) da marca Agilent 6100 (Figura 6). As condições operatórias utilizadas foram baseadas na metodologia apresentada por McSheehy *et al.* (2005) e determinadas após a realização de vários testes para as amostras do trabalho.

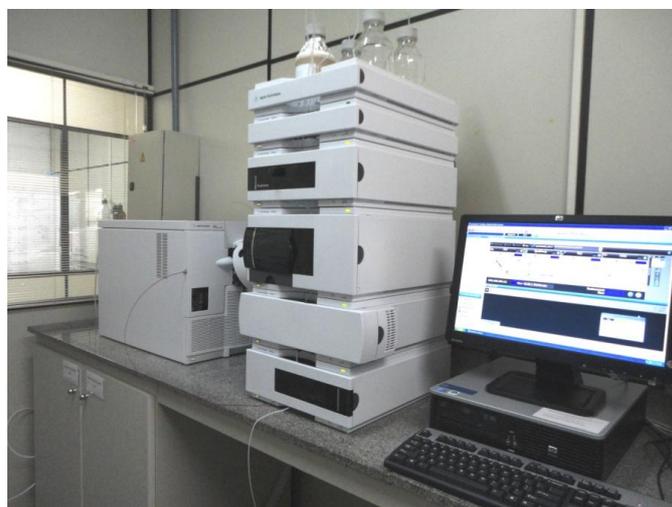


Figura 6 – EQUIPAMENTO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA. FONTE: O AUTOR (2012).

Para os estudos no LC-MS, foram utilizados os seguintes padrões: metionina (Sigma-Aldrich, Japan) lote: 037K0070; seleno-DL-metionina (Sigma-Aldrich, Japan) lote: 042K2578 e cloridrato de Se-(metil)selenocisteína (Sigma-Aldrich, USA) lote: 1001 194262.

3.9.3.1 Digestão da biomassa para determinação de selênio orgânico

Para análise do selênio orgânico bioacumulado pela levedura produzida, a amostra foi submetida a uma digestão ácida mais branda, na qual as proteínas foram quebradas em aminoácidos para que as formas orgânicas do selênio, SeMet e SeCis, pudessem ser detectadas pelo LC-MS.

O estudo da digestão da amostra foi baseado na metodologia desenvolvida por Wrobel *et al* (2003) que utiliza o ácido metanossulfônico para digestão de *S. cerevisiae* selenizada.

Dessa forma, de acordo com o método de Wrobel *et al* (2003), para a digestão foi pesado 0,05 g de biomassa liofilizada, adicionou-se 10 mL de ácido metanossulfônico 4M da (Sigma-Aldrich, France) lote: STBC2824V, validade: 30.07.2012; e 200 μ L de β -mercaptoetanol (Vetec, Brazil) lote: 1008870, validade: 11/2012, que age como antioxidante, em balão de fundo chato de 125 mL. A amostra foi submetida ao aquecimento em chapa sob refluxo com auxílio de um condensador de bolas por 8 horas, tempo dito suficiente por McSheehy *et al.* (2006), como mostrado na Figura 7. Pérolas de vidro foram adicionadas para regular a ebulição. Decorrida a digestão, a amostra foi aferida para 100 mL em balão volumétrico.

Para análise no LC-MS a amostra passou por uma pré-filtração utilizando papel filtro e, posteriormente, por filtração à vácuo com membrana de ésteres de celulose MF-Millipore, hidrofílica, de 0,22 μ m.



Figura 7 - SISTEMA DE DIGESTÃO DA BIOMASSA SECA POR REFLUXO. FONTE: O AUTOR (2012)

Baseando-se nessa metodologia de digestão ácida de biomassa desenvolvida por Wrobel *et al.* (2003) para a levedura *S. cerevisiae*, foram realizados outros estudos de digestão, visto que não foi possível detectar e quantificar Se orgânico pelo LC-MS. Tal fato deve-se provavelmente à levedura em estudo ser da espécie *S. boulardii* e apresentar diferenças morfológicas com a espécie *S. cerevisiae* utilizada por Wrobel *et al.*

Foi utilizado também o método de ruptura celular por sonicação. Foi utilizado o equipamento Desruptor de célula - Ultrassônico da marca Unique (Freq.US 19KHz, Potência US 500W), no qual a biomassa passou por 4 ciclos de 1 minuto a uma potência de 99%.

3.10 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS SbM E Sb4308

Nesse estudo foram realizados experimentos com o intuito de se conhecer o perfil de crescimento das cepas SbM e Sb4308. Sendo assim, foram determinados os tempos de cultivo da produção do inóculo e da fermentação para dar início aos estudos de otimização das condições do processo.

O inóculo foi preparado conforme item 3.5. em meio YM líquido. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% v/v referente ao volume total. Os cultivos foram realizados em 100 mL de meio YM líquido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. A incubação foi feita a 30°C e a agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker* (Figura 8). As análises foram realizadas para os tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas.



Figura 8 – CULTIVO EM FRASCOS DE ERLLENMEYER COM AGITAÇÃO EM AGITADOR DO TIPO *SHAKER*. FONTE: O AUTOR (2012)

Foram realizadas as análises de biomassa obtida por peso seco, conforme subitem 3.8.2.1.; contagem de células totais, conforme subitem 3.8.2.2. e viabilidade celular, conforme subitem 3.8.2.3.

3.11 ESTUDO DA TEMPERATURA DE CULTIVO

Os crescimentos das cepas SbM e Sb4308 na temperatura de 37°C, temperatura ótima de crescimento da *S. boulardii* segundo Czerucka (2007) e Buts (2009), foram analisados para comparação com as biomassas obtidas nos cultivos realizados a 30°C, que é usualmente utilizada para a levedura do gênero *Saccharomyces*).

O inóculo foi preparado conforme item 3.5. em meio YM líquido. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% v/v referente ao volume total. Os cultivos foram realizados em 100 mL de meio YM líquido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*, em triplicata. A análise de biomassa seca (g/L) foi realizada para o tempo de 48 horas, conforme subitem 3.8.2.1.

3.12 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Com o objetivo de aumentar a biomassa produzida e utilizando no meio de cultivo o resíduo agroindustrial melaço de cana-de-açúcar, foram realizados experimentos para a otimização do meio de cultivo. Para essa otimização foram realizados 3 planejamentos experimentais: do tipo Plackett & Burman, Fatorial Incompleto $2^{(5-2)}$ e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3 .

Nesta etapa de otimização do meio de cultivo partiu-se inicialmente do meio de cultivo modificado (Tabela 4) baseado no meio utilizado por Wang, Zhang e Tan (2010) para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* para bioacúmulo de selênio.

Tabela 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO INICIAL PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii*

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Glicose	32,0
Melaço de cana	20,0
Extrato de levedura	15,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,006
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,006
MnSO ₄ .H ₂ O	0,006

Para os planejamentos experimentais o inóculo foi preparado conforme item 3.5. com o meio de cultivo Wang, Zhang e Tan (2010) modificado (Tabela 4). Após a otimização do meio de cultivo, a preparação do inóculo passou a ser realizado com esse meio. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% v/v referente ao volume total. Os crescimentos foram realizados em 50 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, a incubação foi feita a 30°C, agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*. A análise de biomassa por peso seco foi realizada para o tempo de 48 horas e conforme subitem 3.8.2.1.

3.12.1 Seleção de variáveis significativas por Planejamento Experimental tipo Plackett & Burman

Iniciou-se a otimização dos componentes do meio de cultivo com um planejamento experimental do tipo Plackett e Burman com 16 ensaios mais 3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios. Observou-se assim, a influência desses componentes na variável resposta biomassa seca (g/L). A cepa utilizada nesse planejamento foi a Sb4308 e o delineamento do planejamento, assim como a análise dos resultados foram realizados através do Software *Statística 5.0*.

Na construção dessa matriz (Tabela 5) foram tomados os cuidados descritos por RODRIGUES e IEMMA (2005) como ter no mínimo de 4 ensaios a mais do que o número de variáveis a serem estudadas no processo, deixando assim graus de liberdade para cálculo do erro padrão e a realização de no mínimo três repetições na condição do ponto central.

Tabela 5 - MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN

ENSAIO	GLI.	MEL.	EXT. LEV.	(NH ₄) ₂ HPO ₄	MgSO ₄	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	ZnSO ₄	FeSO ₄	CuSO ₄	MnSO ₄
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1
3	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
8	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
10	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1
11	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
12	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
15	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1
17 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A fermentação foi conduzida com taxa de inoculação de 10% v/v, a 30°C sob agitação de 120 rpm em agitador tipo *Shaker*. Utilizaram-se frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. As amostras foram retiradas após 48 horas de fermentação para análise de biomassa por peso seco, conforme subitem 3.8.2.1. Os níveis estudados de cada variável estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - NÍVEIS DECODIFICADOS DE CADA VARIÁVEL DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT & BURMAN

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Glicose (g/L)	0	16,0	32,0
Melaço de cana (g/L)	0	10,0	20,0
Extrato de levedura (g/L)	0	7,5	15,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	0	4,0	8,0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0	2,5	5,0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0	0,5	1,0
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	0,5	1,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0	0,005	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0	0,003	0,006
CuSO ₄ .5H ₂ O (g/L)	0	0,003	0,006
MnSO ₄ .H ₂ O (g/L)	0	0,003	0,006

3.12.2 Segunda etapa de seleção de variáveis por Planejamento Fatorial Incompleto $2^{(5-2)}$

Uma vez que as variáveis que apresentaram efeito significativo no delineamento Plackett e Burman foram selecionadas, o próximo delineamento realizado foi o fatorial incompleto $2^{(5-2)}$. Neste experimento utilizou-se 8 tratamentos diferentes mais 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios para cada cepa, o delineamento obedeceu a matriz de dados apresentada na Tabela 7. As duas cepas, SbM e Sb4308, foram analisadas nesse experimento.

Tabela 7 - MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$

ENSAIO	GLICOSE	MELAÇO	EXT.LEV.	MgSO4	FeSO4
1	1	1	1	1	1
2	1	1	-1	1	-1
3	1	-1	1	-1	1
4	1	-1	-1	-1	-1
5	-1	1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	-1	1
7	-1	-1	1	1	-1
8	-1	-1	-1	1	1
9 (C)	0	0	0	0	0
10 (C)	0	0	0	0	0
11 (C)	0	0	0	0	0

A fermentação foi conduzida com taxa de inoculação de 10% v/v, a 30 °C sob agitação de 120 rpm em agitador tipo *Shaker* em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. As amostras foram retiradas após 48 horas de fermentação para análise de biomassa por peso seco conforme subitem 3.8.2.1.

Os níveis de cada variável estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - NÍVEIS DECODIFICADOS DE CADA VARIÁVEL DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Glicose (g/L)	30	35	40
Melaço de cana (g/L)	20	30	40
Extrato de levedura (g/L)	15	20	25
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0	2,5	5
FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	0,006	0,008	0,010

3.12.3 Terceira etapa de otimização do meio de cultivo por Planejamento Experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^3

Após a seleção das três variáveis que exercem influência significativa na produção de biomassa e da determinação dos níveis de concentração interessantes para as cepas SbM e Sb4308, foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 para se obter as concentrações ótimas dos componentes selecionados no planejamento fatorial incompleto. Este delineamento produz resultados mais completos, passíveis de serem representados por um modelo matemático com mais precisão por utilizar mais níveis e testar um maior número de combinações entre os fatores. Neste planejamento foi utilizado um nível de significância de 0,05.

O delineamento obedeceu a matriz de dados apresentada na Tabela 9, constando de 8 ensaios, 6 ensaios nos pontos axiais e mais 3 ensaios nas condições de ponto central, totalizando 17 ensaios. Nele foram utilizados pontos fatoriais (+1 e -1), pontos axiais (+1,68 e -1,68) e pontos centrais (0). O ponto central foi repetido 3 vezes para estimar o erro experimental.

Tabela 9 - MATRIZ DE DADOS CODIFICADOS DO PLANEJAMENTO DCCR 2³

ENSAIO	GLICOSE	MELAÇO	EXT.LEV.
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0
17 (C)	0	0	0

Os níveis utilizados para cada variável estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - NÍVEIS DECODIFICADOS DE CADA VARIÁVEL DO PLANEJAMENTO DCCR 2³

VARIÁVEIS	NÍVEIS				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Glicose (g/L)	38,64	40,0	42,0	44,0	45,36
Melaço de cana (g/L)	36,59	40,0	45,0	50,0	53,41
Extrato de levedura (g/L)	1,59	5,0	10,0	15,0	18,41

3.12.4 Análise Estatística

As matrizes de dados codificadas e as análises dos resultados dos planejamentos experimentais foram realizadas pelo Software Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

3.12.5 Validação da otimização do meio de cultivo

Com a finalidade de se validar o modelo obtido após a otimização dos componentes do meio de cultivo, realizou-se, em triplicata, novas fermentações nas condições ótimas dadas pelo planejamento DCCR e repetiu-se o melhor ensaio do planejamento DCCR para cada cepa, conforme Tabela 11. As

produções de biomassa foram comparadas com os resultados teóricos obtidos através dos modelos matemáticos produzidos ao final da otimização (para as novas condições), e com os resultados experimentais obtidos nos melhores ensaios do planejamento.

Tabela 11 - ENSAIOS PARA A VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO DCCR 2³

CEPA	GLICOSE (g/L)	MELAÇO (g/L)	EXT.LEV. (g/L)
Ambas (ensaio 8)	44	50	15
SbM	40	50	12
Sb4308	45	55	12

3.12.6 Análise da influência do aumento da concentração de melaço de cana no rendimento da produção de biomassa Sb4308

Após a análise dos gráficos de superfície de resposta do planejamento experimental do tipo DCCR da cepa Sb4308, notou-se que ainda não havia sido proporcionada a ela uma condição ótima de concentração das fontes de carbono, indicando a necessidade de aumento. Dessa forma, a partir dessa etapa do trabalho continuaram-se os experimentos apenas com a cepa Sb4308. Nesse estudo, seu cultivo foi realizado em meio contendo concentrações aumentadas de melaço de cana e o extrato de levedura foi mantido a 12 g/L. As concentrações utilizadas estão apresentadas na Tabela 12. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Nessa etapa, a fonte de carbono glicose foi retirada, tomando-se o cuidado de se observar se uma maior concentração da fonte de carbono melaço de cana-de-açúcar (resíduo agroindustrial), já supriria sua ausência.

Tabela 12 - ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELAÇO DE CANA

ENSAIO	MELAÇO (g/L)	EXT. LEV. (g/L)
01	55	12
02	70	12
03	100	12
04	125	12
05	150	12
06	200	12
07	250	12
08	300	12
09	350	12
10	400	12
11	450	12

O inóculo foi preparado conforme item 3.5. em meio de cultivo contendo melaço de cana-de-açúcar 55 g/L e extrato de levedura 12 g/L. A taxa de inóculo foi de 10% v/v. Os cultivos foram realizados em 50 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, a incubação foi feita a 30°C e agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*. A análise de biomassa seca, subitem 3.8.2.1, foi realizada para o tempo de cultivo de 48 horas.

3.12.6.1 Análise de rendimento

Foi observado que o aumento da concentração de melaço de cana até 250 g/L proporciona um aumento da biomassa obtida. Porém, é necessário um estudo do rendimento dessas condições para selecionar o melhor meio de cultivo. O cálculo do rendimento leva em conta as concentrações iniciais e finais da fonte de carbono e da biomassa, conforme a equação abaixo:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Biomassa final (g/L)} - \text{Biomassa inicial (g/L)}}{\text{Açúcares totais inicial (g/L)} - \text{Açúcares totais final (g/L)}} \times 100 \quad (4)$$

Para o estudo foram escolhidas as concentrações 100, 150 e 200 g/L de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura 12 g/L, conforme Tabela 13.

Tabela 13 – ENSAIOS PARA A ANÁLISE DO RENDIMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA (g/L) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELAÇO DE CANA

ENSAIO	MELAÇO (g/L)	EXT.LEV. (g/L)
01	100	12
02	150	12
03	200	12

O inóculo foi preparado conforme item 3.5. em meio de cultivo contendo melaço de cana-de-açúcar 55 g/L e extrato de levedura 12 g/L. A taxa de inóculo foi de 10% v/v. Os crescimentos foram realizados em 50 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, a incubação foi feita por 48 horas a 30°C e agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*.

Nesse teste foram realizadas as análises de biomassa seca, subitem 3.8.2.1; determinação de açúcares totais, conforme subitem 3.8.1.2. e análise de pH, subitem 3.8.1.1. Os testes foram realizados em triplicata. Com os resultados obtidos nesse estudo foi concluída a otimização do meio de cultivo para a cepa Sb4308, como também foi selecionada a cepa com maior produção de biomassa na condição otimizada.

3.13 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DO INÓCULO DE *S. boulardii* Sb4308

A partir dessa etapa utilizou-se o meio de cultivo otimizado para a cepa Sb4308, sendo este composto por melaço de cana-de-açúcar 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L, tanto para o preparo do inóculo como para a fermentação.

A realização da cinética do inóculo teve por objetivo determinar o tempo de viabilidade celular máxima no meio de cultivo otimizado para transferência de células (inoculação) para a fermentação.

Os crescimentos foram realizados em 50 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, a incubação foi feita a 30°C e agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*. Os testes foram feitos em duplicata e a amostragem realizada a cada 8 horas em um período de 32 horas. Foram realizadas análises de biomassa seca, subitem 3.8.2.1, viabilidade celular, conforme subitem 3.8.2.4. e determinação de pH, subitem 3.8.1.1.

3.14 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

Após determinado o tempo de cultivo do inóculo, foi realizado o estudo da cinética da fermentação no meio otimizado com o objetivo de se analisar o perfil de crescimento da biomassa e também o consumo da fonte de carbono.

Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio, a incubação foi feita a 30°C e agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*. Os testes foram feitos em duplicata e a amostragem realizada a cada 8 horas em um período de 56 horas. Foram realizadas análises de biomassa seca, subitem 3.8.2.1; determinação de pH, subitem 3.8.1.1.; determinação de açúcar total, conforme subitem 3.8.1.2. e determinação de açúcar redutor, subitem 3.8.1.3.

3.15 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 EM BATELADA EM BIORREATOR DO TIPO STR

Foi realizada a cinética da produção de biomassa em fermentação submersa em biorreator do tipo tanque agitado (*Stirred Tank Reactor* - STR). O biorreator modelo Bioflo da marca New Brunswick consiste em um cilindro vertical de vidro borossilicato e tampa de aço inoxidável (Figura 9). A agitação é realizada através de pás internas (impelidores) do tipo hélice. A aeração ocorre através de um compressor de ar cuja entrada de ar no biorreator localiza-se na parte inferior. A temperatura é controlada através de uma camisa externa por onde circula água de resfriamento.



Figura 9 - BIORREATOR TIPO TANQUE AGITADO. FONTE: O AUTOR, 2012.

O experimento foi realizado inicialmente com o preparo do pré-inóculo (tempo de cultivo de 20 horas) e, posteriormente, com o preparo do inóculo (tempo de cultivo de 24 horas), determinados nos experimentos anteriores (para inóculo e fermentação em frascos de Erlenmeyer).

Para as condições de fermentação foram utilizados 9 L de meio de cultivo (melaço de cana-de-açúcar 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L) com taxa de inóculo de 10% v/v, em operação de batelada, a 30°C. A agitação (mínimo de 300 rpm) foi programada para que ficasse relacionada com o oxigênio dissolvido (OD) de mínimo de 30%, assim, conforme diminuía o OD, aumentava a agitação, e pH inicial 5,5. Amostras foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24, 28, 32 e 48 horas, totalizando 48 horas de fermentação, para análise de biomassa seca, subitem 3.8.2.1; determinação de pH, subitem 3.8.1.1.; determinação de açúcares totais, conforme subitem 3.8.1.2. e determinação de açúcares redutores, subitem 3.8.1.3.

3.16 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 EM BATELADA ALIMENTADA EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

Foi testada a alimentação da fermentação com melaço de cana-de-açúcar após 4, 6 e 8 horas do início do cultivo, na concentração de 150 g/L. Após verificar que restavam açúcares totais e redutores no meio de cultivo no

final da fermentação alimentada com melaço de cana a 150 g/L, essa concentração foi diminuída para 100 g/L.

A alimentação com glicose também foi testada nos tempos 4 e 6 horas, na concentração de 30 g/L (concentração de açúcares redutores máximo quantificado na fermentação em frascos de Erlenmeyer), verificando-se assim, se a pronta disponibilidade de açúcares redutores beneficiaria o processo.

A taxa de alimentação foi de 10% v/v. Os testes foram realizados em triplicata e as amostras foram retiradas nos tempos 8, 10 e 32 horas, para análise de biomassa seca, subitem 3.8.2.1; determinação de açúcares totais, conforme subitem 3.8.1.2. e determinação de açúcares redutores, subitem 3.8.1.3. Esses dados foram utilizados para o cálculo de rendimento (%), conforme subitem 3.12.6.1. e produtividade (g/L.h) do processo, calculada conforme a equação 5.

Produtividade (g/L.h) = biomassa seca produzida (g/L)/tempo de cultivo (h) (5)

3.17 ANÁLISE DO BIOACUMÚLO DE SELÊNIO

A partir desse estudo iniciou-se a análise do bioacúmulo de selênio através da adição de selênio inorgânico no meio de cultura na forma do sal selenito de sódio (Na_2SeO_3).

3.17.1 Análise prévia da capacidade das cepas SbM e Sb4308 de tolerância e adaptação ao selênio no meio de cultivo

Antes da otimização das condições de produção para as duas cepas SbM e Sb4308, foi realizado uma análise prévia da capacidade de tolerância dessas na presença de Na_2SeO_3 no meio de cultivo, neste caso foi utilizado o meio YM líquido, como também foi analisada a capacidade destas cepas de se adaptarem diante de concentrações aumentadas de Na_2SeO_3 no meio. Nesse estudo o inóculo foi preparado conforme item 3.5. em meio YM líquido, sendo a taxa de inóculo 10% v/v e tempo de cultivo de 24 horas. Os cultivos foram realizados em 50 mL de meio YM líquido em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*.

Foram realizados dois experimentos, um para a análise de tolerância das cepas diante o Na_2SeO_3 no meio de cultivo, observando a capacidade da cepa em crescer e acumular selênio, com o tempo final de fermentação de 48 horas e com a adição das concentrações de 0, 10, 50, 100, 150, 200, 300 e 400 ppm de Se no momento da inoculação.

O outro experimento foi para a análise de capacidade de adaptação das cepas, o qual foi realizado a transferência de células (taxa de 10% v/v) seriada, no qual se iniciou com a concentração de 0 ppm e após 48 horas de incubação esse fermentado foi utilizado como inóculo para um meio contendo 10 ppm de Se, e assim por diante, até se chegar na concentração de 400 ppm de Se. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os testes analisados foram determinação do peso seco da biomassa produzida, segundo subitem 3.8.2.1. e determinação de selênio inorgânico no sobrenadante por reação de Azure B, conforme subitem 3.9.1.1.

Esses experimentos foram os primeiros a serem realizados no trabalho e tiveram por objetivo conhecer a capacidade de bioacúmulo das cepas SbM e Sb4308. E também adaptar as amostras deste trabalho ao método de determinação de selênio inorgânico no sobrenadante por reação de Azure B desenvolvido por Mathew e Narayana (2006), descrito no subitem 3.9.1.1., e assim utilizá-lo como o método analítico de *screening* inicial por ser mais barato e prático. O teste de adaptação a concentrações crescentes de Na_2SeO_3 no meio de cultivo proveu cepas consideradas adaptadas ao Se e após o crescimento destas em meio contendo a maior concentração testada (400 ppm), elas foram guardadas e mantidas, para depois possibilitar a comparação do bioacúmulo da cepa Sb4308 adaptada com a cepa Sb4308 selvagem nas condições de cultivo otimizadas.

3.17.2 Análise da concentração de selenito de sódio Na_2SeO_3 a ser adicionada no meio de cultura para bioacúmulo

Após a otimização das condições de produção da biomassa da levedura Sb4308, iniciou-se o estudo sobre o bioacúmulo de selênio pela Sb4308, como a concentração de selenito de sódio (Na_2SeO_3) a ser adicionado no meio de cultivo e o melhor tempo para essa adição.

De acordo com os resultados obtidos no experimento anterior, chegou-se à conclusão de que concentrações maiores que 100 ppm de Se no meio de cultivo inibia fortemente o crescimento da levedura como também não favorecia o seu bioacúmulo. Dessa forma, foram testadas inicialmente as concentrações de 50 e 75 ppm, as quais foram adicionadas ao mesmo tempo em que se realizou a alimentação com melaço de cana-de-açúcar, ou seja, 4 horas de fermentação.

Foi testado também a adição de Na_2SeO_3 no meio de cultivo nas mesmas concentrações, 50 e 75 ppm de Se, no final da fase log de crescimento (10 horas). Nessa condição seria analisada a capacidade da biomassa, que já estaria na sua concentração máxima, de acumular selênio em sua fase estacionária de crescimento.

Nesse estudo o inóculo foi preparado conforme item 3.5. no meio de cultivo otimizado. Os crescimentos foram realizados em 50 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, a 30°C com agitação de 120 rpm em agitador do tipo *Shaker*. Para o estudo com a adição de Na_2SeO_3 , no momento da alimentação com melaço de cana-de-açúcar, as amostras (frascos de Erlenmeyer) foram retiradas em duplicata nos tempos 4, 6, 8, 10 e 24 horas, e para branco foram retiradas amostras nos tempos 4, 10 e 24 horas, em duplicata, os quais não receberam Na_2SeO_3 . Já no estudo em que o Na_2SeO_3 foi adicionado no final da fase log (10 horas) as amostras foram retiradas no tempo de 24 horas.

Os testes realizados foram determinação do peso seco da biomassa produzida, segundo subitem 3.8.2.1., e determinação de selênio inorgânico no sobrenadante por reação de Azure B, conforme subitem 3.9.1.1.

Através desses estudos foram definidas as condições ótimas para o bioacúmulo de selênio pela levedura Sb4308.

3.18 ESTUDO DO CRESCIMENTO E BIOACÚMULO DE SELÊNIO PELA CEPA SB4308 ADAPTADA

Depois de otimizadas as condições de crescimento e de bioacúmulo para a cepa selvagem Sb4308, foi realizado o estudo do crescimento e de

bioacúmulo de selênio pela cepa Sb4308 adaptada obtida no estudo de adaptação das cepas. Foi comparado o desempenho das duas e determinado qual a melhor cepa para a produção de levedura selenizada.

3.19 CINÉTICA DO CRESCIMENTO E BIOACÚMULO DE SELÊNIO PELA Sb4308 EM FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR STR

Com a determinação de que o melhor tempo para se adicionar Na_2SeO_3 no meio de cultivo para o bioacúmulo de selênio pela levedura Sb4308 era no final da fase log, ou seja, no tempo 10 horas, e que a melhor concentração era de 100 ppm de Se, foi realizado cinética de crescimento e bioacúmulo de selênio no biorreator do tipo STR modelo Bioflo da marca New Brunswick da fermentação no modo batelada alimentada.

O experimento foi realizado inicialmente com o preparo do pré-inóculo (tempo de cultivo de 20 horas) e, posteriormente, com o preparo do inóculo (tempo de cultivo de 24 horas). Para as condições de fermentação foram utilizados 9 L de meio de cultivo otimizado (melaço de cana-de-açúcar 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L) com taxa de inóculo de 10% v/v, a 30 °C, a agitação (mínimo de 300rpm) foi programada para que ficasse relacionada com o oxigênio dissolvido para o mínimo de 30% e pH inicial 5,5. Amostras foram retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 21, 24, 27, 30, 33 e 48 horas, totalizando 48 horas de fermentação, para análise de biomassa seca, subitem 3.8.2.1; determinação de açúcares totais, conforme subitem 3.8.1.2., determinação de açúcares redutores, subitem 3.8.1.3., determinação de selênio total na biomassa por espectrometria de absorção atômica, conforme subitem 3.9.2. e determinação de selênio orgânico na biomassa na forma de selenometionina e selenocisteína por cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa, conforme subitem 3.9.3.

Para as análises de determinação de selênio orgânico na biomassa por LC-MS vários estudos sobre a digestão da biomassa selenizada e também sobre a metodologia de análise no equipamento LC-MS foram realizados.

3.20 QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ADSORVIDO NA BIOMASSA

Como não foi possível quantificar o selênio orgânico contido na biomassa da levedura Sb4308, nas formas de SeMet e SeCis, suspeitou-se de que uma maior parte do selênio total quantificado na biomassa estaria na forma adsorvida e não na forma absorvida. Dessa forma, foram realizados testes para se quantificar o Se adsorvido pela Sb4308 através da análise de águas de lavagem da biomassa e da biomassa lavada através de AAS. A lavagem da biomassa foi realizada com H₂O ultrapura baseando-se na alta solubilidade do Na₂SeO₃ em H₂O (ABDO, 1994)

Para esses testes, pesou-se 0,3 g de biomassa liofilizada da levedura Sb4308 selenizada e em seguida adicionou-se 2,0 mL de H₂O ultrapura. A suspensão foi agitada por 4 minutos em agitador Vortex e a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi armazenado para análise e repetiu-se esse procedimento por mais 2 vezes, resultando em 3 amostras de água de lavagem para cada amostra. Os testes para a levedura selenizada foram realizados em duplicata.

Para amostra de levedura selenizada foi utilizada a amostra 48 h do estudo descrito no item 3.19 e como branco, a amostra 9 h do mesmo estudo. Estas passaram pelo processo de digestão ácida conforme subitem 3.9.2.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DAS CEPAS SbM E Sb4308

Os resultados obtidos para o estudo da produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii* SbM e Sb4308, conduzido em fermentação submersa utilizando o meio YM líquido, podem ser visualizados na Figura 10.

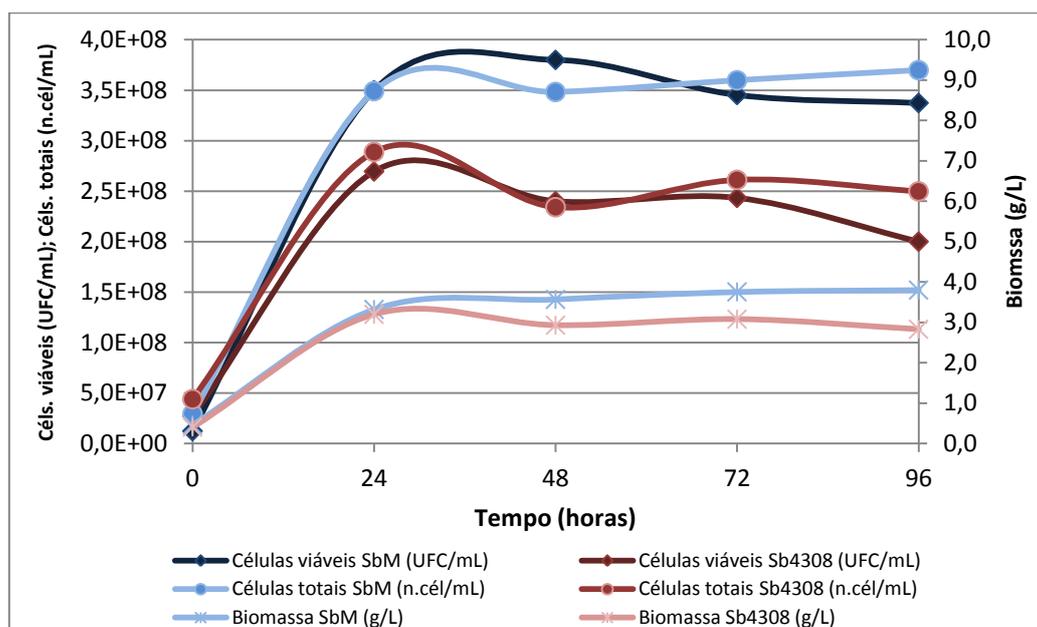


Figura 10 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Saccharomyces boulardii* SbM E Sb4308.
 FONTE: O AUTOR (2012)

A avaliação da curva de crescimento da cepa SbM em YM líquido mostrou que no período de 0 a 24 horas ocorre a fase exponencial (fase log), passando de $1,2 \cdot 10^7$ para $3,5 \cdot 10^8$ UFC/mL. Tal fato demonstra sua adaptação às condições de cultivo, não necessitando passar pela fase lag. Após esse período, inicia-se a fase estacionária de crescimento com células viáveis na concentração de $3,5 \cdot 10^8$ UFC/mL. O perfil da curva das células totais foi semelhante ao das células viáveis e o número de células/mL foi de aproximadamente $3,6 \cdot 10^8$. A biomassa total nesse período foi de 3,67 g/L.

Os perfis das curvas de crescimento da cepa Sb4308, tanto a de células viáveis quanto a de células totais, foram semelhantes às da cepa SbM, não passando pela fase lag e a fase log terminando com 24 horas. O número de células viáveis passou de $2,7 \cdot 10^7$ para $2,7 \cdot 10^8$ UFC/mL, tendo atingido $2,4 \cdot 10^8$

UFC/mL na fase estacionária. A concentração de células totais ficou em torno de $2,6 \cdot 10^8$ células/mL e a biomassa total de 3,01 g/L.

Esse estudo foi importante para uma definição inicial dos tempos de cultivos a serem utilizados nos experimentos seguintes. Para as duas cepas, o tempo de crescimento do inóculo foi definido em 24 horas, pois apresenta a máxima viabilidade celular antes da biomassa iniciar a fase estacionária de crescimento. Já para a produção de biomassa por fermentação foi definido o tempo de 48 horas.

4.2 ESTUDO DA TEMPERATURA DE CULTIVO

Na Tabela 14 estão apresentadas as concentrações de biomassa obtidas a 37°C e a 30°C, com crescimento até 48 horas.

Tabela 14 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA NOS CULTIVOS DAS CEPAS SbM E Sb4308 A 30°C E 37°C

CEPA	BIOMASSA (g/L)	
	30°C	37°C
SbM	$3,66 \pm 0,22$	$0,32 \pm 0,05$
Sb4308	$3,01 \pm 0,16$	$0,21 \pm 0,01$

As duas cepas apresentaram crescimento muito inferior quando cultivadas a 37°C, aproximadamente, 9% e 7% da biomassa obtida a 30°C, respectivamente para as cepas SbM e Sb4308. Sendo assim, foi determinada a temperatura de cultivo de 30°C.

De acordo com Czerucka, Piche e Rampal (2007) a temperatura ótima de crescimento da levedura *Saccharomyces boulardii* é 37°C. Dessa forma, esse experimento teve por objetivo comparar o crescimento das cepas SbM e Sb4308 a 37°C com o crescimento destas a 30°C, temperatura usualmente utilizada para a levedura *S. cerevisiae*, como nos trabalhos de Ponce de León *et al.* (2002), Suhajda *et al.* (2000) e Wang, Zhang e Tan (2010).

4.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

A biomassa por peso seco obtida na fermentação realizada com o meio de cultivo definido YM líquido foi de apenas 3,67 g/L para a cepa SbM e de 3,01 g/L para a cepa Sb4308. Assim, foi iniciada a etapa de otimização dos componentes do meio de cultivo para aumentar a produção de biomassa.

4.3.1 Seleção de variáveis significativas - Planejamento Experimental tipo Plackett & Burman

Nesse planejamento foram realizados 16 ensaios, mais 3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios para a análise da influência de 11 componentes do meio de cultivo na variável resposta Biomassa seca (g/L). Os resultados obtidos estão representados na Tabela 15.

Tabela 15 – RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO PLACKETT & BURMAN – CEPA Sb4308

ENSAIO	BIOMASSA (g/L)
1	4,86
2	4,29
3	4,39
4	3,48
5	2,79
6	3,49
7	2,83
8	2,89
9	5,42
10	3,86
11	3,82
12	3,40
13	0,96
14	1,31
15	0,85
16	0,89
17	3,92
18	4,06
19	4,01

De acordo com os resultados, a maior produção de biomassa de *S. boulardii* Sb4308 foi de 5,42 g/L obtida com a adição de melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 e CuSO_4 (todos no nível +1). A segunda maior foi de 4,86 g/L obtida com a adição de

todos os componentes também com o nível +1. A menor produção foi de 0,85 g/L quando se adiciona apenas $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, K_2HPO_4 e ZnSO_4 .

A análise da variância entre as variáveis, ANOVA, dos resultados do delineamento Plackett & Burman estão mostradas na Tabela 16. A melhor visualização da influência dos componentes na produção de biomassa pode ser feita através do Diagrama de Pareto (Figura 11).

Tabela 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO PLACKETT & BURMAN – CEPA Sb4308

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRADAS	RAZÃO F	RAZÃO p
Glicose	4,521	1	4,521	12,5469	0,0094
Melaço	19,173	1	19,173	53,2116	0,0001
Ext.lev.	1,221	1	1,221	3,3887	0,1082
NH_4HPO_4	0,324	1	0,323	0,8977	0,3749
MgSO_4	3,492	1	3,492	9,6919	0,0170
K_2HPO_4	0,035	1	0,035	0,0976	0,7639
KH_2PO_4	0,048	1	0,048	0,1328	0,7263
ZnSO_4	0,319	1	0,319	0,8859	0,3779
FeSO_4	1,331	1	1,331	3,6943	0,0960
CuSO_4	0,001	1	0,001	0,0039	0,9519
MnSO_4	0,041	1	0,041	0,1138	0,7457

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta. $R^2 = 0,923$.

O valor de R^2 foi de 0,923, podendo-se dizer que esse modelo explica 92,3% da variância.

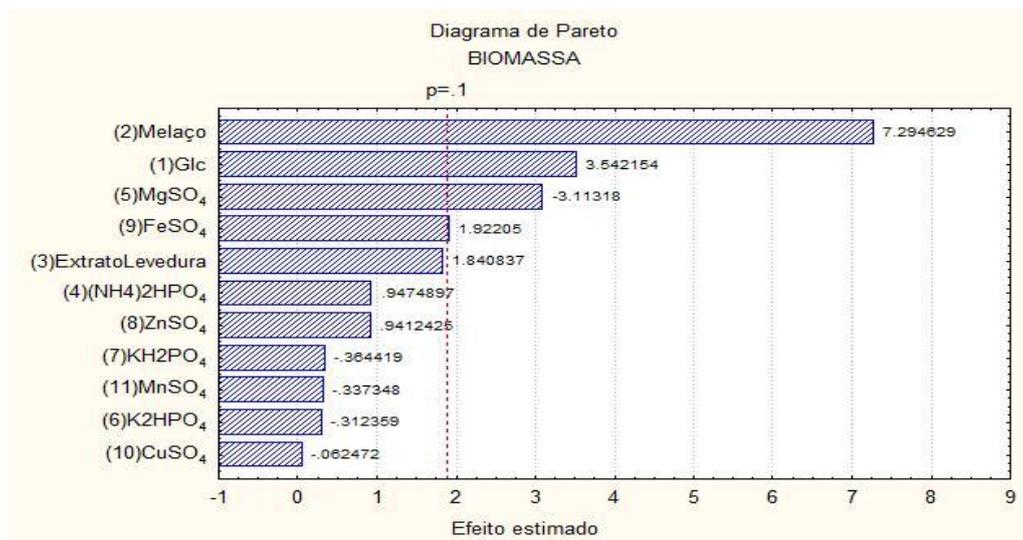


Figura 11 - DIAGRAMA DE PARETO – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NO MEIO DE CULTIVO ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO PLACKETT E BURMAN.

Este teste mostrou que apenas as variáveis melaço de cana-de açúcar, glicose e MgSO₄ são significativas para a produção de biomassa, sendo que o melaço de cana-de-açúcar e a glicose exercem influência positiva e o MgSO₄ exerce influência negativa nas concentrações testadas, ao nível de significância de 0,1.

Em delineamentos de *screening*, como o Plackett Burmann, um nível de significância de 0,1 (ou seja, 10% de probabilidade de um erro tipo I) é considerado apropriado. Nos outros tipos de delineamentos considera-se um bom nível de significância um valor de 0,05. Portanto, para aceitar o valor de b como significativo seu p-valor deve ser menor do que 0,1 ou 0,05 (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

É importante ressaltar nesse teste que as demais variáveis não tiveram efeito estatisticamente significativo nas concentrações utilizadas nesta triagem. Porém, as variáveis extrato de levedura e FeSO₄ também foram selecionadas para os próximos experimentos, apesar de não terem tido efeitos significativos sobre a variável-resposta, pois suspeitou-se que o intervalo de concentração utilizada para esses componentes não foi suficiente para apresentar um efeito significativo.

4.3.2 Segunda etapa de seleção de variáveis - Planejamento Fatorial Incompleto 2⁽⁵⁻²⁾

Após o *screening* inicial dos componentes do meio de cultivo, foi realizado o planejamento fatorial incompleto 2⁽⁵⁻²⁾ com o estudo da influência das concentrações das variáveis glicose, melação de cana, extrato de levedura, MgSO₄ e FeSO₄, sendo realizados 8 tratamentos mais 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios para cada cepa.

4.3.2.1 Resultados da produção de biomassa pela cepa *S. boulardii* SbM

A variável resposta biomassa seca (g/L) obtida para cada ensaio apresenta-se na Tabela 17.

Tabela 17 – RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO 2⁽⁵⁻²⁾ – CEPA SbM

ENSAIO	GLICOSE (g/L)	MELAÇO (g/L)	EXT.LEV. (g/L)	MgSO ₄ (mg/L)	FeSO ₄ (mg/L)	BIOMASSA (g/L)
1	40	40	25	5	10	7,91
2	40	40	15	5	6	8,51
3	40	20	25	0	10	6,70
4	40	20	15	0	6	6,94
5	30	40	25	0	6	7,07
6	30	40	15	0	10	7,08
7	30	20	25	5	6	5,74
8	30	20	15	5	10	5,92
9 (C)	35	30	20	2,5	8	6,98
10 (C)	35	30	20	2,5	8	6,88
11 (C)	35	30	20	2,5	8	7,11

O melhor resultado foi obtido no ensaio 2 com nível +1 de glicose (40 g/L), melação (40 g/L) e MgSO₄ (5 mg/L) e nível -1 de extrato de levedura (15 g/L) e FeSO₄ (6 mg/L), obtendo uma biomassa seca de 8,51 g/L. Os menores valores foram obtidos nos ensaios 7 e 8, com nível -1 de glicose (30 g/L) e melação (20 g/L), com a produção de 5,74 g/L e 5,92 g/L de biomassa; retratando a necessidade de maior concentração de fonte de carbono.

A análise de variância entre as variáveis, ANOVA, pode ser visualizada na Tabela 18.

Tabela 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA SbM

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRADAS	RAZÃO F	RAZÃO p
(1) Glicose	2,249	1	2,249	166,2189	5E-05
(2) Melaço	3,449	1	3,449	254,7821	1,76E-05
(3) Ext.lev.	0,132	1	0,132	9,7499	0,0262
(4) MgSO ₄	0,009	1	0,009	0,7112	0,4375
(5) FeSO ₄	0,053	1	0,053	3,9318	0,1042

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta. $R^2 = 0,989$.

Com o $R^2=0,989$, na tabela da ANOVA é possível observar que as variáveis glicose, melaço e extrato de levedura apresentaram significância ($p<0,05$) na faixa estudada. As variáveis MgSO₄ e FeSO₄ não apresentaram significância. Esses dados também podem ser visualizados no Diagrama de Pareto da Figura 12.

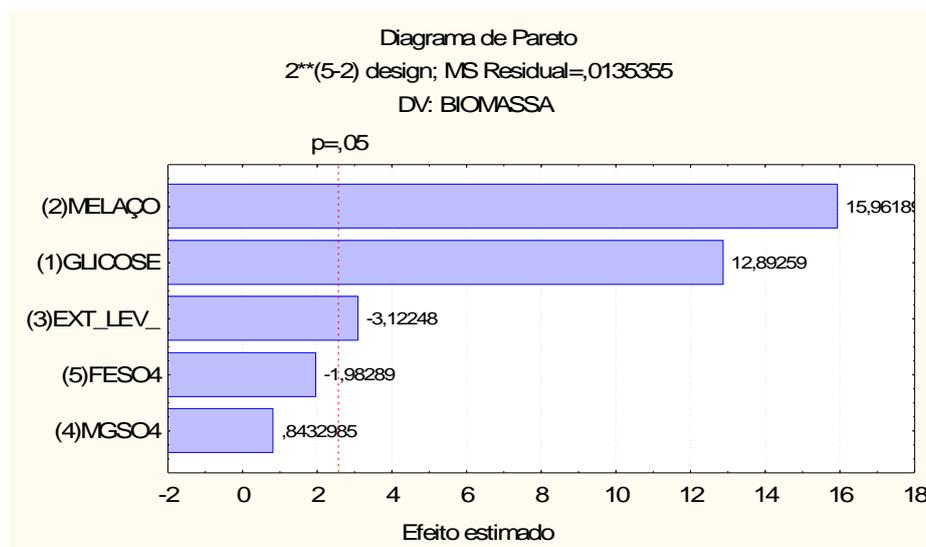


Figura 12 - DIAGRAMA DE PARETO – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NO MEIO DE CULTIVO ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA SbM

É possível observar no diagrama de Pareto que o melaço de cana-de-açúcar e a glicose exercem influência positiva e o extrato de levedura exerce influência negativa nos níveis estudados.

4.3.2.2 Resultados da produção de biomassa pela cepa *S. boulardii* Sb4308

A produção de biomassa seca (g/L) obtida nas diferentes condições para a cepa *S. boulardii* Sb4308 está apresentada na Tabela 19.

Tabela 19 - RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA Sb4308

ENSAIO	GLICOSE (g/L)	MELAÇO (g/L)	EXT.LEV. (g/L)	MgSO ₄ (mg/L)	FeSO ₄ (mg/L)	BIOMASSA (g/L)
1	40	40	25	5	10	8,25
2	40	40	15	5	6	8,38
3	40	20	25	0	10	7,51
4	40	20	15	0	6	6,96
5	30	40	25	0	6	7,91
6	30	40	15	0	10	7,05
7	30	20	25	5	6	5,94
8	30	20	15	5	10	5,93
9 (C)	35	30	20	2,5	8	7,58
10 (C)	35	30	20	2,5	8	7,40
11 (C)	35	30	20	2,5	8	6,89

Os melhores e piores resultados para a cepa *S. boulardii* Sb4308 foram os mesmos aos obtidos nos ensaios da cepa SbM, sendo que o melhor resultado foi obtido no ensaio 2 com nível +1 de glicose (40 g/L), melaço (40 g/L) e MgSO₄ (5 mg/L) e nível -1 de extrato de levedura (15 g/L) e FeSO₄ (6 mg/L), com uma biomassa seca de 8,38 g/L; e os menores valores foram obtidos nos ensaios 7 e 8, com nível -1 de glicose (30 g/L) e melaço (20 g/L), com a produção de 5,94 g/L e 5,93 g/L de biomassa.

A análise de variância entre as variáveis pode ser visualizada na Tabela 20, sendo que os efeitos estatisticamente significativos podem ser melhor visualizados no Diagrama de Pareto da Figura 13.

Tabela 20 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA Sb4308

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRADAS	RAZÃO F	RAZÃO p
(1) Glicose	2,260	1	2,260	20,6006	0,0062
(2) Melaço	3,455	1	3,455	31,4884	0,0025
(3) Ext.lev.	0,210	1	0,210	1,9178	0,2247
(4) MgSO ₄	0,109	1	0,109	0,9906	0,3653
(5) FeSO ₄	0,026	1	0,026	0,2332	0,6495

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R^2 = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta. $R^2 = 0,917$.

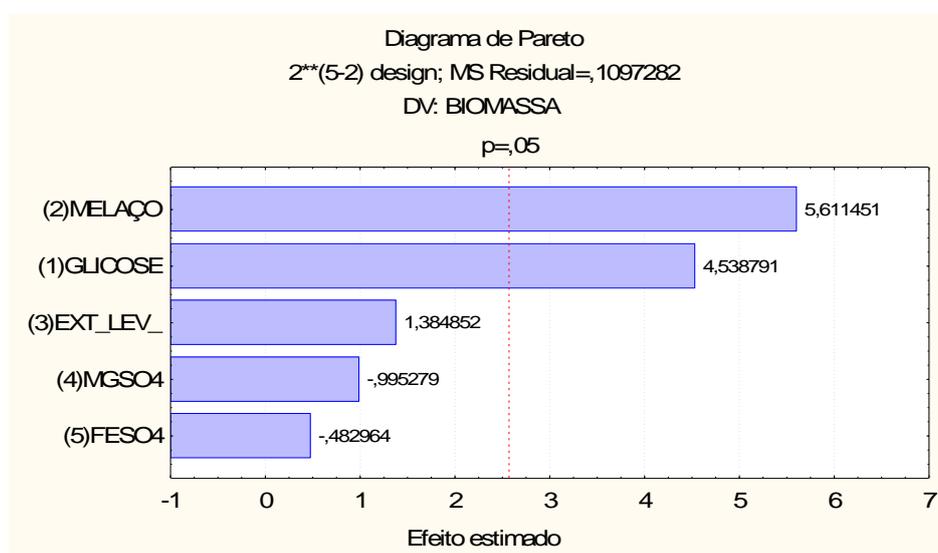


Figura 13 - DIAGRAMA DE PARETO – ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES NO MEIO DE CULTIVO ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO FATORIAL INCOMPLETO $2^{(5-2)}$ – CEPA Sb4308

Com o $R^2=0,917$, pôde-se ver pela tabela da ANOVA que as variáveis glicose e melaço de cana-de-açúcar apresentaram significância ($p<0,05$) na faixa estudada. As variáveis extrato de levedura, MgSO₄ e FeSO₄ não apresentaram significância nas condições estudadas. De acordo com o Diagrama de Pareto, ambas as variáveis melaço de cana e glicose exercem influência positiva.

Através dos resultados obtidos para as duas cepas, foram selecionadas as variáveis glicose, melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura para dar prosseguimento à otimização da composição do meio de cultivo.

4.3.3 Terceira etapa de otimização - Planejamento Experimental DCCR 2³

Essa etapa teve por objetivo determinar as concentrações ótimas dos componentes selecionados no planejamento experimental anterior, os quais foram: a glicose, o melaço de cana e o extrato de levedura.

4.3.3.1 Resultados da cepa *S. boulardii* SbM

Os resultados do planejamento experimental DCCR para a cepa SbM estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21- RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO DCCR 2³ – CEPA SbM

ENSAIO	GLICOSE (g/L)	MELAÇO (g/L)	EXT.LEV. (g/L)	BIOMASSA (g/L)
1	40	40	5	8,00
2	40	40	15	8,41
3	40	50	5	8,83
4	40	50	15	9,53
5	44	40	5	8,36
6	44	40	15	8,65
7	44	50	5	8,73
8	44	50	15	9,56
9	38,64	45	10	8,84
10	45,36	45	10	8,89
11	42	36,59	10	8,30
12	42	53,41	10	9,30
13	42	45	1,59	7,44
14	42	45	18,41	8,91
15 (C)	42	45	10	9,81
16 (C)	42	45	10	9,65
17 (C)	42	45	10	8,99

O melhor resultado de produção de biomassa seca foi obtido com a condição do ponto central do experimento (glicose 42 g/L, melaço de cana 45 g/L e extrato de levedura 10 g/L), com uma produção média de 9,65 g/L. No ensaio 8, com nível +1 das três variáveis (glicose 44 g/L, melaço de cana 50 g/L e extrato de levedura 15 g/L), houve a segunda melhor produção de 9,56 g/L e a terceira foi de 9,53 g/L quando o nível +1 foi utilizado para as variáveis melaço (50 g/L) e extrato de levedura (15 g/L) e o -1 para a glicose (40 g/L). A

menor produção de biomassa seca (7,44 g/L) foi obtida no ensaio 13 que analisou as variáveis no nível -1 (glicose 40 g/L, melação de cana 40 g/L e extrato de levedura 5 g/L).

Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, indicando uma boa repetibilidade do processo.

A análise das interações entre as variáveis pode ser visualizada na Tabela 22.

Tabela 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR 2³– CEPA Sbm

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRADAS	RAZÃO F	RAZÃO p
(1) Glicose (L)	0,028	1	0,028	0,3025	0,5994
Glicose (Q)	0,344	1	0,344	3,7758	0,0931
(2) Melação (L)	1,753	1	1,753	19,2556	0,0032
Melação (Q)	0,446	1	0,446	4,9000	0,0625
(3) Ext. lev. (L)	1,628	1	1,628	17,8821	0,0039
Ext. lev. (Q)	1,979	1	1,979	21,7386	0,0023
1L por 2L	0,055	1	0,055	0,6071	0,4614
1L por 3L	0	1	0	0	1
2L por 3L	0,087	1	0,087	0,9571	0,3605

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R² = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; L = interação linear; Q = interação quadrática. R² = 0,898.

Com o R²=0,898, a tabela da ANOVA mostra que a interação linear do melação e a interação linear e também a interação quadrática do extrato de levedura apresentaram significância (p<0,05) na faixa estudada. Este resultado foi confirmado pelo Diagrama de Pareto (Figura 14) e pelas superfícies de resposta gerada (Figuras 15, 16 e 17).

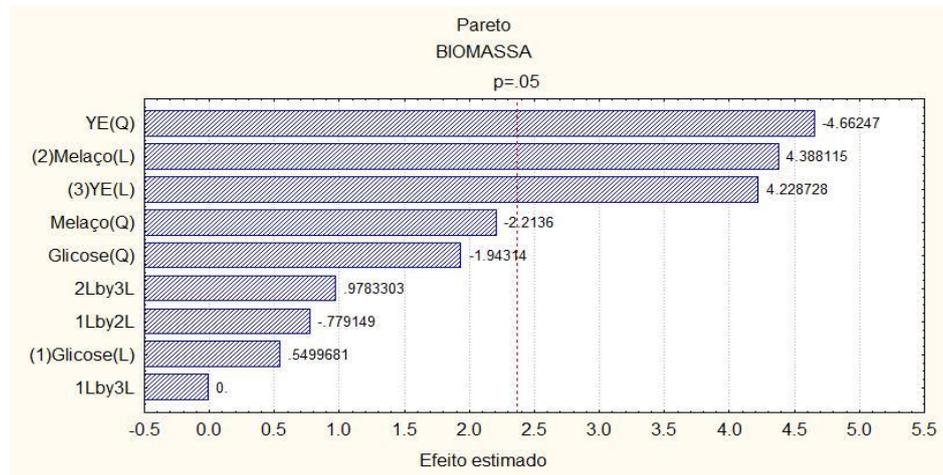


Figura 14 - DIAGRAMA DE PARETO – PLANEJAMENTO DCCR APRESENTANDO AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA SbM

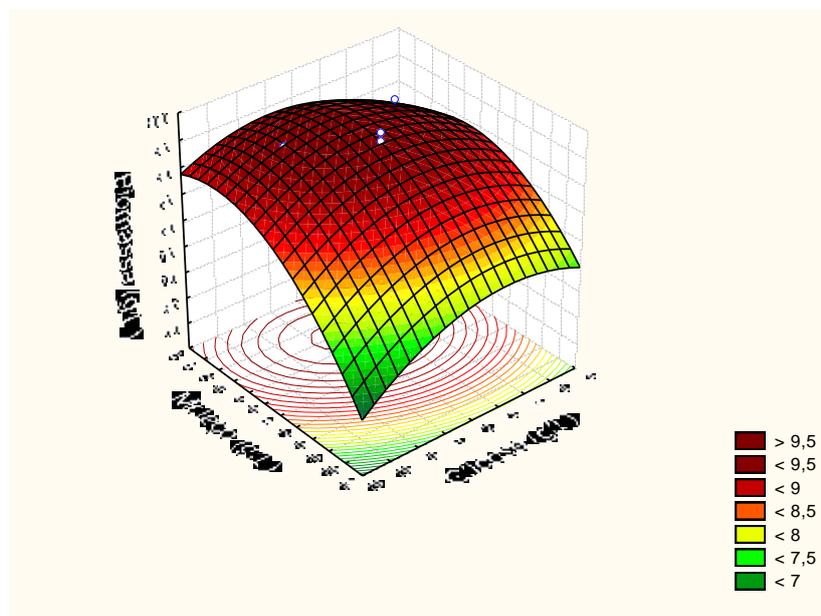


Figura 15 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (MELAÇO E GLICOSE) - SbM. VARIÁVEL EXTRATO DE LEVEDURA MANTIDA NO NÍVEL 0.

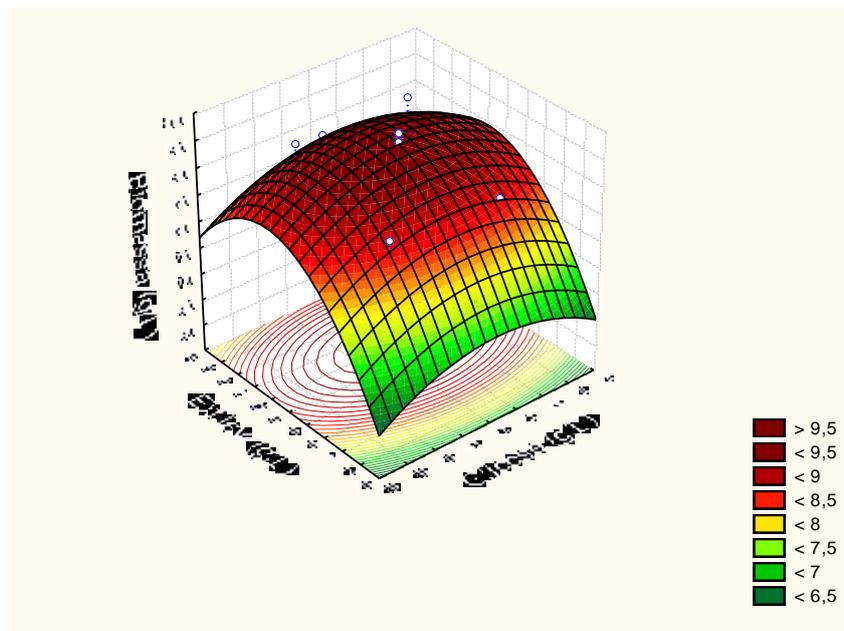


Figura 16 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E GLICOSE) - SbM. VARIÁVEL MELAÇO MANTIDA NO NÍVEL 0.

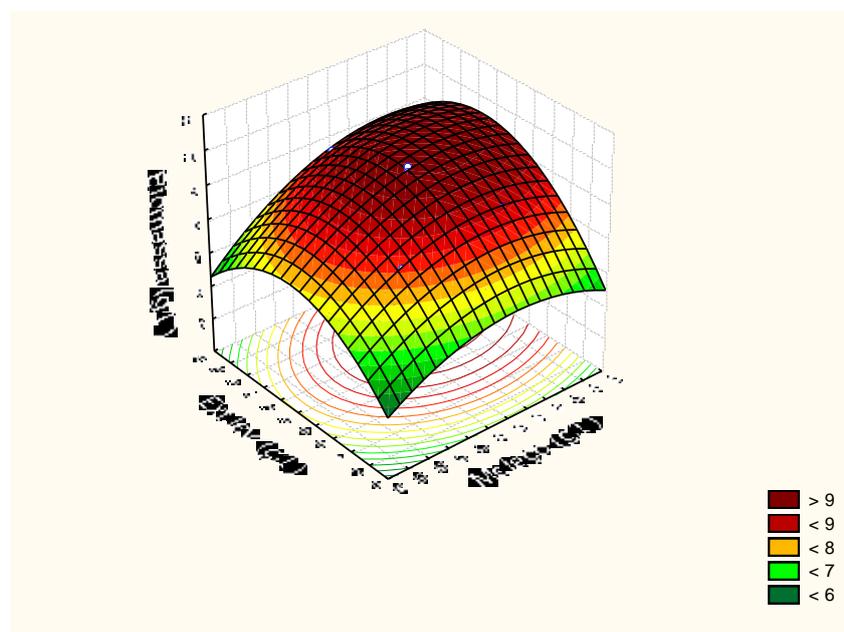


Figura 17 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E MELAÇO) - SbM. VARIÁVEL GLICOSE MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático gerado que representa a produção de biomassa (g/L) em condições otimizadas é dado pela equação abaixo:

Biomassa (g/L) = $-104,02 + 1,09 \times [\text{melaço}] - 7,96 \cdot 10^{-3} \times [\text{melaço}]^2 + 0,22 \times [\text{extrato de levedura}] - 1,67 \cdot 10^{-2} \times [\text{extrato de levedura}]^2 - 8,31 \cdot 10^{-3} \times 42,00 \times [\text{melaço}] - 1,07 \cdot 10^{-14} \times 42,00 \times [\text{extrato de levedura}] + 4,18 \cdot 10^{-3} \times [\text{melaço}] \times [\text{extrato de levedura}] + 93,67$.

Através das superfícies de resposta, verificou-se que os níveis das variáveis estudadas proporcionaram a identificação da região do ótimo para a cepa *S. boulardii* SbM, sendo: glicose 40 g/L, melaço de cana 50 g/L e extrato de levedura 12 g/L, que proporcionaria uma produção de biomassa de 9,66 g/L.

4.3.3.2 Resultados da cepa *S. boulardii* Sb4308

Os resultados do planejamento experimental DCCR para a cepa Sb4308 estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DO PLANEJAMENTO DCCR 2³ – CEPA Sb4308

ENSAIO	GLICOSE (g/L)	MELAÇO (g/L)	EXT.LEV. (g/L)	BIOMASSA (g/L)
1	40	40	5	8,08
2	40	40	15	8,92
3	40	50	5	7,85
4	40	50	15	8,66
5	44	40	5	7,59
6	44	40	15	8,39
7	44	50	5	7,75
8	44	50	15	9,62
9	38,64	45	10	8,72
10	45,36	45	10	8,22
11	42	36,59	10	7,96
12	42	53,41	10	9,16
13	42	45	1,59	6,08
14	42	45	18,41	8,53
15 (C)	42	45	10	9,11
16 (C)	42	45	10	8,84
17 (C)	42	45	10	8,09

O melhor resultado de produção de biomassa seca foi obtido no ensaio 8, com nível +1 das três variáveis (glicose 44 g/L, melaço de cana 50 g/L e extrato de levedura 15 g/L) com uma produção de 9,62 g/L de biomassa. Nas

condições do ensaio 12, houve a segunda melhor produção de biomassa 9,16 g/L (nível 1,68 para a variável melaço, 53,41 g/L, e nível 0 para as variáveis glicose, 42 g/L, e extrato de levedura, 10 g/L) e a terceira foi com a condição do ponto central do experimento (glicose 42 g/L, melaço de cana 45 g/L e extrato de levedura 10 g/L), com uma produção de em média de 8,84 g/L (média de 9,11 g/L; 8,84 g/L e 8,09 g/L). A menor produção de biomassa seca (6,08 g/L) foi obtida no ensaio 13 que analisou as variáveis no nível -1 (glicose 40 g/L, melaço de cana 40 g/L e extrato de levedura 5,0 g/L).

A análise das interações entre as variáveis pode ser visualizada na Tabela 24.

Tabela 24 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO DCCR 2³– CEPA Sb4308

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRADAS	RAZÃO F	RAZÃO p
(1) Glicose (L)	0,074	1	0,074	0,3896	0,5523
Glicose (Q)	0,001	1	0,001	0,0070	0,9355
(2) Melaço (L)	0,624	1	0,624	3,2979	0,1122
Melaço (Q)	0,005	1	0,005	0,0248	0,8793
(3) Ext. lev. (L)	5,242	1	5,242	27,7275	0,0012
Ext. lev. (Q)	2,016	1	2,016	10,6639	0,0138
1L por 2L	0,441	1	0,441	2,3305	0,1707
1L por 3L	0,129	1	0,129	0,6845	0,4353
2L por 3L	0,133	1	0,133	0,7048	0,4289

Legenda: F = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%); R² = coeficiente de determinação para o ajuste do modelo à superfície de resposta; L = interação linear; Q = interação quadrática. R² = 0,872.

Com o R²=0,872, a tabela da ANOVA mostrou que somente a interação linear e também a interação quadrática do extrato de levedura apresentaram significância (p<0,05) na faixa estudada. Este resultado foi confirmado pelo Diagrama de Pareto (Figura 18) e pelas superfícies de resposta gerada (Figuras 19, 20 e 21).

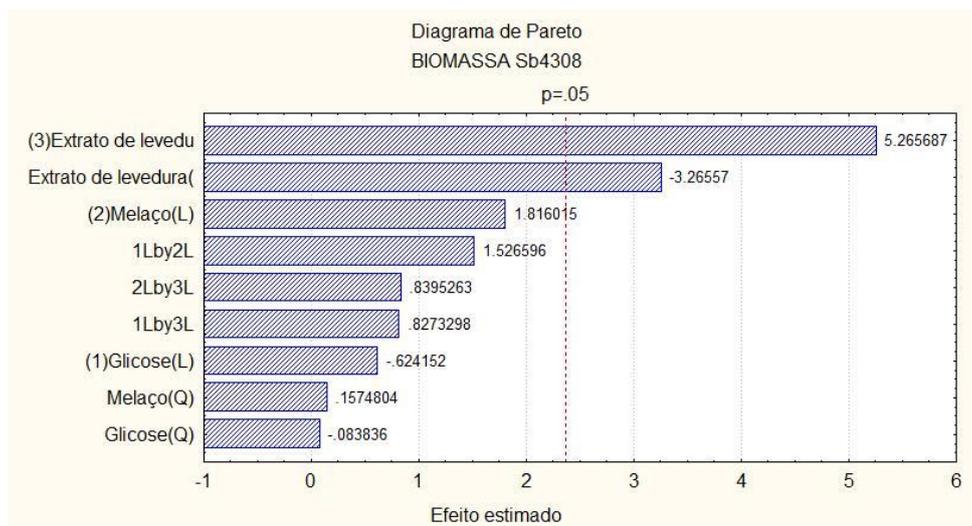


Figura 18 - DIAGRAMA DE PARETO – PLANEJAMENTO DCCR - Sb4308

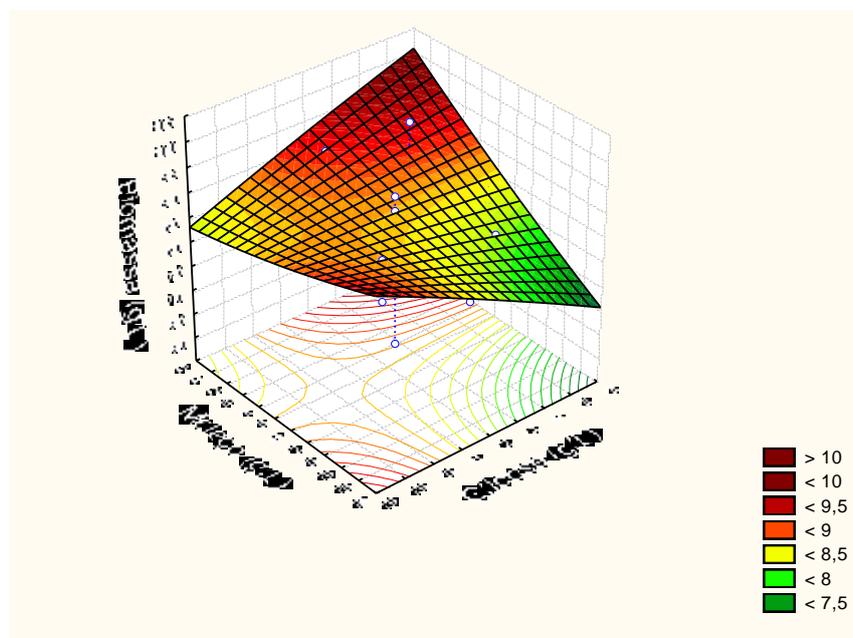


Figura 19 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (MELAÇO E GLICOSE) - Sb4308. VARIÁVEL EXTRATO DE LEVEDURA MANTIDA NO NÍVEL 0.

Através da superfície de resposta da Figura 19 pôde-se notar claramente que as concentrações dos componentes glicose e melaço de cana-de-açúcar utilizadas para os níveis analisados ainda não proporcionaram a determinação da região do ótimo para a produção de biomassa por *S. boulardii* Sb4308.

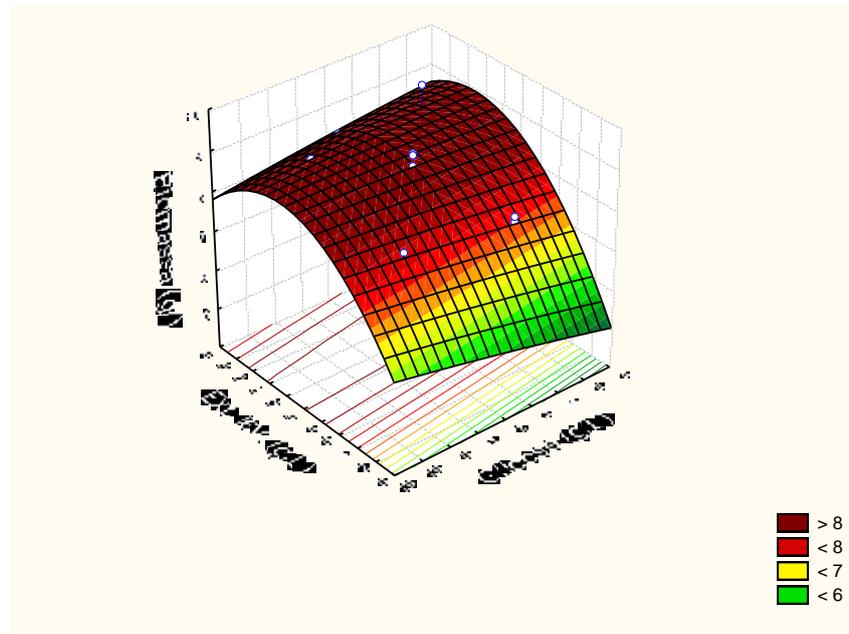


Figura 20 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E GLICOSE) - Sb4308. VARIÁVEL MELAÇO MANTIDA NO NÍVEL 0.

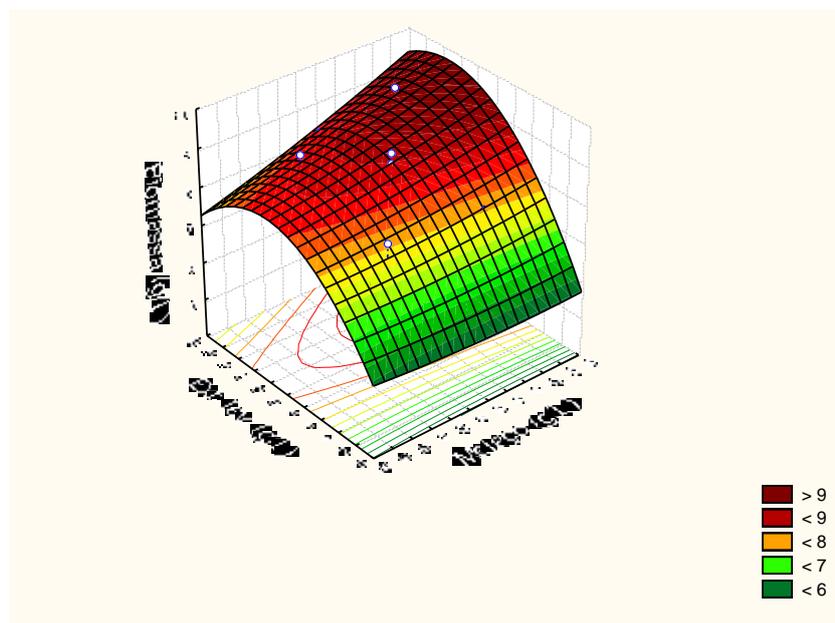


Figura 21 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA - PLANEJAMENTO DCCR (EXTRATO DE LEVEDURA E MELAÇO) - Sb4308. VARIÁVEL GLICOSE MANTIDA NO NÍVEL 0.

O modelo matemático para esse planejamento foi:

$$\text{Biomassa (g/L)} = 54,17 - 0,99 \times [\text{glicose}] - 2,75 \cdot 10^{-3} \times [\text{glicose}]^2 - 1,07 \times [\text{melaço}] + 8,15 \cdot 10^{-4} \times [\text{melaço}]^2 - 0,30 \times [\text{extrato de levedura}] - 1,69 \cdot 10^{-2} \times$$

$$[\text{extrato de levedura}]^2 + 2,35 \cdot 10^{-2} \times [\text{glicose}] \times [\text{melaço}] + 1,27 \cdot 10^{-2} \times [\text{glicose}] \times [\text{extrato de levedura}] + 5,16 \cdot 10^{-3} \times [\text{melaço}] \times [\text{ext. levedura}].$$

O modelo matemático nos indica que para a variável significativa, extrato de levedura ($p= 0,0012$), uma diminuição na concentração ($-0,30 \times [\text{extrato de levedura}]$) tem um efeito positivo na produção de biomassa. Conforme relatado na avaliação da Figura 19, os níveis de concentrações estudados para as fontes de carbono, glicose e melaço de cana, estavam aquém de proporcionar uma produção ótima de biomassa. Além disso, a análise dessa figura indica que esse aumento levaria ao encontro da região ótima das concentrações e, conseqüentemente, essas variáveis apresentariam significância para a produção da biomassa.

As três superfícies de resposta (Figuras 19, 20 e 21) mostraram que as concentrações das fontes de carbono utilizadas para os níveis analisados não proporcionaram a determinação da região do ótimo para a produção de biomassa por *S. boulardii* Sb4308. Como um dos objetivos do trabalho é a produção otimizada dessa levedura utilizando o resíduo agroindustrial melaço de cana, seguiu-se os estudos da otimização do meio de cultivo com concentrações aumentadas dessa fonte de carbono.

Com os resultados obtidos nessa etapa do trabalho, foram determinadas as concentrações ótimas dos componentes para a cepa SbM, sendo: glicose 40 g/L, melaço de cana 50 g/L e extrato de levedura 12 g/L; já para a cepa Sb4308, a região do ótimo não foi identificada, encontrando-se somente a concentração ótima de extrato de levedura: 12 g/L. Assim, assumiu-se que para a cepa Sb4308 a otimização do meio de cultivo ainda não estaria finalizada, sendo necessários mais experimentos com concentrações maiores de fonte de carbono.

4.3.4 Validação do modelo da otimização do meio de cultivo

Para a validação da otimização do meio de cultivo, foram realizadas em triplicata a fermentação nas condições do ensaio 8 (glicose 44 g/L, melaço 50 g/L e extrato de levedura 15 g/L) e também em novas condições, conforme especificado no subitem 3.12.5., sendo glicose 40 g/L, melaço 50 g/L e extrato

de levedura 12 g/L para SbM e glicose 45 g/L, melaço 55 g/L e extrato de levedura 12 g/L para Sb4308. Foi realizada uma comparação com os resultados obtidos no planejamento DCCR e com os resultados teóricos obtidos através dos modelos matemáticos. Os resultados obtidos estão na Tabela 25.

Tabela 25 – RESULTADO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO DCCR 2³

CEPA	ENSAIO	BIOMASSA (g/L)	
		MÉDIA	VALOR TEÓRICO
SbM	01	9,69 ± 0,23	9,66
	02	9,49 ± 0,18	9,56*
Sb4308	01	9,80 ± 0,11	9,74
	02	9,22 ± 0,11	9,62*

LEGENDA: 01 = NOVA CONDIÇÃO TESTADA E 02 = CONDIÇÃO IGUAL AO ENSAIO 8. *VALOR EXPERIMENTAL OBTIDO NO PLANEJAMENTO DCCR

A otimização do meio de cultivo através do planejamento DCCR foi validada, visto que os valores teóricos, obtidos através dos modelos matemáticos, são muito próximos dos obtidos experimentalmente.

4.3.5 Análise da influência do aumento da concentração de melaço de cana no rendimento da produção de biomassa Sb4308

As superfícies de resposta obtidas nos planejamentos experimentais do tipo DCCR para a cepa Sb4308 indicaram a necessidade de aumentar a concentração da fonte de carbono no meio de cultivo. Nessa etapa foram testadas concentrações desde 55 g/L até 400 g/L de melaço de cana e os resultados de biomassa (g/L) obtidos estão na Tabela 26.

Tabela 26 – RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA OBTIDA COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE MELAÇO DE CANA – CEPA Sb4308

ENSAIO	MELAÇO DE CANA (g/L)	BIOMASSA (g/L)
01	55	5,87 ± 0,14
02	70	6,75 ± 0,12
03	100	8,20 ± 0,09
04	125	9,40 ± 0,01
05	150	10,14 ± 0,02
06	200	11,65 ± 0,71
07	250	13,30 ± 0,68
08	300	11,75 ± 0,52
09	350	13,93 ± 0,75
10	400	12,70 ± 0,46
11	450	11,54 ± 0,27

NOTA: TODOS OS ENSAIOS TAMBÉM CONTINHAM EXTRATO DE LEVEDURA 12g/L

Os resultados mostraram que a produção de biomassa aumentou, conforme a concentração de melaço de cana-de-açúcar foi aumentada, até 250 g/L, a partir daí não houve aumento significativo. Nesse caso foi necessário o estudo do rendimento da produção em tais condições para então ser determinada a melhor condição em termos de concentração de melaço de cana do meio de cultivo.

Observou-se que a retirada da fonte de carbono glicose foi suprida pelo aumento da fonte de carbono melaço de cana-de-açúcar na concentração de 125 g/L. Tal fato pode ser comprovado pelo valor de biomassa obtida da cepa *S. boulardii* Sb4308 quando esta foi cultivada em meio contendo glicose 45 g/L, melaço de cana-de-açúcar 55 g/L e extrato de levedura 12 g/L (ensaio 01 do subitem 4.3.4), o qual foi de cerca de 9,8 g/L. Já no meio de cultivo contendo melaço de cana-de-açúcar 125 g/L e extrato de levedura 12 g/L a produção de biomassa atingiu 9,4 g/L.

4.3.5.1 Análise de rendimento da produção de biomassa de Sb4308

Uma análise de rendimento do processo de produção de biomassa de *S. boulardii* Sb4308 foi realizada com melaço de cana-de-açúcar em três concentrações distintas, 100, 150 e 200 g/L, e extrato de levedura 12 g/L. Os resultados obtidos estão na Tabela 27.

Tabela 27 - ANÁLISE DE RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MELAÇO DE CANA

ENSAIO	BIOMASSA (g/L)	AÇÚCAR TOTAL (g/L)	RENDIMENTO (%)
01Ti	0,99	44,57	18,80
01Tf	8,41	5,07	
02Ti	1,14	63,41	17,48
02Tf	11,03	6,80	
03Ti	1,29	78,71	15,28
03Tf	12,03	8,38	

LEGENDA: ENSAIO 01 = MELAÇO 100g/L; ENSAIO 02 = MELAÇO 150g/L; ENSAIO 03 = MELAÇO 200g/L; Ti = TEMPO INICIAL E Tf = TEMPO FINAL.

Analisando-se a produção de biomassa (g/L) obtida nos ensaios observa-se que houve um aumento de 33,3% do ensaio 01 para o ensaio 02 (de 7,42 g/L para 9,89 g/L) e um aumento de apenas 8,6% do ensaio 02 para o ensaio 03 (de 9,89 g/L para 10,75 g/L). Porém, ao analisar os rendimentos de produção, foi verificado um rendimento de 17,48% nas condições do ensaio 02 e 15,28% nas condições do ensaio 03. Dessa forma, pôde-se concluir que o ensaio 02: melaço de cana-de-açúcar 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L, teve a melhor relação produção de biomassa (g/L) x rendimento (%).

Nesse teste também foi analisado o pH do meio de cultivo antes de ser inoculado (após a esterilização em autoclave), o pH do meio após a inoculação (tempo 0) e o pH ao final da fermentação (tempo final de 48horas). Esses resultados estão apresentados na Tabela 28:

Tabela 28 - pH DO MEIO DE CULTIVO: APÓS AUTOCLAVAGEM, NO INÍCIO E NO FINAL DA FERMENTAÇÃO

ENSAIO	pH MEIO DE CULTIVO	pH NO TEMPO 0	pH NO TEMPO FINAL
01	6,15	5,53	4,33
02	6,19	5,52	4,45
03	6,07	5,47	4,53

De acordo com os resultados obtidos do pH, pôde-se concluir que não há necessidade de se corrigir o pH do meio de cultura antes da inoculação, pois o pH inicial da fermentação, em torno de 5,5, é interessante para o cultivo de leveduras do gênero *Saccharomyces* (DERMICI e PORMETTO, 1999; WANG, ZHANG e TAN, 2010).

Com esse experimento concluiu-se a otimização do meio de cultivo para a cepa *S. boulardii* Sb4308, sendo este composto por melaço de cana-de-açúcar 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L, com o qual foi obtido uma biomassa de 11,03 g/L. Este valor foi maior do que o obtido para a cepa SbM na sua condição otimizada, que foi de 9,69g/L. Dessa forma, a cepa Sb4308 foi a cepa selecionada para produção de biomassa e acúmulo de selênio nas etapas posteriores deste trabalho.

Prosseguiu-se para a realização dos estudos da cinética de produção do inóculo e da fermentação para produção de biomassa de *S. boulardii* Sb4308, para assim se determinar os melhores tempos de cultivo.

4.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DO INÓCULO DE *S. boulardii* Sb4308

De acordo com Stanbury, Whitaker e Hall (1995), a condição fisiológica do inóculo no momento da transferência da cultura tem um grande efeito sobre o desempenho da fermentação. O melhor momento para a transferência da cultura deve ser determinado experimentalmente, para então, os procedimentos serem estabelecidos de modo que a inoculação ideal possa ser alcançada rotineiramente. Esses procedimentos incluem as padronizações das condições de cultura e acompanhamentos do estado do inóculo, de modo que a transferência ocorra no tempo ótimo e estado fisiológico correto.

Nessa etapa foi avaliada a cinética do inóculo, sendo obtidos dados de pH, biomassa seca (g/L) e viabilidade celular (UFC/mL) durante a fermentação com tempo total de 32 horas, sendo analisados os tempos de 0, 8, 16, 24 e 32 horas. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 22.

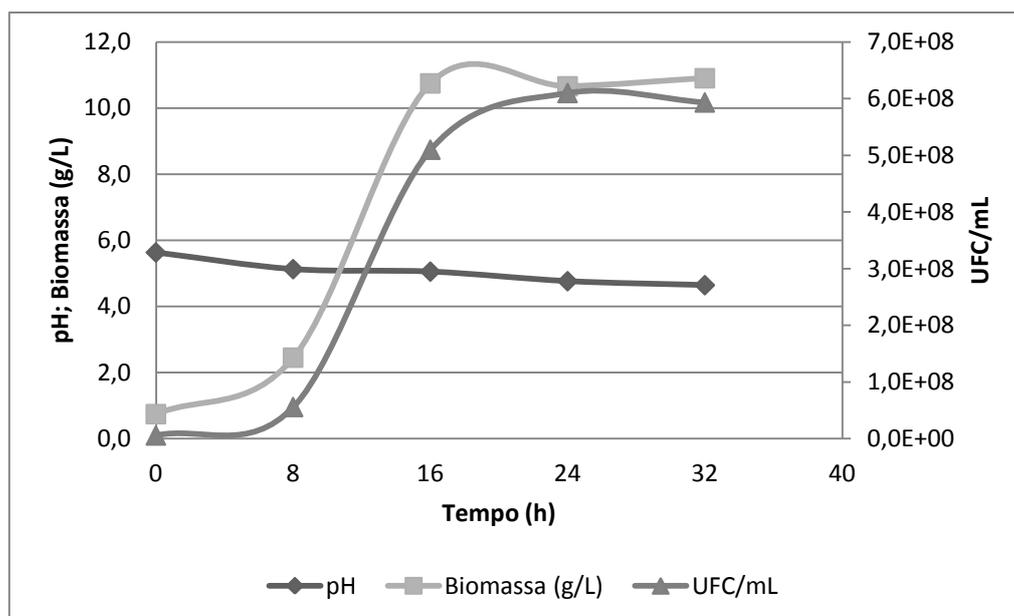


Figura 22 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DO INÓCULO DA CEPA *S. boulardii* Sb4308

O estudo da cinética de crescimento da cepa Sb4308 mostra que a mesma teve uma fase de adaptação (fase lag) nas primeiras 8 horas de cultivo, provavelmente por ter sido transferida de um meio sólido YM para um meio líquido complexo, composto por melaço de cana e extrato de levedura. Após 8 horas iniciou a fase exponencial de crescimento (fase log) e a partir de 24 horas iniciou a fase estacionária, chegando a $6,1 \cdot 10^8$ UFC/mL. O perfil da curva da concentração de biomassa seca obtida foi semelhante à das células viáveis e ficou em torno de 10,67 g/L.

Em relação ao pH, houve pouca variação ao longo da fermentação. O pH teve uma diminuição de 5,6 para 4,8, isso ocorreu provavelmente devido à produção de ácidos orgânicos (ácidos succínico, láctico, acético e outros) e, conseqüentemente, o aumento da acidez do meio de fermentação (RIBÉREAU-GAYON e PEINAUD, 1996).

Através dessas análises, ficou determinado que o tempo de transferência de células para a inoculação do meio de cultivo a ser empregado durante a fermentação seria de 20 horas, tempo em que a fase de reprodução celular encontra-se extremamente ativa.

4.5 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

Após a determinação do tempo de cultivo do inóculo, foi realizada a cinética da fermentação em frascos de Erlenmeyer. Os resultados da cinética estão mostrados na Figura 23.

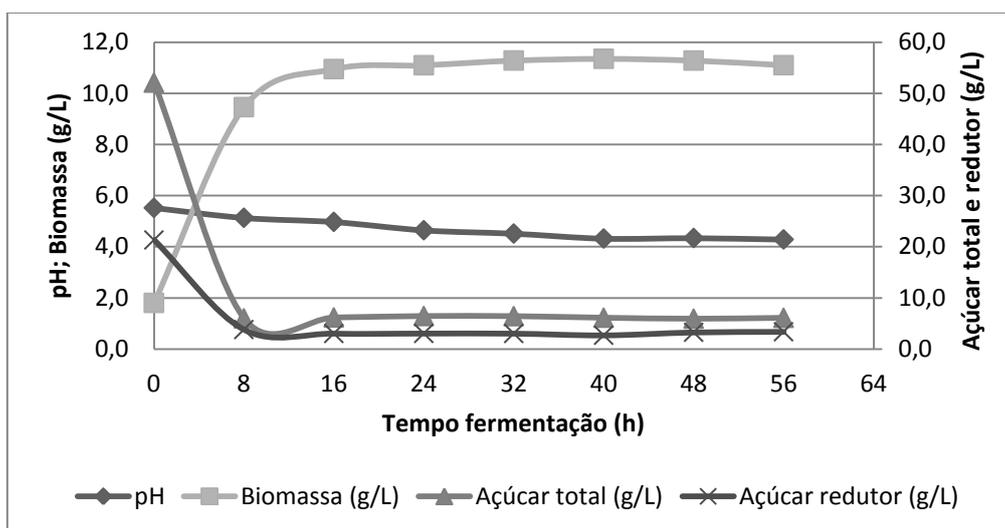


Figura 23 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER

Analisando a curva de biomassa, observou-se que não houve fase de adaptação, o crescimento da cepa entrou diretamente na fase exponencial. Tal fato ocorreu, pois as células já se encontravam adaptadas ao meio e às condições de cultivo. A partir de 16 horas o crescimento se manteve praticamente constante, ficando em torno de 11,22 g/L.

O perfil de consumo de açúcares totais e redutores mostrou que, a partir de 8 horas, essas fontes de carbono praticamente se esgotaram, ficando em torno de 6,0 g/L e 3,0 g/L, respectivamente. O pH diminuiu de 5,5 para 4,4.

A partir dos dados obtidos, para se garantir que o crescimento das células esteja na fase estacionária e também por motivos operacionais, definiu-se um tempo de fermentação total de 24 horas.

4.6 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb 4308 EM BATELADA EM BIORREATOR DO TIPO STR

Os tempos de cultivo determinados para o inóculo (20 horas) e para a fermentação em frascos de Erlenmeyer (24 horas) foram transferidos para o preparo do pré-inóculo e inóculo, respectivamente, para a realização da fermentação submersa em modo batelada em biorreator do tipo tanque agitado (*Stirred Tank Reactor* - STR). Os resultados do acompanhamento do processo estão na Figura 24.

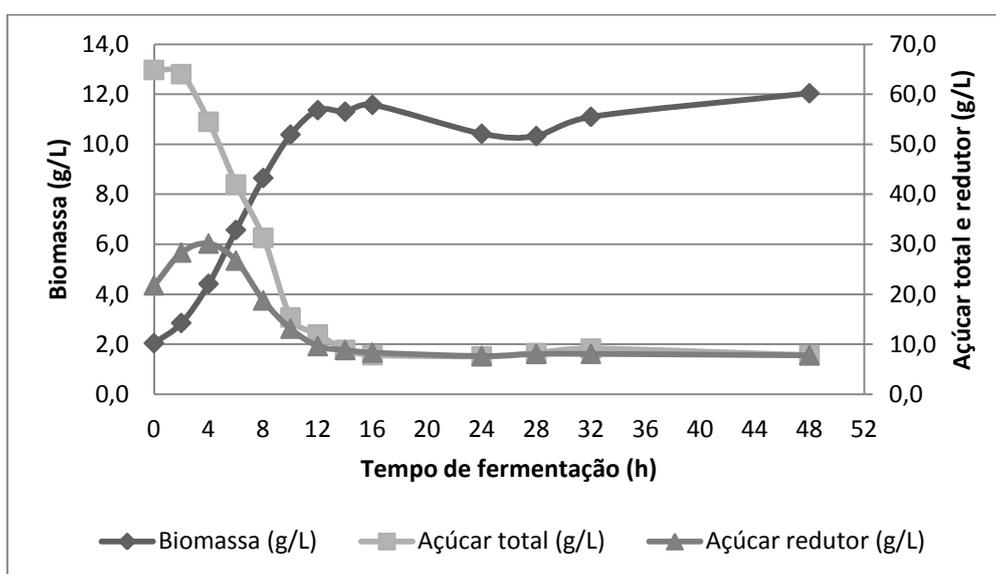


Figura 24 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BATELADA EM BIORREATOR STR – CEPA Sb4308

De acordo com o gráfico, o crescimento da levedura *S. boulardii* 4308 inicia na fase log que vai até 12 horas de cultivo. A partir daí segue na fase estacionária, chegando a um total de 11,37 g/L. A concentração de açúcares totais e redutores cai para aproximadamente 8,0 g/L após 14 horas de cultivo. Os pontos 24 horas e 28 horas apresentaram uma diminuição da biomassa, provavelmente devido à adição de grande volume de anti-espumante, causando uma possível diluição da biomassa coletada.

Nota-se que a produção de biomassa obtida em fermentação em biorreator (11,37g/L) foi bem próxima à obtida em frascos de Erlenmeyer (11,22 g/L). Isto pode ter ocorrido, provavelmente, devido ao fato de que as condições apresentadas em frascos de Erlenmeyer, como agitação e, conseqüentemente, a oxigenação, sejam suficientes para o crescimento máximo da levedura.

Muller *et al.* (2007) analisaram a cinética de crescimento de *S. boulardii* em biorreator *Air-lift*, com aeração de 1,0 e 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto), comparada com o crescimento em frascos agitados em *shaker*. Utilizaram meio de cultivo contendo glicose 10,0 g/L, peptona de carne 2,0 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, KH_2PO_4 0,6 g/L, ureia 0,36 g/L, sulfato de amônia 0,12 g/L e sulfato de magnésio 0,24 g/L, e incubação a 30°C sob agitação de 200min⁻¹ (*shaker*) por 12 horas. Os autores obtiveram valores de massa celular (g.L⁻¹) próximas para as três condições, sendo: 3,15, 3,97 e 3,91, para os reatores *Air-lift* 1,0 vvm, *Air-lift* 1,5 vvm e *Shaker*, respectivamente

Foi observado que a partir de 8 horas a concentração de açúcares totais reduziu pela metade, dessa forma, iniciou-se o estudo da alimentação da fermentação com melaço de cana, visando ajudar na multiplicação celular e assim aumentar a concentração de biomassa final obtida. Esse estudo foi realizado em frascos de Erlenmeyer com o objetivo de se obter o horário mais adequado para a alimentação, a concentração e o tempo total de fermentação.

4.7 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 EM BATELADA ALIMENTADA EM FRASCOS DE ERLENMEYER

Iniciou-se a análise da alimentação da fermentação alimentando-se os cultivos após 4, 6 e 8 horas do início da fermentação com melaço de cana-de-açúcar 150 g/L. A alimentação também foi realizada com glicose 30 g/L após 4 e 6 horas do início, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 25. O tempo de cultivo total para cada ensaio foi de 24 horas, contadas a partir da alimentação. Por exemplo, para o ensaio em que a alimentação foi realizada no tempo de 4 horas, o tempo total do cultivo foi de 28 horas.

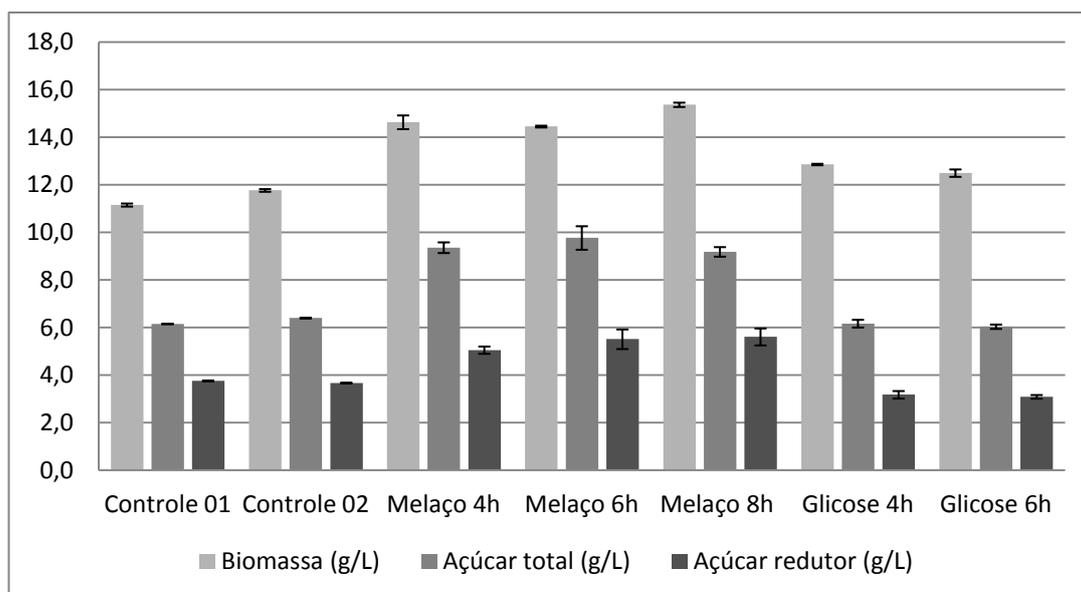


Figura 25 - ANÁLISE DOS TEMPOS DE ALIMENTAÇÃO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E GLICOSE.

Os controles, que não receberam alimentação (processo em batelada), tiveram tempo total de cultivo 8 horas (01) e 32 horas (02). Esses tempos foram escolhidos baseando-se no ensaio em que o fermentado recebeu alimentação com melaço de cana no tempo de 8 horas e prosseguiu até o tempo de 32 horas. Para ambos os controles, foi observado uma produção de biomassa próxima, de 11,15 g/L e 11,77 g/L, respectivamente, mostrando que com o tempo de 8 horas de cultivo já se chega à fase estacionária de crescimento. Os crescimentos para os ensaios alimentados com melaço de cana-de-açúcar nos tempos 4 e 6 horas foram próximos: 14,63 g/L e 14,45 g/L, respectivamente; o que ocorreu também entre os ensaios alimentados com glicose: 12,85 g/L e 12,49 g/L. Já o ensaio alimentado no tempo 8 horas com melaço teve uma produção de 15,36 g/L de biomassa.

Foi verificada uma concentração final de açúcares totais de aproximadamente 6,3 g/L para os controles 01 e 02. Para os ensaios alimentados com melaço de cana aproximadamente 9,4 g/L de açúcares totais ainda permaneceram e, aproximadamente 6,1 g/L para os ensaios alimentados com glicose. As concentrações finais de açúcares redutores foram de aproximadamente: 3,7 g/L para os controles 01 e 02, 5,4 g/L para os ensaios alimentados com melaço e 3,1 g/L para os ensaios alimentados com glicose.

Concluiu-se assim que a alimentação realizada com melaço de cana-de-açúcar promove uma maior produção de biomassa quando comparada com a

alimentação com glicose e, também, com a fermentação em batelada. Para uma melhor análise e comparação dos métodos, foram calculados os rendimentos (%) e as produtividades (g/L.h) dos processos em batelada alimentada, com alimentação de melaço, e o processo em batelada, os quais estão mostrados na Tabela 29.

Tabela 29 - ANÁLISE DO RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE DAS FERMENTAÇÕES EM BATELADA ALIMENTADA COM MELAÇO DE CANA E FINALIZADAS APÓS 24 HORAS DA ALIMENTAÇÃO

ENSAIO	BIOMASSA (g/L)	RENDIMENTO (%)	PRODUTIVIDADE (g/L.h)
Controle 01	11,15	17,49	1,39
Controle 02	11,77	18,65	0,37
Melaço 4h	14,63	24,96	0,52
Melaço 6h	14,45	24,81	0,48
Melaço 8h	15,36	26,23	0,48

A análise do rendimento dos processos mostrou que a alimentação com melaço de cana-de-açúcar proporcionou um aumento de 39,4%, de 38,6% e de 40,7%, respectivamente para os tempos 4, 6 e 8 horas, em relação à fermentação em batelada (controle 02). Porém, ao analisarmos a produtividade obtida nos ensaios, verificou-se que a fermentação em batelada e com término após 8 horas do início (controle 01) é a que apresentou melhor resultado, isso se deve ao fato de que a produtividade é inversamente proporcional ao tempo total de fermentação.

Dessa forma, foi realizado outro experimento avaliando a alimentação nos tempos 4 e 6 horas e com término após 8 horas e 10 horas do início da fermentação (tempos totais) e não após 24 horas da alimentação, como foi no experimento anterior.

Para esse experimento a concentração de melaço de cana-de-açúcar foi diminuída para 100 g/L, visto que foi observado concentrações restantes de aproximadamente 9,0 g/L de açúcares totais e 5,0 g/L de açúcares redutores. Os resultados estão mostrados na Figura 26.

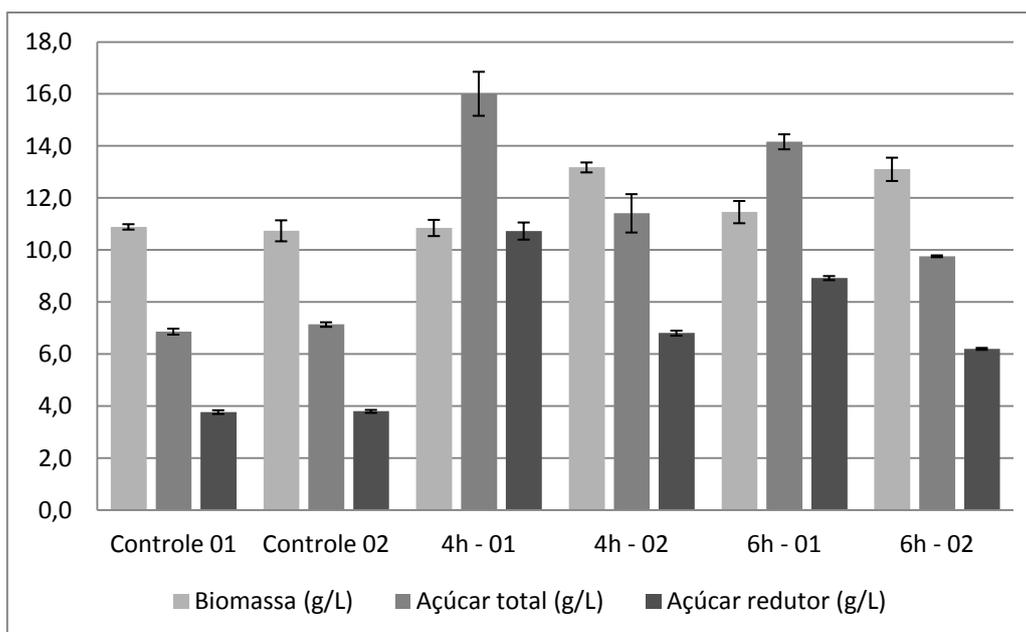


Figura 26 - ANÁLISE DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DO TEMPO FINAL DA FERMENTAÇÃO.

Verificou-se que os processos em batelada com os tempos de cultivo 8 e 10 horas, controles 01 e 02, proporcionaram uma produção de biomassa próxima, de 10,89 g/L e 10,74 g/L, respectivamente. Os crescimentos para os ensaios com tempo final de cultivo de 8 horas, tanto alimentado no tempo 4 horas quanto no tempo 6 horas, foram de 10,85 g/L e 11,46 g/L, respectivamente; sendo inferiores quando comparados aos cultivos que foram finalizados no tempo de 10 horas, com produção de biomassa de 13,18 g/L para alimentação no tempo 4 horas e de 13,11 g/L no tempo 6 horas.

Quanto à concentração de açúcar total final, foi verificada uma concentração de 6,9 g/L para o controle 01 e de 7,12 g/L para o controle 02. Nos ensaios de batelada alimentada finalizados no tempo 8 horas, a concentração de açúcares totais foi de 16,01 g/L com alimentação no tempo de 4 horas, e de 14,17 g/L no tempo de 6 horas. Para os ensaios finalizados no tempo 10 horas, nos quais houve um tempo maior para o consumo desses açúcares, as concentrações restantes foram de 11,41 g/L e de 9,77 g/L, respectivamente.

Já as concentrações finais de açúcares redutores foram de aproximadamente: 3,79 g/L para os processos em batelada (controles 01 e 02); 10,73 g/L e 8,93 g/L para os ensaios em batelada alimentada e com

alimentação nos tempos 4 e 6 horas e finalizados no tempo 8 horas; e para os finalizados no tempo de 10 horas foram de aproximadamente 6,51 g/L.

Para uma melhor análise, foram calculados os rendimentos (%) e as produtividades (g/L.h) dos processos alimentados com melaço e os brancos, que estão mostrados na Tabela 30.

Tabela 30 - ANÁLISE DO RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE DAS FERMENTAÇÕES EM BATELADA ALIMENTADA COM MELAÇO DE CANA E FINALIZADOS NOS TEMPOS 8 E 10 HORAS

ENSAIO	BIOMASSA (g/L)	RENDIMENTO (%)	PRODUTIVIDADE (g/L.h)
Controle – 01	10,89	17,26	1,36
Controle – 02	10,74	17,08	1,07
Melaço 4h – 01	10,85	20,50	1,36
Melaço 4h – 02	13,18	23,16	1,32
Melaço 6h – 01	11,46	20,97	1,43
Melaço 6h – 02	13,11	22,32	1,31

LEGENDA: 01 = TEMPO FINAL DE 8 HORAS; 02 = TEMPO FINAL DE 10 HORAS

Analisando-se os resultados concluiu-se que a fermentação em batelada alimentada, com alimentação após 4 horas do início, e com término após 10 horas de cultivo (4h – 02), promoveu um melhor rendimento, levando a um aumento de 35,7% quando comparado com o controle 02 (em batelada e com tempo final de 10 horas), e ainda com uma produtividade maior, obtendo cerca de 1,3 g/L.h de biomassa de *S. boulardii* Sb4308.

Portanto, com esses resultados concluiu-se que as condições de fermentação selecionadas para a cepa Sb4308 foram: Fermentação em Batelada Alimentada para produção de biomassa em meio de cultivo para inóculo e fermentação composto por melaço de cana-de-açúcar 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L, alimentação com melaço de cana-de-açúcar 100 g/L, e parâmetros físicos para o cultivo em frascos de Erlenmeyer e em biorreator segundo a Tabela 31.

Tabela 31 - PARÂMETROS FÍSICOS DETERMINADOS PARA O CULTIVO DA CEPA *S. boulardii* Sb4308

PARÂMETROS	FRASCOS DE ERLLENMEYER	BIORREATOR
Temperatura	30°C	30°C
Agitação	120 rpm	30% OD
Pré-inóculo	-	20 horas
Inóculo	20 horas	24 horas
Alimentação	4 horas	4 horas
Término	10 horas	10 horas
Tempo total	30 horas	54 horas

A Tabela 32 apresenta o resumo da evolução das etapas de otimização que levaram a um aumento de biomassa (g/L) e um menor tempo de cultivo, resultando em ganhos de produtividade.

Tabela 32 - RESUMO DA EVOLUÇÃO DOS RESULTADOS DE BIOMASSA, PRODUTIVIDADE E GANHOS DE PRODUTIVIDADE DAS ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE *S. boulardii* Sb 4308

ETAPA	BIOMASSA (g/L)	PRODUTIVIDADE (g/L.h)	GANHOS DE PRODUTIVIDADE
Condição inicial (meio YM)	3,67 g/L em 48 horas	0,076	-
1 – Planejamento Otimização do meio de cultivo	8,86 g/L em 48 horas	0,185	Aumento de 141 % na produtividade em relação à condição inicial
2 – Continuação Otimização do meio de cultivo	11,03 g/L em 48 horas	0,230	Aumento de 201 % na produtividade em relação à condição inicial
3 – Cinética do inóculo e fermentação (frascos e Biorreator)	11,22 g/L e 11,37 g/L em 24 horas	0,471	Aumento de 516% na produtividade em relação à condição inicial
4 – Fermentação Batelada Alimentada em frascos	13,18 g/L em 10horas	1,318	Aumento de 1624% na produtividade em relação à condição inicial

FONTE: O AUTOR, 2013

Praticamente todos os dados na literatura sobre a *Saccharomyces boulardii* são referentes à sua atuação como probiótico, o que tornou difícil uma análise comparativa com trabalhos que tratassem de estudos sobre a produção biotecnológica dessa levedura.

Citado anteriormente, Muller *et al.* (2007) analisaram a cinética de crescimento de *S. boulardii* em biorreator *Air-lift*, com aeração de 1,0 e 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), comparada com o crescimento em frascos agitados em *shaker*. Esses autores obtiveram como resultados de biomassa (g/L) os seguintes valores: 3,15, 3,97 e 3,91, para os reatores *Air-lift* 1,0vvm, *Air-lift* 1,5vvm e *Shaker*, respectivamente. Valores próximos dos

obtidos para a levedura utilizada neste trabalho, Sb4308, quando cultivada nas condições iniciais: em meio YM líquido e nas condições antes das otimizações, que foi de aproximadamente de 3,01 g/L e, praticamente 70% menores que o obtido após a otimização de cultivo, 13,18 g/L. Destaca-se o ganho de produtividade de 1624% da condição final otimizada de fermentação em batelada alimentada com duração de 10 horas em relação à condição inicial que era de cultivo em meio YM líquido por 48 horas.

No trabalho de Muller *et al.* (2006) os resultados de produtividade (g/L.h) obtidos para o cultivo de *S. boulardii* nos reatores *Air-lift* 1,0 vvm, *Air-lift* 1,5 vvm e *Shaker*, foram de 0,263, 0,320 e 0,325, respectivamente, ao longo de 12 horas. Valores abaixo do obtido neste trabalho com cultivo de 10 horas, que foi de 1,318 g/L.h.

Já os resultados de rendimento (%) obtidos por esses autores foram de 33,4, 39,3 e 41,7, para o cultivo nos reatores *Air-lift* 1,0vvm, *Air-lift* 1,5vvm e *Shaker*, respectivamente. Sendo maiores do que o obtido nesse trabalho, que foi de 23,17%, valor que pode ser melhorado através de estudos da adição de uma menor concentração de melaço de cana na alimentação da fermentação, o que poderia diminuir a quantidade de açúcares restantes e assim resultar em uma melhor conversão de substrato em células.

A produção de biomassa *S. boulardii* otimizada nesse trabalho pode seguir dois caminhos, um seria para a produção de biomassa para ser utilizada como probiótica, dessa forma não é adicionado Na_2SeO_3 para bioacúmulo e a biomassa obtida é separada e concentrada por centrifugação sendo posteriormente seca por liofilização. O outro caminho seria para a produção de levedura rica em selênio orgânico, na qual a biomassa é obtida nas mesmas condições de cultivo otimizadas para o crescimento e inclui a etapa de bioacúmulo de Se através da adição de solução de Na_2SeO_3 na concentração e no tempo selecionados através dos experimentos realizados, e esta biomassa bioacumulada segue para a etapa de secagem em estufa a 60°C com circulação de ar.

Esses diferentes tratamentos de secagem do produto foram propostos visto que de acordo com legislação brasileira, para que micro-organismos sejam considerados probióticos é necessário que estejam viáveis no momento em que são administrados oralmente, para assim atuarem adequadamente ao

chegarem ao intestino. A mesma estabelece que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo (ANVISA, 2008). A liofilização foi o processo utilizado nesse trabalho, por ser um processo de secagem branda, que mantém a viabilidade dos micro-organismos, também pelo fato de que os produtos probióticos comercializados de *S. boulardii* são liofilizados.

Já para o produto enriquecido com selênio, essa viabilidade não é necessária, pelo contrário, de acordo com Moesgaard e Paulin (2005), o selênio orgânico bioacumulado na levedura é mais facilmente absorvido pelo mamífero quando essa levedura se apresenta morta e o tratamento térmico resulta em uma grande desintegração das células. O processo de secagem a 60°C em estufa com circulação de ar foi utilizado nesse trabalho para secagem do produto, acrescido de uma etapa de trituração. Essa etapa de secagem em estufa, ao invés da liofilização, além de melhorar o aproveitamento do produto, minimiza o custo da produção por ser uma etapa mais barata.

Como proposto como sugestão para trabalho futuro, os dois produtos poderiam passar pela mesma etapa de secagem: por *spray-dryer*, podendo o produto rico em selênio receber um pré-tratamento de pasteurização. A utilização de um mesmo método para os dois produtos tornaria o processo mais barato e com menos etapas, além da possibilidade de o produto final ser composto por um produto misto.

4.8 ANÁLISE DO BIOACÚMULO DE SELÊNIO

4.8.1 Análise prévia da capacidade das cepas SbM e Sb4308 quanto à tolerância e adaptação ao Se adicionado no meio de cultivo

As cepas foram inoculadas em meio de cultivo contendo diversas concentrações de Na_2SeO_3 . A tolerância destas cepas nessas condições foi avaliada através da análise da produção de biomassa obtida e pela quantidade de Se restante no meio. Sendo assim, foi possível determinar, indiretamente, a

quantidade de selênio que foi bioacumulada pela biomassa da levedura de maneira absorvida ou adsorvida. Os resultados estão mostrados na Tabela 33.

Tabela 33 – ANÁLISE DA TOLERÂNCIA DAS CEPAS *S. boulardii* SbM E Sb4308 AO SELÊNIO

Se (ppm)	SbM		Sb4308	
	BIOMASSA (g/L)	Se (ppm) NO SOBRENADANTE	BIOMASSA (g/L)	Se (ppm) NO SOBRENADANTE
0	3,34	0	2,69	0
10	1,41	3,82	1,41	3,52
50	1,07	37,87	0,96	37,72
100	0,82	97,29	0,49	100,38
150	0,75	100,47	0,32	141,03
200	0,75	200,72	0,30	199,14
300	0,66	291,51	0,35	219,65
400	0,66	401,67	0,36	380,41

Os resultados mostraram que a presença de selênio inorgânico no meio de cultivo inibe fortemente o crescimento das leveduras, sendo tóxico às essas células. Esse fato foi notado por Tuite e Oliver (1991), citados por Ponce de León *et al.* (2002), que fizeram estudos com *Saccharomyces cerevisiae* e mostraram que elementos tais como Se, Ag, As e Pb podem afetar desfavoravelmente o crescimento da levedura quando presentes em concentrações maiores que 100 $\mu\text{mol/L}$ (7,9 ppm para o Se), provavelmente devido a perda da eficiência da divisão celular.

Wang, Zhang e Tan (2010) relataram que há um bioacúmulo crescente quando a adição de Na_2SeO_3 no meio de cultivo vai de 30 a 90 ppm e um declínio para concentrações acima de 90 ppm pela *S. cerevisiae*. Com os dados obtidos nesse estudo para a *S. boulardii*, notou-se que na adição de 10 ppm, houve um bioacúmulo de cerca de 60% e na adição de 50 ppm houve um bioacúmulo de cerca de 24%, para as duas cepas. A partir de 100 ppm os valores bioacumulados foram praticamente nulos ou não se pôde fazer uma relação entre as quantidades de Na_2SeO_3 restantes no meio de cultivo (quantidade que não foi incorporada na biomassa na forma absorvida ou adsorvida), com as quantidades de sal adicionadas ao meio. No entanto, ambas as cepas são capazes de acumular Se em suas biomassas.

Os resultados relacionados à capacidade de adaptação das cepas diante de concentrações aumentadas de Se no meio de cultivo estão mostrados na Tabela 34.

Tabela 34 – TESTE DE ADAPTAÇÃO DAS CEPAS *S. boulardii* SbM e Sb4308 AO SELÊNIO

Se (ppm)	SbM		Sb4308	
	BIOMASSA (g/L)	Se (ppm) NO SOBRENADANTE	BIOMASSA (g/L)	Se (ppm) NO SOBRENADANTE
0	3,34		2,69	
10	1,69	6,68	1,48	2,22
50	0,92	46,21	0,74	35,68
100	0,78	92,17	0,40	100,35
150	0,88	122,09	0,52	137,19
200	0,96	162,33	0,56	192,37
300	0,98	238,70	0,46	300,27
400	0,901	348,99	0,38	366,70

Esses dados também mostraram uma inibição do crescimento das leveduras na presença de Na_2SeO_3 no meio de cultivo. A adaptação destas pôde ser notada nos meios contendo acima de 150 ppm de Se pois as biomassas obtidas foram um pouco maiores do que as obtidas no estudo de tolerância realizado anteriormente, nos quais não houve a inoculação seriada em meios contendo concentrações maiores de Se. Por exemplo, para a cepa *S. boulardii* SbM as biomassas obtidas no teste de tolerância ao Se nas concentrações de 150, 200, 300 e 400 ppm foram de 0,75, 0,75, 0,66 e 0,66 g/L, respectivamente; já para o teste de adaptação ao Se nas mesmas concentrações, as biomassas obtidas foram de 0,88, 0,96, 0,98 e 0,90 g/L.

Quanto à incorporação de selênio pelas cepas adaptadas, não foi possível se fazer uma relação entre a quantidade de selênio no meio de cultivo e a quantidade absorvida/adsorvida.

Apesar destes testes não terem sido conclusivos, foram importantes para mostrarem que a levedura *S. boulardii* é capaz de incorporar selênio inorgânico do meio de cultivo, podendo dar sequência ao trabalho utilizando-a com o objetivo de bioacúmulo de selênio.

As cepas cultivadas no meio contendo 400 ppm de Se, após passarem pela inoculação seriada, foram mantidas para posteriormente se comparar as

performances entre a cepa selvagem selecionada e sua respectiva cepa adaptada, nas condições de cultivo e de bioacúmulo otimizadas no trabalho.

4.8.2 Análise da concentração de Na_2SeO_3 a ser adicionada no meio de cultivo para bioacúmulo

Essa etapa foi realizada com a cepa *S. boulardii* Sb4308 que foi selecionada durante a otimização do processo de produção de biomassa.

Foram analisados o bioacúmulo de Se pela levedura (de maneira indireta, através da quantidade de Se (ppm) restante no sobrenadante, subitem 3.9.1.1) e biomassa obtida quando se adicionou 50 ppm e 75 ppm no meio de cultivo, tanto no momento da alimentação com melaço de cana-de-açúcar, tempo de 4 horas, quanto no final da fase log, tempo 10 horas. Os resultados estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 COM ADIÇÃO DE Se 50 E 75 ppm NOS TEMPOS 4 E 10 HORAS

ENSAIO	t (h)	50 ppm		75 ppm	
		BIOMASSA (g/L)	Se (ppm)	BIOMASSA (g/L)	Se (ppm)
Controle	4	4,84 ± 0,11	-	7,47 ± 0,35	-
	10	13,70 ± 0,07	-	13,78 ± 0,29	-
	24	14,58 ± 0,24	-	13,32 ± 0,15	-
Adição Na_2SeO_3 4h	4	5,13 ± 0,27	20,15 ± 0,03	6,46 ± 0,19	64,14 ± 0,23
	6	6,74 ± 0,07	0	7,54 ± 0,26	56,81 ± 0,04
	8	8,37 ± 0,05	0	8,47 ± 0,43	62,03 ± 0,04
	10	8,98 ± 0,42	0	8,07 ± 0,50	66,04 ± 0,12
	24	9,07 ± 0,03	0	8,43 ± 0,09	64,02 ± 0,10
Adição Na_2SeO_3 10h	24	13,31 ± 0,17	0	13,18 ± 0,13	0

LEGENDA: CONTROLE = SEM ADIÇÃO DE Na_2SeO_3

Nos testes em que a adição de Na_2SeO_3 foi realizada no tempo de 4 h na concentração de 50 ppm de Se, notou-se que a partir de 6 h todo o Se já havia sido bioacumulado pela levedura. As biomassas produzidas nesses ensaios foram menores do que as obtidas para os respectivos controles (que não foram cultivadas em meio contendo Se e que terminaram com o mesmo tempo de cultivo). Por exemplo, a amostra com tempo final de cultivo (Tf) de 10 h obteve uma produção de biomassa de 8,98 g/L e o controle com Tf de 10 h obteve uma produção de biomassa de 13,70 g/L, havendo uma diminuição de

34,5%. Para a amostra e seu respectivo controle com Tf de 24 h, essa diminuição foi de 37,8%.

Para os ensaios com adição de Na_2SeO_3 na concentração de 75 ppm de Se no tempo de 4 h, notou-se que praticamente todo o Se permaneceu nesse meio, não sendo bioacumulado pela biomassa. Além de também ocorrer uma diminuição da produção de biomassa das amostras em relação aos seus respectivos controles: a produção de biomassa da amostra com Tf de 10 h (8,07 g/L) foi 41,5% menor do que a obtida para o controle (13,78 g/L), e para o Tf de 24 h essa diminuição foi 36,7%.

Não houve diminuição da produção de biomassa quando as concentrações de 50 e 75 ppm de Se foram adicionadas no final da fase log, 10 horas, momento em que a produção de biomassa celular já se encontra no seu máximo. Para o cultivo em que foi adicionado 50 ppm de Se, a biomassa obtida foi de 13,31 g/L (controle 14,58g/L), e para o cultivo em que foi adicionado 75 ppm, a biomassa obtida foi de 13,18 g/L (controle 13,31 g/L). Além do mais, o bioacúmulo (absorção/adsorção) de Se pela levedura foi completo, para as duas concentrações. Através desses dados pôde-se concluir que o bioacúmulo de selênio pela levedura ocorre de maneira mais intensa quando esta já se apresenta na fase estacionária de crescimento, ou seja, a presença do sal durante a multiplicação celular além de inibi-la, ainda não é favorável para sua absorção/adsorção.

Ponce de León *et al.* (2002) avaliaram quatro diferentes métodos para bioacúmulo de Se por *Saccharomyces cerevisiae*: adição de Na_2SeO_3 nas concentrações: 10, 20, 40 e 50 mg/L, no momento da inoculação; adição de Na_2SeO_3 nas concentrações: 10 e 50 mg/L, em dois momentos: 6 h e 24 h; inóculo preparado com 40 mg/L de Na_2SeO_3 (*seeding*); e utilizando o glicerol como fonte de carbono, Na_2SeO_3 40 mg/L. Os autores concluíram que ambos os métodos *seeding* e usando o glicerol como fonte de C, inibiram significativamente o crescimento da levedura e que o melhor procedimento de enriquecimento foi com a adição de 10 mg/mL de Na_2SeO_3 no final da fase log.

Wang, Zhang & Tan (2010) analisaram a adição de Na_2SeO_3 em momentos diferentes: no início (13 h), no meio (18 h), no final da fase log (23 h), e também na fase estacionária (28 h), com o objetivo de descreverem um protocolo de fermentação em batelada alimentada para produção de levedura

S. cerevisiae enriquecida com Se. E também concluíram que o melhor momento da adição era no final da fase log.

Dessa forma, o próximo passo foi testar a adição de 100 ppm, 125 ppm e 150 ppm de Se após 10 horas de cultivo, em triplicata. As análises realizadas foram biomassa por peso seco e ao invés de se quantificar o Se livre presente no sobrenadante através do método espectrofotométrico da reação com Azure B, foram realizadas análises de Se absorvido (mg)/g de biomassa por AAS, conforme subitem 3.9.2.

Para confirmar que essa substituição não prejudicaria as comparações com os resultados anteriormente obtidos, foi realizada a comparação dos resultados obtidos por ambas as técnicas. Para tal, as amostras do experimento acima, que receberam Na_2SeO_3 no tempo 4 horas e finalizadas no tempo 10 h e 24 h, sofreram uma digestão ácida, conforme subitem 3.9.2.1., e a quantidade de Se total presente na biomassa foi determinada através de AAS.

Os dados obtidos pela AAS nos fornecem a quantidade de Se total contido na biomassa (Se absorvido (mg)/ g de biomassa) e através da subtração desse valor do valor de Se adicionado ao meio de cultivo, podemos chegar à quantidade de Se livre (ppm) restante no sobrenadante. Os resultados de ambas as técnicas estão mostradas na Tabela 36.

Tabela 36 – COMPARAÇÃO DO ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA REAÇÃO COM AZURE B COM O ENSAIO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

ENSAIO	Tf (h)	Se (ppm) NO SOBRENADANTE	
		AZURE B	ABSORÇÃO ATÔMICA
Controle	24	0,00	-0,03
Adição	10	66,04	67,40
Na_2SeO_3 4h	24	64,02	64,14

LEGENDA: CONTROLE = SEM ADIÇÃO DE Na_2SeO_3

Pôde-se observar que os resultados de Se (ppm) no sobrenadante obtidos nas amostras 10 h e 24 h pelos 2 métodos foram bem próximos: para a amostra 10 h os valores de Se no sobrenadante foi de 66,04 ppm pelo método espectrofotométrico da reação com Azure B e de 67,04 ppm pelo método AAS; já para a amostra 24 h os valores foram de 64,02 e 64,14 ppm, respectivamente. Dessa forma, pode-se dar continuidade nos experimentos

realizando-se apenas análises com o método de espectrometria de absorção atômica, considerado mais sensível.

Com a conclusão de que a adição de Na_2SeO_3 no final da fase log (10 horas) apresenta menor efeito tóxico e, conseqüentemente, um maior crescimento da levedura, prosseguiu-se com a análise da adição de Na_2SeO_3 nas concentrações de 100 ppm, 125 ppm e 150 ppm de Se e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 37.

Tabela 37 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM ADIÇÃO DE Se 100, 125 E 150 ppm NO TEMPO DE 10 HORAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

ENSAIO	BIOMASSA (g/L)	Se (mg)/g BIOMASSA
Controle	13,29 ± 0,20	0,00 ± 0,00
100 ppm	12,66 ± 0,20	4,56 ± 0,44
125 ppm	12,37 ± 0,04	4,73 ± 0,66
150 ppm	12,12 ± 0,08	4,48 ± 0,99

LEGENDA: CONTROLE = SEM ADIÇÃO DE Na_2SeO_3

Para uma melhor análise, os resultados da adição de 50, 75, 100, 125 e 150 ppm de Na_2SeO_3 foram reunidos na Tabela 38.

Tabela 38 - REUNIÃO DOS RESULTADOS DA ADIÇÃO DE 50, 75, 100, 125 E 150 ppm DE Se NO TEMPO DE 10 HORAS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

ENSAIO	BIOMASSA (g)	REDUÇÃO	%Se	Se (mg)/g
		BIOMASSA (%)	ABSORVIDO	BIOMASSA
50 ppm	13,31 ± 0,17	3,38	25,62	1,54 ± 0,25
75 ppm	13,18 ± 0,13	4,34	34,05	3,08 ± 0,07
100 ppm	12,66 ± 0,20	4,79	37,89	4,56 ± 0,44
125 ppm	12,37 ± 0,05	6,93	31,39	4,73 ± 0,66
150 ppm	12,12 ± 0,08	8,84	24,78	4,48 ± 0,99

Observou-se uma redução da produção de biomassa conforme foi aumentando a concentração de Se adicionado ao meio de cultivo, fato observado anteriormente devido a toxicidade do Se para as células de levedura. Essa redução foi menor no intervalo de aumento de 75 ppm para 100 ppm de Na_2SeO_3 , que foi de apenas 0,45%; de 50 para 75 ppm essa redução foi de 0,95%, de 100 para 125 ppm foi de 2,14% e de 125 para 150 ppm foi de 1,90%.

Em relação à quantidade de Se bioacumulado pela biomassa, houve um aumento conforme se aumentou a adição de 50 para 75 ppm (de aproximadamente 1,53 mg Se/g biomassa) e de 75 para 100 ppm (de cerca de 1,49 mg de Se/g biomassa); já para o intervalo de aumento de 100 para 125 ppm, o aumento de bioacúmulo foi de apenas 0,16 mg Se/g biomassa e, para o intervalo de 125 para 150 ppm praticamente não houve aumento.

Considerando-se os desvios padrão, a concentração de Se escolhida para ser adicionada ao cultivo foi de 100 ppm, pois com essa concentração houve uma melhor relação selênio bioacumulado por biomassa produzida.

4.9 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE Se PELA CEPA *S. boulardii* Sb4308 ADAPTADA

A cepa *S. boulardii* Sb4308 adaptada, conforme descrito anteriormente no subitem 4.8.1., foi cultivada nas condições otimizadas de crescimento e bioacúmulo de selênio para a cepa Sb4308 selvagem. Os resultados estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39 - RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE Se DA CEPA Sb4308 ADAPTADA

ENSAIO	BIOMASSA (g/L)	Se (mg)/g BIOMASSA
Controle	8,37 ± 0,38	0 ± 0
100 ppm	5,72 ± 0,13	1,40 ± 0,13

LEGENDA: CONTROLE: SEM ADIÇÃO DE Na₂SeO₃

Comparando-se os resultados obtidos para a cepa Sb4308 selvagem e adaptada, observou-se que no cultivo sem adição de Na₂SeO₃ a cepa selvagem teve um melhor crescimento, de 13,29 g/L, enquanto que a adaptada foi de 8,37 g/L. Quando na presença de Na₂SeO₃, tanto o crescimento quanto o bioacúmulo de Se foram melhores também para a cepa selvagem, obtendo-se 12,66 g/L de biomassa e 4,56 mg Se/g biomassa, respectivamente, e 5,73 g/L biomassa e 1,40 mg Se/ g biomassa para a cepa adaptada. Conforme mostrado na Tabela 40 abaixo:

Tabela 40 - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE Se PELAS CEPAS *S. boulardii* Sb4308 SELVAGEM E ADAPTADA

CEPA	BIOMASSA (g/L)	Se (mg)/g BIOMASSA
Selvagem	12,66 ± 0,20	4,56 ± 0,44
Adaptada	5,72 ± 0,13	1,40 ± 0,13

NOTA: CULTIVO EM MEIO CONTENDO Se 100ppm

Portanto, concluiu-se que os melhores resultados são obtidos com a cepa de *S. boulardii* Sb4308 selvagem.

O fato de a cepa selvagem apresentar melhores resultados do que a mesma cepa adaptada ao selênio também foi relatado por Ponce de León *et al.* (2002), em seu estudo de bioacúmulo de Se pela levedura *S. cerevisiae*. Nesse estudo o inóculo foi preparado com 40 mg/L de Na₂SeO₃, e observou-se uma mínima diminuição no crescimento celular, de 81,0.10⁷ células selvagens para 45,0.10⁷ células adaptadas. Houve, porém, uma diminuição na concentração de Se absorvido, sendo de 4,86 mg Se/g biomassa pelas células selvagens e de 3,46 mg Se/g biomassa pelas células adaptadas. Roepcke (2007) estudou o bioacúmulo de zinco pela levedura *Pichia guilliermondii*, no qual foi realizado o cultivo da levedura em meios de cultivo contendo aumento progressivo do metal de 0,05 g/L até 0,5 g/L. A autora concluiu que a cepa adaptada não apresentou resistência ao zinco e que as células não adaptadas apresentaram maior concentração de células viáveis/mL de fermentado durante todo o cultivo celular e maior quantidade de zinco total acumulado em sua biomassa.

4.10 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIOACÚMULO DE SELÊNIO POR *S. boulardii* SB4308 EM FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA EM BIORREATOR

A cinética de produção de biomassa de *S. boulardii* Sb4308 foi realizada nas condições otimizadas para crescimento e bioacúmulo de Se. Os resultados das análises de biomassa por peso seco, consumo de açúcar total pelo método de fenol sulfúrico, consumo de açúcar redutor pelo método DNS, e selênio na biomassa por espectrometria de absorção atômica estão apresentados na Figura 27.

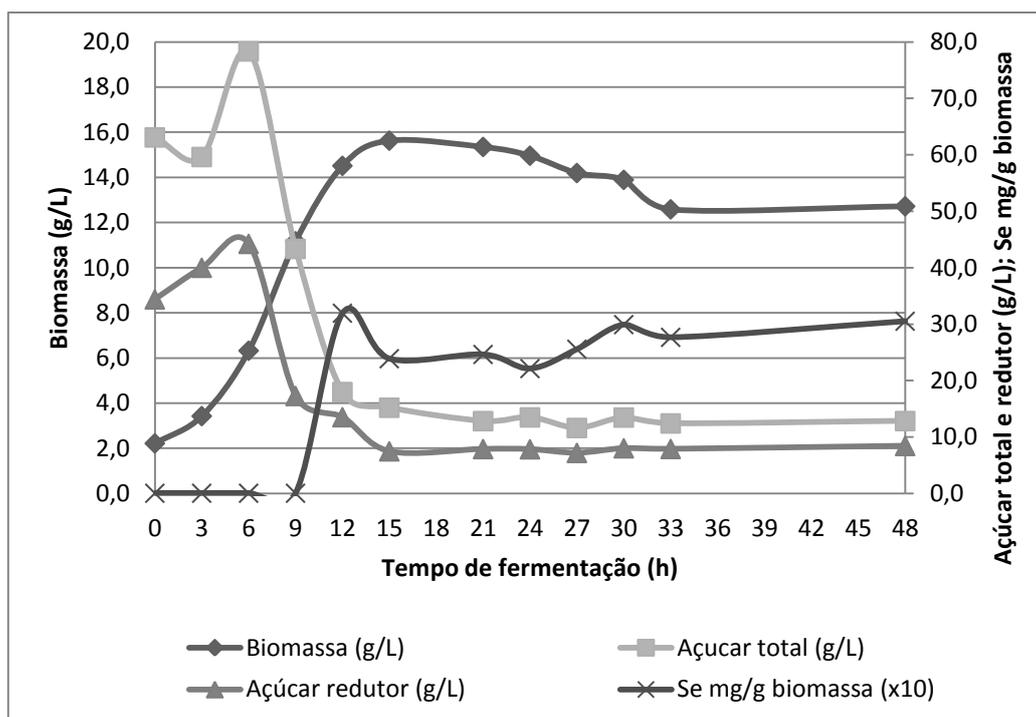


Figura 27 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA RICA EM SELÊNIO DE *S. boulardii* Sb4308 EM BIORREATOR STR POR FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA

É possível observar no gráfico que o crescimento exponencial da levedura iniciou nas primeiras horas de fermentação, sem apresentar uma fase de adaptação (fase lag), seguindo até 15 h, quando atingiu um valor de 15,63 g/L de biomassa seca. A partir das 15 h, notou-se o início da fase estacionária do crescimento e após 24 h de fermentação já se inicia a fase de declínio. A biomassa seca obtida após 48 h de cultivo foi de 12,73 g/L. Esse valor foi inferior ao obtido no tempo de 15 h, provavelmente devido ao fato de que na etapa de concentração da biomassa por centrifugação, muito debrí celular (decorrente das mortes celulares) tenha sido retirado durante a lavagem da biomassa precipitada.

A alimentação com melaço de cana-de-açúcar foi realizada no tempo 4 horas, o que pôde ser verificado nos gráficos de açúcares totais e redutores, os quais tiveram picos de aumento de concentração nas amostras coletadas no tempo de 6 h. No tempo de 9 h as concentrações dos açúcares reduzem pela metade. A partir de 21 h de cultivo, as concentrações de açúcares totais e redutores permaneceram constantes, próximos de 12,78 g/L e 7,8 g/L, respectivamente.

A adição de Na_2SeO_3 , realizada no tempo 10 horas, pôde ser notada na curva de Se (mg)/g biomassa, determinada pela análise de Se total presente na

biomassa realizado por espectrometria de AAS, mostrando seu bioacúmulo pela levedura. Observou-se que a adição de Na_2SeO_3 no tempo 10 h não ocasionou uma diminuição da produção de biomassa que continuou seu crescimento exponencial até o tempo 15 horas, inibição que foi facilmente notada no subitem 4.8.1., quando a adição desse sal foi realizada no início do cultivo ou em tempos anteriores ao final da fase log. Tal fato sugere que essas células são mais resistentes ao Se quando estão entrando em sua fase estacionária de crescimento, ou seja, quando a reprodução assexuada por gemulação está quase estagnando. No tempo final de 48 horas, o Se total acumulado na biomassa foi de 3,05 mg Se/g biomassa seca.

Nesses gráficos não estão apresentadas as análises realizadas pelo LC-MS, que buscaram a especiação e quantificação de Se na forma orgânica, SeMet e SeCis, na biomassa bioacumulada. Esses estudos estão descritos a seguir.

4.10.1 Testes de metodologia de análise da amostra selenizada no LC-MS

Como descrito no subitem 3.9.3., a análise no LC-MS foi baseada na metodologia apresentada por McSheehy *et al.* (2005).

Utilizando essa metodologia, conseguiu-se detectar os padrões de SeMet, SeCis e Metionina (Met). A Figura 28 apresenta o cromatograma dos padrões, na concentração de 50 ppm, e na Figura 29 se encontram seus respectivos perfis de fragmentação.

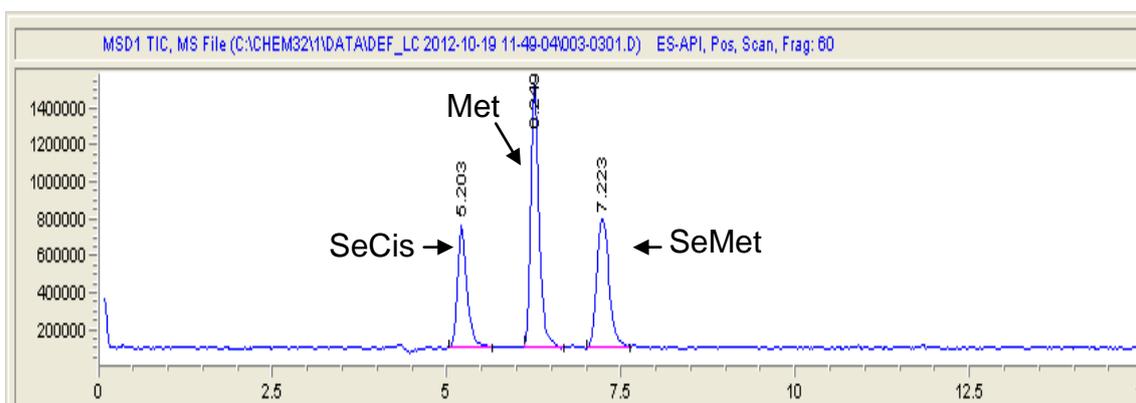


Figura 28 - CROMATOGRAMA DOS PADRÕES SeCis, Met E SeMet (50 ppm)

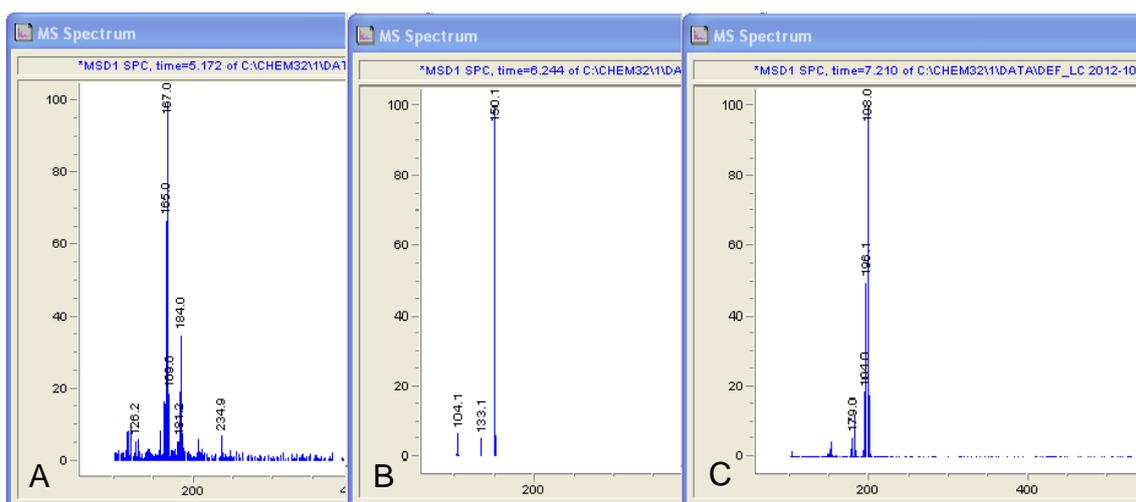


Figura 29 - ESPECTRO DE MASSA DOS PADRÕES SeCis, Met E SeMet. LEGENDA: PERFIS DE QUEBRA PARA: A) PADRÃO SeMet; B) PADRÃO Met; C) PADRÃO SeMet

Nesse estudo não foi possível a detecção e quantificação de Se orgânico na biomassa, o que levou à realização de vários testes utilizando a metodologia em questão. A Tabela 41 resume os testes realizados, no qual consta cada problema sugerido, as condições testadas para averiguar os problemas, os resultados e suas conclusões.

Tabela 41 - RESUMO DOS TESTES REALIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DE QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ORGÂNICO NA BIOMASSA DE *S. boulardii* Sb4308 POR LC-MS

PROBLEMA EM QUESTÃO	CONDIÇÕES TESTADAS	RESULTADO	CONCLUSÃO
Volume de injeção da amostra	5 μ L, 10 μ L e 20 μ L	Não houve detecção	Volume não é o problema
Fase móvel	Gradiente Isocrático	Não houve detecção	Fase móvel não é o problema
Metodologia	Dopagem da amostra com padrão SeMet 10ppm	Houve detecção	A metodologia não é o problema
Sensibilidade do teste	Padrão SeMet 1ppm	Não houve detecção	As amostras podem estar muito diluídas
Amostra muito diluída	Concentração da amostra 10x em estufa a vácuo	Não houve detecção	A secagem em estufa pode ter degradado a SeMet
Degradação da SeMet na secagem	Concentração da amostra dopada com SeMet	Houve detecção	A secagem não degrada a SeMet
SeMet e SeCis em meio com Ác.metanossulf não ser detectada	Padrões SeMet e SeCis em sol. Ac.metanossulfônico	Houve detecção	O solvente de digestão não interfere na detecção
Conclusão final: são necessários mais estudos sobre a digestão da amostra			

Depois da conclusão de que a metodologia utilizada é adequada para a quantificação do Se orgânico bioacumulado na biomassa de Sb4308, foram realizados testes da preparação da amostra antes de sua análise em LC-MS.

4.10.2 Testes de digestão da biomassa da levedura Sb4308 rica em selênio

Conforme explicado no subitem 3.9.3.1., a digestão da biomassa para análise no LC-MS foi realizada baseando-se no método desenvolvido por Wrobel *et al.* (2003), que utiliza o ácido metanossulfônico e aquecimento em chapa sob refluxo.

A digestão da biomassa de leveduras para análise de selênio orgânico é um tema bastante estudado e inúmeros métodos foram desenvolvidos, dentre eles tem-se metodologias que utilizam ácidos, enzimas proteolíticas ou outros reagentes: como proteinase XIV (CAPELO *et al.*, 2004; SCHRAUZER, 2006), ProteaseVIII (CAPELO *et al.*, 2004), Pepsina (PONCE DE LEÓN *et al.* 2002), HCl (SCHRAUZER, 2006), ácido metanossulfônico (WROBEL *et al.*, 2003), entre outros. Em um estudo realizado por Yang *et al.* (2004) foram comparados 14 métodos de extração comumente citados na literatura para quantificação de metionina (Met) e selenometionina (SeMet) em levedura *S. cerevisiae*, no qual concluíram que o método mais eficiente foi o da digestão com ácido metanossulfônico sob refluxo, que os métodos que utilizam enzimas proteolíticas extraem aproximadamente 30 e 50% menos de Se e SeMet, respectivamente, em relação à extração com ácido metanossulfônico, e que a extração realizada com HCl é a menos eficiente. Para o doseamento, eles utilizaram cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS).

Essa maior eficiência do método de Wrobel *et al.* (2003) também foi citado por McSheehy *et al.* (2006) que avaliaram o método utilizando um selenopeptídeo sintético como modelo e constataram que após 8 horas de digestão sob refluxo com o ácido metanossulfônico a hidrólise está completa e conseqüentemente toda a selenometionina está livre para ser detectada. A detecção foi realizada por LC-MS.

A partir desse método foram realizados alguns testes para verificar tempo de digestão e se há degradação da amostra. Testou-se igualmente a sonicação antes da digestão com ácido. A Tabela 42 abaixo resume as

condições testadas para averiguar os possíveis problemas, seus resultados e as conclusões obtidas.

Tabela 42 - RESUMO DOS TESTES REALIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ORGÂNICO NA BIOMASSA DE *S. bouldarii* Sb4308 POR LC-MS

PROBLEMA EM QUESTÃO	CONDIÇÕES TESTADAS	RESULTADO	CONCLUSÃO
Digestão da amostra degrada a SeMet	Digestão com ác.metanossul.-refluxo 8 h de amostra dopada com padrão SeMet	Houve detecção pelo LC-MS	A digestão não degrada a SeMet
Tempo de digestão insuficiente	Digestão por 16 h	Não houve detecção	O tempo não é insuficiente
Método de digestão insuficiente	-Sonicação; -Sonicação + refluxo com ác.metanos.por: - 8 h - 16 h	Não houve detecção	Amostra sem SeMet/ SeCis ou método de digestão ainda insuficiente

Dessa forma, concluiu-se que a preparação da amostra para análise por LC-MS ainda precisa ser desenvolvida adequadamente para a levedura Sb4308 selenizada. Outra possibilidade é o Se acumulado no produto desenvolvido nesse trabalho estar predominantemente adsorvido na biomassa e não absorvido. Para verificar esta última questão, foi realizado o teste de lavagem dessa biomassa e a quantificação de Se total nessas águas de lavagem por AAS e, conseqüentemente, a quantificação de Se adsorvido na biomassa produzida.

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE SELÊNIO ADSORVIDO NA BIOMASSA

Para quantificar o Se presente na biomassa na forma adsorvida, a biomassa selenizada foi submetida a etapas de lavagens com H₂O ultrapura, descrito no item 3.20, na qual o Se é solúvel, segundo pesquisa realizada. As águas de lavagem como também a biomassa lavada foram tratadas por digestão ácida para então serem analisados por AAS. Os resultados de Se total quantificado por AAS nas amostras de biomassa e em suas respectivas águas de lavagem estão mostrados na Tabela 43.

Tabela 43 – RESULTADOS DE Se BIOACUMULADO ADSORVIDO E ABSORVIDO EM AMOSTRAS DE BIOMASSA E ÁGUA DE LAVAGEM

AMOSTRA	Se(ppm)	Se(mg)/g BIOMASSA
Biomassa Controle	30,5	0,102
Controle Lavagem 01	21,0	NA
Controle Lavagem 02	21,0	NA
Controle Lavagem 03	14,0	NA
Biomassa Amostra 1	1028,5	3,428
Amostra 1 Lavagem 01	72,0	NA
Amostra 1 Lavagem 02	39,0	NA
Amostra 1 Lavagem 03	32,0	NA
Biomassa Amostra 2	969,0	3,461
Amostra 2 Lavagem 01	50,5	NA
Amostra 2 Lavagem 02	26,5	NA
Amostra 2 Lavagem 03	14,0	NA

LEGENDA: NA = NÃO SE APLICA.

Para a análise realizada em duplicata foi utilizada a amostra denominada de 48 h do estudo cinética da produção de biomassa e bioacúmulo de selênio por *S. boulardii* Sb4308 em fermentação em batelada alimentada em biorreator, item 4.10.

Os valores de Se (ppm) encontrados nas biomassas das amostras selenizadas foram significativamente maiores do que as obtidas nas suas respectivas águas de lavagens: 1028,5 ppm de Se na biomassa da amostra 1 e 72,0, 39,0 e 32,0 ppm nas águas de lavagens 01, 02 e 03, respectivamente; e 969,0 ppm de Se na biomassa da amostra 2 e 50,5, 26,5 e 14,0 ppm nas águas de lavagens 01, 02 e 03. Os valores de Se (ppm) tanto da biomassa da amostra controle (que não foi cultivada em meio contendo Na_2SeO_3) quanto de suas águas de lavagens foram de apenas 30,5, 21,0, 21,0 e 14,0 ppm.

Pôde-se concluir assim, que o selênio presente na biomassa da levedura *S. boulardii* Sb4308 cultivada em meio de cultivo contendo Na_2SeO_3 provavelmente se encontra predominantemente na forma absorvida e não adsorvida na biomassa. E assim, são necessários mais estudos sobre a digestão da amostra para quantificação e especiação do selênio contido na biomassa. Lembrando que, segundo Fietto *et al.* (2004), a metodologia utilizada foi baseada em trabalhos com a levedura *S. cerevisiae*, que é morfológica e fisiologicamente diferente da *S. boulardii*.

Com esses dados, sugere-se que nesse trabalho foi obtido o produto: biomassa de *S. boulardii* Sb4308 rica em selênio orgânico contendo 3,0 – 3,4 mg Se/g biomassa seca ou 3.000,00-3.400,00 µg Se/g biomassa seca. Este valor se encontra acima dos produtos existentes no mercado que, de acordo com a EFSA (2008), não apresentam mais do que 2,5 mg de selênio/g levedura seca. Ressalta-se também o fato de a levedura rica em selênio produzida nesse trabalho ser de espécie diferente, *S. boulardii*, da comumente utilizada nesses produtos, *S. cerevisiae*.

A Tabela 44 mostra os resultados obtidos por outros autores que também produziram levedura rica em selênio orgânico, em todos esses casos utilizando a *S. cerevisiae*.

Tabela 44 - PRODUÇÃO DE LEVEDURA RICA EM SELÊNIO POR DIFERENTES AUTORES

REFERÊNCIA	LEVEDURA	BIOMASSA	SE (µg)/g BIOMASSA
Dermici, Pometto III e Cox, 1999	<i>S. cerevisiae</i>	45,24 g/L	2.495,00 µg/g
Suhajda, <i>et al.</i> 2000		9,8 g/L	1.200-1.400,00 µg/g
Ponce de León, <i>et al.</i> 2002		151.10 ⁷ céls.	500,00 µg/g
Oliveira, 2006		9 g/L	300-350 ppm
Ouerdane e Mester, 2008			4.940,00 µg de SeMet/g
Yin, <i>et al.</i> 2009		8,5 g/L	3.530,00 µg/g
Yin, Fan e Gu, Z., 2010		9,23 g/L	5.900,00 µg/g
Wang, Zhang e Tan, 2010		102,4 g/L	2,020 µg/g
Autor, 2013	<i>S. boulardii</i>	12,73 g/L	3.053,00 µg/g

FONTE: O AUTOR, 2013.

Cada estudo apresentou suas particularidades (como meio de cultivo, condições de processo, momento e concentração de sal de selênio adicionado ao cultivo, entre outros) que interferiram nos resultados obtidos. Um resumo dessas condições se encontra na Tabela 45. Porém, comparando-se os resultados finais obtidos, tem-se que os obtidos nesse trabalho estão próximos ou acima da maioria.

Tabela 45 - RESUMO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO UTILIZADAS POR OUTROS AUTORES QUE PRODUZIRAM LEVEDURA RICA EM SELÊNIO

FONTE DE SE	MEIO DE CULTIVO	CONDIÇÕES DO PROCESSO	METODOLOGIA DE ANÁLISE DE SE NA BIOMASSA	REFERÊNCIA
Na ₂ SeO ₄ 31,6g/L no feed de melaço	Melaço de cana, Uréia CaCl ₂ .H ₂ O MgCl ₂ .H ₂ O KH ₂ PO ₄ NH ₄ H ₂ PO ₄ Biotina Sol.de elem.traço Na ₂ SO ₄	Ferm. Batelada alimentada 3 L (Biorreator 5 L), 30°C, pH 5,5, aeração: 1vvm 500 rpm	Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (EAAS) (Se total)	Dermici, Pometto III e Cox, 1999.
Na ₂ SeO ₃ 30ppm Adicionada em 6 partes (5mg/L a cada hora) durante a fase log.	Glicose 70,0 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 6,5 g/L, KH ₂ PO ₄ , 2,5 g/L, MgSO ₄ .7H ₂ O 1,7 g/L yeast extract 5.0 g/L, vários sais	Ferm. Batelada 5 L (Biorreator 10L) 30°C, pH 4,0 oxigênio dissolvido: aeração: 0,5 v/v min; agit.: 350 rpm taxa de inoculo:25%.	Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)	Suhajda, <i>et al.</i> 2000
Na ₂ SeO ₃ 10ppm	YEDP: D-glicose 20 g/L, peptona 10 g/L, Ext.lev.5 g/L	Ferm. Batelada 24 h, 30°C e 250 rev/min, inóculo de 1x10 ⁷ cels/mL.	Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa com fonte de plasma induzido (HPLC-ICP-MS)	Ponce de León, <i>et al.</i> 2002.
Na ₂ SeO ₃ 25ppm	Açúcar mascavo (Sacarose 120 g/L); (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 g/L; KH ₂ PO ₄ 3 g/L; MgSO ₄ .7H ₂ O 1,2 g/L	Ferm. Batelada Frascos 250,0 mL 30°C 120 rpm 23 horas	Espectrofometria de absorção atômica (AAS)	Oliveira, 2006
SeMet 100ppm	Glicose 20 g/L NH ₄ Cl 5 g/L, Sais, Sol. rica de vitaminas, elementos traços e aminoácidos Cisteína 5 mg/L, Ác. Ascórb. 100 mg/L	Ferm. Batelada Frascos de 250 mL 22°C 150 rpm	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	Ouerdane e Mester, 2008.
Na ₂ SeO ₃ 15ppm	Sucos de arroz integral, cevada e soja (4:4:2)	Ferm. Batelada Frasco de Erlenmeyer 250 mL (50 mL) Taxa Inóculo 10%, 160 rpm, 28±0,5°C	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS) (Se total e inorgânico)	Yin, <i>et al.</i> 2009

Continua

TABELA 45 - RESUMO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO UTILIZADAS POR OUTROS AUTORES QUE PRODUZIRAM LEVEDURA RICA EM SELÊNIO

continuação

FONTE DE SE	MEIO DE CULTIVO	CONDIÇÕES DO PROCESSO	METODOLOGIA DE ANÁLISE DE SE NA BIOMASSA	REFERÊNCIA
Na ₂ SeO ₃ 15ppm	Sucos de arroz integral, cevada e soja (4:4:2)	Ferm. Batelada Frasco de Erlenmeyer 250 mL (89,4 mL) Taxa Inóculo 10%, 160 rpm, 27,4°C, pH inicial 5,8	Espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HG-AFS) (Se total e inorgânico)	Yin, Fan e Gu, 2010
Na ₂ SeO ₃ 90ppm	Glicose 60 g/L, YE 15 g/L, (NH ₄) ₂ HPO ₄ 8 g/L, MgSO ₄ 5 g/L, melaço de cana de açúcar 28 g/L, milhocina 16 g/L, K ₂ HPO ₄ 1 g/L, KH ₂ PO ₄ 1 g/L, ZnSO ₄ 10 mg/L, FeSO ₄ 6 mg/L, CuSO ₄ 6 mg/L e MnSO ₄ 6 mg/L.	Ferm. Batelada Alimentada 2 L (Biorreator de 5 L) Fluxo de ar 4 L/h, Taxa inóc. 20% 600 rpm, 30 °C, pH 5,0	Espectrofotometria de absorção atômica (Se total)	Wang, Zhang e Tan, 2010.

Nota-se que a maioria dos autores utilizou meios de cultivos com muitos componentes, incluindo diversos sais, exceto para Oliveira (2006), Yin *et al.* (2009) e Yin, Fan e Gu (2010), que realizaram a otimização completa de seus meios de cultivo, verificando a significância de cada um dos componentes. Ponce de León *et al.* (2002), utilizaram o meio de cultivo pronto YEPD (*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*). Essas análises são importantes visto que a utilização de todos esses sais no meio de cultivo, potencialmente não significativos para o crescimento, aumenta o custo do processo de produção.

Na Figura 30 são apresentadas fotos da visualização em microscópico óptico com auxílio de lente objetiva de 100x (aumento de 1000 vezes) das células liofilizadas dos dois produtos obtidos nesse trabalho: *S. boulardii* Sb4308 probiótica e *S. boulardii* Sb4308 rica em selênio orgânico. Observa-se uma coloração verde fluorescente entre a parede e a membrana celular nas células selenizadas.

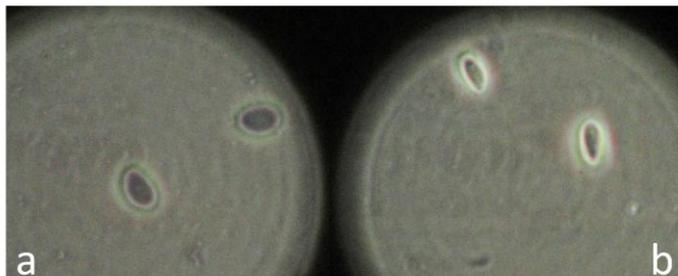


Figura 30 - VISUALIZAÇÃO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO DE CÉLULAS DE *Saccharomyces boulardii* Sb4308 NÃO SELENIZADAS (A) E SELENIZADAS (B) (EXAME DE CÉLULAS LIOFILIZADAS - AUMENTO DE 1000X). FONTE: O AUTOR (2013)

Essas diferenças morfológicas que ocorreram entre células cultivadas em meio não contendo Se e em meio contendo Se ocorreram também entre células adaptadas a alguns metais e células não adaptadas. No primeiro caso, houve e não houve contato com o microelemento e, no segundo caso, o contato com o microelemento existiu, como também esse contato ocorreu em concentrações crescentes do sal. Tais fatos sugerem que mudanças morfológicas podem ocorrer já no primeiro contato com microelementos, como também em contatos subsequentes.

Segundo Roepcke (2007), mudanças morfológicas em resposta a metais pesados foram citadas pela literatura, envolvendo estruturas de reprodução, comprimento de micélios em fungos filamentosos ou inibição do desenvolvimento do micélio. A autora observou mudanças morfológicas entre células adaptadas ao zinco e não adaptadas, indicando que as células não adaptadas apresentaram estruturas semelhantes a vacúolos, diferentemente das células adaptadas que não apresentaram esses vacúolos e se mostraram mais alongadas. Essas diferenças morfológicas também foram encontradas por De Silóniz *et al.* (2002) ao compararem células adaptadas com não adaptadas ao cobre. As células não adaptadas formaram uma forma filamentosa, sem a forma unicelular, quando foram cultivadas em meio contendo cobre. Foi observada também uma mudança para a coloração verde das culturas. Já as células adaptadas não apresentaram formação de filamentos, apresentando-se apenas na forma unicelular.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de um bioprocesso para a produção de biomassa de levedura probiótica *S. boulardii* através de fermentação submersa utilizando o subproduto agroindustrial melaço de cana-de-açúcar e também para a produção desta levedura enriquecida com selênio foi atingido com sucesso.

As principais contribuições deste trabalho podem ser resumidas nas seguintes conclusões:

- A cepa *S. boulardii* 4308 foi selecionada por ter atingido uma maior produção de biomassa (11,03 g/L) em comparação com a cepa *S. boulardii* do medicamento Floratil da Merck (9,66 g/L);
- A temperatura de crescimento selecionada para *S. boulardii* foi de 30°C;
- O meio de cultivo otimizado para a cepa Sb4308 é composto por melaço de cana-de-açúcar 150 g/L e extrato de levedura 12 g/L. A produção de biomassa nesse meio foi de 11,03 g/L em 48 h de fermentação, com um ganho de produtividade foi de 201% em relação às condições iniciais de cultivo (meio YM);
- Os tempos de cultivo determinados para o inóculo e para a produção de biomassa foram de 20 h e 24 h respectivamente, com uma obtenção de 11,22 g/L de biomassa em cultivo realizado em frascos e de 11,37 g/L em cultivo realizado em biorreator. O ganho de produtividade em relação à condição inicial de cultivo foi de 516%. A biomassa obtida em biorreator foi bem próxima à obtida em frasco de Erlenmeyer, o que indica que as condições em frasco, como agitação e aeração, simulam de maneira fiel o que ocorre em biorreator e que estas se encontram no seu ótimo em frascos;
- O estudo da fermentação no modo batelada alimentada em frascos de Erlenmeyer proporcionou um aumento de produtividade de 1624%, com uma produção de biomassa de 13,18 g/L em apenas 10 horas de fermentação. O tempo ideal determinado para se realizar a alimentação foi 4 horas com melaço de cana-de-açúcar 100 g/L na taxa de 10% (v/v);
- O estudo do tempo de adição de Na_2SeO_3 e da concentração de Se a ser adicionado no meio de cultivo para um melhor crescimento da levedura e

bioacúmulo desse micronutriente foi de 10 horas, que corresponde ao final da fase log, e na concentração de 100 ppm;

- A cepa de *S. boulardii* Sb4308 adaptada ao Se não apresentou um aumento na resistência ao mesmo comparado à cepa selvagem. As células não adaptadas apresentaram maior produção de biomassa e maior quantidade de selênio total bioacumulado;
- No estudo da cinética do bioacúmulo de selênio e da fermentação em modo batelada alimentada em biorreator obteve-se uma produção de biomassa de 12,73 g/L. A quantidade de selênio bioacumulado foi de 3053,00 µg/g de biomassa, estando esse valor de bioacúmulo acima dos produtos encontrados no mercado;
- Não foi possível realizar a especiação do Se acumulado pela biomassa como também a quantificação de Se orgânico através dos estudos realizados pelo LC-MS. Porém, através do estudo da lavagem da biomassa bioacumulada, pôde-se sugerir que o Se bioacumulado está predominantemente absorvido pela biomassa, sendo necessário estudos futuros sobre a digestão desta para posterior análise no LC-MS;
- Cabe a ressalva que os resultados de todos os autores utilizados para análises comparativas de produção de biomassa rica em selênio foram obtidos para a levedura *S. cerevisiae*, pois dados de estudos de desenvolvimento desse bioprocessos para a levedura *S. boulardii* não foram encontrados na literatura.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados desse trabalho são importantes visto que na literatura há pouquíssimos estudos sobre o desenvolvimento de bioprocessos para a obtenção de biomassa da levedura probiótica *S. boulardii* como também não há relatos sobre o bioacúmulo de selênio por essa levedura.

As seguintes sugestões para trabalhos futuros, perspectivas para a produção de biomassa de levedura probiótica como também enriquecida com selênio orgânico, deverão complementar a investigação iniciada com esta dissertação:

- Estudar a realização da etapa de secagem por *spray dryer*, como também a utilização de crioprotetores;
- Avaliar a viabilidade celular da levedura após as etapas de secagem, visando sua utilização como probiótica;
- Avaliar a estabilidade do produto final;
- Otimizar as condições físico-químicas restantes (manutenção do pH, aeração, agitação) em biorreator;
- Continuar os estudos sobre a digestão da biomassa acumulada com selênio para análise de selênio orgânico na biomassa pelo LC-MS;
- Testar a mesma linhagem quanto à sua capacidade em bioacumular outros microelementos;
- Estudar a realização da secagem da Sb4308 rica em selênio por *spray dryer*, antecedida por uma etapa de pasteurização;
- Testar os produtos Sb4308 probiótico e também rico em Se em animais (aves ou mamíferos), acompanhando o ganho de peso, dosagem sanguínea, avaliações biológicas;
- Estudar as diferenças morfológicas entre a levedura *S. boulardii* Sb4308 probiótica e a levedura *S. boulardii* Sb4308 rica em selênio orgânico.

REFERÊNCIAS

ABDO, K. M. **NTP Technical Report on Toxicity Studies of Sodium Selenate and Sodium Selenite**. National Toxicology Program. NIH Publication 94-3387, 1994.

AGHEYISI, R. **The probiotics market: Ingredients, supplements, foods, Report code: FOD035B, BCC Research**, Wellesley, MA, USA (2010) Disponível em: <http://www.bccresearch.com/report/probiotics-market-ingredients-foods-fod035c.html>. Acesso em: 17 de Abril de 2013.

ALVAREZ-OLMOS, M.I e OBERHELMAN, R.A. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.1567–76, 2001.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002**. Aprovar o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde, constante do anexo desta Resolução. Diário Oficial da União, Poder Executivo de: 17 de Julho de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/02_02rdc.htm>. Acesso em: 15/03/2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX - **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas em Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 05/01/2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 269, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o "regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais". Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005.

BALJINNYAM, E., HASEBE, N., MORIHIRA, M., SUMITOMO, K., MATSUSAKA, T., FUJINO, T., FUKUZAWA, J., USHIKUBI, F., KIKUCHI, K. Oral pretreatment with ebselen enhances heat shock protein 72 expression and reduced myocardial infarct size. **Hypertension Research**, v.29, p.905–913, 2006.

BARUSELLI, M.S. Suplementos e co-produtos na nutrição de gado de corte. In: I SIMBOI - Simpósio sobre desafios e novas tecnologias na bovinocultura de corte. Brasília-DF: 2005.

BATTIN, E.E e BRUMAGHIM, J.L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase and

metal-binding antioxidant mechanisms. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v.55, p.1–23, 2009.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. **Food Technology Biotechnology**, v.44, n.3, p.407-415, 2006.

BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. **Gut**, v.42, p.2–7, 1998.

BIRD, S.M.; UDEN, P.C. ; TYSON, J.F.; BLOCK, E.; DENOYER, E. Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.12, p.785-788, 1997.

BOKHARI, S. A. T; FAROOQ, L.; RAJOKA, M. I. Cinética de alto nível da produção de β -glucosidase por um 2-deoxiglucose mutante resistente de *Humicola lanuginosa* em fermentação submersa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, n. 4, p. 724-733, 2008.

BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. Microbiologia Alimentar. Volumen 2: **Fermentaciones alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1995, p. 19-29.

BROWN, K. M. e ARTHUR, J. R. Selenium, selenoproteins, and human health: A review. **Public Health and Nutrition**, v.4, p. 593–599, 2001.

BUCKLEY, W.T. Trace element dynamics. In: D’Mello, J.P.F. (ed.) **Farm Animal Metabolism and Nutrition**. CAB International, Wallingford, UK, p. 161–182, 2000.

BUTS, J-P. Twenty-Five Years of Research on *Saccharomyces boulardii* Trophic Effects: Updates and Perspectives. **Digestive Diseases and Sciences**, v.54, p.15–18, 2009.

CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.88, suppl.1, p.S165-S176, 2002.

CAPELO, J. L.; XIMENEZ-EMBUN, P.; MADRID-ALBARRAN, Y.; CAMARA, C. Enzymatic probe sonication: enhancement of protease-catalyzed hydrolysis of selenium bound to proteins in yeast. **Analytical Chemistry**, v.76, p.233, 2004.

CARDINALI, G. e MARTINI, A. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.791-797, 1994.

CARMELI, E.; BACHAR, A.; BARHAD, S.; MORAD, M.; MERRICK, J. Antioxidant status in serum of persons with intellectual disability and hypothyroidism: A pilot study. **Research on Developmental Disabilities**, v.29, p.431–438, 2008.

CLARK, L. C., COMBS, G. F., JR., TURNBULL, B. W., SLATE, E. H., CHALKER, D. K., CHOW, J., DAVIS, S. L., GLOVER, R. A., GRAHAM, F. G., GROSS, E. G., KRONGRAD, A., LESHER, J. L., PARK, K., SANDERS, B. B., SMITH, C. L., TAYLOR, J. R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. **Journal of the American Medical Association**, v.276, p.1957–1963, 1996.

COMBS, G. F. J. R. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p.517-547, 2001.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012** – Brasília : Conab 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perfil do setor do açúcar e álcool no Brasil. Edição para a safra 2009-2010** – Brasília : Conab 2012.

CZERUCKA, D.; PICHE, T. e RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.26, p.767–778, 2007.

DE SILÓNIZ, M. I.; BALSALOBRE, L.; ALBA, C.; VALDERRAMA, M. J.; PEINADO, J. M. Feasibility of copper uptake by the yeast *Pichia guilliermondii* isolated from sewage sludge. **Research in Microbiology**, v.153, n.3, p.173–180, 2002.

DERMICI, A.; POMETTO III, A. Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. **Journal of Agricultura Food Chemistry**, v.47, p. 2491-2495, 1999.

DIWADKAR-NAVSARIWALA, V.; PRINS, G. S.; SWANSON, S. M.; BIRCH, L. A.; RAY, V. H.; HEDAYAT, S.; LANTVIT, D. L; DIAMOND, A. M. Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.103, p.8179–8184, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EFSA. European Food Safety Authority. **Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population**. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. 766, 1-42, 2008.

FIETTO, J. L. R.; ARAÚJO, R. S.; VALADÃO, F. N.; FIETTO, L. G.; BRANDÃO, R. L.; NEVES, M. J.; GOMES, F. C. O.; NICOLI, J. R.; CASTRO, I. M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae*

and *Saccharomyces boulardii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.615–621, 2004.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, London, v.17, p.711-724, 2003.

FAO/WHO. Human Vitamin and Mineral Requirements - Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand, 2002

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. p.46. Disponível em: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>. Acesso em: 06/11/2012.

FOSTER, L. H. Selenium in the environment, food, and health. **Nutrition and Food Science**, v.95, p.17–23, 1995.

FUJIYA, M. e KOHGO, Y. Novel perspectives in probiotic treatment: the efficacy and unveiled mechanisms of the physiological functions. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v.3, p.117–127, 2010.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

GRAFF, S.; CHAUMEIL, J-C.; BOY, P.; LAI-KUEN, R.; CHARRUEAU, C. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, p. 221-227, 2008.

HENNEQUIN, C.; THIERRY, A.; RICHARD, G.F.; LECOINTRE, G.; NGUYEN, H.V.; GAILLARDIN, C.; DUJON, B. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 551-559, 2001.

ICIDCA. Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar. **Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia**. Brasília: ABIPTI, p. 49-55, 267-271, 297-301, 1999.

IM, E. e POTHOUKAKIS, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v.34, Suppl. 1, p.S62—S70, 2010.

IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **J.Nutrition**, v.128, p.1845-1854, 1998.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, London, v.18, n.2, p.299-313, 2004.

JIANG, C.; JIANG, W.; IP, C.; GANTHER, H.; LU, J. Selenium-induced inhibition of angiogenesis in mammary cancer at chemopreventive levels of intake. **Molecular Carcinogenesis**, v.26, n.4, p. 213-25, 1999.

KAKIZOE, T. Chemoprevention of cancer focusing on clinical trials. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v.33, n.9, p.421–442, 2003.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.101, p.229-241, 2001.

LARSEN, B.; MONIF, G. R. G. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.e69–e77, 2001.

LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. **Biomassa & Bioenergy**, v.44, p. 80-86, 2012.

MAHAN, D. C. In: Biotechnology in the feed industry. proceedings of Alltech's 19th annual symposium (t.p. Lyons and K.A. Jacques, eds.). Nottingham University Press, UK. p. 523 – 535., 1999.

MALLIÉ, M.; NGUYEN VAN, P.; BERTOUT, S.; VAILLANT, C.; BASTIDE, J.-M. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. **Journal of Medical Mycology**., v.11:19-25, 2001.

MANDENIUS, C-F.; BRUNDIN, A. Review: biocatalysts and Bioreactor design. Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology. **Biotechnology Progress**. v.24, p.1191-1203, 2008.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>.> Acesso em: 10/01/13.

MATHEW, M.; NARAYANA, B. An easy spectrophotometric determination of selenium using azure B as a chromogenic reagent. **Indian Journal of Chemical Technology**, v.13, p.455-458, 2006.

McFARLAND, L.V. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p.200-201, 1996.

McSHEEHY, S.; YANG, L.; STURGEON, R.; MESTER, Z. Determination of Methionine and Selenomethionine in Selenium-Enriched Yeast by Species-Specific Isotope Dilution with Liquid Chromatography - Mass Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection. **Analytical Chemistry**, v.77, p.344 – 349, 2005.

McSHEEHY, S.; YANG, L.; MESTER, Z. Selenomethionine extraction from selenized yeast: an LC-MS study of the acid hydrolysis of a synthetic selenopeptide. **Microchimica Acta**, v.155, p.373-377, 2006.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, n.1, p. 33-39, 2000.

MIEKELEY, N.; DIAS CARNEIRO, M. T. W.; PORTO DA SILVEIRA, C. L. How reliable are human hair reference intervals for trace elements? **The Science of the Total Environment**, v. 218, p.9 – 17, 1998.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959

MOESGAARD, S.; PAULIN, H. S. **Selenium yeast product, a method of preparing a selenium yeast product and the use of the product for preparing food, a dietary supplement or a drug.** Patente US 20050089530 A1, 2005.

MORRIS, V. C.; LEVANER, O. A. Selenium content in foods. **Journal of Nutrition**, v.100, p.1383–1388, 1970.

MUGESH, G.; PANDA, A.; SINGH, H. B.; PUNEKAR, N. S.; BUTCHER, R. J. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: A mechanistic study. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p. 839–850, 2001.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p.688-693, 2007.

OLIVEIRA, C. G. R. de. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

OSTADALOVA, I., VOBECKY, M., CHVOJKOVA, Z., MIKOVA, D., HAMPL, V., WILHELM, J., OSTADAL, B. Selenium protects the immature rat heart against ischemia/reperfusion injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.300, p.259–267, 2007.

OUERDANE, L.; MESTER Z. Production and Characterization of Fully Selenomethionine-Labeled *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.11792–11799, 2008.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R.; DUSSP, C. **Advances in fermentation technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., 2008.

PONCE DE LEÓN, C. A.; BAYÓN, M. M.; PAQUIN, C.; CARUSO J. A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.602–610, 2002.

POTHOULAKIS, C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.30, p.826-833, 2009.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. Analise e controllo del vini. **Edizioni Agricoli Bologna**, p.543, 1996.

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; TEODORO, J.; OSS, J. F.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. A new alternative to produce Gibberellic acid by solid state fermentation. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, Special Number: pp. 181-188, 2009.

RODRIGUES, M. I e IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**: Uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª. Ed.-Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROEPCKE, C. B. S. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
SAAD, S. M. S. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**, v.42, n.1, 2006.

SALMON, D. N. X; PIVA, L. C.; BINATI, R. L.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; SOCCOL, C. R.; SPIER, M. R. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, n.7, p.1067-1079, 2012.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANDERS, M.E. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. Supplement article. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.S58–61, 2008.

SCHRAUZER, G. N. Selenium yeast: Composition, quality, analysis, and safety. **Pure and Applied Chemistry**., v.78, N.1, p.105–109, 2006.

SCHRAUZER, G. N. Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. **Journal Nutrition**, v.130, p.1653–1656, 2000.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. e AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. 1. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 433p., 2002.

SOCCOL, C. R. e VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p. 205-218, 2003.

SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L. P. S., SPIER, M. R. MEDEIROS, A. B. P., YAMAGUISHI, C. T., LINDNER, J. D., PANDEY, A., THOMAZ-SOCCOL, V. The Potential of Probiotics: A Review. **Food Technology and Biotechnology**, v.48, n.4, p.413–434, 2010.

STADTMAN, T. C. Selenium biochemistry: Mammalian selenoenzymes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.899, p.399–402, 2006.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Great Britain: Pergamon, 1995.

STRATTON, M. S.; DILLEY, T.; AHMANN, F. In: Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 19th annual symposium (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds), Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 31-50, 2003.

SUHAJDA, A.; HEGOCZKI, J.; JANZSO, B.; PAIS, I.; VERECZKEY, G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.14, p.43-47, 2000.

SURAI, P. F.; SPARKS, N. H. C. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. **Trends in food science and technology**, v.7, p.12-16, 2001.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, p.134-44, 2003.

TOUFEKTSIAN, M.-C., BOUCHER, F., PUCHEU, S., TANGUY, S., RIBUOT, C., SANOU, D., TRESALLET, N., DE LEIRIS, J. Effects of selenium deficiency on the response of cardiac tissue to ischemia and reperfusion. **Toxicology**, v.148, p.125–132, 2000.

WANG, Z.; ZHANG, L.; TAN, T. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS2 for selenium-enriched yeast production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.27, n.6, p.1836-1840, 2010.

WENTZEL, A.; BRUHEIM, P.; OVERBY, A.; JAKOBSEN, O.M.; SLETTA, H.; OMARA, W. A. M; HODGSON, D.; ELLINGSEN, T.E. Optimized submerged batch fermentation strategy for systems scale studies of metabolic switching in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **BMC Systems Biology**, v.6, n.59, p. 1-16, 2012.

WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: An update. **British Journal of Nutrition**, v.91, p.11–28, 2004.

WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; CARUSO, J. A. Hydrolysis of protein with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p.133-138, 2003.

YADAN, J-C; MOUTET, M. **Non-photosynthetic micro-organisms enriched with organic selenium from seleno-hydroxyacid compounds and applications thereof in the fields of nutrition, cosmetics and pharmaceuticals**. Patent US 20110151545A1, 2011.

YANG, L.; STURGEON, R. E.; MCSHEEHY, S.; MESTER, Z. Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1055, p.177–184, 2004.

YIN, H.; CHEN, Z.; GU, Z.; HAN, Y. Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by D -optimal mixture design. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.327–331., 2009.

YIN, H.; FAN, G.; GU, Z. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.666–669, 2010.

ZOETENDAL, E. G.; AKKERMANS, A. D. L.; AKKERMANS-VAN VLIET, W. M. et al. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.13, p.129–134, 2001.