MICHELE VITOLO

ATIVIDADE INVERTÁSICA DE CÉLULAS INTACTAS DE
LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) OBTIDAS POR
CULTIVO CONTÍNUO

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica do Instituto
de Química da Universidade de São Paulo

Orientador:
Prof. Dr. WALTER BORZANI

SÃO PAULO
1983

*Dedico esta tese a
minha querida esposa
Márcia Cristina.*

Minha eterna gratidão ao Prof.Dr. WALTER BORZANI, que pôs a minha disposição todo o seu talento e sua vasta experiência em pesquisa, propiciando-me inaudita segurança, sem a qual teria sido impossível conduzir a bom termo esta tese.

Agradecimento especial aos meus queridos pais, ERSILIO e ENRICHETTA, pelo estímulo aos estudos e pelo enorme carinho e amor que sempre me deram.

"O homem é a medida de
todas as coisas".

(Protágoras).

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. MARINA LIA RIBEIRO VAIRO pela preciosa e imprescindível colaboração nos ensaios de cultivo contínuo.

Aos Srs. ARMANDO CAMOLEZE FILHO e JOSÉ EDUARDO DA CRUZ pelo brilhante trabalho na elaboração dos desenhos.

Ao Prof.Dr. Bruno Carlos de Almeida Cunha por todo o apoio que me tem dado.

À Biblioteca do Instituto de Química da USP, pela revisão das referências bibliográficas.

Ao Prof.Dr. Eugênio Aquarone a quem devo o convite para ingressar na Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP em associação com o IPT, que possibilitaram e facilitaram a execução dos ensaios de cultivo contínuo.

Ao Químico Luiz H. Koshimizu, Eng^a. Agron. Maria Regina de Melo Cruz, ao Eng^o Químico Enrique Ildefonso V. Gómez e ao Eng^o Celso L.B. Netto, sem cuja colaboração teria sido impossível realizar os experimentos de cultivo contínuo.

Ao Sr. Euclides Gomes da Silva pelo apoio técnico no preparo dos ensaios de cultivo contínuo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram na execução deste trabalho.

ÍNDICE

	p.
NOMENCLATURA	I
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Resumo da teoria do processo contínuo de fermentação	5
1.3 Objetivo do trabalho	11
1.4 A escolha do tipo de fermentação	12
1.5 Escolha do mosto de fermentação	13
1.6 Escolha do microrganismo	14
1.7 Escolha das variáveis de estudo	15
1.8 Análise dos resultados	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Preparo do mosto	20
2.1.1 Clarificação	20
2.1.2 Esterilização	20
2.1.3 Acerto do pH	21
2.1.4 Suplementação	21
2.2 Preparo do inóculo	21
2.3 Descrição do equipamento	22
2.4 Descrição de um ensaio típico	22
2.4.1 Condições experimentais	24
2.4.2 Tratamento das amostras	24
2.5 Técnicas analíticas	26
2.5.1 Medida do pH	26
2.5.2 Medida da concentração celular	26
2.5.3 Medida da concentração de açúcares redutores totais (ART)	27
2.5.4 Medida da atividade invertásica	29
2.5.4.1 Solução de sacarose	30

	p.
2.5.4.2 Medida da atividade invertásica da amostra	30
2.5.4.3 Prova em branco	31
2.5.4.4 Correção da atividade invertásica medida em 2.5.4.2	31
2.5.4.5 Cálculo da atividade invertásica	33
2.5.5 Análise de fatores que podem interferir no método analítico de medida da concentração de ART	35
2.5.5.1 Interferência da presença de células	35
2.5.5.2 Medida do consumo de ART pelas células	36
2.5.6 Efeito do tipo de armazenamento da suspensão de células sobre a atividade invertásica	36
3. RESULTADOS	38
3.1 Curva de calibração	38
3.2 Erro experimental na dosagem do ART pelo método de Somogyi	40
3.3 Interferência da presença de células na determinação do ART	41
3.4 Influência do consumo de açúcares pelas células na determinação do ART	42
3.5 Ensaio em cultivo contínuo	43
3.5.1 Ensaio nº 1	43
3.5.2 Ensaio nº 2	49
3.5.3 Ensaio nº 3	55
3.5.4 Ensaio nº 4	59
3.5.5 Ensaio nº 5	65
3.5.6 Ensaio nº 6	76
3.5.7 Ensaio nº 7	83
3.5.8 Ensaio nº 8	88
3.5.9 Ensaio nº 9	93

	p.
3.5.10 Ensaio do inóculo	98
3.5.11 Ensaio nº 10	100
3.5.12 Ensaio nº 11	107
3.6 Ensaio em cultivo descontínuo	117
3.6.1 Ensaio nº 12	117
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	121
4.1 Ensaio do inóculo	121
4.2 Erro experimental na dosagem do ART pelo método de Somogyi	123
4.3 Interferência da presença de células na determinação do ART	123
4.4 Influência do consumo de açúcares pelas células na determinação do ART	124
4.5 Ensaios em cultivo contínuo	124
4.5.1 Ensaios com borbulhamento de ar e com mosto não suplementado	124
4.5.1.1 Ensaio nº 1	124
4.5.1.2 Ensaio nº 2	130
4.5.1.3 Ensaio nº 3	137
4.5.1.4 Ensaio nº 4	142
4.5.1.5 Ensaio nº 5 (1ª etapa)	143
4.5.1.6 Ensaio nº 10 (1ª etapa)	144
4.5.1.7 Comentários sobre o item 4.5.1	145
4.5.2 Ensaios com borbulhamento de ar e com mosto suplementado	148
4.5.2.1 Ensaio nº 5	148
4.5.2.2 Ensaio nº 6	159
4.5.2.3 Ensaio nº 7	166
4.5.2.4 Ensaio nº 10	167
4.5.2.5 Ensaio nº 11	173
4.5.2.6 Comentários sobre o item 4.5.2	174
4.5.3 Ensaio com mosto não suplementado e sem borbulhamento de ar	176
4.5.3.1 Ensaio nº 8	176

	p.
4.5.4 Ensaio com mosto suplementado e sem borbulhamento de ar	177
4.5.4.1 Ensaio nº 9	177
4.6 Ensaio descontínuo com melaço suplementado e com borbulhamento de ar	178
4.6.1 Ensaio nº 12	178
4.7 Análise geral dos ensaios de fermentação con- tínua	184
4.7.1 Ensaios em regime estacionário	184
4.7.2 Ensaios em regime transiente	189
4.7.3 Considerações finais	193
5. CONCLUSÕES	198
6. RESUMO	201
SUMMARY	205
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	209
8. APÊNDICE	218

NOMENCLATURA

Apresentamos, a seguir, o significado dos símbolos e abreviaturas utilizados no decorrer desta tese.

a,b	-	coeficientes linear e angular da curva de calibração.
AR	-	Açúcares redutores calculados como glicose.
ART	-	Açúcares redutores totais calculados como glicose.
c'	-	Concentração de ART.
C ₀	-	Concentração de um ingrediente qualquer no mosto de alimentação.
C	-	Concentração de um ingrediente qualquer no tanque de fermentação.
CV	-	Coeficiente de variação.
D	-	Vazão específica de alimentação da dorna.
F	-	Vazão de alimentação da dorna.
f	-	Fator de diluição da suspensão de células
m	-	Massa de células secas, cuja atividade invertásica foi medida.
m'	-	Massa celular úmida.
N	-	Frequência do agitador.
P.O.M.	-	Período de oscilação médio da atividade invertásica ao longo do ensaio.
r	-	Coeficiente de correlação linear.

r_{crit}	- Coeficiente de correlação linear crítico.
s	- Desvio-padrão.
S_0	- Concentração de AR no mosto de alimentação.
S'_0	- Concentração de ART no mosto de alimentação.
S	- Concentração de AR no tanque de fermentação.
S'	- Concentração de ART no tanque de fermentação.
$(S'-S)$	- Concentração de sacarose no tanque de fermentação
$\frac{dS}{dt}$	- Velocidade de variação da concentração de AR no mosto em fermentação.
$(\frac{dS}{dt})_c$	- Velocidade de consumo de AR.
$(\frac{dS}{dt})_p$	- Velocidade de formação de AR a partir da sacarose.
$\frac{d(S'-S)}{dt}$	- Velocidade de variação da concentração de sacarose no mosto em fermentação.
$\frac{d(S'-S)_c}{dt}$	- Velocidade de consumo de sacarose.
t	- Tempo
v	- Atividade invertásica específica das células intactas de levedura.
V	- Volume de mosto no tanque de fermentação.
V_I	- Volume da amostra contendo a massa celular seca.
x	- Massa de glicose
x'	- Massa de AR (medida como glicose) produzida pela invertase existente em dada massa de células secas.
X	- Concentração de microrganismo no mosto em fermentação.
$\frac{dX}{dt}$	- Velocidade de variação da concentração celular no mosto em fermentação.

$\left(\frac{dX}{dt}\right)_c$	- Velocidade de crescimento do microrganismo.
y	- Absorbância da solução lida a 540 nm.
y_1	- Absorbância proveniente da hidrólise não enzimática da sacarose.
y_2	- Absorbância proveniente do AR residual, previamente, existente na solução amostra.
y_0	- Absorbância da solução no início da reação enzimática.
θ	- Tempo de residência.
θ_g	- Tempo de geração.
μ	- Velocidade específica de crescimento do microrganismo.
μ_s	- Velocidade específica de consumo de AR.
$\mu(s'-s)$	- Velocidade específica de consumo de sacarose.
v	- Graus de liberdade.
ϕ	- Vazão específica de ar no tanque de fermentação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

A invertase (β -fructofuranosídeo-frutohidrolase, EC. 3.2.1.26) é uma enzima encontrada em várias espécies de organismos (60), sendo, no entanto, a levedura a fonte principal, sobretudo as espécies S. cerevisiae e S. carlsbergensis.

Historicamente a invertase foi uma das primeiras enzimas a ser obtida na forma de extrato bruto (60) e, já em meados deste século, encontrava-se disponível no comércio (52).

Segundo SKINNER (54) o comércio de invertase no mercado Norte-Americano durante a década passada movimentou cifras da ordem de US\$ 200.000, que, quando comparadas com o mercado global de enzimas (aproximadamente de US\$ 50 milhões), são bastante modestas.

Por outro lado, o Brasil importou 2 800kg em 1980 e 8 792 kg em 1981, despendendo, respectivamente US\$ 31.420 e US\$ 74.670*. Considerando a importação brasileira de enzimas em 1980 e confrontando-a com os valores acima referentes ao mesmo ano, verifica-se que a invertase ocupou o 4º lugar em termos de quantidade e o 8º em divisas (61).

* Informação pessoal obtida junto à Novo Industri do Brasil.

Ao lado das perspectivas econômicas, que são alentadoras, deve ser realçada a importância que os estudos sobre a invertase sempre tiveram para o desenvolvimento da Bioquímica. Atualmente particular atenção vem sendo prestada a estudos relacionados com a biossíntese e transporte da invertase, importantes subsídios para esclarecer os mecanismos que levam à formação de uma estrutura rica em macromoléculas, como é o caso da parede celular.

Foi demonstrada a existência de dois tipos de invertase na célula de S. cerevisiae. Uma situada no interior do citoplasma e desprovida de manana, e outra na região da parede celular contendo este polissacarídeo (29). Ainda existem muitas controvérsias sobre as interrelações entre essas duas invertases (1) (34) (50).

A maneira pela qual a invertase é transferida para fora do citoplasma, também não está bem esclarecida. Segundo FARKAS et al (26) durante a gemulação, fase do ciclo celular de intensa atividade metabólica, a invertase é depositada, preferencialmente, na parede celular da gêmula em crescimento. Conforme LAMPEN et al (38), a parte protéica da enzima seria formada no retículo endoplasmático e, a seguir, glicosilada, à medida que fosse transferida para a gêmula. Esta transferência parece ser intermediada por vesículas e a glicosilação ocorreria ao nível da plasmalema (6) (45) (53) (56).

Apesar das incógnitas existentes em relação aos eventos referidos, parece claro que deve existir um certo grau de correlação entre os eventos da gemulação e os do transporte, localização e biossíntese da invertase e, por extensão, com a biogênese da parede celular.

O resumo apresentado a seguir foi baseado nas referências (8) (9) (14) (28) (33) (51) e toma como ponto de partida uma célula que ainda não gemulou.

Uma vez atingido o tamanho adequado e, certamente, estabelecidas as melhores condições fisiológicas, a célula num dado momento passa a apresentar uma diminuta protuberância num ponto qualquer de sua superfície. É o primórdio da gêmula. Concomitantemente verifica-se uma aceleração do consumo de carboidratos de reserva (trealose e glicogênio), seguida da síntese de polissacarídeos estruturais. Além disso ocorre, também, o aparecimento de um grande número de vesículas, as quais conteriam os materiais necessários para a formação da estrutura da gêmula, inclusive a glucanase que seria responsável pelo enfraquecimento local da parede celular da célula-mãe, por onde se extrudaria a gêmula.

No instante em que a parede celular da célula-mãe é rompida, começam a ser formadas, de modo contínuo, a parede celular e a plasmalema da célula-filha. O material constituinte da nova parede celular, principalmente glicana e manana, vai sendo inserido na porção distal da gêmula.

A glicana, que é o constituinte estrutural da parede, na verdade é o nome genérico de dois polissacarídeos da glicose, que se encontram associados. Um deles é linear, apresentando ligações osídicas do tipo $\beta_{1 \rightarrow 3}$ e algumas do tipo $\beta_{1 \rightarrow 6}$, enquanto que o outro é ramificado, sendo as ligações osídicas da cadeia principal do tipo $\beta_{1 \rightarrow 6}$ e, nos pontos de ramificação, do tipo $\beta_{1 \rightarrow 3}$.

Por sua vez, a manana, que se entrelaça com as moléculas de glicana e cuja estrutura é variável de acordo

com a espécie da levedura, é um polímero da manose contendo N-acetilglicosamina e fosfato e que está associada a um peptídeo. A manana estaria parte dispersa na parede celular e parte no espaço periplásmico, fazendo parte, neste último caso, da estrutura de enzimas como invertase e fosfatase ácida. Existem evidências de que as mananas destas duas regiões são muito semelhantes e que estas macromoléculas são sintetizadas no citoplasma pela ação da manano-sintetase e, a seguir, são transportadas para a periferia em vesículas.

Toda a troca de materiais entre a gêmula e a célula-mãe se dá através de um pequeno canal formado entre ambas. Quando o broto atinge um tamanho próximo da célula inicial, começa a se formar um septo de quitina na base do canal. A formação deste septo primário requer a concorrência de três elementos: uma enzima na forma de zimógeno localizada na plasmalema (quitina-sintetase), uma protease (ativador) e um peptídeo de PM $\approx$ 8 500 (inibidor).

Uma vez terminada a consolidação do septo primário, começam a se formar os septos secundários, sendo um voltado para a célula-filha e o outro para a célula-mãe, cujos componentes são análogos aos da parede celular.

Atingindo o tamanho adequado a célula-filha se destaca da célula-mãe.

Apesar de todas as dúvidas existentes, a verdade é que a invertase acaba se instalando na parede celular e/ou no espaço periplásmico. Como foi visto, estas regiões são passíveis de intensas e variadas modificações, que poderiam causar tanto mudanças conformacionais na estrutura das

moléculas de invertase, como provocar posicionamentos distintos das mesmas. Isto tudo, em última análise, refletir-se-ia, a grosso modo, sobre a atividade invertásica total da célula intacta do S. cerevisiae, conforme será visto nos resultados apresentados mais adiante.

1.2 RESUMO DA TEORIA DO PROCESSO CONTÍNUO DE FERMENTAÇÃO

Em um processo fermentativo contínuo a dorna é constantemente alimentada com mosto, o qual é fermentado e retirado a uma vazão igual à de alimentação, o que permite um fluxo contínuo de produto e um volume constante de meio no tanque.

Neste processo podem se estabelecer, no sistema, dois tipos de regime: transiente e estacionário. Todas as vezes que as condições de cultivo não se adaptarem às necessidades fisiológicas do microrganismo, tem-se o estabelecimento de regime transiente, onde as propriedades do sistema variam com o decorrer do tempo. Caso contrário obtém-se o regime estacionário que, aliás, é um dos objetivos principais do uso industrial do processo contínuo de fermentação.

Na presente análise só serão apresentadas as deduções das equações que foram realmente aplicadas no cálculo de certos parâmetros úteis para a discussão dos resultados obtidos, a partir de uma dorna alimentada com mosto esterilizado e sem recirculação de microrganismos. Maiores informações poderão ser encontradas nos textos de AIBA (2) e BORZANI, LIMA e AQUARONE (10).

Consideremos o sistema representado na figura 1.

FIGURA 1. Representação esquemática de um sistema de fermentação contínua.

Suponhamos que o fermentador seja homogêneo, contendo um volume V de mosto, sendo alimentado, com mosto esterilizado, a uma vazão F , sendo S_0 e S_0' , respectivamente, as concentrações de AR e ART no mosto de alimentação.

No interior da dorna o mosto é fermentado pelo microrganismo, presente na concentração X , e retirado a uma vazão F . Sejam S e S' , respectivamente, as concentrações de AR e ART no meio existente na dorna. Como se está admitindo agitação perfeita do sistema, então a composição do efluente é idêntica à do meio dentro da dorna.

O balanço material do microrganismo, em um intervalo de tempo dt , pode ser escrito como:

Variação da massa de microrganismos no tanque	=	Variação da massa de microrganismos devido à reprodu- ção celular	-	Massa de micror- ganismos retira- da no efluente
---	---	--	---	--

$$V \cdot dX = V(dX)_c - FXdt \quad (1-1)$$

ou

$$\frac{dX}{dt} = \frac{(dX)_c}{dt} - DX \quad (1-II)$$

onde $D = \frac{F}{V}$ representa a vazão específica de alimentação.

Dividindo (1-II) por X, temos:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{1}{X} \cdot \frac{(dX)_c}{dt} - D \quad (1-III)$$

Mas por definição: $\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{(dX)_c}{dt}$

onde μ representa a velocidade específica de reprodução.

Assim (1-III) pode ser escrita:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu - D \quad (1-IV)$$

Porém, em regime estacionário, tem-se $\frac{dX}{dt} = 0$

logo $\mu = D \quad (1-V)$

A relação (1-V) mostra que no sistema de um só tanque homogêneo, sem recirculação de microrganismos, a velocidade específica de crescimento $\bar{\mu}$, no regime estacionário, igual à vazão específica de alimentação.

A equação que exprime o balanço material de AR do sistema $\bar{\mu}$:

$$VdS = FS_0dt + V(dS)_p + V(dS)_c - FSdt \quad (1-VI)$$

Rearranjando temos:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) + \frac{(dS)_p}{dt} + \frac{(dS)_c}{dt}$$

ou

$$\frac{(dS)_c}{dt} = \frac{dS}{dt} - D(S_0 - S) - \frac{(dS)_p}{dt} \quad (1-VII)$$

A equação para expressar o balanço da sacarose no sistema $\tilde{e}$:

$$V.d(S' - S) = F.dt(S'_0 - S_0) + V.d(S' - S)_c - F.dt(S' - S) \quad (1-VIII)$$

rearranjando temos:

$$\frac{d(S' - S)_c}{dt} = \frac{d(S' - S)}{dt} - D[(S'_0 - S_0) - (S' - S)] \quad (1-IX)$$

Lembremos, também, que:

$$\frac{d(S' - S)_c}{dt} = - \frac{(dS)_p}{dt} \quad (1-X)$$

Quando o sistema atinge o estado estacionário tem-se:

$$\frac{dS}{dt} = 0 \quad (1-XI)$$

$$\frac{d(S' - S)}{dt} = 0 \quad (1-XII)$$

Substituindo (1-XI) e (1-XII), respectivamente, em (1-VII) e (1-IX), tem-se:

$$\frac{(dS)_c}{dt} = - D(S_0 - S) - \frac{(dS)_p}{dt} \quad (1-XIII)$$

e

$$\frac{d(S' - S)_c}{dt} = - D[(S'_0 - S_0) - (S' - S)] \quad (1-XIV)$$

Considerando, agora, as equações (1-X) e (1-XIV) podemos escrever que:

$$\frac{(dS)_p}{dt} = D \left| (S'_0 - S_0) - (S' - S) \right| \quad (1-XV)$$

Finalmente, substituindo (1-XV) na (1-XIII) obtêm-se:

$$\frac{(dS)_c}{dt} = D(S' - S'_0) \quad (1-XVI)$$

As velocidades específicas de consumo de $AR(\mu_S)$ e de sacarose ($\mu_{S'-S}$) são definidas do seguinte modo:

$$\mu_S = \frac{1}{X} \frac{(dS)_c}{dt} \quad (1-XVII)$$

$$\mu_{S'-S} = \frac{1}{X} \cdot \frac{d(S'-S)_c}{dt} \quad (1-XVIII)$$

No caso em que se deseja saber a quantidade de determinado ingrediente após certo tempo no reator, procede-se do seguinte modo:

Seja o sistema representado na figura 2

FIGURA 2. Representação esquemática de um reator em regime de alimentação contínua.

onde: C_0 = concentração inicial do ingrediente na dorna
 C = concentração do mesmo ingrediente após o tempo t
 V = volume do mosto.

Considerando um intervalo de tempo dt e desconsiderando o eventual consumo do ingrediente pelas células, temos:

$$V.dC = -FCdt \quad (1-XIX)$$

logo

$$\ln C = \ln C_0 - Dt \quad (1-XX)$$

Sabendo que o tempo de residência (θ) é o inverso de D , e aplicando (1-XX) pode-se saber, com boa aproximação, a quantidade do ingrediente após um tempo determinado (t).

Na discussão dos resultados obtidos utilizou-se o tempo de geração (θ_g) definido como sendo o tempo para haver duplicação da massa de células existentes no meio de cultivo. Por conseguinte demonstra-se que (10):

$$\theta_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1-XXI)$$

Para determinar as velocidades específicas de crescimento celular (μ), consumos de AR (μ_S) e de sacarose ($\mu_{S'-S}$), através, respectivamente, das equações (1-IV), (1-VII) e (1-IX) em regime transiente, onde $\frac{dX}{dt}$, $\frac{dS}{dt}$ e $\frac{d(S'-S)}{dt}$ não são nulos, foi utilizado para o cálculo destas variáveis o método algébrico preconizado por Le DUY e ZAJIC (64). No apêndice apresenta-se uma tabela para ilustrar os cálculos feitos na aplicação do método referido.

No único ensaio em que se utilizou processo fermentativo descontínuo, que foi o ensaio nº 12, as equações utilizadas para calcular os parâmetros acima referidos foram:

$$\frac{(dS)_c}{dt} = \frac{dS}{dt} - \frac{(dS)_p}{dt} \quad (1-XXII)$$

$$\frac{d(S' - S)_c}{dt} = \frac{d(S' - S)}{dt} = - \frac{(dS)_p}{dt} \quad (1-XXIII)$$

1.3 OBJETIVO DO TRABALHO

Hã, na literatura, muitos trabalhos que procuraram estudar vários aspectos do comportamento da levedura cultivada por processo contínuo, podendo ser citados, a título de exemplo, estudos relacionados com a composição da parede celular (40) e com a repressão-desrepressão de enzimas (18).

Nosso primeiro objetivo foi o de verificar, em cultivo contínuo, a influência de alguns fatores na atividade invertásica de leveduras intactas no intuito de, posteriormente, estabelecer condições que conduzissem a células ricas em invertase.

Com o decorrer dos experimentos, porém, notou-se que a atividade invertásica específica das células intactas oscilava ao longo do ensaio, independentemente de se estar em regime transiente ou estacionário. Como não foi encontrada nenhuma publicação que fizesse menção a esse com-

portamento oscilatório, procurou-se apresentar uma explicação deste fenômeno.

1.4 A ESCOLHA DO TIPO DE FERMENTAÇÃO

É muito difícil, ao se estudar um sistema qualquer, evitar que algum fator estranho ao mesmo acarrete perturbações indesejáveis que, por sua vez, poderão conduzir a erros de interpretação dos resultados.

O grau da perturbação dependerá do tipo da técnica escolhida para o estudo programado e do seu tempo de aplicação.

No caso particular de microrganismos, que são sistemas altamente complexos, cuidados especiais devem ser tomados a este respeito.

Assim, quando a finalidade é avaliar a influência do meio ambiente sobre a fisiologia microbiana ou sobre a biossíntese de determinada substância, é comum o emprego das técnicas: sincronismo celular (43), centrifugação fracionada (30), eletroforese bidimensional em gel de alta resolução (27) e cultivo contínuo (2)(10).

Segundo ELLIOTT (22) a técnica do sincronismo celular pode não ser a mais adequada para o estabelecimento do padrão de biossíntese de macromoléculas, pois para obter o referido sincronismo as condições metabólicas da célula sofrem profundas alterações. Este autor sugere, para tal fim, o emprego da centrifugação fracionada e a eletroforese bidimensional.

O cultivo contínuo, por sua vez, é um bom meio para se acompanhar as mudanças fisiológicas decorrentes de perturbações externas, pois nesse sistema as células podem ser mantidas em um ambiente com propriedades constantes (13)(16).

Segundo DEAN (19) e TODA (57) o cultivo contínuo permite verificar o comportamento da atividade de enzimas frente às variações ambientais como pH, vazão específica de alimentação (D), oxigenação, etc.

Assim sendo, o cultivo contínuo em estágio único mostra-se bastante adequado para abordar, convenientemente, os objetivos deste trabalho.

Realizou-se, também, um ensaio por processo descontínuo com o intuito de acompanhar o comportamento da atividade invertásica e do crescimento celular em regime francamente transiente.

1.5 ESCOLHA DO MOSTO DE FERMENTAÇÃO

Para o cultivo, contínuo ou descontínuo, de S. cerevisiae, assim como de muitos outros microrganismos, podem ser usados tanto meios sintéticos, cuja composição é conhecida, como meios provenientes de resíduos industriais.

A escolha do meio, sem dúvida alguma, estará na dependência do tipo de estudo a ser realizado. Quando se deseja estudar os sutis e complexos mecanismos que ocorrem no metabolismo celular, o uso de meio de cultura bem conhecido é uma condição necessária. Por outro lado, quando o estudo está voltado para fins industriais, onde os problemas de cus-

to tornam-se relevantes, o emprego de meio de cultura mais barato torna-se necessário, passando os resíduos industriais a terem maior importância.

Levando em conta que se pretendia verificar a possível aplicação industrial dos resultados deste trabalho, optou-se, por conseguinte, pela escolha do melaço de cana-de-açúcar como matéria prima.

Além disso, segundo PEREGO (47), o melaço, que é o resíduo da fabricação do açúcar a partir do caldo de cana, é um meio rapidamente transformado pela levedura, não contém substâncias inibidoras, seu pH relativamente baixo diminui os riscos de contaminação, é de fácil manipulação e pode ser armazenado durante o ano todo.

1.6 ESCOLHA DO MICRORGANISMO

Algumas das razões que levaram à escolha do S. cerevisiae foram:

- a) o grande número de estudos existentes sobre esta espécie de levedura, tornando-a um dos mais bem conhecidos microrganismos (37) (48);
- b) a facilidade de seu isolamento e sua manutenção;
- c) suas exigências nutricionais são relativamente poucas;
- d) apresenta bom crescimento em meios preparados a partir de resíduos industriais;
- e) seu amplo uso em processos industriais;

- f) sua reconhecida capacidade de produzir enzimas extracitoplasmáticas (invertase e fosfatase ácida), sendo, por exemplo, a principal fonte de invertase;
- g) o fato de apresentar a invertase situada na região periférica da célula, permitindo que a atividade desta enzima seja medida com relativa facilidade.

Deve ser destacado, outrossim, que este microrganismo está sendo muito utilizado nos processos fermentativos para a produção de etanol. Como neste processo há crescimento celular ponderável, poder-se-ia, então, desviar parte da massa de células formada para a extração da invertase. Ficaria assim aberta a possibilidade de acoplar a produção de etanol com a de invertase.

1.7 ESCOLHA DAS VARIÁVEIS DE ESTUDO

Sempre que se procura utilizar microrganismos como agentes de transformação, defrontamo-nos com dois fatos que, embora intimamente relacionados, exibem características distintas.

Um deles está relacionado com o metabolismo celular, regido por mecanismos próprios e dependentes da constituição genética da célula. O outro relaciona-se com as condições do ambiente no qual a célula é obrigada a viver e que podem ser propositalmente variadas ou, então, que se alteram como consequência da própria atividade celular.

A resposta da célula às variações ambientais aparece na forma de modificações morfo-fisiológicas, que implicam no aumento ou diminuição da atividade de pelo menos uma enzima (19)(57). Assim, pela medida da variação da atividade de uma enzima adequadamente escolhida, pode-se ter uma idéia da intensidade do efeito causado pela mudança ambiental.

No presente trabalho escolheu-se a invertase como enzima marcadora, sobretudo pela sua localização propícia na célula de levedura e pela relativa facilidade em se medir sua atividade.

Por outro lado, as medidas das concentrações de AR, ART e de células, também se constituem em importantes indicadores da resposta da célula às variações das condições ambientais, neste caso em termos de balanços globais de massa.

Existem muitos parâmetros do sistema fermentativo que podem ser variados e seus efeitos avaliados.

Neste trabalho foram escolhidas as seguintes variáveis:

- a) vazão específica de alimentação da dorna: 0,10 a 0,11-014 - 0,23 a 0,26 h^{-1} ;
- b) vazão específica de borbulhamento de ar: 0-1-2 $\ell/\ell.\text{min}$;
- c) frequência do agitador: 500-700 min^{-1} ;
- d) adição ou não de nutrientes: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Os níveis de variação fixados para os parâmetros selecionados, foram suficientes para provocar efeitos mensuráveis na célula de levedura.

A tabela I-I representa, de maneira resumida, algumas das condições em que foram realizados os ensaios de cultivo contínuo.

1.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Mediram-se as concentrações de células (X), açúcares redutores (S), açúcares redutores totais (S') e a atividade invertásica específica (v) em função do tempo, a partir de amostras do conteúdo da dorna retiradas periodicamente.

Através de um balanço material adequado, deduziram-se equações que permitiram calcular as velocidades específicas de consumo de açúcares redutores (μ_S) e de sacarose ($\mu_{S'-S}$), assim como a velocidade específica de formação de células (μ). Em consequência, também, foi possível calcular o tempo de geração (θ_g) celular nos vários ensaios.

De posse destes parâmetros, conduziu-se a análise dos resultados de modo que se pudesse obter, entre outras, conclusões relacionadas com:

- a) condições de maior produção de células ricas em invertase;
- b) correlação entre as várias velocidades específicas;
- c) o verdadeiro significado dos valores de v medidos;

- d) condições favoráveis à obtenção de regimes transiente e estacionário;
- e) a explicação da oscilação de v com o tempo;
- f) o significado da periodicidade das oscilações de v em relação ao tipo de regime estabelecido na dorna;
- g) o acoplamento entre a decomposição da sacarose e a assimilação dos açúcares redutores, intermediada pela ação da invertase localizada na periferia da célula;
- h) a eventual relação entre v e a produtividade em células, nos regimes estacionário e transiente;
- i) os efeitos causados por perturbações (por degrau e por impulso) sobre o sistema de cultivo.

TABELA 1-I. Condições em que foram realizados os experimentos. Indica-se entre parêntesis os números dos ensaios

	Sem adição de nutrientes		Com adição de nutrientes	
	Frequência do agitador 500 min ⁻¹		Frequência do agitador 700 min ⁻¹	
ϕ (ℓ/ℓ min)	$\star D(h^{-1})$ 0,10 0,23 a a 0,11 0,14 0,26		$D(h^{-1})$ 0,10 0,23 a a 0,11 0,14 0,26	
0	(8)		(9)	
1	(1) (4) (5) ₁ (10) ₁		(5) ₃ (5) ₂ (6) ₁ (10) ₂	
2	^{**} (2) ₁ (2) ₂ (3)		(5) ₄ (6) ₂ (7) (11)	

* Os valores de D são aproximados.

** O índice representa a etapa do ensaio realizada sob as condições especificadas. As demais condições experimentais estão indicadas em Materiais e Métodos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARO DO MOSTO

Em todos os ensaios utilizou-se mosto de melaço de cana-de-açúcar clarificado, esterilizado e não hidrolisado, preparado da seguinte maneira:

2.1.1 Clarificação (11)

A melaço de cana-de-açúcar diluído em água potável (proporção volumétrica 1:1) adicionou-se $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,25 g/l de mistura), sendo a mistura distribuída em balões de 12 l e sucessivamente aquecida a 100°C por 15 min e a $115-120^\circ\text{C}$ por igual período. Em seguida a mistura foi deixada em repouso por no mínimo 48h, para permitir a sedimentação de materiais precipitados. Findo este período, o mosto clarificado foi retirado por sifonação.

2.1.2 Esterilização

O mosto clarificado foi diluído de tal modo a apresentar uma concentração de ART da ordem de 30 g/l e acrescido de solução 4,0 N de NaOH suficiente para obter pH ao redor de 7,0. A seguir o mosto diluído foi distribuído da seguinte forma: 1,2l, divididos em frações de 200 ml, em erlenmeyers de 1l (para preparar o inóculo); 2,5 l na dorna e o

volume restante em balões de 12ℓ (10 ℓ em cada balão), procedendo-se então à esterilização em autoclave a 120°C por 30 min.

2.1.3 Acerto do pH

O pH do mosto utilizado na fermentação foi ajustado em 4,0, pela adição de quantidades adequadas de solução 4,0 N de H_2SO_4 . A fração de mosto (1,2 ℓ) usada para preparar o inóculo teve seu pH ajustado em 4,5.

2.1.4 Suplementação

Nos casos em que se utilizou mosto enriquecido, a suplementação foi feita adicionando-se, a cada balão, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (2,4 g/ℓ), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,075 g/ℓ) e $(NH_4)_2SO_4$ (5,1 g/ℓ), conforme preconizado por WHITE (62).

2.2 PREPARO DO INÓCULO

Em todos os ensaios o microrganismo utilizado foi o S. cerevisiae, isolado de fermento prensado comercial e mantido em meio glicosado sólido (extrato de levedura 3,0 g/ℓ, peptona 5,0 g/ℓ, glicose 10,0 g/ℓ e agar-agar 15,0 g/ℓ).

A partir da cultura pura, o microrganismo foi inoculado em tubos contendo 10,0 ml de caldo glicosado (o qual diferiu do meio anterior apenas por não conter agar-agar) e incubado em estufa a 30°C por 48h.

Cada tubo, por sua vez, serviu de inóculo para um erlenmeyer de 1ℓ, contendo 200 ml de mosto idêntico ao que

foi utilizado nos ensaios. Os erlenmeyers inoculados foram incubados a 30°C por 22 h em incubador rotativo (New Brunswick Scientific Co., Inc.) com frequência de 200 min⁻¹ e excentricidade de 3 cm. A dorna de fermentação foi inoculada com o conteúdo de 3 erlenmeyers (volume de 600 ml).

2.3 DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO (Ver Figura 2-I)

Utilizou-se fermentador "Microferm" com dorna de 7 l de capacidade nominal, fabricado pela New Brunswick Scientific Co. Inc., com controles de temperatura, frequência do agitador, pH e vazão de ar.

A adição contínua de mosto à dorna foi feita através de alimentador de vazão constante (bomba Biolafitte, série nº 2920). A retirada contínua de mosto foi feita através de um tubo, cuja extremidade inferior foi nivelada com a superfície do mosto na dorna e a extremidade superior foi conectada a uma balão de 2 l ligado a uma bomba de vácuo.

A adição de antiespumante, quando necessária, foi feita mediante a adaptação de um dispositivo adequado (Fig. 2-I).

2.4 DESCRIÇÃO DE UM ENSAIO TÍPICO

Inoculou-se a dorna com 600 ml de inóculo, deixando-se o sistema durante 6 h nas condições experimentais escolhidas. Após este período foi iniciada a alimentação contínua de mosto.

FIGURA 2.1. Esquema do sistema utilizado nos ensaios de cultivo contínuo. A- Balões de 12 l com 10 l de mosto; B- Filtros de algodão; C- Alimentador de vazão constante; D- Dispositivo para adição de antiespumante; E- Dorna de 7 l; F- Entrada do mosto de alimentação; G- Saída do mosto fermentado; H- Chicanas (em número de quatro) simetricamente dispostas; I- Agitador: turbina com pás verticais; J- Balão de 6 l para recolhimento do mosto fermentado; L- Entrada de ar.

O andamento da fermentação foi acompanhado por amostragem periódica do mosto em fermentação no interior da dorna. A cada hora mediu-se o volume de efluente para controle da vazão de alimentação.

2.4.1 Condições Experimentais

Os fatores seguintes tiveram seus valores fixados em todos os ensaios realizados:

temperatura de fermentação: $(30,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$

pH do mosto: 4,0

antiespumante: UCON ou dimetilpolisiloxano

volume de mosto na dorna: 3 l

volume de inóculo: 600 ml

idade do inóculo: 22 h

As demais condições experimentais estão especificadas na tabela 1-I e nos ensaios correspondentes no capítulo de Resultados.

2.4.2 Tratamento das amostras

As amostras, a menos das colhidas a intervalos de tempo de 10 min, cujo volume variou de 10 a 50 ml, foram tratadas como indicado na figura 2-II. Os pormenores desse tratamento são descritos no item 2.5.

No caso de amostras colhidas a cada 10min, procedeu-se ao seguinte tratamento: filtrou-se 15,0 ml da amostra através de membrana "Millipore" (diâmetro dos poros = $1,2 \mu\text{m}$), lavando-se, em seguida, o material celular com 2 por

FIGURA 2-II. Esquema do tratamento das amostras das determinações analíticas.

ções de 25 ml de água destilada; uma vez escoada toda a água, as células foram transferidas, com o auxílio de uma espátula, para um frasco munido de rolha de borracha, de massa conhecida; por diferença de pesagens, determinou-se a massa de células úmidas da amostra. Os frascos foram guardados em geladeira até o momento da medida da atividade invertásica: o material úmido de cada amostra foi suspenso em 200 ml de água destilada, sendo esta suspensão adequadamente diluída. Desta última, tomou-se 0,5 ml procedendo-se conforme descrito em 2.5.4.

2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.5.1 Medida do pH

O pH foi medido em potenciômetro (Micronal, B221).

2.5.2 Medida da concentração celular (11)

A amostra, tão logo colhida, foi filtrada em membrana "Millipore" (diâmetro do poro = 1,2 μ m) para separar as células em suspensão. O resíduo da filtração foi lavado com 50 ml de água destilada e posto a secar em estufa a 105°C por 2 h.

A concentração celular obtida foi expressa em gramas de matéria seca por litro de amostra.

2.5.3 Medida da concentração de açúcares redutores totais (ART)

Em balão de 100 ml foram colocados 5,0 ml do efluente isento de células e 25,0 ml de uma solução de HCl (100 ml de HCl concentrado em 800 ml de água destilada). Em seguida o balão foi mergulhado em banho de água a 65-70°C por 15 min para hidrolisar a sacarose do mosto. Findo este período resfriou-se o balão em água corrente (25).

A concentração de ART no hidrolisado foi determinada pelo método de SOMOGYI (55), descrito a seguir:

a) Reagentes

O método de Somogyi utiliza três soluções cujas composições são:

Solução I

NaHCO ₃		20,0 g
NaKC ₂ H ₄ O ₆		15,0 g
Na ₂ CO ₃		30,0 g
Na ₂ SO ₄		180 g
Água destilada q.s.p.		1 000 ml

Solução II

Preparada pela dissolução, a frio, de 46,0g de Na₂SO₄ em 100 ml de uma solução de CuSO₄.5H₂O de concentração igual a 40,0 g/l; eleva-se o volume a 200 ml com água destilada.

Solução III

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50,0 g
H_2SO_4 (d= 1,84)	42,0 ml
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,0 g
Água destilada q.s.p.	1 000 ml

As soluções devem ficar em repouso por, no mínimo, 30 h e devem ser guardadas em frasco escuro a 30°C.

b) Doseamento

As soluções preparadas segundo descrito foram calibradas a partir de soluções de glicose em água destilada, cujas concentrações distribuíram-se no intervalo de 20 a 200 mg/l.

O doseamento propriamente dito é descrito a seguir.

Em tubo de Folin-Wu colocaram-se 1,0 ml de uma mistura das soluções I e II na razão volumétrica de 4:1 (mistura reativa), preparada no momento do uso, e 1,0 ml da amostra hidrolisada, adequadamente diluída. Em seguida o tubo foi colocado em banho de água fervente durante 10 min exatos e, logo após, resfriado em banho de gelo e água. A seguir adicionou-se 2,0 ml da solução III e agitou-se vigorosamente para expulsar os gases formados, completando-se em seguida o volume de 25,0 ml com água destilada. Em paralelo preparou-se uma prova em branco, onde a amostra foi substituída por 1,0 ml de água destilada.

Isto feito, mediu-se a absorbância da solução em espectrofotômetro Coleman Jr. (comprimento de onda = 540

nm) usando, como referência, a solução obtida na prova em branco.

Muito embora os açúcares redutores obtidos pela hidrólise do mosto de melaço sejam principalmente glicose e frutose, os resultados das determinações serão sempre expressos em gramas de açúcares redutores totais, calculados como glicose, por litro de mosto, uma vez que a glicose sempre foi o padrão utilizado nas calibrações das soluções de reagentes.

Nos casos em que foi necessária a determinação dos açúcares redutores (AR) existentes na amostra, bastou tomar 1,0 ml de uma solução adequadamente diluída de efluente isento de células e proceder conforme descrito neste item.

Para avaliar o erro cometido ao usar-se o método de Somogyi, preparou-se uma solução de glicose (10 g/l), a qual foi diluída 100 vezes. Desta diluição tomou-se alíquota de 1,0 ml e procedeu-se ao doseamento. Repetiu-se a medida cinco vezes.

2.5.4 Medida da atividade invertásica

Antes da medida da atividade procedia-se a uma diluição adequada da suspensão de células, a fim de garantir a condição de saturação da enzima pelo substrato durante a reação. O tempo de reação fixado sempre esteve dentro do intervalo de 1 a 3 min, durante o qual a velocidade de formação de ART foi constante. Isto foi assegurado determinando-se, em cada ensaio, a curva do aumento da concentração de ART com o tempo tomando-se por base a amostra correspondente

ã suspensão celular mais ativa obtida em processo contínuo. A medida do aumento da concentração do ART foi acompanhada, de minuto em minuto, durante 6 minutos. O sistema montado foi igual ao descrito em 2.5.4.2 a menos do tempo de reação que se prolongou por 6 min. Informações complementares serão fornecidas no capítulo RESULTADOS.

2.5.4.1 Solução de sacarose

A solução de sacarose, de concentração 100 g/l, foi preparada dissolvendo-se no momento do uso, em tubo de Folin-Wu, 0,25 g de sacarose p.a. (marca Reagen) em 2,5 ml de tampão acetato pH = 4,6. Agitou-se até dissolução total. O tempo decorrido entre a adição do tampão sobre a sacarose e o momento do uso foi sempre de 5 min exatos.

A solução-tampão acetato de pH=4,6 foi preparada da seguinte maneira (7): foram misturados 260 ml de solução 0,010 M de ácido acético e 240 ml de solução 0,010 M de acetato de sódio. Após a homogeneização da mistura o pH foi ajustado a 4,6 e o volume completado a 1 l com água destilada.

2.5.4.2 Medida da atividade invertásica da amostra

O tubo de Folin-Wu contendo a solução de sacarose foi colocado em banho de água a 37°C por 10 min. Em seguida adicionou-se 0,5 ml da suspensão diluída de células e a mistura permaneceu a 37°C durante um tempo fixo (1, 2 ou 3 minutos). A reação foi interrompida pela adição de 1,0 ml da mistura reativa (ver item 2.5.3), seguida da imediata

imersão em banho de água fervente por 10 min. Após resfriamento do tubo em água corrente, adicionou-se 2,0 ml da solução III (ver Ítem 2.5.3) e agitou-se energeticamente. A seguir o volume foi completado a 25,0 ml com água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (comprimento de onda igual a 540 nm). Esta determinação foi feita sempre em duplicata.

2.5.4.3 Prova em Branco

Em tubo de Folin-Wu colocaram-se 0,5 ml de tampão-acetato e 1,0 ml da mistura reativa. Em seguida o tubo foi mergulhado em banho de água fervente, procedendo-se, como em 2.5.4.2.

2.5.4.4 Correção da atividade invertásica medida em 2.5.4.2

Os seguintes pontos devem ser considerados para se poder chegar ao valor corrigido da atividade invertásica:

a) Concentração de AR existentes na suspensão aquosa de células

Esta determinação é necessária porque as lavagens a que foram submetidas as células (ver figura 2-II) não garantem eliminação completa dos açúcares provenientes do mosto. Em tubo de Folin-Wu colocaram-se 0,5 ml da suspensão diluída de células e 1,0 ml da mistura reativa. O tubo foi deixado em banho de água fervente por 10 min. A seguir foi

resfriado, acrescido de 2,0 ml da solução III e o volume completado a 25,0 ml com água destilada.

b) Concentração de AR formados durante a ação da invertase por hidrólise não enzimática da sacarose

Durante o intervalo de tempo em que a sacarose sofre a ação da invertase da levedura hã, concomitantemente, hidrólise não enzimática da sacarose com a consequente produção de AR. A concentração de AR produzidos pela hidrólise não enzimática deve, obviamente, ser medida. Para tanto, procedia-se do seguinte modo: dois tubos de Folin-Wu contendo 2,5 ml da solução de sacarose foram deixados em banho de água a 37°C por 10 min. Em seguida adicionou-se a um dos tubos 1,0 ml da mistura reativa, e, após homogeneização, o tubo foi mergulhado em banho de água fervente, procedendo-se conforme 2.5.4.2. O outro tubo foi deixado a 37°C durante mais 3 min, sofrendo a seguir tratamento análogo ao anterior.

c) Determinação da concentração de ART formados durante os 10 min de permanência da solução de sacarose a 37°C

Para esta determinação procedeu-se tal como descrito em 2.5.4.2, exceto que a mistura reativa (1,0 ml) foi adicionada ao tubo de Folin-Wu imediatamente após a adição da amostra contendo as células (0,5 ml). Este tubo será considerado como sendo o "tubo de tempo zero".

2.5.4.5 Cálculo da atividade enzimática

Para o cálculo da atividade enzimática procedeu-se como descrito a seguir (Figura 2-III).

FIGURA 2.III. Esquema da técnica utilizada para medida da atividade enzimática de amostras contendo células intactas de levedura.

Da leitura y deve-se subtrair a absorbância devida à hidrólise não enzimática da sacarose (y_1) e também aquela devida à existência de AR na amostra em questão (y_2). Chega-se assim a uma absorbância dada por:

$$y = (y_1 + y_2)$$

Desse último valor deve ser ainda subtraída a absorbância obtida nos "tubos de tempo zero" que, analogamente ao que foi exposto anteriormente, será:

$$y_0 = (y_1 + y_2)$$

O valor corrigido da absorbância para o cálculo da atividade enzimática será:

$$Y = y - y_0 \quad (2-I)$$

Sendo x a massa de ART correspondente à absorbância Y , e sendo $Y = a + bx$ a equação da curva de calibração, tem-se:

$$x = \frac{y - y_0 - a}{b} \quad (2-II)$$

Levando em conta o método utilizado na medida da atividade enzimática (ver Fig. 2-III), a massa de ART que seria produzida pela massa m de células será:

$$x' = 2fV_I \frac{y - y_0 - a}{b} \quad (2-III)$$

Sendo a atividade enzimática (v) definida como

a massa de ART produzida na unidade de tempo, pela unidade de massa de células (matéria seca), tem-se:

$$v = \frac{2f.V_I}{m.t} \cdot \frac{y - y_0 - a}{b} \quad (2-IV)$$

A equação (2-IV) só não foi aplicada nas amostras que, durante o ensaio nº 11, foram colhidas de 10 em 10 min durante um período de 3 h. Por razões de ordem técnica não foi possível determinar a massa de células secas dessas amostras, sendo por isso utilizados os valores das massas de células úmidas (m') no cálculo de v . Assim, nesses casos, tem-se:

$$v = \frac{2f.V_I}{m'.t} \cdot \frac{y - y_0 - a}{b} \quad (2-V)$$

2.5.5 Análise de fatores que podem interferir no método analítico de medida da concentração de ART

Preparou-se uma suspensão de levedura (fermento Fleischmann) em água destilada de concentração igual a 0,33 g de matéria seca por litro. Aliquotas desta suspensão foram tomadas para avaliar a interferência dos fatores indicados a seguir.

2.5.5.1 Interferência da presença de células

A tubos contendo volumes conhecidos (0,4 ml; 0,6 ml e 0,8 ml) de solução de glicose (0,2 g/%) adicionou-se 0,5 ml de suspensão de levedura e tampão-acetato (pH =

4,6) suficiente para completar 3,0 ml. Após homogeneização, determinou-se a concentração de AR em cada tubo. Tratamento análogo, a menos da adição da suspensão de levedura, foi dado, em paralelo, a outros tubos (provas em branco).

2.5.5.2 Medida do consumo de ART pelas células

A tubos de ensaio adicionou-se: a) 5,0 ml de solução de sacarose, previamente submetida à hidrólise ácida (100 ml de água destilada + 10 g de sacarose + 10ml de HCl concentrado foram aquecidos em banho de água a 70°C por 15 min) com pH = 4,6 e mantida a 37°C, por 10 min; b) 1,0 ml de suspensão de levedura, também previamente mantida a 37°C por 10 min.

De tempos em tempos, sempre a 37°C, retirava-se um tubo que, após receber 2,0 ml de solução 0,010 M de NaOH, era centrifugado (1 100 xg) durante 10 min. Determinava-se a concentração do ART no sobrenadante.

2.5.6 Efeito do tipo de armazenamento da suspensão de células sobre a atividade invertásica

Tão logo a amostra foi retirada do fermentador e após as operações de lavagem foi feita a medida da atividade invertásica. A seguir foi acondicionada em erlenmeyer de 125 ml munido de rolha e guardada em geladeira. Após 24 h (tempo que corresponderia ao momento de análise da amostra conforme nosso esquema de trabalho) mediu-se novamente a atividade invertásica. O restante da suspensão foi mantida nas mesmas condições durante sete dias, quando se refez a

a medida da atividade.

Além disso, mediante o uso de microscópio bi
nocular convencional observou-se a morfologia das células
de levedura em suspensão, tão logo a amostra foi obtida e
sete dias após.

3. RESULTADOS

3.1 Curva de Calibração

Uma curva típica de calibração do espectrofotômetro para determinação da concentração de ART está indicada na tabela 3.1 e representada na figura 3.1.

O coeficiente de correlação (r) para todas as curvas de calibração utilizadas na determinação do AR e ART esteve entre 0,9990 e 0,9998.

TABELA 3.1 Calibração do espectrofotômetro ($\lambda = 540$ nm) para determinação da concentração de açúcares redutores.

Massa de glicose x (mg)	Absorbância (y)	
	Leituras	Média
0,04	0,100 - 0,100	0,100
0,08	0,195 - 0,200	0,198
0,12	0,295 - 0,295	0,295
0,16	0,390 - 0,395	0,393
0,20	0,490 - 0,495	0,493

FIGURA 3.I. Curva de calibração do espectrofotômetro para medidas das concentrações de açúcares redutores. (x= massa de glicose; y= absorbância; r= coeficiente de correlação).

3.2 Erro experimental na dosagem do ART pelo método de Somogyi

a) Resultados

Os valores obtidos encontram-se na tabela 3.2.

b) Comentários

A equação da curva de calibração utilizada é a seguinte:

$$y = 1,963x + 0,0044 \quad (r = 0,996) \quad (3.1)$$

O valor médio da concentração de glicose, desvio-padrão e coeficiente de variação são, respectivamente, 9,71 g/l, 0,26 g/l e 2,7%.

Pela aplicação do teste "t" e considerando 4 graus de liberdade e 95% de confiança, obtêm-se o intervalo para a média dos valores: $(9,71 \pm 0,36)$ g/l.

TABELA 3.2 Avaliação do erro experimental na determinação da concentração de ART

Absorbância	Concentração de glicose, c (g/l)
0,190	9,45
0,190	9,45
0,195	9,71
0,200	9,96
0,200	9,96
c = 9,71 g/l s = 0,26 g/l CV = 2,7%	

3.3 Interferência da presença de células na determinação do ART

a) Condições experimentais

Tanto a suspensão de células como os tubos contendo solução de glicose foram mantidos a 37°C por 10 minutos, antes de serem misturados

b) Resultados

Os valores obtidos encontram-se na tabela 3.3.

c) Comentários

Como o objetivo do ensaio era verificar se a presença de células causava alguma interferência, a alíquota para a dosagem era retirada imediatamente após a homogeneização da mistura das células com a solução de glicose. A rapidez teve o objetivo de eliminar qualquer perda de glicose em consequência da presença de células intactas de levedura.

A equação da curva de calibração usada nos cálculos foi:

$$y = 1,963x + 0,0044 \quad (r = 0,996) \quad (3.1)$$

TABELA 3.3 Interferência da presença de células na determinação da concentração de ART

Concentração de glicose esperada (g/l)	Concentração determinada (g/l)			
	Na ausência de cêls.		Na presença de cêls.	
	Medidas	Média	Medidas	Média
0,0270	0,0255-0,0265	0,0260	0,0260-0,0260	0,0260
0,0400	0,0420-0,0420	0,0420	0,0408-0,0412	0,0410
0,0540	0,0555-0,0565	0,0560	0,0560-0,0560	0,0560

3.4 Influência do consumo de açúcares pelas células na determinação do ART

a) Condições experimentais

A amostragem foi feita de 10 em 10 min na primeira hora e, a partir da segunda hora, de 20 em 20 min, até completar 3 h.

b) Resultados

Os valores obtidos encontram-se na tabela 3.4.

c) Comentários

O objetivo deste ensaio foi o de se avaliar algum consumo de ART por parte das células de levedura, já que elas estão intactas e viáveis. Os valores de $\bar{c}$, s e c.v. são, respectivamente 28,9 g/l, 1,18 g/l e 4,1%.

A equação da curva de calibração usada nos cálculos foi

$$y = 1,963x + 0,0044 \quad (r = 0,996) \quad (3.1)$$

TABELA 3.4 Concentração de ART da solução de sacarose hidrolisada em contato com leveduras viáveis

Tempo decorrido após adição da levedura (min)	Concentração de ART no sobrenadante, c (g/l)	
	Medidas	Média
0	27,0 - 27,2	27,1
10	26,9 - 27,3	27,1
20	29,8 - 30,4	30,1
30	29,1 - 29,1	29,1
40	29,5 - 29,7	29,6
50	30,0 - 30,2	30,1
60	29,7 - 30,5	30,1
80	29,9 - 30,3	30,1
100	28,0 - 28,2	28,1
120	28,4 - 28,8	28,6
140	27,0 - 27,2	27,1
160	28,9 - 29,3	29,1
180	28,6 - 29,6	29,1
$\bar{c} = 28,9 \text{ g/l} \quad s = 1,18 \text{ g/l} \quad CV = 4,1\%$		

3.5 Ensaio em cultivo contínuo

3.5.1 Ensaio nº 1

a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: nenhum

$$S'_0 = 29,9 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 23,7 \text{ g/l}$$

Volume final de mosto na dorna = 2,95 l

$$F = 312 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,11 \text{ h}^{-1}$$

$$\phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.5 e nas figuras 3.IIa e 3.IIb.

A equação utilizada para o cálculo do AR e ART foi:

$$y = 0,00341x + 0,015 \quad (3.II)$$

Para o cálculo do ART proveniente da atividade enzimática a equação usada foi:

$$y = 2,304x + 0,0014 \quad (r = 0,997) \quad (3.III)$$

c) Comentários

Neste ensaio as amostras foram colhidas de 3 em 3h.

Na preparação do mosto constatou-se hidrólise de sacarose como consequência da esterilização, pois, antes dela,

os valores de AR e ART eram, respectivamente, 7,6 g/l e 29,6 g/l. Isto sucedeu devido ao fato do pH do mosto ter sido ajustado em 4,0 antes da esterilização.

Da figura 3.IIb constata-se que os períodos de oscilação de v (considerando dois mínimos consecutivos) a partir do instante $t = 12$ h são: 6h, 12h; 9h; 6h e 6h, sendo o período médio de 7,8h.

O coeficiente de variação dos valores de v é 23,5% ($\bar{v} = 0,149$ gART/g cêl.min e $s = 0,035$ gART/g cêl.min).

Os dados referentes à formação de ART em função do tempo na medida a que se refere o ítem 2.5.4 relativa à amostra mais ativa obtida durante o processo contínuo, são mostrados na tabela 3.6 e na figura 3.IIb (gráfico A_1). Este procedimento será mantido doravante.

Procedeu-se ao exame microscópico das células existentes na suspensão aquosa tão logo foi preparada e após 7 dias de armazenamento em geladeira, não sendo observadas modificações morfológicas.

TABELA 3.5 Resultados obtidos no ensaio nº 1.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v (gART/g cél.min)		
				1ª	2ª	Média
-6	0,072	13,9	26,5	-	-	-
-3	0,77	19,0	23,7	0,180	-	-
* 0	1,66	16,2	17,2	0,268	0,268	0,268
3	1,95	14,5	15,8	0,221	0,221	0,221
6	2,26	13,3	14,6	0,139	0,146	0,143
9	2,50	13,0	14,6	0,114	0,114	0,114
12	2,75	12,6	14,1	0,099	0,093	0,096
15	2,74	12,2	13,1	0,114	0,104	0,109
18	2,83	11,6	12,3	0,101	0,101	0,101
21	2,95	10,8	11,6	0,112	0,112	0,112
24	3,00	10,4	11,0	0,129	0,138	0,134
27	3,07	9,5	9,9	0,164	0,154	0,159
30	3,12	9,7	10,3	0,138	0,142	0,140
33	3,14	9,6	9,7	0,142	0,151	0,146
36	3,19	8,6	9,7	0,166	0,157	0,162
39	3,33	8,4	8,6	0,155	0,160	0,158
42	3,32	7,9	8,2	0,182	0,190	0,186
45	3,38	7,8	8,7	0,178	0,187	0,183
48	3,40	7,0	7,5	0,186	0,186	0,186
51	3,46	5,4	5,8	0,179	0,183	0,181
54	3,70	2,9	3,0	0,191	0,199	0,195

* Início do cultivo contínuo

TABELA 3.6 Variação da concentração de ART pela ação de células recolhidas no instante $t = 0$ h do Ensaio nº 1 (ver Item 2.5.4) .

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas 1 ^a	2 ^a	Média
1	0,043	0,045	0,044
2	0,089	0,089	0,089
3	0,131	0,134	0,133
4	0,176	0,180	0,178
5	0,221	0,223	0,222
6	0,270	0,264	0,267

FIGURA 3.IIa. Variação, com o tempo, das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº 1.

FIGURA 3.IIb. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) no ensaio nº 1. A curva do gráfico A_1 mostra a variação da concentração de ART (c'), com o tempo, na medida a que se refere o item 2.5.4, utilizando células colhidas no instante $t = 0$ h. (Equação da curva: $c' = 0,045t - 0,002$; $r = 0,996$).

3.5.2 Ensaio nº 2a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: nenhum

$$S'_0 = 28,4 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 7,5 \text{ g/l}$$

Volume final de mosto na dorna = 3,10 l

$$\phi = 2 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

$$F (1^a \text{ etapa}) = 339 \text{ ml/h}$$

$$D (1^a \text{ etapa}) = 0,11 \text{ h}^{-1}$$

$$F (2^a \text{ etapa}) = 423 \text{ ml/h}$$

$$D (2^a \text{ etapa}) = 0,14 \text{ h}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.7 e nas figuras 3.IIIa,b. A equação usada para o cálculo do AR e ART foi:

$$y = 0,00341x + 0,015 \quad (3.II)$$

e para o cálculo do ART proveniente da atividade enzimática a equação usada foi:

$$y = 2,293x + 0,015 \quad (r = 0,997) \quad (3.IV)$$

c) Comentários

A amostragem foi feita de 3 em 3h.

Para evitar a hidrólise da sacarose durante a esterilização, acertou-se o pH do mosto em 7,0. Nestas condi-

ções, os valores de AR e ART não foram afetados pela esterilização. Este procedimento foi mantido nos ensaios seguintes.

Após 44 h de processo contínuo aumentou-se a vazão de alimentação para 423 ml/h, valor este mantido até o final do ensaio. Isto foi feito na tentativa de acelerar o estabelecimento do regime estacionário.

Para efeito de cálculos este ensaio será considerado em duas etapas. Os valores de X , AR, ART e v correspondentes a $t = 44$ h e $t = 45,5$ h foram desprezados.

Da figura 3.IIIb constata-se que os períodos de oscilação de v na 1^a etapa são: 12h; 12h e 12h, sendo o período médio de 12h. Na 2^a etapa são: 12h e 9h, sendo o período médio de 10,5h.

O coeficiente de variação de v na 1^a etapa é 14,7% ($\bar{v} = 0,163$ gART/g cél. min e $s = 0,024$ gART/g cél. min) e na 2^a etapa é 8,0% ($\bar{v} = 0,251$ gART/g cél.min e $s = 0,020$ gART/g cél.min).

A tabela 3.8 e a figura 3.IIIb (gráfico A_1) mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo (ver item 2.5.4).

TABELA 3.7 Resultados obtidos no ensaio nº 2 .

D (h ⁻¹)	t (h)	X (g/ℓ)	S (g/ℓ)	S' (g/ℓ)	v (gART/g cēl. min)		
					Medidas		Média
					1 ^a	2 ^a	
0	-6	0,58	8,5	22,4	0,609	0,584	0,596
	-3	1,23	18,1	20,9	0,200	0,189	0,195
0,11	* 0	1,95	14,2	13,0	0,261	0,245	0,253
	2	2,02	12,2	15,0	0,165	0,179	0,172
	5	2,22	12,2	14,5	0,177	0,177	0,177
	8	2,44	12,2	14,9	0,167	0,155	0,161
	11	2,81	11,5	13,7	0,150	0,150	0,150
	14	3,05	11,2	13,7	0,119	0,119	0,119
	17	3,30	10,3	12,9	0,132	0,145	0,139
	20	3,51	9,7	12,6	0,161	0,157	0,159
	23	3,72	8,9	10,6	0,164	0,156	0,160
	26	3,87	8,1	10,2	0,131	0,139	0,135
	29	4,06	8,4	10,3	0,166	0,155	0,160
	32	4,38	8,3	9,4	0,194	0,194	0,194
	35	4,46	7,6	8,9	0,180	0,185	0,183
	38	4,60	6,9	8,6	0,165	0,180	0,173
	41	4,73	6,6	7,5	0,207	0,207	0,207
0,14	44	4,89	6,1	7,4	0,218	0,218	0,218
	45,5	4,89	-	-	0,276	0,258	0,267
	47	4,93	6,5	7,4	0,229	0,229	0,229
	50	5,30	7,3	8,0	0,241	0,247	0,244
	53	5,55	6,7	8,0	0,261	0,251	0,256
	56	5,54	6,6	7,6	0,246	0,246	0,246
	59	5,67	6,5	7,0	0,222	0,238	0,230
	62	5,91	6,3	6,9	0,272	0,265	0,269
	64	5,75	6,1	7,3	0,287	0,287	0,287
	68	5,99	5,4	6,3	0,235	0,256	0,246
	71	6,23	-	-	0,291	0,277	0,284

* Início do cultivo contínuo.

TABELA 3.8 Variação da concentração de ART pela ação de células recolhidas no instante $t = 64$ h do Ensaio nº 2 (ver Ítem 2.5.4) .

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,082	0,084	0,083
2	0,162	0,168	0,165
3	0,247	0,249	0,248
4	0,329	0,333	0,331
5	0,413	0,413	0,413
6	0,495	0,497	0,496

FIGURA 3.IIIa. Variação, com o tempo, das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº 2.

FIGURA 3.III.b. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) no ensaio nº 2. A curva do gráfico A1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, utilizando células colhidas no instante $t = 64$ h (Equação da curva: $c' = 0,083t - 0,002$; $r = 0,998$).

3.5.3 Ensaio nº 3

a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: nenhum

$$S'_0 = 30,2 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 8,0 \text{ g/l}$$

Volume final de mosto na dorna = 3,04 l

$$F = 697 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,23 \text{ h}^{-1}$$

$$\phi = 2 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v acham-se na tabela 3.9 e figura 3.IV.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,00345x + 0,011 \quad (3.V)$$

e para a medida do ART proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,422x + 0,0052 \quad (r = 0,998) \quad (3.VI)$$

c) Comentários

A amostragem para a medida da atividade invertásica foi feita de 1,5 em 1,5h, enquanto que para AR, ART e X foi feita de 3 em 3h. Os valores intermediários de X foram determinados por interpolação gráfica. Tal procedimento será mantido no ensaio nº 4.

A diminuição do intervalo da amostragem teve o objetivo de tentar melhorar a observação do perfil oscilatório da função $v = f(t)$.

Da figura 3.IV constata-se que os períodos de oscilação de v são: 3h; 6h; 4,5h; 6h; 3h; 3h; 6h, sendo o período médio de 4,5h.

O coeficiente de variação de v é 51,5% ($\bar{v} = 0,066$ gART/g cêl.min; $s = 0,034$ gART/g cêl.min).

A tabela 3.10 e a figura 3.IV (gráfico A_1) mostram os dados referentes à velocidade de formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

TABELA 3.10 Variação da concentração de ART pela ação de células recolhidas no instante $t = 0$ h do ensaio nº 3 (ver Item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,054	0,054	0,054
2	0,108	0,110	0,109
3	0,161	0,165	0,163
4	0,216	0,218	0,217
5	0,269	0,275	0,272
6	0,325	0,327	0,326

TABELA 3.9 Resultados obtidos no ensaio nº 3.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cêl.min)		
				Medidas		Média
				1ª	2ª	
-6	0,52	8,6	24,9	0,586	0,573	0,580
-3	1,14	17,9	21,5	0,230	0,236	0,233
*0	1,71	15,4	16,6	0,321	0,313	0,317
1,5	1,71	-	-	0,190	0,197	0,194
3	1,74	12,9	18,2	0,173	0,189	0,181
4,5	1,85	-	-	0,133	0,140	0,137
6	1,99	12,7	18,1	0,090	0,083	0,086
7,5	2,02	-	-	0,097	0,104	0,101
9	2,04	11,4	18,0	0,054	0,054	0,054
10,5	2,15	-	-	0,083	0,083	0,083
12	2,28	10,5	18,4	0,060	0,066	0,063
13,5	2,25	-	-	0,049	0,049	0,049
15	2,20	9,6	19,5	0,042	0,042	0,042
16,5	2,17	-	-	0,051	0,051	0,051
18	2,19	9,1	18,9	0,060	0,060	0,060
19,5	2,15	-	-	0,024	0,024	0,024
21	2,06	9,3	19,6	0,038	0,043	0,041
22,5	2,07	-	-	0,045	0,045	0,045
24	2,11	8,9	20,1	0,059	0,059	0,059
25,5	2,23	-	-	0,042	0,042	0,042
27	2,33	8,8	19,5	0,062	0,058	0,060
28,5	2,43	-	-	0,051	0,051	0,051
30	2,51	9,5	19,1	0,060	0,064	0,062
31,5	2,57	-	-	0,049	0,049	0,049
33	2,54	9,5	19,0	0,053	0,061	0,057
34,5	2,55	-	-	0,063	0,063	0,063
36	2,66	9,2	18,9	0,070	0,062	0,066
37,5	2,70	-	-	0,053	0,053	0,053
39	2,96	9,4	18,1	0,073	0,077	0,075

* Início do cultivo contínuo

FIGURA 3.IV. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) e das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº 3. A curva do gráfico A_1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t=0$ h (Eq. da curva: $c' = 0,054t + 0,0002$; $r = 0,997$).

3.5.4 Ensaio nº 4

a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: nenhum

$$S'_0 = 31,2 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 7,6 \text{ g/l}$$

Volume final de mosto na dorna = 3,00 l

$$F = 679 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,23 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v acham-se na tabela 3.11 e figura 3.V.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,00345x + 0,011 \quad (3.V)$$

e para a medida do ART oriundo da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,307x + 0,013 \quad (r = 0,995) \quad (3.VII)$$

c) Comentários

Pela figura 4.5 constata-se que os períodos de oscilação de v no patamar, são: 3h; 6h; 6h; 4,5h; 4,5h; 9h e 3h, sendo o período médio de 5,1h.

O coeficiente de variação de v no patamar é 31,4% ($\bar{v} = 0,044 \text{ gART/g cēl.min}$ e $s = 0,014 \text{ gART/g cēl.min}$).

A tabela 3.12 e a figura 3.V (Gráfico A₁) mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

TABELA 3.11 Resultados obtidos no ensaio nº 4.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cēl.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
-6	0,57	9,2	25,6	0,653	0,666	0,660
-3	1,07	19,8	22,3	0,308	0,329	0,319
* 0	1,76	15,7	15,9	0,338	0,344	0,341
1,5	1,60	-	-	0,157	0,157	0,157
3	1,45	13,0	20,2	0,123	0,130	0,126
4,5	1,26	-	-	0,106	0,106	0,106
6	1,14	11,3	19,7	0,095	0,095	0,095
7,5	1,25	-	-	0,081	0,090	0,085
9	1,32	9,5	18,3	0,085	0,077	0,081
10,5	1,25	-	-	0,036	0,036	0,036
12	1,17	9,7	21,8	0,031	0,031	0,031
13,5	1,15	-	-	0,049	0,049	0,049
15	1,13	7,3	22,6	0,014	0,014	0,014
16,5	1,10	-	-	0,027	0,034	0,031
18	1,10	6,9	22,7	0,074	0,066	0,070
19,5	1,10	-	-	0,049	0,049	0,049
21	1,13	7,0	22,6	0,045	0,045	0,045
22,5	1,13	-	-	0,053	0,062	0,057
24	1,17	6,8	22,5	0,062	0,062	0,062
25,5	1,15	-	-	0,042	0,042	0,042
27	1,06	7,7	21,1	0,025	0,025	0,025
28,5	1,10	-	-	0,051	0,051	0,051
30	1,17	7,4	21,8	0,048	0,057	0,053
31,5	1,20	-	-	0,031	0,031	0,031
33	1,16	7,6	22,5	0,036	0,040	0,039
34,5	1,18	-	-	0,038	0,043	0,041
36	1,22	7,4	22,2	0,033	0,033	0,033
37,5	1,23	-	-	0,041	0,046	0,043

Continua

Continuação da Tabela 3.11

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cēl.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
39	1,18	6,5	22,5	0,045	0,045	0,045
40,5	1,16	-	-	0,046	0,046	0,046
42	1,14	7,1	22,6	0,044	0,044	0,044
43,5	1,15	-	-	0,035	0,039	0,037
45	1,17	7,2	23,1	0,031	0,031	0,031
46,5	1,18	-	-	0,043	0,043	0,043
48	1,14	7,3	23,4	0,035	0,035	0,035
49,5	1,18	-	-	0,048	0,048	0,048
51	1,20	7,0	22,5	0,060	0,060	0,060

* Início do cultivo contínuo.

TABELA 3.12 Variação da concentração de ART pela ação de células recolhidas no instante $t = 0$ h do ensaio nº 4 (ver item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,060	0,060	0,060
2	0,119	0,121	0,120
3	0,180	0,180	0,180
4	0,240	0,240	0,240
5	0,298	0,304	0,301
6	0,359	0,362	0,361

FIGURA 3.V. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) e das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº4. A curva do gráfico A_1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t=0$ h (Eq. da curva: $c'=0,061t-0,004$; $r=0,998$)

3.5.5 Ensaio nº 5

a) Condições experimentais

$$S_0' = 30,8 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 6,5 \text{ g/l}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

O ensaio foi dividido em quatro etapas:

1ª Etapa (t= 3h até t= 27h)

Nutrientes adicionados ao mosto: nenhum

$$F = 689 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$\text{Volume final de mosto na dorna} = 2,89 \text{ l}$$

2ª Etapa (t= 28,5 h até t= 51 h)

Nutrientes adicionados ao mosto: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ conforme referido
 no item 2.1.4 .

$$F = 692 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$\text{Volume final de mosto na dorna} = 2,89 \text{ l}$$

3ª Etapa (t= 52,5 h até t = 75 h)

Nutrientes adicionados ao mosto: conforme indicado na 2ª etapa

$$F = 291 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,10 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

Volume final de mosto na dorna = 2,89 l

4ª Etapa (t= 76,5 h até t= 96 h)

Nutrientes adicionados ao mosto: conforme indicado na 2ª etapa.

$$F = 268 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,10 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 2 \text{ l/l.min}$$

Volume final de mosto na dorna = 2,75 l

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.13 e figuras 3.VIa-d, 3.VII e 3.VIII.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,00340 x + 0,0092 \quad (3.VIII)$$

e para a medida do ART proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,285x + 0,0024 \quad (r= 0,998) \quad (3.IX)$$

c) Comentários

A suplementação do mosto teve início após o estabelecimento de um patamar nítido, sendo a adição de nutrientes feita por degrau a partir de t= 27 h.

Da figura 3.VII constata-se que os períodos de oscilação de v em cada etapa são:

1ª etapa: 6h; 4,5h; 6h; 3h; período médio = 4,5 h

2^a etapa: 3h; 3h; 9h; 3h; 3,5 h; período médio = 3,3 h

3^a etapa: 3h e 9h; período médio = 6 h

4^a etapa: 6h; 4,5 h; 6h; período médio = 5,3 h

Os coeficientes de variação de v em cada etapa são:

1^a Etapa: considerando os valores de v entre $t = 3h$ e $t = 27h$,
temos: $CV = 34,7\%$ ($\bar{v} = 0,077 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$ e
 $s = 0,027 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$).

2^a Etapa: a) considerando os valores de v entre $t = 28,5h$ e
 $t = 51h$, temos: $CV = 92,3\%$ ($\bar{v} = 1,19 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$ e
 $s = 1,10 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$);

b) considerando os valores de v entre $t = 40,5h$ e
 $t = 51h$, temos: $CV = 12,1\%$ ($\bar{v} = 2,24 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$
e $s = 0,27 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$).

3^a Etapa: a) considerando os valores de v entre $t = 52,5 h$ e
 $t = 75h$, temos: $CV = 64,1\%$ ($\bar{v} = 1,10 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$
e $s = 0,71 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$);

b) considerando os valores de v entre $t = 63h$ e
 $t = 75h$, temos: $CV = 20,1\%$ ($\bar{v} = 0,596 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$
e $s = 0,12 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$).

4^a Etapa: a) considerando os valores de v entre $t = 76,5h$ e
 $t = 96h$, temos: $CV = 33,1\%$ ($\bar{v} = 1,06 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$
e $s = 0,35 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$);

b) considerando os valores de v entre $t = 85,5h$ e
 $t = 96h$, temos: $CV = 18,7\%$ ($\bar{v} = 1,30 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$
e $s = 0,24 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$).

Para a 2^a, 3^a e 4^a etapas a desconsideração de alguns valores de v justifica-se pelo fato de que, ao se mudar

determinado parâmetro, as células demoram um certo tempo para se adaptarem às novas condições.

A tabela 3.14 e a figura 3.VII (ver gráfico A₁) mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

TABELA 3.14 Variação da concentração de ART pela ação de células recolhidas no instante $t = 52,5$ h do ensaio nº 5 (ver item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,147	0,149	0,148
2	0,293	0,297	0,295
3	0,446	0,440	0,443
4	0,592	0,590	0,591
5	0,737	0,741	0,739
6	0,885	0,886	0,886

TABELA 3.13 Resultados obtidos no ensaio nº 5.

Etapa	t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cêl.min)		
					Medidas		Média
					1 ^a	2 ^a	
Desc.	-6	0,67	9,0	25,4	0,722	0,733	0,727
	-3	1,25	20,5	22,5	0,400	0,383	0,392
1 ^a	* 0	1,87	15,3	15,6	0,398	0,405	0,402
	1,5	1,70	-	-	0,233	0,233	0,233
	3	1,54	13,4	17,7	0,145	0,138	0,142
	4,5	1,55	-	-	0,081	0,081	0,081
	6	1,53	11,7	20,7	0,061	0,061	0,061
	7,5	1,50	-	-	0,026	0,026	0,026
	9	1,47	10,1	22,1	0,062	0,062	0,062
	10,5	1,40	-	-	0,106	0,106	0,106
	12	1,37	7,9	21,2	0,092	0,092	0,092
	13,5	1,35	-	-	0,085	0,085	0,085
	15	1,39	7,7	21,2	0,106	0,091	0,099
	16,5	1,38	-	-	0,068	0,068	0,068
	18	1,41	8,2	21,5	0,066	0,066	0,066
	19,5	1,45	-	-	0,064	0,071	0,068
	21	1,58	7,3	18,5	0,094	0,094	0,094
	22,5	-	-	-	-	-	-
	24	1,51	7,4	20,1	0,055	0,055	0,055
	25,5	1,45	-	-	0,072	0,079	0,076
	27	1,43	7,5	20,8	0,050	0,050	0,050
2 ^a	28,5	1,55	-	-	0,067	0,067	0,067
	30	1,71	6,1	20,9	0,061	0,061	0,061
	31,5	1,90	-	-	0,095	0,095	0,095
	33	2,11	6,0	18,2	0,078	0,078	0,078
	34,5	2,40	-	-	0,088	0,088	0,088
	36	2,73	6,6	12,0	0,099	0,109	0,104
	37,5	3,20	-	-	0,212	0,212	0,212
	39	3,62	3,5	4,5	0,464	0,464	0,464
	40,5	3,90	-	-	2,57	2,57	2,57
	42	4,35	1,6	2,1	1,67	1,67	1,67

Continua

Continuação da Tabela 3.13

Etapa nº	t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cél.min)		
					Medidas		Média
					1ª	2ª	
2ª	43,5	4,60	-	-	2,20	2,20	2,20
	45	4,78	1,5	2,0	2,10	2,10	2,10
	46,5	5,00	-	-	2,50	2,40	2,45
	48	5,17	1,6	2,0	2,26	2,26	2,26
	49,5	5,30	-	-	2,26	2,26	2,26
	51	5,22	1,4	1,8	2,39	2,39	2,39
3ª	52,5	5,70	-	-	2,67	2,52	2,59
	54	6,38	1,3	1,7	2,25	2,32	2,28
	55,5	7,20	-	-	2,04	2,10	2,07
	57	8,24	1,1	1,7	1,73	1,73	1,73
	58,5	9,20	-	-	1,41	1,41	1,41
	60	10,3	1,3	1,3	1,03	1,03	1,03
	61,5	10,8	-	-	1,10	1,10	1,10
	63	11,2	1,1	1,5	0,433	0,433	0,433
	64,5	11,8	-	-	0,650	0,650	0,650
	66	11,8	0,91	1,2	0,647	0,647	0,647
	67,5	12,6	-	-	0,731	0,731	0,731
	69	13,1	0,88	1,5	0,731	0,731	0,731
	70,5	13,3	-	-	0,556	0,556	0,556
	72	13,5	0,86	1,5	0,386	0,386	0,386
	73,5	13,6	-	-	0,610	0,610	0,610
	75	13,6	0,93	1,6	0,622	0,622	0,622
4ª	76,5	14,0	-	-	0,814	0,814	0,814
	78	14,4	0,99	1,6	0,420	0,420	0,420
	79,5	14,7	-	-	0,932	0,932	0,932
	81	15,1	1,0	1,4	0,806	0,806	0,806
	82,5	15,4	-	-	0,763	0,765	0,764
	84	15,6	0,92	1,3	0,732	0,732	0,732
	85,5	15,0	-	-	1,09	1,09	1,09

Continua

Continuação da Tabela 3.13

Etapa	t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cêl.min)		
					Medidas		Média
					1 ^a	2 ^a	
4 ^a	87	14,2	0,96	1,5	1,15	1,15	1,15
	88,5	14,2	-	-	1,12	1,12	1,12
	90	14,1	1,0	1,5	1,48	1,48	1,48
	91,5	14,2	-	-	1,53	1,53	1,53
	93	14,3	1,0	1,5	1,72	1,72	1,72
	94,5	14,0	-	-	1,10	1,10	1,10
	96	13,8	1,0	1,5	1,18	1,18	1,18

* Início do cultivo contínuo

FIGURA 3.VIa. Variação, com o tempo, das concentrações de ART (S'), AR (S) e de células (X).

FIGURA 3.VIb. Perfil da variação, com o tempo, das concentrações de ART (S') e AR (S) para a 2ª etapa do ensaio nº 5 (entre os instantes $t=27h$ e $t=51h$).

FIGURA 3.VIc. Perfil da variação, com o tempo, da concentração de células (X) para a 2ª etapa do ensaio nº5.

FIGURA 3.VId. Perfil da variação, com o tempo, da concentração celular (X) para a 3ª e 4ª etapas do ensaio nº 5.

FIGURA 3.VII. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) no ensaio nº5. A curva do gráfico A1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t=52,5h$ (Eq.da curva: $c'=0,15t-0,002$; $r=0,998$).

FIGURA 3.VIII. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) no ensaio nº 5 entre os instantes $t=3h$ e $t=36h$.

3.5.6 Ensaio nº 6a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ conforme ítem 2.1.4.

$$S'_0 = 30,7 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 6,6 \text{ g/l}$$

O ensaio foi dividido em duas etapas:

1ª etapa (t= 0 h até t= 45 h)

$$F = 711 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,23 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

Volume final de mosto na dorna = 3,10 l

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

2ª etapa (t= 46,5 h até t= 72 h)

$$F = 704 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 2 \text{ l/l.min}$$

Volume final de mosto na dorna = 2,94 l

$$N = 700 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.15 e nas figuras 3.IXa-b.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,00340x + 0,0092 \quad (3.VIII)$$

e para a medida do ART proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,315x + 0,0088 \quad (r = 0,9994) \quad (3.X)$$

c) Comentários

Da figura 3.IXb constata-se que os períodos de oscilação de v no patamar são:

1^a etapa: 4,5h; 3h; 3h; 3h; 5h; 3h; 5h; 3h; 6h e 4,5 h;
período médio = 4,4 h.

2^a etapa: 12h e 10,5 h período médio = 11,3 h

O coeficiente de variação de v é:

1^a etapa: 51,7% ($\bar{v} = 0,658 \text{ gART/g cēl.min}$ e
 $s = 0,34 \text{ gART/g cēl.min}$).

2^a etapa: 26,9% ($\bar{v} = 0,633 \text{ gART/g cēl.min}$ e
 $s = 0,17 \text{ gART/g cēl.min}$).

A tabela 3.16 e a figura 3.IXb (gráfico A₁) mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

TABELA 3.15. Resultados obtidos no ensaio nº 6.

Etapa	t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cēl.min)		
					Medidas		Média
					1 ^a	2 ^a	
Desc.	-6	0,84	8,3	23,4	0,619	0,602	0,611
	-3	1,94	15,6	16,2	0,238	0,231	0,235
1 ^a	* 0	3,90	0,93	1,4	0,440	0,440	0,440
	1,5	4,25	-	-	0,856	0,856	0,856
	3	4,28	1,3	2,0	1,13	1,13	1,13
	4,5	4,60	-	-	0,928	0,928	0,928
	6	4,67	1,6	2,1	1,38	1,31	1,34
	7,5	4,60	-	-	1,30	1,27	1,29
	9	4,47	2,0	2,5	1,20	1,20	1,20
	10,5	4,35	-	-	1,32	1,40	1,36
	12	4,33	2,3	2,7	0,929	0,954	0,941
	13,5	4,30	-	-	0,985	1,04	1,01
	15	4,15	2,7	3,2	0,735	0,735	0,735
	16,5	4,00	-	-	0,816	0,816	0,816
	18	3,99	3,1	3,7	0,666	0,612	0,639
	19,5	3,90	-	-	0,723	0,709	0,716
	21	3,90	3,2	4,4	0,543	0,516	0,529
	22,5	3,90	-	-	0,516	0,516	0,516
	24	3,87	3,3	4,2	0,506	0,478	0,492
	25,5	3,85	-	-	0,508	0,508	0,508
	27	3,90	3,8	4,4	0,391	0,377	0,384
	28,5	3,80	-	-	0,401	0,401	0,401
	30	3,76	4,0	4,3	0,348	0,334	0,341
	31,5	3,80	-	-	0,359	0,344	0,352
	33	3,74	4,0	4,7	0,350	0,350	0,350
	34,5	3,78	-	-	0,346	0,346	0,346
	36	3,74	3,9	4,6	0,307	0,321	0,314
	37,5	3,70	-	-	0,372	0,372	0,372
	39	3,66	3,7	4,8	0,366	0,376	0,371
	40,5	3,70	-	-	0,343	0,343	0,343
	42	3,57	4,1	4,9	0,345	0,355	0,350

Continua

Continuação da Tabela 3.15

Etapa	t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cêl.min)		
					Medidas		Média
					1 ^a	2 ^a	
1 ^a	43,5	3,55	-	-	0,378	0,378	0,378
	45,0	3,29	4,2	5,1	0,418	0,429	0,424
2 ^a	46,5	3,40	-	-	0,341	0,352	0,347
	48	3,69	4,1	4,8	0,363	0,383	0,373
	49,5	3,80	-	-	0,401	0,430	0,415
	51	3,96	3,2	3,6	0,535	0,535	0,535
	52,5	4,00	-	-	0,624	0,624	0,624
	54	4,07	2,5	2,5	0,627	0,627	0,627
	55,5	4,10	-	-	0,635	0,622	0,629
	57	4,13	2,7	3,4	0,555	0,529	0,542
	58,5	4,15	-	-	0,501	0,553	0,527
	60	4,20	2,5	3,2	0,597	0,649	0,623
	61,5	4,30	-	-	0,659	0,659	0,659
	63	4,31	2,6	3,0	0,708	0,733	0,720
	64,5	4,30	-	-	0,734	0,759	0,747
	66	4,25	2,4	2,9	0,997	0,946	0,972
	67,5	4,30	-	-	0,935	0,935	0,935
	69	4,41	2,4	3,0	0,618	0,618	0,618
	70,5	4,30	-	-	0,810	0,835	0,822
	72	4,31	2,6	3,1	0,682	0,682	0,682

* Início do cultivo contínuo.

TABELA 3.16 Variação da concentração de ART pela ação de células recolhidas no instante $t = 10,5h$ do ensaio nº 6 (ver item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,235	0,237	0,236
2	0,470	0,476	0,473
3	0,707	0,711	0,709
4	0,946	0,946	0,946
5	1,16	1,20	1,18
6	1,40	1,44	1,42

FIGURA 3.IXa. Variação, com o tempo, das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº 6.

FIGURA 3.IXb. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) no ensaio, nº 6. A curva do gráfico A_1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t = 10,5$ h. (Eq. da curva: $c' = 0,24t - 0,004$; $r = 0,9998$).

3.5.7 Ensaio nº 7

a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conforme referido no
 item 2.1.4.

$$S'_0 = 30,3 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 6,6 \text{ g/l}$$

$$F = 725 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,23 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 2 \text{ l/l.min}$$

$$\text{Volume final de mosto na dorna} = 3,10 \text{ l}$$

$$N = 700 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.17 e na figura 3.X.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,0036x - 0,0037 \quad (3.XI)$$

e para a medida do ART proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,226x + 0,015 \quad (r = 0,998) \quad (3.XII)$$

c) Comentários

Da figura 3.X constata-se que os períodos de oscilação de v entre os instantes $t = 15\text{h}$ e $t = 57\text{h}$, são: 3h; 4h; 5,5h; 3h; 4,5h; 3h; 6h; 6h; 3h, sendo o período médio de 4,2h.

O coeficiente de variação de v entre $t = 15h$ e $t = 57h$ é 15,6% ($\bar{v} = 0,161$ gART/g cêl.min; $s = 0,025$ gART/g cêl.min.)

A tabela 3.18 e a figura 3.X (gráfico A₁) mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

Com o intuito de verificar melhor o perfil da oscilação de v , foram feitas amostragens de meia em meia hora entre os instantes $t = 48h$ e $t = 51h$.

TABELA 3.18 Variação da concentração de ART pela ação de células recolhidas no instante $t = 3h$ do ensaio nº 7 (ver item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,076	0,076	0,076
2	0,151	0,154	0,153
3	0,228	0,230	0,229
4	0,303	0,307	0,305
5	0,381	0,383	0,382
6	0,458	0,458	0,458

TABELA 3.17 Resultados obtidos no ensaio nº 7.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cêl. min)		
				Medidas		Média
				1ª	2ª	
-6	1,02	5,8	23,4	0,782	0,782	0,782
-3	1,36	14,5	21,4	0,314	0,314	0,314
*0	3,87	3,9	4,4	0,193	0,184	0,188
1,5	4,20	-	-	0,383	0,410	0,397
3	4,30	2,8	3,8	0,444	0,444	0,444
4,5	4,25	-	-	0,436	0,436	0,436
6	4,24	3,2	3,7	0,383	0,410	0,397
7,5	4,20	-	-	0,294	0,321	0,307
9	4,11	3,9	4,8	0,259	0,287	0,273
10,5	4,00	-	-	0,210	0,210	0,210
12	4,00	5,1	5,9	0,234	0,224	0,229
13,5	3,80	-	-	0,217	0,217	0,217
15	3,78	5,1	6,6	0,238	0,238	0,238
16,5	3,70	-	-	0,202	0,182	0,192
18	3,73	5,7	6,2	0,191	0,191	0,191
19,5	3,70	-	-	0,222	0,212	0,217
21	3,73	5,0	6,4	0,201	0,191	0,196
22,5	3,70	-	-	0,162	0,152	0,157
24	3,76	5,2	6,5	0,179	0,169	0,174
25,5	3,70	-	-	0,141	0,141	0,141
27	3,66	6,2	6,5	0,174	0,184	0,179
28,5	3,70	-	-	0,182	0,172	0,177
30	3,10	4,3	5,3	0,152	0,152	0,152
31,5	3,70	-	-	0,162	0,162	0,162
33	3,67	4,8	7,3	0,132	0,122	0,127
34,5	3,70	-	-	0,141	0,152	0,147
36	3,64	5,1	6,6	0,144	0,144	0,144
37,5	3,70	-	-	0,121	0,121	0,121
39	3,71	5,0	7,0	0,121	0,121	0,121
40,5	3,70	-	-	0,121	0,121	0,121

Continua

Continuação da Tabela 3.17

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cēl. min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
42	3,71	5,1	6,5	0,171	0,161	0,166
43,5	3,70	-	-	0,162	0,152	0,157
45	3,70	5,0	6,5	0,152	0,152	0,152
46,5	3,70	-	-	0,152	0,162	0,157
48	3,72	4,9	6,3	0,141	0,141	0,141
48,5	3,70	-	-	0,192	0,182	0,187
49	3,70	-	-	0,152	0,141	0,147
49,5	3,70	-	-	0,162	0,162	0,162
50	3,70	-	-	0,167	0,167	0,167
50,5	3,70	-	-	0,131	0,141	0,136
51	3,65	5,1	6,4	0,133	0,143	0,138
52,5	3,70	-	-	0,141	0,141	0,141
54	3,73	4,9	6,5	0,170	0,180	0,175
55,5	3,70	-	-	0,177	0,177	0,177
57	3,69	5,0	6,6	0,172	0,162	0,167

* Início do cultivo contínuo.

FIGURA 3.X. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v), e das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº 7. A curva do gráfico A_1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t = 3$ h (Eq.da curva: $c' = 0,077t - 0,003$; $r = 0,9995$).

3.5.8 Ensaio nº 8a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: nenhum

$$S'_0 = 30,8 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 6,3 \text{ g/l}$$

$$F = 737 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 0 \text{ (sem borbulhamento de ar)}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 3,10 \text{ l}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.19 e na figura 3.XI.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,0036x + 0,015 \quad (3.XIII)$$

e para a medida do ART proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,407x + 0,0071 \quad (r = 0,9998) \quad (3.XIV)$$

c) Comentários

Da figura 3.XI constata-se que os períodos de oscilação de v entre os instantes $t = 3\text{h}$ e $t = 45\text{h}$, são: 6h; 12h; 4,5h; 3h; 7,5h; 4h, sendo o período médio de 6,1 h.

O coeficiente de variação de v entre $t = 3\text{h}$ e $t = 45\text{h}$ é 18% ($\bar{v} = 0,081 \text{ gART/g cēl.min}$; $s = 0,015 \text{ g ART/g cēl.min}$).

A tabela 3.20 e a figura 3.XI (Gráfico A₁) mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

Com o intuito de verificar melhor o perfil da oscilação de v foram feitas amostragens de meia em meia hora entre os instantes $t = 42h$ e $t = 45h$.

TABELA 3.20 Variação da concentração de ART pela ação de células colhidas no instante $t = 0h$ do ensaio nº 8 (ver item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,025	0,025	0,025
2	0,059	0,061	0,060
3	0,090	0,090	0,090
4	0,118	0,122	0,120
5	0,149	0,151	0,150
6	0,175	0,175	0,175

TABELA 3.19 Resultados obtidos no ensaio nº 8.

t (h)	X (g/ℓ)	S (g/ℓ)	S' (g/ℓ)	v(gART/g cēl. min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
-6	0,58	7,0	23,1	0,508	0,508	0,508
-3	1,03	17,6	20,6	0,232	0,225	0,229
* 0	1,48	13,2	12,1	0,193	0,212	0,202
1,5	1,35	-	-	0,160	0,160	0,160
3	1,30	7,2	14,3	0,144	0,134	0,139
4,5	1,25	-	-	0,095	0,095	0,095
6	1,31	4,8	12,7	0,076	0,068	0,072
7,5	1,25	-	-	0,079	0,071	0,075
9	1,22	4,7	15,1	0,077	0,077	0,077
10,5	1,25	-	-	0,075	0,075	0,075
12	1,30	5,2	15,7	0,061	0,061	0,061
13,5	1,25	-	-	0,070	0,070	0,070
15	1,25	4,8	16,4	0,075	0,075	0,075
16,5	1,25	-	-	0,075	0,080	0,078
18	1,22	5,2	15,2	0,094	0,083	0,088
19,5	1,25	-	-	0,092	0,092	0,092
21	1,22	4,8	15,5	0,091	0,091	0,091
22,5	1,25	-	-	0,081	0,086	0,083
24	1,21	5,3	14,8	0,055	0,055	0,055
25,5	1,25	-	-	0,097	0,108	0,103
27	1,21	4,8	16,6	0,069	0,069	0,069
28,5	1,25	-	-	0,061	0,061	0,061
30	1,24	6,4	15,1	0,098	0,098	0,098
31,5	1,25	-	-	0,058	0,058	0,058
33	1,27	4,3	14,7	0,077	0,077	0,077
34,5	1,25	-	-	0,108	0,103	0,105
36	1,22	4,4	15,3	0,100	0,100	0,100
37,5	1,25	-	-	0,086	0,086	0,086
39	1,24	4,2	15,6	0,059	0,070	0,064
40,5	1,25	-	-	0,070	0,064	0,067

Continua

Continuação da Tabela 3.19

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cél.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
42	1,23	5,9	15,5	0,108	0,108	0,108
42,5	1,25	-	-	0,092	0,092	0,092
43	1,25	-	-	0,081	0,070	0,075
43,5	1,25	-	-	0,086	0,086	0,086
44	1,25	-	-	0,081	0,075	0,078
44,5	1,25	-	-	0,075	0,075	0,075
45	1,24	4,0	15,1	0,104	0,104	0,104

* Início do cultivo contínuo.

FIGURA 3.XI. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) e das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº8. A curva do gráfico A1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t = 0$ h (Eq.da curva: $c' = 0,03t - 0,002$; $r = 0,998$).

3.5.9 Ensaio nº 9

a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: foram adicionados nutrientes conforme referido no item 2.1.4.

$$S'_0 = 28,4 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 6,1 \text{ g/l}$$

$$\phi = 0 \text{ (sem borbulhamento de ar)}$$

$$F = 770 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,26 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Volume final de mosto na dorna} = 3,0 \text{ l}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.21 e figura 3.XII.

Para o cálculo do AR e ART usou-se a equação:

$$y = 0,0036x + 0,015 \quad (3.XIII)$$

e para a medida do ART proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,378x + 0,013 \quad (r = 0,997) \quad (3.XV)$$

c) Comentários

Da figura 3.XII nota-se que os períodos de oscilação de v entre os instantes $t = 9\text{h}$ e $t = 51\text{h}$, são: 6h; 7h; 3,5h; 7,5h; 3h; 3h; 3h; 4,5h; 3,5h, sendo o período médio de 4,6 h.

O coeficiente de variação de v entre $t = 9h$ e $t = 51h$ é 26,8% ($\bar{v} = 0,099$ gART/g cél.min e $s = 0,027$ gART/g cél.min.).

A tabela 3.22 e a figura 3.XII (Gráfico A₁) mostram os dados referentes à velocidade de formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

Com o intuito de evidenciar melhor o perfil da oscilação de v foram feitas amostragens de meia em meia hora entre os instantes $t = 48h$ e $t = 51h$.

TABELA 3.22 Variação da concentração de ART pela ação de células colhidas no instante $t = 1,5h$ do ensaio nº 9 (ver item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,107	0,107	0,107
2	0,213	0,215	0,214
3	0,319	0,323	0,321
4	0,427	0,429	0,428
5	0,533	0,537	0,535
6	0,640	0,644	0,642

TABELA 3.21 Resultados obtidos no ensaio nº 9.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cēl.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
-6	0,7	7,6	22,5	0,422	0,432	0,427
-3	1,4	13,6	17,3	0,177	0,177	0,177
* 0	2,34	2,5	2,3	0,332	0,332	0,332
1,5	2,15	-	-	0,497	0,497	0,497
3	2,13	3,7	4,6	0,351	0,344	0,347
4,5	1,85	-	-	0,268	0,252	0,260
6	1,85	4,3	7,4	0,222	0,215	0,218
7,5	1,70	-	-	0,118	0,118	0,118
9	1,71	3,8	8,9	0,117	0,126	0,122
10,5	1,60	-	-	0,108	0,108	0,108
12	1,67	3,9	9,6	0,087	0,095	0,091
13,5	1,60	-	-	0,053	0,061	0,057
15	1,63	3,2	11,3	0,115	0,123	0,119
16,5	1,60	-	-	0,134	0,134	0,134
18	1,63	4,3	10,5	0,124	0,124	0,124
19,5	1,60	-	-	0,091	0,099	0,095
21	1,62	3,6	10,9	0,098	0,090	0,094
22,5	1,60	-	-	0,113	0,113	0,113
24	1,63	3,8	10,7	0,046	0,046	0,046
25,5	1,60	-	-	0,056	0,056	0,056
27	1,68	3,4	11,1	0,103	0,111	0,107
28,5	1,60	-	-	0,152	0,152	0,152
30	1,59	3,4	10,8	0,126	0,126	0,126
31,5	1,60	-	-	0,051	0,051	0,051
33	1,54	3,3	10,9	0,085	0,094	0,090
34,5	1,60	-	-	0,064	0,064	0,064
36	1,51	3,3	11,0	0,105	0,096	0,101
37,5	1,60	-	-	0,091	0,091	0,091
39	1,51	3,0	9,9	0,096	0,096	0,096

Continua

Continuação da Tabela 3.21

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cēl.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
40,5	1,60	-	-	0,082	0,082	0,082
43,5	1,56	3,7	11,0	0,129	0,129	0,129
45	1,63	3,7	11,1	0,115	0,115	0,115
46,5	1,60	-	-	0,117	0,117	0,117
48	1,63	3,7	11,0	0,072	0,080	0,076
48,5	1,60	-	-	0,064	0,064	0,064
49	1,60	-	-	0,082	0,091	0,086
49,5	1,60	-	-	0,091	0,091	0,091
50	1,60	-	-	0,126	0,108	0,117
50,5	1,60	-	-	0,117	0,108	0,113
51	1,58	3,0	11,1	0,137	0,137	0,137

* Início do cultivo contínuo.

FIGURA 3.XII. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) e das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº9. A curva do gráfico A1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t=1,5$ h (Eq. da curva: $c'=0,108t-0,003$; $r=0,9995$).

3.5.10 Ensaio do Inóculo

a) Condições experimentais

Conforme descrito no ítem 3.2. Outrossim, deve ser mencionado que o inóculo foi preparado com meio não suplementado e com meio acrescido dos seguintes nutrientes:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,4 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075 g/l e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,1 g/l.

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X e v encontram-se na tabela 3.23.

Para a medida do ART, proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,407x + 0,0071 \quad (r = 0,9998) \quad (3.XIV)$$

c) Comentários

Neste ensaio foram utilizados 10 frascos de 1 l, dos quais retiraram-se amostras de 10 ml para a medida da concentração celular e da atividade invertásica. O tempo total de processo foi de 22 h.

O objetivo deste ensaio foi o de se ter uma idéia de como o inóculo se encontrava ao ser introduzido na dorna.

TABELA 3.23 Resultados referentes ao ensaio do inóculo.

Mosto com Nutrientes		Mosto sem Nutrientes	
X (g/l)	$\bar{v}$ (gART/g cél.min)	X (g/l)	$\bar{v}$ (gART/g cél.min)
4,35	0,437	3,26	0,383
4,28	0,438	3,32	0,402
4,18	0,467	3,28	0,381
4,22	0,456	3,20	0,390
4,30	0,460	3,23	0,381
$\bar{X} = 4,27$ (g/l) $\bar{v} = 0,452$ (gART/g cél.min) $s = 0,067$ (g/l) $s = 0,014$ (gART/g cél.min) $CV = 1,6\%$ $CV = 3,1\%$		$\bar{x} = 3,26$ (g/l) $\bar{v} = 0,387$ (gART/g cél.min) $s = 0,046$ (g/l) $s = 0,009$ (gART/g cél.min) $CV = 1,4\%$ $CV = 2,3\%$	

3.5.11 Ensaio nº 10a) Condições experimentais

$$S'_0 = 31,5 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 6,6 \text{ g/l}$$

$$F = 713 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,23 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Volume final de mosto na dorna} = 3,10 \text{ l}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.24 e figuras 3.XIIIa-b.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,0036x + 0,015 \quad (3.XIII)$$

e para a medida do ART, proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,382x + 0,027 \quad (r = 0,998) \quad (3.XVI)$$

c) Comentários

O processo contínuo entre os instantes $t = 0\text{h}$ e $t = 19\text{h}$ foi executado com mosto não suplementado, sendo as condições de ensaio muito próximas daquelas do ensaio nº 4. Após o instante $t = 19\text{h}$ foram adicionados, de uma só vez à dorna (perturbação por impulso), os sais: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,4 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075 g/l e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,1 g/l. A operação foi

repetida mais três vezes a intervalos de 12 h. Este ensaio, para efeito de análise, será subdividido em 5 etapas (considerando apenas o processo contínuo) a saber:

1ª etapa ($t = 0h$ até $t = 19h$): o coeficiente de variação de $\underline{v}$ é 63,2% ($\bar{v} = 0,038$ gART/g cēl.min; $s = 0,024$ gART/g cēl.min), sendo os períodos de oscilação de v iguais a: 4,5h; 4h; 6h (período médio = 4,8h).

2ª etapa ($t = 19h$ até $t = 31h$): o coeficiente de variação de v é 44,7% ($\bar{v} = 0,038$ gART/g cēl.min e $s = 0,017$ gART/g cēl.min).

3ª etapa ($t = 31h$ até $t = 43h$): o coeficiente de variação de v é 51,1% ($\bar{v} = 0,045$ gART/g cēl.min e $s = 0,023$ gART/g cēl.min).

4ª etapa ($t = 43h$ até $t = 55h$): o coeficiente de variação de v é 36,3% ($\bar{v} = 0,055$ gART/g cēl.min e $s = 0,021$ gART/g cēl.min).

5ª etapa ($t = 55h$ até $t = 66h$): o coeficiente de variação de v é 51,5% ($\bar{v} = 0,036$ gART/g cēl.min e $s = 0,020$ gART/g cēl.min).

Ressalte-se, outrossim, que cada impulso foi efetuado 3 min após ter sido retirada a última amostra de cada etapa.

Considerando o tempo global de fermentação contínua, obtêm-se os seguintes períodos de oscilação de v : 4,5h; 4h; 6h; 5h; 6h; 3h; 5,5h; 9h; 3h; 4,5h; 4,5h; 3h; 3h, sendo o período médio de 4,7 h.

A tabela 3.25 e a figura 3.XIIIb (Gráfico A₁) mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

TABELA 3.25 Variação da concentração de ART pela ação de células colhidas no instante $t = 0$ h do ensaio nº 10 (ver item 2.5.4).

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,035	0,035	0,035
2	0,067	0,067	0,067
3	0,099	0,102	0,101
4	0,135	0,135	0,135
5	0,169	0,167	0,168
6	0,206	0,204	0,205

TABELA 3.24. Resultados obtidos no ensaio nº 10.

Etapa	t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cél.min)		
					Medidas		Média
					1 ^a	2 ^a	
Desc.	-6	0,60	6,1	25,4	0,511	0,523	0,517
	-3	1,07	17,7	22,5	0,232	0,225	0,229
1 ^a	*0	1,63	15,0	15,5	0,210	0,202	0,206
	1,5	1,45	-	-	0,063	0,072	0,068
	3	1,34	11,8	19,7	0,078	0,078	0,078
	4,5	1,27	-	-	0,083	0,083	0,083
	6	1,33	9,1	20,8	0,027	0,027	0,027
	7,5	1,27	-	-	0,037	0,037	0,037
	9	1,27	7,7	21,5	0,014	0,014	0,014
	10,5	1,27	-	-	0,014	0,014	0,014
	12	1,22	6,8	21,9	0,026	0,026	0,026
	13,5	1,27	-	-	0,047	0,047	0,047
	15	1,24	6,2	21,7	0,020	0,020	0,020
	16,5	1,27	-	-	0,022	0,022	0,022
	19	1,29	7,6	21,8	0,057	0,052	0,054
2 ^a	21	1,32	6,0	21,4	0,016	0,016	0,016
	22,5	1,35	-	-	0,023	0,023	0,023
	24	1,39	5,9	20,3	0,058	0,058	0,058
	25,5	1,50	-	-	0,051	0,070	0,061
	27	1,70	5,9	18,8	0,037	0,037	0,037
	28,5	1,80	-	-	0,043	0,043	0,043
	30	1,82	6,2	16,9	0,019	0,019	0,019
3 ^a	31,5	1,80	6,9	17,3	0,043	0,050	0,047
	33	1,85	7,0	16,5	0,034	0,041	0,038
	34,5	1,80	-	-	0,020	0,020	0,020
	36	1,82	6,2	17,1	0,019	0,019	0,019
	39	1,96	4,7	16,6	0,039	0,039	0,039
	40,5	2,00	-	-	0,053	0,053	0,053
	42	2,04	7,5	14,9	0,065	0,072	0,069

Continua

Continuação da Tabela 3.24

Etapa	t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cél.min)		
					Medidas		Média
					1 ^a	2 ^a	
4 ^a	43,5	2,10	-	-	0,083	0,070	0,077
	45	2,17	5,7	13,9	0,016	0,016	0,016
	46,5	2,20	-	-	0,054	0,054	0,054
	48	2,21	5,8	14,2	0,054	0,048	0,051
	49,5	2,20	-	-	0,079	0,073	0,076
	51	2,23	5,4	11,8	0,053	0,059	0,057
	52,5	2,20	-	-	0,041	0,041	0,041
	54	2,11	6,9	13,6	0,083	0,083	0,083
5 ^a	55,5	2,00	-	-	0,060	0,060	0,060
	57	1,90	7,3	15,9	0,019	0,019	0,019
	58,5	1,85	-	-	0,034	0,034	0,034
	60	1,85	7,3	16,8	0,019	0,019	0,019
	61,5	1,90	-	-	0,041	0,041	0,041
	63	2,02	4,7	15,4	0,017	0,017	0,017
	64,5	2,10	-	-	0,054	0,059	0,057
	66	2,20	6,4	13,4	0,067	0,067	0,067

* Início do cultivo contínuo

FIGURA 3.XIIIa. Variação, com o tempo, das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº 10. As setas indicam os momentos em que foram realizadas as perturbações por impulso.

FIGURA 3.XIIIb. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) no ensaio nº10. A curva do gráfico A1 mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t = 0h$ (Eq. da curva: $c' = 0,034t - 0,0008$; $r = 0,9998$). As setas indicam os momentos em que foram realizadas as perturbações por impulso.

3.5.12 Ensaio nº 11a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
 2,4 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075 g/l e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 5,1 g/l.

$$S'_0 = 29,5 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 5,7 \text{ g/l}$$

$$F = 729 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 2 \text{ l/l.min}$$

Volume final de mosto na dorna = 3,10 l

$$N = 700 \text{ min}^{-1}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se nas tabelas 3.26 e 3.27 e nas figuras 3.XIV, 3.XV e 3.XVI.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,0036x + 0,015 \quad (3.XIII)$$

e para a medida do ART, proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,248x + 0,039 \quad (r = 0,9994) \quad (3.XVII)$$

c) Comentários

Da figura 3.XV constata-se que os períodos de oscilação de v entre os instantes $t = 15\text{h}$ e $t = 60\text{h}$, são: 3h; 6h;

7h; 8h; 6h; 9h, sendo o período médio de 6,5 h.

O coeficiente de variação de v entre os instantes $t = 15h$ e $t = 60h$ é 36,7% ($\bar{v} = 0,148$ gART/g cêl.min e $s = 0,054$ gART/g cêl.min).

Entre os instantes $t = 48h$ e $t = 51h$ de processo contínuo foram feitas amostragens de 10 em 10 min, conforme descrito em 2.4.2. O objetivo disto foi acompanhar o valor da atividade invertásica em intervalos de tempo menores. O intervalo utilizado correspondeu ao menor tempo possível entre a retirada e a lavagem de duas amostras consecutivas nas nossas condições de trabalho. Ressalte-se, outrossim, que os valores de v determinados neste caso não podem ser comparados aos demais valores de v do ensaio, pois para a sua determinação foi utilizada a massa de células úmidas.

A partir do instante $t = 75h$ suspendeu-se a alimentação de mosto à dorna, deixando-se em regime descontínuo até o final do ensaio. O objetivo desta última etapa foi verificar se, após longo período de processo contínuo, as condições iniciais, tanto de concentração de células quanto de atividade invertásica, seriam restabelecidas.

Neste ensaio as amostragens foram feitas de 3 em 3 h. Contudo, durante dois períodos não consecutivos de 9h de duração ($t = 18h$ à $t = 27h$ e $t = 66h$ à $t = 75h$) foram colhidas amostras de 1,5 em 1,5h com o objetivo de obter dados do perfil da oscilação de v comparáveis aos de outros ensaios.

O gráfico 3.XVIA mostra o perfil da oscilação de v para amostras colhidas de 10 em 10 min. O gráfico 3.XVIB e a tabela 3.28 mostram os dados referentes à formação de ART

em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida entre os instantes $t = 48h$ e $t = 51h$.

O gráfico 3.XVIC e a tabela 3.29 mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo contínuo.

TABELA 3.26 Resultados obtidos no ensaio nº 11.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(g/ART/g cēl.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
-6	1,02	6,8	22,7	0,284	0,274	0,279
-3	1,72	15,2	17,1	0,175	0,182	0,179
*0	3,84	2,5	2,9	0,366	0,377	0,372
3	4,46	1,6	2,0	1,02	1,02	1,02
6	4,23	2,5	2,7	0,791	0,791	0,791
9	3,94	3,8	4,4	0,497	0,511	0,504
12	3,69	4,5	4,7	0,283	0,283	0,283
15	3,59	3,8	4,6	0,219	0,219	0,219
18	3,46	4,6	5,3	0,216	0,227	0,222
19,5	3,40	-	-	0,231	0,220	0,226
21	3,51	4,5	5,0	0,150	0,150	0,150
22,5	3,40	-	-	0,166	0,155	0,160
24	3,37	4,1	5,6	0,145	0,134	0,140
25,5	3,40	-	-	0,187	0,198	0,193
27	3,32	4,2	6,0	0,228	0,228	0,228
30	3,35	4,5	6,6	0,102	0,091	0,096
33	3,67	4,5	6,7	0,164	0,153	0,159
36	3,34	4,6	6,4	0,113	0,124	0,119
39	2,95	4,5	6,4	0,128	0,128	0,128
42	3,17	5,1	6,1	0,179	0,179	0,179
43,5	3,40	-	-	0,141	0,133	0,137
45	3,47	4,1	6,2	0,120	0,130	0,125
47	3,47	4,8	6,2	0,130	0,130	0,130
51	3,40	4,0	5,8	0,122	0,111	0,117
54	3,50	4,4	6,9	0,150	0,150	0,150
57	3,17	4,9	7,1	0,055	0,055	0,055
60	3,26	4,7	7,5	0,025	0,025	0,025
63	3,03	4,3	7,0	0,027	0,027	0,027

Continua

Continuação da Tabela 3.26

t (h)	X (g/ℓ)	S (g/ℓ)	S' (g/ℓ)	v(gART/g cêl.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
66	2,98	5,0	6,6	0,102	0,102	0,102
67,5	3,00	-	-	0,126	0,126	0,126
69	2,96	4,9	6,6	0,078	0,090	0,084
70,5	2,95	-	-	0,128	0,116	0,122
72	2,81	4,9	8,3	0,108	0,108	0,108
73,5	2,65	-	-	0,059	0,072	0,066
75	2,52	6,8	9,7	0,076	0,076	0,076
78	3,77	0,9	1,4	0,759	0,759	0,759
81	4,38	0,9	1,3	0,746	0,746	0,746

* Início do cultivo contínuo

TABELA 3.27 Atividade invertásica de amostras obtidas a intervalos de 10 min, durante o ensaio nº11.

t (min)	m' (g)	v(gART/g cēl.min)		
		Medidas		Média
		1 ^a	2 ^a	
* 0	0,25	0,032	0,032	0,032
10	0,23	0,027	0,027	0,027
20	0,23	0,032	0,030	0,031
30	0,19	0,044	0,042	0,043
40	0,24	0,030	0,029	0,030
50	0,20	0,031	0,031	0,031
60	0,24	0,030	0,030	0,030
70	0,20	0,029	0,031	0,030
80	0,20	0,034	0,034	0,034
90	0,24	0,031	0,029	0,030
100	0,21	0,043	0,041	0,042
110	0,20	0,040	0,040	0,040
120	0,21	0,034	0,032	0,033
130	0,21	0,033	0,033	0,033
140	0,20	0,044	0,044	0,044
150	0,24	0,031	0,031	0,031
160	0,20	0,047	0,047	0,047
170	0,23	0,036	0,036	0,036

m' = massa de células úmidas

* = instante correspondente a t= 48h de cultivo contínuo

TABELA 3.28 Variação da concentração de ART pela ação de células colhidas no instante $t = 51$ h do ensaio nº 11 (ver itens 2.5.4 e 2.4.2)

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,024	0,024	0,024
2	0,047	0,047	0,047
3	0,070	0,072	0,071
4	0,094	0,094	0,094
5	0,117	0,119	0,118
6	0,139	0,143	0,141

TABELA 3.29 Variação da concentração de ART pela ação de células colhidas no instante $t = 3$ h do ensaio nº 11 (ver item 2.5.4)

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas		Média
	1 ^a	2 ^a	
1	0,182	0,184	0,183
2	0,368	0,364	0,366
3	0,552	0,544	0,548
4	0,731	0,731	0,731
5	0,910	0,918	0,914
6	1,09	1,11	1,10

FIGURA 3.XIV. Variação, com o tempo, das concentrações de ART (S), de AR (S'), de células (X) no ensaio nº 11. A seta indica o momento em que se interrompeu a alimentação de mosto à dorna.

FIGURA 3.XV. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) no ensaio nº11. A seta indica o momento em que se interrompeu a alimentação de mosto à dorna.

FIGURA 3.XVI. O gráfico A mostra o perfil da oscilação de v para as amostras colhidas de 10 em 10 min entre os instantes $t = 48h$ e $t = 51h$. O gráfico B mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo usando células colhidas no instante $t = 51h$, sendo a amostragem feita de 10 em 10 min (Eq.da curva: $c' = 0,024t + 0,0003$; $r = 0,998$). O gráfico C mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo usando células colhidas no instante $t = 3h$ (Eq.da curva: $c' = 0,184t - 0,005$; $r = 0,9990$).

3.6 Ensaio em cultivo descontínuo

3.6.1 Ensaio nº 12

a) Condições experimentais

Nutrientes adicionados ao mosto: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
 2,4 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075 g/l e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 5,1 g/l .

$$S'_0 = 30,4 \text{ g/l}$$

$$S_0 = 6,2 \text{ g/l}$$

$$\Phi = 2 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

$$F = 0 \text{ (cultivo descontínuo)}$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3.30 e figura 3.XVII.

Para o cálculo do AR e ART utilizou-se a equação:

$$y = 0,0034x - 0,0039 \quad (3.XVIII)$$

e para a medida do ART proveniente da atividade invertásica usou-se a equação:

$$y = 2,111x + 0,045 \quad (r = 0,994) \quad (3.XIX)$$

c) Comentários

A figura 3.XVII e a tabela 3.31 mostram os dados referentes à formação de ART em função do tempo para a amostra de células mais ativa obtida durante o processo descontínuo.

TABELA 3.30 Resultados obtidos no ensaio nº 12.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	v(gART/g cēl.min)		
				Medidas		Média
				1 ^a	2 ^a	
0	0,84	10,3	25,0	0,529	0,558	0,544
0,5	0,95	-	-	0,647	0,631	0,639
1	1,20	17,6	22,5	0,481	0,481	0,481
1,5	1,30	-	-	0,943	0,852	0,890
2	1,43	15,5	21,3	0,278	0,278	0,278
2,5	1,95	-	-	0,184	0,184	0,184
3	2,53	16,3	17,6	0,141	0,141	0,141
3,5	2,85	-	-	0,115	0,115	0,115
4	3,17	11,6	11,7	0,103	0,094	0,100
4,5	3,80	-	-	0,110	0,110	0,110
5	4,20	4,6	5,1	0,205	0,205	0,205
5,5	4,50	-	-	0,640	0,640	0,640
6	4,86	1,2	1,5	0,744	0,744	0,744
6,5	5,00	-	-	0,664	0,664	0,664
7	5,16	-	-	0,697	0,681	0,690
7,5	5,25	-	-	0,734	0,723	0,728
8	5,34	-	-	0,655	0,688	0,672

TABELA 3.31 Variação da concentração de ART pela ação de células colhidas no instante $t = 1,5h$ do ensaio nº 12 (ver ítem 2.5.4) .

t (min)	Concentração de ART, c' (g/l)		
	Medidas 1 ^a	2 ^a	Média
1	0,047	0,047	0,047
2	0,092	0,094	0,093
3	0,140	0,140	0,140
4	0,189	0,185	0,187
5	0,232	0,234	0,233
6	0,278	0,282	0,280

FIGURA 3.XVII. Variação, com o tempo, da atividade invertásica (v) e das concentrações de ART (S'), de AR (S) e de células (X) no ensaio nº12. A curva do gráfico A₁ mostra a variação da concentração de ART (c') com o tempo na medida a que se refere o item 2.5.4, usando células colhidas no instante $t=1,5\text{h}$ (Eq. da curva: $c'=0,047t-0,002$; $r=0,9998$).

4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1 ENSAIO DO INÓCULO

Pela análise da tabela 3.23 verifica-se que o inóculo preparado com meio suplementado apresenta uma concentração celular média ($\bar{X}$) e uma atividade invertásica específica média ($\bar{v}$), respectivamente 1,3 e 1,2 vezes superior às do inóculo preparado em meio de cultura não suplementado. Este resultado vem de encontro ao fato, já bem estabelecido, de que células crescidas em meio enriquecido têm sua atividade metabólica incrementada.

Outrossim, verifica-se que os coeficientes de variação para $\bar{X}$ de células crescidas em meio suplementado e não suplementado são, respectivamente, 1,6% e 1,4%, enquanto que para $\bar{v}$ tem-se, respectivamente, 3,1% e 2,3%. Isto indica que as diferenças encontradas entre os ensaios com e sem nutrientes são devidas, apenas, à diferente constituição dos meios de cultura.

Seria interessante, neste momento, verificar se os valores de X e de v , medidos logo após a inoculação da dorina nos vários ensaios fermentativos realizados, guardam alguma relação com os mostrados acima. Para tanto elaborou-se a tabela 4.1, que mostra os valores de X e de v medidos na amostra colhida no instante $t = -6$ h em cada um dos ensaios realizados. Para facilitar a análise, os doze ensaios foram divididos em dois grupos, conforme o mosto utilizado tenha ou não

TABELA 4.1 Determinação da concentração celular (X) e da atividade invertásica específica (v) de amostras colhidas no instante $t = -6$ h para todos os ensaios de cultivo contínuo.

Mosto não Suplementado			Mosto Suplementado		
Ensaio nº	X (g/l)	v (gART/g cêl.min)	Ensaio nº	X (g/l)	v (gART/g cêl.min)
1	-	-	6	0,84	0,611
2	0,58	0,596	7	1,02	0,782
3	0,52	0,580	9	0,70	0,427
4	0,57	0,660	11	1,02	0,279
5	0,67	0,727	12	0,84	0,544
8	0,58	0,508			
10	0,60	0,517			
$\bar{X} = 0,59$ (g/l)			$\bar{X} = 0,88$ (g/l)		
$s = 0,049$ (g/l)			$s = 0,14$ (g/l)		
C V = 8,3 %			C V = 15,5%		

sido suplementado. De imediato nota-se que $\bar{X}$ para o grupo em que se usou mosto suplementado é cerca de 1,5 vezes superior ao $\bar{X}$ do outro grupo. Este resultado está bem próximo ao apurado através da tabela 3.23.

Com relação à atividade invertásica específica os dados obtidos são discrepantes, ressaltando-se que, a menos do ensaio nº 11, os valores de v para o instante $t = -6$ h, são superiores aos mostrados na tabela 3.23. No momento não temos explicação para este fato. Mais adiante propor-se-á uma hipótese para tentar explicar a oscilação de v com o tempo, que foi observada durante os ensaios de cultivo contínuo e, a partir dela, talvez se possa tirar alguma idéia que permita compreender melhor o resultado ora encontrado.

4.2 ERRO EXPERIMENTAL NA DOSAGEM DO ART PELO MÉTODO DE SOMOGYI

Pela tabela 3.2 verifica-se que o coeficiente de variação das medidas da concentração de ART é igual a 2,7%, inferior portanto ao limite tolerado para o erro experimental em métodos espectrofotométricos, que é de 5% (46).

4.3 INTERFERÊNCIA DA PRESENÇA DE CÉLULAS NA DETERMINAÇÃO DO ART

A tabela 3.3 mostra claramente que a presença de células na concentração de 0,33 g/l não interfere na determinação do ART.

4.4 INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE AÇÚCARES PELAS CÉLULAS NA DETERMINAÇÃO DO ART

Da tabela 3.4 depreende-se que a influência do consumo de açúcares pelas células na determinação do ART não é mensurável pelo método analítico utilizado.

4.5 ENSAIOS EM CULTIVO CONTÍNUO

4.5.1 Ensaio com borbulhamento de ar e com mosto não suplementado

4.5.1.1 Ensaio nº 1

Examinando as figuras 3.IIa e 4.II depreende-se que as condições experimentais utilizadas ($F = 312 \text{ ml/h}$; $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$ e $N = 500 \text{ min}^{-1}$) conduziram a um regime transiente durante 54 h de processo contínuo.

As figuras 4.I e 4.II, cujos dados são apresentados na tabela 4.2, mostram o comportamento de μ_S , μ , $\mu_{(S'-S)}$ e μ_X em função do tempo.

Comparando os perfis de μ_S , $\mu_{(S'-S)}$ e v entre si a partir do instante $t = 10 \text{ h}$, nota-se claramente que são diferentes. O que mais chama a atenção é a diferença entre as curvas de $\mu_{(S'-S)}$ e v que, teoricamente, deveriam apresentar alguma correlação, já que a célula, para se multiplicar nas condições do ensaio, necessita converter a sacarose do mosto em açúcares fermentescíveis, somente podendo fazê-lo mediante a ação da invertase que ela possui em sua parede celular.

Ajustando-se retas pelo método dos mínimos quadrados aos pontos dos gráficos $\mu X = f(t)$ e $v = f(t)$ a partir de $t = 15h$, obtêm-se respectivamente, os seguintes coeficientes de correlação (r): 0,81 e 0,96. Os valores críticos de r (99% de probabilidade) são, respectivamente, 0,39 e 0,66 (32). Destes dados depreende-se que tanto a atividade invertásica específica como a produtividade em células são funções crescentes do tempo a partir de $t = 15h$.

Outrossim, destaca-se que o valor de v , após apresentar acentuada variação entre os instantes $t = 0h$ e $t = 12h$, passa a oscilar, sendo o período de oscilação médio de 7,8 h (Fig. 3.IIb).

TABELA 4.2 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose, de crescimento celular e produtividade em células para o ensaio nº 1.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μX (g/l.h)
0	1,70	16,4	17,8	1,313	1,235	0,135	0,230
1	1,75	15,6	17,0	1,275	1,248	0,149	0,261
2	1,85	14,8	16,2	1,206	1,135	0,160	0,296
3	1,95	14,3	15,5	1,145	1,037	0,157	0,306
4	2,05	13,8	15,0	1,089	0,960	0,155	0,318
5	2,15	13,5	14,9	1,008	0,833	0,153	0,329
6	2,25	13,3	14,5	0,940	0,760	0,150	0,338
7	2,35	13,1	14,5	0,915	0,730	0,149	0,350
8	2,45	13,0	14,5	0,876	0,683	0,143	0,350
9	2,53	12,9	14,5	0,839	0,656	0,136	0,344
10	2,60	12,8	14,5	0,848	0,655	0,135	0,351
11	2,68	12,8	14,4	0,872	0,685	0,130	0,348
12	2,73	12,7	14,2	0,895	0,733	0,124	0,339
13	2,78	12,6	13,5	0,895	0,758	0,119	0,331
14	2,80	12,4	13,0	0,885	0,757	0,110	0,308
15	2,80	12,3	13,2	0,881	0,739	0,106	0,297
16	2,80	12,2	12,8	0,869	0,748	0,110	0,308
17	2,82	12,0	12,5	0,851	0,790	0,115	0,324
18	2,85	11,6	12,3	0,822	0,796	0,117	0,333
19	2,88	11,3	11,8	0,797	0,765	0,115	0,331
20	2,90	11,0	11,5	0,771	0,733	0,111	0,322
21	2,91	10,8	11,4	0,772	0,742	0,111	0,323
22	2,93	10,5	11,1	0,778	0,758	0,118	0,346
23	2,98	10,3	10,9	0,776	0,747	0,118	0,352
24	3,00	10,1	10,7	0,782	0,744	0,113	0,339
25	3,02	10,0	10,5	0,781	0,730	0,119	0,359
26	3,08	9,9	10,4	0,783	0,736	0,119	0,367
27	3,10	9,8	10,3	0,789	0,730	0,111	0,344

Continua

Continuação da Tabela 4.2

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μX (g/l.h)
28	3,11	9,8	10,0	0,782	0,707	0,109	0,339
29	3,12	9,8	10,0	0,768	0,693	0,112	0,349
30	3,15	9,8	10,0	-	-	0,111	0,350
31	3,15	9,8	10,0	0,739	0,665	0,106	0,334
32	3,15	9,8	10,0	0,702	0,628	0,106	0,334
33	3,15	9,8	10,0	0,660	0,634	0,106	0,334
34	3,15	9,5	10,0	0,646	0,707	0,111	0,350
35	3,18	9,0	10,0	0,641	0,720	0,114	0,363
36	3,20	8,7	9,9	0,687	0,712	0,114	0,365
37	3,23	8,6	9,7	0,736	0,734	0,118	0,381
38	3,28	8,5	9,3	0,759	0,776	0,117	0,384
39	3,30	8,3	8,7	0,757	0,810	0,117	0,386
40	3,35	8,0	8,6	0,732	0,764	0,113	0,379
41	3,35	8,0	8,5	0,725	0,712	0,106	0,355
42	3,35	8,0	8,3	0,720	0,708	0,106	0,355
43	3,35	8,0	8,3	0,707	0,695	0,106	0,355
44	3,35	8,0	8,3	0,681	0,668	0,110	0,369
45	3,38	8,0	8,3	0,641	0,671	0,110	0,372
46	3,38	7,7	8,3	0,636	0,707	0,109	0,368
47	3,40	7,5	8,0	0,658	0,760	0,109	0,371
48	3,40	7,0	7,7	0,690	0,841	0,109	0,371
49	3,42	6,6	7,2	0,711	0,859	0,112	0,383
50	3,44	6,2	6,6	0,714	0,912	0,115	0,396
51	3,48	5,5	6,0	0,688	0,938	0,125	0,435
52	3,57	4,8	5,1	0,659	0,952	0,130	0,464
53	3,65	4,0	4,3	0,641	0,989	0,131	0,478
54	3,75	3,0	3,3	0,623	0,879	0,129	0,484

FIGURA 4.I. Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de AR (μ_S) no ensaio nº1. O gráfico A mostra o perfil da curva para interpolar os valores de $(S'-S)$ utilizados para calcular $\mu_{(S'-S)}$. O perfil da curva usado para interpolar os valores de S para calcular μ_S é mostrado na figura 3.IIa.

FIGURA 4.II. Variação, com o tempo, da velocidade específica de crescimento celular (μ) e da produtividade de células (μX) no ensaio nº 1.

4.5.1.2 Ensaio nº 2

Conforme descrito anteriormente este ensaio é constituído por duas etapas, cujas condições de trabalho foram:

1ª etapa:

$$F = 339 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,11 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 2 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

2ª etapa:

$$F = 423 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,14 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 2 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

Pela análise das figuras 3.III e 4.IV verifica-se que em ambas as etapas obteve-se regime transiente.

A tabela 4.3 e as figuras 4.III e 4.IV mostram o comportamento de μ_S , $\mu_{(S'-S)}$, μ e μ_X em função do tempo.

Comparando os gráficos de μ_S , $\mu_{(S'-S)}$ e v entre si, nota-se que apresentam perfis diferentes. Aqui, também, verifica-se a dissemelhança entre as curvas dos grãfi

cos de v e $\mu(S'-S)$, tal como sucedeu no ensaio nº 1.

Para analisar um pouco melhor os regimes transientes obtidos, tentamos ajustar aos pontos de $\mu X = f(t)$ e $v = f(t)$ em cada etapa, as correspondentes retas de mínimo quadrado. Assim, para a primeira etapa, mais precisamente entre os instantes $t = 14$ h e $t = 43$ h, os coeficientes de correlação (r) obtidos para μX e v são, respectivamente, 0,91 e 0,86, sendo que os correspondentes valores de r críticos (99% de probabilidade) são, respectivamente, 0,49 e 0,76 (32).

Por outro lado, para a 2^a etapa, compreendida entre os instantes $t = 46$ h e $t = 68$ h, os coeficientes de correlação para μX e v são, respectivamente 0,86 e 0,64, sendo os correspondentes valores críticos de r (99% de probabilidade), respectivamente, iguais a 0,55 e 0,79 (32).

Pelos dados obtidos conclui-se que na 1^a etapa do ensaio tanto μX como v são funções crescentes com o tempo. No entanto para a 2^a etapa não se pode estabelecer tal correlação para v ao nível de 99% de probabilidade.

Para finalizar deve ser realçado que a partir do instante $t = 14$ h o valor de v começa a oscilar, assim sucedendo até o final do processo (Fig. 3.III). O período médio de oscilação de v para a 1^a etapa é 12 h e para a 2^a etapa 10,5 h.

TABELA 4.3 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose, de crescimento celular e produtividade em células para o ensaio nº 2.

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/l.h)
0	2,00	14,3	14,8	0,45	0,73	0,120	0,240
1	2,02	13,0	14,8	0,66	0,74	0,122	0,246
2	2,05	12,5	14,8	0,82	0,72	0,134	0,275
3	2,12	12,3	14,8	0,87	0,70	0,141	0,299
4	2,18	12,2	14,8	0,89	0,70	0,135	0,294
5	2,23	12,1	14,8	0,89	0,69	0,137	0,306
6	2,30	12,1	14,7	0,88	0,69	0,143	0,329
7	2,38	12,0	14,6	0,87	0,68	0,146	0,347
8	2,47	12,0	14,5	0,86	0,70	0,144	0,356
9	2,55	11,8	14,3	0,84	0,71	0,141	0,360
10	2,63	11,7	14,0	0,81	0,68	0,148	0,389
11	2,75	11,6	13,8	0,76	0,64	0,150	0,413
12	2,85	11,5	13,7	0,71	0,61	0,145	0,413
13	2,95	11,3	13,6	0,68	0,59	0,144	0,425
14	3,05	11,2	13,5	0,64	0,57	0,140	0,427
15	3,13	10,9	13,4	0,59	0,57	0,137	0,429
16	3,22	10,6	13,3	0,57	0,52	0,136	0,438
17	3,30	10,5	13,2	0,56	0,54	0,137	0,452
18	3,40	10,1	13,0	0,56	0,58	0,136	0,462
19	3,48	9,8	12,8	0,57	0,59	0,127	0,442
20	3,52	9,5	12,5	0,62	0,63	0,130	0,458
21	3,62	9,3	11,8	0,65	0,66	0,135	0,489
22	3,70	9,0	11,3	0,62	0,64	0,128	0,474
23	3,75	8,8	10,8	0,58	0,60	0,123	0,461
24	3,80	8,6	10,6	0,56	0,58	0,126	0,479
25	3,87	8,4	10,4	0,54	0,55	0,126	0,488
26	3,92	8,3	10,3	0,54	0,53	0,127	0,498
27	4,00	8,3	10,3	0,53	0,51	0,120	0,480
28	4,00	8,3	10,3	0,52	0,54	0,120	0,480
29	4,08	8,3	10,2	0,52	0,51	0,126	0,514
30	4,13	8,25	10,1	0,53	0,54	0,127	0,525

Continua

Continuação da Tabela 4.3

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/l.h)
31	4,22	8,1	9,8	0,53	0,55	0,130	0,549
32	4,30	8,0	9,5	0,53	0,54	0,138	0,593
33	4,40	7,9	9,3	0,53	0,54	0,133	0,585
34	4,50	7,8	9,2	0,51	0,52	0,128	0,576
35	4,56	7,7	8,8	0,48	0,51	0,121	0,552
36	4,60	7,5	8,8	0,45	0,48	0,119	0,547
37	4,64	7,4	8,7	0,42	0,47	0,119	0,552
38	4,68	7,0	8,6	0,42	0,50	0,116	0,543
39	4,70	6,8	8,4	0,46	0,52	0,117	0,550
40	4,75	6,6	8,2	0,50	0,55	0,118	0,561
41	4,78	6,5	7,5	0,50	0,56	0,117	0,559
42	4,82	6,3	7,3	0,47	0,52	0,117	0,564
43	4,85	6,3	7,3	0,46	0,51	0,116	0,563
44*	4,88	6,1	7,2	0,56	0,59	0,117	0,571
45	4,92	6,2	7,0	0,55	0,56	0,116	0,571
46	4,94	6,3	7,3	0,56	0,56	0,143	0,706
47	4,98	6,5	7,4	0,57	0,55	0,145	0,722
48	5,02	6,8	7,6	0,58	0,53	0,149	0,748
49	5,10	7,2	7,8	0,56	0,52	0,155	0,791
50	5,20	7,3	8,0	0,50	-	0,153	0,796
51	5,27	7,2	8,1	0,47	0,50	0,149	0,785
52	5,33	7,0	8,2	0,47	0,52	0,152	0,810
53	5,43	6,8	8,1	0,49	0,53	0,153	0,831
54	5,50	6,8	8,0	0,51	0,54	0,152	0,836
55	5,60	6,7	7,8	0,51	0,54	0,149	0,834
56	5,63	6,6	7,5	0,51	0,54	0,142	0,799
57	5,66	6,6	7,3	0,52	0,55	0,145	0,821
58	5,72	6,5	7,2	0,52	0,55	0,147	0,841
59	5,78	6,5	7,1	0,50	0,52	0,144	0,832
60	5,80	6,5	6,9	0,47	0,50	0,141	0,818

Continua

Continuação da Tabela 4.3

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μX (g/l.h)
61	5,83	6,4	7,0	0,45	0,49	0,144	0,840
62	5,88	6,3	7,1	0,44	0,48	0,143	0,841
63	5,90	6,3	7,2	0,43	0,48	0,145	0,856
64	5,97	6,1	7,3	0,42	0,48	0,145	0,866
65	6,00	6,0	7,2	0,43	0,49	0,141	0,846
66	6,02	5,8	7,1	0,45	0,52	0,143	0,861
67	6,07	5,6	6,8	0,47	0,54	0,196	1,19
68	7,00	5,4	6,5	0,41	0,48	0,211	1,48

* Instante no qual a vazão específica foi aumentada para 0,14 h⁻¹.

FIGURA 4.III. Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de AR (μ_S) no ensaio nº 2. O gráfico A mostra o perfil da curva para interpolar os valores de $(S'-S)$ utilizados para calcular $\mu_{(S'-S)}$. O perfil da curva usado para interpolar os valores de S para calcular μ_S é mostrado na figura 3.III.

FIGURA 4.IV. Variação, com o tempo, da velocidade específica de crescimento celular (μ) e da produtividade de em células (μX) no ensaio nº 2.

4.5.1.3 Ensaio nº 3

Pela análise das figuras 3.IV e 4.VI nota-se que as condições de ensaio utilizadas ($F = 697 \text{ ml/h}$; $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$ e $N = 500 \text{ min}^{-1}$) permitiram obter regime transiente.

A tabela 4.4 e as figuras 4.V e 4.VI mostram o comportamento de μ_S , $\mu_{(S'-S)}$, μ e μ_X em função do tempo.

A figura 3.IV mostra que a partir do instante $t = 6 \text{ h}$ o valor de v começa a oscilar, sendo o período médio de oscilação igual a $4,5 \text{ h}$.

TABELA 4.4 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose, de crescimento celular e produtividade em células para o ensaio nº 3.

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/ℓ)	(g/ℓ)	(g/ℓ)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/ℓ.h)
0	1,70	15,1	16,8	2,43	1,52	0,236	0,401
1	1,71	15,0	17,3	2,26	1,47	0,245	0,419
2	1,75	14,5	17,7	2,08	1,50	0,241	0,422
3	1,75	14,0	17,8	2,03	1,52	0,244	0,427
4	1,80	13,5	18,1	1,89	1,44	0,249	0,448
5	1,82	13,1	18,2	1,89	1,46	0,257	0,468
6	1,90	12,7	18,2	1,76	1,42	0,264	0,502
7	1,95	12,2	18,3	1,69	1,42	0,268	0,523
8	2,05	11,8	18,3	1,58	1,32	0,267	0,547
9	2,10	11,5	18,3	1,51	1,31	0,247	0,519
10	2,12	11,0	18,3	1,44	1,28	0,242	0,513
11	2,15	10,8	18,3	1,35	1,22	0,242	0,520
12	2,17	10,3	18,5	1,24	1,13	0,235	0,510
13	2,17	10,1	18,8	1,16	1,05	0,230	0,499
14	2,17	9,8	19,2	1,12	1,04	0,230	0,499
15	2,17	9,6	19,3	1,21	1,12	0,230	0,499
16	2,17	9,4	19,3	1,24	1,15	0,230	0,499
17	2,17	9,3	19,3	1,25	1,15	0,230	0,499
18	2,17	9,2	19,3	1,26	1,15	0,230	0,499
19	2,17	9,2	19,3	1,28	1,15	0,230	0,499
20	2,17	9,2	19,3	1,28	1,15	0,230	0,499
21	2,17	9,2	19,3	1,28	1,15	0,230	0,499
22	2,17	9,2	19,3	1,28	1,15	0,230	0,499
23	2,17	9,2	19,3	1,28	1,15	0,230	0,499
24	2,17	9,2	19,3	1,28	1,15	0,242	0,525
25	2,22	9,2	19,3	1,26	1,13	0,248	0,551
26	2,25	9,2	19,3	1,24	1,11	0,259	0,585
27	2,35	9,2	19,3	1,19	1,06	0,262	0,616
28	2,40	9,2	19,3	1,16	1,04	0,251	0,602
29	2,45	9,2	19,3	1,14	1,02	0,250	0,613

Continua

Continuação da Tabela 4.4

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/l.h)
30	2,50	9,2	19,3	1,12	1,00	0,244	0,610
31	2,52	9,2	19,3	1,11	0,99	0,240	0,605
32	2,55	9,2	19,3	1,09	0,98	0,242	0,617
33	2,58	9,2	19,3	1,08	0,97	0,240	0,619
34	2,60	9,2	19,3	1,07	0,96	0,236	0,614
35	2,61	9,2	19,3	1,07	0,96	0,249	0,650
36	2,70	9,2	19,3	1,06	0,95	0,256	0,691
37	2,75	9,2	19,2	1,11	1,00	0,257	0,707
38	2,85	9,2	18,8	1,19	1,08	0,274	0,781
39	3,00	9,2	18,2	1,09	0,99	0,269	0,807

FIGURA 4.V. Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de AR (μ_S) no ensaio nº3. O gráfico A mostra o perfil da curva para interpolar os valores de $(S'-S)$ usados para calcular $\mu_{(S'-S)}$. O perfil da curva usado para interpolar os valores de S para calcular μ_S é mostrado na figura 3.IV.

FIGURA 4.VI. Variação, com o tempo, da velocidade específica de crescimento celular (μ) e da produtividade em células (μX) no ensaio nº 3.

4.5.1.4 Ensaio nº 4

Pela figura 3.V nota-se claramente que, o processo fermentativo contínuo realizado nas seguintes condições:

$$F = 679 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,23 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

permitiu o estabelecimento de regime estacionário a partir do instante $t = 12 \text{ h}$.

O patamar obtido se manteve durante 39h, com os seguintes valores médios:

$$\bar{X} = 1,16 \text{ g/l}$$

$$\bar{S} = 6,8 \text{ g/l}$$

$$\bar{v} = 0,044 \text{ gART/g c\~{e}l.min}$$

$$\bar{S}' = 22,6 \text{ g/l}$$

As velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de Ar e consumo de sacarose são, respectivamente, iguais a $0,23 \text{ h}^{-1}$, $1,71 \text{ h}^{-1}$ e $1,26 \text{ h}^{-1}$. A produtividade em células foi de $0,27 \text{ g/l.h}$.

Outrossim deve ser destacado que durante todo o período de duração do patamar o valor de v oscilou, sendo o período médio de oscilação igual a $5,1 \text{ h}$.

4.5.1.5 Ensaio nº 5

Conforme indicado no ítem 3.5.5 este ensaio foi dividido em 4 etapas, das quais a 1^a etapa será analisada neste momento.

Entre os instantes $t = 0h$ e $t = 27h$ as condições de ensaio foram análogas às do ensaio nº 4, sendo mais precisamente:

$$F = 689 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

Conforme se pode depreender da figura 3.VI o regime permanente foi reproduzido e mantido durante 24h, com os seguintes valores médios:

$$\bar{X} = 1,40 \text{ g/l}$$

$$\bar{S} = 7,8 \text{ g/l}$$

$$\bar{S}' = 21,0 \text{ g/l}$$

$$\bar{v} = 0,077 \text{ gART/g cêl.min}$$

Deve ser notado que, embora a perturbação do sistema tenha sido feita no instante $t = 27h$, o patamar se prolongou até o instante $t = 30h$. A explicação reside no fato de que o sistema precisa de um certo tempo para responder às novas condições.

As velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de AR e consumo de sacarose são, respectivamente, iguais a $0,24 h^{-1}$, $1,63 h^{-1}$ e $1,82 h^{-1}$. A produtividade de em células foi de $0,34 g/l.h$.

Observando a figura 3.VIII observa-se que o valor de v oscila ao longo do patamar, sendo o período de oscilação médio de $4,5h$.

4.5.1.6 Ensaio nº 10

Este ensaio foi dividido em 5 etapas, de acordo com o descrito no item 3.5.11, das quais se analisará a 1ª etapa neste momento.

Entre os instantes $t = 0h$ e $t = 19h$ o sistema foi mantido sob condições operacionais análogas às dos ensaios nº 4 e nº 5 (1ª etapa), sendo:

$$F = 713 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,23 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

Pela figura 3.XIII infere-se que o regime permanente foi mantido durante $16h$, com os seguintes valores médios:

$$\bar{X} = 1,25 \text{ g/l}$$

$$\bar{S} = 6,5 \text{ g/l}$$

$$\bar{S}' = 21,5 \text{ g/l}$$

$$\bar{v} = 0,038 \text{ gART/g cl.min}$$

As velocidades especficas de crescimento celular, de consumo de AR e consumo de sacarose so, respectivamente, iguais a $0,23 \text{ h}^{-1}$, $1,75 \text{ h}^{-1}$ e $1,68 \text{ h}^{-1}$. A produtividade em clulas foi de $0,29 \text{ g/l.h}$.

Da figura 3.XIII depreende-se que o valor de v oscila ao longo do patamar, sendo o perodo mdio de oscilao de 4,8 h.

4.5.1.7 Comentrios sobre o tem 4.5.1

Analisando o grupo de ensaios realizados com borbulhamento de ar e com mosto no suplementado pode-se dizer:

a) O regime transiente foi obtido nas quatro condies seguintes:

- 1) $F = 312 \text{ ml/h}$; $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$ e $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$.
- 2) $F = 339 \text{ ml/h}$; $D = 0,11 \text{ h}^{-1}$ e $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$.
- 3) $F = 423 \text{ ml/h}$; $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$ e $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$.
- 4) $F = 697 \text{ ml/h}$; $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ e $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$.

Em todos estes casos a frequncia do agitador foi de 500 min^{-1} .

b) O regime estacionrio foi obtido nas seguintes condies:

- 1) $F = 679 \text{ ml/h}$; $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ e $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$.

- 2) $F = 689 \text{ ml/h}$; $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$ e $\phi = 1 \text{ l/l.min.}$
 3) $F = 713 \text{ ml/h}$; $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$ e $\phi = 1 \text{ l/l.min.}$

Em todos estes casos a frequência do agitador foi de 500 min^{-1} .

- c) Em todos os ensaios a atividade invertásica específica de células intactas de levedura apresenta uma variação acentuada durante as primeiras horas de processo contínuo.

Na tabela 4.5 nota-se um comportamento distinto entre as variações de v e X num mesmo intervalo de tempo no início do cultivo contínuo, de acordo com as condições operacionais empregadas. No caso das condições para regime transiente (ensaios nºs 1, 2 e 3) a variação de X é positiva e a de v negativa, ao passo que nas condições para regime estacionário ambas apresentam variação negativa. É notório, também, que no primeiro caso a variação de v é menos acentuada do que no segundo.

Sabendo que a invertase só pode provir da célula e que a enzima, uma vez formada, fica presa à parede celular, então as referidas variações, provavelmente, refletem mudanças no metabolismo celular.

- d) Tanto em regime transiente como estacionário os valores de v oscilam.
 e) Em regime transiente v , $\mu_{(S'-S)}$ e μ_S , aparentemente, não se correlacionam.

TABELA 4.5 Variações globais de X e v no início do processo fermentativo contínuo dos ensaios 1, 2, 3, 4, 5 (1^a etapa) e 10 (1^a etapa) .

Ensaio nº	Intervalo de tempo (h)	X (g/l)	v (gART / g cêl.min)	ΔX (g/l)	Δv (gART / g cêl.min)	Variação Percentual	
						ΔX	Δv
1	0	1,66	0,268	1,09	-0,172	39,6	-64,2
	12	2,75	0,096				
2	0	1,95	0,253	1,10	-0,134	36,1	-52,9
	14	3,05	0,119				
3	0	1,71	0,317	0,28	-0,231	14,1	-72,9
	6	1,99	0,086				
4	0	1,76	0,341	-0,51	-0,305	-29,0	-89,4
	10,5	1,25	0,036				
5 (1 ^a)	0	1,87	0,402	-0,37	-0,376	-19,8	-93,5
	7,5	1,50	0,026				
10 (1 ^a)	0	1,63	0,202	-0,18	-0,130	-11,0	-64,4
	1,5	1,45	0,072				

f) Em regime transiente o período de oscilação médio (P.O.M.) da atividade invertásica específica é superior ao obtido em regime estacionário, indicando que ν varia mais rápido neste tipo de regime do que naquele. Assim, no caso dos ensaios nº 1, 2 (1ª etapa), 2 (2ª etapa) e 3, onde se obtiveram regimes transientes, o P.O.M. apresentou CV igual a 38% enquanto que nos ensaios em regime estacionário (ensaios nº 4, 5 (1ª etapa) e 10 (1ª etapa) o CV foi cerca de 6%.

4.5.2 Ensaio com borbulhamento de ar e com mosto suplementado

4.5.2.1 Ensaio nº 5

A primeira etapa deste ensaio ($t = 0h$ até $t = 27h$) já foi analisada no item 5.4.1, restando, por ora, discutir um pouco a respeito das demais.

A) 2ª etapa

Teve início no instante $t = 28,5h$ e prolongou-se até $t = 51h$. Em relação à etapa anterior, a única modificação realizada foi introduzir na dorna mosto enriquecido, conforme descrito em 3.5.5, causando uma perturbação por degrau no sistema.

A utilização das condições indicadas a seguir permitiram o estabelecimento de regime transiente, o qual resulta nítido da observação das figuras 3.VI e 4.VIII ($\mu = f(t)$):

$$F = 692 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\phi = 1 \text{ l/l.min}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

As figuras 4.VII e 4.VIII, cujos dados são apresentados na tabela 4.6, mostram o comportamento de μ_S , $\mu_{(S'-S)}$, μ e μ_X em função do tempo.

Merece destaque a similaridade dos perfis de μ_S e $\mu_{(S'-S)}$, que parecem mostrar o acoplamento, provavelmente intermediado pela ação da invertase ligada à parede celular da levedura, entre a decomposição da sacarose e a retirada dos açúcares redutores formados do mosto em fermentação.

Por outro lado, confrontando-se v e $\mu_{(S'-S)}$ constata-se que estas duas velocidades específicas apresentam comportamento oposto, sobretudo a partir do instante $t = 35\text{h}$ onde v cresce e $\mu_{(S'-S)}$ decresce.

Confrontando $v = f(t)$ com $\mu_X = f(t)$ nota-se que ambas são nitidamente funções crescentes, embora não tenha sido possível associar aos pontos experimentais uma reta de mínimo quadrado estatisticamente significativa.

Da figura 4.VII observa-se que v apresentou um aumento abrupto 8h após a perturbação, evidenciando a fase de adaptação sofrida pelas células de levedura diante das novas condições ambientais. A partir desta fase de adaptação os valores de v oscilaram, sendo o P.O.M de 3,3h.

B) 3ª etapa

Caracterizou-se pela manutenção das condições da etapa anterior, a menos da vazão específica de alimentação que foi reduzida a $0,10 \text{ h}^{-1}$. As figuras 3.VI e 4.X ($\mu = f(t)$) mostram o estabelecimento de regime transiente no sistema.

As figuras 4.IX e 4.X, cujos dados aparecem na tabela 4.7, mostram os perfis de μ_S , μ , $\mu_{(S'-S)}$ e μ_X em função do tempo.

Tal como na etapa precedente, μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ em função do tempo apresentam comportamento similar. Contudo, comparando-se simultaneamente v , μ_X , μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ ao longo desta etapa nota-se que inexistente correlação estatisticamente significativa.

No entanto, caso se leve em conta o período de ensaio compreendido entre os instantes $t = 52,5\text{h}$ e $t = 63\text{h}$, o qual pode ser considerado como sendo a fase de adaptação da levedura às novas condições, observa-se que v , μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ são funções decrescentes com o tempo, enquanto que μ_X é função crescente.

Ajustando-se as retas de mínimo quadrado aos pontos situados entre os instantes referidos para v , μ_S , $\mu_{(S'-S)}$ e μ_X , obtêm-se, respectivamente, os seguintes coeficientes de correlação: 0,98; 0,93; 0,91 e 0,98. Os respectivos valores críticos de r com 99% de probabilidade são: 0,83 e 0,76 (32).

Outrossim deve-se mencionar que entre os instantes $t = 63\text{h}$ e $t = 75\text{h}$ os valores de v oscilam, sendo o P.O.M. igual a 6h.

c) 4ª etapa

Esta foi realizada nas mesmas condições que a anterior, exceto que o ar foi borbulhado a uma vazão de 2 l/l.min.

As figuras 3.VI e 4.X ($\mu = f(t)$) mostram que o regime estabelecido na dorna foi o transiente, embora menos acentuado que nas etapas anteriores. Ressalte-se que a partir de $t = 90h$ o sistema tendeu para regime estacionário.

Comparando-se os perfis de v , μ_S , $\mu(S'-S)$ e μ_X , mostrados nas figuras 4.IX e 4.X, verifica-se a inexistência de correlação entre eles, exceptuando-se, talvez, μ_S e $\mu(S'-S)$, quando comparados entre si.

Não se encontrou explicação plausível para a pronunciada variação ocorrida ao redor do instante $t = 86h$ nas curvas de μ_X , μ e X .

Para finalizar, deve ser salientado que durante toda esta etapa os valores de v oscilam, sendo o P.O.M., igual a 5,3h.

TABELA 4.6 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose, de crescimento celular e produtividade em células para o ensaio nº 5 (2^a etapa).

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/l.h)
27	1,43	7,5	20,8	1,84	1,67	0,303	0,433
28	1,52	7,5	20,8	1,73	1,57	0,303	0,461
29	1,62	7,5	20,8	1,68	1,54	0,299	0,484
30	1,71	7,5	20,6	1,74	1,60	0,307	0,525
31	1,85	7,5	20,1	1,76	1,64	0,318	0,588
32	2,00	7,5	19,5	1,89	1,80	0,305	0,610
33	2,11	7,4	18,5	2,25	2,19	0,318	0,671
34	2,33	7,3	16,2	2,42	2,40	0,324	0,755
35	2,50	7,1	14,1	2,38	2,48	0,320	0,800
36	2,73	6,5	12,0	2,23	2,51	0,330	0,901
37	3,00	5,5	9,5	2,12	2,54	0,343	1,03
38	3,35	4,5	7,1	1,93	2,37	0,333	1,12
39	3,62	3,5	4,5	1,71	2,18	0,317	1,15
40	3,91	2,5	3,3	1,54	1,97	0,308	1,20
41	4,15	2,0	2,5	1,41	1,77	0,293	1,22
42	4,35	1,6	2,1	1,31	1,63	0,284	1,24
43	4,53	1,6	2,0	1,26	1,53	0,276	1,25
44	4,68	1,5	2,0	1,22	1,48	0,267	1,25
45	4,78	1,5	2,0	1,19	1,44	0,266	1,27
46	4,93	1,5	2,0	1,15	1,40	0,267	1,32
47	5,05	1,5	2,0	1,13	1,36	0,264	1,33
48	5,17	1,5	2,0	1,10	1,33	0,256	1,32
49	5,22	1,5	2,0	1,09	1,32	0,246	1,28
50	5,23	1,5	2,0	1,09	1,32	0,243	1,27
51	5,25	1,5	2,0	1,08	1,31	0,243	1,28

FIGURA 4.VII. Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de AR (μ_S) referentes à 2ª etapa do ensaio nº5. O gráfico A mostra o perfil da curva para interpolar os valores de $(S'-S)$ utilizados para calcular $\mu_{(S'-S)}$. O perfil da curva usado para interpolar os valores de S para calcular μ_S é mostrado na figura 3.VI do item 3.5.5.

FIGURA 4.VIII. Variação, com o tempo, da velocidade específica de crescimento celular (μ) e da produtividade em células (μX) referentes à 2ª etapa do ensaio nº 5.

TABELA 4.7 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose, de crescimento celular e produtividade em células para o ensaio nº5 (3^a e 4^a etapas).

t (h)	X (g/ℓ)	S (g/ℓ)	S' (g/ℓ)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μX (g/ℓ.h)
54	6,4	1,02	1,49	0,372	0,458	0,209	1,34
55	7,1	1,02	1,49	0,336	0,413	0,192	1,36
56	7,7	1,02	1,49	0,309	0,381	0,178	1,37
57	8,3	1,02	1,49	0,287	0,353	0,166	1,38
58	8,8	1,02	1,49	0,271	0,333	0,157	1,38
59	9,3	1,02	1,49	0,256	0,315	0,154	1,43
60	9,8	1,02	1,49	0,243	0,299	0,148	1,45
61	10,3	1,02	1,49	0,232	0,286	0,144	1,48
62	10,7	1,02	1,49	0,223	0,274	0,139	1,49
63	11,1	1,02	1,49	0,215	0,264	0,136	1,51
64	11,5	1,02	1,49	0,207	0,255	0,135	1,55
65	11,9	1,02	1,49	0,200	0,246	0,127	1,51
66	12,2	1,02	1,49	0,196	0,241	0,125	1,52
67	12,5	1,02	1,49	0,191	0,234	0,126	1,58
68	12,8	1,02	1,49	0,186	0,229	0,120	1,54
69	13,0	1,02	1,49	0,183	0,225	0,115	1,50
70	13,2	1,02	1,49	0,181	0,222	0,113	1,49
71	13,4	1,02	1,49	0,179	0,220	0,109	1,46
72	13,5	1,02	1,49	0,177	0,218	0,107	1,44
73	13,6	1,02	1,49	0,176	0,216	0,106	1,44
74	13,6	1,02	1,49	0,175	0,216	0,102	1,39
75*	13,6	1,02	1,49	0,175	0,216	0,111	1,51
76	13,9	1,02	1,49	0,166	0,205	0,116	1,61
77	14,2	1,02	1,49	0,163	0,201	0,117	1,66
78	14,5	1,02	1,49	0,160	0,197	0,114	1,65
79	14,7	1,02	1,49	0,158	0,194	0,113	1,66
80	14,9	1,02	1,49	0,155	0,191	0,112	1,67
81	15,1	1,02	1,49	0,153	0,188	0,110	1,66

Continua

Continuação da Tabela 4.7

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/l.h)
82	15,3	1,02	1,49	0,151	0,186	0,108	1,65
83	15,5	1,02	1,49	0,150	0,184	0,107	1,65
84	15,6	1,02	1,49	0,148	0,182	0,099	1,54
85	15,5	1,02	1,49	0,149	0,183	0,075	1,16
86	14,8	1,02	1,49	0,156	0,192	0,053	0,78
87	14,2	1,02	1,49	0,163	0,200	0,075	1,07
88	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,093	1,34
89	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37
90	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37
91	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37
92	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37
93	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37
94	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37
95	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37
96	14,1	1,02	1,49	0,164	0,202	0,097	1,37

* Instante em que foi feita a mudança de ϕ .

FIGURA 4.IX. Variação com o tempo, das velocidades específicas de consumo de sacarose ($\mu_{(s'-s)}$) e de AR (μ_s) referentes às 3ª e 4ª etapas do ensaio nº 5.

FIGURA 4.X. Variação, com o tempo, da velocidade específica de crescimento celular (μ) e da produtividade de células (μX) referentes à 3^a e 4^a etapas do ensaio nº 5.

4.5.2.2 Ensaio nº 6

Este ensaio será analisado em 2 etapas. Os resultados são mostrados nas figuras 3.IX, 4.XI e 4.XII e nas tabelas 3.15 e 4.8.

A) 1ª etapa

A utilização das seguintes condições experimentais:

$$F = 711 \text{ ml/h}; D = 0,23 \text{ h}^{-1}; \Phi = 1 \text{ l/l.min}; N = 500 \text{ min}^{-1}$$

permitiram o estabelecimento de regime transiente, conforme se pode depreender das figuras 3.IX e 4.12 ($\mu = f(t)$).

Os perfis de μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ são similares, mostrando, tal como na 2ª etapa do ensaio nº 5, um acoplamento entre a decomposição da sacarose e a metabolização dos açúcares redutores. Por outro lado v e $\mu_{(S'-S)}$ são funções nitidamente distintas, pois aquela é decrescente e esta crescente.

Comparando $v = f(t)$ e $\mu_X = f(t)$ nota-se que ambas são funções decrescentes. Associando-se retas de mínimos quadrados aos pontos situados entre $t = 12\text{h}$ e $t = 35\text{h}$ tanto para v como para μ_X , encontrou-se os respectivos valores para r : 0,94 e 0,93. Os correspondentes valores críticos de r para 99% de probabilidade são: 0,62 e 0,54 (32).

Entre os instantes $t = 35\text{h}$ e $t = 45\text{h}$, v e μ_X , aparentemente, não apresentam correlação. Não se encontrou justificativa para tal fato.

Pela figura 3.IX verifica-se que os valores de v oscilam ao longo do tempo, sendo o P.O.M. igual a 4,4 h.

B) 2^a etapa

O uso das seguintes condições experimentais:

$$F = 704 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\Phi = 2 \text{ g/g.min}$$

$$N = 700 \text{ min}^{-1}$$

permitiram o estabelecimento de regime transiente, conforme se pode inferir das figuras 3.IX e 4.XII ($\mu = f(t)$). Contudo deve-se ressaltar que a partir do instante $t = 60\text{h}$ o sistema parece ter atingido regime estacionário.

A análise comparada dos perfis de μ_S , $\mu(S'-S)$ e v conduzem a resultados análogos aos da etapa anterior.

Considerando o intervalo entre $t = 45\text{h}$ e $t = 60\text{h}$ nota-se que v e μ_X são funções crescentes, embora não tenha sido possível ajustar retas de mínimo quadrado que tivessem significado estatístico.

TABELA 4.8 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose, de crescimento celular e produtividade em células para o ensaio nº 6.

t (h)	X (g/ℓ)	S (g/ℓ)	S' (g/ℓ)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μX (g/ℓ.h)
0	3,90	1,00	1,40	1,39	1,70	0,256	0,998
1	4,00	1,10	1,55	1,36	1,66	0,261	1,04
2	4,15	1,15	1,60	1,31	1,59	0,272	1,13
3	4,35	1,30	1,70	1,25	1,50	0,270	1,18
4	4,50	1,40	1,85	1,21	1,45	0,260	1,17
5	4,62	1,50	1,95	1,18	1,41	0,252	1,16
6	4,70	1,62	2,10	1,16	1,38	0,233	1,10
7	4,65	1,72	2,20	1,17	1,39	0,219	1,02
8	4,60	1,85	2,30	1,18	1,40	0,219	1,01
9	4,55	2,00	2,40	1,20	1,40	0,219	0,996
10	4,50	2,12	2,50	1,21	1,41	0,213	0,959
11	4,40	2,22	2,65	1,24	1,42	0,210	0,924
12	4,32	2,35	2,75	1,26	1,45	0,216	0,933
13	4,28	2,50	2,90	1,27	1,46	0,216	0,924
14	4,20	2,65	3,05	1,29	1,49	0,215	0,903
15	4,15	2,70	3,20	1,31	1,50	0,218	0,905
16	4,10	2,85	3,35	1,32	1,50	0,218	0,894
17	4,05	3,00	3,50	1,33	1,50	0,218	0,883
18	4,00	3,10	3,70	1,31	1,49	0,218	0,872
19	3,95	3,18	3,90	1,31	1,49	0,220	0,869
20	3,92	3,20	4,10	1,32	1,51	0,224	0,878
21	3,90	3,22	4,33	1,34	1,53	0,227	0,885
22	3,90	3,25	4,33	1,36	1,55	0,227	0,885
23	3,88	3,28	4,33	1,38	1,56	0,226	0,877
24	3,87	3,35	4,33	1,40	1,57	0,226	0,875
25	3,85	3,45	4,33	1,42	1,57	0,225	0,866
26	3,83	3,60	4,33	1,44	1,58	0,226	0,866
27	3,82	3,75	4,33	1,45	1,59	0,227	0,867
28	3,81	3,90	4,33	1,46	1,59	0,227	0,865
29	3,80	3,98	4,33	1,45	1,59	0,229	0,870

Continua

Continuação da Tabela 4.8

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μX (g/l.h)
30	3,80	4,00	4,33	1,44	1,59	0,227	0,863
31	3,78	4,05	4,37	1,44	1,59	0,226	0,854
32	3,77	4,05	4,40	1,44	1,60	0,226	0,852
33	3,75	4,05	4,42	1,44	1,60	0,223	0,836
34	3,72	4,02	4,50	1,43	1,60	0,225	0,837
35	3,71	4,00	4,52	1,43	1,60	0,227	0,842
36	3,70	3,90	4,60	1,41	1,61	0,229	0,847
37	3,70	3,80	4,65	1,41	1,61	0,229	0,847
38	3,69	3,72	4,69	1,41	1,60	0,223	0,823
39	3,65	3,70	4,75	1,43	1,62	0,218	0,796
40	3,60	3,70	4,80	1,47	1,64	0,223	0,803
41	3,60	3,85	4,90	1,51	1,63	0,223	0,803
42	3,55	4,10	4,95	1,54	1,65	0,216	0,767
43	3,50	4,20	5,01	-	-	0,209	0,732
44	3,40	4,25	5,10	1,56	1,71	0,201	0,683
45*	3,30	4,25	5,15	1,62	1,80	0,198	0,653
46	3,45	4,20	5,00	1,66	1,84	0,276	0,952
47	3,55	4,18	4,80	1,63	1,81	0,275	0,976
48	3,70	4,08	4,60	1,54	1,75	0,271	1,00
49	3,78	3,90	4,40	1,49	1,72	0,261	0,987
50	3,86	3,65	4,20	1,43	1,70	0,262	1,01
51	3,95	3,20	4,15	1,35	1,66	0,259	1,02
52	4,01	2,85	3,90	1,33	1,62	0,256	1,03
53	4,08	2,65	3,80	1,33	1,61	0,253	1,03
54	4,12	2,53	3,70	1,36	1,61	0,248	1,02
55	4,15	2,53	3,50	1,37	1,61	0,250	1,04
56	4,20	2,53	3,40	1,35	1,58	0,246	1,03
57	4,20	2,53	3,30	1,35	1,59	0,242	1,02
58	4,22	2,53	3,22	1,34	1,58	0,246	1,04
59	4,25	2,53	3,20	1,34	1,57	0,246	1,05
60	4,27	2,53	3,15	1,33	1,56	0,246	1,05
61	4,30	2,53	3,04	1,32	1,55	0,243	1,05
62	4,30	2,53	3,04	1,32	1,55	0,242	1,04
63	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,242	1,05

Continua

Continuação da Tabela 4.8

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S (g/l)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	μX (g/l.h)
64	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
65	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
66	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
67	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
68	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
69	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
70	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
71	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04
72	4,32	2,53	3,04	1,31	1,54	0,240	1,04

FIGURA 4.XI. Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de AR (μ_S) referentes ao ensaio nº 6. O gráfico A mostra o perfil da curva usada para interpolar os valores de $(S'-S)$ utilizados para calcular $\mu_{(S'-S)}$. O perfil da curva usado para interpolar os valores de S para o cálculo de μ_S é mostrado na figura 3.IX do item 3.5.6.

FIGURA 4.XII. Variação, com o tempo, da velocidade específica de crescimento celular (μ) e da produtividade de em células (μX) referentes ao ensaio nº 6.

4.5.2.3 Ensaio nº 7

Pela figura 3.X nota-se claramente que, o processo fermentativo contínuo realizado nas seguintes condições:

$$F = 725 \text{ ml/h}; \quad D = 0,23 \text{ h}^{-1}; \quad \phi = 2 \text{ l/l.min}; \quad N = 700 \text{ min}^{-1}$$

Permitiu o estabelecimento de regime estacionário a partir do instante $t = 12\text{h}$.

O patamar obtido se manteve por 42 h, com os seguintes valores médios:

$$\begin{aligned} \bar{X} &= 3,71 \text{ g/l} & \bar{S}' &= 6,55 \text{ g/l} \\ \bar{S} &= 5,14 \text{ g/l} & \bar{v} &= 0,161 \text{ gART/g cēl.min} \end{aligned}$$

As velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de AR e consumo de sacarose são, respectivamente, iguais a $0,23 \text{ h}^{-1}$; $1,5 \text{ h}^{-1}$ e $1,41 \text{ h}^{-1}$. A produtividade em células foi de $0,85 \text{ g/l.h}$.

Durante todo o período de duração do patamar o valor de v oscilou, sendo o P.O.M. de $4,2 \text{ h}$.

Conforme mostrado na figura 3.X, entre os instantes $t = 48\text{h}$ e $t = 51\text{h}$ foram feitas amostragens de $0,5$ em $0,5 \text{ h}$. Nota-se que neste intervalo de tempo surgiram dois picos, mostrando que, provavelmente, a oscilação observada, fazendo-se amostragem de $1,5$ em $1,5 \text{ h}$, nada mais é que o resultado da somatória de oscilação mais rápidas, e cujo período médio não foi possível determinar nas condições deste ensaio.

4.5.2.4 Ensaio nº 10

Entre os instantes $t = 0h$ e $t = 19 h$ as condições operacionais foram análogas às do ensaio nº 4. Os resultados obtidos nesta fase já foram discutidos no item 4.5.1.6.

A partir de $t = 19$ foram provocadas, de 12 em 12 h, perturbações por impulso pela adição de uma só vez à dorna de uma mistura adequada de sais, conforme descrito em 3.5.11. Como consequência o sistema passou a regime transiente, o qual está ilustrado nas figuras 3.XIII e 4.XIV ($\mu = f(t)$).

Em todos os ensaios realizados até o momento, as perturbações de naturezas diferentes foram feitas de modo descontínuo. Este ensaio, por sua vez, foi idealizado para verificar o comportamento de $v = f(t)$ frente a perturbações de mesma natureza e provocadas periodicamente.

O intervalo transcorrido entre duas perturbações consecutivas foi fixado em torno de 12 h, correspondendo a, aproximadamente, 3 tempos de residência. Nessas condições garantiu-se que, ao se provocar nova perturbação, a concentração dos ingredientes adicionados no impulso anterior já era praticamente desprezível.

Pela figura 3.XIII observa-se que o comportamento de v ao longo de todo o ensaio não se altera significativamente. No entanto se olharmos com mais aten-

ção para os valores de v antes e logo após o impulso, verifica-se a ocorrência de variações da ordem de 70%, 56%, 76% e 79%, respectivamente, para a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a perturbações.

Considerando-se os perfis de μ_S , $\mu_{(S'-S)}$, v e μ_X das figuras 4.XIII e 4.XIV, cujos dados são mostrados na tabela 4.9, depreende-se que não existe correlação entre eles, exceto no caso de μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ que, conforme já verificado em ensaios anteriores, apresentam certa similaridade.

Outrossim deve ser mencionado que os valores de v oscilaram durante todo o ensaio, sendo o P.O.M. de 4,7 h.

TABELA 4.9 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose, de crescimento celular e produtividade em células para o ensaio nº 10.

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/l.h)
21	1,35	6,00	21,4	1,84	1,94	0,230	0,311
22	1,35	6,00	21,1	1,89	1,99	0,249	0,336
23	1,40	6,00	20,8	1,87	1,97	0,255	0,357
24	1,42	6,00	20,3	1,96	2,06	0,265	0,376
25	1,50	6,00	20,0	2,00	2,10	0,283	0,425
26	1,58	6,00	19,5	2,01	2,10	0,277	0,438
27	1,65	6,00	18,9	2,04	2,09	0,282	0,465
28	1,75	6,10	18,3	2,04	2,06	0,273	0,478
29	1,80	6,18	17,7	2,13	2,15	0,266	0,479
30	1,88	6,20	17,0	2,18	2,16	0,257	0,483
31	1,90	6,45	16,2	2,22	2,07	0,243	0,462
32*	1,93	6,85	16,2	1,91	1,74	0,230	0,444
33	1,90	7,00	16,5	1,72	1,64	0,217	0,412
34	1,88	7,00	16,9	1,62	1,63	0,219	0,412
35	1,86	6,80	17,1	1,52	1,70	0,222	0,413
36	1,85	6,40	17,2	1,35	1,71	0,219	0,405
37	1,82	5,40	17,1	1,37	1,96	0,222	0,404
38	1,82	4,80	16,9	1,57	1,97	0,238	0,433
39	1,85	4,70	16,6	1,89	2,00	0,252	0,466
40	1,90	5,40	16,1	2,50	2,14	0,252	0,479
41	1,93	7,00	15,6	2,77	2,18	0,256	0,494
42*	2,00	7,50	15,0	2,21	2,07	0,268	0,536
43	2,08	7,20	14,6	1,84	2,03	0,259	0,539
44	2,12	6,30	14,3	1,64	1,98	0,247	0,524
45	2,15	5,90	14,1	1,72	1,91	0,249	0,535
46	2,20	5,80	14,1	1,71	1,82	0,246	0,541
47	2,22	5,78	14,1	1,69	1,78	0,241	0,535
48	2,25	5,78	14,2	1,67	1,79	0,243	0,547
49	2,28	5,60	14,0	1,82	2,00	0,241	0,549
50	2,30	5,40	12,8	2,21	2,35	-	-

Continua

Continuação da Tabela 4.9

t	X	S	S'	$\mu(S'-S)$	μ_S	μ	μX
(h)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g/l.h)
51	2,28	5,50	11,8	2,12	2,12	0,219	0,500
52	2,25	5,90	12,2	1,86	1,71	0,212	0,477
53	2,20	6,50	13,0	1,81	1,59	0,210	0,455
54*	2,15	6,90	13,6	1,77	1,58	0,210	0,445
55	2,10	7,20	14,4	1,72	1,54	0,194	0,407
56	2,00	7,40	15,1	1,70	1,54	0,180	0,360
57	1,90	7,50	15,8	1,67	-	0,177	0,336
58	1,80	7,40	16,4	1,73	1,68	0,202	0,364
59	1,80	7,30	16,7	1,76	1,78	0,244	0,439
60	1,85	7,00	16,8	1,63	1,82	0,257	0,475
61	1,90	6,40	16,6	1,53	1,97	0,269	0,511
62	2,00	5,30	16,0	1,57	2,12	0,263	0,526
63	2,03	4,80	15,4	1,80	2,09	0,255	0,518
64	2,10	4,90	14,7	2,11	2,16	0,254	0,533
65	2,13	5,40	14,0	2,40	2,20	0,253	0,539
66	2,20	6,40	13,4	2,21	1,98	0,254	0,559

* Instantes em que foram provocados os impulsos.

FIGURA 4.XIII. Variação, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de AR (μ_S) referentes ao ensaio nº 10. O perfil do gráfico A foi usado para interpolar os valores de $(S'-S)$ para o cálculo de $\mu_{(S'-S)}$. O perfil da curva utilizado para interpolar os valores de S para o cálculo de μ_S é mostrado na figura 3.XIII do item 3.5.11.

FIGURA 4.XIV. Variação, com o tempo, da velocidade específica de crescimento celular (μ) e da produtividade em células (μX) referentes ao ensaio nº 10.

4.5.2.5 Ensaio nº 11

Pela figura 3.XIV nota-se nitidamente que, o processo fermentativo contínuo realizado nas seguintes condições:

$$F = 729 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\phi = 2 \text{ l/l.min}$$

$$N = 700 \text{ min}^{-1}$$

permitiu o estabelecimento de regime estacionário a partir do instante $t = 18 \text{ h}$.

O patamar obtido se manteve por 42h, com os seguintes valores médios:

$$\bar{X} = 3,40 \text{ g/l}$$

$$\bar{S} = 4,50 \text{ g/l}$$

$$\bar{S}' = 6,25 \text{ g/l}$$

$$\bar{v} = 0,148 \text{ gART/g c\~{e}l.min}$$

As velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de AR e consumo de sacarose são, respectivamente, iguais a $0,24 \text{ h}^{-1}$; $1,62 \text{ h}^{-1}$ e $1,54 \text{ h}^{-1}$. A produtividade em células foi de $0,82 \text{ g/l.h}$.

Durante todo o período de duração do patamar o valor de v oscilou, sendo o P.O.M. de 6,5 h.

Após $t = 75\text{h}$, quando a alimentação de mosto foi interrompida, nota-se, pela figura 3.XV, que o sistema mostrou forte tendência para retornar ao estado inicial, isto é, para a fase descontínua do ensaio. Isto mostra que a capacidade funcional das células, considerada em termos glo-

bais, sofre pequena ou nenhuma influência pelo fato das mesmas terem sido submetidas ao cultivo contínuo.

Conforme descrito no item 3.5.12, entre os instantes $t = 48h$ e $t = 51h$ de processo contínuo, fizeram-se amostragens de 10 em 10 min, sendo os resultados mostrados na tabela 3.27 e no gráfico 3.XVIA. Por conseguinte, cada oscilação dos valores de v observada para intervalos de amostragem mais longos, representaria, na realidade, um conjunto de oscilações mais rápidas, cujo período não foi possível detectar nas nossas condições de trabalho.

4.5.2.6 Comentários sobre o item 4.5.2

Analisando o grupo de ensaios realizados com borbulhamento de ar e com mosto suplementado pode-se dizer:

a) o regime transiente foi obtido nas condições seguintes:

- 1) $F = 692 \text{ ml/h}$; $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$; $N = 500 \text{ min}^{-1}$.
- 2) $F = 290 \text{ ml/h}$; $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$; $N = 500 \text{ min}^{-1}$.
- 3) $F = 268 \text{ ml/h}$; $D = 0,097 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$; $N = 500 \text{ min}^{-1}$.
- 4) $F = 711 \text{ ml/h}$; $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$; $N = 500 \text{ min}^{-1}$.
- 5) $F = 704 \text{ ml/h}$; $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$; $N = 700 \text{ min}^{-1}$.
- 6) $F = 713 \text{ ml/h}$; $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$; $N = 500 \text{ min}^{-1}$.

b) o regime estacionário foi obtido nas seguintes condições:

- 1) $F = 725 \text{ ml/h}$; $D = 0,23 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$; $N = 700 \text{ min}^{-1}$.
- 2) $F = 729 \text{ ml/h}$; $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$; $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$; $N = 700 \text{ min}^{-1}$.

c) Em regime transiente, quaisquer que sejam as condições operacionais, os perfis de μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ são similares, indicando o provável acoplamento entre a decomposição da sacarose e a assimilação dos açúcares redutores, intermediada pela presença da invertase na parede celular da levedura.

d) Em regime transiente não existe correlação aparente entre v e $\mu_{(S'-S)}$.

e) De um modo geral, em regime transiente o comportamento de v e μ_X depende das condições operacionais. Assim, ambas são funções crescentes do tempo para as condições dos ensaios nº 5 (2ª etapa) e nº 6 (2ª etapa); decrescentes do tempo para o ensaio nº 6 (1ª etapa); para o ensaio nº 5 (3ª etapa) $v = f(t)$ é crescente e $\mu_X = f(t)$ decrescente. Para os ensaios nº 5 (4ª etapa) e nº 10 (2ª etapa) nada se pode dizer sobre a tendência geral destes dois parâmetros.

Ressalte-se que, do ponto de vista da produção de invertase, as condições nas quais v e μ_X são crescentes merecem especial atenção. Mesmo nestes casos é importante notar que um aumento de μ_X não implica num aumento proporcional de v . Assim, para o ensaio nº 5 (2ª etapa), considerando o intervalo entre os instantes $t = 27h$ e $t = 47h$, μ_X e v variam cerca de 67 e 30%, respectivamente. Contudo para o ensaio nº 6 (2ª etapa), levando em conta o intervalo entre os instantes $t = 46h$ e $t = 60h$, as variações de μ_X e v são, respectivamente, de 9 e 44%.

f) Comparando as perturbações provocadas pela adição de nutrientes nos ensaios de nº 5 (2^a etapa) e nº 10 (2^a etapa), é patente que a perturbação por degrau causa sobre o sistema um efeito mais intenso do que a perturbação por impulso.

g) Considerando, apenas, as perturbações por degrau, as quais, em princípio, podem ser provocadas pela alteração de um ou mais dos diversos parâmetros operacionais, a que apresentou efeito mais intenso sobre v foi a adição de nutrientes ao mosto.

h) Tanto em regime transiente como no estacionário os valores de v oscilam. Provavelmente o período de oscilação real não é superior a 10 min.

i) Os períodos de oscilação médios (P.O.M.), exceptuando-se a 2^a etapa do ensaio nº 6, são de mesma magnitude tanto para regime transiente como estacionário.

4.5.3 Ensaio com mosto não suplementado e sem borbulhamento de ar

4.5.3.1 Ensaio nº 8

Pela figura 3.XI nota-se claramente que, o processo fermentativo contínuo realizado nas seguintes condições:

$$F = 735 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

permitiu o estabelecimento de regime estacionário a partir do instante $t = 3h$.

O patamar obtido se manteve durante 40h, com os seguintes valores médios:

$$\bar{X} = 1,25 \text{ g/l}$$

$$\bar{S} = 4,92 \text{ g/l}$$

$$\bar{S}' = 15,3 \text{ g/l}$$

$$\mu_D = 0,24 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_S = 2,96 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu(S' - S) = 2,71 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_X = 0,30 \text{ g/l.h}$$

$$\bar{v} = 0,081 \text{ gART/g c\text{el}.min}$$

Outrossim deve ser destacado que durante todo o período de duração do patamar o valor de v oscilou, sendo o período médio de oscilação igual a 6,1 h.

4.5.4 Ensaio com mosto suplementado e sem borbulhamento de ar

4.5.4.1 Ensaio nº 9

Pela figura 3.XII observa-se que as condições seguintes :

$$F = 770 \text{ ml/h}$$

$$D = 0,26 \text{ h}^{-1}$$

$$N = 500 \text{ min}^{-1}$$

permitiram o estabelecimento de regime estacionário a partir do instante $t = 9 h$.

O patamar manteve-se durante 36h, com os seguintes valores médios:

$$\bar{X} = 1,60 \text{ g/l}$$

$$\bar{S} = 3,52 \text{ g/l}$$

$$\bar{S}' = 10,9 \text{ g/l}$$

$$\mu_D = 0,26 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_S = 2,73 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu(S'-S) = 2,33 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_X = 0,40 \text{ g/l.h}$$

$$\bar{v} = 0,099 \text{ gART/g cél.min}$$

Durante todo o período de duração do patamar os valores de v oscilaram, sendo o P.O.M. de 4,6 h.

4.6 ENSAIO DESCONTÍNUO COM MELAÇO SUPLEMENTADO E COM BORBULHAMENTO DE AR

4.6.1 Ensaio nº 12

Analisando-se as figuras 3.XVII e 4.XV, cujos dados estão mostrados, respectivamente, nas tabelas 3.30 e 4.10, nota-se:

- a) devido à própria natureza do ensaio estabeleceu-se no sistema o regime transiente;
- b) $\mu(S'-S)$ decresce com o tempo, tornando-se praticamente desprezível a partir do instante $t = 3h$;
- c) $\mu_S = f(t)$ é uma função que apresenta valores máximos nos instantes $t = 1h$ ($2,98h^{-1}$) e $t = 4h$ ($3,16h^{-1}$) e mínimos em $t = 0,5h$ ($0,32 h^{-1}$) e $t = 5,5h$ ($0,55 h^{-1}$);

- d) $\mu = f(t)$ atingiu o máximo valor em $t = 2h$. A análise do perfil mostra que não se estabeleceu uma fase de crescimento exponencial;
- e) $v = f(t)$, após rápida oscilação entre $t = 0h$ e $t = 1,5h$, decresceu continuamente até chegar a um valor mínimo em $t = 4h$ ($0,100 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$). A partir deste instante passou a crescer até atingir o valor de $0,700 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$ ($t = 6h$), permanecendo, a seguir, praticamente constante.

Pela tabela 4.11, fica claro que durante todo o ensaio a atividade invertásica específica sempre foi superior às demais. Mesmo para $t = 4h$, onde v é mínima, ela é, respectivamente, cerca de 23 e 2 vezes superior a μ e μ_S , por exemplo. Isto explica porque, a partir de $t = 4h$, apesar de $\mu_{(S'-S)}$ ser desprezível, a sacarose presente no mosto continua a ser hidrolisada. Por outro lado, como $\mu_S > \mu$ sempre, então, analogamente, pode-se explicar a queda contínua da concentração de AR a partir de $t = 4h$.

Este quadro conduzirá ao ponto em que a concentração de S no mosto caia abaixo de 10 g/l (após o instante $t = 4h$). Concentrações de S desta ordem de grandeza deixam de reprimir a biossíntese de invertase (23)(34)(44), o que explica o aumento de v observado a partir de $t = 4h$.

A partir do instante $t = 6h$, quando S e S' são muito baixos, o valor de v mantém-se alto ($0,700 \text{ gART/g c\text{e}l.min}$) e, aproximadamente, constante. Isto ocorre porque a invertase presa à parede celular continua ativa, independentemente

do fato dos produtos resultantes de sua ação terem ou não participação no metabolismo celular. Em outros termos, a invertase se acha naturalmente imobilizada na célula intacta de levedura.

A técnica utilizada ao longo deste trabalho para medir a atividade invertásica descrita no Ítem 2.5.4, avalia, na verdade, a atividade total da invertase imobilizada na parede celular e não a parcela da atividade da qual resultam os açúcares redutores que são efetivamente consumidos pela célula.

A variação de v entre os instantes $t = 0h$ e $t = 1,5h$, provavelmente, seja o resultado da combinação dos seguintes efeitos:

- a) adaptação das células às novas condições;
- b) a glicose, inicialmente presente no mosto, teria a capacidade de estimular a biossíntese da invertase pela célula (35);
- c) fenômenos de repressão e desrepressão atuando simultaneamente.

TABELA 4.10 Velocidades específicas de consumo de AR,
de consumo de sacarose e de crescimento ce
lular para o ensaio nº 12.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	S' (g/l)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)
0	0,85	10,3	25,0	13,9	2,12	0,235
0,5	0,95	15,3	24,5	7,12	0,32	0,263
1	1,10	18,0	23,6	4,14	2,98	0,355
1,5	1,35	18,5	22,7	2,12	2,04	0,407
2	1,65	18,3	21,3	1,14	1,56	0,418
2,5	2,05	17,5	19,5	0,78	1,70	0,390
3	2,45	16,3	17,6	0,56	1,71	0,347
3,5	2,90	14,4	15,0	0,33	1,83	0,310
4	3,35	11,7	11,7	1,35	3,16	0,263
4,5	3,78	8,0	8,5	0	1,85	0,225
5	4,20	4,7	5,0	0	1,21	0,169
5,5	4,50	2,5	3,3	0	0,55	0,144
6	4,85	1,5	1,5	0	1,44	0,109
6,5	5,05	-	-	-	-	0,069
7	5,20	-	-	-	-	0,048
7,5	5,30	-	-	-	-	0,037
8	5,40	-	-	-	-	0,030

FIGURA 4.XV. Variação, com o tempo, de $(\mu_{(S'-S)})$, μ_S e μ referentes ao ensaio nº 12. O perfil do gráfico A foi usado para interpolar os valores de $(S'-S)$ para o cálculo de $\mu_{(S'-S)}$. O perfil da curva usado para interpolar os valores de S para calcular μ_S é mostrado na figura 3.XVII.

TABELA 4.11 Relações entre as atividades específicas: μ , μ_S , $\mu_{(S'-S)}$ e v , referentes ao ensaio nº 12.

t (h)	v/μ	v/μ_S	$v/\mu_{(S'-S)}$	μ_S/μ	$\mu_S/\mu_{(S'-S)}$	$\mu_{(S'-S)}/\mu$
0	139	15,4	2,3	9,0	0,15	59
0,5	146	120	5,4	1,2	0,04	27,1
1	81,3	9,7	7,0	8,4	0,72	11,7
1,5	131	26,2	25,2	5,0	0,96	5,2
2	39,9	10,7	14,6	3,7	1,4	2,7
2,5	28,3	6,5	14,2	4,4	2,2	2
3	24,3	5,0	15,1	4,9	3,1	1,6
3,5	22,3	3,8	20,9	5,9	5,5	1,1
4,0	22,8	1,9	-	12	-	-
4,5	29,3	3,4	-	8,2	-	0
5	72,8	10,2	-	7,2	-	0
5,5	267	70	-	3,8	-	0
6	410	31	-	13,2	-	0

4.7 ANÁLISE GERAL DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

4.7.1 Ensaio em regime estacionário

O regime estacionário foi obtido nos ensaios de número: 4, 5 (1ª etapa), 7, 8, 9, 10 (1ª etapa) e 11. Os parâmetros característicos referentes a cada um deles estão resumidos na tabela 4.12.

Verifica-se pela tabela 4.12 que μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ em cultivo sem borbulhamento de ar são pelo menos, respectivamente, 41 e 33% superiores aos obtidos em aerobiose, independente do fato do mosto ter sido ou não suplementado. Este resultado respalda-se no já bem conhecido fato de que em cultivo sem borbulhamento de ar a conversão da glicose em ATP apresenta rendimento inferior à mesma conversão realizada em aerobiose (39). Assim sendo, a célula deve remover AR do meio com maior velocidade, a fim de que ela possa ter energia suficiente para manter sua atividade metabólica. Como consequência, observa-se que, também, $\bar{v}$ em cultivo sem borbulhamento de ar é maior do que em aerobiose com mosto não suplementado. Este interrelacionamento não é de se estranhar, pois a única fonte de reserva de AR disponível para a levedura é a sacarose presente no meio, a qual só pode ser hidrolisada, nas condições operacionais empregadas, pela invertase.

Por outro lado, $\bar{v}$ em cultivo sem borbulhamento de ar é menor do que em aerobiose com mosto adicionado de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e MgSO_4 , conforme descrito em

2.1.4. Este resultado se aproxima daquele encontrado por DODYK e ROTHSTEIN (21), que mostraram que a atividade invertásica de células intactas de levedura era incrementada pela presença de íons Mg^{2+} , NH_4^+ e $H_2PO_4^-$. Contudo, deve ser salientado que, embora $\bar{v}$ nas condições referidas tenha aumentado, $\mu_{(S'-S)}$ não aumentou. O único modo de explicar isto é admitir que somente uma parcela da atividade invertásica total é efetivamente usada pela célula para decompor a sacarose e suprir suas necessidades em AR. Este resultado reforça o que foi dito por ocasião da análise do ensaio nº 12, qual seja, que a técnica de medida de v empregada, só permite avaliar a atividade total da invertase imobilizada na célula intacta de levedura.

O fator de conversão de substrato em microrganismo ($\bar{Y}$) decresce na seguinte ordem: aerobiose com mosto suplementado, aerobiose com mosto não suplementado e anaerobiose com e sem suplementação. Em termos globais $\bar{Y}$ reflete os diferentes estados metabólicos em que a levedura se encontra, quando submetida a condições ambientais distintas.

Tendo em vista os ensaios sem borbulhamento de ar nota-se que $\mu_S \approx \mu_{(S'-S)}$, independente do mosto ter sido ou não suplementado, embora a suplementação tenha propiciado um ganho de 22% em massa celular seca. De outra parte, observa-se que algo semelhante ocorre entre os ensaios realizados com borbulhamento de ar, exceto que o ganho em massa seca foi de 64% para o caso em que houve suplementação. Isto demonstra o já referido acoplamento dentro da dorna entre a decomposição da sacarose e o consumo do AR formado.

Pela figura 4.XVI fica demonstrado que a atividade enzimática específica é função crescente da velocidade de crescimento celular dentro da dorna em regime permanente. Este resultado corrobora aquele que já foi observado em vārios ensaios realizados em regime transiente.

A equação da reta ajustada aos pontos do grāfico da figura 4.XVI é:

$$\bar{v} = 0,54 + 10,66 \bar{D}\bar{X} \quad r = 0,94 \quad (4-I)$$

Procedendo-se da mesma forma para as relações: $\bar{v} = f(\mu_S \cdot \bar{X})$, $v = f(\mu_{(S'-S)} \cdot \bar{X})$ e $\mu_S \bar{X} = f(\mu_{(S'-S)} \cdot \bar{X})$ tem-se:

$$\bar{v} = -0,96 + 1,77 \mu_S \bar{X} \quad r = 0,95 \quad (4.II)$$

$$\bar{v} = -0,96 + 1,92 \bar{X} \cdot \mu_{(S'-S)} \quad r = 0,98 \quad (4.III)$$

$$\mu_S \bar{X} = 0,15 + 1,04 \bar{X} \cdot \mu_{(S'-S)} \quad r = 0,98 \quad (4.IV)$$

Os coeficientes de correlação obtidos são estatisticamente significativos, pois o valor de r crítico, para 99% de probabilidade e 5 graus de liberdade, é igual a 0,87 (32).

Comparando as equações acima, nota-se claramente, pelo coeficiente angular, que a velocidade de variação de $\bar{v}$ é maior em relação a $\bar{D}\bar{X}$, ficando demonstrado, portanto, que os valores de v obtidos ao longo deste trabalho relacionam-se com a produtividade em células. Em outros termos, representam a atividade da invertase naturalmente imobilizada na parede celular, confirmando a evidência realçada na análise do ensaio nº 12.

TABELA 4.12 Comparação dos vários parâmetros nos ensaios em que se estabeleceu regime estacionário.

Ensaio nº	Φ ($\ell/\ell\text{min}$)	Adição de nutrientes	N (min^{-1})	$\mu_S \frac{\mu(S'-S)}{(h^{-1})}$	$\bar{v}$ (*)	$\bar{X}$ (g/ ℓ)	$\bar{S}$ (g/ ℓ)	$\bar{S}'$	$\bar{Y}$	$D\bar{X}$	$\mu_S \bar{X}$ (g/ $\ell.h$)	$\mu_{(S'-S)} \bar{X}$	
8	0	não	500	2,96	2,71	4,86	1,25	4,92	15,3	0,081	0,30	3,70	3,39
9	0	sim	500	2,73	2,33	5,94	1,60	3,52	10,9	0,091	0,40	4,37	3,73
4	3	não	500	1,71	1,26	2,40	1,16	5,40	22,6	0,135	0,27	1,98	1,46
5(1 ^a et.)	3	não	500	1,63	1,82	4,62	1,40	7,60	21,2	0,146	0,34	2,28	2,55
10(1 ^a et.)	3	não	500	1,75	1,68	2,28	1,25	6,25	22,0	0,132	0,29	2,19	2,10
7	6	sim	700	1,50	1,41	9,66	3,71	5,14	6,55	0,156	0,85	5,57	5,23
11	6	sim	700	1,62	1,54	8,88	3,40	4,5	6,50	0,148	0,82	5,51	5,24

(*) $\bar{v}$ (gART/g cél.h)

$$\bar{D} = 0,239 \text{ h}^{-1} \quad S_D = 0,007 \text{ h}^{-1} \quad CV = 2,9\%$$

$$\bar{S}'_0 = 30,35 \text{ g}/\ell \quad S_{S'_0} = 1,1 \text{ g}/\ell \quad CV = 3,6\%$$

$$\bar{S}_0 = 6,49 \text{ g}/\ell \quad S_{S_0} = 0,60 \text{ g}/\ell \quad CV = 9,2\%$$

FIGURA 4.XVI. Relação entre a atividade invertásica específica média e a produtividade celular para os ensaios realizados em regime estacionário.

4.7.2 Ensaio em regime transiente

O estudo quantitativo de um sistema em regime transiente é de difícil execução, pois os parâmetros do sistema (por ex., X , S , S') variam com o tempo, impossibilitando o estabelecimento de conclusões com grande amplitude de validade.

No presente trabalho procurou-se analisar um sistema nestas condições através da análise de velocidades específicas de consumo ou formação de certos constituintes do sistema, por exemplo, transformação de um substrato limitante.

Através do balanço material, mostrado no item 1.2, deduziram-se as equações (4.V) a (4.VIII), as quais permitiram calcular parâmetros do tipo μ_S , $\mu_{(S'-S)}$ e μ , que em última análise estão intimamente relacionados ao metabolismo celular:

$$\frac{d(S'-S)_c}{dt} = \frac{d(S'-S)}{dt} - D [(S'_0 - S_0) - (S'-S)] \quad (4.V)$$

$$\frac{(dS)_c}{dt} = \frac{dS}{dt} - D (S_0 - S) - \frac{(dS)_p}{dt} \quad (4.VI)$$

$$\frac{d(S'-S)_c}{dt} = - \frac{(dS)_p}{dt} \quad (4.VII)$$

$$\mu - D = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (4.VIII)$$

Assim, verificou-se que nos ensaios (nºs 1, 2

e 3) onde o mosto não foi suplementado, tais velocidades específicas mostraram baixo grau de correlação. Outrossim, nos casos em que se usou mosto suplementado (ensaios de nº 5, 6 e 10) μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ apresentaram comportamento similar, evidenciando alto grau de correlação, que, em última instância, deve corresponder ao acoplamento entre a decomposição da sacarose e o consumo do AR. Na presença de nutrientes há uma ativação geral do metabolismo, que exigirá maior dispêndio de energia, o qual, por sua vez, estimulará a célula a aumentar a eficiência de utilização da fonte de C disponível.

Comparando v com μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ não se nota relação aparente. Mas confrontando $v = f(t)$ com $\mu X = f(t)$ nos ensaios nº 1, 2 (1ª e 2ª etapas), 5 (2ª etapa), 6 (1ª e 2ª etapas), verifica-se certo grau de correlação. São possíveis associar retas estatisticamente significativas para os ensaios nº 1, 2 (1ª etapa) e 6 (1ª etapa), que são:

Ensaio nº 1 ($t = 15h$ a $t = 54h$): (ver Figs. 3.IIb e 4.II)

$$v = 0,073 + 0,0024 t \quad r = 0,96 \quad (4.IX)$$

$$\mu X = 0,27 + 0,0028 t \quad r = 0,81 \quad (4.X)$$

Ensaio nº 2 (1ª etapa) ($t = 14h$ a $t = 43h$): (Figs. 3.III e 4.IV)

$$v = 0,092 + 0,0026 t \quad r = 0,86 \quad (4.XI)$$

$$\mu X = 0,35 + 0,0054 t \quad r = 0,91 \quad (4.XII)$$

Ensaio nº 6 (1ª etapa) ($t = 12h$ e $t = 35h$): (Figs. 3.IX e 4.XII)

$$v = 1,23 - 0,029 t \quad r = 0,94 \quad (4.XIII)$$

$$\mu X = 0,95 - 0,003t \quad r = 0,93 \quad (4.XIV)$$

A respeito das segundas etapas dos ensaios nº 2, 5 e 6 a relação crescente de v e μX ao longo do tempo só pode ser notada pela observação direta das figuras 3.III, 3.VII, 3.IX, 4.IV, 4.VIII e 4.XII.

Com relação aos ensaios nº 3, 5 (3^a e 4^a etapas) e 10 (2^a etapa) nada se pode dizer sobre a eventual correlação entre v e μX . Porém, dentre eles o único que realmente apresentou resultado inesperado foi o de nº 3, pois os demais, tendo sido submetidos a várias perturbações, não permitiram o estabelecimento de uma correlação mais nítida entre v e μX .

Considerando os coeficientes angulares das retas correspondentes aos ensaios nº 1 e 2 (1^a etapa), cuja única diferença residiu na Φ , nota-se, claramente, que μX é mais sensível à variação do teor de O_2 no meio do que v . Isto é compreensível, pois a célula tendo mais O_2 disponível, terá aumentada sua capacidade de gerar energia, a qual poderá ser empregada em reações de biossíntese, trazendo como resultado final maior produtividade em células.

É interessante ressaltar que no ensaio nº 5 ao se passar da 2^a para a 3^a etapa, cuja perturbação por degrau consistiu na diminuição brusca de D , o sistema respondeu com uma queda acentuada de v entre os instantes $t = 52,5h$ e $t = 63h$. Como o tempo de residência é da ordem de 10 h este intervalo de tempo representou a fase de adaptação das células às novas condições. As retas que se ajustam aos pontos experimentais de v , μ_S , $\mu(S'-S)$ e μX no intervalo considerado são:

$$v = 12,8 - 0,195 t \quad r = 0,98 \quad (4.XV)$$

$$\mu X = 0,165 + 0,021 t \quad r = 0,97 \quad (4.XVI)$$

$$\mu_S = 1,47 - 0,019 t \quad r = 0,93 \quad (4.XVII)$$

$$\mu_{(S'-S)} = 1,24 - 0,016 t \quad r = 0,91 \quad (4.XVIII)$$

Pelas inclinações das retas, nota-se que v , μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ decrescem simultaneamente, porém com variação cerca de 10 vezes mais acentuada para v . Este fato vem de encontro àquele já estabelecido anteriormente, qual seja, de que os valores de v determinados referem-se à atividade total da invertase imobilizada na parede celular e não à atividade que realmente supre as necessidades em AR da levedura. Se assim não fosse, seria lógico esperar variações de magnitudes equivalentes para estes parâmetros.

Ressalte-se que as perturbações por degrau pela adição de nutrientes e diminuição de D , causam respostas marcantes do sistema em regime contínuo de alimentação.

Do ponto de vista da produção de invertase, os resultados obtidos mostram que as melhores condições de trabalho são aquelas do ensaio nº 5 (1ª e 2ª etapas em conjunto). Assim, o regime estacionário obtido nas condições: 500 min^{-1} , 1 l/l.min , $D = 0,24 \text{ h}^{-1}$ e sem adição de nutrientes, seguido de uma perturbação por degrau com quantidades não limitantes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, permitiu obter células de levedura com atividade invertásica total cerca de 46% maior que a obtida no ensaio nº 6, onde a perturbação por degrau consistiu da variação da frequência do agitador (de 500 para 700 min^{-1}) e da vazão específica do ar (de 1 para 2 l/l.min), sendo que a presença de nutrientes foi mantida durante todo este ensaio. O resultado obtido no ensaio nº 5 foi cerca de 41% superior ao obtido em regime descontínuo de fermentação (ensaio nº 12).

Estudos posteriores serão feitos na tentativa de conseguir regime estacionário, no qual seja mantido o nível de atividade invertásica ao redor de 1,2 gART/g cél.min, que poderia ser útil caso se desejasse uma produção contínua de invertase.

4.7.3 Considerações finais

Em todos os ensaios realizados verifica-se, pela análise dos gráficos de $v = f(t)$, que os valores de v oscilam, independentemente do regime estabelecido no sistema e das condições operacionais empregadas.

Pela tabela 4.13 nota-se, claramente, que a variação de v não pode ser oriunda de erro experimental por duas razões, sendo uma delas a magnitude da variação e a outra a ocorrência do fenômeno em todos os ensaios.

Observando os resultados obtidos por TODA(58) e TODA et al (59) verifica-se que os autores não observaram oscilação nos valores de v , assim como não existe correlação aparente entre os valores de v e μX por eles apresentados.

Algumas razões que poderiam levar a esta discordância, seriam:

- a) emprego de espécies diferentes de levedura;
- b) uso de meios de cultura diferentes;
- c) diferentes intervalos de tempo de amostragens consecutivas.

Por outro lado, tendo em vista as peculiaridades de um sistema em regime contínuo de alimentação e em estada

do estacionário, os dados da tabela 4.13 poderiam indicar que a oscilação seria consequência da defasagem entre o tempo de geração (θ_g) e o tempo de residência, acentuado pela aleatoriedade em relação ao ciclo celular com a qual as amostragens de células foram feitas. Cumpre lembrar que um sistema desses não é sincronizado (12) (31) (42) (63), daí não ser necessário fixar um intervalo de amostragem coincidente com as fases do ciclo de vida da levedura. Mas os resultados obtidos no ensaio nº 11 entre os instantes $t=48h$ e $t=51h$, onde as amostragens foram feitas de 10 em 10 min, mostram que a oscilação ocorre a intervalos de tempo bem inferiores ao θ_g e tempo de residência, tornando, assim, esta hipótese improvável.

Conforme verificado indiretamente no ensaio nº 12 (regime descontínuo) e pelos dados apresentados por TODA (58), existe evidência de um mecanismo de repressão - desrepressão da biossíntese de invertase governado pela concentração de glicose, presente no mosto. Segundo ELORZA et al (23)(24) e CARLSON et al (15) a repressão catabólica da invertase pela glicose se dá ao nível da transcrição do DNA e da translação do RNA_m . O efeito da glicose seria o de aumentar a velocidade de degradação do RNA_m específico para a formação da invertase. Além disso, segundo os autores, este fenômeno não interfere na secreção e nem na atividade catalítica da invertase. Como nos regimes estacionários obtidos verificou-se que a concentração de AR no meio permanecia praticamente inalterada, a oscilação detectada não pode ser explicada por um mecanismo do tipo repressão-desrepressão.

Foi verificado que em culturas de S.cerevisiae em estado estacionário o volume celular médio da população, assim como o início da gemulação, estando este último vinculado a um tamanho celular mínimo, dependem do valor de D (36) (40).

A duração da fase de brotamento do S. cerevisiae numa faixa de D compreendida entre $0,66 \text{ h}^{-1}$ e $0,07 \text{ h}^{-1}$ permanece, aproximadamente, constante e é de cerca de 2h (41). Como consequência seria de esperar que, para valores baixos de D (da ordem de $0,07 \text{ h}^{-1}$), a população celular na dorna seria constituída em sua maior parte de células individuais, enquanto que para valores altos de D (da ordem de $0,66 \text{ h}^{-1}$) a população seria, predominantemente, formada por células com gêmulas. É oportuno lembrar que ao longo do nosso trabalho os regimes estacionários foram obtidos com D da ordem de $0,23 \text{ h}^{-1}$, o que, possivelmente, permitiu o estabelecimento na dorna de uma população com grau de brotamento ponderável.

A gemulação corresponde à fase do ciclo celular onde o metabolismo global da célula de levedura é mais intenso, conforme se pode depreender do quadro morfogenético descrito resumidamente no item 1.1.

A parede celular da gêmula em formação está sujeita a contínuas modificações (14), que podem se refletir sobre a atividade catalítica da invertase, a qual se encontra em maior quantidade associada a esta estrutura (3)(20) (49). Outrossim, há evidências de que boa parte da invertase extracitoplasmática esteja, mais exatamente, localizada no espaço periplasmico (4) (5). Neste caso, então, os efeitos sobre a ação da invertase deveriam ser mais pronunciados, dada

ã maior possibilidade de variação do volume desta zona. De acordo com CONWAY e DOWNEY (17) o volume do espaço periplás_mico é cerca de 11% do volume celular e, segundo ARNOLD (4) toda a invertase externa poderia se acomodar neste espaço. Além disso TKACZ (56) demonstrou que a invertase formada duran_te a gemulação é distribuída assimetricamente na superfície da gêmula. Estes fatores unidos ocasionariam posicionamen_tos distintos das moléculas da enzima durante o desenvolvi_mento celular, influenciando ora mais, ora menos acentuadamente, sobre a interação invertase-sacarose.

O tratamento das amostras, conforme descrito no ítem 2.4.2, permitiu obter suspensões de células intac_tas, viáveis e em fase de não crescimento que manteriam, a_proximadamente, as mesmas características que possuíam dentro do fermentador no momento da amostragem. Assim, a oscilação dos valores de v , medidos conforme descrito no ítem 2.5.4, po_deria ser vista como sendo o resultado da maior ou menor di_ficuldade da invertase em interagir com a sacarose, refletin_do os posicionamentos distintos de suas moléculas na zona da parede celular durante os vários estágios do ciclo reprodu_tivo.

A periodicidade do fenômeno é consequência das células terem sido formadas em cultivo contínuo, pois num sistema destes as propriedades se repetem de tempos em tem_pos (57).

Finalmente, como se depreende da tabela 4.13, o P.O.M. parece estar relacionado de algum modo com D , pois o P.O.M. para $D \approx 0,11 \text{ h}^{-1}$ é superior ao P.O.M. para $D \approx 0,23 \text{ h}^{-1}$.

TABELA 4.13 Parâmetros referentes aos ensaios de cultivo contínuo em regimes transiente e estacionário.

Ensaio nº *	Regime	D (h ⁻¹)	tempo de resid. (h)	tempo de ge- ração (h)	P.O.M (h) ***	$\bar{v}$ *****	C V para v(%) ****	Adição de Nutrientes
1	T**	0,11	9,1	-	7,8	0,149	23,5	-
2-I	T	0,11	9,1	-	11,5	0,163	14,7	-
2-II	T	0,14	7,1	-	10	0,251	8,0	-
3	T	0,23	4,3	-	4,5	0,066	51,5	-
4	E**	0,23	4,3	3	5,1	0,044	31,4	-
5-I	E	0,24	4,2	2,9	4,5	0,077	34,7	-
5-II	T	0,24	4,2	-	3,3	1,19	92,3	+
5-III	T	0,10	10	-	6	1,10	64,1	+
5-IV	T	0,10	10	-	3,3	1,06	33,1	+
6-I	T	0,23	4,3	-	4,4	0,658	51,7	+
6-II	T	0,24	4,2	-	-	0,633	26,9	+
7	E	0,23	4,3	3	4,4	0,161	15,6	+
8	E	0,24	4,2	2,9	6,1	0,081	18	-
9	E	0,25	4	2,8	4,6	0,099	26,8	+
10-I	E	0,23	4,3	3	4,8	0,038	63,2	-
10-II ^Δ	T	0,23	4,3	-	4,7	0,044	46	+
11	E	0,24	4,2	2,9	6,5	0,148	36,7	+

* O algarismo romano representa a etapa do ensaio.

** T = transiente; E = estacionário.

*** P.O.M = Período de Oscilação Médio.

**** C V = Coeficiente de variação

***** $\bar{v}$ em gART/g cêl.min

Δ Como na verdade este ensaio é constituído de 5 etapas, sendo a 1^a em regime estacionário e as demais transiente, os valores de $\bar{v}$ e C V apresentados representam a média destes parâmetros entre as etapas: 2^a, 3^a, 4^a e 5^a. Foi feito isto por questão de conveniência (ver texto para maiores detalhes).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições experimentais descritas nesta Tese permitem concluir:

1. Para uma dada composição do meio, a técnica adotada no preparo do inóculo permitiu obter suspensões de leveduras com praticamente mesma concentração celular e mesma atividade invertásica específica.
2. Nas primeiras horas dos ensaios de cultivo contínuo, a atividade invertásica específica da levedura apresentou acentuado decréscimo, refletindo prováveis alterações do metabolismo celular naqueles períodos.
3. A atividade invertásica específica da levedura oscilou em todos os ensaios de cultivo contínuo.
4. O valor real do período de oscilação da atividade invertásica específica da levedura em cultivo contínuo não é superior a 10 min.
5. Nos ensaios em regime transiente não foi observada correlação entre a atividade invertásica específica e a velocidade específica de consumo da sacarose.

6. Nos ensaios, em regime transiente, com borbulhamento de ar e mosto suplementado, os perfis das variações, com o tempo, das velocidades específicas de consumo de AR e de consumo de sacarose foram semelhantes, indicando provável acoplamento entre a hidrólise da sacarose e a assimilação dos açúcares redutores, intermediada pela presença da invertase na parede celular.
7. Considerando apenas as perturbações do sistema provocadas por adição de nutrientes, verificou-se que a perturbação por degrau causou um efeito mais intenso na atividade invertásica específica do que a perturbação por impulso.
8. Entre as várias perturbações por degrau efetuadas, a que apresentou maior influência sobre a atividade invertásica específica foi a provocada por adição de nutrientes.
9. Nos ensaios em regime estacionário, a atividade invertásica específica média diminuiu na seguinte sequência: a) cultivo com borbulhamento de ar e mosto suplementado; b) cultivo sem borbulhamento de ar e mosto suplementado ou não; c) cultivo com borbulhamento de ar e mosto não suplementado.
10. Em regime permanente, a atividade invertásica específica média é função crescente da velocidade de crescimento celular:

$$\bar{v} = 0,54 + 10,66 \bar{D\bar{X}} \quad (r = 0,94)$$

11. Em regime permanente, as seguintes equações foram obtidas:

$$\begin{aligned}\bar{v} &= -0,96 + 1,77 \mu_S \cdot \bar{X} & (r= 0,95) \\ \bar{v} &= -0,96 + 1,92 \mu_{(S'-S)} \cdot \bar{X} & (r= 0,98) \\ \mu_S \cdot \bar{X} &= 0,15 + 1,04 \mu_{(S'-S)} \cdot \bar{X} & (r= 0,98)\end{aligned}$$

12. A velocidade de crescimento celular é mais sensível do que a atividade invertásica específica à velocidade de fornecimento de oxigênio ao meio.

13. A variação da atividade invertásica específica no decorrer do cultivo descontínuo pode ser atribuída a um mecanismo de repressão-desrepressão relacionado com a concentração de glicose presente no meio.

14. A oscilação da atividade invertásica específica, observada em todos os ensaios de cultivo contínuo, pode ser compreendida, pelo menos em parte, como resultante da maior ou menor dificuldade de interação entre a invertase e a sacarose, em consequência dos distintos posicionamentos das moléculas da enzima na parede celular durante os estágios do ciclo reprodutivo das células.

15. Os maiores valores de atividade invertásica específica foram obtidos quando um cultivo contínuo, com mosto não suplementado e com $\Phi = 1 \text{ l/l.min}$, $D \approx 0,24 \text{ h}^{-1}$ e $N=500 \text{ min}^{-1}$, foi submetido a uma perturbação por degrau por adição de nutrientes.

6. RESUMO

Mediu-se a atividade invertásica de células intactas de levedura (*S. cerevisiae*) cultivadas por processo contínuo em meio preparado a partir de melaço de cana-de-açúcar, nas seguintes condições:

a) aerobiose, com adição de nutrientes ao meio

$$D(h^{-1}): 0,10 \text{ e } 0,24$$

$$\Phi(l/l.min): 1 \text{ e } 2$$

$$N(min^{-1}): 500 \text{ e } 700$$

b) aerobiose, sem adição de nutrientes ao meio

$$D(h^{-1}): 0,11; 0,14 \text{ e } 0,23$$

$$\Phi(l/l.min): 1 \text{ e } 2$$

$$N(min^{-1}): 500$$

c) anaerobiose, com e sem adição de nutrientes ao meio

$$D(h^{-1}): 0,24$$

$$N(min^{-1}): 500$$

Nas condições referidas obtiveram-se cultivos contínuos em regime permanente e transiente.

Realizou-se, também, cultivo descontínuo de células (mosto suplementado, $\Phi = 2 \text{ l/l.min}$ e $N = 500 \text{ min}^{-1}$), constatando-se que a atividade invertásica específica (v) variava no decorrer do processo.

A análise dos resultados deste ensaio permitiu concluir que a variação de v poderia ser o resultado de um mecanismo de repressão-desrepressão controlado pela concentração de glicose no meio. Outrossim, o valor constante de v no final do processo refletiria o fato de que a enzima na realidade está imobilizada na parede celular.

No caso dos cultivos contínuos foi observado que os valores de v , em função do tempo, oscilaram, sendo que o período de oscilação não foi maior que 10 min. Outrossim, deve ser destacado que o P.O.M da atividade invertásica guardou certa dependência com as condições operacionais usadas nos ensaios. Assim, no caso de cultivos em aerobiose com mosto não suplementado o P.O.M de v em regime permanente é menor do que em regime transiente. De outra parte, no caso de cultivos em aerobiose com mosto suplementado o P.O.M foi de mesma magnitude tanto em regime transiente como permanente.

Através de balanços materiais adequados foi possível calcular as velocidades específicas de crescimento celular (μ), de consumo de AR (μ_S) e de consumo de sacarose ($\mu_{S'-S}$) em função do tempo. Em regime transiente não se encontrou nenhuma lei que correlacionasse estas velocidades específicas entre si. Contudo, nos casos em que foi empregado mosto acrescido de nutrientes, verificou-se graficamente que deve existir uma correlação entre μ_S e $\mu_{(S'-S)}$, o que evidenciaria o acoplamento existente entre a decomposição da sacarose e o consumo de AR pelas células, intermediada pela invertase. Ressalte-se, também, que v e $\mu_{(S'-S)}$ não mostraram correlação aparente, o que é de se estranhar, pois nas condições de trabalho a hidrólise da sacarose só poderia se dar por via enzimática.

Em regime transiente observou-se que a atividade invertásica específica apresentava alguma correlação com a velocidade de crescimento celular (μX). Dependendo das condições do experimento v e μX eram funções crescentes ou decrescentes com o tempo. Esta correlação ficou bem demonstrada nos cultivos em regime permanente, onde $\bar{v}$ era função crescente de μX , obedecendo à relação:

$$\bar{v} = 0,54 + 10,66 \mu X \quad (r = 0,94)$$

Em regime permanente foi verificado, também, que:

a) μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ para os cultivos em anaerobiose eram superiores às daquelas dos cultivos em aerobiose, independente do fato do mosto ter sido ou não suplementado;

b) $\bar{v}$ diminuía, de acordo com as condições operacionais empregadas, na seguinte ordem: cultivo em aerobiose com mosto suplementado, cultivo em anaerobiose com ou sem mosto suplementado e cultivo em aerobiose e mosto não suplementado;

c) o fator de conversão de substrato em microrganismo decresceu na seguinte ordem: cultivo em aerobiose e mosto suplementado, cultivo em aerobiose e mosto não suplementado e cultivo em anaerobiose com e sem mosto suplementado.

A correlação existente entre v e μX mostrou que os valores de v determinados referem-se à atividade global da invertase imobilizada na parede celular e não àquela parcela da atividade que gerou os açúcares redutores realmente consumidos pela célula. Além disso, do modo como foi feito o tratamento das amostras, é possível admitir que não ocorreram modificações significativas nas características morfo-fisiológicas

cas das células, representando estas a população existente na dorna no momento da amostragem. Por conseguinte a oscilação de v poderia ser vista como sendo uma variação na interação da invertase com a sacarose, devido aos posicionamentos distintos que as moléculas da enzima teriam na parede celular durante as várias etapas do ciclo celular.

SUMMARY

The invertase specific activities of intact yeast cells obtained from continuous cultures on sugar-cane molasse media were determined. The experiments were carried out under the following conditions:

a) aerated and supplemented medium:

$$D(h^{-1}): 0.10 \text{ and } 0.24$$

$$\Phi(l/l.min): 1 \text{ and } 2$$

$$N(min^{-1}): 500 \text{ and } 700$$

b) aerated and non supplemented medium:

$$D(h^{-1}): 0.11, 0.14 \text{ and } 0.23$$

$$\Phi(l/l.min): 1 \text{ and } 2$$

$$N(min^{-1}): 500$$

c) non aerated, supplemented and non supplemented medium:

$$D(h^{-1}): 0.24$$

$$N(min^{-1}): 500$$

The above conditions lead to unsteady and to steady-state cultures.

It was observed that the invertase specific activity (v) varied during a batch growth experiment carried out under the following conditions: supplemented molasses, $\Phi = 2$ $l/l.min$ and $N = 500 \text{ min}^{-1}$. The observed variation was

probably caused by a repression-desrepression phenomenon on the biosynthesis of invertase, controlled by glucose concentration in the medium. Nevertheless, v was approximately constant at the end of the process, which could be explained as a result of the enzyme immobilization on the cell wall.

It was also observed that in continuous test v oscillated, and the oscillatory period was not greater than 10 min. Otherwise, it must be enhanced that there were some correlations between average oscillatory period and the experimental conditions. Considering the aerated continuous tests carried out with non supplemented medium, it was found that average oscillatory period in steady-state was lower than in unsteady-state. Nevertheless, in aerated continuous cultures carried out with supplemented medium average oscillatory period was the same, regardless if the system would be in unsteady or steady-state.

The following parameters were calculated: specific growth rate of the yeast (μ), specific consumption rate of reducing sugar (μ_S) and specific hydrolysing rate of sucrose ($\mu_{S'-S}$). Such parameters didn't show any correlation among them during unsteady states. Nevertheless, the curves $\mu_S=f(t)$ and $\mu_{(S'-S)} = f(t)$, when supplemented molasses were used, show some correlation between μ_S and $\mu_{(S'-S)}$, which could show a coupling between sucrose hydrolysis and reducing sugar consumption by cells, intermediated by invertase. In spite of the fact that only invertase could hydrolyse sucrose under the experimental conditions used, it wasn't possible to find any correlation between $\mu_{(S'-S)}$ and v .

Otherwise, it was found a correlation between v and μ_X (growth rate) during unsteady-state. Such correlation was well demonstrated in steady-state tests:

$$\bar{v} = 0.54 + 10.66 \mu_X \quad (r = 0.94)$$

The other main features of the experimental results obtained in steady-state continuous experiments are:

a) μ_S and $\mu_{(S'-S)}$, for experiments carried out under anaerobic conditions, were higher than the same parameters for experiments carried out under aerobic conditions, regardless if the molasses had been supplemented or not;

b) $\bar{v}$ varied as follows: (aerated culture with supplemented medium) > (non aerated culture with or without supplemented medium) > (aerobic culture with non supplemented medium);

c) the yield factor varied as follows: (aerated culture with supplemented medium) > (aerated culture with non supplemented medium) > (non-aerated culture with or without supplemented medium).

The correlation between v and μ_X was an evidence that the measured values of v represent the total invertase activity of the cell, and has no relation with the fraction of invertase that produced the reducing sugars assimilated by the cells.

Otherwise, it seems possible to assure that the sample manipulation did not affect the cell structure and that, consequently, the measured enzyme activity represents the actual invertase activity of the growing cells. The

oscillatory phenomena could then be considered as a variation of the invertase-sucrose interaction due to different positions of the invertase molecules on the cell wall during the cell growth.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABRAMS, B.B.; HACKEL, R.; MIZUNAGA, T.; LAMPEN, O.J.
Relationship of large and small invertases in Saccharomyces: mutant selectively deficient in small invertase. J. Bacteriol., Baltimore, 135(3):809-17, 1978.
2. AIBA, S.; HUMPHREY, E.A.; MILLIS, F.N. Engenharia bioquímica. Campinas, Editora do ITAL, 1971. p.111-37.
3. ARNOLD, W.N. The structure of the yeast cell wall: solubilization of a marker enzyme (invertase) by the autolytic enzyme system. J. Biol. Chem., Baltimore, 247(4):1161-9, 1972.
4. ARNOLD, W.N. Volume and enzyme content of the periplasmic space in yeast. Physiol. Chem. Phys., Portland, 5(2): 117-23, 1973.
5. ARNOLD, W.N. Location of acid phosphatase and β -fructofuranosidase within yeast cell envelopes. J. Bacteriol., Baltimore, 112(3):1346-52, 1972.
6. BABCZINSKI, P. Partial purification, characterization and localization of the membrane-associated invertase of yeast. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 614(1): 121-33, 1980.

*De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos estão de acordo com o Chemical Abstracts Service Source Index, Easton, 1975.

7. BACILA, M.; VILLELA, G.G.; TASTALDI, H. Técnicas e experimentos de bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1972. p.29.
8. BALLOU, C.E. Some aspects of the structure, immunochemistry and genetic control of yeast mannans. Adv.Enzymol., New York, 40:239-70, 1974.
9. BOER, P.; LINNEMANS, W.A.M.; ELBERS, P.F. Localization of acid phosphatase in S. cerevisiae: a clue to cell wall formation. J. Bacteriol., Baltimore, 131(2):638-44, 1977.
10. BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. Engenharia bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher, 1975. v.3, p. 112.
11. BORZANI, W.; GREGORI, R.E.; VAIRO, M.L.R. Some observations on oscillatory changes in the growth rate of S. cerevisiae in aerobic continuous undisturbed culture. Biotechnol. Bioeng., New York, 19:1363-74, 1977.
12. BOSTOCK, C.J.; DONACHIE, W.D.; MASTERS, M.; MITCHISON, J. M. Synthesis of enzymes and DNA in synchronous cultures. Nature, London, 210:808-10, 1966.
13. BULL, A.T. Environmental factors influencing the synthesis and excretion of exocellular macromolecules. J. Appl. Chem. Biotechnol., London, 22:261-92, 1972.
14. CABIB, B. Molecular aspects of yeast morphogenesis. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, 29:191-214, 1975.

15. CARLSON, M. & BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. Cell, Cambridge, 28:145-54, 1982.
16. CLARKE, P.H. Methods for studying enzyme regulation. Methods Microbiol., London, 6A:269-326, 1971.
17. CONWAY, E.J. & DOWNEY, M. An outer metabolic region of the yeast cell. Biochem. J., London, 47:347-55, 1950.
18. DAVIES, A. Invertase formation in S. fragilis. J. Gen. Microbiol., London, 14:109-21, 1956.
19. DEAN, A.C.R. Influence of environment on the control of enzyme synthesis. J. Appl. Chem. Biotechnol., London, 22:245-59, 1972.
20. DEMIS, D.J.; ROTHSTEIN, A.; MEIER, R. The relationship of the cell surface to metabolism. X. The location and function of invertase in the yeast cell. Arch. Biochem. Biophys., New York, 48:55-62, 1954.
21. DODYK, F. & ROTHSTEIN, A. Factors influencing the appearance of invertase in S. cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys., New York, 104:478-86, 1964.
22. ELLIOTT, S.G. & McLAUGHLIN, C.S. Rate of macromolecular synthesis through the cell cycle of the yeast S. cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Washington, 75 (9):4384-8, 1978.

23. ELORZA, M.V.; VILLANUEVA, J.R.; SENTANDREU, R. The mechanism of catabolite inhibition of invertase by glucose in S. cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 475(1):103-12, 1977.
24. ELORZA, M.V.; LOSTAU, C.M.; VILLANUEVA, J.R.; SENTANDREU, R. Invertase messenger ribonucleic acid in S. cerevisiae: Kinetics of formation and decay. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 475(4):638-51, 1977.
25. FALCONE, M. & MARQUES, A.B. Estudo sobre as condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. Tecnol. Aliment. Bebidas, São Paulo, 4:24-30, 1965.
26. FARKAS, V.; KOVARIK, J.; KOSINOVA, A.; BAUER, S. Autoradiographic study of mannan incorporation into the growing cell walls of S. cerevisiae. J. Bacteriol., Baltimore, 117(1):265-9, 1974.
27. FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., Baltimore, 250:4007-21, 1975.
28. GALLILI, G. & LAMPEN, O.J. Large and small invertases and the yeast cell cycle. Pattern of synthesis and sensitivity to tunicamycin. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 475(1):113-22, 1977.
29. GASCÓN, S.; NEUMAN, N.P.; LAMPEN, O.J. Purification of the internal invertase of yeast. J. Biol. Chem., Baltimore, 243:1567-72, 1968.

30. GORDON, C.N. & ELLIOTT, S.G. Fractionation of S.cerevisiae cell populations by centrifugal elutriation. J. Bacteriol., Baltimore, 129(1):97-100, 1977.
31. GORMAN, J.; TAURO, P.; La BERGE, M.; HALVORSON, H. Timing of enzyme synthesis during synchronous division in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 15(1): 43-9, 1964.
32. GRANER, E.A. Como aprender estatística. São Paulo, Melhoramentos, 1952. p. 119.
33. HARRISON, J.S. Baker's yeast. In: RAINBOW, C. & ROSE, A.H., ed. Biochemistry of industrial microorganisms. London, Academic Press, 1963. p. 9-30.
34. IGLESIAS, C.F.; MORENO, F.; GASCON, S. Light and intermediate molecular forms of yeast invertase as precursors of the heavy enzyme. FEBS Lett., Amsterdam, 114(1):57-60, 1980.
35. ISLAM, M.F. & LAMPEN, J.O. Invertase secretion and sucrose fermentation by S. cerevisiae protoplasts. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 58:294-302, 1962.
36. JOHNSTON, G.G.; EHRHARDT, C.W.; LORINCZ, A.; CARTER, B.L.A. Regulation of cell size in the yeast S. cerevisiae. J. Bacteriol., Baltimore, 137(1):1-5, 1979.
37. LACAZ, C.S.; MINAMI, P.T.; PURCHIO, A. O grande mundo dos fungos. São Paulo, EDUSP, 1970.

38. LAMPEN, J.O.; KUO, S.; CANO, F.R. Structural features in synthesis of external enzymes by yeast. Ferment. Technol. Today, Proc. Int. Ferment. Symp., 4th, 1972, 819-24. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 84:27875K, 1973.
39. LEHNINGER, A.L. Bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher, 1976. v.2, p.317.
40. McMURROUGH, I. & ROSE, A.H. Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of the cell wall of S. cerevisiae. Biochem. J., London, 105:189-203, 1967.
41. MEYENBURG, H.K. The budding cycle of S. cerevisiae. Pathol. Microbiol., Basel, 31:117-27, 1968.
42. MITCHISON, J.M. Enzyme synthesis in synchronous cultures. Science, Washington, 165:657-63, 1969.
43. MITCHISON, J.M. The growth of single cells. I. Schizosaccharomyces pombe. Exp. Cell Res., New York, 13(2): 244-62, 1957.
44. MORMENEO, S. & SENTANDREU, R. Regulation of invertase synthesis by glucose in S. cerevisiae. J. Bacteriol., Baltimore, 152(1):14-8, 1982.
45. NOVICK, P. & SCHEKMAN, R. Secretion and cell surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of S. cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, 76(4):1858-62, 1979.

46. OHWEILER, A.O. Teoria e prática da análise quantitativa inorgânica. Brasília, Editora Univ. Brasília, 1968. v.1, p.9.
47. PEREGO, L. Fermentação alcoólica contínua de mosto de melão: influência da concentração do mosto e da vazão específica de alimentação na estabilidade do sistema a 32°C. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1979. [Dissertação - mestrado].
48. PFAFF, J.H.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. The life of yeast. 2.ed. Cambridge, Harward University Press, 1968.
49. PREISS, W.J. The localization of invertase in the yeast cell with low voltage electrons. Arch. Biochem. Biophys., New York, 75:156-95, 1958.
50. RODRIGUES, L. Yeast invertase: subcellular distribution and possible relationship between the isoenzymes. Curr. Microbiol., New York, 1(1):41-44, 1978. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 89:159858v, 1978.
51. ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. The yeasts. London, Academic Press, 1971. v.2.
52. SAMEJIMA, H.; KIMURA, K.; ADO, Y. Recent development and future directions of enzyme technology in Japan. Biochimie, Paris, 62:299-315, 1980.
53. SANTOS, E.; VILLANUEVA, J.R.; SENTANDREU, R. - The plasma membrane of S. cerevisiae: isolation and some properties. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 508(1):39 - 54, 1978.

54. SKINNER, K.J. Enzymes technology. Chem. Eng. News, Washington, 53(33):22-41, 1975.
55. SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. J. Biol.Chem., Baltimore, 195(1):19-23, 1952.
56. TKACZ, J.S. & LAMPEN, J.O. Surface distribution of invertase on growing Saccharomyces cells. J. Bacteriol., Baltimore, 113(2):1073-5, 1973.
57. TODA, K. Induction and repression of enzymes in microbial culture. J. Chem. Technol. Biotechnol., Oxford, 31:775-90, 1981.
58. TODA, K. Invertase biosynthesis by S. carlsbergensis in batch and continuous cultures. Biotechnol. Bioeng., New York, 18:1103-15, 1976.
59. TODA, K.; TAKEUCHI, T.; SANO, H. Growth rate dependence of enzyme synthesis in chemostat cultures: α -amylase, β -galactosidase, acid phosphatase and β -fructosidase. J. Chem Technol. Biotechnol., Oxford, 29:747-55, 1979.
60. VITOLLO, M. Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (S. cerevisiae). São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1979. |Dissertação - mestrado|.
61. VITOLLO, M. Tópicos de enzimologia industrial. São Paulo, Edição do autor, 1981. p. 58.
62. WHITE, J. Yeast technology. London, Chapman and Hall, 1954. p. 62.

63. WILLIAMSON, D.H. & SCOPES, A.W. A rapid method for synchronizing division in the yeast S. cerevisiae. Nature, London, 193:256-7, 1962.
64. ZAJIK, E.J. & LeDUY, A. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. Bio-technol. Bioeng., New York, 15:805-10, 1973.

8. APÊNDICE

A tabela 8.1 tem o objetivo de ilustrar os vários passos necessários para calcular as velocidades específicas, empregadas na discussão dos resultados desta tese. Estes parâmetros foram calculados através das equações (1-III), (1-VII) e (1-IX), deduzidas no item 1.2, em associação com o método algébrico de cálculo de derivadas preconizado por ZAJIC & Le DUY (64), utilizado para determinar dS/dt , dX/dt e $d(S'-S)/dt$.

TABELA 8.1. Parâmetros intermediários indispensáveis para o cálculo de μ , μ_S e $\mu_{S'-S}$. Os dados mostrados referem-se à 2ª etapa do ensaio nº 5.

t (h)	x	s	s'	(S'-S)	(S'-S) Interp	$\frac{d(S'-S)^*}{dt}$	(**)	$\frac{d(S'-S)_c}{dt}$	$\frac{ds^*}{dt}$	$D(S_0-S)$	$\frac{(ds)_c}{dt}$	μ_S	$\mu_{(S'-S)}$	$\frac{1}{x} \frac{dx^*}{dt}$	μ	μx
		(g/L)				(g/L.h)						h^{-1}				(g/L.h)
27	1,43	7,5	20,8	13,3	13,3	0	2,629	-2,629	0	-0,239	-2,39	1,67	1,84	0,063	0,303	0,433
28	1,52	7,5	20,8	13,3	13,3	0	2,629	-2,629	0	-0,239	-2,39	1,57	1,73	0,063	0,303	0,461
29	1,62	7,5	20,8	13,3	13,3	-0,098	2,629	-2,727	0	-0,239	-2,49	1,54	1,68	0,059	0,299	0,484
30	1,71	7,5	20,6	13,1	13,1	-0,295	2,677	-2,972	0	-0,239	-2,73	1,60	1,74	0,067	0,307	0,525
31	1,85	7,5	20,1	12,6	12,7	-0,492	2,772	-3,264	0	-0,239	-3,03	1,64	1,76	0,078	0,318	0,588
32	2,00	7,5	19,5	12,0	12,1	-0,835	2,940	-3,775	-0,050	-0,239	-3,59	1,80	1,89	0,065	0,305	0,610
33	2,11	7,4	18,5	11,1	10,8	-1,52	3,227	-4,747	-0,100	-0,215	-4,63	2,19	2,25	0,078	0,318	0,671
34	2,33	7,3	16,2	8,9	8,9	-1,95	3,681	-5,631	-0,149	-0,131	-5,59	2,40	2,42	0,084	0,324	0,755
35	2,50	7,1	14,1	7,0	6,9	-1,80	4,159	-5,959	-0,373	-0,143	-6,19	2,48	2,38	0,080	0,320	0,800
36	2,73	6,5	12,0	5,5	5,3	-1,55	4,541	-6,091	-0,762	0	-6,85	2,51	2,23	0,090	0,330	0,901
37	3,00	5,5	9,5	4,0	3,8	-1,45	4,900	-6,350	-1,024	0,239	-7,61	2,54	2,12	0,103	0,343	1,03
38	3,35	4,5	7,1	2,7	2,4	-1,23	5,234	-6,464	-1,000	0,490	-7,95	2,37	1,93	0,093	0,333	1,12
39	3,62	3,5	4,5	1,0	1,3	-0,72	5,497	-6,207	-0,974	0,717	-7,90	2,18	1,71	0,077	0,317	1,15
40	3,91	2,5	3,3	0,8	0,8	-0,39	5,617	-6,007	-0,750	0,956	-7,71	1,97	1,54	0,068	0,308	1,20
41	4,15	2,0	2,5	0,45	0,5	-0,144	5,688	-5,832	-0,448	1,080	-7,36	1,77	1,41	0,053	0,293	1,22
42	4,35	1,6	2,1	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	-0,212	1,171	-7,07	1,63	1,31	0,044	0,284	1,24
43	4,53	1,6	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	-0,050	1,183	-6,92	1,53	1,26	0,036	0,276	1,25
44	4,68	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	-0,025	1,195	-6,91	1,48	1,22	0,027	0,267	1,25
45	4,78	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	0	1,195	-6,88	1,44	1,19	0,026	0,266	1,27
46	4,93	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	0	1,195	-6,88	1,40	1,15	0,027	0,267	1,32
47	5,05	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	0	1,195	-6,88	1,36	1,13	0,024	0,264	1,33
48	5,17	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	0	1,195	-6,88	1,33	1,10	0,016	0,256	1,32
49	5,22	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	0	1,195	-6,88	1,32	1,09	0,006	0,246	1,28
50	5,23	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	0	1,195	-6,88	1,32	1,09	0,003	0,243	1,27
51	5,25	1,5	2,0	0,5	0,5	0	5,688	-5,688	0	1,195	-6,88	1,31	1,08	0,003	0,243	1,28

* Calculados através do método algébrico preconizado por Le Duy e Zajic (64)

** = $0,239[24,3-(S'-S)]$.