

Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *air lift* e *shaker*

Comparison of Saccharomyces boulardii growth in an air-lift fermentor and in a shaker

José Luis MULLER¹, Karina Luvizutto PROTTI¹, Marina da Silva MACHADO¹, Leo Lynce Valle de LACERDA¹, Tania Mari Bellé BRESOLIN¹, Pablo Sanchez PODLECH^{1*}

Resumo

Os fermentadores tipo *air lift* oferecem vantagens tais como: eficiente homogeneização dos componentes, baixo cisalhamento e economia de energia, pois o meio é agitado pelo processo de aeração, sem necessidade de agitação mecânica. O objetivo deste trabalho foi analisar a cinética de crescimento de *Saccharomyces boulardii* neste fermentador, com aeração de 1 e 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto), comparada com o crescimento em frascos agitados em *shaker*, visando a futura aplicação deste fermentador, em escala industrial. Os resultados indicaram que houve uma diminuição do pH com o consumo da glicose do meio, a qual foi totalmente consumida até o final da fase exponencial, de 5 e 6 horas para o *shaker* e o *air lift*, respectivamente. Após este período houve uma alteração na velocidade de crescimento de *S. boulardii*, em ambos os equipamentos, indicando uma possível mudança na fonte de carbono utilizada, uma vez que toda a glicose foi consumida após estes períodos. Os valores de velocidades específicas de crescimento foram semelhantes para o *shaker* e *air-lift* com 1,0 vvm, porém inferiores ao *air-lift* com 1,5 vvm, indicando que neste último reator há possibilidades de se conseguir uma velocidade de produção celular maior, dependendo apenas da eficiência de oxigenação oferecida.

Palavras-chave: *S. boulardii*; fermentação; *air lift*; *shaker*.

Abstract

This work aimed to analyze the kinetics of *S. boulardii* growth in an air lift fermentor under two aeration conditions: 1 and 1.5 air vvm (air volume per volume of culture medium per minute), in comparison with growth in shaken flasks, with a view to the future application of this fermenter on an industrial scale. Air lift fermentors offer advantages such as efficient homogenization of the components, low shear stress, and energy savings because the medium is stirred by aeration and does not require mechanical stirring. The pH of the medium decreased with the glucose uptake during the exponential phase, probably due to the formation of secondary metabolites. The entire process showed a similar specific growth rate during the exponential phase (up to 5 hours in the case of the shaker and 6 hours in that of the air-lift fermentor), indicating a possible change in the carbon source, since all the glucose was depleted after the aforementioned periods. After 6 hours, the growth rates in the shaker and the fermentor were similar under 1.0 vvm, but lower than in the fermentor under 1.5 vvm, suggesting that the fermentor may reach a higher cell production rate depending only on the oxygenation efficiency.

Keywords: *S. boulardii*; fermentation; air-lift fermentor; shaker.

1 Introdução

S. boulardii foi primeiramente isolada de frutas silvestres (Lychee) na Indochina nos anos 50 e desde então tem sido usada como probiótico, adicionado à dieta alimentar com a finalidade de equilibrar a flora intestinal e com fins terapêuticos no tratamento de diarreias^{10,18}. Os probióticos são substâncias ativas no trato gastrointestinal na inter relação com este meio, sendo considerados medicamentos com a regulação oficial em quase 100 países².

SCHREZENMEIR e DE VRESE¹³ propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, e que produzem efeitos benéficos em sua saúde. Vários microrganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido-lácticas e leveduras. Um probiótico deve ser inócuo, manter-se viável por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do

suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal, não possuir genes transmissores de resistência a antibióticos e possuir propriedade anticarcinogênica atribuída à inibição de enzimas pró-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imunitário do hospedeiro, assim como resistir a fagos e ao oxigênio⁴.

Entre as formas comerciais de administração de *S. boulardii* como agente terapêutico está o produto liofilizado, na forma de cápsulas. Um dos processos utilizados para a obtenção comercial deste microrganismo é a fermentação em batelada. Este é o processo de escolha na indústria alimentícia e farmacêutica, devido ao maior controle do processo e dificuldade de contaminação³.

O *air lift* é um biorreator utilizado na fermentação industrial em batelada que promove ligação entre o líquido do topo e da base, com direcionamento do gás de modo a obter turbulência e autocirculação dirigida, permitindo elevada transferência de oxigênio¹². Este tipo de fermentador pode proporcionar processos de produção de microrganismos em grande escala, sem limitação de oxigênio local, além de apresentar forças de cisalhamento muito baixas, preservando os tecidos, principalmente os micelianos que se apresentam mais frágeis⁶. A aeração é fator importante para que se obtenha uma maior formação de massa celular viável durante o processo fermentativo. A injeção

Recebido para publicação em 29/8/2006

Aceito para publicação em 26/9/2007 (001831)

¹ Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, CP 360, CEP 88302-202, Itajaí - SC, Brasil,

E-mail: pablo.biotec@univali.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

do gás serve para agitar e aerar, eliminando o gasto de energia para agitação, e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor¹⁴. Este equipamento é de construção simples e econômica, possibilitando uma manutenção fácil e barata, podendo representar uma alternativa ao processo industrialmente mais utilizado, o sistema em batelada contínua, tendo em vista, especialmente, a economia de energia, um dos principais custos do processo industrial.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de crescimento de *S. boulardii* em fermentador *air lift*, ainda não relatado na literatura, com diferentes condições de aeração e baixa concentração de substrato, comparando a cinética de crescimento, neste equipamento, com o processo em frascos agitados (*shaker*), normalmente utilizado para estabelecer as variáveis do processo para posterior aumento de escala.

2 Material e métodos

2.1 Cultura

A espécie em estudo, *S. boulardii* foi obtida a partir do produto comercial (Floratil®, Merck). Cada cápsula de 100 mg continha cerca de 2×10^8 células de *S. boulardii*-17 na forma liofilizada.

2.2 Meio de cultura

O meio de cultura foi preparado de acordo com a Tabela 1 com volume adequado para cada processo fermentativo utilizado (*shaker* e *air lift*), esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Em sistemas aerados o rendimento do substrato em células, teoricamente, se encontra na faixa de 0,5, sabendo-se que 50% do corpo da célula constitui-se de carbono. Também foram consideradas as concentrações de nitrogênio, fósforo, enxofre, vitaminas do complexo B e magnésio, de maneira a produzir uma quantidade de células, em relação ao percentual do peso seco, correspondente a 10 vezes a quantidade inicial⁹.

Tabela 1. Composição do meio de cultura utilizado no processo fermentativo.

Substâncias	Quantidade g.L ⁻¹
Glicose anidra (Vetec)	10
Peptona de carne (Biobrás)	2
Extrato de levedura (Bioliife)	2
KH ₂ PO ₄ (Nuclear)	0,6
Uréia (Nuclear)	0,36
Sulfato de amônia (Vetec)	0,12
Sulfato de magnésio (Analítica)	0,24

Todas as transferências do inóculo foram realizadas utilizando-se fluxo laminar vertical.

2.3 Pré-inóculo e inóculo

O pré-inóculo foi preparado em condições assépticas, utilizando-se levedura liofilizada (Floratil®), sendo as cápsulas previamente desinfetadas externamente com hipoclorito de sódio (Vetec) a 1% (borrifadas e secadas no tempo de 5 minutos,

em ambiente de fluxo laminar). Em 100 mL de meio de cultura esterilizado, foi adicionado 100 mg da levedura, seguido de homogeneização. Foram distribuídos 50 mL do meio inoculado em dois frascos Erlenmeyer de 500 mL e após 12 horas de incubação a 30 °C sob agitação de 200 min⁻¹ em *shaker* (modelo 712, Marconi) obteve-se o inóculo.

2.4 Processo fermentativo

O processo fermentativo foi realizado através de dois métodos: cultivo em *shaker* (modelo 712, Marconi) e em fermentador *air lift*. Neste último foram utilizadas duas vazões de ar: 1,0 e 1,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto).



Figura 1. Biorreator com agitação aerada do tipo *air-lif*.

O fermentador *air lift* (Figura 1) utilizado foi construído de acordo com PEDRINI et al⁸ e possuía sistema de circulação externa com controle de temperatura no *downcomer*.

No cultivo em *shaker*, para cada ensaio foram preparados frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL de volume final de trabalho, contendo 10% de inóculo. Os Erlenmeyers foram colocados em *shaker* de bancada rotativo, sob agitação de 200 min⁻¹ e temperatura de 30 ± 1 °C.

Para o cultivo em *air lift* foram preparados 2300 mL de volume final de trabalho contendo 10% de inóculo. A temperatura

de 30 ± 1 °C foi controlada através do trocador de calor colocado no *downcomer*.

No tempo zero (t_0) e em intervalos regulares (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12 horas), foram retiradas alíquotas, em ambos os processos para as análises da massa celular, concentração de glicose e pH.

Foram utilizadas concentrações crescentes de antiespumante (Silbione® 70460, Plury Química) na concentração de 0,2-1,8% v.v⁻¹, em 50 mL de meio inoculado, medindo-se a formação de espuma. Também foi medida a massa celular após 6 horas de fermentação, conforme descrito abaixo, a fim de verificar a influência sobre o microrganismo.

2.5 Análises dos processos

Inicialmente elaborou-se uma curva analítica, correlacionando a massa celular com a medida de densidade ótica (DO). Por regressão linear foi estimada uma equação linear para calcular a massa celular das amostras. As amostras dos processos fermentativos foram retiradas nos tempos especificados, seguido de filtração através de membrana de 0,22 µm de tamanho de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore), diluição em água destilada e leitura da DO em espectrofotômetro (modelo 1601, Shimadzu). A massa celular das amostras foi calculada utilizando-se a equação da reta.

O consumo de glicose do meio foi quantificado através do método enzimático Glicose PAP Liquiform® (Labtest Diagnóstica). Também foi construída uma curva analítica correlacionando a concentração de glicose com a DO. Para quantificar o consumo de glicose durante o processo, as alíquotas retiradas nos diferentes tempos foram filtradas através de membrana de 0,22 µm de tamanho de poro e 25 mm de diâmetro (Millipore) a fim de separar as células contidas no meio fermentado. As amostras filtradas foram congeladas em freezer (Larp) a -20 °C até o momento da realização da análise de glicose. A absorbância foi lida em duplicata em espectrofotômetro (modelo 1601, Shimadzu) e, através da equação da reta, foi calculada a concentração de glicose.

O pH foi medido em pHmetro com compensação manual de temperatura, utilizando eletrodo de vidro calomelano (Digimed DME-CV1).

Foram calculadas as seguintes variáveis características dos processos fermentativos: conversão de substrato em células, produtividade (razão entre a massa de células produzida por volume de meio em fermentação por unidade de tempo) e a velocidade específica dos processos, durante a fase exponencial.

2.6 Análise estatística

Para análise das variáveis: conversão de substrato em células, produtividade, massa celular e velocidade específica de crescimento, os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados foram interpretados por meio de análise de variância, utilizando teste *F* ao nível de 5% de probabilidade.

As médias dos valores das variáveis foram comparadas utilizando teste de Tukey, adotando o nível de 5% de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o aplicativo Statistica versão 6.0¹⁶.

3 Resultados e discussões

Inicialmente foi determinada a quantidade mínima do antiespumante a ser adicionada no meio. A adição de 0,2% de antiespumante evitou a formação de espuma, sem alterar a DO do meio, comparando com o controle, sem antiespumante (dados não mostrados).

A Figura 2 mostra a análise de um dos processos fermentativos, em *shaker*, sendo que o experimento foi realizado em triplicata e as repetições apresentaram perfis similares (dados não mostrados).

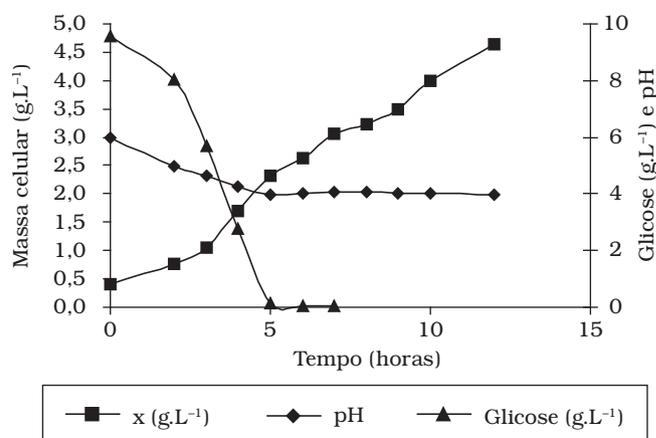


Figura 2. Variação de massa celular (*x*), consumo de glicose e pH na fermentação de *S. boulardii* em fermentador batelada tipo *shaker*.

Na fase *Lag* ou fase de latência o crescimento celular é nulo devido à adaptação das células¹². Esta fase praticamente não foi observada neste trabalho, devido ao meio de cultivo ser idêntico ao utilizado no preparo do pré-inóculo. O consumo de substrato e o pH sofreram pequenas variações devido ao baixo metabolismo celular. Na segunda fase, chamada de fase de transição, ocorre o início da reprodução propriamente dita, havendo um aumento gradual do crescimento, sendo que no fim desta fase toda a população começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo. A próxima fase (fase *Log*, Logarítmica ou exponencial) foi observada no período de 2 a 5 horas (Figura 2). Nesta fase pôde-se observar que a curva apresentou uma inclinação acentuada, atribuída a fatores e condições favoráveis ao metabolismo, onde a formação de unidades funcionais celulares é máxima. O consumo de substrato também é máximo nesta fase, pois visa suprir as necessidades celulares na fermentação alcoólica onde uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de ATP's gerando energia para a célula¹². Segundo RIBÉREAU-GAYON e PEYNAUD¹¹ a queda no pH observada, deve-se à formação de ácidos orgânicos (ácidos succínico, láctico, acético e outros) e, conseqüentemente, ao aumento da

acidez do meio de fermentação. Após 5 horas, observou-se um crescimento linear de *S. boulardii*.

A Figura 3 mostra uma das repetições do processo fermentativo em *air lift* com aeração 1,0 e 1,5 vvm, sendo que as replicatas dos experimentos apresentaram perfis idênticos (dados não mostrados).

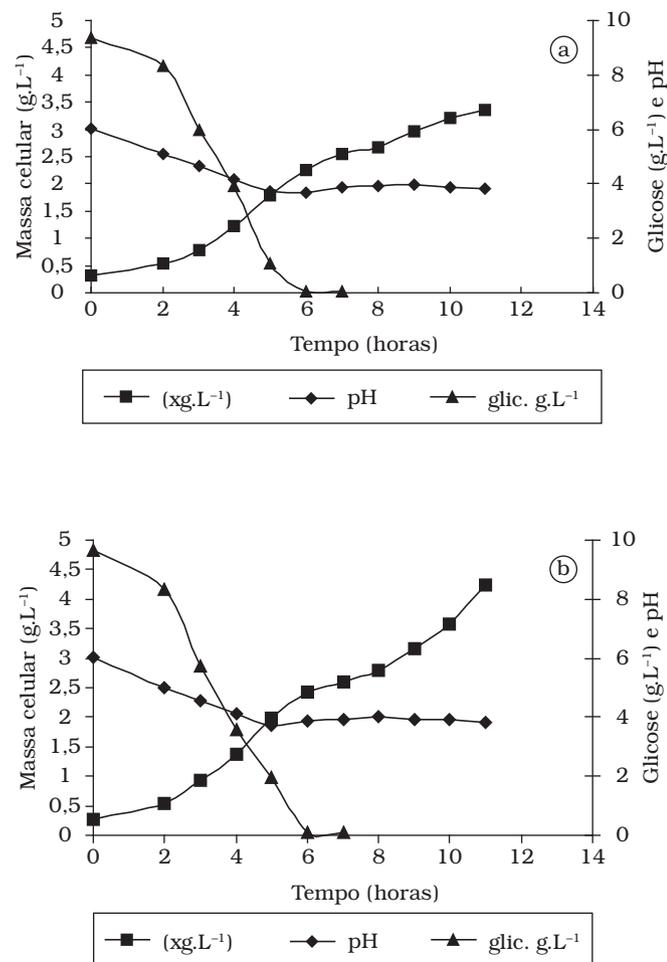


Figura 3. Variação de massa celular (x), a) consumo de glicose e pH na fermentação de *S. boulardii* em fermentador batelada *air-lift* 1 vvm e b) 1,5 vvm.

O perfil dos processos fermentativos em *air lift* (Figura 3) apresentou similaridade com a fermentação em *shaker* (Figura 2), porém pode-se observar que a fase exponencial em *air lift* parece ocorrer no período de 2 a 6 horas, mais prolongada em comparação com a fase exponencial em *shaker* (2 a 5 horas). O término do conteúdo de glicose, no final da fase exponencial, coincide com uma inflexão na curva de massa celular, a qual continua a crescer até o final do período de 12 horas, em fase linear.

Para melhor comparar a produção celular entre os três processos, a massa celular foi colocada em gráfico, em função do tempo (Figura 4).

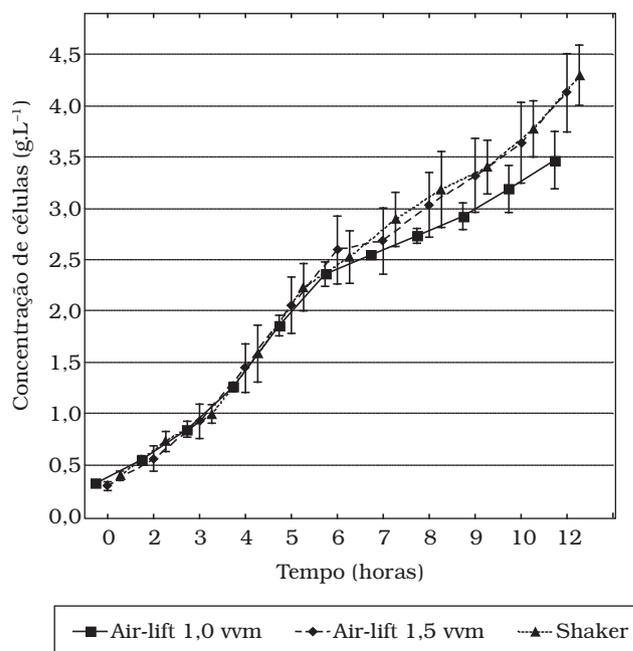


Figura 4. Variação de massa celular durante o processo fermentativo nos reatores batelada *shaker* e *air-lift* 1,0 vvm e 1,5 vvm.

As curvas apresentadas (Figura 4) mostram uma pequena inflexão a partir do tempo 6 horas (*air lift*) e 5 horas (*shaker*), o que coincide com o final da fase exponencial da fermentação, conforme observado anteriormente (Figuras 2 e 3). Na próxima fase, que compreende o tempo 7 a 12, a velocidade passa a ser linear e não mais exponencial. Nesta segunda fase pode haver a presença de interferentes, comuns no decorrer do processo, como a formação de metabólitos ou escassez de substrato. Como não havia mais glicose presente no meio, e o microrganismo continuou a crescer nesta segunda fase, haveria uma mudança de substrato utilizado, o qual pode ser um metabólito formado durante a primeira fase.

O consumo de etanol, glicerol e outros ácidos orgânicos, no decorrer do processo fermentativo, ocorre devido à oxidação metabólica pela célula com o objetivo de gerar mais ATP e biomassa, mas apenas em aerobiose⁵. À medida que a glicose foi sendo consumida houve uma diminuição do pH (Figuras 2 e 3), provavelmente devido à formação de ácidos orgânicos.

Na fase exponencial do processo foi calculada a velocidade específica de crescimento (Tabela 2).

Embora a produtividade e a massa de células não tenha se diferenciado nos três processos fermentativos, o *air lift* 1,5 vvm apresentou maior velocidade específica de crescimento em relação aos dois outros processos ($p < 0,05$), indicando que a maior aeração provocou um aumento na velocidade específica de crescimento de *S. boulardii*. No que diz respeito à conversão de substrato em glicose, o *air lift* 1,0 (média de 0,334) e *Shaker* (média de 0,417) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). O *air lift* 1,5 apresentou conversão intermediária entre os demais, com diferenças não significativas ($p > 0,05$).

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão das variáveis conversão de substrato em células, produtividade, massa celular e velocidade específica de crescimento de *S. boulardii* na fermentação em batelada em *shaker* e *air-lift*.

Reator	Conversão substrato em células (g.g ⁻¹)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h)	Massa celular (g.L ⁻¹)	Velocidade Específica (h ⁻¹)*
<i>Air-lift</i> 1,0 vvm	0,334 ± 0,023 ^a	0,263 ± 0,025 ^a	3,153 ± 0,301 ^a	0,351 ± 0,007 ^a
<i>Air-lift</i> 1,5 vvm	0,393 ± 0,037 ^{ab}	0,320 ± 0,030 ^a	3,969 ± 0,536 ^a	0,382 ± 0,006 ^b
<i>Shaker</i>	0,417 ± 0,021 ^b	0,325 ± 0,025 ^a	3,907 ± 0,294 ^a	0,350 ± 0,002 ^a

Médias com letras diferentes dentro da mesma coluna apresentam diferença significativa entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; e *estimada na fase exponencial de crescimento celular de 2 a 5 horas e 2 a 6 horas em *shaker* e *air-lift*, respectivamente.

Outras espécies de leveduras como *S. cerevisiae* em aerobiose se constitui em crescimento glicose-etanol diáuxico. A glicose se metaboliza a etanol na primeira fase exponencial de crescimento, quando as células apresentam uma alta velocidade (tempo de geração de 1,7 horas). Na produção industrial de leveduras de panificação, observa-se um tempo de geração de 3 a 4 horas, quando se forma uma boa concentração de álcool e de 5 a 6 horas nas culturas livres de álcool. Na primeira fase de crescimento, as funções do ácido tricarbólico são apenas para a formação de esqueletos carbônicos para propósitos biossintéticos. As atividades das enzimas são baixas, assim como as dos demais sistemas envolvidos, por exemplo, citocromos. Na segunda fase do crescimento diáuxico as atividades aumentam, havendo a formação de enzimas de metabolismo oxidativo, crescente na fase interlag. Se a concentração de glicose ultrapassa determinado nível, cerca de 250 a 300 mg.L⁻¹, essas enzimas não se formam ou são inibidas. O oxigênio controla o metabolismo da glicose no efeito Pasteur, por isto, o fenômeno foi chamado de efeito Pasteur reverso, efeito glicose ou *crabtree*. À medida que o mecanismo passou a ser melhor entendido, recebeu o nome de repressão catabólica, que é mais geral. O acúmulo intracelular de metabólitos de açúcares, nomeadamente de glicose, é responsável pelos efeitos regulatórios observados da repressão catabólica. Evita-se a repressão catabólica, cultivando-se a levedura em meio de cultura com baixa concentração de glicose, o que é possível em fermentação contínua ou, melhor ainda, em descontínuo-alimentado (*fedbatch*)^{3,18}.

Na *Saccharomyces cerevisiae* este fenômeno resulta na sua preferência para fermentar açúcares via glicólise a etanol e CO₂ em vez de oxidá-los completamente via respiração¹⁸.

Para avaliar a cinética de crescimento de *S. boulardii* no *air lift*, neste trabalho foi utilizada uma baixa concentração de substrato (10 g.L⁻¹), a fim de evitar a inibição do crescimento da levedura.

Na fermentação alcoólica, o principal responsável pela diminuição da viabilidade celular é o seu próprio produto, o etanol (12% v.v⁻¹ após 72 horas de fermentação), cuja ação tóxica reflete-se na desorganização da membrana citoplasmática⁷. BUENO NETO¹, utilizando como inóculo o *S. cerevisiae*, analisou valores crescentes de concentração de etanol no meio fermentativo e concluiu que somente acima do teor de 7,2% v.v⁻¹ ocorreu inibição para o crescimento celular. Nos processos estudados no presente trabalho, o etanol pode ter sido gerado no meio e provavelmente foi utilizado como fonte de carbono após o consumo de glicose. Esta hipótese pode ser apoiada no

modelo de crescimento de leveduras em glicose apresentado por SONNLEITNER e KAPELLI¹⁵. Segundo estes autores, a capacidade respiratória das células governa o metabolismo da glicose ou do etanol, e a formação de produtos em células em crescimento, e representa uma restrição ou estrangulamento (*bottleneck*) para a utilização oxidativa do substrato. Como a utilização de etanol é um processo oxidativo e a sua utilização tem uma prioridade menor que a da glicose, não há consumo de etanol nestas condições, ou seja, o princípio da capacidade respiratória limitada não permite o consumo e produção, simultâneos, de etanol (o etanol é usado ao se atingir a capacidade respiratória do microrganismo, quando toda a glicose já tiver sido consumida).

4 Conclusões

Em termos de produtividade não houve diferença estatisticamente significativa no crescimento celular do *S. boulardii* utilizando-se os processos fermentativos em *shaker* ou *air lift* na fase de 0 a 6 horas. Porém, entre 7 e 12 horas, observou-se uma menor velocidade na formação de células no *air lift* 1,0 vvm. No *air lift* 1,5 vvm, aparentemente, a maior aeração promoveu uma maior velocidade específica de crescimento. Estes resultados sugerem que apenas a eficiência de oxigenação oferecida foi responsável pelo aumento da velocidade específica de crescimento, o que deve ser mantido mesmo com o aumento da concentração do substrato em escala industrial. Provavelmente, após o consumo da glicose, o microrganismo utiliza o etanol gerado como fonte de carbono, porém, este fato precisa de um estudo de avaliação em termos de conversão do novo substrato pelas células.

Concentração elevada de substrato inibe o crescimento da levedura e, para viabilizar o uso industrial do *air lift* na produção desta levedura em bateladas deverá ser posteriormente avaliada a utilização de elevada concentração de substrato neste equipamento, normalmente utilizando o sistema *fedbatch* em processos industriais. Deste modo, poderiam ser selecionadas as condições ideais para minimizar esta inibição. Outro parâmetro importante a ser determinado em estudos futuros, neste equipamento, seria a medida do teor de oxigênio dissolvido, a fim de melhor caracterizar o mesmo e avaliar sua eficiência.

Agradecimentos

Os autores agradecem à PropPPEC (Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Cultura) da UNIVALI, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Referências bibliográficas

1. BUENO NETO, C. L. **Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar**. 1982. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Escola Politécnica, Universidade de São Paulo - USP.
2. BUTS, J. P. Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. **Revista de Gastroenterología**, v. 25, n. 2, p. 176-188, 2005.
3. CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, cap. 9, p. 193-204.
4. COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
5. LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, p. 66-71, 2001.
6. MERCHUK, J. C. Why use airlift reactors. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 66, 1990.
7. PANTOJA, L. et al. Processo fermentativo para produção de bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 19, p. 50-54, 2001.
8. PEDRINI, M. R. S. et al. Aplicação de um Biorreator Airlift com Circulação Externa em Fermentações com *Ralstonia eutropha*. In: VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas - SHEB, 1999, Maringá - PR. **Anais do SHEB**, v. 1. p. 26, 1999.
9. QUINTERO R. **Ingeniería Bioquímica – Teoría y aplicaciones**. 3ª edição. Yucatan: Alhambra, 1993.
10. RASIC, J. L. The role of dairy foods containing bifido and acidophillus bacteria in nutrition and health. **North European Dairy Journal**, v. 4, p. 80-88, 1983.
11. RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. **Análise e controllo Del vini. Edizioni Agricoli Bologna**, p. 543, 1996.
12. SCHMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, cap. 8, p. 179-192.
13. SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 361-364, 2001.
14. SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C.W. Application of *air-lift* gas-liquid-solid reactors in Biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 13-14, p. 3215-3229, 1992.
15. SONNLEITNER, B.; KAPPELL, O.; Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 6, p. 927-937, 1986.
16. STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0 2001. (Software estatístico).
17. SURAWICZ C. M. et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. **Gastroenterology**, v. 96, n. 4, p. 981-988, 1989.
18. TRIVEDI, N. B.; JACOBSON, G.; TESCH, W. Baker's Yeast. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 75-109, 1986.