MICHELE VITOLO

EFEITO DO pH E DA AERAÇÃO SOBRE A
ATIVIDADE INVERTÁSICA DE CÉLULAS
INTACTAS DE LEVEDURA (*S. cerevisiae*)
OBTIDAS POR CULTIVO DESCONTÍNUO

Tese apresentada ao Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da USP para a obtenção do
título de Livre-Docente.

SÃO PAULO
1989

DESCONFIAR SEMPRE DE TODO AQUELE QUE PROPÕE A OBTENÇÃO DA FELIC
CIDADE PLENA COMO OBJETIVO FINAL, MAS NÃO DESCARTAR AQUELE QUE
PROPUSER PEQUENOS MELHORAMENTOS A SEREM CONSEGUIDOS PASSO A
PASSO. (KARL POPPER).

DEDICO ESTA TESE A MINHA
QUERIDA ESPOSA MÁRCIA CRIST
TINA, AOS MEUS FILHOS GUIL
LHERME E ALESSANDRO E AOS
MEUS PAIS ERSILIO E ENRIC
CHETTA.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro concedido (processo nº 84/1260-1).

Ao Prof.Dr. Walter Borzani pelo apoio desde o início do trabalho, além dos profícuos pareceres emitidos durante a discussão dos resultados, que permitiram conduzir a bom termo esta tese.

Ao Prof.Dr. Eugênio Aquarone a quem devo o convite para ingressar na USP.

Ao Prof.Dr. Bruno C. de Almeida Cunha pelo incentivo ' que me tem dado.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelas facilidades colocadas a minha disposição e, em particular aos Prof. Dr. Renato Baruffaldi e Ângelo José Colombo, em cujas gestões os trabalhos desta tese foram realizados.

À Srta. Ângela Maria Lima pelo cuidadoso serviço de datilografia.

Ao Sr. Euclides Gomes da Silva pelo apoio técnico na clarificação do melaço empregado nos experimentos.

Ao Sr. Dante Augusto Moraes e à Sra. Oneida Holanda ' Rende Ramos pela cuidadosa colaboração, respectivamente, na dosagem do etanol e na manutenção da cepa de *S. cerevisiae*.

Ao Sr. Antonio Ferrarin pela sua prestimosa colaboração nos experimentos.

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

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

ÍNDICE

NOMENCLATURA	pg. I
RESUMO	II
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Objetivo do trabalho	3
1.3 A escolha do tipo de fermentação e de mosto	4
1.4 Escolha do microrganismo	5
1.5 Escolha das variáveis de estudo e análise dos resultados	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Preparo do mosto	8
2.1.1 Clarificação	8
2.1.2 Tratamento térmico	8
2.1.3 Acerto do pH	8
2.1.4 Suplementação	8
2.2 Preparo do inóculo	9
2.3 Descrição de um ensaio típico	9
2.4 Técnicas analíticas	10
2.4.1 Medida do pH	10
2.4.2 Medida da concentração celular	10
2.4.3 Medida da concentração de açúcares reduzíveis totais (ART)	10
2.4.4 Medida da atividade invertásica	10
2.4.5 Medida da concentração de etanol	11
3. RESULTADOS	13
3.1 Ensaio nº 1	13
3.2 Ensaio nº 2	15
3.3 Ensaio nº 3	17
3.4 Ensaio nº 4	19
3.5 Ensaio nº 5	21
3.6 Ensaio nº 6	23
3.7 Ensaio nº 7	25
3.8 Ensaio nº 8	27
3.9 Ensaio nº 9	29

3.10 Ensaio nº 10	31
3.11 Ensaio nº 11	33
3.12 Ensaio nº 12	35
3.13 Ensaio nº 13	37
3.14 Ensaio nº 14	39
3.15 Ensaio nº 15	41
3.16 Ensaio nº 16	43
3.17 Ensaio nº 17	45
3.18 Ensaio nº 18	47
3.19 Ensaio nº 19	49
3.20 Ensaio nº 20	51
3.21 Ensaio nº 21	53
3.22 Ensaio nº 22	55
3.23 Ensaio nº 23	57
3.24 Ensaio nº 24	59
3.25 Ensaio nº 25	61
3.26 Ensaio nº 26	63
3.27 Ensaio nº 27	65
3.28 Ensaio nº 28	67
 4. DISCUSSÃO	 69
 5. CONCLUSÕES	 131
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 133

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.
f	- Fator de diluição da suspensão de células.
m	- Massa de células secas, cuja atividade invertásica foi medida.
N	- Frequência do agitador.
r	- Coeficiente de correlação linear.
S_0	- Concentração inicial de AR no mosto.
S'_0	- Concentração inicial de ART no mosto.
S	- Concentração de AR no tanque de fermentação.
(S'-S)	- Concentração de sacarose no tanque de fermentação
dS/dt	- Velocidade de variação da concentração de AR no mosto em fermentação.
$(dS/dt)_c$	- Velocidade de consumo de AR.
$(dS/dt)_p$	- Velocidade de formação de AR a partir da sacarose.
$d(S'-S)/dt$	- Velocidade de variação da concentração de sacarose no mosto , em fermentação.
$d(S'-S)_c/dt$	- Velocidade de consumo de sacarose.
t	- Tempo.
v	- Atividade invertásica específica das células intactas de levedura (gART/gcél.min).
v'	- Atividade invertásica das células intactas de levedura (gART/L.min).
V_I	- Volume da amostra contendo a massa celular seca.
X	- Concentração de microrganismo no mosto em fermentação.
dX/dt	- Velocidade de variação da concentração celular no mosto em fermentação.
$(dX/dt)_c$	- Velocidade de crescimento do microrganismo.
y	- Absorbância da solução lida a 540 nm.
y_0	- Absorbância da solução no início da reação enzimática.
tg	- Tempo de geração.
$\bar{v}$	- Atividade invertásica específica das células intactas (gART/cél.h).
μ	- Velocidade específica de crescimento do microrganismo.
μ_S	- Velocidade específica de consumo de AR
$\mu(S'-S)$	- Velocidade específica de consumo de sacarose.

RESUMO

Mediu-se a atividade invertásica de células intactas de levedura (*S. cerevisiae*) cultivadas por processo fermentativo descontínuo, utilizando-se mosto constituído basicamente de melaço de cana de açúcar. Além disso, foram determinados, também, as concentrações de etanol (E), de células (X), de açúcares redutores (S) e de sacarose (S').

Variou-se a vazão específica de ar (ϕ) entre 0 e 3,0 L/L.min e o pH entre 4,0 e 6,5, tendo sido mantidos fixos os parâmetros: a) $N = 500 \text{ min}^{-1}$; b) volume inicial de mosto inoculado = 3 L; c) volume do inóculo = 450 mL; d) idade do inóculo = 22 h; e) anti-espumante: dimetilpolisiloxano; f) sais de suplementação: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,1 g/L) e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (2,4 g/L).

Realizaram-se, também, cultivos descontínuos ($\text{pH} = 5,5$ e $\phi = 1,0 \text{ min}^{-1}$) às temperaturas de 30°C ; 35°C e 40°C .

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 ($\mu_{(S'-S)}$).

Os resultados obtidos mostraram, dentre outras coisas, que: 1) a atividade invertásica (v) variava ao longo do cultivo, atingindo valor mínimo após 4 ou 5 h de processo, passando, em seguida, a aumentar abruptamente; 2) o pH, a aeração e a temperatura influíram no perfil das curvas $v = f(t)$, na produção global da enzima e na v final das células intactas; 3) a invertase em momento algum foi um fator limitante da disponibilidade de AR para as células; 4) a célula utilizou os nutrientes do mosto não só para o crescimento, mas também para a formação de outras substâncias; 5) a maior produção de invertase, que foi da ordem de $8,24 \text{ gART/L.min}$, ocorreu no cultivo realizado em $\text{pH} = 5,0$ e $\phi = 2,0 \text{ min}^{-1}$; 6) os maiores valores de v (da ordem de $1,7 \text{ gART/gcél.min}$) foram obtidos em sistemas aerados e em $\text{pH} 5,0$ e $5,5$.

Atribuiu-se a variação de v durante o cultivo à ação combinada dos seguintes fatores: a) mecanismos de repressão-desrepressão; b) disponibilidade no mosto de uma fonte de C de reserva; c) estímulos diferenciados sobre a via oxidativa, intermediados, sobretudo, pelo O_2 dissolvido; d) variações intra e extracelulares do pH.

Em linhas gerais, a variação de $v = f(t)$ pode ser visualizada como resultado das intensas modificações conformacionais e químicas sofridas pela parede celular durante os processos de crescimento e multiplicação da levedura, causando posicionamentos diversos e aleatórios das moléculas de enzima no espaço periplásmico, além de mudanças na própria estrutura da proteína, tornando-as mais ou menos acessíveis às moléculas de substrato.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

A invertase (β -fructofuranosídeo-frutohidrolase, E.C. 3.2.1.26) é uma enzima encontrada na parede celular do *S. cerevisiae*, que apresenta interesse industrial tanto na forma solúvel quanto insolúvel como via alternativa para a produção do açúcar invertido (61).

Apesar desta enzima ser conhecida desde o século passado, ter desempenhado importante papel no estabelecimento de vários conceitos bioquímicos e ter sido o segundo catalisador protéico a ser comercializado (62), existem vários aspectos não esclarecidos, relacionados com os mecanismos intracelulares envolvidos na biossíntese e na fixação da invertase na parede celular do *S. cerevisiae*. Tais eventos acabam interferindo em maior ou menor grau sobre a produtividade em invertase apresentada pela levedura, a qual, por sua vez, dependerá das condições de cultivo empregadas. Além disto o conhecimento mais aprofundado do perfil invertásico das células intactas permitiria avaliar a possibilidade de obter a enzima a partir de células residuais de destilarias, tornando-se, deste modo, um produto secundário da indústria alcooleira, setor bastante desenvolvido em nosso país.

Em trabalhos anteriores (65-66), onde o perfil invertásico de células de levedura obtidas de cultivos contínuos foi analisado frente à várias condições de crescimento, foi constatado que a atividade invertásica específica das células intactas oscilava periodicamente ao longo do experimento, mesmo quando no sistema era estabelecido o regime estacionário. Assim sendo mecanismos de repressão-desrepressão, amplamente aceitos para explicar a maior ou menor biossíntese da invertase (56), não puderam ser aceitos plenamente. Na tentativa de compreender o fenômeno observado, admitiu-se que a interação invertase-sacarose durante o cultivo contínuo seria afetada pelas contínuas e profundas alterações morfológicas sofridas pela parede celular e/ou espaço periplásmico. Tal hipótese foi consubstanciada a partir dos seguintes fatos descritos na literatura:

- a) durante a gemulação a parede celular é submetida a contínuas modificações;
- b) a invertase se distribui assimetricamente na parede do broto;
- c) a maior parte da enzima está associada à parede celular e/ou localizada no espaço periplásmico;
- d) o espaço periplásmico é suficientemente largo para acomodar toda a invertase extracitoplasmática.

Anteriormente (63) o trinômio: biossíntese/transferência/localização extracitoplasmática, foi visto como resultante do fato da célula de levedura atingir um tamanho adequado e, conseqüentemente, apresentar condições fisiológicas propícias à gemulação, cujo broto apareceria num ponto qualquer da superfície da célula-mãe. Nesta fase tornam-se evidentes o consumo de carboidratos de reserva (trealose, glicogênio), a síntese de polissacarídeos estruturais, o aumento do número de vesículas e da atividade da glucanase, enzima responsável pelo enfraquecimento localizado da parede celular da célula-mãe, por onde se dá a extrusão da gêmula. Uma vez rompida a parede original, começam a ser formadas de modo contínuo a parede celular e a plasmalema da gêmula, sendo as trocas intercelulares efetuadas através de um canal formado entre as células mãe e filha.

O material constituinte da nova parede celular, formado pelos polissacarídeos glicana (polímero de glicose com ligações osídicas do tipo β) e manana (polímero de manose contendo N-acetilglicosamina e fosfato) seria formado no citoplasma e, a seguir, levado à periferia através de vesículas. Tão logo o broto adquire o tamanho adequado, tem início a formação de um septo quitinoso entre ele e a célula-mãe, requerendo a concorrência de três elementos: quitina-sintetase, proteína ativadora e um peptídeo inibidor (63). Após um certo tempo as células se separam, reiniciando o ciclo de multiplicação.

Do que se conhece até hoje, o ciclo celular do *S. cerevisiae*, constituído basicamente das fases de gemulação e de crescimento, em face da ocorrência de eventos morfológicos e bioquímicos pode ser dividido nos estágios seguintes (28):

1) Fase S: período durante o qual o DNA se replica; 2) Fase G2: período transcorrido entre o final da replicação do DNA e a divisão nuclear; 3) Fase M: período de migração e divisão do núcleo da célula; 4) Fase G1: período entre a divisão do núcleo e a replicação do DNA. Dentro desta fase pode ser individualizado o período transcorrido entre a divisão nuclear e a separação das células.

No que tange à invertase, é sabido que existem duas formas da enzima, uma intracitoplasmática (desprovida de manana) e outra na parede celular (associada à manana), existindo controvérsias quanto às eventuais interações entre ambas (63). Contudo, para todos os efeitos, é a invertase extracitoplasmática a responsável pelo aproveitamento da sacarose pela levedura e que tem interesse comercial. Sobre o modo pelo qual a enzima se instala na parede celular, existem evidências de que durante a gemulação a invertase é depositada preferencialmente na parede celular do broto, sendo a parte protéica do

catalisador formada no retículo endoplasmático e, a seguir, glicolisada, à medida que vai sendo transferida para a gêmula. A transferência parece ser intermediada por vesículas e a glicosilação ocorreria ao nível da plasmalema (63).

Nos últimos anos as pesquisas nesta área tem sido dirigidas no sentido de elucidar os fatos acima arrolados através das seguintes abordagens: 1) avaliação das condições fisiológicas globais da célula sob determinadas situações. Os exemplos mais notórios seriam: a) o súbito aumento de proteínas quando as células são submetidas a um choque térmico (41)(68)(71); b) variações do pH citoplasmático em resposta às modificações nas condições de cultivo (4)(59), dentre as quais o teor de oxigênio dissolvido (47); 2) variações intracelulares de intermediários metabólicos, como por exemplo AMP cíclico(6)(52), carboidratos (26), enzimas gliconeogênicas(32) e ATP (69); 3) análise do modo pelo qual ocorrem a formação e o alongamento dos polímeros constituintes da parede celular (37)(58)(73); 4) identificação e deciframento da parte do código genético relacionado com os genes responsáveis pela formação da invertase, bem como os mecanismos reguladores de sua expressão (1)(11)(38); 5) detecção e caracterização de receptores localizados na parede celular (44).

Apesar dos múltiplos aspectos relacionados com o trinômio: biossíntese/transferência/localização extracitoplasmática estarem sendo intensivamente estudados, ainda falta muito para se ter uma idéia precisa e clara do assunto. Seria como dispor de uma caixa repleta de elos diferentes e misturados, os quais deveriam ser lógica e funcionalmente concatenados.

1.2. Objetivo do trabalho

Existem na literatura vários trabalhos publicados, nos quais foram abordados os mais variados aspectos do comportamento da levedura, cultivada na maioria dos casos em meios sintéticos, utilizando-se processo fermentativo descontínuo, contínuo ou descontínuo-alimentado. Como exemplos, podem ser citados os estudos relacionados com a composição da parede celular (37), repressão-desrepressão de enzimas (56) e aproveitamento de nutrientes (14)(29). De outra parte, são exíguas as informações disponíveis sobre o perfil enzimático da levedura cultivada em mosto constituído basicamente de resíduo industrial (melaço, por exemplo).

Salienta-se que o aproveitamento de resíduos agro-industriais está, no momento, recebendo muita atenção por parte dos pesquisadores, constituindo-se, inclusive, na mola propulsora do mercado brasileiro de enzimas (61).

Por conseguinte, neste trabalho foram analisados os efeitos do pH e da aeração sobre a atividade invertásica total de células intactas de *S. cerevisiae* cultivadas por processo descontínuo em melaço de cana-de-açúcar.

1.3. A escolha do tipo de fermentação e de mosto

Anteriormente (65-66) foi verificado que a atividade invertásica específica de células intactas de levedura cultivadas em melaço de cana-de-açúcar por processo contínuo em regime estacionário ou transiente não era constante. Resultado análogo foi obtido cultivando o microrganismo por processo descontínuo, verificando-se, neste caso, que a atividade invertásica em função do tempo era decrescente, atingindo o valor mínimo no instante $t = 4$ h, aumentando, em seguida, rapidamente (65).

Tendo em vista o processo descontínuo ser transiente por natureza e responder rapidamente às perturbações provocadas no sistema, optou-se pela sua adoção a fim de dar continuidade aos estudos referentes aos efeitos das variações dos parâmetros de cultivo (pH e aeração no presente trabalho) sobre a atividade invertásica do *S. cerevisiae*.

Outrossim, deve ser lembrado que em nosso país os processos fermentativos do tipo não contínuo são tradicionalmente os mais utilizados em escala industrial.

O cultivo de microrganismos, em princípio, pode ser feito usando-se tanto meios sintéticos e bem caracterizados quanto resíduos industriais, recaindo a escolha sobre o tipo de estudo a ser efetuado e/ou sobre a natureza do produto desejado. Caso o produto tenha interesse comercial, então o fator custo se torna relevante e, sendo assim, a possibilidade de emprego de matéria-prima mais barata deve ser considerada.

De outra parte, tendo este trabalho o objetivo de se afastar o menos possível da realidade do setor açúcar/etanol/levedura, optou-se pelo melaço de cana-de-açúcar, resíduo abundante da indústria açucareira e amplamente utilizado no Brasil.

Além disso, segundo Perego (42), o melaço é um meio rapidamente transformado pela levedura, não contém substâncias inibidoras, seu pH relativamente baixo diminui os riscos de contaminação, é de fácil manuseio e pode ser armazenado durante o ano todo.

1.4. Escolha do microrganismo

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

- a) esta espécie de levedura é um dos microrganismos mais estudados e bem conhecidos (63);
- b) a facilidade de seu isolamento e 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) o desenvolvimento de processos de interesse industrial através do uso das células imobilizadas (16)(31)(50);
- g) sua reconhecida capacidade de produzir enzimas extracitoplasmáticas, sendo, por exemplo, a principal fonte de invertase;
- h) o fato de apresentar a invertase situada na região periférica da célula, permitindo que a atividade desta enzima seja medida com relativa facilidade;
- i) possibilidade de obtenção de oxidoredutases intracitoplasmáticas (superóxido-dismutase e catalase) (27);
- j) existe enorme interesse em se modificar o genoma desta levedura por meio de técnicas biotecnológicas modernas (15)(34)(43).

Dado o amplo emprego desta espécie de levedura em nosso país para a produção de etanol, e considerando que neste processo o crescimento celular é ponderável, poder-se-ia, então, desviar parte desta biomassa para a obtenção da invertase. Abrir-se-ia, portanto, a possibilidade de acoplar a produção de etanol com a de invertase, sub-produto de valor comercial indiscutível (63).

1.5. Escolha das variáveis de estudo e análise dos resultados

Ao se utilizar microrganismos como agentes de transformação, dois aspectos intimamente relacionados porém distintos devem ser considerados: 1) o metabolismo celular, que é regido por mecanismos próprios e estritamente dependentes da constituição genética da célula; 2) as condições de cultivo nas quais a célula é obrigada a viver e que podem ser propositalmente variadas ou, então, que se alteram como consequência da atividade celular (caso típico do cultivo descontínuo).

De qualquer forma a resposta da célula às variações do meio ambiente se manifesta através de modificações morfo-fisiológicas, que implicam no aumento ou diminuição da atividade de pelo menos uma enzima (63) e/ou de algum intermediário metabólico (24).

Particularmente neste trabalho, escolheu-se a invertase como indicador da intensidade do efeito causado pela variação ambiental, sobretudo pela sua favorável localização na célula e pela facilidade da medida de sua atividade.

Os parâmetros de cultivo variados foram o pH e a vazão de ar introduzida na dorna, cujos intervalos são mostrados na tabela 1. Os níveis de variação fixados para os parâmetros selecionados, foram suficientes para provocar efeitos mensuráveis na célula de levedura.

Por outro lado, foram determinadas, também, 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. Fizeram-se, em paralelo, determi-nações do etanol eventualmente formado, com o intuito de se ter uma idéia da eficiência de uma determinada aeração do meio de cultivo.

A partir das equações abaixo (I-II), obtidas aplicando-se balan-ço material adequado (63), foi possível calcular as velocidades de consumo de AR e de sacarose, as quais serviram de base para o cálculo de μ_S e $\mu_{(S'-S)}$, respectivamente, a partir das equações III e IV.

A velocidade específica de crescimento celular (μ) e o tempo de geração (tg) foram calculados a partir das equações V e VI, respectivamente.

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

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

$$\mu_S = \frac{1}{X} \cdot \left| \frac{(dS)_c}{dt} \right| \quad (III)$$

$$\mu_{(S'-S)} = \frac{1}{X} \cdot \left| \frac{d(S'-S)_c}{dt} \right| \quad (IV)$$

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (V)$$

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (VI)$$

Para a determinação das variáveis dS/dt , dX/dt , $d(S'-S)/dt$ foi utilizado o método algébrico preconizado por Le Duy e Zajic (72).

A partir destes parâmetros, foi possível analisar os resultados obtidos experimentalmente, de tal modo a conseguir, entre outras, conclusões relacionadas com:

- condições de maior produção de células ricas em invertase;
- condições de cultivo que permitiram a evidênciação de um intervalo de tempo durante o qual o crescimento celular obedeceu a um modelo exponencial;
- as possíveis correlações entre as várias velocidades específicas;
- o verdadeiro significado dos valores de v medidos;
- a variação da atividade invertásica específica em função do tempo;
- a influência da temperatura sobre a "aceleração" de aparecimento da invertase;
- o efeito do pH e da aeração na produção da invertase.

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

TEMP. (°C)	ϕ^* pH	0	0,5	1	2	3
30	4,0	(5)	(2)	(3)	(1)	(4)
	4,5	(7)	(9)	(8)	(6)	(10)
	5,0	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
	5,5	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)
	6,0	(26)	-	(25)	(24)	-
	6,5	(21)	-	(22)	(23)	-
35	5,5	-	-	(27)	-	-
40	5,5	-	-	(23)	-	-

ϕ = vazão específica de ar (L/L.min).

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 (3)

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 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 48 h, para permitir a sedimentação de materiais precipitados. Findo este período, o mosto clarificado foi retirado por sifonação.

2.1.2. Tratamento térmico

O mosto clarificado foi convenientemente diluído para uma concentração de ART da ordem de 30 g/L, tendo sido seu pH ajustado a 7,0 com solução de NaOH 4,0 N e, a seguir, autoclavado a 120°C por 30 min.

2.1.3. Acerto do pH

Antes do mosto ser utilizado na fermentação o seu pH era ajustado ao valor desejado pela adição de quantidades adequadas de solução 4,0 N de H_2SO_4 ou 4,0 N de NaOH.

A fração de mosto usada para preparar o inóculo teve seu pH ajustado em 4,5.

2.1.4. Suplementação

Em todos os experimentos efetuados, utilizou-se mosto suplementado com: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (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), conforme preconizado por White (70).

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 contendo: agar nu triente Difco 23,0 g/L e glicose 1,0 g/L.

A partir da cultura pura, o microrganismo foi inoculado 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) e deixado em estufa a 33°C por 24 h.

Os tubos de agar inclinado, por sua vez, serviram de inóculo a tubos contendo 2,5 mL de caldo glicosado, cuja composição era idêntica ao meio anterior a menos do agar-agar, os quais foram deixados em estufa a 33°C por 48 h.

Cada tubo de caldo glicosado serviu de inóculo a um frasco (250 mL) contendo 50 mL de mosto idêntico ao utilizado no ensaio. Os frascos eram dei xados incubando a 30°C por 22 h em agitador metabólico (frequência de agitação entre 110 e 120 min⁻¹), sendo, a seguir, utilizados para inocular a dorna.

2.3. Descrição de um ensaio típico

Utilizou-se fermentador "Kiel" com dorna de 5 L de capacidade no minal, fabricado pela L. Eschweiler e Co Kiel, com controles de temperatura, frequência do agitador, pH e vazão de ar.

A dorna foi, inicialmente, carregada com 2,55 L de mosto e, a se guir, inoculada com 450 mL de inóculo. Nos experimentos feitos em aerobiose, borbulhou-se ar no mosto por 30 min antes de se proceder à inoculação.

Em todos os ensaios efetuados foram mantidos fixos os seguintes parâmetros: a) $N = 500 \text{ min}^{-1}$; b) volume inicial de mosto inoculado = 3 L; c) volume do inóculo = 450 mL; d) idade do inóculo = 22 h; e) dimetilpolisiloxano (antiespumante adicionado conforme a necessidade); f) concentração e na tureza dos sais de suplementação (conforme descrito no item 2.1.4). As demais condições experimentais estão especificadas nos ensaios correspondentes no capítulo de resultados.

O andamento do cultivo descontínuo foi acompanhado por amostragens feitas de hora em hora. A amostra tão logo obtida foi submetida ao seguinte ' tratamento (63): 10 mL foram filtrados através de membrana filtrante (Millipore^R, diâmetro do poro = 0,45 μm) e 10 mL foram centrifugados a 3000xg por 10 min. O filtrado foi usado para a determinação do AR e ART e o resíduo, após duas lavagens sucessivas com água destilada (25 mL), foi usado para determinar a massa celular seca. O resíduo da centrifugação, por sua vez, foi lavado 2 ve zes sucessivas com água destilada (10 mL), e, a seguir, recolhido em erlenmeyer

de 125 mL munido de rolha, o qual foi deixado a 4°C até o momento da determina
ção da atividade invertásica.

2.4. Técnicas analíticas

2.4.1. Medida do pH

O pH foi medido em potenciômetro da marca Micronal (modelo B 371).

2.4.2. Medida da concentração celular (3)

A amostra, tão logo obtida, foi filtrada através de membrana fil
trante para separar as células em suspensão. O resíduo foi lavado duas vê
zes com 10 mL de água destilada e posto a secar em estufa a 105°C por 2 h.

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

2.4.3. Medida da concentração de açúcares redutores totais (ART)

Em balão de 100 mL foram colocados 5,0 mL do meio isento de cêlu
las 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 o balão foi
resfriado (12).

A concentração de ART no hidrolisado foi determinada pelo método
de Somogyi (45).

Os resultados das determinações foram expressos em gramas de açú
cares redutores totais calculados como glicose, por litro de mosto. A calibra
ção foi feita contra soluções de glicose, cujas concentrações distribuíram-se
no intervalo de 20 a 200 mg/L.

2.4.4. Medida da atividade invertásica (63-64)

A suspensão de células foi diluída de modo que o consumo de subs
trato não fosse superior a 1% da quantidade inicialmente presente, durante o
tempo total da reação.

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 solução alcali
no-cúprica, seguida da imediata imersão em banho de água fervente por 10 min .

Após resfriamento do tubo em água corrente, adicionaram-se 2,0 mL da solução ' arseno-molibdica e agitou-se energicamente. A seguir o volume foi completado a 25,0 mL com água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (com primento de onda igual a 540 nm). Esta determinação foi feita sempre em duplicata.

Empregou-se a seguinte equação para o cálculo da atividade:

$$v = \frac{2fV_I}{m \cdot t} \cdot \frac{y - y_0 - a}{b} \quad (\text{VII})$$

onde: v = atividade invertásica específica (expressa em gART/gcél . min)
 f = fator de diluição
 V_I = volume da amostra contendo a massa seca (mL)
 m = massa de células secas, cuja atividade invertásica é determi
nada (g)
 t = tempo da reação (min)
 y = absorbância da solução lida a 540 nm
 y_0 = absorbância da solução no início da reação
 a, b = coeficiente linear e angular da curva de calibração
OBS.: quando t foi expresso em horas v foi simbolizado por ∇ .

2.4.5. Medida da concentração de etanol (25)

Em aparelho de destilação por arraste a vapor (marca Tecnal) des
tilou-se 1,0 mL do mosto isento de células, tendo o destilado sido recolhido
em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de solução 0,7 N de $K_2Cr_2O_7$. Em
seguida o frasco foi mergulhado em banho de água a 65-70°C por 20 minutos para
que a reação de oxidação ocorresse. Após resfriamento em água corrente, o
excesso de dicromato de potássio era determinado por titulação com sulfato fer
roso amoniacal, usando-se a ortofenantrolina como indicador.

Em paralelo efetuava-se uma prova em branco, usando-se água des
tilada.

A concentração de etanol foi expressa em g/L e calculada pela re
lação:

$$E = 11,5 \cdot V' \cdot N' \cdot \left(1 - \frac{V_a}{V_b}\right) \quad (\text{VIII})$$

- onde:
- V' = volume de solução de dicromato de potássio (mL)
 - N' = normalidade da solução de $K_2Cr_2O_7$
 - V_a = volume de solução contendo sal de Mohr gasto na titulação da amostra (mL)
 - V_b = volume de solução contendo sal de Mohr gasto na titulação da prova em branco (mL)
 - E = concentração de etanol (g/L)

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio nº 1

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).

$S_0 = 6,50$ g/L

$S'_0 = 32,7$ g/L

Volume final de mosto = 3,28 L

Vazão específica de ar = 2,0 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 4,0

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 2 e na figura 1.

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

$$y = 2,556 x - 0,009 \quad r = 0,9990$$

TABELA 2. Resultados obtidos no ensaio nº 1.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	v(gART/gcél.min)		
				MEDIDAS		MÉDIA
				1ª	2ª	
0	0,670	6,10	32,0	0,474	0,478	0,476
1	0,670	9,60	31,1	0,369	0,365	0,366
2	0,710	9,70	20,3	0,260	0,260	0,260
3	1,00	12,3	19,5	0,116	0,116	0,116
4	1,23	9,70	15,6	0,0820	0,0800	0,0810
5	1,60	8,80	13,4	0,0825	0,0800	0,0830
6	2,20	5,90	9,60	0,200	0,190	0,195
7	2,34	2,60	5,60	0,274	0,274	0,274
8	2,82	2,00	2,60	0,374	0,370	0,372

FIGURA 1. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (▲), AR (S) (■), de células (X) (●) e da atividade invertásica (v) (○) no ensaio nº 1.

3.2. Ensaio nº 2

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).

$$S_o = 5,26 \text{ g/L}$$

$$S'_o = 29,6 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 3,0 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 0,5 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 4,0$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 3 e figura 2.

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

$$y = 2,556 x - 0,009$$

$$r = 0,9990$$

TABELA 3. Resultados obtidos no ensaio nº 2.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	v(gART/gcél.min)		
				MEDIDAS		MÉDIA
				1ª	2ª	
0	0,790	4,70	26,8	0,334	0,332	0,333
1	0,810	7,20	23,3	0,230	0,230	0,230
2	1,00	8,40	21,2	0,170	0,168	0,169
3	1,16	11,1	19,9	0,122	0,122	0,122
4	1,46	9,70	16,4	0,0900	0,0860	0,0880
5	1,70	7,90	13,8	0,0750	0,0750	0,0750
6	1,93	5,70	9,70	0,0600	0,0580	0,0590
7	2,38	3,10	5,20	0,102	0,100	0,101
8	2,54	1,20	1,90	0,329	0,329	0,329
9	2,70	0,500	0,800	0,414	0,416	0,415

FIGURA 2. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacktriangle$), AR (S) ($\blacksquare$), de células (X) ($\bullet$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 2.

3.3. Ensaio nº 3

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).

$S_0 = 6,00 \text{ g/L}$

$S'_0 = 32,7 \text{ g/L}$

Volume final de mosto = 3,0 L

Vazão específica de ar = 1,0 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 4,0

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 4 e figura 3.

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

$$y = 2,663 x - 0,031$$

$$r = 0,999990$$

TABELA 4. Resultados obtidos no ensaio nº 3.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	v(gART/gcél.min)		
				MEDIDAS		MÉDIA
				1ª	2ª	
0	0,730	5,50	26,8	0,218	0,218	0,218
1	0,770	7,60	24,2	0,242	0,244	0,243
2	0,930	10,4	23,5	0,122	0,122	0,122
3	1,09	12,5	19,4	0,116	0,116	0,116
4	1,56	11,3	18,7	0,0820	0,0820	0,0820
5	1,88	8,80	16,6	0,0660	0,0640	0,0650
6	2,40	6,50	11,2	0,100	0,0960	0,0980
7	3,05	2,30	4,50	0,230	0,228	0,229
8	3,38	0,900	1,60	0,706	0,706	0,706
9	3,49	0,600	1,30	0,803	0,803	0,803

FIGURA 3. Variação com o tempo das concentrações do ART (S') (Δ), AR (S) ($\blacksquare$), de células (X) ($\bullet$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 3.

3.4. Ensaio nº 4

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).

$S_0 = 6,10 \text{ g/L}$

$S'_0 = 29,6 \text{ g/L}$

Volume final do mosto = 2,92 L

Vazão específica de ar = 3,0 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 4,0

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 5 e na figura 4.

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

$$y = 2,741x - 0,023$$

$$r = 0,9992$$

TABELA 5. Resultados obtidos no ensaio nº 4.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	v(gART/gcél.min)		
				MEDIDAS		MÉDIA
				1ª	2ª	
0	0,780	5,30	25,6	0,128	0,126	0,127
1	0,800	6,40	23,1	0,145	0,145	0,145
2	1,00	19,8	22,7	0,107	0,107	0,107
3	1,34	12,6	21,3	0,0840	0,0820	0,0830
4	1,52	9,60	17,5	0,0790	0,0750	0,0770
5	2,14	8,30	15,5	0,0750	0,0750	0,0750
6	2,36	5,20	10,4	0,126	0,126	0,126
7	3,74	2,30	3,80	0,545	0,543	0,544
8	4,14	0,800	0,900	1,19	1,19	1,19
9	3,85	0,500	0,700	1,48	1,48	1,48

FIGURA 4. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (▲), AR (S) (■), de células (X) (●) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 4.

3.5. Ensaio nº 5

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).

$$S_0 = 5,44 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 29,6 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,90 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 0$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 4,0$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 6 e na figura 5.

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

$$y = 2,741x - 0,023$$

$$r = 0,9992$$

A partir deste ensaio serão feitas determinações do teor alcoólico das amostras.

TABELA 6. Resultados obtidos no ensaio nº 5.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E [*] (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,600	3,90	23,8	0,390	0,202	0,200	0,201
1	0,830	6,40	21,2	1,90	0,185	0,185	0,185
2	0,840	8,00	19,9	2,40	0,182	0,180	0,181
3	0,890	9,40	18,3	2,40	0,175	0,171	0,173
4	1,62	9,00	16,5	3,95	0,106	0,0980	0,102
5	1,80	6,70	11,8	4,74	0,143	0,143	0,143
6	2,23	3,60	6,70	4,34	0,257	0,255	0,256
7	2,82	1,60	2,70	7,50	0,596	0,596	0,596
8	2,90	0,500	0,900	8,70	0,932	0,932	0,932
9	2,53	0,400	0,700	6,70	1,15	1,15	1,15

* E = concentração de etanol

FIGURA 5. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (•), AR (S) (▲), de células (X) (■) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 5.

3.6. Ensaio nº 6

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).

$S_0 = 6,50 \text{ g/L}$

$S'_0 = 31,4 \text{ g/L}$

Volume final de mosto = 2,90 L

Vazão específica de ar = 2,0 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 4,5

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X , AR , ART e v encontram-se na ta bela 7 e figura 6.

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

$$y = 2,116 x + 0,0023$$

$$r = 0,9995$$

TABELA 7.. Resultados obtidos no ensaio nº 6.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,790	5,80	29,3	0,250	0,108	0,106	0,107
1	0,940	7,00	26,5	1,10	0,103	0,103	0,103
2	1,08	9,60	24,6	2,30	0,124	0,124	0,124
3	1,35	10,3	20,6	2,70	0,0950	0,0950	0,0950
4	1,81	10,1	19,2	3,10	0,0820	0,0780	0,0800
5	2,47	8,90	14,4	4,60	0,0560	0,0560	0,0560
6	3,02	5,30	10,2	6,60	0,0640	0,0640	0,0640
7	4,11	2,30	3,20	7,30	0,516	0,520	0,518
8	4,15	0,590	0,900	7,70	0,819	0,819	0,819
9	4,16	0,580	0,330	6,60	0,948	0,956	0,952

FIGURA 6. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 6.

3.7. Ensaio nº 7

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).

$$S_0 = 7,40 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 29,8 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,90 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 0$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 4,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, v e E encontram-se na tabela 8 e figura 7.

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

$$y = 2,444 x - 0,0023$$

$$r = 0,9990$$

TABELA 8. Resultados obtidos no ensaio nº 7.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,300	6,80	29,8	0,0	0,0940	0,0980	0,0960
1	0,420	7,00	22,5	1,40	0,0690	0,0690	0,0690
2	0,450	8,30	22,9	2,00	0,0590	0,0550	0,0570
3	0,470	8,50	23,1	2,40	0,0610	0,0610	0,0610
4	0,510	8,70	22,3	2,40	0,0570	0,0570	0,0570
5	0,880	8,30	21,5	3,00	0,0400	0,0420	0,0410
6	1,26	7,90	19,9	3,20	0,0500	0,0500	0,0500
7	1,60	7,20	17,5	3,60	0,0670	0,0640	0,0650
8	1,77	5,60	14,4	4,00	0,0810	0,0830	0,0820
9	1,97	4,10	11,3	4,30	0,107	0,107	0,107
10	2,17	2,60	6,90	7,50	0,211	0,209	0,210

FIGURA 7. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\bullet$), AR (S) ($\blacktriangle$), de células (X) ($\blacksquare$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 7.

3.8. Ensaio nº 8

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).

$$S_0 = 7,40 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 29,8 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,80 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 1,0 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 4,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART e v encontram-se na tabela 9 e figura 8.

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

$$y = 2,4074 x - 0,012$$

$$r = 0,9992$$

TABELA 9. Resultados obtidos no ensaio nº 8.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	v(gART/gcél.min)		
				MEDIDAS		MÉDIA
				1ª	2ª	
0	0,470	7,40	25,3	0,205	0,205	0,205
1	0,570	9,00	23,4	0,179	0,179	0,179
2	0,740	10,5	22,6	0,148	0,150	0,149
3	0,850	10,9	20,9	0,125	0,123	0,124
4	1,20	11,9	20,1	0,0830	0,0830	0,0830
5	1,67	10,5	16,8	0,0560	0,0560	0,0560
6	2,19	8,20	12,1	0,0700	0,0700	0,0700
7	2,98	2,30	4,70	0,420	0,410	0,415
8	3,53	0,630	1,10	1,46	1,46	1,46
9	3,87	0,560	0,90	1,58	1,58	1,58

FIGURA 8. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\odot$) no ensaio nº 8.

3.9. Ensaio nº 9

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).

$$S_0 = 7,40 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 24,2 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,86 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 0,5 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 4,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 10 e na figura 9.

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

$$y = 2,4012 x + 0,0049$$

$$r = 0,9990$$

TABELA 10. Resultados obtidos no ensaio nº 9.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					1ª	2ª	MÉDIA
0	0,440	6,00	24,2	0	0,245	0,245	0,245
1	0,510	8,60	23,7	0,800	0,194	0,194	0,194
2	0,760	10,6	22,5	1,20	0,124	0,122	0,123
3	0,920	11,0	20,4	1,60	0,105	0,107	0,106
4	1,29	10,6	18,7	2,00	0,0730	0,0730	0,0730
5	1,80	9,80	15,4	2,40	0,0500	0,0500	0,0500
6	2,19	5,80	11,5	2,80	0,152	0,148	0,150
7	2,70	2,70	4,00	3,60	0,496	0,496	0,496
8	3,42	0,700	0,800	5,60	1,25	1,23	1,24
9	3,47	0,600	0,700	6,00	1,42	1,42	1,42

FIGURA 9. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (⊙) no ensaio nº 9.

3.10. Ensaio nº 10

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).

$$S_0 = 7,40 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 24,2 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,90 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 3,0 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 4,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 11 e na figura 10.

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

$$y = 2,3506 x - 0,0135$$

$$r = 0,99990$$

TABELA 11. Resultados obtidos no ensaio nº 10.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,550	6,50	23,1	0	0,261	0,263	0,262
1	0,670	9,00	22,7	0,400	0,234	0,234	0,234
2	0,800	10,8	20,2	1,70	0,167	0,167	0,167
3	1,18	11,2	19,4	2,20	0,107	0,107	0,107
4	1,68	9,10	14,8	2,60	0,0670	0,0650	0,0660
5	2,96	8,20	11,4	3,00	0,0830	0,0830	0,0830
6	3,17	5,70	7,00	6,40	0,214	0,212	0,213
7	3,57	1,20	1,90	7,90	0,735	0,735	0,735
8	3,67	0,500	0,700	10,0	0,998	1,01	1,00
9	3,41	0,400	0,500	10,5	1,10	1,08	1,09

FIGURA 10. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\odot$) no ensaio nº 10.

3.11. Ensaio nº 11

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).

$S_0 = 8,20 \text{ g/L}$

$S'_0 = 27,8 \text{ g/L}$

Volume final de mosto = 2,96 L

Vazão específica de ar = 0

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 5,0

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 12 e na figura 11.

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

$$y = 2,3506 x - 0,0135$$

$$r = 0,9996$$

TABELA 12. Resultados obtidos no ensaio nº 11.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,690	8,60	29,5	0,200	0,209	0,209	0,209
1	0,810	9,40	26,1	2,40	0,195	0,197	0,196
2	0,850	13,0	24,9	3,00	0,186	0,186	0,186
3	1,10	14,6	23,3	3,80	0,115	0,115	0,115
4	1,41	13,3	18,2	4 20	0,0880	0,0860	0,0870
5	1,74	10,8	15,2	4,90	0,0770	0,0770	0,0770
6	2,03	8,20	10,4	6,40	0,0640	0,0640	0,0640
7	2,52	4,40	7,10	-	0,0680	0,0660	0,0670
8	2,84	1,10	2,10	10,0	0,577	0,579	0,578
9	2,93	0,500	0,900	10,3	1,01	1,01	1,01

FIGURA 11. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (•), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 11.

3.12. 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).

$S_0 = 8,20$ g/L

$S'_0 = 27,8$ g/L

Volume final de mosto = 2,84 L

Vazão específica de ar = 0,5 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 5,0

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 13 e na figura 12.

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

$$y = 2,3506 x - 0,0135$$

$$r = 0,9996$$

TABELA. 13. Resultados obtidos no ensaio nº 12.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,700	8,20	27,8	0,200	0,242	0,242	0,242
1	0,750	10,5	26,1	1,20	0,226	0,224	0,225
2	0,910	13,3	25,8	2,00	0,174	0,174	0,174
3	1,19	13,8	22,0	-	0,120	0,122	0,121
4	1,68	13,3	19,0	2,40	0,0730	0,0730	0,0730
5	2,40	9,50	13,9	4,80	0,0630	0,0630	0,0630
6	2,80	5,40	7,40	6,80	0,108	0,104	0,106
7	3,80	1,40	2,30	7,60	1,05	1,05	1,05
8	4,10	0,710	1,00	7,60	1,42	1,42	1,42
9	3,50	0,630	0,830	-	1,71	1,71	1,71

FIGURA 12. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 12.

3.13. Ensaio nº 13

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).

$S_0 = 13,3 \text{ g/L}$

$S'_0 = 33,7 \text{ g/L}$

Volume final de mosto = 3,06 L

Vazão específica de ar = 1,0 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 5,0

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 14 e na figura 13.

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

$$y = 2,4925 x - 0,0047 \quad r = 0,9996$$

TABELA 14. Resultados obtidos no ensaio nº 13.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,550	10,0	23,2	0	0,115	0,115	0,115
1	0,580	10,7	22,0	-	0,128	0,130	0,129
2	0,630	10,6	21,2	2,00	0,0950	0,0950	0,0950
3	0,830	10,2	19,6	2,40	0,0600	0,0600	0,0600
4	1,01	9,80	18,0	3,20	0,0430	0,0450	0,0440
5	1,30	8,70	16,4	3,60	0,0540	0,0540	0,0540
6	1,76	6,40	12,2	-	0,0630	0,0630	0,0630
7	2,37	4,00	8,80	4,00	0,0960	0,0980	0,0970
8	2,97	1,70	4,90	4,80	0,141	0,137	0,139
9	3,55	1,20	2,40	-	0,204	0,204	0,204
10	3,61	0,700	0,900	8,90	0,346	0,346	0,346

FIGURA 13. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 13.

3.14. Ensaio nº 14

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).

$S_0 = 13,0 \text{ g/L}$

$S'_0 = 33,5 \text{ g/L}$

Volume final de mosto = 2,80 L

Vazão específica de ar = 2,0 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 5,0

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, ART, E e v encontram-se na tabela 15 e na figura 14

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

$$y = 2,4925 x - 0,0047$$

$$r = 0,9996$$

TABELA 15. Resultados obtidos no ensaio nº 14.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,700	10,6	24,0	1,60	0,196	0,196	0,196
1	0,820	12,9	23,2	2,00	0,223	0,221	0,222
2	1,20	13,0	21,2	2,40	0,132	0,132	0,132
3	1,63	13,1	19,4	4,40	0,0950	0,0950	0,0950
4	2,50	10,8	15,0	6,00	0,0550	0,0550	0,0550
5	3,16	6,30	9,20	7,20	0,104	0,102	0,103
6	4,27	1,80	2,60	8,40	0,742	0,742	0,742
7	5,07	0,740	0,720	9,20	1,32	1,28	1,30
8	4,96	0,690	0,520	9,20	1,57	1,57	1,57
9	4,99	0,500	0,400	9,20	1,67	1,69	1,68

FIGURA 14. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 14.

3.15. Ensaio nº 15

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).

$$S_0 = 12,9 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 29,1 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,90 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 3,0 \text{ L/L.min}$$

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 5,0$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 16 e na figura 15.

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

$$y = 2,450 x + 0,002$$

$$r = 0,9990$$

TABELA 16. Resultados obtidos no ensaio nº 15.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,680	10,1	21,0	0	0,179	0,177	0,178
1	0,720	11,3	20,2	1,00	0,185	0,185	0,185
2	0,870	11,8	19,4	2,00	0,157	0,155	0,156
3	1,17	12,0	18,6	2,40	0,119	0,119	0,119
4	1,59	11,3	16,2	3,60	0,0670	0,0690	0,0680
5	2,30	8,90	12,5	3,60	0,0510	0,0510	0,0510
6	2,80	6,40	8,90	5,60	0,0400	0,0400	0,0400
7	3,98	2,00	3,60	7,20	0,296	0,296	0,296
8	4,49	0,640	1,20	7,20	1,10	1,14	1,12
9	4,92	0,530	0,460	8,40	1,20	1,20	1,20

FIGURA 15. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 15.

3.16. Ensaio nº 16

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).

$S_0 = 13,0$ g/L

$S'_0 = 29,1$ g/L

Volume final de mosto = 2,90 L

Vazão específica de ar = 0

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 5,5

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 17 e na figura 16.

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

$$y = 2,4375 x + 0,0015$$

$$r = 0,9991$$

TABELA 17. Resultados obtidos no ensaio nº 16.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,690	10,6	22,3	0	0,152	0,152	0,152
1	0,710	11,2	20,7	2,20	0,179	0,179	0,179
2	0,950	11,8	20,4	2,60	0,129	0,131	0,130
3	1,22	11,9	18,7	2,60	0,101	0,101	0,101
4	1,58	9,80	15,5	5,00	0,0760	0,0760	0,0760
5	1,97	7,00	11,0	7,40	0,0640	0,0640	0,0640
6	2,21	3,90	6,50	9,40	0,0700	0,0700	0,0700
7	2,73	1,30	2,60	10,0	0,476	0,478	0,477
8	3,00	0,660	1,10	10,6	1,21	1,21	1,21
9	2,92	0,480	0,630	10,6	1,39	1,39	1,39

FIGURA 16. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 16.

3.17. Ensaio nº 17

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).

$$S_0 = 13,0 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 28,1 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,92 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 0,5 \text{ L/L.min}$$

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 5,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, v e E encontram-se na tabela 18 e na figura 17.

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

$$y = 2,4400 x + 0,0037$$

$$r = 0,9995$$

TABELA 18. Resultados obtidos no ensaio nº 17.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,610	10,5	25,6	0	0,108	0,108	0,108
1	0,680	11,2	23,2	1,60	0,143	0,145	0,144
2	0,860	12,7	21,8	2,00	0,0980	0,0980	0,0980
3	1,14	10,6	17,9	2,80	0,0880	0,0880	0,0880
4	1,71	10,1	16,3	4,00	0,0610	0,0630	0,0620
5	2,19	6,80	11,8	7,70	0,0410	0,0410	0,0410
6	3,07	2,40	5,60	8,50	0,237	0,239	0,238
7	4,03	0,900	1,70	8,90	1,21	1,21	1,21
8	4,00	0,800	0,800	9,30	1,57	1,57	1,57
9	4,08	0,500	0,500	10,5	1,61	1,61	1,61

FIGURA 17. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 17.

3.18. Ensaio nº 18**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).

$S_0 = 13,0$ g/L

$S'_0 = 28,1$ g/L

Volume final de mosto = 2,94 L

Vazão específica de ar = 1,0 L/L.min

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 5,5

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 19 e na figura 18.

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

$$y = 2,4400 x + 0,0037$$

$$r = 0,9995$$

TABELA 19. Resultados obtidos no ensaio nº 18.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS 1ª	2ª	MÉDIA
0	0,600	10,3	23,1	0	0,126	0,128	0,127
1	0,600	11,2	21,4	1,2	0,158	0,158	0,158
2	0,700	11,7	20,2	2,20	0,123	0,123	0,123
3	0,870	12,9	19,4	2,60	0,105	0,105	0,105
4	1,30	11,6	18,5	3,40	0,0690	0,0690	0,0690
5	1,88	9,50	16,1	4,80	0,0490	0,0510	0,0500
6	2,73	6,00	9,60	5,60	0,0720	0,0720	0,0720
7	3,71	2,01	3,50	7,20	0,659	0,659	0,659
8	4,08	0,710	1,00	8,20	1,69	1,71	1,70
9	4,01	0,540	0,700	9,30	1,73	1,73	1,73

FIGURA 18. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (◻) no ensaio nº 18.

3.19. Ensaio nº 19

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).

$$S_0 = 15,0 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 26,2 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,85 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 2,0 \text{ L/L.min}$$

$$T = 30^\circ\text{C}$$

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

$$\text{pH} = 5,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 20 e na figura 19.

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

$$y = 2,3875 x + 0,0010$$

$$r = 0,9998$$

TABELA 20. Resultados obtidos no ensaio nº 19.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,630	12,4	25,5	0,740	0,196	0,194	0,195
1	0,570	12,8	22,5	1,10	0,176	0,176	0,176
2	0,780	14,2	21,7	1,12	0,151	0,150	0,151
3	1,14	13,4	20,0	1,48	0,0970	0,0970	0,0970
4	2,03	11,5	16,7	2,58	0,0540	0,0540	0,0540
5	2,79	6,70	11,6	5,54	0,0460	0,0440	0,0450
6	3,76	2,30	4,40	5,91	0,596	0,596	0,596
7	4,66	0,850	1,40	7,02	1,40	1,44	1,42
8	4,94	0,740	1,20	8,12	1,69	1,69	1,69
9	4,60	0,740	1,10	8,49	1,60	1,60	1,60

FIGURA 19. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 19.

3.20. Ensaio nº 20

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).

$$S_0 = 17,6 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 24,8 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,80 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 3,0 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 5,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 21 e na figura 20.

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

$$y = 2,1411 x - 0,0053 \quad r = 0,9993$$

TABELA 21. Resultados obtidos no ensaio nº 20.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,770	15,7	24,3	0	0,262	0,264	0,263
1	0,880	16,1	22,2	0,920	0,237	0,237	0,237
2	1,16	15,4	20,8	1,00	0,166	0,166	0,166
3	1,65	13,3	17,5	1,24	0,140	0,140	0,140
4	2,29	10,1	13,1	1,84	0,0750	0,0730	0,0740
5	3,01	5,90	7,70	2,20	0,0650	0,0650	0,0650
6	3,60	1,80	1,00	2,49	1,08	1,08	1,08
7	4,56	0,780	0,550	3,44	1,32	1,30	1,31
8	4,71	0,600	0,380	4,00	1,40	1,40	1,40
9	4,66	0,550	0,300	5,70	1,45	1,45	1,45

FIGURA 20. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (•), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 20;

3.21. Ensaio nº 21

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).

$$S_0 = 17,6 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 24,8 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,78 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 0$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 6,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos na determinação de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 22 e na figura 21.

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

$$y = 2,1411x - 0,0053 \quad r = 0,9993$$

TABELA 22. Resultados obtidos no ensaio nº 21.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,450	14,0	22,5	0	0,234	0,234	0,234
1	0,490	16,1	22,0	1,00	0,232	0,230	0,231
2	0,590	16,8	21,4	1,25	0,179	0,179	0,179
3	0,750	16,2	20,1	1,75	0,135	0,135	0,135
4	0,930	14,9	18,0	2,22	0,110	0,107	0,109
5	1,11	13,3	16,0	2,50	0,107	0,107	0,107
6	1,36	8,30	10,4	3,24	0,0870	0,0870	0,0870
7	1,77	4,40	6,00	3,74	0,0560	0,0560	0,0560
8	2,11	2,40	3,80	5,24	0,0930	0,0930	0,0930
9	2,40	1,60	2,90	5,73	0,560	0,562	0,561
10	2,41	1,20	2,20	6,73	0,825	0,825	0,825

FIGURA 21. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 21.

3.22. Ensaio nº 22

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).

$$S_0 = 17,6 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 24,8 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,85 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 1,0 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 6,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 23 e na figura 22.

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

$$y = 2,1411 x - 0,0053$$

$$r = 0,9993$$

TABELA 23. Resultados obtidos no ensaio nº 22.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,550	16,6	22,9	0,410	0,510	0,510	0,510
1	0,690	17,3	21,9	0,820	0,415	0,415	0,415
2	0,890	17,3	20,8	1,65	0,330	0,330	0,330
3	1,18	16,8	19,2	2,06	0,262	0,266	0,264
4	1,53	15,4	17,1	2,47	0,196	0,195	0,196
5	2,03	13,2	14,5	2,89	0,156	0,156	0,156
6	2,94	8,90	9,60	2,89	0,120	0,120	0,120
7	3,83	2,80	3,50	4,12	0,480	0,482	0,481
8	4,21	1,10	1,70	4,53	0,960	0,960	0,960
9	4,16	0,980	1,30	5,77	1,18	1,18	1,18

FIGURA 22. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (•), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 22.

3.23. Ensaio nº 23

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).

$S_0 = 18,3$ g/L

$S'_0 = 26,0$ g/L

Volume final de mosto = 2,90 L

Vazão específica de ar = 2,0 L/L.min

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

$T = 30^\circ\text{C}$

pH = 6,5

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 24 e na figura 23.

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

$$y = 2,3750 x - 0,0043 \quad r = 0,9997$$

TABELA 24. Resultados obtidos no ensaio nº 23.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,700	14,2	22,3	0,590	0,328	0,328	0,328
1	0,740	15,4	21,4	0,790	0,317	0,317	0,317
2	0,830	16,0	20,6	0,790	0,267	0,269	0,268
3	1,00	16,2	19,3	0,990	0,235	0,235	0,235
4	1,27	15,2	18,0	1,59	0,184	0,180	0,182
5	1,53	14,3	16,6	1,98	0,141	0,141	0,141
6	2,01	12,6	14,1	1,98	0,102	0,102	0,102
7	2,63	9,6	10,9	2,38	0,0300	0,0300	0,0300
8	3,35	4,4	5,70	2,97	0,0600	0,0600	0,0600
9	4,15	1,4	2,40	3,17	0,302	0,300	0,301
10	4,33	0,960	1,60	3,96	0,604	0,604	0,604

FIGURA 23. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 23.

3.24. Ensaio nº 24

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).

$$S_0 = 16,0 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 21,4 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,80 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 2,0 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 6,0$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 25 e na figura 24.

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

$$y = 2,3875 x + 0,033$$

$$r = 0,9990$$

TABELA 25. Resultados obtidos no ensaio nº 24.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,630	12,9	16,8	0	0,274	0,274	0,274
1	0,670	13,7	16,5	1,20	0,216	0,216	0,216
2	0,750	14,5	16,2	1,60	0,207	0,207	0,207
3	0,950	14,9	15,7	1,60	0,155	0,157	0,156
4	1,06	14,3	14,9	2,20	0,154	0,152	0,153
5	1,62	12,9	13,2	2,80	0,0940	0,0940	0,0940
6	2,23	9,74	10,2	3,90	0,0660	0,0645	0,0650
7	3,06	6,02	6,60	4,90	0,0890	0,0890	0,0890
8	3,97	1,53	2,30	5,50	0,363	0,363	0,363
9	4,25	1,07	1,40	5,90	0,931	0,929	0,930

FIGURA 24. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') ($\blacksquare$), AR (S) ($\bullet$), de células (X) ($\blacktriangle$) e da atividade invertásica específica (v) ($\circ$) no ensaio nº 24.

3.25. Ensaio nº 25

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).

$$S_0 = 16,0 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 21,4 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,80 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 1,0 \text{ L/L.min}$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 6,0$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 26 e na figura 25.

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

$$y = 2,3480 x + 0,0093$$

$$r = 0,9998$$

TABELA 26. Resultados obtidos no ensaio nº 25.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,630	17,5	21,4	0	0,240	0,240	0,240
1	0,680	17,9	20,5	1,90	0,376	0,378	0,377
2	0,720	18,3	19,7	2,20	0,336	0,336	0,336
3	0,880	17,3	19,2	2,36	0,267	0,267	0,267
4	1,17	15,0	16,2	3,54	0,200	0,202	0,201
5	1,67	13,0	15,4	3,93	0,139	0,133	0,136
6	2,33	9,40	10,3	4,72	0,110	0,104	0,107
7	3,15	4,40	5,40	5,51	0,0770	0,0770	0,0770
8	3,60	1,28	1,97	6,30	0,653	0,653	0,653
9	3,92	1,16	1,46	6,69	0,993	0,993	0,993

FIGURA 25. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 25.

3.26. Ensaio nº 26

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).

$$S_0 = 18,6 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 25,0 \text{ g/L}$$

$$\text{Volume final de mosto} = 2,80 \text{ L}$$

$$\text{Vazão específica de ar} = 0$$

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

$$T = 30^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 6,0$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 27 e na figura 26.

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

$$y = 2,3480 x + 0,0093 \quad r = 0,9998$$

TABELA 27. Resultados obtidos no ensaio nº 26.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,500	15,6	21,4	0	0,328	0,328	0,328
1	0,550	16,6	19,7	1,08	0,317	0,317	0,317
2	0,600	18,3	19,2	1,80	0,274	0,272	0,273
3	0,700	17,3	18,8	2,53	0,209	0,209	0,209
4	0,970	14,5	17,5	2,89	0,151	0,150	0,151
5	1,18	13,7	16,2	3,25	0,124	0,120	0,122
6	1,42	11,5	12,8	3,35	0,110	0,110	0,110
7	1,78	8,10	9,40	4,69	0,0920	0,0920	0,0920
8	2,07	4,30	5,60	6,14	0,0890	0,0890	0,0890
9	2,38	1,70	2,40	8,30	0,494	0,494	0,494
10	2,46	1,20	1,70	10,11	0,889	0,889	0,889

FIGURA 26. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (•), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 26.

3.27. Ensaio nº 27

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).

$S_0 = 18,6 \text{ g/L}$

$S'_0 = 25,0 \text{ g/L}$

Volume final de mosto = 2,85 L

Vazão específica de ar = 1,0 L/L.min

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

$T = 35^\circ\text{C}$

pH = 5,5

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 28 e na figura 27.

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

$$y = 2,3940 x + 0,016 \quad r = 0,9998$$

TABELA 28. Resultados obtidos no ensaio nº 27.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,600	14,8	19,1	0	0,319	0,321	0,320
1	0,650	15,0	17,9	0,69	0,304	0,304	0,304
2	0,820	15,6	17,0	1,04	0,250	0,240	0,245
3	1,13	14,3	15,4	1,39	0,175	0,175	0,175
4	1,78	10,8	11,2	2,43	0,109	0,109	0,109
5	2,43	6,00	6,80	4,51	0,0720	0,0720	0,0720
6	3,30	0,910	1,00	6,25	0,662	0,662	0,662
7	3,48	0,950	1,10	7,00	1,06	1,02	1,04
8	3,64	-	-	7,63	1,10	1,10	1,10
9	3,70	-	-	9,72	1,10	1,10	1,10

FIGURA 27. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 27.

3.28. Ensaio nº 28

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).

$$S_0 = 18,6 \text{ g/L}$$

$$S'_0 = 25,0 \text{ g/L}$$

Volume final de mosto = 2,80 L

Vazão específica de ar = 1,0 L/L.min

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

$$T = 40^\circ\text{C}$$

$$\text{pH} = 5,5$$

b) Resultados

Os valores obtidos nas determinações de X, AR, ART, E e v encontram-se na tabela 29 e na figura 28.

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

$$y = 2,3940 x + 0,016 \quad r = 0,9998$$

TABELA 29. Resultados obtidos no ensaio nº 28.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	S' (g/L)	E (g/L)	v(gART/gcél.min)		
					MEDIDAS		MÉDIA
					1ª	2ª	
0	0,590	14,1	17,9	0	0,370	0,370	0,370
1	0,650	15,2	17,0	1,46	0,379	0,379	0,379
2	0,890	15,6	16,2	2,91	0,196	0,194	0,195
3	1,35	13,3	14,5	4,00	0,178	0,178	0,178
4	1,95	8,90	9,90	4,74	0,117	0,117	0,117
5	2,75	3,90	4,30	5,10	0,112	0,106	0,109
6	3,15	0,910	1,00	6,56	0,419	0,419	0,419
7	3,30	0,950	1,10	6,92	0,577	0,576	0,577
8	3,49	-	-	7,29	0,522	0,518	0,520
9	3,59	-	-	8,01	0,510	0,520	0,515

FIGURA 28. Variação com o tempo das concentrações de ART (S') (■), AR (S) (●), de células (X) (▲) e da atividade invertásica específica (v) (○) no ensaio nº 28.

4. DISCUSSÃO

Analisando-se as figuras 1 a 56, cujos dados encontram-se nas tabelas 2 a 57, nota-se que:

- a) $\mu_{(S'-S)}$ decresceu com o tempo, tornando-se praticamente desprezível a partir do instante $t = 6$ h ou $t = 7$ h, dependendo das condições de cultivo;
- b) os perfis das curvas $\mu_S = f(t)$ dependeram das condições de cultivo. Em alguns poucos experimentos (ensaios nº 6, 19 e 22) μ_S manteve-se, praticamente, constante durante intervalos de tempo da ordem de 2 a 3 h;
- c) em todos os cultivos $v = f(t)$ decresceu gradativamente até atingir valor mínimo entre os instantes $t = 4$ h e $t = 6$ h, a menos dos ensaios de nº 21 a 26, que foram realizados em pH 6,0 e 6,5, nos quais v mínimo ocorreu entre $t = 6$ h e $t = 8$ h. A partir deste ponto v passou a aumentar, atingindo valores da ordem de 1,73 gART/gcél.min (ensaio nº 18). É notório o fato de que o aumento de, aproximadamente, 10 vezes (a menos dos ensaios nº 1, 2, 7, 13 e 28) da atividade invertásica final das células intactas em relação à v mínimo, ocorreu nas últimas 2 ou 3 h de processo;
- d) v e μ variaram inversamente, indicando que o crescimento celular e a biossíntese da invertase seriam eventos desacoplados;
- e) os quatro parâmetros μ , μ_S , $\mu_{(S'-S)}$ e v , quando analisados em conjunto, não apresentaram correlação aparente;
- f) no caso dos ensaios de nº 18, 27 e 28, nos quais somente a temperatura foi variada (30, 35 e 40°C), a atividade invertásica final das células intactas diminuiu sensivelmente com o aumento da temperatura. O menor valor de v ocorreu entre os instantes $t = 4$ h e $t = 5$ h. Outrossim μ , μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ mostraram-se sensíveis à variação da temperatura, sendo que $\mu_{(S'-S)}$ tornou-se desprezível a partir do instante $t = 4$ h.

Das tabelas 58 a 85, onde são mostradas as relações entre a atividade invertásica específica das células intactas ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de crescimento celular e de consumo da fonte de carbono, observa-se claramente que em todos os experimentos efetuados $\bar{v}$ sempre foi superior a μ , μ_S e $\mu_{(S'-S)}$. Tal fato ocorreu mesmo nos instantes em que o valor de $\bar{v}$ era mínimo, não sendo, portanto, a enzima um fator limitante da disponibilidade de AR para o metabolismo celular. Em trabalho anterior (65) evidências a este respeito já tinham sido encontradas.

Outrossim, este resultado pode explicar porque, mesmo $\mu_{(S'-S)}$ decrescendo continuamente, a sacarose presente no mosto continuava a ser hidrolisada.

É notório, também, o fato de que no final do cultivo, quando as concentrações de AR e ART eram desprezíveis, a atividade invertásica específica sempre foi bem maior do que no início do processo, a menos dos ensaios de nº 1 e 28. Este fenômeno pode ser compreendido, considerando-se que a invertase, firmemente presa à parede celular (66)(20), continua ativa, independento do fato dos produtos resultantes de sua ação sobre a sacarose terem ou não participação no metabolismo celular. Em outros termos, a invertase se encontra naturalmente imobilizada por ligação covalente (61) na célula intacta de levedura.

Além disso a técnica para medir v 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 pelas células durante o cultivo.

Observa-se, também, das referidas tabelas que em todos os experimentos realizados μ_S e $\mu_{(S'-S)}$ sempre foram superiores a μ , indicando que a quantidade de AR presente no meio de cultura não se constituiu num fator limiitante do crescimento celular. De outra parte, as razões μ_S/μ e $\mu_{(S'-S)}/\mu$ sempre foram bem maiores que a unidade, evidenciando o fato de que, apenas, parte do AR presente no mosto era utilizada no crescimento celular. O restante, provavelmente, foi utilizado para: a) sintetisar substâncias de reserva (trealose, glicogênio); b) produção de energia química potencial (ATP, por exemplo) empregada para alimentar as vias metabólicas consumidoras de energia (7)(28); c) sintetisar produtos secundários.

A possibilidade de parte do AR ser desviada para a produção de trealose está bem documentada na literatura (9)(17)(51)(60)(65)(66).

Segundo MEYENBURG (35) e LIEVENSE (28) o grau de gemulação das células de levedura varia ao longo do cultivo. Quando μ é da ordem de $0,07 \text{ h}^{-1}$ predominam no meio células individuais, ao passo que para μ da ordem de $0,66 \text{ h}^{-1}$ ocorre a predominância de células com gêmulas. Como se pode observar, praticamente em todos os ensaios efetuados μ inicial foi inferior a $0,1 \text{ h}^{-1}$, aumentando a partir do instante $t = 1 \text{ h}$ ou 2 h até atingir valores entre $0,20 \text{ h}^{-1}$ e $0,57 \text{ h}^{-1}$, voltando a diminuir no final do cultivo. Pela análise microscópica da população de células dentro da dorna constatou-se a referida desproporção de células sem e com gêmulas nas fases inicial, intermediária e final do cultivo.

Segundo LILLIE (30) e PANEK (40) num cultivo descontínuo o teor de trealose intracelular aumenta no início, como resposta adaptativa do microrganismo ao novo meio, e no final do processo, quando as células entram na fase estacionária devido à depauperação do meio em nutrientes nitrogenados e fosfatados, dentre outros.

Além disso, na passagem da fase exponencial para a estacionária ocorrem numerosas alterações fisiológicas na célula, já que a maquinaria metabólica passa de um estado biossintético intenso para o de manutenção e sobrevivência (10).

VAN DOORN (60) demonstrou que a trealose acumulada no início do ciclo celular é rapidamente metabolizada durante a fase de gemulação, estimulando, simultaneamente, o microrganismo a intensificar sua demanda por fonte de C disponível no mosto. Nos experimentos realizados a única fonte de C disponível foi o AR, parte proveniente da hidrólise enzimática da sacarose e parte pré-existente no melaço. A diminuição nos valores das relações μ_S/μ e $\mu_{(S'-S)}/\mu$, sobretudo quando começava a aceleração do metabolismo celular após cerca de $2,5 \text{ h}$ do início do cultivo, refletiriam estas mudanças no destino da do ao AR pelo microrganismo. Além disso, o fato da relação $\mu_S/\mu_{(S'-S)}$ ter se mantido acima da unidade, evidenciou a diminuição contínua da concentração do AR existente no mosto.

Comparando os ensaios nº 18, 27 e 28, nos quais somente a temperatura foi variada, nota-se uma diminuição nos valores das relações μ_S/μ e $\mu_{(S'-S)}/\mu$ nas primeiras 2 h de processo, à medida que a temperatura aumentou. Estas variações nas velocidades específicas refletiriam o efeito estimulante promovido pelo aumento da temperatura no intervalo estudado sobre o metabolismo celular, além da transitoriedade característica do cultivo descontínuo.

Segundo HOTTIGER (17), quando se submete uma cultura de células de *S. cerevisiae*, inicialmente mantida entre 27°C e 30°C, a um aumento de temperatura da ordem de 10°C, ocorrem intensas modificações no metabolismo celular, acarretando variações bruscas nas concentrações intracelulares de vários compostos (por exemplo, proteínas e açúcares). No caso específico da trealose verifica-se um acúmulo no citoplasma, proveniente do aumento diferenciado das concentrações e/ou atividades da trealose fosfatossintetase e da trealose neutra, sendo a primeira favorecida pelo aumento da temperatura. Por conseguinte, o acúmulo de trealose no início do cultivo interferiria no grau de aproveitamento do AR por parte das células. Outrossim, vários autores (18) (23)(33) têm apresentado evidências de que a trealose, além de servir como carboidrato de reserva, protegeria alguns mecanismos regulatórios intracelulares contra quantidades excessivas de glicose e ATP.

Por outro lado, em todos os experimentos efetuados as células foram submetidas à temperatura constante durante todo o processo. Após uma fase de adaptação frente à temperatura mais elevada e uma vez alcançadas as condições metabólicas convenientes (28), tem início o brotamento, quando a trealose é rapidamente consumida e a demanda por AR aumentada, até a depauperação total do mosto após 9 a 10 h de processo.

É notório o fato de que a atividade invertásica específica diminuiu sensivelmente com o aumento da temperatura. Das tabelas 56 e 57 observa-se que a partir do instante $t = 4$ h, $\mu_{(S'-S)}$ tornou-se desprezível, indicando uma queda significativa da demanda de sacarose pelas células, podendo conduzir a uma diminuição da biossíntese da invertase. Contudo, a partir do referido instante a concentração extracelular de AR caiu abaixo de 10 g/L, devendo, segundo TODA (55), ocorrer desrepressão da síntese desta enzima. Assim, diante dos resultados obtidos, parece evidente que a maior ou menor atividade invertásica das células intactas de levedura estaria vinculada não só ao efeito de repressão-desrepressão, causado pela glicose, mas também à disponibilidade de uma fonte extra de AR, que no caso foi a sacarose.

No que tange ao desvio de parte do AR para a formação de produtos secundários, salienta-se que nos experimentos efetuados houve formação de etanol nunca superior a 10 g/L.

Conforme LORENCEZ e KAPPELI (32) a formação de etanol em processos fermentativos descontínuo e contínuo, neste caso para altas vazões específicas de alimentação, efetuados com borbulhamento de ar, seria o resultado da saturação da capacidade oxidativa da célula, fazendo com que o excesso de glicose seja desviado, ao nível do piruvato, para a produção do álcool etílico. Além do mais, a pequena quantidade de álcool formada, e, provavelmente, a

parcela que se acumulou no interior da célula (8), induziria o aumento de enzimas gliconeogênicas (por exemplo, malato desidrogenase) (21-22).

O *S. cerevisiae* provavelmente produziu outras substâncias além do etanol (47), que por limitações técnicas não foram quantificadas.

A quantidade de etanol formada nos ensaios sem e com borbulhamento de ar foi da mesma ordem. Ressalta-se que as condições empregadas nos experimentos feitos em anaerobiose não foram as mais adequadas para uma fermentação alcoólica típica (concentração do inóculo, concentrações de AR e ART).

A tabela 86 mostra os intervalos de tempo durante os quais foi verificada a relação $\ln X = \ln X_0 + \mu t$ para cada um dos ensaios efetuados (2). A partir dos coeficientes angulares calculou-se os tempos de geração correspondentes a cada experimento, cujos valores são mostrados no quadro I.

Outrossim, é interessante notar que o intervalo de tempo (tabela 86) no qual $\ln X = f(t)$ foi linear, correspondeu a, aproximadamente, 48% do tempo total de fermentação.

Quadro I. Tempos de geração (tg) em função do pH e da vazão específica de ar.

pH	tg(h)					C.V.* (%)
	0	0,5	$\phi (L/L \cdot \min)$	2	3	
4,0	-	4,0	2,8	3,3	2,9	17
4,5	-	2,9	2,5	2,6	2,5	7
5,0	3,4	2,4	2,5	2,3	2,5	4
5,5	3,6	2,2	2,0	2,0	2,6	13
6,0	3,9	-	2,1	2,1	-	0
6,5	3,5	-	2,3	2,9	-	16
C.V.*	6	28	12	20	7	

* C.V. = coeficiente de variação = $(s/\bar{X}).100$, onde s é o desvio padrão.

Do quadro I observa-se que:

- a) o tg das células crescidas em meio aerado tendeu a diminuir, à medida que o pH aumentou, sendo cerca de 2 h em $\text{pH} = 5,5$ e vazões específicas de ar da ordem de 1,0 e 2,0 L/L.min;
- b) em $\text{pH} > 5,0$ o tg das células crescidas em anaerobiose foi superior ao da aquelas cultivadas em aerobiose;
- c) para vazões de ar extremas (0 e 3,0 L/L.min) e $4,0 < \text{pH} < 6,5$ a variação dos valores de tg foi da ordem de 7%, evidenciando a independência deste parâmetro frente ao pH;
- d) as variações mais acentuadas dos valores de tg ocorreram em valores extremos de pH (4,0 e 6,5), tendo sido a vazão específica de ar variada entre 0,5 e 3,0 L/L.min.

O comportamento do tg frente ao pH e à vazão de ar pode ser visualizado, considerando que os referidos parâmetros influiriam preferencialmente na duração da fase do ciclo do *S. cerevisiae* correspondente ao crescimento celular, já que, segundo LIEVENSE (28), a etapa da gemulação é de duração constante e independente das condições de cultivo. Outrossim, as evidências disponíveis indicam que o início do brotamento estaria vinculado a um tamanho celular crítico a ser atingido pelas células de levedura, quando, dentre outros, sucederiam eventos do tipo: 1) mudança do pH citoplasmático, o qual é da ordem de 6,0 e 7,0, respectivamente, para a levedura crescida em condições de anaerobiose e aerobiose (53-54). É reconhecido o fato de que a célula dispõe de mecanismos capazes de tamponarem o pH citoplasmático (69), porém em cultivos descontínuos, onde a disponibilidade de nutrientes no meio varia continuamente, seria razoável esperar uma diminuição na capacidade de tamponamento, havendo, deste modo, a possibilidade de se interferir no pH intracelular através de variações adequadas no pH do mosto; 2) acúmulo de ativadores/inibidores de enzimas e/ou genes específicos (5). Um exemplo, seria a formação do AMP cíclico que é um efetor enzimático típico, e que ativa, inclusive a trealase neutra principal enzima responsável pela degradação da trealose (18); 3) variação nas quantidades intra e extracelulares de hexoses, sobretudo de glicose; 4) predominância relativa de uma sobre a outra das vias fermentativa e oxidativa, conforme o teor de O_2 dissolvido no mosto (28)(51).

Outrossim, deve ser ressaltada a existência de controvérsias quanto à faixa de concentração de oxigênio dissolvido capaz de provocar efeitos significativos e mensuráveis no metabolismo celular (47). As variações encontradas para o tg, evidenciaram, indiretamente, que o uso de vazões específicas de ar entre 0,5 e 3,0 L/L.min, permitiram alcançar teores de O_2 dissolvido no mosto capazes de interferir no metabolismo da levedura.

Pela tabela 87 nota-se que a atividade invertásica final das células intactas foi da ordem de 1,0 gART/gcél.min, exceto nos experimentos 1, 2, 3, 7, 13, 21, 23, 26 e 28, destacando-se os cultivos 12, 14 e 18 nos quais v foi da ordem de 1,7 gART/gcél.min. A atividade invertásica específica determinada para células intactas de levedura comercial (fermento Fleischmann) foi da ordem de 2,8 gART/gcél.min (64), indicando que as condições de cultivo, ainda, devem ser melhoradas, provavelmente usando-se menor concentração de açúcar e cultivo do tipo descontínuo-alimentado (46). Entretanto, quando se deseja aproveitar como fonte de invertase a levedura residual de destilarias, obtida de cultivos bem diferentes do utilizado na fabricação do fermento prensado, então valores de v da ordem dos encontrados neste trabalho passam a ter significado.

Considerando que: a) a amostra de células tomada para a medida de v representa a população celular reinante no interior da dorna no momento da amostragem; b) a invertase está firmemente presa à parede celular; c) os valores de pH usados para o cultivo coincidem com a faixa de pH de estabilização da enzima (61), então é possível admitir que a variação da atividade invertásica específica das células frente ao tempo de processo representaria uma "aceleração" de recuperação da atividade invertásica na parede celular do *S. cerevisiae*.

O efeito da aeração e do pH pode ser evidenciado através da variação de $\Delta \bar{v}/\Delta t$ (tabela 87). Assim, observa-se que em pH = 4,0 foi necessária uma maior aeração do meio para se ter uma aceleração da ordem de 20 gART/gcél.h², enquanto que para valores mais altos de pH, sobretudo para 5,0 < pH < 6,0, $\Delta \bar{v}/\Delta t$ foi menos influenciado pela aeração.

Do quadro II, onde são mostradas as acelerações de aparecimento da atividade invertásica nas células intactas mantidas em várias condições de cultivo, e que foram obtidas a partir das curvas $v = f(t)$ através de derivação gráfica (72), nota-se que, a menos das primeiras 2 h de cultivo, $d\bar{v}/dt$ foi crescente. Por conseguinte, o aumento abrupto de v em função do tempo seria, na verdade, o resultado da formação gradativa da invertase por parte das células que passaria a ser significativa após a concentração celular no interior da dorna ter alcançado um determinado valor. Das figuras 57 a 62 parece evidente que tal resultado se verificou em concentrações celulares da ordem de 2 g/L.

Outrossim, as variações iniciais dos valores de v inter e intra ensaios, seriam, provavelmente, o reflexo da adaptação do inóculo às novas condições de cultivo, bem como da variabilidade do meio de cultura (essencialmente melão clarificado e suplementado) usado para a propagação das células. Conforme ORLOWSKI e BARFORD (39) as condições de inóculo e a interrelação inóculo-meio novo, influiriam no desempenho ulterior do microrganismo.

Retomando a tabela 87 nota-se, ainda, que Δt_1 (intervalo de tempo transcorrido entre a queda do teor de AR abaixo de 10 g/L e o início do aumento de v) e Δt_2 (intervalo de tempo durante o qual o teor de AR no mosto permaneceu acima de 10 g/L) na maioria dos casos foram diferentes de zero e, aparentemente, influenciáveis tanto pela aeração quanto pelo pH. É significativo que em todos os casos considerados v sempre diminui nas primeiras horas de processo, independentemente de Δt_2 ser ou não nulo. Por outro lado, valores altos de Δt_2 (da ordem de 4 h) deveriam conduzir a valores também, elevados de Δt_1 , para se estar de acordo com o fato amplamente aceito de que concentrações de AR da ordem de 10 g/L inibem a biossíntese da invertase (55).

Porém, frente aos resultados obtidos está claro que a resposta da levedura à reativação da biossíntese da invertase pode ser mais (ensaios nº 1, 3, 7, 8, 9, 12, 13, 22, 23 e 24, onde $\Delta t_1 \approx 0,5$ h) ou menos (demais ensaios, onde $\Delta t_1 > 1$ h) rápida conforme o pH e a aeração. Outrossim, diante do quadro II parece razoável supor que a diminuição na magnitude da síntese da invertase, resultaria da integração de um complexo e, ainda não bem compreendido conjunto de fatores e não, apenas, de um sistema de repressão-desrepressão.

Da tabela 87 nota-se, também, que a temperatura exerce marcante influência sobre $\Delta \bar{v}/\Delta t$, ao menos no intervalo considerado, sendo que a queda da "aceleração" de aparecimento da invertase dobra a cada 5°C de aumento.

Da tabela 88 e da figura 63, depreende-se que a maior produção de invertase, que foi da ordem de 8,24 gART/min.L meio, ocorreu em células de levedura cultivadas em pH = 5,0 e vazão específica de ar = 2,0 L/L.min. Em adição, observa-se que em pH = 5,5, exceptuando-se o ensaio feito sem borbulhamento de ar, obtiveram-se valores de produção da ordem de 6,5 gART/min.L meio. Assim sendo, o pH ótimo estaria situado no intervalo entre 4,5 e 5,5. No que se refere à aeração e considerando as figuras 57 a 62, parece evidente a existência de um valor ótimo de vazão específica de ar situado entre 1,0 e 2,0 L/L.min.

A variação da atividade invertásica específica das células em função do tempo, observada em todos os experimentos realizados, seria consequência da participação combinada de eventos que se processariam dentro e fora da célula da levedura e passíveis de serem influenciados pelas condições de cultivo, às quais o microrganismo foi submetido.

A influência de cada um dos parâmetros variados (vazão de ar e pH), que atuam simultaneamente sobre o metabolismo celular e que, em última análise acabam interferindo em maior ou menor grau na biossíntese da invertase, se dá em locais e modos distintos. Assim, enquanto o oxigênio dissolvido atua no interior da célula a nível da cadeia respiratória, estimulando a formação de intermediários metabólicos em geral, o pH tem atuação mais abrangente e menos específica, já que pode influir tanto fora, a nível da parede celular, quanto dentro da célula, neste caso estimulando ou não reações enzimáticas integrantes das várias vias metabólicas.

No caso particular da biossíntese da invertase, além dos efeitos integrados e generalizados induzidos pelo pH e pelo oxigênio dissolvido, deve ser considerado o efeito da concentração citoplasmática de glicose sobre os mecanismos de repressão-desrepressão que ocorrem a nível da transcrição do DNA, tradução do mRNA, na estabilidade dos polissomas e/ou na secreção da enzima através da plasmalema (5)(36).

Externamente à célula o pH poderia atuar tanto sobre a estrutura da molécula de invertase quanto sobre a formação da parede celular. O efeito do pH sobre a enzima se faria sentir basicamente na estrutura primária da proteína através da ionização de grupos químicos pertencentes aos resíduos de aminoácidos, podendo a macromolécula adquirir carga elétrica efetiva mais ou menos adequada a sua ligação com a manana, que é um dos polissacarídeos constituintes da parede celular e intimamente integrado à estrutura desta proteína (13)(74). Existiria, também, a possibilidade de ionizações inadequadas causarem perturbações nas estruturas secundária e terciária da macromolécula, causando mudanças na afinidade do sítio ativo pela sacarose.

Outro ponto de atuação do pH seria no processo de construção da parede celular, que se dá pela deposição contínua de moléculas de manana e glicana no sentido da camada mais interna para a externa (19), sendo a composição em manana e a presença de polímeros da manose de PM diferentes variável de acordo com o estágio do ciclo celular da levedura (57). Estes fatos indicariam que a consolidação do polissacarídeo se daria fora do citoplasma através da formação de ligações osídicas e/ou N-glicosídicas entre os diversos pedaços de carboidratos, sendo este o ponto passível de ser influenciado pelos íons hidroxônios, presentes no mosto.

Finalmente, diante do exposto a variação de $v = f(t)$ e a atividade invertásica final das células intactas resultariam das intensas e profundas modificações conformacionais sofridas pela parede celular durante os processos de crescimento e multiplicação do microrganismo, causando posicionamentos diversos e aleatórios das moléculas de enzima dentro da parede bem como mudanças na própria estrutura da macromolécula, tornando-as mais ou menos acessíveis às moléculas de substrato.

TABELA 30. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 1.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,670	6,05	26,5	0	6,90	10,3
1	0,670	8,30	19,6	0,130	6,80	10,2
2	0,760	10,7	12,8	0,180	5,90	8,40
3	0,940	12,3	6,80	0,270	1,50	1,50
4	1,28	10,8	5,70	0,320	1,80	0,700
5	1,68	8,10	4,90	0,240	1,30	0,500
6	2,08	5,40	4,20	0,190	1,60	0,480
7	2,60	3,20	2,40	0,160	1,30	0,700
8	2,82	2,03	0,540	0,140	1,10	0,660

TABELA 58. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 1.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	-	4,10	2,80	-	0,670	-
1	169	3,20	2,20	52,3	0,660	78,5
2	86,7	2,60	1,90	32,8	0,700	46,7
3	25,8	4,60	4,60	5,60	1,00	5,60
4	15,2	2,70	6,90	5,60	2,60	2,20
5	20,8	3,80	10,0	5,40	2,60	2,10
6	61,6	7,30	24,4	8,40	3,30	2,50
7	103	12,6	23,5	8,10	1,90	4,40
8	159	20,3	33,8	7,90	1,70	4,70

TABELA 31. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 2.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,790	4,68	21,3	0,0630	3,27	5,70
1	0,840	6,60	16,8	0,110	2,49	5,12
2	0,980	9,30	12,7	0,160	1,41	3,55
3	1,16	11,1	9,60	0,180	2,38	2,30
4	1,41	9,75	7,20	0,190	2,68	1,58
5	1,70	7,88	5,10	0,170	2,19	1,01
6	2,00	5,73	3,60	0,160	1,92	0,750
7	2,32	3,15	2,10	0,120	1,45	0,570
8	2,57	1,40	0,900	0,0740	0,760	0,320
9	2,70	0,540	0,300	0,0480	0,540	0,220

TABELA 59. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 2.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	317	6,10	3,50	52,0	0,570	90,5
1	126	5,50	2,70	23,0	0,490	46,5
2	63,4	7,20	2,90	8,80	0,400	22,2
3	40,7	3,10	3,20	13,2	1,00	12,8
4	28,0	2,00	3,30	14,1	1,70	8,30
5	26,5	2,10	4,50	12,9	2,20	5,90
6	22,1	1,80	4,70	12,0	2,60	4,70
7	50,5	4,20	10,6	12,1	2,50	4,80
8	267	26,0	61,7	10,3	2,40	4,30
9	519	46,0	113	11,3	2,50	4,60

TABELA 32. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular, para o ensaio nº 3.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,730	5,51	21,3	0,0410	4,51	7,40
1	0,760	7,62	15,9	0,130	2,37	5,49
2	0,930	10,4	12,3	0,180	0,730	3,27
3	1,10	12,5	9,60	0,230	2,40	2,25
4	1,45	11,2	7,30	0,270	2,64	1,55
5	1,88	9,00	5,10	0,250	2,31	1,08
6	2,40	6,52	3,20	0,240	1,92	0,720
7	3,05	2,90	1,60	0,150	1,15	0,370
8	3,38	0,930	0,700	0,0650	0,200	0
9	3,50	0,550	0,700	0,0340	0,110	0

TABELA 60. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 3.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	319	2,90	1,80	110	0,610	180
1	112	6,20	2,70	18,2	0,430	42,2
2	40,7	10,0	2,20	4,10	0,220	18,2
3	30,3	2,90	3,10	10,4	1,10	9,80
4	18,2	1,90	3,20	9,80	1,70	5,70
5	15,6	1,70	3,60	9,20	2,10	4,30
6	24,5	3,10	8,20	8,00	2,70	3,00
7	92,0	11,9	37,1	7,70	3,10	2,50
8	652	212	-	3,10	-	0
9	1417	438	-	3,20	-	0

TABELA 33. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 4.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,780	5,25	20,7	0,0260	5,77	4,24
1	0,800	6,44	16,2	0,140	4,88	3,19
2	1,00	19,8	12,7	0,250	3,10	5,70
3	1,30	12,6	9,90	0,250	1,80	4,20
4	1,65	10,1	7,90	0,220	0,790	2,30
5	2,05	7,60	6,90	0,200	0,630	1,88
6	2,45	5,00	4,90	0,270	0,990	2,03
7	3,70	2,50	1,30	0,190	0,360	0,910
8	4,14	0,750	0,300	0,0140	0	0,130
9	3,85	0,540	0,300	-0,0750	0	0,0550

TABELA 61. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 4.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	293	1,80	1,30	163	0,730	222
1	62,0	2,70	1,80	23,0	0,650	35,0
2	26,0	1,10	2,10	22,8	1,80	12,4
3	19,9	1,20	2,80	16,8	2,30	7,20
4	21,0	2,00	5,80	10,5	2,90	3,60
5	23,0	2,40	7,10	9,60	3,00	3,20
6	28,0	3,70	7,60	7,40	2,10	3,60
7	172	36,0	91,0	4,80	2,50	1,90
8	5079	547	-	9,30	-	0
9	1181	1610	-	0,700	-	0

TABELA 34. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 5.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,650	3,90	20,1	0,230	3,23	7,10
1	0,800	6,40	15,5	0,120	2,51	4,90
2	0,850	8,00	12,0	0,0880	1,68	3,50
3	0,950	9,40	9,40	0,270	2,71	2,70
4	1,40	8,30	6,90	0,320	2,65	1,70
5	1,85	6,60	4,60	0,250	2,17	1,08
6	2,33	3,90	2,80	0,200	1,80	0,730
7	2,78	1,56	1,20	0,0970	0,890	0,380
8	2,90	0,460	0,400	0,0380	0,250	0,130
9	2,53	0,440	0,300	0	0,0470	0,0400

TABELA 62. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 5.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	52,4	3,70	1,70	14,0	0,450	31,0
1	92,5	4,40	2,30	21,0	0,510	41,0
2	123	6,50	3,10	19,1	0,480	40,0
3	38,4	3,80	3,80	10,0	1,00	10,0
4	19,1	2,30	3,60	8,30	1,60	5,30
5	34,3	4,00	7,90	8,70	2,00	4,30
6	77,0	8,50	21,0	9,00	2,50	3,70
7	369	40,2	94,0	9,20	2,30	3,90
8	1472	224	430	6,60	1,90	3,40
9	460	1468	1725	0,300	1,20	0,270

TABELA 55. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 6.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,790	5,40	24,1	0,0760	3,20	5,95
1	0,850	7,60	19,4	0,170	3,30	5,53
2	1,08	9,30	14,7	0,220	2,30	3,50
3	1,32	10,3	11,4	0,270	1,97	2,07
4	1,81	10,0	9,00	0,300	1,77	1,40
5	2,40	8,10	6,30	0,290	2,04	1,10
6	3,20	5,30	3,70	0,240	1,66	0,740
7	3,95	2,20	1,50	0,110	0,870	0,380
8	4,15	0,590	0,300	0,0240	0,230	0,140
9	4,16	0,580	0	0	0	0

TABELA 63. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 6.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	98,0	2,30	1,30	42,0	0,540	78,3
1	38,0	1,90	1,20	19,4	0,600	32,5
2	28,0	2,70	1,80	10,5	0,660	15,9
3	21,0	2,90	2,80	7,30	0,950	7,70
4	16,0	2,70	3,40	5,90	1,26	4,70
5	12,0	1,60	3,10	7,00	1,85	3,80
6	16,0	2,30	5,20	6,90	2,24	3,10
7	283	36,0	82,0	7,90	2,30	3,50
8	2048	214	351	9,60	1,60	5,80
9	28560	28560	-	1,00	-	0

TABELA 36. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 7.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,300	6,70	23,1	0,200	18,7	21,3
1	0,340	7,50	17,6	0,110	7,20	9,30
2	0,380	8,15	15,0	0,110	1,95	3,50
3	0,430	8,65	13,9	0,230	0,510	0,990
4	0,510	8,80	13,4	0,630	1,31	0,770
5	0,880	8,50	13,0	0,480	0,650	0,170
6	1,30	8,00	12,1	0,260	2,35	1,77
7	1,66	7,20	10,5	0,0900	1,76	1,00
8	1,83	5,60	8,80	0,110	2,39	1,46
9	2,00	3,95	6,60	0,0800	1,74	1,03
10	2,15	2,70	4,60	0,0700	1,44	0,930

TABELA 64. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 7.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	28,8	-	-	94	0,900	107
1	37,8	0,600	0,600	65,0	0,770	85,0
2	31,2	1,80	1,20	18,0	0,560	32,0
3	16,2	7,20	3,60	2,20	0,520	4,30
4	6,00	2,40	4,20	2,10	1,70	1,20
5	5,40	3,60	14,4	1,40	3,82	0,350
6	11,4	1,20	1,80	9,00	1,33	6,81
7	43,2	2,40	4,20	20,0	1,76	11,1
8	45,0	1,80	3,60	22,0	1,64	13,3
9	80,4	3,60	6,00	22,0	1,70	12,9
10	180	9,00	13,8	21,0	1,55	13,3

TABELA 37. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 8.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,470	7,35	17,9	0,130	4,04	7,23
1	0,550	8,80	14,6	0,120	2,13	4,68
2	0,650	10,1	12,0	0,240	2,15	4,00
3	0,850	11,3	9,60	0,350	1,15	2,34
4	1,20	12,0	7,60	0,300	2,40	1,48
5	1,63	10,6	5,80	0,330	2,52	1,26
6	2,25	8,20	4,00	0,310	4,25	0,630
7	3,00	2,60	2,20	0,190	1,08	0,580
8	3,50	0,600	0,600	0,130	0,250	0,130
9	3,88	0,390	0,390	0,0800	0,0100	0

TABELA 65. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 8.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	96,0	3,00	1,80	31,0	0,560	56,0
1	90,0	4,80	2,40	18,0	0,460	39,0
2	37,2	4,20	2,40	9,00	0,540	17,0
3	21,0	6,60	3,00	3,30	0,490	6,70
4	16,8	2,40	3,60	8,00	1,62	4,90
5	10,2	1,20	2,40	7,60	2,00	3,80
6	13,8	1,20	6,60	14,0	6,70	2,00
7	132	22,8	43,2	5,70	1,90	3,10
8	672	348	672	1,90	1,90	1,00
9	1200	9480	-	0,130	-	0

TABELA 38. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 9.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,430	6,00	18,3	0,0930	1,40	8,37
1	0,500	8,70	14,9	0,260	2,36	6,40
2	0,700	10,5	11,9	0,420	2,83	4,00
3	1,00	11,0	9,50	0,260	1,97	1,79
4	1,30	10,5	7,90	0,380	1,88	0,910
5	1,75	9,00	6,80	0,280	2,54	0,960
6	2,25	5,80	5,40	0,260	1,41	0,170
7	2,82	2,60	1,70	0,180	2,22	1,19
8	3,30	0,800	0,100	0,0750	0,200	0,0400
9	3,47	0,500	0,0500	0,0300	0,0300	0

TABELA 66. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 9.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	156	10,8	1,80	15,0	0,170	90,0
1	45,0	4,80	1,80	9,10	0,370	25,0
2	17,4	2,40	1,80	6,70	0,710	9,50
3	24,6	3,00	3,60	7,60	1,10	6,90
4	11,4	2,40	4,80	4,90	2,10	2,40
5	10,8	1,20	3,00	9,10	2,60	3,40
6	34,8	6,60	52,8	5,40	8,30	0,650
7	168	13,2	25,2	12,3	1,90	6,60
8	1020	372	1860	2,70	5,00	0,530
9	2820	2820	-	1,00	-	0

TABELA 39. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento, celular para o ensaio nº 10.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,550	6,50	16,9	0,110	1,45	6,55
1	0,630	9,00	13,3	0,210	1,85	5,04
2	0,850	10,8	10,0	0,350	2,27	3,00
3	1,20	11,2	7,50	0,410	2,69	1,82
4	1,75	9,80	5,60	0,460	2,08	0,910
5	2,55	7,80	4,00	0,300	1,60	0,630
6	3,25	5,00	2,40	0,140	2,00	0,450
7	3,62	1,40	1,10	0,0350	0,640	0,280
8	3,70	0,600	0,300	-0,0520	0,170	0,140
9	3,40	0,500	0	-0,120	0,0600	0,0300

TABELA 67. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 10.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	144	10,8	2,40	13,0	0,220	60,0
1	66,0	7,80	3,00	8,80	0,370	24,0
2	28,8	4,20	3,60	6,50	0,760	8,60
3	15,6	2,40	3,60	6,60	1,50	4,40
4	8,40	1,80	4,20	4,50	2,30	2,00
5	16,8	3,00	7,80	5,30	2,50	2,10
6	90,0	6,60	28,2	14,0	4,40	3,20
7	1260	72,0	156	18,0	2,30	8,00
8	-1140	354	426	-3,30	1,20	-2,70
9	-546	1080	2160	-0,500	2,00	-0,250

TABELA 40. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 11.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,700	8,50	21,6	0,0570	7,43	7,71
1	0,750	9,15	16,4	0,120	3,51	6,38
2	0,860	12,3	12,0	0,200	1,18	5,17
3	1,05	14,5	8,00	0,360	2,75	2,21
4	1,43	13,5	5,80	0,240	3,72	1,40
5	1,80	11,0	3,90	0,170	2,61	0,850
6	2,15	8,00	2,40	0,160	1,97	0,580
7	2,50	4,50	1,50	0,140	1,99	0,390
8	2,82	1,30	0,700	0,0580	0,760	0,140
9	2,93	0,350	0,100	0,0200	0,380	0,270

TABELA 68. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 11.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	222	1,80	1,80	130	0,960	135
1	96,0	3,60	1,80	29,0	0,550	53,0
2	54,0	36,0	2,40	6,00	0,230	26,0
3	19,2	2,40	3,00	7,60	1,20	6,10
4	21,6	1,20	3,60	16,0	2,70	5,80
5	27,0	1,80	5,40	15,0	3,10	5,00
6	24,0	1,80	6,60	12,0	3,40	3,60
7	28,8	1,80	10,2	14,0	5,10	2,80
8	600	45,6	246	13,0	5,40	2,40
9	3060	162	222	19,0	1,40	13,5

TABELA 41. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 12.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,700	8,20	20,0	0,0570	4,00	6,86
1	0,750	10,5	15,4	0,170	1,62	5,58
2	0,900	13,2	11,6	0,220	2,18	3,54
3	1,20	14,0	8,60	0,290	2,44	1,97
4	1,62	13,2	6,30	0,390	3,93	1,36
5	2,25	9,60	4,10	0,310	2,97	0,980
6	2,95	5,30	2,00	0,280	1,92	0,680
7	3,73	1,80	0,400	0,120	0,720	0,220
8	4,07	1,00	0	-0,150	0,100	0
9	3,50	0,520	0	-0,270	0,160	0

TABELA 69. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 12.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	252	3,60	2,40	70,0	0,580	120
1	78,0	8,40	2,40	9,50	0,290	33,0
2	48,0	4,80	3,00	9,90	0,620	16,0
3	25,2	3,00	3,60	8,40	1,23	6,80
4	11,4	1,20	3,00	10,0	2,90	3,50
5	12,0	1,20	3,60	9,60	3,00	3,20
6	22,8	3,60	36,0	6,90	2,80	2,40
7	528	90,0	288	6,00	3,30	1,80
8	-570	852	-	-0,660	-	0
9	-378	642	-	-0,590	-	0

TABELA 42. Velocidades específicas de consumo do AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 13.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,550	10,2	13,0	0,0360	1,09	2,18
1	0,580	10,8	11,5	0,0690	1,35	2,39
2	0,650	10,9	10,2	0,150	2,14	1,52
3	0,800	10,5	9,20	0,250	2,38	1,53
4	1,00	9,70	8,10	0,290	1,78	1,00
5	1,27	8,70	7,10	0,290	2,81	0,790
6	1,72	6,40	6,10	0,400	1,82	0,560
7	2,40	3,90	4,80	0,270	1,49	0,620
8	3,05	1,80	3,10	0,180	0,970	0,550
9	3,50	1,10	1,50	0,0580	0,620	0,400
10	3,63	0,600	0,300	0,0200	0,330	0,280

TABELA 70. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 13.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	192	6,60	3,00	30,0	0,500	61,0
1	114	6,00	3,00	20,0	0,600	35,0
2	37,8	2,40	3,60	14,3	1,40	10,0
3	14,4	1,80	2,40	9,50	1,60	6,10
4	9,00	1,20	2,40	6,10	1,80	3,40
5	11,4	1,20	4,20	9,70	3,60	2,70
6	9,60	1,80	6,60	4,60	3,30	1,40
7	21,6	4,20	9,60	5,50	2,40	2,30
8	46,2	8,40	15	5,40	1,80	3,10
9	210	19,8	30,6	11,0	1,60	6,90
10	1038	66,0	74,4	17,0	1,20	14,0

TABELA 43. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 14.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,700	10,6	13,4	0,0570	0,570	4,57
1	0,800	12,9	10,3	0,340	2,21	3,48
2	1,15	13,6	8,00	0,430	1,53	1,38
3	1,70	13,0	6,30	0,460	2,06	0,800
4	2,50	10,8	4,60	0,360	2,45	0,700
5	3,37	6,40	2,60	0,250	2,07	0,620
6	4,20	1,62	1,08	0,190	0,710	0,340
7	4,94	0,800	0	0,0670	0,170	0,120
8	5,15	0,600	0	0	0	0
9	5,20	0,400	0	0	0	0

TABELA 71. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 14.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	204	20,4	2,40	10,0	0,120	80,0
1	39,0	6,00	3,60	6,50	0,640	10,2
2	18,6	5,40	6,00	3,60	1,11	3,20
3	12,6	3,00	7,20	4,50	2,60	1,70
4	9,00	1,20	4,80	6,80	3,50	1,90
5	24,6	3,00	10,2	8,30	3,30	2,50
6	23,5	60,6	132	3,70	2,10	1,80
7	1164	456	660	2,50	1,40	1,80
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-

TABELA 44. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 15.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,700	10,0	11,0	0,0570	1,14	3,43
1	0,740	11,3	8,90	0,0540	1,05	2,14
2	0,800	11,9	7,50	0,190	1,81	2,07
3	1,00	11,9	6,10	0,570	1,43	0,970
4	1,66	11,1	5,10	0,470	1,47	0,600
5	2,40	9,40	4,00	0,320	1,60	0,480
6	3,15	6,30	3,00	0,220	2,45	0,260
7	3,85	2,00	1,80	0,180	1,08	0,420
8	4,43	0,800	0,300	0,120	0,190	0,100
9	4,90	0,500	0	0,0820	0,0820	0,0410

TABELA 72. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 15.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	186	9,60	3,00	20,0	0,330	60,0
1	204	10,8	5,40	19,4	0,490	40,0
2	49,2	5,40	4,80	9,50	0,870	11,0
3	12,6	4,80	7,20	2,50	1,47	1,70
4	8,40	3,00	6,60	3,10	2,50	1,30
5	9,60	1,80	6,60	5,00	3,30	1,50
6	10,8	1,20	9,00	11,1	9,40	1,20
7	96,0	16,2	42,0	6,00	2,60	2,30
8	558	354	672	1,60	2,00	0,830
9	876	876	1758	1,00	2,00	0,500

TABELA 45. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 16.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,650	10,6	11,6	0,0620	0,920	1,85
1	0,700	11,2	10,3	0,110	1,18	2,31
2	0,900	11,8	8,80	0,430	1,57	1,80
3	1,25	11,8	7,00	0,280	2,23	1,60
4	1,60	9,80	5,20	0,220	2,78	1,00
5	1,95	7,00	3,80	0,200	2,21	0,650
6	2,32	4,20	2,40	0,150	1,81	0,530
7	2,68	1,50	1,10	0,130	0,840	0,390
8	2,97	0,800	0,300	0,0220	0,210	0,0720
9	2,90	0,550	0,0500	-0,0690	0,140	0,100

TABELA 73. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 16.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	150	10,2	4,80	14,8	0,500	30,0
1	96,0	9,0	4,80	10,7	0,510	21,0
2	18,0	4,80	4,20	3,70	0,870	4,20
3	21,6	3,00	3,60	8,00	1,40	5,70
4	21,0	1,80	4,80	12,6	2,80	4,50
5	19,2	1,80	6,00	11,1	3,40	3,30
6	28,2	2,40	7,80	12,1	3,40	3,50
7	222	34,2	72,0	6,50	2,20	3,00
8	3300	348	1020	9,50	2,90	3,30
9	-1200	594	840	-2,00	1,40	-1,40

TABELA 46. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 17.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,600	10,5	14,7	0,0670	3,00	5,00
1	0,700	12,0	11,4	0,110	2,48	3,93
2	0,800	12,6	9,10	0,240	2,89	1,59
3	1,10	11,4	7,92	0,530	2,64	0,940
4	1,80	9,60	6,90	0,340	2,21	0,850
5	2,45	6,60	5,70	0,290	2,73	0,690
6	3,10	2,40	3,40	0,220	0,940	0,680
7	3,80	0,900	0,900	0,130	0,520	0,460
8	4,20	0,600	0	-0,0210	0,0970	0,0480
9	4,10	0,380	0	-0,0240	0,0590	0

TABELA 74. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 17.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	96,0	2,40	1,20	45,0	0,600	75,0
1	78,0	3,60	2,40	22,5	0,630	36,0
2	24,6	1,80	3,60	12,0	1,80	6,60
3	10,2	1,80	5,40	5,00	2,80	1,80
4	10,8	1,80	4,20	6,50	2,60	2,50
5	8,40	1,20	3,60	9,40	4,00	2,40
6	66,0	15,0	21,0	4,30	1,40	3,10
7	558	138	156	4,00	1,10	3,50
8	-4500	972	1962	-4,60	2,00	-2,30
9	-4020	1632	-	-2,50	-	0

TABELA 47. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 18.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,520	10,3	12,6	0,0380	3,46	5,00
1	0,580	11,2	10,3	0,0880	1,77	3,82
2	0,650	12,3	8,20	0,150	1,83	2,74
3	0,840	12,8	7,00	0,490	1,47	0,400
4	1,35	11,6	6,70	0,390	1,64	0,280
5	1,90	9,60	6,20	0,360	2,22	0,430
6	2,70	6,00	4,00	0,370	2,76	1,32
7	3,65	2,20	1,40	0,140	1,18	0,450
8	4,00	0,800	0,300	0,0500	0,160	0,0530
9	4,05	0,500	0	-0,0240	0,150	0,0990

TABELA 75. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 18.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	198	2,40	1,80	91,0	0,690	132
1	108	5,40	2,40	20,0	0,460	43,4
2	49,2	4,20	2,40	12,2	0,670	18,3
3	12,6	4,20	15,6	3,00	3,70	0,820
4	10,8	2,40	15,0	4,20	5,90	0,720
5	8,40	1,20	7,20	6,20	5,20	1,20
6	11,4	1,80	3,00	7,50	2,10	3,60
7	282	33,6	90,0	8,40	2,60	3,20
8	2040	636	11920	3,20	3,00	1,10
9	-4320	720	1050	-6,30	1,50	-4,10

TABELA 48. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 19.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,530	12,0	13,1	0,0380	3,77	7,17
1	0,580	13,5	9,90	0,250	2,00	3,75
2	0,800	14,2	7,82	0,420	2,46	1,76
3	1,20	13,4	6,55	0,540	2,31	0,730
4	1,88	11,3	5,65	0,460	2,37	0,480
5	2,80	7,10	4,70	0,320	2,41	0,430
6	3,75	2,80	2,25	0,260	1,01	0,730
7	4,64	0,960	0,700	0,0890	0,210	0,130
8	4,93	0,700	0,300	-0,0300	0,0460	0,0410
9	4,60	0,680	0,150	-0,110	0,0260	0,0220

TABELA 76. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 19.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	308	3,10	1,60	99,2	0,530	189
1	43,0	5,40	2,90	8,00	0,530	15,0
2	21,4	3,70	5,10	5,90	1,40	4,20
3	10,6	2,50	7,80	4,30	3,20	1,40
4	6,80	1,30	6,50	5,20	4,90	1,00
5	9,20	1,20	6,80	7,50	5,60	1,30
6	136	35,0	48,4	3,90	1,40	2,80
7	957	406	655	2,40	1,60	1,50
8	-3380	2204	2473	-1,50	1,10	-1,40
9	-873	3692	4364	-0,240	1,20	-0,200

TABELA 49. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 20.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,770	15,4	8,90	0,160	1,82	3,38
1	0,880	16,2	6,70	0,190	2,43	1,80
2	1,16	15,3	5,20	0,360	2,89	1,11
3	1,65	13,3	3,95	0,330	2,47	0,730
4	2,20	10,2	2,80	0,360	2,50	0,530
5	3,00	5,90	1,65	0,280	1,83	0,370
6	3,83	1,70	-	0,220	0,980	-
7	4,53	0,780	-	0,0550	0,0590	-
8	4,73	0,600	-	-0,0110	0	-
9	4,60	0,550	-	-0,0430	0	-

TABELA 77. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 20.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	99,0	8,70	4,70	11,4	0,540	21,1
1	76,0	5,90	8,00	12,8	1,40	9,50
2	30,0	3,70	9,70	8,00	2,60	3,10
3	23,6	3,20	10,7	7,50	3,40	2,20
4	11,7	1,70	7,90	6,90	4,70	1,50
5	19,3	3,00	14,6	6,50	4,90	1,30
6	295	66,1	-	4,50	-	-
7	1412	1316	-	1,10	-	-
8	-7691	-	-	0	-	-
9	-2037	-	-	0	-	-

TABELA 50. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 21.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,450	14,0	8,50	0,0440	0,440	5,33
1	0,490	16,0	6,20	0,160	1,53	3,60
2	0,590	16,8	4,70	0,260	1,76	1,45
3	0,750	16,2	3,90	0,240	2,93	1,03
4	0,920	14,6	3,10	0,190	3,33	0,670
5	1,11	12,0	2,55	0,270	3,17	0,450
6	1,43	8,40	2,10	0,250	3,52	0,410
7	1,78	4,10	1,60	0,210	1,07	0,120
8	2,14	2,40	1,40	0,110	0,488	0,0935
9	2,38	1,60	1,10	0,0270	0,342	0,0866
10	2,42	1,20	0,900	0	0,165	0,0826

TABELA 78. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 21.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	320	32,0	2,60	10,0	0,0830	121
1	84,4	8,80	3,80	9,60	0,430	22,5
2	39,7	5,90	7,10	6,80	1,20	5,60
3	32,8	2,70	7,60	12,2	2,80	4,30
4	34,7	2,00	9,90	17,5	5,00	3,50
5	22,2	1,90	13,3	11,7	7,00	1,70
6	21,6	1,50	13,2	14,1	8,60	1,60
7	17,1	3,40	30,0	5,10	8,90	0,570
8	65,5	14,8	77,0	4,40	5,20	0,850
9	1267	100	395	12,7	3,90	3,20
10	-	300	599	-	2,00	-

TABELA 51. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 22.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,550	16,6	6,30	0,250	1,45	2,91
1	0,680	17,3	4,80	0,200	1,59	1,89
2	0,880	17,2	3,60	0,340	1,63	1,41
3	1,20	16,8	2,55	0,270	1,99	0,750
4	1,55	15,4	1,70	0,280	1,96	0,340
5	2,03	12,8	1,25	0,370	1,97	0,150
6	2,95	9,00	0,950	0,340	2,71	0,100
7	3,84	2,40	0,700	0,110	0,325	0,0521
8	4,20	1,10	0,500	0,0200	0,147	0,0476
9	4,17	0,850	0,350	-0,0340	0,0480	0,0240

TABELA 79. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 22.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	122	21,1	10,5	5,80	0,500	11,6
1	125	15,8	13,3	8,00	0,840	9,50
2	59,3	12,4	14,3	4,80	1,20	4,10
3	58,9	8,00	21,2	7,40	2,70	2,80
4	42,9	6,10	35,3	7,00	5,80	1,20
5	26,0	4,90	64,0	5,30	13,1	0,410
6	21,2	2,70	72,0	8,00	27,1	0,290
7	253	85,5	534	3,00	6,20	0,470
8	2502	340	1051	7,40	3,10	2,40
9	-2137	1514	3028	-1,40	2,00	-0,710

TABELA 52. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 23.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,690	14,2	8,10	0,0290	1,16	2,90
1	0,730	15,4	6,15	0,100	1,47	2,30
2	0,800	16,0	4,60	0,190	1,49	1,75
3	1,00	16,0	3,45	0,200	0,603	0,980
4	1,23	15,2	2,80	0,230	1,60	0,416
5	1,55	13,6	2,30	0,270	2,21	0,323
6	2,00	10,7	1,85	0,300	1,81	0,200
7	2,63	7,40	1,45	0,240	1,23	0,116
8	3,35	4,30	1,16	0,230	1,12	0,0373
9	4,15	1,20	1,00	0,0800	0,223	0,0482
10	4,35	0,850	0,850	0,0180	0,0460	0,0230

TABELA 80. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 23.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	683	17,1	6,80	40,0	0,400	100
1	188	12,8	8,20	14,7	0,640	23
2	88,4	11,3	9,60	7,80	0,850	9,20
3	72,0	23,9	14,7	3,00	0,620	4,90
4	50,0	7,10	27,4	7,00	3,80	1,80
5	31,1	3,80	26,0	8,20	6,80	1,20
6	18,0	3,00	27,0	6,00	9,10	0,700
7	12,5	2,40	25,9	5,10	10,6	0,480
8	18,3	3,80	113	4,90	30,0	0,160
9	233	83,4	386	2,80	4,60	0,600
10	1967	770	1539	2,60	2,00	1,30

TABELA 53. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 24.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S'-S)$ (h ⁻¹)
0	0,630	12,8	4,20	0,0320	0,635	2,22
1	0,670	13,7	3,00	0,0900	1,25	2,44
2	0,740	14,5	1,75	0,200	0,897	1,45
3	0,900	14,9	0,850	0,280	0,671	0,468
4	1,16	14,3	0,580	0,320	1,57	0,139
5	1,57	12,5	0,460	0,390	1,77	0,0752
6	2,20	9,70	0,390	0,380	1,69	0
7	3,07	5,80	0,370	0,370	1,47	0
8	4,00	1,50	0,340	0,0820	0,315	0
9	4,27	1,00	0,300	0,0520	0,0984	0

TABELA 81. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S'-S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 24.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S'-S)}$	$\frac{\mu(S'-S)}{\mu}$
0	506	25,5	7,30	19,8	0,290	69,4
1	158	11,3	5,80	13,9	0,510	27,1
2	59,7	13,3	8,20	4,50	0,620	7,30
3	34,3	14,3	20,5	2,40	1,40	1,70
4	27,2	5,50	62,6	4,90	11,3	0,430
5	14,8	3,30	76,6	4,50	23,5	0,190
6	12,3	2,80	-	4,40	-	0
7	18,6	4,70	-	4,00	-	0
8	267	70,0	-	3,80	-	0
9	1073	567	-	1,90	-	0

TABELA 54. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 25.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu(S' - S)$ (h ⁻¹)
0	0,630	16,6	4,60	0,0630	0,952	3,49
1	0,680	17,9	2,70	0,0650	0,269	1,16
2	0,730	18,3	1,90	0,130	1,63	0,632
3	0,880	17,3	1,60	0,250	2,57	0,232
4	1,17	15,3	1,35	0,390	2,25	0,179
5	1,70	12,9	1,10	0,410	2,06	0,121
6	2,36	9,40	0,930	0,330	2,12	0,0920
7	3,10	4,70	0,700	0,180	1,30	0,0648
8	3,60	1,40	0,540	0,0950	0,185	0,0386
9	3,92	1,10	0,400	0,0770	0,0870	0,0357

TABELA 82. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu(S' - S)$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 25.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu(S' - S)}$	$\frac{\mu(S' - S)}{\mu}$
0	229	15,1	4,10	15,1	0,270	55,4
1	351	84,8	19,7	4,10	0,230	17,8
2	157	12,5	32,3	12,5	2,60	4,90
3	65,0	6,30	69,8	10,3	11,1	0,930
4	30,8	5,30	67,1	5,80	12,6	0,460
5	20,5	4,10	69,4	5,00	17,0	0,300
6	18,7	2,90	67,2	6,40	23,0	0,280
7	30,7	4,20	85,2	7,20	20,1	0,360
8	420	216	1034	1,90	4,80	0,410
9	771	683	1664	1,10	2,40	0,460

TABELA 55. Velocidades específicas de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 26.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,500	15,6	4,80	0,0520	0,160	3,76
1	0,530	17,0	3,10	0,120	1,07	2,58
2	0,600	17,7	1,85	0,130	2,61	1,98
3	0,730	17,0	1,45	0,270	2,64	0,370
4	0,940	15,5	1,20	0,260	2,14	0,196
5	1,19	13,7	1,02	0,210	1,84	0,151
6	1,44	11,5	0,850	0,220	2,21	0,0708
7	1,78	8,10	0,750	0,190	2,49	0,0781
8	2,11	4,20	0,630	0,140	1,17	0,0104
9	2,38	1,80	0,520	0,0470	0,390	0,0185
10	2,46	1,20	0,480	0,0240	0,179	0,0163

TABELA 83. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 26.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	381	124	5,30	3,10	0,0430	72,3
1	160	17,9	7,44	8,90	0,410	21,5
2	127	6,30	8,30	20,1	1,30	15,2
3	46,7	4,80	34,1	9,80	7,10	1,40
4	35,1	4,30	46,5	8,20	10,9	0,750
5	35,7	4,10	49,7	8,80	12,2	0,720
6	30,0	3,00	93,2	10,0	31,2	0,320
7	31,6	2,40	76,8	13,1	31,9	0,410
8	38,6	4,60	519	8,40	113	0,0740
9	664	80,0	1686	8,30	21,1	0,400
10	2225	298	3276	7,50	11,0	0,680

TABELA 86. Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose e de crescimento celular para o ensaio nº 27.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,600	14,5	4,50	0,0830	1,33	3,00
1	0,650	15,3	2,80	0,240	1,84	2,46
2	0,850	15,6	1,30	0,340	2,23	1,38
3	1,17	14,5	0,600	0,420	2,32	0,568
4	1,73	11,6	0	0,430	3,02	0
5	2,57	6,00	0	0,300	2,53	0
6	3,25	1,00	0	0,0830	0,300	0
7	3,50	0,600	0	0,0410	0,0571	0
8	3,65	-	-	0,0170	-	-
9	3,70	-	-	0,0110	-	-

TABELA 84. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 27.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	231	14,4	6,40	16,0	0,440	36,1
1	75,0	9,80	7,30	7,70	0,750	10,3
2	44,1	6,70	10,9	6,60	1,60	4,10
3	24,7	4,50	18,3	5,50	4,10	1,40
4	15,3	2,20	-	7,00	-	0
5	15,0	1,80	-	8,40	-	0
6	517	143	-	3,60	-	0
7	1522	1093	-	1,40	-	0
8	3847	-	-	-	-	-
9	6011	-	-	-	-	-

TABELA 57 Velocidades específicas de consumo de AR, de consumo de sacarose^{105.} e de crescimento celular para o ensaio nº 28.

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	(S' - S) (g/L)	μ (h ⁻¹)	μ_S (h ⁻¹)	$\mu_{(S'-S)}$ (h ⁻¹)
0	0,550	14,1	3,80	0,180	1,09	4,00
1	0,650	15,3	2,00	0,280	1,52	2,15
2	0,870	15,6	0,750	0,440	2,20	0,818
3	1,33	13,4	0,270	0,400	3,64	0,160
4	2,00	8,90	0,100	0,400	2,59	0,0510
5	2,73	4,30	0	0,180	1,43	0
6	3,15	1,00	0	0,0650	0,169	0
7	3,34	0,800	0	0,0480	0,0120	0
8	3,50	-	-	0,0400	-	-
9	3,63	-	-	0,0330	-	-

TABELA 85. Relações entre a atividade invertásica específica das células ($\bar{v}$) e as velocidades específicas de consumo de AR (μ_S), de consumo de sacarose ($\mu_{(S'-S)}$) e de crescimento celular (μ) para o ensaio nº 28.

t (h)	$\frac{\bar{v}}{\mu}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_S}$	$\frac{\bar{v}}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_S}{\mu}$	$\frac{\mu_S}{\mu_{(S'-S)}}$	$\frac{\mu_{(S'-S)}}{\mu}$
0	127	21,0	5,70	6,10	0,270	22,2
1	78,2	14,4	10,2	5,40	0,710	7,70
2	34,1	6,80	18,3	5,00	2,70	1,90
3	21,0	2,30	52,5	9,10	22,8	0,400
4	16,5	2,50	129	6,50	50,8	0,130
5	40,0	5,00	-	7,90	-	0
6	390	151	-	2,60	-	0
7	674	2695	-	0,250	-	0
8	819	-	-	-	-	-
9	998	-	-	-	-	-

FIGURA 29. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 1.

FIGURA 30. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 2.

FIGURA 31. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 3.

FIGURA 32. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 4.

108.

FIGURA 33. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 5.

FIGURA 34. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 6.

FIGURA 35. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 7.

FIGURA 36. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 8.

FIGURA 37. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 9.

FIGURA 38. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 10.

FIGURA 39. Variação com o tempo das atividades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 11.

FIGURA 40. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 12.

FIGURA 41. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 13.

FIGURA 42. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 14.

FIGURA 43. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 15.

FIGURA 44. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 16.

FIGURA 45. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 17.

FIGURA 46. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 18.

FIGURA 47. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 19.

FIGURA 48. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 20.

FIGURA 49. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 21.

FIGURA 50. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 22.

FIGURA 51. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 23.

FIGURA 52. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 24.

FIGURA 53. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 25.

FIGURA 54. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet$), de consumo de AR ($\blacksquare$) e de consumo de sacarose ($\blacktriangle$) para o ensaio nº 26.

FIGURA 55. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 27.

FIGURA 56. Variação com o tempo das velocidades específicas de crescimento celular (•), de consumo de AR (■) e de consumo de sacarose (▲) para o ensaio nº 28.

TABELA 86. Intervalo de tempo (Δt) para cada ensaio executado durante o qual a relação: $\ln X = \ln X_0 + \mu t$ foi verificada.

Ensaio (Nº)	$\ln X_0$	μ (h ⁻¹)	r	Δt	Ensaio (Nº)	$\ln X_0$	μ (h ⁻¹)	r	Δt
(1)	-0,61	0,213	0,990	3 a 8 h	(15)	-0,62	0,276	0,993	3 a 8 h
(2)	-0,34	0,172	0,997	2 a 7 h	(16)	-0,34	0,193	0,992	3 a 7 h
(3)	-0,62	0,250	0,996	3 a 7 h	(17)	-0,76	0,310	0,997	3 a 7 h
(4)	-0,48	0,241	0,990	2 a 8 h	(18)	-1,14	0,352	0,9991	4 a 7 h
(5)	-	-	-	-	(19)	-0,77	0,343	0,98	3 a 7 h
(6)	-0,48	0,269	0,998	2 a 7 h	(20)	-0,32	0,270	0,993	2 a 7 h
(7)	-	-	-	-	(21)	-0,88	0,200	0,993	5 a 9 h
(8)	-0,88	0,275	0,994	4 a 8 h	(22)	-0,75	0,299	0,998	3 a 7 h
(9)	-0,65	0,236	0,994	4 a 8 h	(23)	-0,73	0,241	0,9991	3 a 9 h
(10)	-0,64	0,283	0,990	3 a 7 h	(24)	-1,2	0,328	0,996	4 a 8 h
(11)	-0,49	0,202	0,998	3 a 7 h	(25)	-1,15	0,331	0,9994	4 a 7 h
(12)	-0,64	0,285	0,992	3 a 7 h	(26)	-0,71	0,179	0,998	4 a 9 h
(13)	-1,11	0,278	0,998	4 a 8 h	(27)	-0,89	0,352	0,994	3 a 6 h
(14)	-0,36	0,295	0,992	2 a 7 h	(28)	-0,58	0,301	0,991	2 a 6 h

QUADRO II. Aceleração da atividade invertásica específica de células intactas de levedura em função do tempo.

t (h)	pH ϕ	4,0					4,5					5,0				
		0 ^{**}	0,5	1	2	3	0	0,5	1	2	3	0	0,5	1	2	3
0		-1,7 [*]	-7,2	2,4	-7,8	3,0	-2,0	-3,4	-1,6	-0,12	-1,2	-0,24	-0,60	1,8	5,4	1,2
1		-0,36	-4,1	-2,9	-7,4	-1,2	-0,81	-3,3	-1,2	-0,62	-3,6	-1,1	-2,5	-1,5	-2,2	-1,2
2		-1,0	-3,3	-4,2	-8,6	-2,1	-0,48	-2,3	-2,4	-0,31	-4,4	-3,7	-3,6	-2,2	-6,2	-2,8
3		3,0	-2,5	-2,2	-2,3	-0,46	-0,34	-2,4	-1,8	-0,60	-2,9	-2,9	-3,0	-0,75	-0,27	-3,2
4		0,68	-1,3	-0,61	-0,38	0,020	-0,06	-1,4	-1,2	-1,6	1,6	-1,1	-0,73	0,11	0,70	-1,9
5		6,1	-0,79	1,1	3,0	2,1	0,10	2,6	-0,10	-0,26	4,0	-0,69	0,99	0,88	14	-0,49
6		12	1,5	4,3	6,3	5,2	0,58	13	3,9	4,0	17	0,32	7,5	1,5	39	2,8
7		22	5,8	19	6,9	55	0,90	22	34	24	18	4,8	4,9	2,4	17	33
8		19	11	7,7	5,0	13	1,7	7,1	7,3	10	9,5	37	11	3,3	8,7	6,1
9		17	15	4,2	-	21	2,9	12	7,7	6,7	5,8	19	24	5,5	7,2	3,0
10		-	-	-	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-	7,2	-	-

(CONTINUA)

Continuação do quadro II.

t (h)	pH ϕ	5,5					6,0			6,5			*** T	
		0	0,5	1	2	3	0	1	2	0	1	2	35°C	40°C
0		2,3	3,6	3,1	-0,60	-1,2	-0,12	13	-1,9	-0,36	-5,8	-0,60	-0,72	-0,72
1		-1,1	-0,87	-0,21	-1,7	-5,4	-2,5	-1,2	-2,2	-3,7	-5,0	-2,2	-2,6	-9,4
2		-2,7	-3,6	-3,2	-2,8	-2,9	-3,9	-4,4	-2,3	-2,6	-4,3	-2,4	-5,0	-7,4
3		-1,5	-0,83	-1,4	-3,3	-3,7	-3,6	-4,9	-0,93	-1,3	-4,2	-2,9	-4,6	-2,3
4		-0,31	0,06	-1,2	-0,40	-1,1	-1,9	-3,6	-9,7	-0,93	-2,4	-3,0	-3,0	-0,05
5		0,46	4,6	0,80	2,0	4,7	-1,1	-2,3	-1,8	-0,46	-2,4	-3,0	-1,3	4,2
6		7,2	27	8,1	50	15	-0,53	-1,4	0,44	-1,7	-5,5	-2,3	26	10
7		49	23	70	14	8,0	-0,92	2,1	7,9	1,0	22	-5,0	4,4	0,73
8		13	5,3	3,1	-5,3	3,6	1,4	26	19	9,0	23	6,3	1,2	0,24
9		8,9	0,72	1,7	-5,4	2,4	30	15	49	17	22	17	0,24	0,12
10		-	-	-	-	-	16	-	-	14	-	17	-	-

* Aceleração da atividade invertásica específica expressa em gART/gcél.h²;

** Vazão específica de ar (ϕ) expressa em L/L.min;

*** Estes ensaios foram feitos em pH 5,5 e $\phi = 1,0$ L/L.min.

TABELA 87. Parâmetros relacionados com a atividade invertásica de células intactas de levedura obtidas de cultivo descontínuo.

ϕ^* pH		0	0,5	1	2	3
4,0	v_m	0,102	0,059	0,0650	0,0810	0,0750
	v_f	1,15	0,415	0,803	0,372	1,48
	Δt_1	1,4h	2,1h	0,5h	0h	1,3h
	Δt_2	0h	1,7h	2,9h	2,6h	2,8h
	$\Delta \bar{v}/\Delta t$	12,6	7,12	11,1	4,37	21,1
4,5	v_m	0,0410	0,050	0,0560	0,0560	0,0660
	v_f	0,210	1,42	1,58	0,952	1,09
	Δt_1	-	0,7h	0,7h	1,7h	1,0h
	Δt_2	-	2,8h	3,7h	1,4h	2,9h
	$\Delta \bar{v}/\Delta t$	2,03	20,6	22,9	13,4	12,3
5,0	v_m	0,064	0,0630	0,0440	0,0550	0,0400
	v_f	1,01	1,71	0,346	1,68	1,20
	Δt_1	1,8h	0,7h	0,5h	0,3h	1,1h
	Δt_2	3,7h	4,2h	4h	4,6h	4,8h
	$\Delta \bar{v}/\Delta t$	18,9	24,7	3,02	19,5	23,2
5,5	v_m	0,064	0,041	0,0500	0,0450	0,0650
	v_f	1,39	1,61	1,73	1,60	1,45
	Δt_1	1,7h	1,2h	1,1h	0,7h	1h
	Δt_2	3,9h	3,9h	4,7h	4,4h	4,1h
	$\Delta \bar{v}/\Delta t$	19,9	23,5	25,2	23,3	20,8

(CONTINUA)

Continuação da tabela 87.

ϕ *		0	0,5	1	2	3
pH						
6,0	v_m	0,089	-	0,0770	0,0650	-
	v_f	0,889	-	0,993	0,930	-
	Δt_1	1,6h	-	1,4h	0,7h	-
	Δt_2	6,5h	-	5,8h	5,9h	-
	$\Delta \bar{v}/\Delta t$	24,0	-	27,5	17,3	-
6,5	v_m	0,0560	-	0,120	0,0300	-
	v_f	0,825	-	1,18	0,604	-
	Δt_1	3,1h	-	0,3h	0,6h	-
	Δt_2	4,3h	-	5,8h	6,9h	-
	$\Delta \bar{v}/\Delta t$	15,4	-	21,2	11,5	-
TEMPERATURA	35°C	v_m	-	-	0,0720	-
		v_f	-	-	1,10	-
		Δt_1	-	-	0,6h	-
		Δt_2	-	-	4,4h	-
		$\Delta \bar{v}/\Delta t$	-	-	15,4	-
	40°C	v_m	-	-	0,109	-
		v_f	-	-	0,515	-
		Δt_1	-	-	1h	-
		Δt_2	-	-	3,9h	-
		$\Delta \bar{v}/\Delta t$	-	-	6,09	-

* Vazão específica de ar expressa em L/L.min; v_m = atividade invertásica mínima (gART/gcél.min); v_f = atividade invertásica específica final (gART/gcél.min); Δt_1 = intervalo de tempo transcorrido entre a queda do teor de AR abaixo de 10 g/L e o início do aumento de v ; Δt_2 = intervalo de tempo durante o qual o teor de AR permaneceu acima de 10 g/L.

ABELA 88. Efeito do pH e da vazão de ar sobre a produção de invertase em células de *S. cerevisiae*.

Ensaio nº	pH	Vazão de ar (min^{-1})	P (gART/L.min)	Tempo de cultivo (h)
1	4,0	2,0	0,73	8
2	4,0	0,5	0,86	9
3	4,0	1,0	2,64	9
4	4,0	3,0	5,58	9
5	4,0	0,0	2,79	9
6	4,5	2,0	3,88	9
7	4,5	0,0	0,43	10
8	4,5	1,0	6,01	9
9	4,5	0,5	4,82	9
10	4,5	3,0	3,58	9
11	5,0	0,0	2,82	9
12	5,0	0,5	5,82	9
13	5,0	1,0	1,19	10
14	5,0	2,0	8,24	9
15	5,0	3,0	5,78	9
16	5,5	0,0	3,96	9
17	5,5	0,5	6,50	9
18	5,5	1,0	6,86	9
19	5,5	2,0	7,24	9
20	5,5	3,0	6,55	9
21	6,5	0,0	1,88	10
22	6,5	1,0	4,63	9
23	6,5	2,0	2,39	10
24	6,0	2,0	3,78	9
25	6,0	1,0	3,74	9
26	6,0	0,0	2,02	10
27	5,5	1,0	3,88	9
28	5,5	1,0	1,63	9

FIGURA 57. Atividade invertásica em função da concentração de células para os ensaios efetuados em pH = 4,0, nos quais o ar foi borbulhado nas vazões (min^{-1}): 0 (•); 0,5 (■); 1 (▲); 2 (○); e 3 (□).

FIGURA 58. Atividade invertásica em função da concentração de células para os ensaios efetuados em pH = 5,0, nos quais o ar foi borbulhado nas vazões (min^{-1}): 0 (•); 0,5 (■); 1 (▲); 2 (○) e 3 (□).

FIGURA 59. Atividade invertásica em função da concentração de células para os ensaios efetuados em $\text{pH} = 4,5$, nos quais o ar foi borbulhado nas vazões (min^{-1}): 0 (●); 0,5 (■); 1 (▲); 2 (○) e 3 (□).

FIGURA 60. Atividade invertásica em função da concentração de células para os ensaios efetuados em $\text{pH} = 5,5$, nos quais o ar foi borbulhado nas vazões (min^{-1}): 0 ($\bullet$); 0,5 ($\blacksquare$); 1 ($\blacktriangle$); 2 ($\square$) e 3 ($\square$).

FIGURA 61. Atividade invertásica em função da concentração de células para os ensaios efetuados em $\text{pH} = 6,0$ (vazão de ar (min^{-1}): 0 ($\bullet$); 1 ($\blacksquare$) e 2 ($\blacktriangle$)) e em $\text{pH} = 6,5$ (vazão de ar (min^{-1}): 0 ($\circ$); 1 ($\square$) e 2 ($\triangle$)).

FIGURA 62. Atividade invertásica em função da concentração de células para os ensaios efetuados em pH = 5,5 e vazão de ar = $1,0 \text{ min}^{-1}$, às temperaturas: 30°C (▲), 35°C (●) e 40°C (◻).

FIGURA 63. Interdependência da produção de invertase e da vazão de ar frente a vários pH. 4,0 (●), 4,5 (■); 5,0 (○); 5,5 (▲); 6,0 (△) e 6,5 (□).

5. CONCLUSÕES

- 1) Os parâmetros μ , μ_S , v e $\mu_{(S'-S)}$ não apresentaram correlação aparente.
- 2) O crescimento celular e a biossíntese da invertase seriam eventos desa
coplados.
- 3) A invertase não foi um fator limitante da disponibilidade de AR para o metabolismo da célula.
- 4) A invertase presa à parede celular atuaria como uma típica enzima imobi
lizada por ligação covalente.
- 5) A quantidade de AR presente no mosto não se constituiu num fator limi
tante para o crescimento celular.
- 6) Nas condições de cultivo empregadas, apenas, parte do AR disponível no mosto era usado para o crescimento celular.
- 7) A temperatura de cultivo teve influência marcante sobre a atividade in
vertásica específica das células intactas de levedura.
- 8) A atividade invertásica estaria vinculada à mecanismos de repressão-
desrepressão e à disponibilidade de sacarose no meio de cultura.
- 9) Em todos os experimentos realizados houve formação de etanol nunca su
perior a 10 g/L.
- 10) o pH e a aeração influíram na magnitude do tempo de geração, atuando, pre
ferencialmente, na fase G1 do crescimento celular.
- 11) A variação do tg foi mais nítida em sistemas aerados e em valores ex
tremos de pH (4,0 e 6,5).
- 12) A variação do tg para vazões específicas de ar extremas (0 e 3,0 L/L.min) independeu do pH.

- 13) A maior atividade invertásica específica, que foi da ordem de 1,7 gART/gcél.min, foi obtida em sistemas aerados e em pH 5,0 e 5,5.
- 14) A atividade invertásica específica variou ao longo do ensaio, atingindo valores mínimos entre os instantes $t = 4$ h e $t = 5$ h, e apresentando aumento abrupto nas últimas 2 ou 3 h de processo.
- 15) O pH e a aeração influíram na produção da invertase.
- 16) A temperatura influenciou sobre a magnitude da "aceleração" de aparecimento da invertase, constatando-se uma queda aproximada de 50% nos valores de v para incrementos de temperatura da ordem de 5°C .
- 17) A "aceleração" de aparecimento da invertase foi sempre crescente, a menos das duas primeiras horas de processo, independente das condições de cultivo empregadas.
- 18) A maior produção de invertase, que foi da ordem de 8,24 gART/min.L de meio, foi obtida em pH = 5,0 e vazão de ar = 2,0 L/L.min.
- 19) A variação de $v = f(t)$ e da v final das células intactas seria o resultado das intensas modificações conformacionais e químicas sofridas pela parede celular durante os processos de crescimento e multiplicação da levedura, causando posicionamentos diversos e aleatórios das moléculas ' de enzima no espaço periplásmico, além de mudanças na própria estrutura da proteína, tornando-as mais ou menos acessíveis às moléculas de substrato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMS, E.; NEIGEBORN, L.; CARLSON, M. Molecular analysis of SNF2 and SNF5, genes required for expression of glucose repressible genes in *S. cerevisiae*. Mol. Cell Biol., London, 6:3643-3651, 1986.
2. BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. Engenharia bioquímica. São Paulo , Edgard Blücher, 1975. v.3, p.183.
3. 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, 19:1363-1374, 1977.
4. BUSA, W.B. & NUCCITELLI, R. Metabolic regulation via intracellular pH. Am.J.Physiol., Bethesda, 246:R409-R438, 1984.
5. CARLSON , M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. J.Bacteriol., Baltimore, 169(11):4873-4877, 1987.
6. CASPANI, G.; TOSTORA, P.; HANOZET, G.M.; GUERRITORE, A. Glucose-stimulated cAMP increase may be mediated by intracellular acidification in *S.cerevisiae* FEBS Lett., Amsterdam, 186:75-79, 1985.
7. CAUBET, R.; GUERIN, B.; GUERIN, M. Comparative studies on the glycolytic and hexose monophosphate pathways in *C. parapsilosis* and *S. cerevisiae*. Arch. Microbiol., Berlin, 149(4):324-329, 1988.
8. D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Intracellular ethanol accumulation in *S. cerevisiae* during fermentation. Appl.Environ.Microbiol., Washington, 54(1):110-114, 1988.
9. DELLAMORA-ORTIZ, G.M.; ORTIZ, C.H.D.; MAIA, J.C.C.; PANEK, A.D. Partial purification and characterization of the interconvertible forms of trehalose from *S. cerevisiae*. Arch.Biochem.Biophys, New York, 251: 205-214, 1986.

10. DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. Intracellular accumulation of AMP as a cause for the decline in rate of ethanol production by *S. cerevisiae* during batch fermentation. Appl.Environ.Microbiol., Washington, 54(1):98-104, 1988.
11. ENTIAN, K.D. Glucose repression: a complex regulatory system in yeast. Microbiol.Sci., London, 3:366-371, 1986.
12. FALCONE, M. & MARQUES, A.B. Estudo sobre as condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. Tecnol.Ali-ment. Bebidas, São Paulo, 4:24-30, 1965.
13. FREVERT, J. & BALLOU, C.E. *S. cerevisiae* structural cell wall mannoprotein. Biochemistry, Washington, 24:753-759, 1985.
14. GONZÁLEZ, A.; RODRIGUEZ, L.; FOLCH, J.; SOBERÓN, M.; OLIVEIRA, H. Coordinated regulation of ammonium assimilation and carbon catabolism by glyoxylate in *S. cerevisiae*. J.Gen.Microbiol., London, 133:2497-2501, 1987.
15. GUARENTE, L. & PTASHNE, M. Fusion of *E. coli* loc Z to the cytochrome c gene of *S. cerevisiae*. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, Washington, 78:2199-2203, 1981.
16. HOLCBERG, I.B. and MARGALITH, P. Alcohol fermentation by immobilized yeast at high sugar concentration. Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol., Berlin, 13(3):133-140, 1981.
17. HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat induced accumulation and futile cycling of trehalose in *S. cerevisiae*. J. Bacteriol., Baltimore, 169(12):5518-5522, 1987.
18. HOTTIGER, T.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *S. cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. FEBS Lett., Amsterdam, 220:113-115, 1987.
19. HORISBERGER, M.; ROUVET-VAUTHEY, M.; RICHLI, U.; FARR, D.R. Cell wall architecture of the halophilic yeast *S. rouxii*. Eur. J. Cell Biol., Stuttgart, 37:70-77, 1985.

20. 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.
21. KAPPELI, O.; ARREGUIN, M.; FIECHTER, A. The respirative breakdown of glucose by *S. cerevisiae*: an assessment of a physiological state. J.Gen.Microbiol., London, 131:1411-1416, 1985.
22. KAPPELI, O. Regulation of carbon metabolism in *S. cerevisiae* and related yeasts. Adv.Microbial Physiol., London, 28:181-209, 1986.
23. KELLER, F.; SCHELLENBERG, B.; WIEMKEN, A. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast. Arch.Microbiol., Berlin, 131:298-301, 1982.
24. KENYON, C.P.; BERNARD, A.P.; VUUREN, H.J.J. Water relations of ethanol fermentation by *S. cerevisiae*: glycerol production under solute stress. Enzyme Microb. Technol., Haywards Heath, 8:461-464, 1986.
25. KRAUTER, M. Influência da adição de mosto com vazão linearmente decrescente com o tempo no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica. S.Paulo, 1987. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
26. KUO, T.P. Isolation of glucose containing high mannose glycoprotein core oligossacharides. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, Washington, 81(20):6340-6343, 1984.
27. LEE, F.J.S. & HASSAN, H. Biosynthesis of superoxide dismutase and catalase in chemostat culture of *S. cerevisiae*. Appl.Microbiol.Biotechnol., Berlin, 26:531-536, 1987.
28. LIEVENSE, J.C. & LIM, H.C. Annual Reports on Fermentation Processes. Academic Press. New York, 1982. p.211.

29. LIGTHELM, E.M.; PRIOR, B.A.; PREEZ, J.C.. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. Appl.Microbiol.Biotechnol., Berlin, 28(1):63-68, 1988.
30. LILLIE, S.H. & PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *S.cerevisiae*: responses to nutritional limitation. J.Bacteriol., Baltimore, 143: 1384-1394, 1980.
31. LINKO, P. & LINKO, Y.Y. Continuous ethanol fermentation by immobilized biocatalysts. Enzyme Eng., New York, 6:335-342, 1982.
32. LORENCEZ, A.M. & KAPPELI, O. Regulation of gluconeogenic enzymes during the cell cycle of *S. cerevisiae* growing in a chemostat. J.Gen.Microbiol., London, 133:2517-2522, 1987.
33. MARTIN, M.C.; DIAZ, L.A.; MANZANAL, M.B. Role of trehalose in the spores of *Streptomyces*. FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, 35:49-54, 1986.
34. MERCEREAU, P.O.; LACRONTE, F.; KOURILSKY, P. Synthesis of a chicken ovalbumin like protein in the yeast *S. cerevisiae*. Gene, Amsterdam, 11:163-167, 1980. ,
35. MEYENBURG, H.K. The budding cycle of *S. cerevisiae*. Pathol.Microbiol., Basel, 31:117-127, 1968.
36. MORMENEO, S. & SENTANDREU, R. Regulation of invertase synthesis by glucose in *S. cerevisiae*. J.Bacteriol., Baltimore, 152(1):14-18, 1982.
37. NAKAJIMA, T.; NISHIHARA, H.; CHIBA, Y. and MATSUDA, K. Structural alteration of cell wall polysaccharides from *S. cerevisiae* mutants. J.Ferment.Technol., Tokyo, 66(3):251-255, 1988.
38. NEIGEBORN, L.; RUBIN, K.; CARLSON, M. Suppressors of *snf2* mutation restore invertase derepression and cause temperature-sensitive lethality in yeast. Genetics, Austin, 112:741-753, 1986.

39. ORLOWSKI, J. & BARFORD, J. The effect of inoculum preparation on the fully aerated growth of *S. cerevisiae* with a glucose substrate. J.Gen.Appl.Microbiol., Tokyo, 33:113-121, 1987.
40. PANEK, A.D. & MATTOON, J.R. Regulation of energy metabolism in *S. cerevisiae*. Relationship between catabolite repression, trehalose synthesis and mitochondrial development. Arch.Biochem.Biophys., New York, 183:306-316, 1977.
41. PANEK, A.C.; ARAUJO, P.S.; MOURA NETO, V.; PANEK, A.D. Regulation of the trehalose P-synthase complex in *Saccharomyces*. Curr.Genet., Berlin, 11:459-466, 1987.
42. 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, 1979. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
43. SANTOS, M.G.R. Melhoramento genético e caracterização de novas cepas amilolíticas de leveduras obtidas por engenharia genética. Bol.Biotecnol., Piracicaba, 20:1-2, 1988.
44. SCHMITT, M. & RADLER, F. Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *S. cerevisiae*. J.Bacteriol., Baltimore, 170(5):2192-2196, 1988.
45. SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. J.Biol.Chem., Baltimore, 195(1):19-23, 1952.
46. SUOMALAINEN, H. & OURA, E. Increase of saccharase content in baker's yeast during the growth phase. Arch.Biochem.Biophys., New York, 68:425-431, 1957.
47. SWEERE, A.P.J.; JANSE, L.; LUYBEN, K.A.M. Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production. I. One fermentor system. Biotechnol.Bioeng., New York, 31(6):567-78, 1988.

48. SWEERE, A.P.J.; JANSE, L.; LUYBEN, K.A.M. Experimental simulation of oxygen profiles and their influence on baker's yeast production. II. Two fermentor system. Biotechnol.Bioeng., New York, 31(6):579-586, 1988.
49. SWEERE, A.P.J.; GIESSELBACH, R.B.; KRIEGER, R.; HONDERD, G.; LUYBEN, K.A. M. Modelling the dynamic behaviour of *S. cerevisiae* and its application in control experiments. Appl.Microbiol.Biotechnol., Berlin, 28:116-127, 1988.
50. TAKARA SHUZO Co., Ltd. Manufacture of ethanol. Japan Patent 5820, 193 (Feb. 5, 1983). Apud: Chem.Abstr., Columbus, 98:177515 W, 1983.
51. THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiol. Rev., Washington, 48:42-59, 1984.
52. THEVELEIN, J.M. & BEULLENS, M. Cyclic AMP and the stimulation of trehalose activity in the yeast *S. cerevisiae* by carbon sources, nitrogen sources and inhibitors of protein synthesis. J.Gen.Microbiol., London, 131: 3199-3209, 1985.
53. THEVELEIN, J.M.; BEULLENS, M.; HONSHOVEN, F.; HOEBEECK, G.; DETREMERIE, K.; HOLLANDER, J.A.; JANS, A.H. Regulation of the cAMP level in the yeast *S. cerevisiae*: intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. J.Gen.Microbiol., London, 133:2191-2196, 1987.
54. THEVELEIN, J.M.; BEULLENS, M.; HONSHOVEN, F.; HOEBEECK, G.; DETREMERIE, K.; GRIEWEL, B.; HOLLANDER, J.A.; JANS, A.H. Regulation of the cAMP level in the yeast *S. cerevisiae*: the glucose-induced cAMP signal is not mediated by transient drop in the intracellular pH. J.Gen.Microbiol., London, 133:2197-2205, 1987.
55. TODA, K. Invertase biosynthesis by *S. carlsbergensis* in batch and continuous cultures. Biotechnol.Bioeng., New York, 18:1103-1115, 1976.
56. TODA, K. Induction and repression of enzymes in microbial culture. J.Chem.Technol.Biotechnol., Oxford, 31:775-790, 1981.

57. VALENTIN, E.; HERRERO, H.R.; MIRAGALL, F.; SENTANDREU, R. Cell wall mannoproteins during the population growth phases in *S. cerevisiae*. Arch.Microbiol., Berlin, 148:88-94, 1987.
58. VALENTIN, E. & SENTANDREU, R. Solubilization and analysis of mannoproteins molecules from the cell wall of *S. cerevisiae*. J.Gen.Microbiol., London, 130(6):1419-1428, 1984.
59. VALLE, E.; BERGILLOS, L.; GASCON, S.; PARRA, F.; RAMOS, S. Trehalase activation in yeasts is mediated by an internal acidification. Eur.J. Biochem., Berlin, 154:247-251, 1986.
60. VAN DOORN, J.; SCHOLTE, E.M.; POSTMA, P.W.; VAN DRIEL, R.; VAN DAM, K. Regulation of trehalase activity during the cell cycle of *S. cerevisiae*. J.Gen.Microbiol., London, 134:785-790, 1988.
61. VITOLO, M. Extração de invertase solúvel a partir de levedura de panificação (*S. cerevisiae*). São Paulo, 1979. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
62. VITOLO, M. Tópicos de enzimologia industrial. São Paulo, Edição do Autor. 1981. 70p.
63. VITOLO, M. Atividade invertásica de células intactas de levedura (*S. cerevisiae*) obtidas por cultivo contínuo. São Paulo, 1983. [Tese de Doutorado - Instituto de Química da USP].
64. VITOLO, M. & BORZANI, W. Measurement of invertase activity of cells of *S. cerevisiae*. Anal.Biochem., Baltimore, 130:469-470, 1983.
65. VITOLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *S. cerevisiae* growing on sugar cane molasses. I. Steady-state continuous culture tests. Biotechnol.Bioeng., New York, 27: 1229-1235, 1985.
66. VITOLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *S. cerevisiae* growing on sugarcane molasses. II. Unsteady-state continuous culture tests. Biotechnol.Bioeng., New York, 30: 9-14, 1987.

67. VITOLLO, M. Obtenção e uso de enzimas industriais. Bol.Biotecnol., Piracicaba, 15:1-3, 1988.
68. WEITZEL, G.; PILATUS, U.; RENSING, L. Similar dose response of heat shock protein synthesis and intracellular pH change in yeast. Exp. Cell Res., New York, 159:252-256, 1985.
69. WEITZEL, G.; PILATUS, U.; RENSING, L. The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast. Exp. Cell Res., New York, 170:64-79, 1987.
70. WHITE, J. Yeast technology. London, Chapman and Hall, 1954. p.62.
71. WU, C. Two protein-binding sites in chromatin implicated in the activation of heat-shock genes. Nature, London, 309:229-234, 1984.
72. ZAJIK, E.J. & LEDUY, A. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. Biotechnol.Bioeng., New York, 15:805-810, 1973.
73. ZLOTNIK, H. & FERNANDEZ, M.P. *S. cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. J.Bacteriol., Baltimore, 159(3):1018-1026, 1984.
74. ZUECO, J.; MORMENEO, S.; SENTANDREU, R. Temporal aspects of the o-glycosylation of *S. cerevisiae* mannoproteins. Biochim.Biophys. Acta, Amsterdam, 884:93-100, 1985.