UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

EFEITO DE FOSFATO SOBRE A MULTIPLICAÇÃO DE
Saccharomyces cerevisiae EM CULTIVO CONTÍNUO

SUNAO SATO

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. EUGÊNIO AQUARONE

São Paulo
1983

A meus pais

A minha esposa, Midory

A meus filhos, Simone e Sergey

A meus amigos

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Eugênio Aquarone, pela orientação objetiva e estímulo que deu para realizar o presente trabalho.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela formação e incentivo.

Ao Professor Shuichi Aiba, pela contribuição, idéias, críticas, sugestões e decisivo apoio à elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Takahiro Ogawa, pela dedicação e incansável colaboração.

Ao Ministério da Educação do Japão, através do Consulado em São Paulo, que proporcionou a bolsa de estudos junto à Universidade de Osaka.

Ao pessoal do Laboratório I do Departamento de Tecnologia de Fermentação da Faculdade de Engenharia de Osaka-Japão, pelo auxílio.

Aos colegas da Disciplina de Tecnologia das Fermentações e do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio prestado.

Aos amigos Masahiko Shimoda e Mitsuru Nunoda, pela colaboração e dedicação prestada no desenvolvimento da parte experimental e na tradução de textos.

À Srta. Ines Imperatriz, da Biblioteca do Conjunto das Químicas - USP, pela revisão das referências bibliográficas.

À Srta. Laura Ribeiro da Silva, pela colaboração e presteza pelo serviço de datilografia.

À todos, que direta ou indiretamente colaboraram para a execução do presente trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
NOMENCLATURA	I
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVO DO TRABALHO	13
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 - Materiais	14
3.1.1 - Microrganismos	14
3.1.2 - Manutenção de cultura	14
3.1.3 - Preparação do inóculo	14
3.1.4 - Preparação do meio de cultura	14
3.1.5 - Equipamentos e materiais auxilia- res	15
3.2 - Métodos	16
3.2.1 - Determinação de concentração celu- lar	16
3.2.2 - Determinação de glicose	18
3.2.3 - Determinação de etanol	20
3.2.4 - Determinação de fósforo no meio de cultivo	21
3.2.5 - Determinação da velocidade especí- fica de formação de dióxido de car- bono	25
3.2.6 - Determinação da velocidade especí- fica de consumo de oxigênio	25
3.2.7 - Separação de fósforo intracelular ..	26

	Pág.
3.3 - Descrição do processo experimental	29
4 - RESULTADOS	31
4.1 - Cultivo descontínuo com glicose como substrato limitante	31
4.1.1 - Cultivo em agitador rotativo	31
4.1.2 - Determinação da massa celular	35
4.2 - Cultivo contínuo com glicose como substrato limitante	38
4.3 - Cultivo contínuo com glicose como substrato limitante	41
4.4 - Recuperação de carbono em condições de glicose limitante e fosfato limitante	44
4.5 - Cultivo contínuo em condições de fosfato e glicose limitantes	48
4.5.1 - Cultivo contínuo em estado estacionário fixando-se a vazão de alimentação em $0,32 \text{ h}^{-1}$ e alterando a concentração de fosfato do meio de alimentação	48
4.5.2 - Cultivo contínuo, fixando em 3,0mM a concentração de fosfato no meio de alimentação e variando a vazão específica de alimentação	51
4.6 - Recuperação de carbono em condições de glicose limitante	55

4.7 - Cultivo contínuo em condições de glicose e de glicose-fosfato limitantes com variação da concentração de glicose do meio de alimentação	57
4.7.1 - Cultivo contínuo em condição de glicose limitante	57
4.7.2 - Cultivo contínuo em condições de glicose-fosfato limitantes	61
4.8 - Separação de fósforo intracelular sob cada condição de substrato limitante	68
5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	71
5.1 - Cultivo descontínuo com glicose como substrato limitante	71
5.1.1 - Cultivo em agitador rotativo	71
5.1.2 - Determinação de massa celular	71
5.2 - Cultivo contínuo com glicose como substrato limitante	72
5.3 - Cultivo contínuo com fosfato como substrato limitante	73
5.4 - Comparação dos resultados de cultivo contínuo em condições de glicose limitante e fosfato limitante	73
5.5 - Cultivo contínuo em condições de fosfato e glicose limitantes	78
5.5.1 - Cultivo contínuo em estado estacionário fixando-se a vazão específica	

ca de alimentação em $0,32 \text{ h}^{-1}$, alterando a concentração de fosfato do meio de alimentação	79
5.5.2 - Cultivo contínuo, fixando-se em 3,0mM a concentração de fosfato do meio de alimentação e variando a vazão específica de alimentação	81
5.6 - Recuperação de carbono em condições de glicose, fosfato e glicose-fosfato limitantes..	82
5.7 - Cultivo contínuo em condições de glicose e de glicose-fosfato limitantes, com variação da concentração de glicose do meio de alimentação	83
5.7.1 - Cultivo contínuo em condição de glicose limitante	83
5.7.2 - Cultivo contínuo em condição de glicose-fosfato limitantes	83
5.8 - Separação de fósforo intracelular sob cada condição de substrato limitante	84
6 - CONCLUSÕES	91
7 - RESUMO	92
8 - SUMMARY	93
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

I - NOMENCLATURA

O significado dos símbolos e abreviaturas utilizados no presente trabalho estão apresentados a seguir :

- A - Unidades de absorbância
- a_1 - Fração molar de carbono na molécula de glicose (72 mg C/mM de glicose)
- a_2 - Fração molar de carbono na molécula de dióxido de carbono (12mg C/mM de CO_2)
- a_3 - Fração molar de carbono na molécula de etanol (24 mg C/mM de etanol)
- b - Teor de carbono da célula ($0,47 \times 10^3$ mg C/g.cel) (9, 28)
- D - Vazão específica de alimentação (h^{-1})
- E - Concentração de etanol no meio de fermentação (mM)
- F - Vazão de alimentação do meio (l/h)
- P - Concentração final de fosfato no meio em fermentação (mM)
- P_0 - Concentração inicial de fosfato no meio de alimentação (mM)
- p.a. - Para-análise
- P_x - Produtividade do processo em células (g/l.h)

- Q_{CO_2} - Velocidade específica de formação de dióxido de carbono (mM/g.cel.h)
- Q_{O_2} - Velocidade específica de consumo de oxigênio (mM/g.cel.h)
- Q_E - Velocidade específica de produção de etanol (mM/g.cel.h)
- QR - Quociente respiratório
- r - Coeficiente de correlação linear no método de regressão linear
- S - Concentração final de glicose no meio em fermentação (mM)
- So - Concentração inicial de glicose no meio de alimentação (mM)
- V - Volume do meio no tanque de fermentação (l)
- X - Concentração de massa celular no meio em fermentação (g.cel/l)
- V_g - Velocidade específica de consumo de glicose (mM glicose/g.cel.h)
- V_e - Velocidade específica de produção de etanol (mM etanol/g.cel.h)
- V_p - Velocidade específica de consumo de fosfato (mM fosfato/g.cel.h)
- μ - Velocidade específica de crescimento do microrganismo (h^{-1})
- μ_{max} - Máxima velocidade específica de crescimento do microrganismo (h^{-1}).

1 - INTRODUÇÃO

Desde muito tempo a levedura de gênero Saccharomyces é usada na fermentação alcoólica e na produção de alimentos fermentados para o consumo humano.

O estudo da fermentação contínua foi iniciado há cerca de 6 décadas, quando a levedura alimentícia foi pela primeira vez produzida por esse processo. O cultivo contínuo de microrganismos tem sido empregado por um grande número de pesquisadores e ainda constitui um enorme campo a ser explorado, principalmente no que se refere à sua aplicação em produtos de interesse econômico.

O cultivo contínuo é um bom sistema para acompanhar as mudanças fisiológicas decorrentes de perturbações externas, pois nesse sistema as células podem ser mantidas em um ambiente com propriedades constantes.

A maioria das publicações sobre cultivo contínuo está relacionado com o comportamento fisiológico dos microrganismos.

Dispositivos específicos como "chemostat", "turbidostat", etc, são utilizados para o cultivo contínuo e a maioria desses sistemas tem sido estudado em laboratórios, antes que em escala industrial (1), (10), (11), (40).

A falta de emprego de processos contínuos em larga escala pode ser atribuída a uma série de fatores, entre as quais destacamos as seguintes dificuldades :

- a - Possibilidade das espécies microbianas empregadas sofrerem mutações indesejáveis,
- b - Dificuldades técnicas de execução asséptica durante um longo período de tempo, e
- c - Falta de conhecimentos sobre os aspectos dinâmicos do comportamento dos microrganismos.

Na maioria dos estudos em fermentação, o processo contínuo em estado estacionário é realizado utilizando-se de um substrato limitante de crescimento para controlar a atividade do microrganismo de interesse.

Há na literatura, muitos trabalhos que procuram estudar vários aspectos do comportamento de leveduras em cultivo contínuo, entre as quais, fontes de carboidratos como substrato limitante do processo, isto é, a glicose sendo simultaneamente a única fonte de carbono e energia.

Destacamos, como exemplos os trabalhos desenvolvidos por BECK e Von MEYENBURG (4) onde apresentam a correlação entre o estado das células em gemulação e repressão e derepressão de enzimas em células de Saccharomyces cerevisiae obtidas em cultivo descontínuo e contínuo sob condições de glicose limitante. As enzimas mostraram ser dependentes da velocidade de consumo de substrato, do tipo de metabolismo e estar relacionadas com a gemulação.

MOSS et al. (30) estudaram em cultivo contínuo em estado estacionário a influência do oxigênio dissolvido e concentração de glicose sobre o metabolismo aeróbico e a fermentação etanólica de Saccharomyces carlsbergensis.

Quando a velocidade de consumo de glicose era baixa a distribuição relativa de glicose entre a "fermentação aeróbica" e etanólica era sensível ao oxigênio.

KÜENZI & FIECHTER (22) investigaram a influência da composição de carboidratos em Saccharomyces cerevisiae cultivados aerobicamente em sistema contínuo para diferentes velocidades de crescimento. Em condição de glicose limitante a síntese de carboidratos de reserva aumenta fortemente, subindo o estoque de substrato limitante, isto é, diminuindo a velocidade de crescimento.

A levedura do gênero Saccharomyces é um microrganismo anaeróbico facultativo, que dependendo da presença ou ausência de oxigênio, qualidade e concentração de açúcar, modifica a respiração ou a fermentação.

A acentuada suscetibilidade da respiração de levedura de panificação para a glicose tem sido verificada por diversos autores (4), (14), (29). É evidente a partir destes estudos que a "fermentação aeróbica" surgiu de um cultivo contínuo em condições de glicose limitante quando a concentração de glicose residual excede o valor crítico, por exemplo, em torno de 50mg/l (14).

O valor da vazão específica de alimentação crítica, além do qual a "fermentação aeróbica" é observada, também depende da concentração de glicose do meio (35); não obstante, os fatores que são responsáveis pela dupla função anaeróbica e aeróbica das células de leveduras não foram necessariamente esclarecidas.

É bem conhecido que as leveduras quando cultivadas aerobicamente são caracterizadas por este duplo caminho, aeróbico e anaeróbico, em função da fonte de energia.

A partir de piruvato como intermediário da glicólise, a energia requerida para o crescimento das células e o metabolismo, origina-se a partir dos modelos anaeróbico e aeróbico; o primeiro leva eventualmente à formação de etanol e gás carbônico, enquanto o outro se relaciona com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

O efeito Pasteur, um fenômeno em que a velocidade de consumo de glicose é controlada pelo oxigênio, em espécies de leveduras como Saccharomyces cerevisiae, mesmo em condições aeróbicas e com alta concentração de glicose ocorre fermentação.

Este fenômeno é denominado geralmente de efeito glicose. Este fenômeno é também denominado "fermentação aeróbica". Quando a concentração de glicose no meio em cultivo contínuo atinge 70mg por litro (30), a glicose tende a ser parcialmente metabolizada, durante a fermentação, em álcool e CO_2 ; a fermentação é exigida a cessar se a concentração de glicose no meio é menos do que o nível específico de 70mg/litro.

O controle do metabolismo do efeito glicose é análogo ao modelo de repressão catabólica e o mecanismo não está muito claro, embora muitas partes estejam esclarecidas.

Segundo HOLZER (16), a glicose e os metabólitos

não somente causam repressão na síntese de enzimas em alguns microrganismos mas também inativam certas enzimas, entretanto, o mecanismo de inativação destas enzimas não é conhecido. As inativações não são somente causadas pela glicose, mas também pelos açúcares relacionados metabolicamente, tais como a frutose, sacarose e maltose.

AIBA et al. (2) apresentaram a maneira de evitar o efeito glicose na produção de levedura de panificação a partir de glicose em cultivo semi-contínuo, pelo controle da velocidade de alimentação do meio com uma medida "ad hoc" do quociente respiratório. A alimentação do meio é realizada passo a passo de tal modo que o valor de quociente respiratório fique na faixa de 1,0 ~ 1,2 durante o cultivo.

A velocidade específica de crescimento baseada sobre a massa celular total e o rendimento obtido durante o processo foram de $0,24 \text{ h}^{-1}$ e 0,55 gramas de células por grama de glicose.

A produção industrial de leveduras de panificação (7) pelo sistema aeróbico semi-contínuo tem sido realizada por uma adição intermitente de glicose para mantê-la a um nível baixo, minimizando então a aparência do modelo anaeróbico, evitando o acúmulo de álcool, porque a energia liberada através do modelo anaeróbico para a síntese celular é menos eficiente quando comparada com a dos ácidos tricarboxílicos. A produção do etanol é a maior razão para a diminuição do rendimento celular máximo em relação à glicose.

Quando se utiliza glicose em condições anaeróbi-

cas para formar lactato, a velocidade de desdobramento da glicose é muitas vezes maior do que em condições aeróbicas na mesma célula, a fim de compensar a pequena produção de ATP por molécula de glicose durante a glicólise.

Segundo LEHNINGER (23), a glicólise anaeróbica libera um saldo de apenas duas moléculas de ATP por molécula de glicose enquanto que a oxidação aeróbica completa libera 36 moléculas de ATP por molécula de glicose. Assim, a célula anaeróbica necessitaria 18 vezes mais de glicose por unidade de tempo se produzisse ATP na mesma velocidade que uma célula aeróbica.

Se o oxigênio for introduzido em uma suspensão de células que utilizam glicose através da glicólise, a uma alta velocidade, a velocidade de consumo de glicose diminuirá drasticamente, passando a uma pequena fração de sua velocidade específica anaeróbica. Ao mesmo tempo, o acúmulo de lactato reduz-se a zero na presença de oxigênio, uma vez que a respiração leva à formação de gás carbônico e água a partir de glicose sem acúmulo de lactato.

Embora as diversas etapas da glicólise sejam conhecidas desde 1940, as pesquisas sobre essa via ainda não cessaram. De fato, a pesquisa intensiva sobre as enzimas de glicólise vêm revelando alguns mecanismos pelos quais certas enzimas da sequência participam na regulação da glicólise na célula intacta. Embora, a maioria das pesquisas clássicas sobre o mecanismo da fermentação e da glicólise seja executada em extratos de levedura e de músculos, essas vias

ocorrem apenas com pequenas alterações na maioria das formas de vida, uma indicação do valor da sobrevivência evolutiva dessa primitiva via produtora de energia.

Às vezes há diferença nas propriedades das enzimas homólogas da sequência glicolítica de uma espécie ou tipo de células para outra. Tais variações presumivelmente dizem respeito às diferenças na regulação dessa via como um reflexo da diversidade das espécies ou dos tecidos.

Apesar da importância do metabolismo do fosfato pelo microrganismos ter sido destacado por muitos pesquisadores (12), (20), são raros os dados sobre cultivo contínuo em condições de fosfato limitante de leveduras de panificação.

MARKHAM & BYRNE (26) investigaram as alterações nos vários "pools", o conteúdo de fósforo em levedura quando em crescimento em cultivo contínuo em um meio de fosfato limitante, concluindo que o polifosfato é formado durante o crescimento e sugerem que a concentração de glicose no meio pode ser também fator contribuinte na quantidade formada durante o crescimento.

Em 1941, LYNEN (24) e JOHNSON (19) pesquisando se paradamente tentaram explicar a relação entre o efeito Pasteur e o fosfato inorgânico. As experiências com células de leveduras indicaram que o efeito Pasteur era devido a fosforilação oxidativa e a localização de enzimas em diferentes compartimentos celulares.

UYEDA & RACKER (39) estudaram a função regulado-

ra do fosfato em sistema glicolítico artificial, trabalhando com enzimas glicolíticas purificadas. Analisaram a importância da estimulação coordenada pelo fósforo inorgânico de hexoquinase e fosfofrutoquinase na regulação da utilização de glicose e o efeito Pasteur. Verificaram que o ortofosfato inorgânico estimula acentuadamente a formação de triose-fosfato a partir de glicose. Com a hexoquinase de levedura, a estimulação era inicialmente no sítio de fosfofrutoquinase. Verificou-se também neste sistema que o aumento de consumo de glicose e produção de lactato, era dependente da concentração de fósforo inorgânico. Em concentrações limitantes de fósforo inorgânico e ADP, era observada a inibição da produção de lactato quando a mitocôndria estava em excesso e a respiração era inibida quando predominaram as enzimas glicolíticas.

Em 1977, BÃÑUELOS et al. (3) publicaram que a enzima chave para a regulação de glicólise era a fosfofrutoquinase, que era ativada pelo ortofosfato em Saccharomyces cerevisiae, entretanto, o fenômeno específico não poderia ser explicado pelo nível de fosfato intracelular. A ativação pelo fosfato é pH dependente.

Segundo FIECHTER (14), se a concentração de açúcar no meio de cultivo excede de 50mg/l, ocorre o efeito glicose.

SHODA & AIBA (35), em estudos para observar a relação entre a velocidade específica de crescimento e a concentração de substrato em cultivo contínuo concluíram que a concentração de glicose crítica que representa o modelo ae-

róbico estava em torno de 15mg/l. Em concentrações de glicose superiores à concentração crítica, apresentavam-se os modelos aeróbico e anaeróbico simultaneamente.

Por outro lado, Von MEYENBURG (29), em um sistema de cultivo contínuo com glicose limitante, pesquisou o metabolismo de respiração e fermentação e dentro disso em relação ao efeito glicose verificou que o controle da composição de enzimas está em função da velocidade específica de consumo de glicose, ao invés da concentração de açúcar no meio de cultivo.

Baseados em resultados de Von MEYENBURG (29), da Tabela I, fez-se o gráfico da velocidade específica de consumo de glicose e a vazão específica de alimentação, conforme a Figura 1. Em torno da vazão específica de alimentação igual a $0,23 \text{ h}^{-1}$, pode-se verificar o crescimento rápido da velocidade específica de consumo de glicose.

Em "fermentação aeróbica", baseado no fato de que ocorre o aumento desta velocidade específica de consumo de glicose, se o aumento desta velocidade específica for controlada, levantou-se a hipótese de que mesmo em cultivo contínuo em uma vazão específica de alimentação superior a $0,23 \text{ h}^{-1}$, não ocorreria a "fermentação aeróbica" e para isso escolheu-se a concentração do fosfato como o fator controlador.

As experiências realizadas envolvem condições limitantes de substrato, tais como glicose, fosfato e glicose-fosfato limitantes em cultivo contínuo de levedura.

Entende-se como condição de glicose-fosfato limitante o estado em que o substrato fosfato não é totalmente limitante à célula e nem há sobra de fosfato no meio. É um estado sob condição de extrema limitação em que há dois substratos limitantes e está ocorrendo a inibição da "fermentação aeróbica".

FIGURA 1 - Crescimento aeróbico de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo em condições de glicose limitante, segundo dados das experiências de von MEYENBURG (29).

X - Massa celular em peso seco (○)
 S - Concentração de glicose (Δ)
 V_g - Velocidade específica de consumo de glicose (●)

TABELA I - Valores obtidos segundo von MEYENBURG (29) para crescimento aeróbico de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo.

$D(h^{-1})$	$X(g/l)$	$S(mM)$	$Vg(mM/g.h)$
0,05	13,5	0,0	0,576
0,10	13,8	0,0	1,13
0,15	13,9	0,0	1,68
0,20	14,0	0,0	2,22
0,24	13,9	0,0	2,69
0,275	9,1	0,0	4,70
0,30	7,4	0,0	6,31
0,325	6,4	0,0	7,90
0,35	5,7	0,0	9,55
0,375	5,1	0,0	11,40
0,40	4,6	3,44	13,20
0,425	4,1	7,67	15,30
0,45	3,7	13,80	17,20

2 - OBJETIVO DO TRABALHO

A indústria de panificação, que utiliza comumente o processo semi-contínuo para a produção de levedura de panificação e que ultimamente tem lançado mão do processo de fermentação contínuo, tem operado com uma vazão específica de alimentação em torno de $0,18$ a $0,20 \text{ h}^{-1}$, segundo as informações obtidas junto à indústria (31).

Propõe-se verificar :

- A possibilidade de ampliar essa vazão específica de alimentação, devido ao fato que ocorre a "fermentação aeróbica" com o aumento da velocidade específica de consumo de glicose.
- A possibilidade de controlar a "fermentação aeróbica", mesmo em vazão de alimentação superior à acima mencionada, através do controle do substrato, o fosfato.

Se houver um controle da concentração de fosfato e o controle de velocidade específica de consumo de glicose, eventualmente poder-se-á aumentar a produtividade na multiplicação de leveduras de panificação.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - Microrganismos

O microrganismos usado foi a levedura de panificação (Saccharomyces cerevisiae, raça nº 18, biotipo 236) obtido da Oriental Yeast Corporation Limited, Japan (31).

3.1.2 - Manutenção de cultura

O microrganismo era conservado em um meio sólido simples constituído de polipeptona 1%, extrato de levedura 1% e agar 2% e mantido em refrigerador a 4°C. Era repicado mensalmente.

3.1.3 - Preparação do inóculo

Os microrganismos eram multiplicados em Erlenmeyer de 500ml a 30°C (com frequência de 185 min⁻¹ e excentricidade de 4cm) com 100ml de meio de cultura durante 20 horas.

O meio líquido sintético foi preparado conforme a Tabela II, sendo glicose e vitaminas adicionadas no início.

3.1.4 - Preparo do meio de cultura

O meio de cultura foi preparado conforme Tabe-

la II e esterilizado em autoclave por 25 minutos à 121°C.

As soluções de glicose e vitaminas eram autoclavadas em separado dos sais minerais e misturadas posteriormente à esterilização.

3.1.5 - Equipamentos e materiais auxiliares

Os equipamentos e materiais auxiliares de laboratório foram os seguintes :

- Mini-fermentador Marubishi LEM, MD 250 e Tokyo Rikakikai Co, M-10.
- Microbombas : Tokyo Rikakikai Co. Ltd. e Mitsumi peristatic mini SJ 1210.
- Espectrofotômetro : Hitachi Ltd. Model 101, Tokyo.
- Analisador de Gás : Fuji Electric Co. Ltd. ZED 22211-60; Toray Model LC-700E.
- Centrífuga refrigerada.
- Compressor de ar.
- Microscópio Nikon.
- Autoclave industrial.
- Estufa de laboratório.
- Membranas filtrantes (diâmetro do poro = 1,2 µm) (Millipore Corp., Bedford, Mass.)

Reagentes

- Glicose p.a.
- Glucostato : (Worthington Biochemical Co. Freehold, New Jersey) (42).
- Álcool desidrogenase (ADH) de levedura : Sigma Chemical Co (36).
- β -Nicotinamida Adenina dinucleotídeo (NAD) - (Gram III - de levedura) Sigma Chemical Co. (37).

Os sais utilizados foram p.a. e as vitaminas de pureza farmacopeica.

A água era deionizada em coluna com resina de troca iônica recuperada de tempo em tempo.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Determinação de concentração celular

A concentração celular (X) era determinada em absorbância medida no espectrofotômetro Hitachi Ltd. Model 101, em comprimento de onda de 660nm, após atingir o estado estacionário e então era determinada a massa seca por filtração em membrana de uma alíquota (5ml) do meio de cultivo através de membrana Millipore com diâmetro dos poros igual a 1,2 μ m, para separar as células em suspensão.

O resíduo da filtração era lavado por 3 vezes com 20ml de água deionizada fria, seguido de secagem a 95°C

TABELA II - Composição de meio de cultivo

$C_6H_{12}O_6$	10,00 g
KH_2PO_4	1,50 g
$(NH_4)_2SO_4$	5,00 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,06 g
K_2SO_4	0,40 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2,00 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,10 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,00 mg
Biotina	0,10 mg
Pantotenato de Cálcio	1,50 mg
Inositol	60,00 mg
Tiamina	14,00 mg
Piridoxina	3,00 mg
Água deionizada q.s.p.	1.000ml
pH = 5,0	

durante uma noite até peso constante. A concentração celular foi expressa em gramas de matéria seca por litro de amostra.

3.2.2 - Determinação de glicose

As concentrações de glicose inicial (S_0) e residual (S) eram medidas pelo método enzimático do glucostato (42).

1. β -D glicose + O_2 + H_2O $\xrightarrow{\text{glico-oxidase}}$ H_2O_2 + ácido D glucono δ -lactona.
2. H_2O_2 + 4 amino antipirina + P-hidroxibenzoato $\xrightarrow{\text{P-oxidase}}$ Quinonemin + H_2O .
(pigmento)

3.2.2.1 - Preparação de reagentes

Dissolveu-se um frasco de "glucostato" (Worthington Biochemical Co.) em 50ml de água deionizada. A solução de glucostato era conservada em refrigerador entre 2 e 6°C.

Usou-se o reagente no máximo até o 5º dia após a sua preparação.

3.2.2.2 - Preparação de solução padrão de glicose

Certa quantidade de glicose era deixada durante uma noite a 95°C e resfriada então em dessecador. Pesou-se 50mg da glicose em balança analítica e colocou-se em

um balão volumétrico de 100ml e dissolvendo com água deionizada e completando-se o volume.

3.2.2.3 - Determinação da curva padrão de glicose

A curva padrão foi feita com 3 pontos.

Preparou-se as soluções de glicose, diluindo a solução padrão em água deionizada para obter concentração de 25, 50 e 100 µg/ml.

O conteúdo de mistura para determinar a curva padrão foi a seguinte :

- Solução de glicose 1,0 ml
- Solução de glucostato 1,0 ml
- Água deionizada 2,0 ml

Incubou-se durante 30 minutos à 37°C e fez-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 500nm.

3.2.2.4 - Determinação de glicose no meio de cultivo

A composição da mistura para determinar glicose no meio de cultivo era :

- Solução de amostra 1,0 ml
- Solução de glucostato 1,0 ml
- Água deionizada 2,0 ml

Deixou-se em banho-maria à 37°C du-

rante 30 minutos e em seguida fez-se a leitura em espectrofômetro no comprimento de onda 500nm medindo-se em absorbância.

A leitura é lançada na curva padrão e calcula-se a concentração de glicose.

3.2.3 - Determinação de etanol

A concentração de etanol (E) era determinada pelo método enzimático com álcool desidrogenase (5), (36), (37).

O β -NADH formado é proporcional à quantidade de etanol e era medido espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340nm.

3.2.3.1 - Preparação de reagentes

Tampão pirofosfato de sódio 75mM, pH 8,7. Dissolveu-se 10,0g de pirofosfato de sódio, 2,5g de semi-carbazida e 0,5g de glicina em 250ml de água deionizada em um balão volumétrico de 300ml. Ajustou-se o pH a 8,7 com hidróxido de sódio 4N e completou-se o volume do balão.

β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (24mM - β -NAD - Sigma Chemical Co). Dissolveu-se 50mg de β -NAD em 3,0ml de água deionizada, guardando-se em refrigerador.

Álcool desidrogenase (30,0mg/ml - ADH - Sigma Chemical Co). Dissolveu-se 18mg de ADH em 0,6ml de água deionizada, que era guardada sob refrigeração.

3.2.3.2 - Determinação da curva padrão de etanol

Usou-se etanol 99,5% (v/v) da WAKKO KOKKYO Co., o qual foi diluído em água deionizada para obter as seguintes concentrações : 0,004975% (v/v) e 0,00995% (v/v).

Os reagentes eram colocados na seguinte ordem para a amostra e o branco.

Buffer	3,00 ml	3,00 ml
β -NAD	0,10 ml	0,10 ml
Amostra	0,20 ml	--
Água deionizada	--	0,20 ml
ADH	0,02 ml	0,02 ml

O tempo de reação foi de 60 minutos a 30°C em banho-maria; após a reação foi feita a leitura em absorbância no comprimento de onda de 340nm no espectrofotômetro Hitachi Type 124 duplo feixe.

Para o cálculo de conversão de % (v/v) para g/l usou-se densidade do etanol igual a 0,789.

3.2.4 - Determinação de fósforo no meio de cultivo

A concentração de fosfato inicial (Po) e residual (P) foi determinada pelo método de FISKE & SUBBAROW (15) e de Mistura Reagente (13).

O material de vidraria usado na determinação de fósforo foi lavado com detergente SCAT - 20 X (isento de fósforo) da DAICHI KOKKYO SEIYAKU Co.

3.2.4.1 - Preparo dos reagentes para o método de FISKE & SUBBAROW

1. Solução de ácido sulfúrico 5N - Diluiu-se 70ml de ácido sulfúrico concentrado em 500ml de água deionizada.
2. Solução de molibdato de amônia 2,5% - Dissolveu-se 2,565g de molibdato de amônia em 100ml de água deionizada.
3. Reagente redutor - Preparado na forma de pó e dissolvido antes do uso. O reagente redutor em pó foi preparado como se segue :

- Ácido 1-amino. 2 naftol 4 sulfônico 0,2 g
- Bissulfito de sódio 1,2 g
- Sulfito de sódio 1,2 g

Triturou-se em um gral.

Usou-se 0,125g do pó, assim preparado, dissolvendo-o em 10ml de água deionizada.

3.2.4.2 - Preparação de solução padrão de fosfato monobásico de potássio

Dissolveu-se 1,3609g de KH_2PO_4 (p.a.) em 1.000ml de água deionizada, adicionando-se 3 gotas de clorofórmio. A solução era estocada em refrigerador.

3.2.4.3 - Determinação de curva padrão de fósforo para o método de FISKE & SUBBAROW

A curva padrão foi feita com 5 pontos.

A composição da mistura para determinar a curva padrão foi a seguinte :

- Amostra 1,0 ml
- H_2SO_4 5N 1,0 ml
- Molibdato de amônia 2,5% 1,0 ml
- Reagente redutor 0,2 ml
- H_2O q.s.p. 10,0 ml

Agitou-se e após o tempo de reação de 10 minutos, fez-se a leitura da absorbância, medindo com espectrofotômetro em comprimento de onda de 660nm.

3.2.4.4 - Preparo dos reagentes para o método de Mistura Reagente (pode-se medir até uma concentração de $3,2 \times 10^{-4}$ μM P/ml) :

1. Solução de ácido sulfúrico 5N - Diluiu-se 70ml de ácido sulfúrico concentrado em 500ml de água deionizada.
2. Solução de tartarato de antimônio e potássio - Dissolveu-se 1,3715g de $K(SbO)C_4H_4O_6$ em 400ml de água deionizada em um balão volumétrico de 500ml e completou-se o volume. Guardou-se à 4°C em frasco âmbar com tampa esmerilhada.
3. Solução de molibdato de amônia - Dissolveu-se 20,0g de molibdato de amônia em 500ml de água deionizada e guardou-se em frasco plástico à 4°C.
4. Solução de ácido ascórbico 0,1N - Dissolveu-se 1,76g de ácido ascórbico em 100ml de água deionizada. Esta solução foi estocada a 4°C, sendo usada até 1 semana após a sua preparação.
5. Mistura Reagente - As soluções de 1 a 4 foram misturadas como se segue :

H_2SO_4 5N	50 ml
$\text{K}(\text{SbO}) \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 1/2 H_2O	5 ml
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15 ml
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,1N	30 ml

A mistura foi preparada após as soluções atingirem a temperatura ambiente e guardada a 4°C . A mistura foi preparada semanalmente.

3.2.4.4.1 - Preparação de solução padrão de fosfato para o método de Mistura Reagente

Usou-se a solução de KH_2PO_4 (10 μM P/ml) preparado para o método de FISKE & SUBBAROW.

3.2.4.5 - Determinação da curva padrão de fosfato para o método de Mistura Reagente

A curva padrão foi feita com 5 pontos. A composição da mistura para determinar a curva padrão foi a seguinte :

- Amostra	1,0 ml
- H_2O deionizada	4,0 ml
- Mistura Reagente	0,8 ml

Agitou-se a mistura, fez-se a leitura em espectrofotômetro entre 10 e 30 minutos após a preparação, em comprimento de onda de 880nm.

3.2.5 - Determinação da velocidade específica de formação de dióxido de carbono

O Q_{CO_2} era medido por um analisador de gás portátil Fuji Electric Co. Ltd. ZED 22211-60. Para a determinação da concentração de CO_2 (%) do gás de saída, usou-se a seguinte equação :

$$Q_{CO_2} = \frac{\text{vol. de ar entrada (ml/min)} \times 60 \times (\text{leitura} - 0,03) \times 0,01}{\text{conc. celular (g/l)} \times 22,4 (l) \times \text{vol. (l)}}$$

$$Q_{CO_2} = \left(\frac{\text{mM } CO_2}{g \cdot h} \right)$$

Considerou-se a concentração de CO_2 no ar igual a 0,03%.

3.2.6 - Determinação da velocidade específica de consumo de oxigênio

O Q_{CO_2} foi medido em um analisador de gás (Toray Model LC - 700 E). Na sua determinação usou-se a seguinte equação :

$$Q_{O_2} = \frac{\text{vol. de ar de entrada (ml/min)} \times 60 \times (\text{leitura}) \times 0,01}{\text{concentração celular (g/l)} \times 22,4 (l) \times \text{vol. (l)}}$$

$$Q_{O_2} = \left(\frac{\text{mM } O_2}{g \cdot h} \right)$$

O gás de saída passou por uma mistura de acetona e gelo seco para resfriar e retirar compostos orgânicos e em seguida era introduzido no analisador de gás.

3.2.7 - Separação de fósforo intracelular (34).

3.2.7.1 - Método de separação

Para a separação de fósforo intracelular procedeu-se como descrito (a seguir) na Figura 2.

FIGURA 2 - Esquema da técnica utilizada para separação de fósforo intracelular.

3.2.7.2 - Métodos de determinação de fósforo intracelular

O fósforo intracelular foi determinado nas frações obtidas segundo o método de separação pelo método de FISKE & SUBBAROW (15).

3.2.7.2.1 - Determinação do orto-fosfato

Logo após a separação da fração ácido solúvel, fez-se a sua determinação como se segue :

Adicionou-se à amostra contendo de 0,1 a 1,0 μ M de fosfato, 1,0ml de ácido sulfúrico 5N. A mistura, em tubo de ensaio foi levada à evaporação na chama; quando o conteúdo tornou-se marron, após resfriamento, adicionou-se 1 gota de ácido nítrico 2N e continuou-se o aquecimento até o aparecimento de uma fumaça branca. Após o resfriamento, 1,0ml de água foi adicionado e o tubo foi colocado em banho-maria durante 5 minutos. Após o resfriamento, o molibdato foi adicionado e seguiu-se o método de FISKE & SUBBAROW.

3.2.7.2.2 - Determinação de polifosfato (Δ 7P)

Pelo método de FISKE & SUBBAROW, após a adição de ácido sulfúrico 1N, completou-se com água até 5,0ml para se obter uma concentração 1N.

Aqueceu-se o tubo em banho-maria (100°C) durante 7 minutos. Resfriou-se e seguiu-se o método de FISKE & SUBBAROW, adicionando-se molibdato.

3.2.7.2.3 - Determinação de fosfato
total em cada fração

Fêz-se a carbonização e após a desintegração completa de todo material orgânico, determinou-se o orto-fosfato, segundo o método de FISKE & SUBBAROW.

3.3 - Descrição do processo experimental

Cultivo contínuo - O cultivo contínuo foi realizado de acordo com os princípios do processo contínuo (6) (33).

A fermentação propriamente dita foi feita em mini-fermentadores : Marubishi LEM, Tokyo, MD 250 de 2600 mililitros e ou Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Modelo M-10 de 2500 mililitros de capacidade.

O volume do meio no fermentador foi mantido constante em 1,0 litro.

A vazão específica do ar e agitação foram de 2,0vvm e 600rpm, respectivamente. A temperatura de fermentação foi mantida a $30,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

O pH do meio foi medido em potenciômetro Marubishi Laboratory Type MPH-LMC e mantido a 5,0 com controle automático pela adição de hidróxido de sódio 2N.

Usou-se como antiespumante Antifoam-AF Emulsion fornecido por Nakarai Chemical Co. Kyoto.

Um efluente do cultivo contínuo foi coletado a 0°C , seguido de uma centrifugação a $1.000 \times g$, durante 5 minutos a 4°C obtendo o líquido sobrenadante. O líquido foi objeto de análises de glicose, etanol e fosfato.

Na Figura 3, está uma representação esquemática dos aparelhos experimentais em sistema contínuo.

FIGURA 3 - Representação esquemática dos aparelhos experimentais em sistema contínuo.

1. Fermentador
2. Tomada de amostra
3. Reservatório de meio de cultivo
4. Eletrodo de pH
5. Controlador de pH
6. Bomba peristáltica
7. Reservatório de álcali
8. Filtro de lã de vidro
9. Tubo para adição de álcali
10. Dispersor de ar
11. Filtro de PVA
12. Fluxômetro
13. Regulador de tempo
14. Reservatório de anti-espumante
15. Tubo para adição de anti-espumante
16. Tubo para exaustão de ar
17. Sifão
18. Analisador de oxigênio ou de gás carbônico
19. Acetona-gelo seco
20. Tubo para saída do meio de fermentação.

4 - RESULTADOS

4.1 - Cultivo descontínuo com glicose como substrato limitante

4.1.1 - Cultivo em agitador rotativo

O cultivo descontínuo em agitador rotativo foi realizado para determinar a máxima velocidade específica de crescimento celular do Saccharomyces cerevisiae escolhido.

Os resultados da experiência estão expostos na Tabela III e Figura 4.

TABELA III - Crescimento celular em cultivo descontínuo para a determinação da máxima velocidade específica.

- Condições experimentais

- Temperatura	30,0°C
- Agitação	800rpm
- Aeração	2,5 vvm
- pH	5,0

1ª EXPERIÊNCIA

Tempo (h)	Concentração celular A_{660}
0,0	0,085
1,5	0,111
3,0	0,172
4,5	0,296
6,0	0,580
7,0	0,870
8,0	1,36
9,0	1,87
10,0	1,96
11,0	2,24
12,0	2,58
14,0	3,24
16,0	4,04
18,0	4,35
22,0	4,45

2ª EXPERIÊNCIA

Tempo (h)	Concentração celular A_{660}
0,0	0,094
2,0	0,153
4,0	0,310
5,5	0,592
7,0	1,18
8,5	1,92
10,0	2,36
12,0	3,12
14,0	3,80
16,0	5,40
18,0	5,60
20,0	5,65

FIGURA 4 - Crescimento celular em cultivo descontínuo
(●) 1ª Experiência
(○) 2ª Experiência

4.1.2 - Determinação da massa celular

Determinou-se a concentração de massa celular em absorvância no comprimento de onda 660nm e paralelamente o seu peso seco, nas experiências em diversas condições de substrato limitante.

Os resultados encontram-se expostos nas Tabelas IV, V e Figura 5.

FIGURA 5 - Concentração celular em peso seco em função da absorvância.

(o) Em condição de glicose limitante

(●) Em condição de fosfato limitante

(*) Em condição de glicose-fosfato limitante.

TABELA IV - Valores de massa celular obtidos em absorbância a 660nm e em peso seco em diversas condições de substrato limitante.

A ₆₆₀	X(g/l)	A ₆₆₀	X(g/l)	A ₆₆₀	X(g/l)
0,40	0,37	2,06	1,89	3,09	2,82
0,77	0,65	2,07	1,95	3,09	2,82
0,99	0,80	2,07	1,95	3,10	2,56
1,21	0,86	2,08	1,87	3,12	2,84
1,31	0,94	2,13	1,97	3,28	3,03
1,35	1,08	2,16	2,09	3,32	3,03
1,50	1,24	2,17	1,77	3,45	2,93
1,55	1,32	2,17	2,07	3,46	3,30
1,60	1,34	2,17	2,13	3,47	3,34
1,64	1,43	2,17	2,13	3,55	3,30
1,70	1,49	2,20	1,96	3,60	3,32
1,72	1,79	2,33	1,98	3,62	3,75
1,80	1,58	2,35	2,11	3,62	3,75
1,94	1,99	2,35	2,33	3,63	3,43
1,95	2,03	2,51	2,44	3,64	3,64
1,95	2,03	2,63	2,40	3,64	3,71
1,98	1,45	2,70	2,42	3,71	3,52
1,99	2,18	2,82	2,65	3,89	3,63
2,04	1,48	3,01	2,85		

TABELA V - Valores de massa celular obtidos em absorbância a 660nm e em peso seco (X = g/l)

A_{660}	X(g/l)
5,60	4,59
5,40	4,32
5,40	4,75
5,20	4,66
5,10	4,40
5,10	3,97
5,05	4,67
4,94	4,36
4,87	4,13
4,82	4,30
4,80	4,13
4,68	4,46
4,50	4,35
4,48	4,10
4,48	3,68
4,40	4,05
4,39	4,21
4,39	4,02
4,38	4,21

4.3 - Cultivo contínuo com glicose como substrato limitante

O meio de cultivo usado foi o meio padrão conforme a Tabela II, com :

	(g/l)	(mM)
Glicose	10,0	55,6
Fosfato	1,5	11,0

Nas Tabelas VI, VII e Figura 6 estão representados os resultados obtidos, quando em regime estacionário, em diversas vazões específicas de alimentação (h^{-1}).

TABELA VI - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo em condição de glicose limitante.

D_1 (h^{-1})	X (g/l)	S (mM)	P (mM)	E (mM)
0,095	4,23	0,10	8,29	0,21
0,139	4,24	0,03	7,73	0,29
0,201	4,17	0,20	8,91	0,30
0,245	3,99	0,24	8,91	7,54
0,270	3,43	0,39	9,14	27,2
0,292	3,12	0,24	8,91	18,9
0,303	1,97	0,64	13,10	36,7
0,319	1,81	0,99	10,20	53,3
0,340	2,08	0,77	10,40	54,4
0,350	1,97	0,95	9,47	54,4
0,369	1,54	1,54	10,10	55,9
0,379	1,29	2,97	10,20	55,9

FIGURA 6 - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo em condição de glicose limitante em função da vazão específica de alimentação.

- (o) Massa celular em peso seco
- (Δ) Concentração de glicose do meio
- (●) Concentração de etanol do meio
- (▲) Concentração de fosfato do meio.

TABELA VII - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo em condição de glicose limitante.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S (mM)	V _g ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _p ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{CO2} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{O2} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _R (-)
0,095	4,23	0,10	1,25	11,1	8,29	0,063	0,21	0,00	3,32	3,28	1,01
0,139	4,24	0,03	1,82	11,1	7,73	0,110	0,29	0,01	4,53	4,31	1,05
0,201	4,17	0,20	2,67	12,0	8,91	0,149	0,30	0,01	7,02	6,71	1,05
0,245	3,99	0,24	3,40	11,4	8,91	0,153	7,54	0,46	8,56	8,22	1,04
0,270	3,43	0,39	4,35	11,4	9,14	0,178	27,2	2,14	9,94	8,87	1,12
0,292	3,12	0,24	5,18	10,9	8,91	0,186	18,9	1,77	11,5	10,2	1,13
0,303	1,97	0,64	8,45	14,6	13,1	0,231	36,7	5,64	15,7	11,7	1,34
0,319	1,81	0,99	9,62	10,7	10,2	0,088	53,3	9,39	--	--	--
0,340	2,08	0,77	8,96	12,0	10,4	0,262	54,4	8,89	--	--	--
0,350	1,97	0,95	9,71	11,0	9,47	0,272	54,4	9,66	17,6	12,6	1,40
0,369	1,54	1,54	13,0	11,4	10,1	0,331	55,9	13,4	23,4	13,8	1,70
0,379	1,29	2,97	15,5	11,4	10,2	0,352	55,9	16,4	28,4	13,7	2,07

4.3 - Cultivo contínuo com fosfato como substrato limitante

O meio de cultivo é o mesmo da Tabela II, com exceção de fosfato que é igual a 0,075 (g/l) (0,55mM).

Os resultados desta experiência estão na Tabela VIII, IX e Figura 7.

TABELA VIII Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo em condição de fosfato limitante.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S (mM)	P (mM)	E (mM)
0,055	4,05	0,46	0,00	0,47
0,094	3,64	0,68	0,00	11,00
0,143	2,96	0,51	0,01	13,60
0,157	2,79	0,63	0,00	31,00
0,205	2,06	0,91	0,00	45,80
0,235	1,78	0,98	0,01	47,30
0,269	1,37	2,38	0,01	59,80
0,294	1,39	3,65	0,01	60,70

FIGURA 7 - Multiplicação aeróbica de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo contínuo, em condição de fosfato limitante em função da vazão específica de alimentação.

- (o) Massa celular em peso seco
- (Δ) Concentração de glicose do meio
- (●) Concentração de etanol do meio
- (▲) Concentração de fosfato do meio

TABELA IX - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo em condição de fosfato limitante.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S (mM)	V _g ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _p ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	QCO ₂ ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	QO ₂ ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _R (-)
0,055	4,05	0,46	0,75	0,59	0,00	0,008	0,47	0,01	2,63	2,43	1,08
0,094	3,64	0,68	1,42	0,59	0,00	0,015	11,0	0,28	3,82	3,77	1,01
0,143	2,96	0,51	2,66	0,59	0,01	0,028	13,6	0,66	6,22	5,67	1,10
0,157	2,79	0,63	3,09	0,55	0,00	0,031	31,0	1,74	--	--	--
0,205	2,06	0,91	5,44	0,55	0,00	0,055	45,8	4,56	10,2	7,62	1,34
0,235	1,78	0,98	7,21	0,56	0,01	0,073	47,3	6,24	12,4	12,00	1,03
0,269	1,37	2,38	10,40	0,56	0,01	0,108	59,8	11,7	17,2	10,70	1,61
0,294	1,39	3,65	11,00	0,56	0,01	0,116	60,7	12,8	19,5	10,30	1,89

4.4 - Recuperação de carbono em condição de glicose limitante e fosfato limitante

Baseando-se nos resultados das Tabelas VII e XI, usou-se a equação 1 para determinar a recuperação de carbono mostrado pelas Tabelas X, XI e Figuras 8 e 9.

$$a_1 V_g = a_2 \cdot Q_{CO_2} + a_3 Q_E + b\mu \quad (1)$$

TABELA X - Recuperação de carbono em condição de glicose limitante.

% CARBONO				
$D(h^{-1})$	Células	CO ₂	Etanol	Total
0,095	49,6	44,2	0,0	93,8
0,139	49,8	41,5	0,2	91,5
0,201	49,1	43,8	0,1	93,0
0,245	47,0	41,9	4,5	93,4
0,270	40,5	38,1	16,4	95,0
0,292	36,8	37,0	11,4	85,2
0,350	23,5	30,2	33,2	86,9
0,369	18,5	30,0	34,4	82,9
0,379	16,0	30,5	35,5	81,8

TABELA XI - Recuperação de carbono em condições de fosfato limitante.

% CARBONO				
D(h ⁻¹)	Células	CO ₂	Etanol	Total
0,055	47,8	58,4	0,4	106,6
0,094	43,2	44,8	6,6	94,6
0,143	35,1	39,0	8,3	82,4
0,205	24,6	31,2	27,9	83,7
0,235	21,3	28,6	28,9	78,8
0,269	16,9	27,5	37,5	82,0
0,294	17,4	29,5	38,8	85,7

FIGURA 8 - Histograma de recuperação de carbono em diversas vazões específicas de alimentação, em condições de glicose limitante.

FIGURA 9 - Histograma de recuperação de carbono em diversas vazões específicas de alimentação, em condição de fosfato limitante.

(□) Células
 (▨) Dióxido de carbono
 (■) Etanol.

4.5 - Cultivo contínuo em condições de fosfato e glicose limitantes.

4.5.1 - Cultivo contínuo em estado estacionário fixando-se a vazão específica de alimentação em $0,32 \text{ h}^{-1}$ e alterando a concentração de fosfato do meio de alimentação.

Nas Tabelas XII, XIII e Figura 10 estão os resultados desta experiência.

TABELA XII - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo com vazão específica de alimentação igual a $0,32 \text{ h}^{-1}$.

D (h^{-1})	X (g/l)	S (mM)	P _O (mM)	P (mM)	E (mM)	O _E ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)
0,32	1,04	3,83	1,17	0,01	63,10	19,80
0,32	3,37	0,32	2,21	0,01	16,10	1,53
0,32	4,33	0,12	2,87	0,00	0,26	0,02
0,32	4,28	0,10	3,46	0,25	0,18	0,01
0,32	3,15	0,24	4,16	1,63	22,10	2,27
0,32	1,22	2,26	4,54	3,57	45,00	11,80
0,32	1,81	0,99	10,70	10,20	53,30	9,39

FIGURA 10 - Efeito da concentração de fosfato em meio fresco sobre o metabolismo energético de levedura. $S_o = 55,6\text{mM}$; $P_O = 1,17 \sim 11,0\text{mM}$ e $D = 0,32\text{ h}^{-1}$.

- (O) Massa celular em peso seco
- (Δ) Concentração de glicose do meio
- (●) Concentração de etanol do meio
- (▲) Concentração de fosfato do meio.

TABELA XIII-Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo para vazão específica de alimentação igual a $0,32 \text{ h}^{-1}$.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S (mM)	V _g ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _p ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	Q _{CO2} ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	Q _{O2} ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	Q _R (-)
0,326	1,04	3,83	16,20	1,17	0,01	0,364	63,1	19,8	30,4	19,1	1,59
0,320	3,37	0,32	5,25	2,21	0,01	0,209	16,1	1,53	12,3	10,9	1,13
0,321	4,33	0,12	4,11	2,87	0,00	0,213	0,26	0,02	10,7	10,6	1,01
0,323	4,28	0,10	4,19	3,46	0,25	0,242	0,18	0,01	10,2	10,2	1,00
0,323	3,15	0,24	5,68	4,16	1,63	0,259	22,1	2,27	12,6	9,41	1,34
0,319	1,22	2,26	13,90	4,54	3,57	0,254	45,0	11,80	22,9	13,9	1,65
0,319	1,81	0,99	9,62	10,70	10,20	0,088	53,3	9,39	--	--	--

4.5.2 - Cultivo contínuo, fixando em 3,00mM e concentração de fosfato do meio de alimentação e variando a vazão específica de alimentação

As experiências foram realizadas, estabelecendo a concentração de fosfato de meio de alimentação em aproximadamente 3,00mM e dessa maneira verificou-se até que valor de vazão específica de alimentação pode ser bloqueada a fermentação aeróbica.

Os resultados estão na Tabelas XIV, XV e Figuras 11, 12. Estas Figuras mostram também os pontos de cultivo em condições de glicose limitante.

TABELA XIV - Cultivo contínuo em condições de :

Glicose limitante, com va
riação da vazão específi-
ca de alimentação

Glicose-fosfato limitante,
mantendo a concentração de
fosfato inicial em torno
de 3,0mM, com variação da
vazão específica de alimenta
ção

D (h ⁻¹)	X (g/l)	V _g (mM/g.h)	D (h ⁻¹)	X (g/l)	V _g (mM/g.h)
0,095	4,23	1,25			
0,139	4,24	1,82			
0,201	4,17	2,67			
0,245	3,99	3,40			
0,270	3,43	4,35			
0,292	3,12	5,18	0,291	4,18	3,86
0,303	1,97	8,45	0,300	4,29	3,88
0,319	1,81	9,62	0,321	4,33	4,11
0,340	2,08	8,96	0,331	4,07	4,50
0,350	1,97	9,71	0,340	4,01	4,69
0,369	1,54	13,00	0,353	2,84	7,33
0,379	1,29	15,50	0,366	1,72	12,70

FIGURA 11 - Concentração celular relacionada com a vazão específica de alimentação.

FIGURA 12 - Velocidade específica de consumo de glicose em função da vazão específica de alimentação.

- (O) Em condição de glicose limitante
 (●) Em condição de glicose-fosfato limitante.

TABELA XV - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo com concentração inicial de fosfato e glicose aproximadamente a 3,0mM e 55,6mM respectivamente.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S (mM)	V _g ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _p ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{CO2} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{O2} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	QR (-)
0,291	4,18	0,09	3,86	3,49	0,25	0,226	0,57	0,04	9,50	9,61	0,99
0,300	4,29	0,06	3,88	2,88	0,00	0,201	0,38	0,03	10,10	10,50	0,96
0,321	4,33	0,12	4,11	2,87	0,00	0,213	0,26	0,02	10,70	10,60	1,01
0,331	4,07	0,29	4,50	3,04	0,38	0,216	13,80	1,12	10,40	9,64	1,08
0,340	4,01	0,29	4,69	3,04	0,54	0,212	6,07	0,52	11,10	--	--
0,353	2,65	0,58	7,33	2,85	1,03	0,242	41,30	5,50	14,10	10,80	1,31
0,366	1,54	2,11	12,70	2,85	1,69	0,276	54,40	12,90	22,10	14,80	1,49

4.6 - Recuperação de carbono em condição de glicose-fosfato limitante.

Esta recuperação de carbono é vista na Figura 13. Usando-se o mesmo modelo aplicado em condição de glicose limitante e fosfato limitante obteve-se os resultados relacionados na Tabela XVI.

TABELA XVI - Recuperação de carbono em condição de glicose-fosfato limitante.

% CARBONO				
$D(h^{-1})$	Células	CO ₂	Etanol	Total
0,291	49,2	41,0	0,3	90,5
0,300	50,5	43,4	0,2	94,1
0,321	51,0	43,4	0,1	94,5
0,331	48,0	38,5	8,3	94,8
0,340	47,3	39,4	3,7	90,4
0,353	31,4	32,1	25,0	88,5
0,366	18,8	29,0	33,8	81,6

FIGURA 13 - Histograma de recuperação de carbono em diversas vazões específicas de alimentação, em cultivo em condição de glicose-fosfato limitante.

- () Células
- () Dióxido de carbono
- () Etanol.

4.7 - Cultivo contínuo em condições de glicose e de glicose-fosfato limitantes com variação e concentração de glicose do meio de alimentação.

4.7.1 - Cultivo contínuo em condição de glicose limitante.

O meio de cultivo usado, exceto glicose e fosfato, é igual ao da Tabela I.

As experiências foram realizadas sob as 3 seguintes condições :

Condição de ensaio	Concentração de glicose inicial (mM)	Concentração de fosfato inicial (mM)
1º	11,2	2,2
2º	33,4	6,6
3º	83,4	16,5

Nestas condições a relação entre as concentrações de fosfato e glicose iniciais foram em torno de 0,197, portanto, como em condição de glicose limitante.

Os resultados destas experiências estão nas Tabelas XVII, XVIII, XIV.

Nas Tabelas XXIII, XXIV, XXV e Figuras 14, 15, 16, estão os demais resultados obtidos nessas condições.

TABELA XVII - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo.

Condição 1ª de ensaio.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S _O (mM)	S (mM)	V _G ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _P ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{CO₂} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{O₂} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _R (-)
0,148	0,92	11,4	0,32	1,78	2,04	1,95	0,014	0,08	0,013	4,49	--	--
0,229	0,89	11,4	0,36	2,84	2,04	1,77	0,069	0,08	0,021	7,35	--	--
0,269	0,88	11,4	0,38	3,37	2,04	1,81	0,070	0,04	0,012	7,20	7,23	0,99
0,301	0,87	11,1	0,19	3,77	2,29	1,80	0,170	0,04	0,014	9,79	8,95	1,09
0,317	0,84	11,1	0,38	4,05	2,26	1,70	0,211	0,54	0,204	10,30	10,00	1,03
0,357	0,82	10,9	0,56	4,48	2,15	1,72	0,187	0,49	0,199	10,40	10,30	1,00
0,367	0,73	11,1	0,69	5,24	2,26	1,86	0,201	2,56	1,290	12,20	11,90	1,02
0,379	0,54	11,1	0,88	7,18	2,26	2,04	0,154	5,61	3,940	15,00	--	--

TABELA XVIII - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo.

Condição 2º de ensaio.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S _O (mM)	S (mM)	V _G ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _P ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	Q _{CO₂} ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	Q _{O₂} ($\frac{\text{mM}}{\text{g.h}}$)	QR (-)
0,182	2,54	33,6	0,15	2,40	6,93	5,15	0,128	0,19	0,014	6,21	6,21	1,00
0,226	2,58	33,6	0,10	2,93	6,93	5,98	0,083	0,22	0,019	8,04	7,86	1,02
0,252	2,57	33,9	0,16	3,31	6,60	4,90	0,344	0,16	0,032	8,34	8,52	0,98
0,314	2,50	33,9	0,19	4,23	6,60	4,54	0,259	0,63	0,079	9,80	10,70	0,92
0,356	1,79	31,5	0,43	6,18	6,52	5,26	0,251	15,00	2,98	14,40	8,87	1,62
0,380	1,10	31,5	0,85	10,60	6,52	5,96	0,193	23,40	8,08	20,70	3,50	5,91

TABELA XIX - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo.
 Condição 3º de ensaio.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S _O (mM)	S (mM)	V _G ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _P ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{CO₂} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{O₂} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	QR (-)
0,104	6,41	83,0	0,24	1,34	18,1	14,2	0,063	0,16	0,003	3,14	3,14	1,00
0,123	6,53	83,0	0,28	1,56	18,1	13,8	0,081	0,27	0,005	3,98	4,07	0,98
0,157	6,67	83,0	0,14	1,95	18,1	15,9	0,052	0,07	0,001	--	--	--
0,213	6,59	83,0	0,13	2,68	18,1	14,0	0,133	0,15	0,005	6,67	6,76	0,99
0,230	6,44	83,5	0,15	2,98	18,1	12,8	0,189	0,19	0,007	7,67	7,29	1,05
0,253	6,10	83,5	0,46	3,44	18,1	1,40	0,170	0,65	0,027	8,73	8,73	1,00
0,309	4,61	83,5	0,54	5,56	18,1	1,50	0,207	57,30	3,840	12,50	5,41	2,31

4.7.2 - Cultivo contínuo em condição de glicose-fosfato limitante

Mantendo a relação $Po/So = 0,051$ obtido em condição de glicose-fosfato limitante, foi aplicada na escolha da concentração de glicose inicial para fixar o valor da concentração de fosfato inicial. Assim, ensaiou-se as seguintes condições :

Condição de ensaio	Concentração de glicose inicial (mM)	Concentração de fosfato inicial (mM)
4º	11,2	0,57
5º	33,4	1,72
6º	83,4	4,30

Os resultados destas experiências estão nas Tabelas XX, XXI e XXII.

Nas Tabelas XXIII, XXIV, XXV e Figuras 14, 15, 16, estão relacionados valores comparativos entre a vazão específica de alimentação e a concentração celular nas diversas condições anteriormente mencionadas.

TABELA XX - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo.
 Condição 4º de ensaio.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S _O (mM)	S (mM)	V _G ($\frac{mM}{g.h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _P ($\frac{mM}{g.h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g.h}$)	QCO ₂ ($\frac{mM}{g.h}$)	QO ₂ ($\frac{mM}{g.h}$)	Q _R (-)
0,237	0,85	11,3	0,33	3,06	0,60	0,07	0,148	0,00	0,000	7,66	6,02	1,27
0,290	0,86	11,3	0,39	3,68	0,60	0,00	0,202	0,16	0,054	9,05	9,05	1,00
0,312	0,87	11,6	0,45	4,00	0,78	0,03	0,269	0,47	0,169	10,20	--	--
0,337	0,82	11,6	0,69	4,48	0,78	0,00	0,321	2,10	0,863	9,99	9,99	1,00
0,341	0,82	12,2	0,62	4,82	0,63	0,19	0,155	1,20	0,499	9,47	10,00	0,95

TABELA XXI - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo.
 Condição 5º de ensaio.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S _O (mM)	S (mM)	V _G ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _P ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{CO₂} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _{O₂} ($\frac{mM}{g \cdot h}$)	Q _R (-)
0,319	2,68	33,5	0,44	3,94	1,86	0,00	0,221	0,19	0,023	11,1	--	--
0,329	2,69	35,3	0,30	4,28	1,76	0,00	0,215	0,26	0,032	10,8	--	--
0,345	2,67	35,3	0,37	4,51	1,76	0,00	0,227	0,41	0,053	11,6	--	--
0,362	2,49	33,9	0,46	4,86	1,71	0,03	0,244	1,47	0,214	11,9	11,4	1,04
0,380	2,01	33,9	0,54	6,31	1,71	0,35	0,257	19,10	3,610	13,9	10,5	1,32

TABELA XXII - Multiplicação aeróbica de Saccharomyces cerevisiae em cultivo contínuo.
Condição 6º de ensaio.

D (h ⁻¹)	X (g/l)	S _O (mM)	S (mM)	V _G ($\frac{mM}{g.h}$)	P _O (mM)	P (mM)	V _P ($\frac{mM}{g.h}$)	E (mM)	Q _E ($\frac{mM}{g.h}$)	Q _{CO2} ($\frac{mM}{g.h}$)	Q _{O2} ($\frac{mM}{g.h}$)	Q _R (-)
0,196	6,50	85,5	0,17	2,57	4,64	0,88	0,113	0,18	0,005	6,45	6,20	1,04
0,245	6,54	85,5	0,16	3,20	4,64	0,73	0,146	0,25	0,009	7,81	7,72	1,01
0,275	6,41	88,8	0,29	3,80	4,58	0,37	0,181	2,03	0,087	8,94	8,93	1,00
0,305	5,90	83,5	0,34	4,30	4,83	0,04	0,248	15,80	0,817	10,30	8,62	1,19
0,320	5,13	83,5	0,48	5,18	4,83	1,20	0,226	40,3	2,51	11,30	7,51	1,50
0,357	2,45	82,0	2,47	11,6	4,38	2,53	0,270	71,0	10,30	20,20	4,85	4,16

TABELA XXIII - Valores comparativos entre vazão específica de alimentação e concentração celular. Glicose inicial igual a 11,2mM e fosfato iniciais de 2,2mM e 0,57mM.

1º ENSAIO		4º ENSAIO	
$D(h^{-1})$	$X(g/l)$	$D(h^{-1})$	$X(g/l)$
0,148	0,92	0,237	0,85
0,229	0,89	0,290	0,86
0,269	0,88	0,312	0,87
0,301	0,87	0,337	0,82
0,317	0,84	0,341	0,82
0,357	0,82		
0,367	0,73		
0,379	0,54

FIGURA 14 - Vazão específica de alimentação em relação a concentração celular em condição de glicose limitante (o) e glicose-fosfato limitante (●)

TABELA XXIV -Valores comparativos entre vazão específica de alimentação e concentração celular. Glicose inicial igual a 33,4mM e fosfato iniciais de 6,6mM e 1,72mM.

2º ENSAIO		5º ENSAIO	
$D(h^{-1})$	$X(g/l)$	$D(h^{-1})$	$X(g/l)$
0,182	2,54	0,319	2,68
0,226	2,58	0,329	2,69
0,252	2,57	0,345	2,67
0,314	2,50	0,362	2,49
0,356	1,79	0,380	2,01
0,380	1,10

FIGURA 15 - Vazão específica de alimentação em relação a concentração celular em condição de glicose limitante (o) e glicose-fosfato limitante (●).

TABELA XXV - Valores comparativos entre vazão específica de alimentação e concentração celular. Glicose inicial igual a 83,4mM e fosfato iniciais de 16,5mM e 4,30mM.

3º ENSAIO		6º ENSAIO	
$D(h^{-1})$	$X(g/l)$	$D(h^{-1})$	$X(g/l)$
0,104	6,41	0,196	6,50
0,123	6,53	0,245	6,54
0,157	6,67	0,275	6,41
0,213	6,59	0,305	5,90
0,230	6,44	0,320	5,13
0,253	6,10	0,357	2,45
0,309	4,61

FIGURA 16 - Vazão específica de alimentação em relação a concentração celular em condição de glicose limitante (○) e glicose-fosfato limitante (●).

4.8 - Separação de fósforo intracelular sob cada condição de substrato limitante.

Os resultados da separação do fósforo intracelular em diversas condições de limitação estão na Tabela XXVI e Figura 17.

TABELA XXVI - Distribuição de fosfato nas células em diversas condições de limitação de substrato

D	X	T-P	AS _{T-P}	AS _{Δ7P}	Orto-P	Lip	AIS _{T-P}	AIS _{Δ7P}	Resíduo	Σ P	ΣP/T-P	ΣΔ7P	Substra
(h ⁻¹)	(g/l)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	(%)	($\frac{\text{mg P}}{\text{g.cel}}$)	to limi- tante
0,095	4,23	18,4	6,91	2,11	1,95	1,39	9,84	2,93	0,89	19,0	102	5,04	G
0,139	4,24	18,7	5,02	3,25	1,77	1,53	6,41	5,30	0,99	13,9	74	8,55	G
0,201	4,17	17,3	5,77	1,51	2,96	2,28	9,17	3,78	0,69	17,9	103	5,29	G
0,303	1,97	18,8	5,77	2,15	2,75	2,20	12,20	5,49	0,62	20,8	111	7,64	G
0,094	3,64	4,87	2,17	0,26	0,31	1,00	3,08	0,87	0,49	6,7	138	1,14	P
0,143	2,96	8,99	2,35	0,12	0,46	1,35	4,34	2,09	0,79	8,8	98	2,22	P
0,205	2,06	8,25	0,99	0,06	0,81	0,54	5,44	1,98	0,46	7,4	90	2,04	P
0,291	4,18	15,8	6,88	1,75	3,30	2,57	10,60	4,62	0,95	21,0	133	6,37	G,P
0,300	4,29	17,9	4,97	0,58	2,90	1,75	11,30	4,29	0,66	18,7	104	4,87	G,P
0,320	3,37	19,1	5,22	0,80	2,17	1,41	10,60	5,18	0,89	18,1	95	5,98	G,P

FIGURA 17 - Histograma da composição de fósforo intracelular em condições de fosfato, glicose e glicose-fosfato limitantes.

Po = 0,59, 11,0 e 2,88mM para cultivos contínuos em condições de fosfato, glicose e glicose-fosfato limitantes, respectivamente, enquanto So = 55,6mM.

5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 - Cultivo descontínuo com glicose como substrato limitante

5.1.1 - Cultivo em agitador rotativo

O gráfico que mostra o crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo no agitador rotativo está apresentado na Figura 4 e tem o aspecto de crescimento diauxico padrão obtendo-se a máxima velocidade específica de crescimento em $0,44 \text{ h}^{-1}$.

5.1.2 - Determinação da massa celular

Como mostra a Figura 5, verificou-se uma distribuição homogênea ao longo da reta e dos valores de absorbância em peso seco das Tabelas IV e V; obteve-se as equações de reta pelo método de regressão linear.

$$X = 0,4416 \times A_{660} + 2,1443 \quad (2) \quad r = 0,6322$$

$$X = 0,9933 \times A_{660} - 0,1722 \quad (3) \quad r = 0,9808$$

Para chegar aos resultados que se seguem, usou-se os valores de A convertidos em peso de massa seca, utilizando as equações (2) e (3).

Como se vê claramente pela Figura 5, nos gráficos do crescimento das células em meio em condições de glicose limitante, fosfato limitante e glicose-fosfato limi

tante não existem diferenças na relação entre absorvância e massa em peso seco.

Pode-se verificar que há uma diferença em torno da absorvância igual a 4,0, entre as determinações celulares das que não estão fermentando e as que estão fermentando.

5.2 - Cultivo contínuo com glicose como substrato limitante

Pelas pesquisas de von MEYENBURG (29), as condições de glicose limitante em cultivo contínuo com Saccharomyces cerevisiae são bem conhecidas e nestas experiências obteve-se o mesmo comportamento.

Em vazão específica de alimentação menor ou igual a $0,23 \text{ h}^{-1}$, a glicose é usada na respiração no metabolismo oxidativo e em vazão específica de alimentação maior que $0,23 \text{ h}^{-1}$, observa-se a "fermentação aeróbica" com produção de álcool.

Em geral diz-se que ocorre a "fermentação aeróbica" de levedura de panificação quando o efeito de glicose está na dependência da concentração de glicose do meio, e acima de 0,27mM ou 50mg/l tem sido dito que ocorre a fermentação, e pela Tabela VII, verificou-se que a concentração de glicose residual no meio, próximo da vazão específica de alimentação crítica foi quase equivalente.

Por outro lado, quanto à concentração de fosfato resi

dual verificou-se que em todas as vazões específicas de alimentação, resta uma quantidade em torno de 8,0 a 10,0 mM, quando o fosfato inicial é de 11,0mM.

5.3 - Cultivo contínuo com fosfato como substrato limitante

Determinou-se pelo método de Mistura Reagente, a concentração de fosfato residual do meio, mas em todas as vazões específicas de alimentação obteve-se concentrações menores que 0,01mM.

Por outro lado, restou mais de 0,46mM ou 82,8mg/l de glicose, portanto, estritamente falando a glicose também é substrato limitante; como porém falta fosfato, a velocidade de crescimento em relação à glicose está diminuindo e por isso diz-se que o fosfato é limitante.

Acima da vazão específica de alimentação crítica igual a $0,055 \text{ h}^{-1}$ ocorreu a "fermentação aeróbica".

5.4 - Comparação dos resultados de cultivo contínuo em condições de glicose limitante e fosfato limitante

Para comparar ambos os fenômenos de "fermentação aeróbica" graficamos as Figuras 18 e 19, onde relacionamos a velocidade específica de formação de gás carbônico e velocidade específica de consumo de glicose com vazão específica de alimentação.

TABELA XXVI - Velocidade específica de formação de gás carbônico em cultivo contínuo em condição de :

Fosfato limitante		Glicose limitante	
$D(h^{-1})$	$Q_{CO_2} (mM)$	$D(h^{-1})$	$Q_{CO_2} (mM)$
0,055	2,63	0,095	3,32
0,094	3,82	0,139	4,53
0,143	6,22	0,201	7,02
0,205	10,20	0,245	8,56
0,235	12,40	0,270	9,94
0,269	17,40	0,292	11,50
0,294	19,50	0,303	15,70
		0,350	17,60
		0,369	23,40
		0,379	28,40

TABELA XXVII- Velocidade específica de consumo de glicose em cultivo contínuo em condição de :

Fosfato	limitante	Glicose	limitante
$D(h^{-1})$	$V_g(mM/g.h)$	$D(h^{-1})$	$V_g(mM/g.h)$
0,055	0,75	0,095	1,25
0,094	1,42	0,139	1,82
0,143	2,66	0,201	2,67
0,157	3,09	0,245	3,40
0,205	5,44	0,270	4,35
0,235	7,21	0,292	5,18
0,269	10,40	0,303	8,45
0,294	11,00	0,319	9,62
		0,340	8,96
		0,350	9,71
		0,369	13,00

Como mostra claramente a Figura 18, com glicose limitante até a vazão específica de alimentação crítica $0,23 \text{ h}^{-1}$, a velocidade específica de formação de gás carbônico tem um crescimento linear e o quociente respiratório igual a 1,0; acima de vazão específica de alimentação $0,23 \text{ h}^{-1}$ inicia-se a fermentação e ocorre um desvio para cima.

No gráfico da velocidade específica de consumo de glicose em relação a vazão específica de alimentação de meio, há uma correspondência à Figura anterior.

Abaixo da vazão específica de alimentação crítica, na Figura 19, o fato da velocidade específica de consumo de glicose e vazão específica de alimentação tornarem-se retilínea deve-se à fonte de carbono, que neste meio provém somente da glicose. Pela equação 4 verifica-se que $Y_{x/s}$ (g. cel/g.glicose) é constante.

$$V_g = m + \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \quad (4)$$

m = Coeficiente de manutenção celular ($\frac{\text{mM glicose}}{\text{g.h}}$)

$Y_{x/s}$ = Fator de conversão de rendimento em relação à glicose ($\frac{\text{g.cel}}{\text{g.glicose}}$)

Em outras palavras, isto significa que o metabolismo energético se desenvolveu apenas pela respiração e o fato da velocidade específica de consumo de glicose estar desviado acima da vazão específica de alimentação crítica, mostra que o $Y_{x/s}$ devido à "fermentação aeróbica" está decrescendo.

No caso de, em condição de fosfato limitante, acima

FIGURA 18 - Velocidade específica de formação de gás carbônico em função de vazão de alimentação

FIGURA 19 - Velocidade específica de consumo de glicose em função da vazão de alimentação.

(●) Em condição de glicose limitante
(Δ) Em condição de fosfato limitante.

da vazão específica de alimentação crítica $0,055 \text{ h}^{-1}$ a velocidade específica de formação de gás carbônico e a velocidade específica de consumo de glicose desvia enormemente para cima, mostrando que está ocorrendo "fermentação aeróbica".

A presente experiência, iniciou-se baseado no seguinte : se for bloqueada a velocidade específica de consumo de glicose, bloquear-se-ia a "fermentação aeróbica" usando o fosfato como substrato limitante, mas na falta total de fosfato, a "fermentação aeróbica" é acelerada. Mas na vazão específica de alimentação igual a $0,055 \text{ h}^{-1}$, mesmo estando presente $0,46 \text{ mM}$ de glicose no meio a produção de álcool foi bloqueada e a curva subiu, o que foi muito interessante.

5.5 - Cultivo contínuo em condições de fosfato e glicose limitantes

Como foi dito em 5.2. , em cultivo contínuo em condição de glicose limitante em vazão específica de alimentação crítica acima de $0,23 \text{ h}^{-1}$ ocorre a "fermentação aeróbica" com velocidade específica de consumo de glicose crescendo rapidamente. Por outro lado, em 5.3. , onde o fosfato era completamente limitante, ficou claro que a "fermentação aeróbica" é acelerada. Assim levando a vazão específica de alimentação em torno de $0,32 \text{ h}^{-1}$ constante e variando a concentração de fosfato do meio de alimentação de $1,17$ a $10,70 \text{ mM}$, foi verificado o metabolismo energético quando varia a condição de fosfato limitante para glicose limitante.

5.5.1 - Cultivo contínuo em estado estacionário fixan
do-se a vazão específica de alimentação em $0,32$
 h^{-1} e alterando a concentração de fosfato do
meio de alimentação.

Em P_0 igual a $1,17mM$, a concentração de fosfato residual foi de $0,01mM$ e é muito baixa. A concentração de glicose residual foi igual a $3,83mM$, é muito elevada, por outro lado; em condição de fosfato limitante pois, está ocorrendo a "fermentação aeróbica" como mostra a Figura 7 e a velocidade específica de produção de etanol é igual a $19,80mM/g.h$; com concentração de fosfato inicial igual a $10,70mM$, a concentração de fosfato residual foi de $10,20mM$ portanto, restando uma grande quantidade. Verificou-se que ocorre a "fermentação aeróbica" em condição de glicose limitante quando a concentração de glicose residual é igual a $0,99mM$ e a velocidade específica de produção de etanol é igual a $9,39mM/g.h..$

Contudo, o que despertou profundo interesse é o comportamento intermediário nas condições de fosfato-glicose limitante em torno da concentração de fosfato inicial igual a $3,00mM$.

A "fermentação aeróbica" diminuiu com um aumento da concentração inicial de fosfato e para a concentração de fosfato inicial igual a $3,00mM$, a "fermentação aeróbica" foi virtualmente suspensa em condições de cultivo em glicose-fosfato limitante. O fosfato residual no meio foi também detectado com dificuldade em cultivo em condições de

glicose-fosfato limitante.

Quando a concentração de fosfato inicial excedeu o nível de 3,00mM, a "fermentação aeróbica", tornou-se novamente apreciável, como pode ser verificado em cultivo em condição de glicose limitante.

De fato, a concentração de glicose residual em condição de glicose-fosfato limitante, tendeu a ser menor do que em cultivo em condição de glicose limitante, e a determinação exata da diferença, mal era possível detectar, devido a erros inerentes à experiência, principalmente na retirada das amostras.

Isto implica que em cultivo em condições de fosfato-glicose limitante, esta condição é imposta pela repressão do fosfato em adição para o cultivo de glicose limitante.

Quando a massa celular é igual a 4,3g/l, corresponde a $Y_{x/s}$, onde a multiplicação depende quase que exclusivamente da respiração e relacionado a isto a produção de etanol é bloqueada.

Nesta condição, a concentração de glicose residual igual a 0,12mM e a concentração de fosfato residual em torno de 0,01 ~ 0,02mM, estão em concentrações muito baixas.

Pela Figura 10, ficou claro que na vazão específica de alimentação igual a $0,32 \text{ h}^{-1}$, está o ponto de concentração máxima de fosfato no meio de alimentação que bloqueia a "fermentação aeróbica".

5.5.2 - Cultivo contínuo, fixando em 3,00mM a concentração de fosfato do meio de alimentação e variando a vazão específica de alimentação.

Controlando a concentração de fosfato, ficou-se sabendo que a vazão específica de alimentação crítica em condição de glicose limitante, que era de $0,23 \text{ h}^{-1}$ passou até $0,32 \sim 0,325 \text{ h}^{-1}$.

A correlação da velocidade específica de consumo de glicose e vazão específica de alimentação está apresentada na Figura 12. A velocidade específica de consumo de glicose está sobre o prolongamento da reta que mostra o metabolismo energético devido a respiração. Deve-se dar especial atenção na Tabela XV ao fato das concentrações de glicose e fosfato residuais em todos os estados estacionários serem suficientemente baixas onde a "fermentação aeróbica" está bloqueada devido ao controle do fosfato.

Na Tabela XIV e Figura 11, são comparados os valores de crescimento celular e a vazão específica de alimentação. Houve um aumento da vazão específica de alimentação crítica em condições de glicose limitante para condição de glicose-fosfato limitante, passando de $0,23 \text{ h}^{-1}$ para $0,32 \text{ h}^{-1}$, com a produção de massa celular na mesma faixa. Isto significa que a produtividade do processo comparado entre as duas condições, passou de $0,98 \text{ g cel./l.h}$ para $1,39 \text{ g cel./l.h.}$, ocorrendo um aumento de 41,8% na produtividade.

5.6 - Recuperação de carbono em condições de glicose, fosfato e glicose-fosfato limitantes

Pode-se observar pelas Tabelas X, XI, XVI e Figuras 8, 9, 13, que, quando se inicia a "fermentação aeróbica", há uma diminuição na recuperação do carbono. Isto pode ser causado por um problema técnico de análise, ou talvez seja decorrência dos sub-produtos como ácido acético, ácido málico, glic_lcerol, etc., que aumentam quando se inicia a fermentação al_lcoólica (32).

5.7 - Cultivo contínuo em condições de glicose e de glicose
-fosfato limitantes, com variação de concentração de
glicose do meio de alimentação

5.7.1 - Cultivo contínuo em condição de glicose limi-
tante

Contrariando a previsão, mesmo em relação ao cultivo contínuo em condição de glicose limitante, com a variação de concentração de glicose inicial, o valor da vazão específica de alimentação crítica sofreu alteração.

Por exemplo, abaixando o valor da concentração inicial de glicose até 11,2mM como no ensaio 1º, não houve "fermentação aeróbica" até a vazão específica de alimentação igual a $0,36 \text{ h}^{-1}$.

5.7.2 - Cultivo contínuo em condição de glicose-fosfa
to limitante

Como em 5.7.1, houve a alteração da vazão específica de alimentação crítica de acordo com a concentração de glicose de alimentação inicial. Na presente experiência, cujo tema é inibição da "fermentação aeróbica", devido ao controle de fosfato, foi verificada que há inibição em relação a cada uma das concentrações de glicose iniciais.

Quanto às condições de ensaio 5º e 6º, foram observadas inibições da "fermentação aeróbica" devido ao controle do fosfato, em cada uma delas. Quanto à condição de ensaio 4º, até o momento não há nada esclarecido.

Quanto à concentração inicial de glicose igual a 83,4mM, da 3ª condição de ensaio não está suficientemente clara a inibição da "fermentação aeróbica"; parece que isto se deve ao fato de não estar completa a condição de glicose-fosfato limitante, como se vê pela concentração de fosfato residual.

5.8 - Separação do fósforo intracelular sob cada condição de substrato limitante

O conteúdo total de fósforo nas células em condição de fosfato limitante foi baixo, isto é, em torno de 7 a 8 microgramas de fósforo por miligrama de célula. E a quantidade em cada fração também foi em geral baixa.

O conteúdo total de fósforo nas células em condição de glicose limitante e glicose-fosfato limitantes foi cerca de 3% e não houve uma diferença predominante. Prevvia-se uma diferença no orto-fosfato das células, mas verificou-se haver a mesma quantidade.

Quanto ao fósforo instável na fração ácido solúvel nas células em condição de glicose-fosfato limitantes houve a tendência à diminuição com o aumento do $D(h^{-1})$.

Na Figura 17, um histograma de fósforo intracelular de cultivos em condições de fosfato, glicose e glicose-fosfato limitantes, não se viu diferença em compostos de fósforo intracelular entre os cultivos em condições de glicose - fosfato e glicose limitantes, embora cada fração do cultivo

em condição de fosfato limitante tenha claramente decrescido. Consequentemente, a "fermentação aeróbica" pode não ter sido prevenida por causa dos fatores associados com o "pool" de fosfato intracelular.

Dos resultados experimentais, ficou claro que o fosfato exerce grande influência no fenômeno do metabolismo energético na levedura de panificação.

Sob o aspecto fermentativo, quanto ao controle da glicólise, as experiências do efeito Pasteur, nos oferecem muitas informações.

Em função do fósforo inorgânico, que é o substrato da reação de síntese de ATP, existe uma competição entre a glicólise e a fosforilação oxidativa. Na presença de oxigênio, essa competição é vencida pela mitocôndria.

Por isso, o fosfato que é aproveitado na glicólise, é limitado e portanto controlado.

UYEDA et al. (39), em experimentos, reconstituíram o efeito Pasteur explicando-o da seguinte forma :

Na presença de oxigênio, a fosforilação oxidativa da mitocôndria, o fósforo inorgânico e ADP intracelular desaparecem e o nível de ATP sobe. A inibição da fosfofrutoquinase pelo ATP, proporciona acúmulo de glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato ou seu metabólito provoca inibição feed-back do transporte de açúcar.

Além disso, em 1977 GANCEDO et al. (3) verificaram que havia ativação da fosfofrutoquinase da levedura pela

concentração de fosfato que se pensa existir intracelularmente, e mencionaram a função do fosfato no controle de fosfofrutoquinase.

Assim, pelo visto, no caso da condição de fosfato limitante, a atividade de fosfofrutoquinase diminui em função da diminuição do fósforo inorgânico intracelular e liberação da repressão dos catabólitos que vai contra a velocidade do metabolismo da glicose; com isso, pela respiração, deve progredir o metabolismo energético.

Ao contrário do que se esperava em condição de fosfato limitante a "fermentação aeróbica" foi acelerada.

Observando os resultados do fracionamento do fósforo intracelular nas células em condição de fosfato limitante, é baixo o conteúdo total do fósforo.

O conteúdo do fósforo em cada parte é igualmente baixo e com este tipo de células pensa-se que não são o metabolismo energético, a síntese de ácidos nucleicos, a síntese de fosfolipídeos da estrutura da membrana mas também pode-se pensar numa biossíntese limitada, que provoca uma alteração na estrutura da membrana da mitocôndria e prever uma baixa na sua função; em condição de fosfato limitante, a recuperação do carbono em relação a fonte de carbono está baixa e isto faz aparecer uma concentração elevada de glicose no meio de cultivo e que deve estar sofrendo a repressão dos catabólitos.

De toda maneira, em qualquer uma das hipóteses anteriores, o fósforo inorgânico e ADP são consumidos na glicólise e ocorre a "fermentação aeróbica".

Em células em condições de fosfato limitante observou-se que a função da mitocôndria está baixa, mas quanto às mitocôndrias isoladas de células em condição de fosfato limitante comparadas às mitocôndrias de células em condição de glicose limitante e fosfato-glicose limitante, a atividade é baixa e o rendimento também (17).

Pensando desta forma, em cultivo contínuo em condição de fosfato limitante, somente em condição em que está se processando o consumo de glicose e de fosfato de acordo com a função da mitocôndria (em vazão específica de alimentação muito baixa), pode-se pensar numa possibilidade de metabolismo devido a respiração.

Por outro lado, pensando-se em células em que esteja ocorrendo a "fermentação aeróbica" devido a limitação do fosfato, mesmo em velocidade específica de crescimento demasiadamente elevada, o metabolismo devido à respiração se está processando.

Isto significa que originalmente essa cepa tem uma atividade da mitocôndria que consegue manter essa elevada velocidade específica de crescimento, por exemplo, quando a concentração de glicose no meio de alimentação é igual a 11,1mM e que mudou a vazão específica de alimentação crítica para $0,35 \text{ h}^{-1}$ em condição de glicose limitante e significa que a velocidade específica de formação de oxigênio máxima desta cepa tem pelo menos cerca de 10,3mM/g.cel.h.

Portanto, com concentração de glicose em meio de alimentação igual a 55,6mM em condição de glicose limitante em

vazão específica de alimentação crítica abaixo de $0,23 \text{ h}^{-1}$ há suficiente atividade da mitocôndria e o aumento da velocidade específica de consumo de glicose corresponde ao aumento da velocidade específica de formação de oxigênio.

Por outro lado, quando a vazão específica de alimentação crítica é mais alto, em condição em que fornece suficiente fosfato, em função do aumento da quantidade de glicose alimentado, a velocidade específica de formação de oxigênio diminui devido ao controle da inatividade contrária à atividade da respiração, ocorrendo o efeito glicose.

Em células em condição de glicose-fosfato limitante, quando se fazia separação de fósforo tinha-se especial interesse na determinação do fósforo inorgânico, mas não houve diferença significativa.

Elevando-se artificialmente a concentração inicial de células e abaixando a concentração de glicose do meio, em vazão específica de alimentação acima da vazão específica de alimentação crítica e alimentando com quantidade mínima de fosfato que satisfaça o conteúdo de fosfato intracelular, dentre os fosfatos consumidos, o fósforo inorgânico destinado ao metabolismo energético é totalmente consumido na mitocôndria e o fósforo inorgânico e ADP da mitocôndria diminui; atividade da glicólise sofre inibição "feed back".

Essa condição é possível mantendo-se o fosfato exterior próximo a zero, pois neste momento a inibição da glicólise no sistema respiratório é máxima; isto quer dizer, que pode-se pensar que o mecanismo de regulação do efeito Pas-

teur é mantido constante artificialmente.

Por outro lado, se adicionar quantidade suficiente de fosfato no meio de alimentação, o fósforo inorgânico intracelular aumenta devido a transformação do próprio fósforo i norgânico ou então do fósforo inorgânico da ADP/ATP, libera a inibição "feed back" da fosfofrutoquinase e estimula a sua atividade.

Disso resulta um aumento da velocidade de consumo de glicose e a ocorrência da "fermentação aeróbica".

Podemos interpretar que o mecanismo de regulação do efeito Pasteur foi mantido artificialmente e a atividade respiratória foi protegida, resultando que a glicose do meio de alimentação foi metabolizada totalmente pela respiração e a concentração de glicose externa diminuiu.

É difícil confirmar, na verdade, se ocorre "in vivo" um controle pelo fosfato como disse nesta discussão, em virtude da falta de informações do fosfato intracelular, pelas análises efetuadas regularmente em sistema de cultivo contínuo.

Embora um amplo campo esteja aberto para posteriores experiências bem como, considerações teóricas sobre o mecanismo acima mencionado da concentração específica de fosfato em cultivo contínuo em condições de glicose-fosfato limitante, pode-se recordar que as células de leveduras em cultivo em condição de glicose-fosfato limitante são obviamente objetos de um "stress", comparado ao cultivo em condição de glicose limitante, por um aumento no gradiente de concencen

tração de fosfato através da membrana celular, porque nenhum fosfato foi detectado em cultivo em condição de glicose-fosfato limitante, enquanto o fosfato residual no meio foi apreciável em cultivo em condição de glicose limitante.

Este meio pode ter alterado a estrutura da membrana "per se" para afetar o transporte de fosfato bem como, da glicose. Além disso, a possibilidade de que a concentração residual de glicose diminuiu por fim no cultivo em condição de glicose-fosfato limitante pode ter extendido a vazão específica de alimentação crítica.

6 - CONCLUSÕES

Em vista das discussões acima, pode-se concluir o seguinte :

1. Em cultivo contínuo em condições de glicose limitante, acima da vazão específica de alimentação crítica igual a $0,23 \text{ h}^{-1}$, ocorreu a "fermentação aeróbica", observando-se o efeito glicose.
2. Em cultivo contínuo em condição de fosfato limitante, a vazão específica de alimentação crítica diminuiu e a "fermentação aeróbica" foi promovida.
3. Quando a concentração de fosfato no meio de alimentação for limitante e a concentração de glicose-fosfato for colocada próxima de zero (condição de glicose-fosfato limitante) a "fermentação aeróbica" foi bloqueada.
4. Na vazão específica de alimentação igual a $0,32 \text{ h}^{-1}$ e concentração de fosfato no meio de alimentação em torno de $3,0 \text{ mM}$ por litro, a "fermentação aeróbica" foi completamente bloqueada.
5. O conteúdo de fosfato intracelular em cultivo contínuo foi quase igual tanto na condição de glicose limitante como na condição de glicose-fosfato limitante, situando-se em torno de 3% sua diferença.

7 - RESUMO

Estudou-se a influência do fosfato na multiplicação de Saccharomyces cerevisiae em uma fermentação contínua em mini-fermentador.

Determinou-se a massa seca, a concentração dos substratos, a velocidade específica de consumo dos substratos, a velocidade específica de formação de gás carbônico, velocidade específica de consumo de oxigênio e o quociente respiratório bem como, o fósforo intracelular em diversas vazões específicas de alimentação, em cultivo contínuo de levedura de panificação, em condições de substratos limitantes.

Controlando-se a quantidade de fosfato no meio de alimentação de tal modo que o fosfato residual no meio de fermentação mal pudesse ser detectado, o valor da vazão específica de alimentação crítica era aparentemente aumentado de $0,23 \text{ h}^{-1}$ para $0,32 \text{ h}^{-1}$.

Isto sugere uma possível influência do fosfato nas funções anaeróbicas e aeróbicas da levedura de panificação.

8 - SUMMARY

The influence of phosphate in a continuous culture was studied using mini-fermentor on the Saccharomyces cerevisiae multiplication.

Dry matter, substrate concentration, specific substrate consumption, specific carbon dioxide release, specific oxygen uptake rates and respiration quotient, as well as phosphorous content of the cells were measured in dependence on the dilution rate.

In continuous culture glucose-limited, of baker's yeast if the supply of phosphorous were restricted to a extent that residual phosphate in the medium could hardly be observed, the value of critical dilution rate was apparently enhanced from $0,23 \text{ h}^{-1}$ to $0,32 \text{ h}^{-1}$.

This observation suggests a possible mediation by phosphate between anaerobic and aerobic functions of the baker's yeast.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 - AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N.F. - Biochemical engineering. 2. ed., Tokyo, University Tokyo Press, 1973. p. 128-62.
- 2 - AIBA, S.; NAGAI, S.; NISHIZAWA, Y. - Fed batch culture of Saccharomyces cerevisiae : a perspective of computer control to enhance the productivity in baker's yeast cultivation. Biotechnol.Bioeng., New York, 18 : 1001-16, 1976.
- 3 - BANÚELOS, M.; GANCEDO, C.; GANCEDO, J.M. - Activation by phosphate of yeast phosphofructokinase. J.biol.Chem., Baltimore, 252 (18) : 6394-8, 1977.
- 4 - BECK, C. & MEYENBURG, H.K.von - Enzyme pattern and aerobic growth of Saccharomyces under various degrees of glucose limitation. J.Bact., Baltimore, 96 (2) : 479-86, 1968.
- 5 - BERNT, E. & GUTMANN, I. - In : BERGMAYER, H.U. & GAWEHN, K., eds. - Methods in enzymatic analysis. 2 ed New York, Academic Press, 1974, p. 1499-1502.
- 6 - BULL, A.T. & SLATER, J.H. - The teaching of continuous culture. In : DEAN, A.C.R.; ELLWOOD, A.C.; EVANS, C. G.T.; MELLING, J., eds. - Continuous culture 6; applications and new field. London, Ellis Horwood, 1976. p. 49-67.

* De acordo com as normas da ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas de títulos de periódicos estão de acordo com o WORLD MEDICAL PERIODICALS, 3.ed., New York, 1961.

- 7 - BURROWS, S. - Baker's yeast. In : ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., eds. - The Yeasts. London, Academic Press, 1970. v.3, p. 349-421.
- 8 - CIRILLO, V.P. - Mechanism of glucose transport across the yeast cell membrane. J.Bact., Baltimore, 84 : 485-91, 1962.
- 9 - COONEY, C.L. - Engineering consideration in the production of single-cell protein from methanol. Proc.Int. Symposium on Microbiol growth on C₁-compounds., 1974. Tokyo - Pub. 1975. p. 183-97.
- 10 - DAWSON, P.S.S. - Continuous fermentations. In : PERLMAN, D.; TSAO, G.T., eds. - Annual Reports on Fermentation Processes. New York, Academic Press, 1977. p. 73-93.
- 11 - DOIN, P.A. - Fermentação contínua. In : BORZANI, W.; ALMEIDA, U.L.; AQUARONE, E. - Engenharia Bioquímica, S. Paulo, Edgard Blücher, Ed. Univ.S.Paulo, 1975. p.112-34.
- 12 - DORRER, E. & TEUBER, M. - Induction of polymyxin resistance in Pseudomonas fluorescens by phosphate limitation. Arch.Mikrobiol., Berlin, 114 : 87-9, 1977.
- 13 - Environmental Protection Agency (Estados Unidos) - Methods for chemical analysis of water and wastes, Ohio, 1971. p. 235-45.
- 14 - FIECHTER, A. - Continuous culture of yeasts. IV. Cultivation of glucose-sensitive yeast types. Meth.Cell Biol., New York, 11 : 119-25, 1975.
- 15 - FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. - Phosphocreatine. J.Biol. Chem., Baltimore, 81 : 629-79, 1929.

- 16 - HOLZER, H. - Catabolite inactivation in yeast. Trends Biochem.Sci., 1 (3) : 178-81, 1976.
- 17 - INOUE, T. - Comunicação pessoal (1979).
- 18 - JAIN, V.K. - Relationship between energy metabolism and growth. I. Glucose dependence of the exponential growth rate of Saccharomyces cerevisiae. Arch.Mikrobiol., Berlin, 72 : 252-9, 1970.
- 19 - JOHNSON, M.J. - The role of aerobic phosphorylation in the Pasteur effect. Science , Washington, 200-2, 1941.
- 20 - KATCHMAN, B.J. & FETTY, W.O. - Phosphorus metabolism in growing cultures of Saccharomyces cerevisiae. J. Bact., Baltimore, 69 (6) : 607-15, 1955.
- 21 - KREBS, H.A. - The Pasteur effect and the relations between respirations and fermentation. Essays Biochem. New York , 8 : 1-34, 1972.
- 22 - KUENZLI, M.T. & FIECHTER, A. - Regulation of carbohydrate composition of Saccharomyces cerevisiae under growth limitation. Arch.Mikrobiol., Berlin, 84 : 254-65, 1972.
- 23 - LEHNINGER, A.L. - Bioquímica. S. Paulo, Edgard Blucher, 1976. v. 2, p. 360-84.
- 24 - LYNEN, F. - Über den aeroben phosphatbedarf der hefe. Justus Liebigs Ann.Chem., 546 : 120-41, 1941.
- 25 - LYNEN, F.; HARTMANN, G.; NETTER, K.F.; SCHUEGRAF, A. - Phosphate turnover and Pasteur effect. iba Found. Symp.Regul.Cell.Metab., London, 256-73, 1958.

- 26 - MARKHAM, E. & BYRNE, W.J. - The formation of polyphosphate during yeast growth. Proc., 4th Int. Symp. on the continuous culture of microorganisms. Prague, Academic Press, 17-21, 1968.
- 27 - MARZUKI, S.; COBON, G.S.; HASLAM, J.M.; LINNANE, A.W.- Biogenesis of mitochondria. The effects of altered steady-state membrane lipid-composition on mitochondria-energy metabolism in Saccharomyces cerevisiae. Arch.Biochem., New York, 169 : 577-80, 1975.
- 28 - MATELES, R.I. - Calculation of the oxygen required for cell production. Biotechnol.Bioeng., New York, 13 : 581-2, 1971.
- 29 - MEYENBURG, H.K.Von - Energetics of the budding cycle of Saccharomyces cerevisiae during glucose limited aerobic growth. Arch.Mikrobiol., Berlin, 66 : 289-303, 1969.
- 30 - MOSS, F.J.; RICKARD, A.D.; BUSH, F.E. - The response by microorganisms to steady-state growth in controlled concentrations of oxygen and glucose. II. Saccharomyces carlsbergensis. Biotechnol.Bioeng., New York, 13 : 63-75, 1971.
- 31 - OHASHI, M. - Oriental Yeast Co.Ltd. Tokyo, Japan. Comunicação pessoal (1977).
- 32 - OURA, E. - Reaction products of yeast fermentations. Process Biochem., London, 12 (3) : 19-21, 1977.
- 33 - PIRT, S.J. - Chemostat culture. In : ————, ed.

- Principles of microbe and cell cultivation. New York, Halsted, 1975. p. 29-41.
- 34 - SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, J. - J.biol.Chem., Baltimore, 161 : 83-9, 1945.
- 35 - SHODA, M. & AIBA, S. - Some considerations on the dual pathway associated with the aerobic cultivation of yeast cells. Progress Report nº 69, 1970. (Original cedido pelo autor).
- 36 - SIGMA CHEMICAL COMPANY, (Estados Unidos). Alcohol dehydrogenase. St. Louis, s.d. (Folheto).
- 37 - SIGMA CHEMICAL COMPANY, (Estados Unidos). β -Nicotinamide adenine dinucleotide. St. Louis, s.d. (Folheto).
- 38 - STEVENINCK, J.V. - The mechanism of transmembrane glucose transport in yeast : evidence for phosphorylation, associated with transport. Arch.Biochem., New York, 130 : 244-52, 1969.
- 39 - UYEDA, K. & RACKER, E. - Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VIII. The regulatory function of phosphate in glycolysis. J.biol.Chem., Baltimore, 240 (12) : 4689-93, 1965.
- 40 - WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. - Fermentation and Enzyme Technology, New York, John Wiley & Sons, 1979. p.98-137.
- 41 - WIAME, J.M. - The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in yeast. J.biol.Chem. Baltimore., 178 : 919-29, 1949.

42 - WORTHINGTON BIOCHEMICAL COMPANY, Osaka. (New Glucostat).
s.n.t. (Folheto em Japonês/Inglês).