

FT 120  
v. 2 q. 1

São Paulo, 1988

Tese apresentada à Escola  
Politécnica da USP para a  
obtenção do título de  
Doutor em Engenharia.

VOLUME 2

CULTIVO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP 245 EM FRUTOSE  
OU GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO PARA  
PRODUÇÃO DE INOCULANTES AGRÍCOLAS

JOSE MANUEL CABRAL DE SOUSA DIAS

NÃO CIRCULA

FT-120  
v. 2 q. 1

OK

Engº Químico, Escola Politécnica da USP, 1975

JOSE MANUEL CABRAL DE SOUSA DIAS

CULTIVO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP 245 EM FRUTOSE  
OU GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO PARA  
PRODUÇÃO DE INOCULANTES AGRÍCOLAS

VOLUME 2

Tese apresentada à Escola  
Politécnica da USP para a  
obtenção do título de  
Doutor em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Depto. Engenharia Química

São Paulo, 1988

SUMÁRIO

VOLUME 2

I SUMÁRIO - VOLUME 2 ..... I

vii NOMENCLATURA ..... vii

ix LISTA DE TABELAS - VOLUME 2 ..... ix

xx LISTA DE FIGURAS - VOLUME 2 ..... xx

4 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO DOS ENSAIOS COM FRUTOSE COMO PRINCIPAL FONTE DE CARBONO ..... 4.1

4.1 Experimento 1 (E1) ..... 4.1

4.1.1 Objetivos e Condições do E1 ..... 4.1

4.1.2 Resultados dos Ensaio do E1 ..... 4.2

4.1.3 Discussão dos Resultados do E1 ..... 4.2

4.1.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriã no ..... 4.2

4.1.3.2 Determinação da Temperatura mais Apro- priada para o Cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em Frutose ..... 4.16

4.2 Experimento 2 (E2) ..... 4.17

4.2.1 Objetivos e Condições dos Ensaio do E2 ..... 4.17

4.2.2 Resultados dos Ensaio do E2 ..... 4.18

4.2.3 Discussão dos Resultados do E2 ..... 4.26

4.2.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriã no ..... 4.26

4.2.3.2 Determinação da Concentração Inicial de Frutose mais Adequada ao Cultivo de *A. brasiliense* sp 245 ..... 4.31

4.3 Experimento 3 (E3) ..... 4.32

4.3.1 Objetivos e Condições do E3 ..... 4.32

4.3.2 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio ..... 4.33

4.3.3 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio ..... 4.34

4.3.4 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio ..... 4.37

4.3.5 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio ..... 4.40

4.3.6 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio ..... 4.45

FD5 ..... 4.49

4.3.7 Concentrações Celulares (N) dos Ensaio do E3 ..... 4.49

4.3.8 Influência da Concentração Inicial de Frutose de Conversão e Produtividades no Cultivo de *A. brasiliense* em Fermentador ..... 4.50

4.3.9 Influência do Oxigênio Dissolvido sobre Alguns Parâmetros Fisiológicos de *A. brasiliense* sp 245 ..... 4.53

4.3.10 Comparação entre os Resultados do Cultivo Desem Fermentador, com Frutose ..... 4.60

4.4 Experimento 4 (E4) ..... 4.62

4.4.1 Objetivos e Condições dos Ensaio do E4 ..... 4.62

4.4.2 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio ..... 4.63

FCl ..... 4.63

4.4.3 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio FC2 ..... 4.67

4.4.4 Influência da Vazão Específica e da Concentração de Frutose nos Fatores de Conversão e Produtividades ..... 4.72

4.5 Parâmetros para Acompanhamento e Controle da Produção de *A. brasiliense* sp 245 em Frutose ..... 4.76

4.5.1 Absorbância ..... 4.76

4.5.2 Concentração Celular (N) e de Proteína ..... 4.79

4.5.3 Oxigênio Dissolvido e Respiração Celular ..... 4.81

4.5.4 pH e Massa de NaOH Adicionada ..... 4.82

5 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO - ENSAIOS COM GLICEROL COMO PRINCIPAL FONTE DE CARBONO ..... 5.1

5.1 Experimento 5 (E5) ..... 5.1

5.1.1 Objetivos e Condições dos Ensaios do E5 ..... 5.1

5.1.2 Resultados dos Ensaios do E5 ..... 5.2

5.1.3 Discussão dos Resultados do E5 ..... 5.2

5.1.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriano ..... 5.2

5.1.3.2 Determinação da Temperatura mais Aprimorada para o Cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em Glicerol ..... 5.23

5.2 Experimento 6 (E6) ..... 5.23

5.2.1 Objetivos e Condições dos Ensaios do E6 ..... 5.23

5.2.2 Resultados dos Ensaios do E6 ..... 5.24

5.2.3 Discussão dos Resultados do E6 ..... 5.29

5.2.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriano ..... 5.29

5.2.3.2 Determinação da Concentração de Glicerol mais Adequada ao Cultivo de *A. bra-*

5.37	<i>silense</i> sp 245 .....
5.38	5.3.1 Objetivos e Condições dos Ensaio do E7 .....
5.39	GD2 .....
5.41	5.3.3 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GD3 .....
5.43	GD4 .....
5.45	GD5 .....
5.48	5.3.6 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GD6 .....
5.51	GD7 .....
5.54	5.3.8 Concentrações Celulares Numéricas dos Ensaio do E7 .....
5.56	5.3.9 Influência da Concentração Inicial de Glicerol nos Fatores de Conversão e Produtividades no Cultivo de <i>A. brasiliense</i> em Fermentador .....
5.61	5.3.10 Influência do Oxigênio Dissolvido sobre Alguns Parâmetros Fisiológicos de <i>A. brasiliense</i> sp 245
5.65	5.3.11 Influência da Fonte de Nitrogênio no Aparecimen̄to de Duas Fases de Crescimento .....
5.67	5.3.12 Comparação entre os Resultados do Cultivo Descon̄tinuo de <i>A. brasiliense</i> sp 245 e Agitador e em Fermentador com Glicerol .....
5.70	5.4 Experimento 8 (E8) .....
5.70	5.4.1 Objetivos e Condições do Ensaio GCl .....
5.70	5.4.2 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GCl .....

5.5 Parâmetros para Acompanhamento e Controle da Produção de *A. brasiliense* sp 245 em Glicerol ..... 5.75

6 - COMPARAÇÃO ENTRE FRUTOSE E GLICEROL COMO FONTES DE CARBO-  
NO PARA O CRESCIMENTO DE *A. brasiliense* sp 245 ..... 6.1

6.1 Temperaturas mais Apropriadas e Energia de Ativação . 6.1

6.2 Influência das Concentrações Iniciais de Substrato nas Velocidades Específicas, Fatores de Conversão e Produtividades, no Processo Descontínuo ..... 6.2

6.3 Influência da Vazão Específica de Alimentação nos Fatores de Conversão e Produtividades ..... 6.8

6.4 Influência da Fonte de Carbono na Floculação ..... 6.11

6.5 Velocidades de Respiração e Conteúdo Protéico ..... 6.13

6.6 Coeficientes de Transferência de Oxigênio ..... 6.15

7 - AVALIAÇÃO ECONÔMICA PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE *A. brasiliense* sp 245 EM FRUTOSE E EM GLICEROL ..... 7.1

7.1 Objetivos e Metodologia da Avaliação ..... 7.1

7.2 Processo de Produção de Inoculantes à Base de *Azospirillum brasiliense* sp 245 ..... 7.2

7.3 Capacidade de Produção ..... 7.5

7.4 Mão-de-Obra Necessária ..... 7.6

7.5 Investimentos Necessários ..... 7.7

7.6 Custos de Produção ..... 7.9

7.6.1 Custos Fixos ..... 7.9

7.6.2 Custos Variáveis ..... 7.10

7.6.2.1 Custo de Extração e Preparo da Turfa .. 7.10

7.6.2.2 Custos da Produção de *A. brasiliense* sp 245 ..... 7.11

7.6.2.3 Custos da Mão-de-Obra ..... 7.12

7.6.2.4 Custos Variáveis Totais ..... 7.13

7.6.3 Custos Totais e Unitários de Produção ..... 7.13

7.14	7.7	Receitas Esperadas .....	7.14
7.14	7.7.1	Prego de Venda do Inoculante .....	7.14
7.15	7.7.2	Receitas Totais .....	7.15
7.16	7.8	Indicadores Económicos .....	7.16
7.17	7.9	Conclusões da Análise Económica .....	7.17
7.18	7.10	Impactos Económicos Potenciais .....	7.18
8.1	8	- CONCLUSÕES .....	8.1
R.1		REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	R.1



NOMENCLATURA

A	absorbância
C	concentração de oxigênio dissolvido (mmol/l)
D	vazão específica de alimentação ( $h^{-1}$ )
E <sub>a</sub>	energia de ativação para o crescimento (kcal/mol)
E <sub>o</sub>	energia necessária para o crescimento (kcal/mol)
G	concentração de glicerol (g/l)
K <sub>i</sub>	constante de inibição pelo substrato
K <sub>iO<sub>2</sub></sub>	constante de inibição pelo oxigênio
K <sub>Ta</sub>	coeficiente de transferência de oxigênio ( $s^{-1}$ ) ou ( $h^{-1}$ )
K <sub>O<sub>2</sub></sub>	constante de saturação em relação ao oxigênio
M	massa de NaOH adicionada (mg/l)
N	concentração celular ou concentração celular numérica (cel/l)
N <sub>i</sub>	concentração de nitrogênio inorgânico (g/l)
N <sub>r</sub>	frequência do agitador ( $min^{-1}$ ) ou ( $seg^{-1}$ )
P	concentração de proteína celular (g/l)
P <sub>G</sub>	potência aerada (W)
P <sub>N</sub>	produtividade celular numérica (cel/l.h)
P <sub>P</sub>	produtividade em proteína celular (g prot/l.h)
P <sub>X</sub>	produtividade celular massica (g/l.h)
Q <sub>ar</sub>	vazão de ar no fermentador (l/min) ou ( $m^3/s$ )
Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	velocidade específica de respiração (mmol O <sub>2</sub> /g.s)
R	constante universal dos gases perfeitos (kcal/mol OK)
S	concentração de frutose (g/l)
T	temperatura (OC)
t	tempo (h)
T <sub>a</sub>	temperatura absoluta (OK)
T <sub>max</sub>	temperatura máxima para crescimento (OC)
T <sub>min</sub>	temperatura mínima para crescimento (OC)

$t_{N_1}$  ... tempo de início do consumo do nitrogênio inorgânico (h)

V ... volume do meio de cultura ( $\ell$  ou  $m^3$ )

$V_S$  ... velocidade superficial do ar (m/s)

X ... concentração celular ou concentração de biomassa (g/ $\ell$ )

$Y_{A/B}$  ... fator de conversão da grandeza B (G, N<sub>1</sub> ou S) na grandeza

A (N, P ou X) (g/g)

$Y_{A/B}$  ... fator de conversão molar da grandeza B (G, N<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> ou S) na

grandeza A (N ou X) (g/mol)

### Letras gregas

$\alpha$  ... temperatura do "zero biológico" (°C)

$\mu$  ... velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

$\mu_{max}$  ... velocidade específica máxima de crescimento ( $h^{-1}$ )

### Índices

F ... final

J ... regime permanente

O ... inicial

### Sobrescritos

~ ... molar

LISTA DE TABELAS

VOLUME 2

TABELA Nº	TÍTULO	PÁGINA
4.1	Temperaturas em que foram realizados os en-	4.1
4.2	saios do EI ..... Resultados do ensaio FSI (Experimento 1 -	4.2
4.3	T = 34°C) ..... Resultados do ensaio FS7 (Experimento 1 -	4.3
4.4	T = 34 °C) ..... Resultados do ensaio FS11 (Experimento 1 -	4.4
4.5	T = 30 °C) ..... Resultados do ensaio FS12 (Experimento 1 -	4.5
4.6	T = 32 °C) ..... Resultados do ensaio FS13 (Experimento 1 -	4.6
4.7	T = 36 °C) ..... Resultados do ensaio FS14 (Experimentos 1 e	4.7
4.8	2 - T = 38 °C) ..... Resultados do ensaio FS15 (Experimento 1 -	4.8
4.9	T = 40 °C) ..... Resultados do ensaio FS16 (Experimento 1 -	4.9
4.10	T = 42 °C) ..... Resultados do ensaio FS23 (Experimentos 1 e	4.10
4.11	2 - T = 38 °C) ..... Tempo total de crescimento, valores ini-	4.11

4.12	Tempo para início do crescimento exponencial, velocidade específica máxima de crescimento, fatores de conversão de frutose e nitrogênio inorgânico em células e produtividade segundo a temperatura de cultivo (Experimento 1)	4.13
4.13	Concentrações iniciais de frutose e de extrato de levedura em que foram realizados os ensaios do E2	4.18
4.14	Resultados do ensaio FS17 (Experimento 2)	4.19
4.15	Resultados do ensaio FS18 (Experimento 2)	4.20
4.16	Resultados do ensaio FS19 (Experimento 2)	4.21
4.17	Resultados do ensaio FS20 (Experimento 2)	4.22
4.18	Resultados do ensaio FS21 (Experimento 2)	4.23
4.19	Resultados do ensaio FS24 (Experimento 2)	4.24
4.20	Resultados do ensaio FS29 (Experimento 2)	4.25
4.21	Tempo total de crescimento, valores iniciais e finais de pH, concentração celular, de frutose, de nitrogênio inorgânico para os ensaios do experimento 2	4.27
4.22	Tempo para início do crescimento exponencial, velocidade específica máxima de crescimento, fatores de conversão de frutose e nitrogênio inorgânico em células e produtividade segundo a concentração inicial	

4.30	Frutose (Experimento 2) .....	4.30
4.23	Condições dos ensaios do E3 .....	4.23
4.24	Resultados do ensaio FD1 (Experimento 3) ..	4.24
4.25	Resultados do ensaio FD2 (Experimento 3) ..	4.25
4.26	Resultados do ensaio FD3 (Experimento 3) ..	4.26
4.27	Resultados do ensaio FD4 (Experimento 3) ..	4.27
4.28	Resultados da aplicação do método dinâmico para determinação de $K_L a$ e $QO_2$ ao cultivo de <i>A. brasiliense</i> sp 245 em frutose. Ensaio FD4 (Experimento 3) .....	4.28
4.29	Concentração celular, vazão de ar, demanda total de oxigênio e velocidade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio ao longo do ensaio FD4 (Experimento 3) ..	4.29
4.30	Resultados do ensaio FD5 (Experimento 3) ..	4.30
4.31	Concentração celular, demanda total de oxigênio, velocidade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio ao longo do ensaio FD5 (Experimento 3) ..	4.31
4.32	Concentrações celulares ( $N, X$ ) e de proteína celular (P) para as amostras finais dos ensaios do E3 e do FS 29 .....	4.32
4.33	Tempo final de crescimento, concentrações - iniciais e finais de células, frutose, nitrogênio inorgânico e proteína para os ensaios do E3 .....	4.33
4.34	Tempo para início da fase exponencial, velocidade .....	4.34



5.16	Tempo total de crescimento, valores iniciais	5.12
5.15	Resultados do ensaio ES6 (Experimento 5 - T = 30°C)	5.12
5.14	Resultados do ensaio ES5 (Experimento 5 - T = 32°C)	5.12
5.13	Resultados do ensaio ES4 (Experimento 5 - T = 40°C)	5.12
5.12	Resultados do ensaio ES3 (Experimento 5 e 6, T = 36°C)	5.11
5.11	Resultados do ensaio ES2 (Experimento 5 - T = 36°C)	5.11
5.10	Resultados do ensaio ES1 (Experimento 5 - T = 38°C)	5.11
5.9	Resultados do ensaio GS20 (Experimentos 5 e 6 - T = 36°C)	5.10
5.8	Resultados do ensaio GS17 (Experimento 5 - T = 30°C)	5.9
5.7	Resultados do ensaio GS11 (Experimentos 5 e 6 - T = 36°C)	5.8
5.6	Resultados do ensaio GS9 (Experimento 5 - T = 38°C)	5.7
5.5	Resultados do ensaio GS6 (Experimento 5 - T = 38°C)	5.6
5.4	Resultados do ensaio GS5 (Experimento 5 - T = 32°C)	5.5
5.3	Resultados do ensaio GS4 (Experimento 5 - T = 40°C)	5.4
5.3	Resultados do ensaio GS4 (Experimento 5 - T = 34°C)	5.3

TABELA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

TABELA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

5.18	ensaios com glicerol do experimento 5 .....	5.18
5.17	Início das fases exponenciais de crescimento, velocidades específicas máximas, fatores de conversão e produtividade para os en- saios com glicerol do experimento 5 .....	5.17
5.19	Tempo total de crescimento, concentrações iniciais e finais de células e nitrogênio inorgânico, tempo para início da fase exponencial, velocidade específica máxima de crescimento, e produtividade para os ensaios com extrato de levedura como fonte de carbono do experimento 5 .....	5.19
5.19	Concentrações iniciais de glicerol e de extrato de levedura em que foram realizados os ensaios do E6 .....	5.19
5.20	Resultados do ensaio GS13 (Experimento 6) .	5.20
5.21	Resultados do ensaio GS14 (Experimento 6) .	5.21
5.22	Resultados do ensaio GS15 (Experimento 6) .	5.22
5.23	Resultados do ensaio GS16 (Experimento 6) .	5.23
5.24	Resultados do ensaio GS19 (Experimento 6) .	5.24
5.25	Tempo total de crescimento, valores iniciais e finais de pH, e das concentrações de células, glicerol e nitrogênio inorgânico para os ensaios do experimento 6 .....	5.25
5.26	Tempo para início das fases exponenciais de crescimento, velocidades específicas máxi-	5.26



5.32	Concentração celular, porcentagem de O <sub>2</sub> dissolvido, demanda total de oxigênio, velocidade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio durante o ensaio G5 (Experimento 7) .....	5.47
5.31	Concentração celular, de glicérol, de nitrogênio inorgânico, de proteína celular, absorbância, massa de NaOH adicionada e % de oxigênio dissolvido durante o ensaio G5 (Experimento 7) .....	5.46
5.30	Concentração celular, de glicérol, de nitrogênio inorgânico, de proteína celular, absorbância, massa de NaOH adicionada e % de oxigênio dissolvido durante o ensaio G4 (Experimento 7) .....	5.44
5.29	Concentração celular, de glicérol, de nitrogênio inorgânico, de proteína celular, absorbância, massa de NaOH adicionada, % de oxigênio dissolvido durante o ensaio G3 (Experimento 7) .....	5.42
5.28	Concentração celular, de glicérol, de nitrogênio inorgânico, de proteína celular, absorbância, massa de NaOH adicionada, % de oxigênio dissolvido durante o ensaio G2 (Experimento 7) .....	5.40
5.27	Condições dos ensaios do E7 .....	5.39
5.31	para os ensaios do experimento 6 .....	5.31
ma, fatores de conversão e produtividades -		

TABELA Nº	TÍTULO	PÁGINA
5.33	Concentração celular, de glicérol, de nítr̄o gênio inorgânico, de proteína celular, ab-sorbância, pH e % de oxigênio dissolvido , durante o ensaio GD6 (Experimento 7) .....	5.49
5.34	Concentração celular, porcentagem de O <sub>2</sub> dis-solvido, demanda total de oxigênio, veloci-dade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio durante o en-saio GD6 (Experimento 7) .....	5.50
5.35	Concentração celular, de glicérol, de nítr̄o gênio inorgânico, de proteína celular, ab-sorbância, pH e % de oxigênio dissolvido, du-rante o ensaio GD7 (Experimento 7) .....	5.52
5.36	Concentração celular, porcentagem de O <sub>2</sub> dis-solvido, demanda total de oxigênio, veloci-dade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio durante o en-saio GD7 (Experimento 7) .....	5.53
5.37	Concentrações celulares e de proteína celu-lar para algumas amostras de ensaios do E7 e do GS19 .....	5.54
5.38	Tempo total de crescimento, concentrações - iniciais e finais de células, glicérol, ní-trogênio inorgânico e proteína celular e concentração celular numérica final para os ensaios do experimento 7 .....	5.57
5.39	Fatores de conversão e produtividades para	

TABELA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

(P<sub>G</sub>/V) em cultivos de *A. brasiliense* sp 245

em frutose ou glicerol .....

7.1 Condições de processo e resultados espera-

dos para a produção de *A. brasiliense* sp 245

em diversas alternativas .....

7.2 Capacidade de produção de 2 reatores em

3.600 h de trabalho segundo as alternativas

propostas .....

7.3 Estimativa de mão-de-obra necessária para

uma unidade de produção de inoculantes. (Em

parênteses os números para o processo B) ..

7.4 Equipamentos necessários para a produção de

inoculantes à base de *A. brasiliense* sp 245.

7.5 Custos fixos anuais para a produção de inc-

culantes à base de *A. brasiliense* sp 245 se-

gundo os processos alternativos .....

7.6 Custos dos meios de cultura para a produçã

de *A. brasiliense* sp 245 nos processos alter

7.7 Custos de utilidades para diversas alterna-

tivas de produção de *A. brasiliense* sp 245 .

7.8 Custos de mão-de-obra variável para as al-

ternativas de produção de *A. brasiliense* sp

245 .....

7.9 Custos variáveis anuais da produção de ino

culantes à base de *A. brasiliense* sp 245

(Custos em 10<sup>3</sup> CZ\$) .....

7.13

7.13

7.12

7.11

7.9

7.8

7.7

7.6

7.4

6.16

7.10	Custos totais e unitários de produção de inoculantes à base de A. brasilense sp 245 segundo as alternativas de processo propostas e incidências percentuais dos itens sobre o custo. (Custos em 10 <sup>3</sup> CZ\$) .....	7.14
7.11	Receitas brutas, despesas operacionais e com imposto de renda e lucro líquido em três alternativas* de produção de inoculantes à base de A. brasilense sp 245 (Valores em 10 <sup>3</sup> CZ\$) .....	7.16
7.12	Indicadores econômicos para três alternativas de produção de inoculantes à base de A. brasilense sp 245 .....	7.16

LISTA DE FIGURAS

VOLUME 2

FIGURA Nº	TÍTULO	PÁGINA
4.1	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FSI (Ex-perimento 1) .....	4.3
4.2	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS7 (Ex-perimento 1) .....	4.4
4.3	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS11 (Ex-perimento 1) .....	4.5
4.4	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS12 (Ex-perimento 1) .....	4.6
4.5	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS13 (Ex-perimento 1) .....	4.7
4.6	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS14 (Ex-perimento 1) .....	4.8

4.7	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS15 (Ex-perimento 1) .....	4.9
4.8	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS16 (Ex-perimento 1) .....	4.10
4.9	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS23 (Ex-perimentos 1 e 2) .....	4.11
4.10	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para diferentes temperaturas (Ex-perimento 1) .....	4.14
4.11	Valores de $\mu_{max}$ , $P_X$ , $Y_{X/S}$ e $Y_{X/Ni}$ segundo a temperatura de cultivo para os ensaios do experimento 1 .....	4.15
4.12	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS17 (Ex-perimento 2) .....	4.19
4.13	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS18 (Ex-perimento 2) .....	4.20
4.14	Valores de pH, concentração celular (X) e concentração de frutose (S) e nitrogênio	

4.15	Valores de pH, concentração celular (X) e concentrações de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS19 (Ex perimento 2) .....	4.21
4.16	Valores de pH, concentração celular (X) e concentrações de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS20 (Ex perimento 2) .....	4.22
4.17	Valores de pH, concentração celular (X) e concentrações de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS24 (Ex perimento 2) .....	4.24
4.18	Valores de pH, concentração celular (X) e concentrações de frutose (S) e nitrogênio inorgânico (Ni) ao longo do ensaio FS29 (Ex perimento 2) .....	4.25
4.19	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para diferentes concentrações iniciais de frutose. Experimento 2 .....	4.29
4.20	Valores de $\mu_{max}$ , $P_X$ , $Y_{X/S}$ e $Y_{X/Ni}$ segundo a concentração inicial de frutose. Experimento 2 .....	4.30
4.21	Concentração celular (X), concentração de frutose (S) e de nitrogênio inorgânico (Ni) e porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio FDI (Experimento 3) .....	4.35

4.22 Concentração celular (X), concentração de frutose (S), de proteína celular (P), e de nitrogênio inorgânico (Ni) e porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio FD2 (Experimento 3) .....

4.23 Concentração celular (X), concentrações de frutose (S), de proteína celular (P) e de nitrogênio inorgânico (Ni) e porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio FD3 (Experimento 3) .....

4.24 Concentração celular (X), concentrações de frutose (S), de proteína celular (P) e de nitrogênio inorgânico (Ni) e porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio FD4 (Experimento 3) .....

4.25 Aplicação do método dinâmico para cálculo de  $QO_2$  e  $k_{La}$  em diversos instantes do ensaio FD4 (Experimento 3) .....

4.26 Concentração celular (X), porcentagem de oxigênio dissolvido, velocidade específica de respiração ( $QO_2$ ), demanda total de oxigênio ( $QO_2 \cdot X$ ) e coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) ao longo do ensaio FD4 (Experimento 3) .....

4.27 Concentração celular (X), concentrações de frutose (S), proteína celular (P) e de nitrogênio inorgânico (Ni) e porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio FD5 (Experimento 3) .....

4.46



FIGURA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

4.28	Concentração celular (X), velocidade especí- fica de respiração ( $\text{O}_2$ ), demanda total de oxigênio ( $\text{O}_2 \cdot X$ ) e coeficiente de transfe- rência de oxigênio ( $k_{La}$ ) ao longo do ensaio FD5 (Experimento 3) .....	4.48
4.29	Concentração celular (X) em função do tempo de cultivo para os ensaios do experimento 3	4.52
4.30	Influência de $S_0$ na concentração celular $\bar{X}$ nal (N), nas produtividades, nos fatores de conversão e na velocidade específica máxima de crescimento de <i>A. brasiliense</i> sp 245 a 38 °C (Experimento 3) .....	4.53
4.31	Porcentagem de proteína celular (% P) e de oxigênio dissolvido (% $\text{O}_2$ ) ao longo dos en- saios do E3 .....	4.57
4.32	Variação de $\text{O}_2$ com a tensão de oxigênio dissolvido ( $\text{pO}_2$ ) para as cepas Cd (a) e Sp 245 (b) .....	4.57
4.33	Comparação entre resultados de cultivos	4.61
4.34	de <i>A. brasiliense</i> sp 245 com frutose .....	4.61
4.35	Concentração celular (X), concentrações de frutose (S), de nitrogênio inorgânico (Ni) e proteína celular (P) para o cultivo conti- nuo de <i>A. brasiliense</i> sp 245 no ensaio FC2	4.65

5.5	Valores de pH, concentração celular (X), con- centrações de glicérol (G) e nitrogênio inor- gânico (Ni) ao longo do ensaio GS9 (Experi- mento 5) .....	5.7
5.6	Valores de pH, concentração celular (X), con- centrações de glicérol (G) e nitrogênio inor- gânico (Ni) ao longo do ensaio GS11 (experi- mento 5 e 6) .....	5.8
5.7	Valores de pH, concentração celular (X), con- centrações de glicérol (G) e nitrogênio inor- gânico (Ni) ao longo do ensaio GS17 (Experi- mento 5) .....	5.9
5.8	Valores de pH, concentração celular (X), con- centrações de glicérol (G) e nitrogênio inor- gânico (Ni) ao longo do ensaio GS20 (Experi- mentos 5 e 6) .....	5.10
5.9	Concentração celular (X,••) e concentração de nitrogênio inorgânico (Ni,••) durante o crescimento de <i>A. brasiliense</i> em extrato de levedura, em diferentes temperaturas (Expe- rimento 5) .....	5.13
5.10	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para ensaios com glicérol do expe- rimento 5 .....	5.16
5.11	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para ensaios com glicérol do expe- rimento 5 .....	5.16
5.12	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para ensaios com glicérol do expe- rimento 5 .....	5.16

5.17	5	incubação para os ensaios com extrato de levedura como fonte de carbono do experimento
5.13	5	Valores de $\mu_{max}$ , $P_x$ , $Y_{X/G}$ e $Y_{X/N}$ segundo a temperatura de cultivo para os ensaios com glicérol do experimento 5
5.20	5	Valores de $\mu_{max}$ e $P_x$ segundo a temperatura de cultivo para os ensaios com extrato de levedura do experimento 5
5.14	5	Valores de $\mu_{max}$ e $P_x$ segundo a temperatura de cultivo para os ensaios com extrato de levedura do experimento 5
5.15	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS13 (Experimento 6)
5.25	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS14 (Experimento 6)
5.16	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS15 (Experimento 6)
5.17	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS16 (Experimento 6)
5.18	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS17 (Experimento 6)
5.28	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS18 (Experimento 6)
5.19	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS19 (Experimento 6)
5.30	6	Valores de pH, concentração celular (X), concentração de glicérol e de nitrogênio inorgânico ao longo do ensaio GS20 (Experimento 6)

FIGURA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

5.20	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para os ensaios GS11, GS13 e GS14 (Experimento 6) .....	5.33
5.21	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para os ensaios GS15 e GS16 (Experimento 6) .....	5.34
5.22	Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para o ensaio GS19 (Experimento 6) .....	5.35
5.23	Valores de $\mu_{max}$ , $P_X$ , $Y_{X/G}$ e $Y_{X/N_2}$ segundo a concentração inicial de glicérol. (Experimento 6) .....	5.36
5.24	Concentração celular (X), de glicérol (G), de nitrogênio inorgânico (N <sub>i</sub> ) e de proteína celular e % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD2 (Experimento 7) .....	5.40
5.25	Concentração de células, de glicérol, de N <sub>i</sub> , trogênio inorgânico e de proteína celular, % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD3 (Experimento 7) .....	5.42
5.26	Concentração de células, de glicérol, de N <sub>i</sub> , trogênio inorgânico e de proteína celular e % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD4 (Experimento 7) .....	5.44
5.27	Concentração de células, de glicérol, de N <sub>i</sub> , trogênio inorgânico e de proteína celular e % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD5 (Experimento 7) .....	5.46

5.28	Concentração celular, % $O_2$ dissolvido, demanda global de oxigênio, velocidade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio ao longo do ensaio GD5 (Experimento 7) .....	5.35
5.29	Concentração celular, de glicerol, de nitrogênio inorgânico e de proteína celular e % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD6 (Experimento 7) .....	5.34
5.30	Concentração celular, % de $O_2$ dissolvido, demanda global de oxigênio, velocidade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio ao longo do ensaio GD6 (Experimento 7) .....	5.33
5.31	Concentração de células, de glicerol, de nitrogênio inorgânico e de proteína celular e % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD7 (Experimento 7) .....	5.32
5.47	Concentração celular, de glicerol, de nitrogênio inorgânico e de proteína celular e % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD5 (Experimento 7) .....	5.58
5.49	Concentração celular, % de $O_2$ dissolvido, demanda global de oxigênio, velocidade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio ao longo do ensaio GD6 (Experimento 7) .....	5.58
5.50	Concentração de células, de glicerol, de nitrogênio inorgânico e de proteína celular e % de oxigênio dissolvido ao longo do ensaio GD7 (Experimento 7) .....	5.53
5.52	Concentração de células, % de $O_2$ dissolvido, demanda global de oxigênio, velocidade específica de respiração e coeficiente de transferência de oxigênio ao longo do ensaio GD7 (Experimento 7) .....	5.58
5.53	Concentração celular segundo o tempo de cultivo para ensaios do experimento 7 .....	5.58
5.54	Concentração celular segundo o tempo de cultivo, para o ensaio GD6 (Experimento 7) .....	5.58
5.55	Valores de $X', N', H_{max}, Y_{X/G}, Y_{X/N}, P_X$ e $P_N$	5.58

5.36	segundo a concentração inicial de glicérol para os ensaios do experimento 7 .....	5.60
5.36	Porcentagem de proteína (% P), de oxigênio dissolvido (% $O_2$ ) e velocidade específica de consumo de $O_2$ ( $QO_2$ ) ao longo dos ensaios do E7 .....	5.62
5.37	Comparação entre resultados de cultivos de <i>A. brasiliense</i> sp 245 em glicérol .....	5.68
5.38	Concentração celular (X), concentração de glicérol (G) e de nitrogênio inorgânico (Ni) para o cultivo contínuo de <i>A. brasiliense</i> sp 245 (Experimento 8) .....	5.73
5.39	Concentração celular (X), de glicérol e de nitrogênio inorgânico, fatores de conversão e produtividade para os regimes permanentes do ensaio G1 (Experimento 8) .....	5.74
6.1	Determinação da energia de ativação para o crescimento de <i>A. brasiliense</i> em diversos substratos .....	6.2
6.2	Concentrações e produtividades celulares e velocidades específicas de crescimento para os cultivos em processo descontínuo, em fermentador com frutose e glicérol .....	6.5
6.3	Fatores de conversão molares para os cultivos em processo descontínuo, em fermentador, com frutose e glicérol .....	6.6
6.4	Concentrações e produtividades celulares e	

7.1	Diagrama de blocos para a produção de inoculantes à base de <i>A. brasiliense</i> sp 245 .....	7.1
6.5	Correlação de Riet aplicada ao cultivo de <i>A. brasiliense</i> sp 245 em frutose ou em glicose .....	6.16
6.10	Fatores de conversão para cultivos contínuos com frutose e glicose .....	6.10

4.1 Experimento 1 (E1)

4.1.1 Objetivos e Condições do E1

O principal objetivo do E1 foi determinar a temperatura mais apropriada para a produção industrial de *A. brasiliense* sp 245 com frutose como fonte de carbono.

A tabela 4.1 apresenta as temperaturas em que foram realizados os ensaios do E1. O meio de cultura utilizado nos ensaios do E1 tinha a composição descrita no item 3.2.5, a não ser nos ensaios FS1 e FS23 onde não foi adicionado extrato de levedura. Todos os ensaios foram realizados em incubador rotativo a 200rpm.

Tabela 4.1 Temperaturas em que foram realizados os ensaios do E1.

Ensaio	Temperatura (°C)
FS11	30
FS12	32
FS1*, FS7	34
FS13	36
FS14, FS23*	38
FS15	40
FS16	42

\* sem extrato de levedura.



O desenvolvimento de *A. brasiliense* sp 245 utilizando frutose como principal fonte de carbono apresentou-se bem caracterizado em todos os ensaios do E1.

Tomando como exemplo, sem perda de generalidade, o ensaio FSI (tabela 4.2 e figura 4.1) pôde-se observar uma fase inicial de adaptação ("lag") em que todas as grandezas medidas mantiveram-se constantes; decorrido esse período (variável de acordo com a temperatura, cf. tabela 4.12) as células iniciavam uma fase de aumento da concentração celular que era acompanhada, muito de perto, pelo decréscimo da concentração de frutose e de nitrogênio inorgânico: essa fase de crescimento (que foi exponencial em todos os casos, cf. figura 4.10) terminava quando uma das duas concentrações (S ou NI) tornava-se limitante. O pH da cultura mantinha-se constante até perto da metade da fase exponencial de crescimento e, em seguida decrescia em resposta à liberação de íons fosfato pelo consumo de amônia.

Deve-se salientar que nos ensaios a 38, 40 e 42°C, foi observada a formação de flocos, sendo que ela foi mais intensa quanto maior a temperatura. Esse é um comportamento pouco usual, pois muitos agregados microbianos se desfazem com o aumento da temperatura |005|.

#### 4.1.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriano

#### 4.1.3 Discussão dos Resultados do E1

São apresentadas em ordem cronológica nas tabelas 4.2 a 4.10 e nas figuras 4.1 a 4.9 os resultados dos ensaios do E1.

#### 4.1.2 Resultados dos Ensaios do E1

Tabela 4.2 - Resultados do ensaio FSL. (Experimento 1 - T=34°C).

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	N <sub>2</sub> (g/L)	A	pH
0,0	0,15	5,24	0,26	0,01	6,95
10,0	0,13	5,40	0,25	0,14	6,90
11,0	-	-	-	0,18	6,95
12,0	0,16	5,20	0,24	0,21	6,90
13,0	-	-	-	0,19	6,90
14,0	0,16	5,13	0,24	0,22	6,90
15,0	-	-	-	0,27	6,80
16,0	0,25	5,08	0,23	0,33	6,85
17,0	-	-	-	0,44	6,75
18,0	0,66	4,55	0,21	0,48	6,75
19,0	-	-	-	0,48	6,75
20,0	0,70	4,56	0,20	0,53	6,70
21,0	-	-	-	0,62	6,70
22,0	0,78	4,30	0,17	0,71	6,60
23,0	-	-	-	1,36	6,30
24,0	-	-	-	1,63	6,00
25,0	1,80	1,66	0,02	2,25	5,35
26,0	-	-	-	2,31	5,30
26,5	2,21	0,89	0,01	2,42	4,70

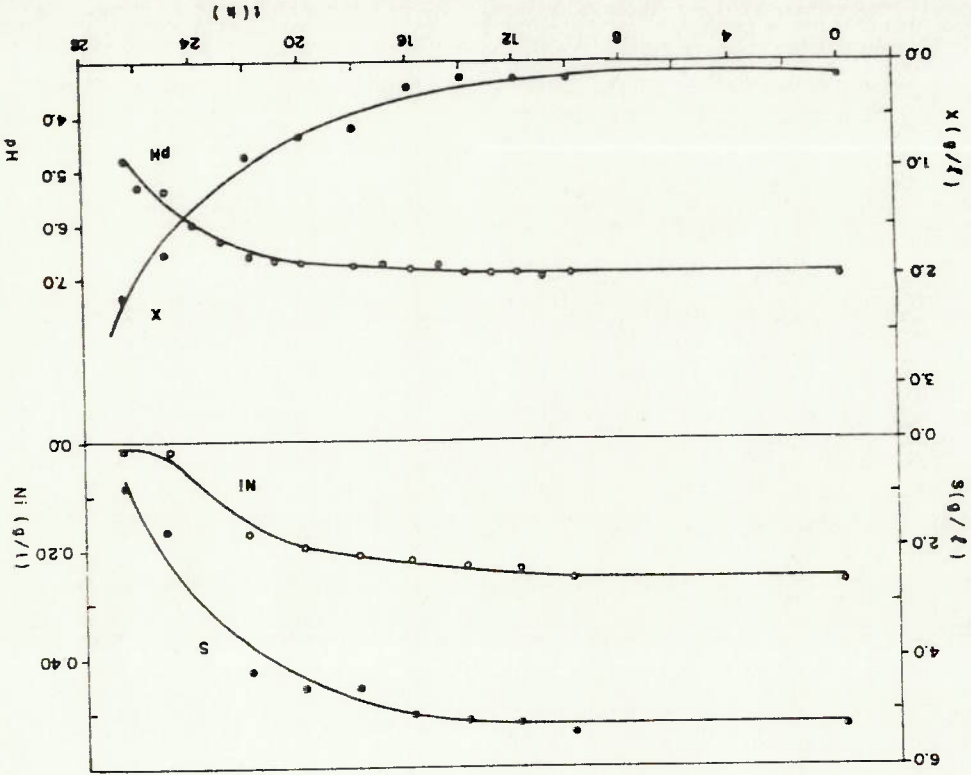


FIGURA 4.1 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FSL. (EXPERIMENTOS 1 E 2)

Tabela 4.3 - Resultados do ensaio FS7. (Experimento 1 - T=34°C).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	N <sub>2</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,09	4,96	0,24	0,01	7,10
3,0	0,10	5,10	0,23	0,04	7,10
5,0	0,08	4,95	0,22	0,09	7,05
7,0	0,16	4,98	0,23	0,18	7,00
9,0	0,34	4,49	0,21	0,39	6,90
11,0	0,67	4,01	0,19	0,68	6,80
12,5	0,92	3,88	0,17	0,92	6,75
14,0	1,61	1,55	0,12	1,49	6,50
15,5	2,18	1,43	0,06	2,50	6,15
17,0	2,84	0,34	0,09	3,25	4,75
18,0	2,98	0,15	0,08	3,36	4,65

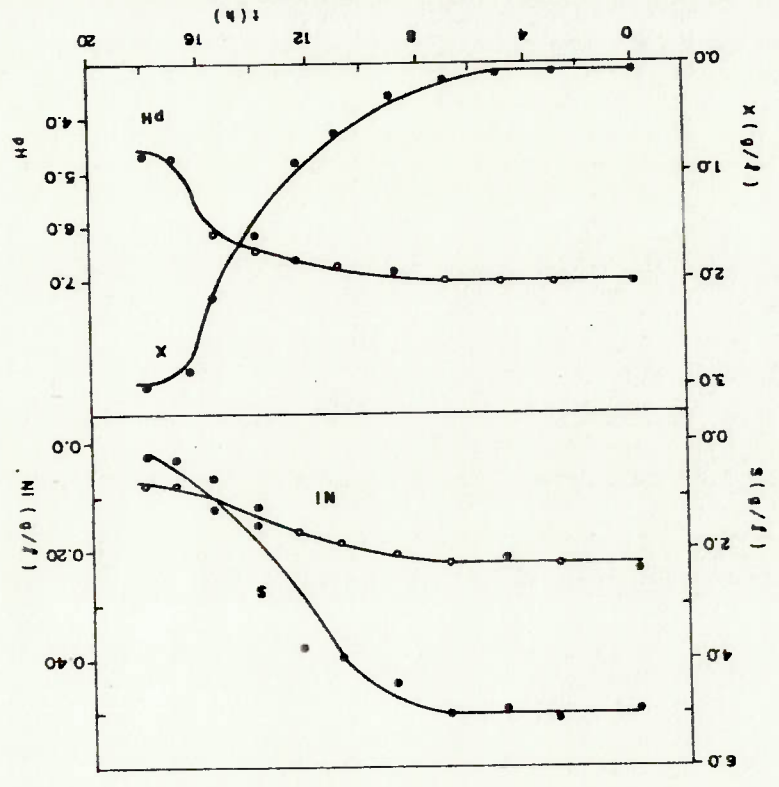


FIGURA 4.2 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS7 (EXPERIMENTO 1)

Tabela 4.3 - Resultados do ensaio FST. (Experimento 1 - T=34°C).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	N <sub>I</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,09	4,96	0,24	0,01	7,10
3,0	0,10	5,10	0,23	0,04	7,10
5,0	0,08	4,95	0,22	0,09	7,05
7,0	0,16	4,98	0,23	0,18	7,00
9,0	0,34	4,49	0,21	0,39	6,90
11,0	0,67	4,01	0,19	0,68	6,80
12,5	0,92	3,88	0,17	0,92	6,75
14,0	1,61	1,55	0,12	1,49	6,50
15,5	2,18	1,43	0,06	2,50	6,15
17,0	2,84	0,34	0,09	3,25	4,75
18,0	2,98	0,15	0,08	3,36	4,65

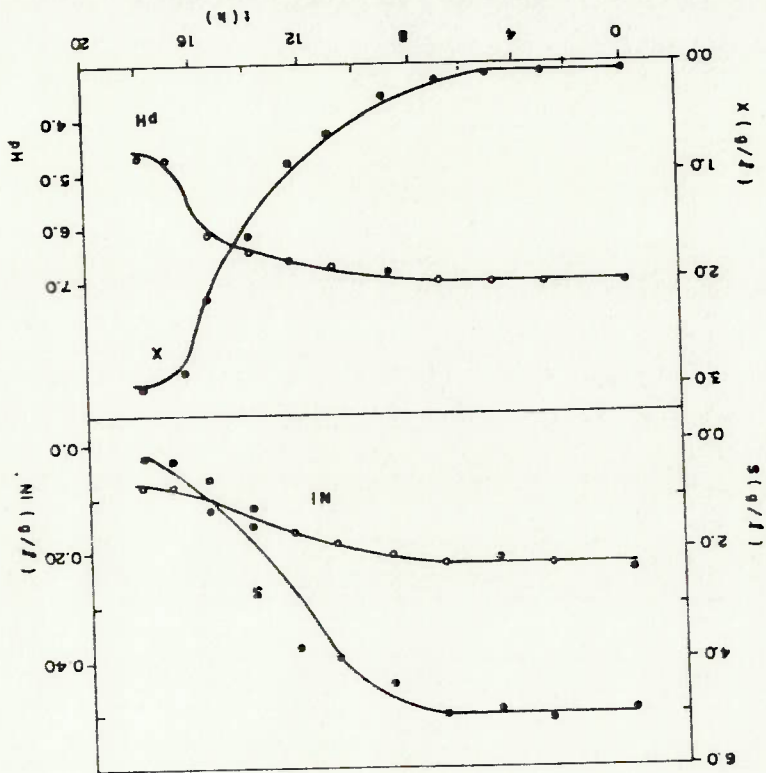


FIGURA 4.2 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E MITOGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FST (EXPERIMENTO 1)

Tabela 4.4 - Resultados do ensaio FS11. (Experimento 1 - T=30°C).

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	N <sub>2</sub> (g/L)	A	pH
0,0	0,07	5,28	0,25	0,01	6,85
3,0	0,14	5,21	0,26	0,03	6,75
5,0	0,16	4,99	0,24	0,04	6,75
7,5	0,17	5,03	0,25	0,07	6,75
9,5	-	4,81	0,25	0,16	6,70
11,5	-	-	-	0,30	6,70
13,0	0,72	4,64	0,22	0,47	6,60
15,0	-	-	-	0,78	6,40
16,5	1,20	3,25	0,16	1,33	6,20
18,5	-	-	-	2,10	5,50
19,0	2,42	1,25	0,07	2,40	5,05
21,0	2,20	1,09	0,06	2,90	4,10

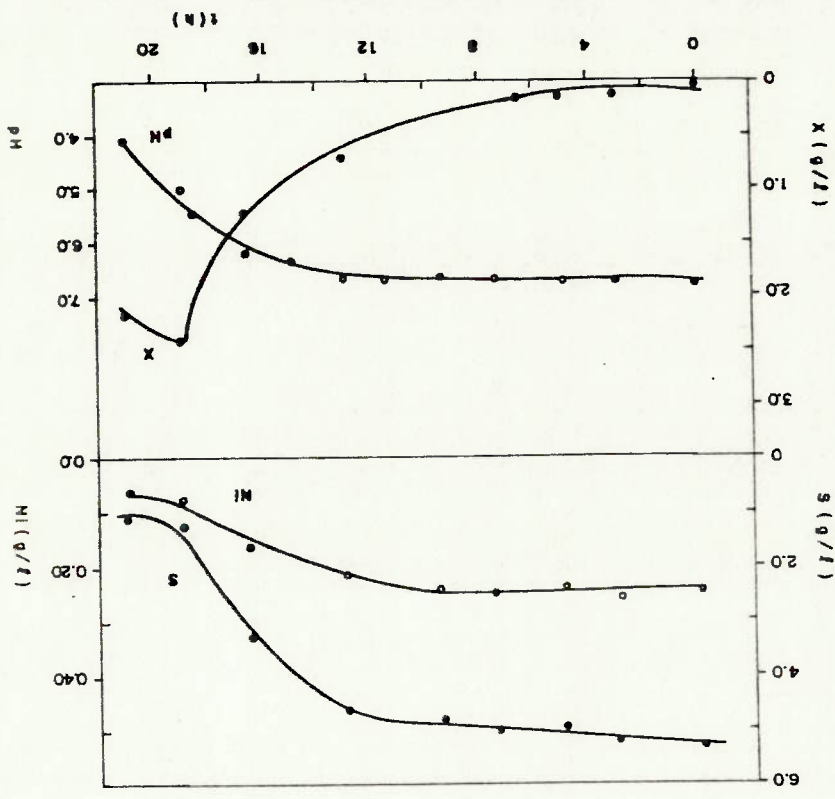


FIGURA 4.3 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E MITOGÊNIO IMOBILIZADO (MI) AO LONGO DO ENSAIO FS11 (EXPERIMENTO 1)

Tabela 4.5 - Resultados do ensaio FS12. (Experimento 1 - T=32°C).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	N <sub>2</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,15	5,40	0,26	0,02	6,80
3,0	0,18	5,46	0,26	0,04	6,70
5,0	0,15	5,09	0,24	0,06	6,70
7,5	0,28	4,97	0,24	0,15	6,70
9,5	-	4,58	0,23	0,52	6,60
12,0	0,83	3,16	-	0,68	6,55
14,0	-	-	-	1,08	6,35
15,0	1,47	3,03	0,16	1,32	6,20
17,0	-	-	-	2,38	5,40
18,0	2,57	1,40	0,06	2,63	4,25
20,0	2,58	1,16	0,06	3,10	4,00

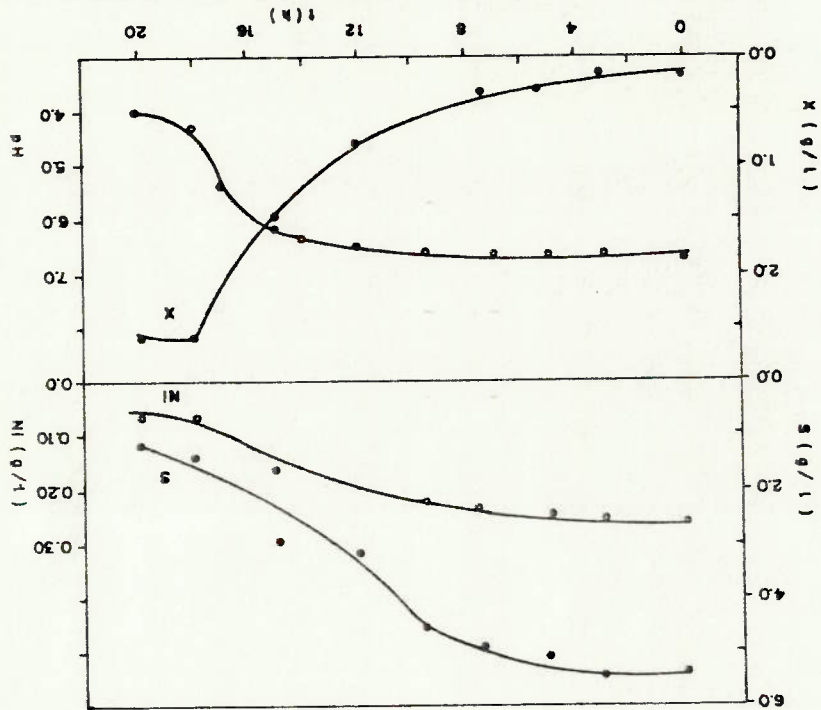


FIGURA 4.4 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS12 (EXPERIMENTO 1)

Tabela 4.6 - Resultados do ensaio FS13. (Experimento 1 - T=36°C).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	N <sub>I</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,14	5,28	0,25	0,03	6,90
4,0	0,13	5,13	0,23	0,14	6,90
7,0	0,51	4,65	0,22	0,51	6,70
9,5	1,24	3,49	0,16	1,46	6,45
11,5	1,85	2,63	0,10	2,30	6,15
13,0	2,48	0,66	0,05	2,83	5,45
14,0	2,75	0,21	0,03	3,09	4,25
15,5	2,69	0,09	0,02	3,06	4,25

Observada floculação a partir das 13,0h de cultivo

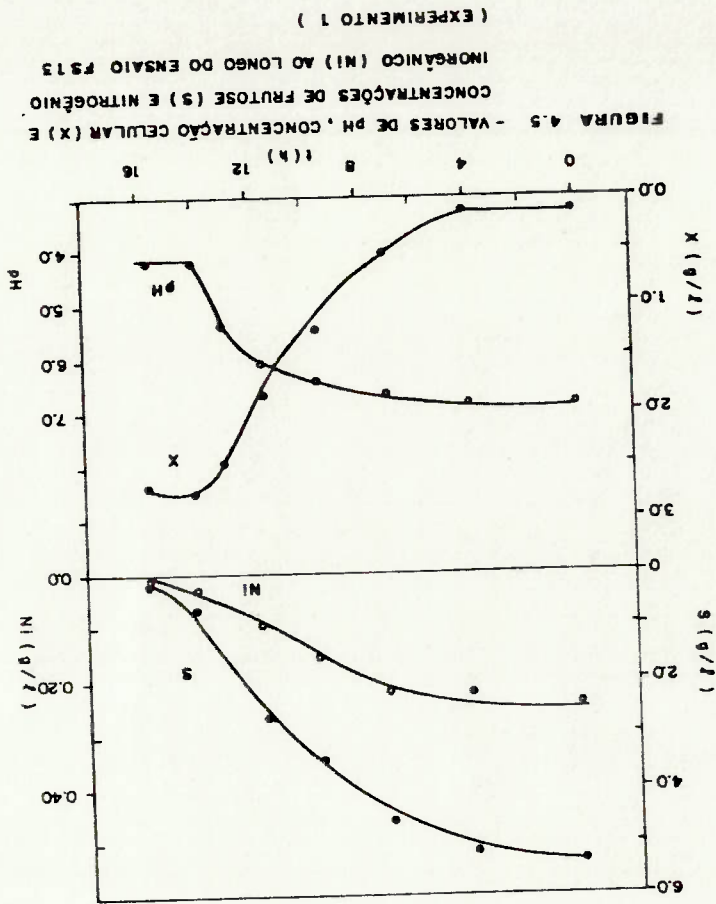


FIGURA 4.5 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS13 (EXPERIMENTO 1)

Tabela 4.7 - Resultados do ensaio FS14. (Experimentos 1 e 2 - T=38°C).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	N <sub>2</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,11	5,21	0,25	0,04	6,95
4,0	0,11	4,84	0,24	0,15	6,90
7,0	0,46	4,81	0,22	0,48	6,65
9,5	1,61	2,95	0,14	1,91	6,20
11,5	2,16	1,67	0,09	2,57	6,00
13,0	2,48	0,69	0,04	2,91	5,10
14,0	2,82	0,09	0,03	3,20	4,30
15,5	2,80	0,11	0,03	2,95	4,75

Observada floculação a partir das 13h de cultivo

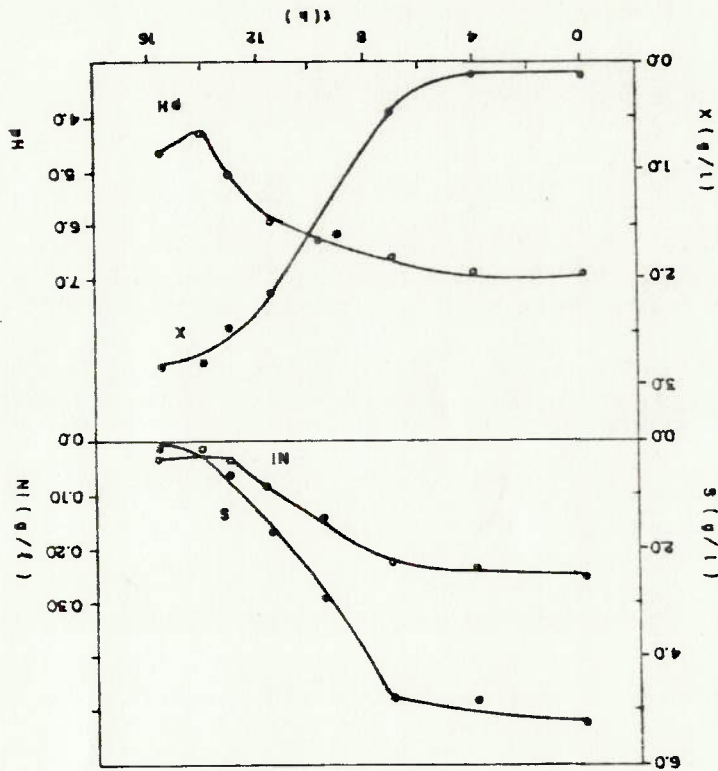
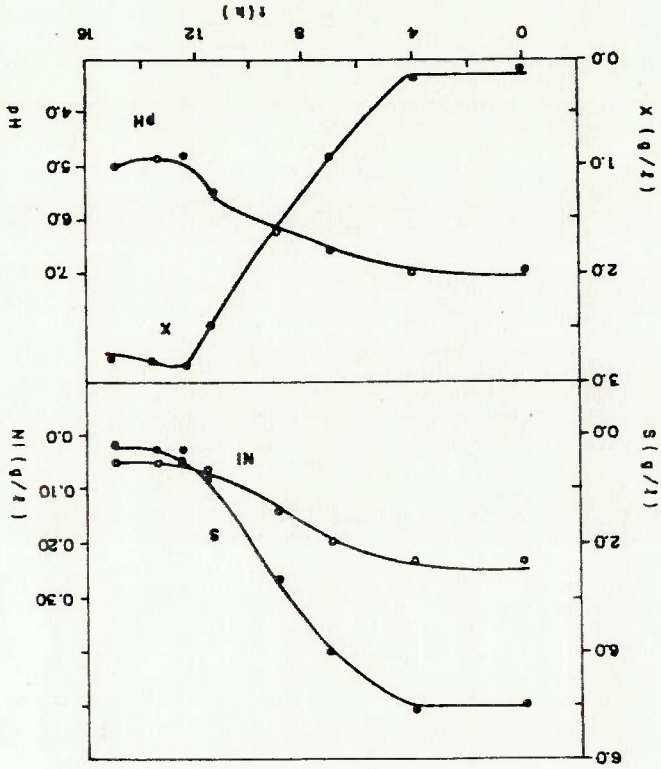


FIGURA 4.6 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR(X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS14 (EXPERIMENTOS 1 E 2)



FIGURA 4.7 - VALORES DE PH, CONCENTRAÇÃO CELULAR  
 NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO  
 ENSAIO FS15 (EXPERIMENTO 1)  
 (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E

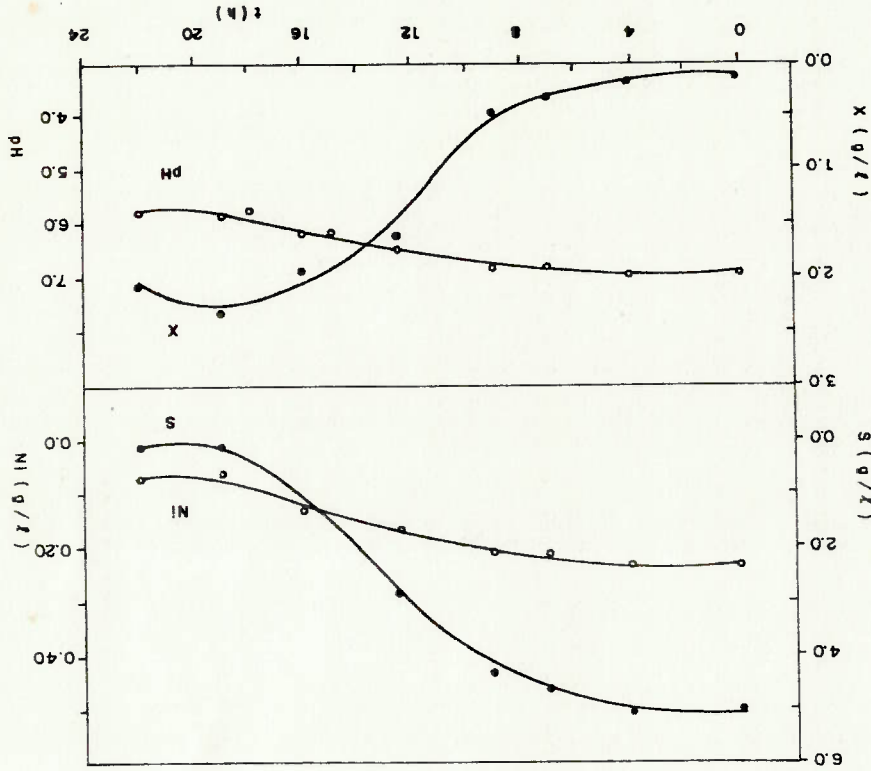


t (h)	X (g/L)	S (g/L)	NI (g/L)	A	pH
0,0	0,08	4,93	0,23	0,05	6,95
4,0	0,14	5,09	0,23	0,14	7,00
7,0	0,84	4,02	0,19	0,68	6,60
9,0	1,62	2,69	0,15	1,88	6,30
11,5	2,43	0,68	0,07	2,80	5,50
12,5	2,88	0,25	0,05	3,68	4,85
13,5	2,74	0,23	0,05	3,65	4,95
15,0	2,72	0,09	0,05	3,30	5,00

Observada intensa floculação a partir das 7,0h de cultivo

Tabela 4.8 - Resultados do ensaio FS15, (Experimento 1 - T=40°C).

FIGURA 4.8 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E MITOGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS 16 (EXPERIMENTO 1)



Observada intensa floculação a partir do início do cultivo

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	NI (g/L)	A	pH
0,0	0,09	5,02	0,24	0,07	6,95
4,0	0,12	5,07	0,23	-	7,00
7,0	0,32	4,65	0,22	0,28	6,83
9,0	0,48	4,36	0,21	0,29	6,80
12,5	1,62	2,85	0,17	1,43	6,50
16,0	1,93	1,35	0,13	2,38	6,20
19,0	2,69	0,07	0,06	2,53	5,80
22,0	2,22	0,08	0,07	2,15	5,85

Tabela 4.9 - Resultados do ensaio FS16. (Experimento 1 - T=42°C).

Tabela 4.10 - Resultados do ensaio FS23. (Experimentos 1 e 2 - T=38°C).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	N <sub>i</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,08	5,55	0,16	0,02	6,75
12,0	0,44	5,21	0,14	0,45	6,50
14,0	0,71	4,09	0,09	1,10	6,20
16,0	1,27	3,11	0,03	1,70	5,60
18,0	1,88	1,65	0,01	1,90	-
20,0	1,61	1,70	0,01	2,25	4,15
22,0	1,60	1,68	0,01	2,81	4,20

Observada floculação desde o início do cultivo.

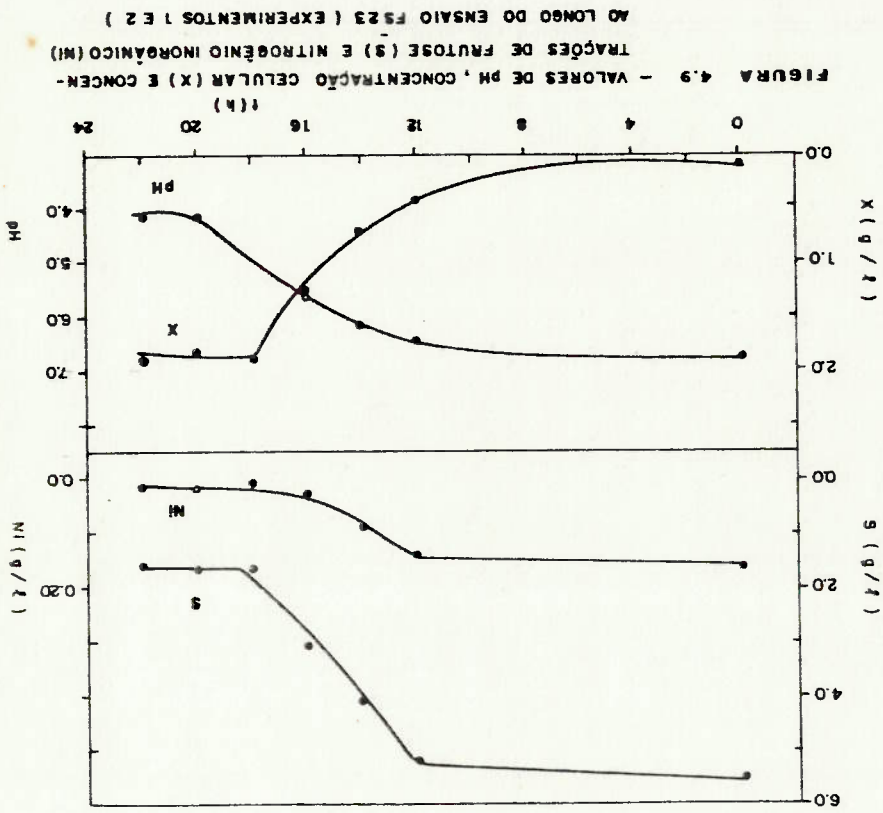


FIGURA 4.9 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS23 (EXPERIMENTOS 1 E 2)

4.12 Os flocos formados nestes ensaios (FS14, FS15, FS16, FS23) eram aproximadamente esféricos e decantavam quando em repouso. Nos ensaios em que houve floculação notou-se também que os meios de cultura e as células retidas nos filtros apresentavam-se amareladas ou rosadas, denotando a formação de carotenóides. Esses dois eventos (floculação e formação de carotenóides) estiveram também associados na cepa *A. brasiliense* Cd 135.

A tabela 4.11 reúne os valores iniciais e finais de grandezas medidas nos ensaios do E1. Os parâmetros de interesse para a análise do processo industrial já definidos no item 3.7.1 estão agrupados na tabela 4.12. Os valores de  $t_1$  e  $\mu_{max}$  foram obtidos dos gráficos da figura 4.10.

A figura 4.11 mostrou claramente que a velocidade específica de crescimento era máxima a 38°C, confirmando amplamente que a faixa ótima para o desenvolvimento bacteriano é de 36 a 38°C como já determinado por TARRAND et alii (192) e discutido no item 2.2.1.

As concentrações residuais de frutose expressas na tabela 4.11 mostram que quase todos os ensaios do E1 com extrato de levedura chegaram ao final. Apenas para as temperaturas de 30 e 32°C (FS11 e FS12) houve residual de frutose superior a 1 g/l, indicando que esse limitante, entretanto, não era o nitrogênio inorgânico, como pode ser visto da própria tabela 4.11.

Já no caso dos ensaios sem extrato de levedura (FS1 e FS23) o limitante poderia ser o  $N_i$  que se encontrava em concentrações bem baixas no final dos ensaios.

Os fatores de conversão  $Y_{X/S}$  e  $Y_{X/N_i}$  dos ensaios com E1 variaram pouco com a temperatura, como pode ser visto na figura 4.11. Nesse caso, calculando-se os valores médios das referidas grandezas chegou-se a:

**Tabela 4.11** Tempo total de crescimento, valores iniciais e finais de pH, da concentração de células, frutose e nitrogênio inorgânico segundo a temperatura de cultivo. (Experimento 1).

Ensaio	T (°C)	t <sub>F</sub> (h)	pH <sub>0</sub> (pH)	pH <sub>F</sub> (pH)	X <sub>0</sub> (g/l)	X <sub>F</sub> (g/l)	S <sub>0</sub> (g/l)	S <sub>F</sub> (g/l)	(NI) <sub>0</sub> (g/l)	(NI) <sub>F</sub> (g/l)
FS11	30	19,0	6,85	5,05	0,07	2,42	5,28	1,09	0,25	0,08
FS12	32	18,0	6,80	4,25	0,15	2,57	5,40	1,40	0,26	0,06
FS7	34	18,0	7,10	4,65	0,09	2,98	4,96	0,15	0,24	0,03
FS13	36	14,0	6,90	4,25	0,14	2,75	5,28	0,21	0,25	0,03
FS14	38	14,0	6,95	4,30	0,11	2,82	5,21	0,10	0,25	0,03
FS15	40	12,5	6,95	4,85	0,08	2,85	5,00	0,25	0,23	0,05
FS16	42	19,0	6,95	5,80	0,09	2,69	5,02	0,07	0,24	0,07
FS1	34	26,5	6,95	4,70	0,15	2,21	5,24	0,29	0,26	0,01
FS23	38	18,0	6,75	5,00	0,08	1,88	5,55	1,65	0,16	0,01

Ensaio FS1 e FS23 - sem extrato de levedura.

**Tabela 4.12** Tempo para início do crescimento exponencial, velocidade específica máxima de crescimento, fatores de conversão de frutose e nitrogênio inorgânico em células e produto (Experimento 1).

Ensaio	T (°C)	t <sub>I</sub> (h)	μ <sub>max</sub> (h <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	Y <sub>X/NI</sub> (g/g)	P <sub>X</sub> (g/l.h)
FS11	30	7,5	0,226	0,56	13,8	0,123
FS12	32	5,0	0,220	0,60	12,1	0,134
FS7	34	7,0	0,307	0,60	13,8	0,161
FS13	36	4,0	0,359	0,52	11,9	0,186
FS14	38	4,0	0,413	0,53	12,3	0,194
FS15	40	4,0	0,342	0,60	15,6	0,224
FS16	42	4,0	0,304	0,53	15,3	0,137
FS1	34	14,0	0,212	0,47	8,2	0,078
FS23	38	-	0,241	0,46	12,0	0,100

FS1 ; FS23 - sem extrato de levedura

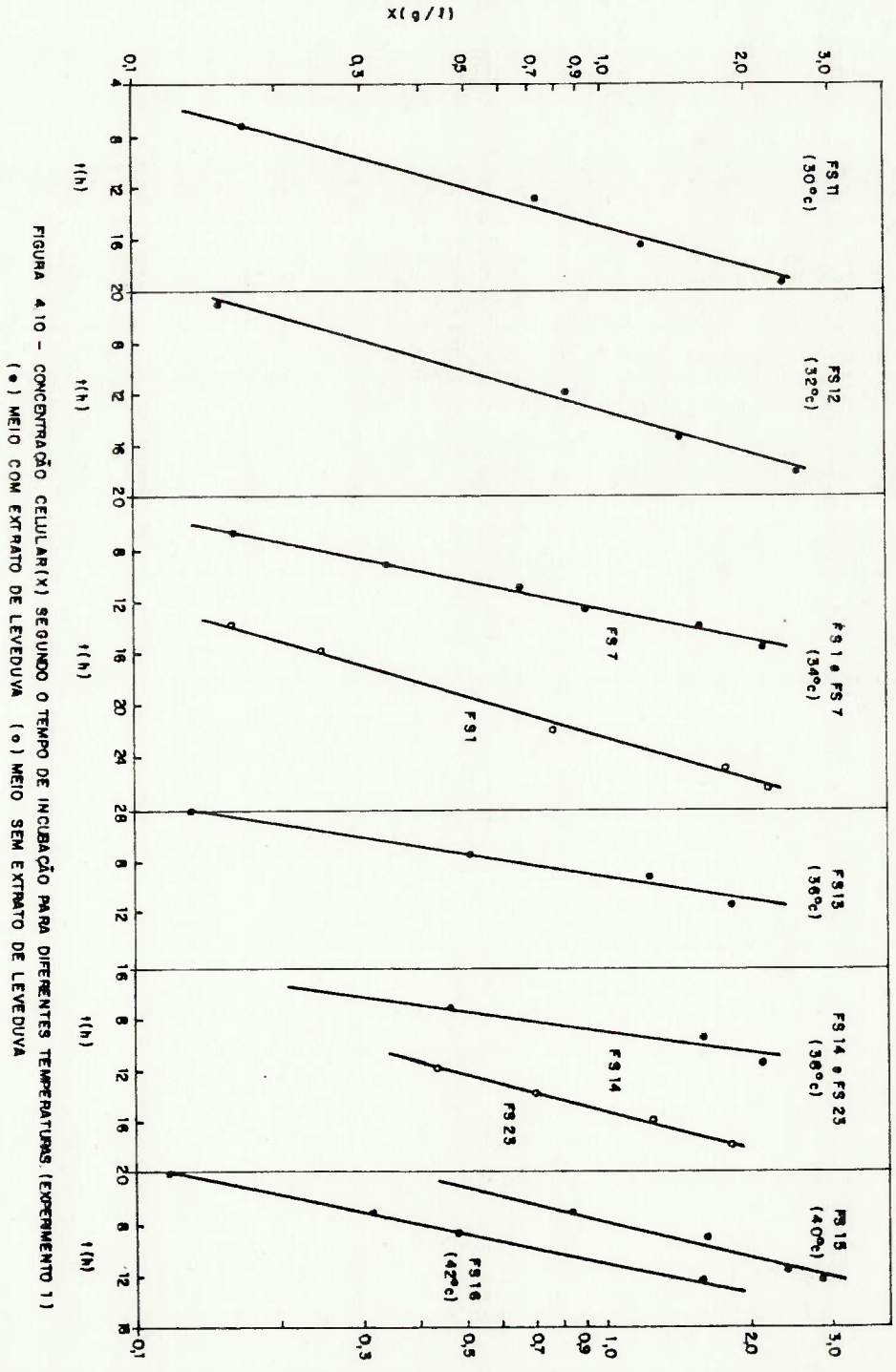
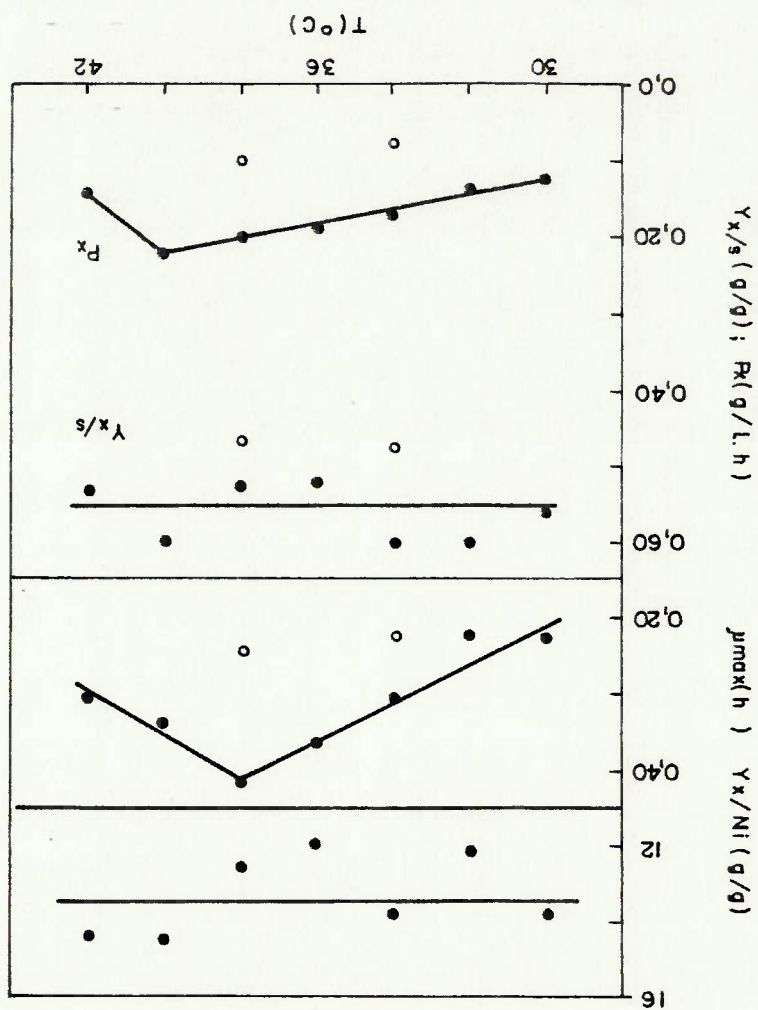


FIGURA 4.10 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) SEQUUNDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA DIFERENTES TEMPERATURAS (EXPERIMENTO 1)

FIGURA 4.11 - VALORES DE  $\mu_{max}$ ,  $P_x$ ,  $Y_{x/s}$  E  $Y_{x/Ni}$  NI SEGUNDO A TEMPERATURA DE CULTIVO PARA OS ENSAIOS DO EXPERIMENTO 1

● COM EXTRATO DE LEVEDURA  
○ SEM EXTRATO DE LEVEDURA



$$\bar{Y}_{X/S} = 0,562 \pm 0,052 \text{ g célula/g frutose}$$

$$\bar{Y}_{X/N_2} = 13,5 \pm 1,51 \text{ g célula/g N}_2$$

Este valor de  $Y_{X/S}$  está de acordo com o esperado para *A. brasiliense* (0,40 a 0,60 g cel/g monossacarídeo) e bem próximo aos valores obtidos para *E. coli* em várias temperaturas, como já foi citado no item 2.1.1.1.

Os ensaios sem extrato de levedura apresentaram  $Y_{X/S}$  em torno de 0,47 g célula/g frutose (cf. tabela 4.12) e esse valor, embora 16,4% inferior ao obtido com FL., ainda se encontra dentro do esperado.

No item 6.1 será examinada a influência da temperatura sobre a velocidade específica de crescimento visando a determinação da energia de ativação e demais parâmetros definidos em 2.2.

No item 4.5 serão discutidas as interrelações entre as grandezas para acompanhamento do processo ( $X, A, pH$ ) segundo o enfoque experimental em 2.6 para todos os ensaios em que se usou frutose como fonte de carbono.

#### 4.1.3.2 Determinação da Temperatura mais Apropriada para

o Cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em Frutose

Tendo em vista que os fatores de conversão  $Y_{X/S}$  e  $Y_{X/N_2}$  mostram-se constantes (cf. 4.1.3.1), a determinação da temperatura ótima para o processo industrial deve levar em consideração a produtividade celular.

Esta, como se observa da figura 4.11, era linearmente crescente com a temperatura entre 30 e 40°C.

Entretanto, levando em consideração que a flocculação também au-



mentava entre 38 e 42°C e que essa floculação é francamente indesejável para o preparo de inoculantes (cf. 2.7.1), adotou-se a temperatura de 38°C para os demais estudos com frutose, uma vez que nessa condição a floculação apareceu ao final do cultivo e a produtividade celular foi apenas 13,4% inferior à máxima obtida a 40°C.

#### 4.2 Experimento 2 (E2)

##### 4.2.1 Objetivos e Condições dos Ensaio do E2

O principal objetivo do E2 foi avaliar a influência da concentração inicial de frutose no crescimento de *A. brasiliense* e nos correspondentes fatores de conversão e produtividade. Buscava-se também definir em que nível de concentração de frutose, a concentração de extrato de levedura (1,0 g/l) anteriormente definida tornava-se limitante para o crescimento.

Todos os ensaios do E2 foram realizados na temperatura definida no E1 (38°C), em incubador rotativo a 200 rpm.

Os ensaios que compõem o E2 com as suas concentrações iniciais de frutose encontram-se na tabela 4.13. As concentrações de fósforo foram modificadas proporcionalmente às de frutose para manter a relação mencionada no item 3.2.5  $\frac{[\text{Frutose}]}{[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]} = \frac{5,0}{1,32}$   $\frac{[\text{K}_2\text{HPO}_4]}{[\text{K}_2\text{HPO}_4]}$  a não ser nos ensaios E51 (cuja composição do meio de cultura está descrita no item 5.2.1) e FS29.

Os motivos para a realização deste último ensaio estão expostos no início do item 4.2.3.1 e estão ligados à ocorrência de resíduos quais não desprezíveis das fontes de carbono e nitrogênio nos ensaios com  $S^o > 11,5 \text{ g/l}$  e  $EL = 1,0 \text{ g/l}$ .

Sendo assim, realizou-se o FS29 com concentração de frutose 50% superior àquela em que não se sentiu limitação (ou seja,  $S_0 = 11,5 \times 1,5$ ) e aumentou-se, na mesma proporção, a concentração de extrato de levedura. Tendo em vista que se poderia esperar um aumento da concentração celular, foram aumentadas as concentrações de nitrogênio e potássio, tendo-se utilizado 5,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e 10 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{L}$ .

**Tabela 4.13** Concentrações iniciais de frutose e de extrato de leve dura em que foram realizados os ensaios do E2.

Ensaio	$S_0$ (g/L)	Conc. Inicial EL (g/L)
ES1	0,00	1,0
FS20	2,60	1,0
FS14	5,21	1,0
FS24	6,18	1,0
FS17	11,51	1,0
FS21	15,30	1,0
FS18	19,20	1,0
FS19	24,45	1,0
FS23	5,55	0,0
FS29	16,48	1,5

#### 4.2.2 Resultados dos Ensaios do E2

Nas tabelas 4.14 a 4.20 e nas figuras 4.13 a 4.18 são apresentadas os resultados dos ensaios do E2, com a ressalva de que os referentes aos ensaios FS14 e FS23 já foram apresentados no E1 e os do ES1 serão apresentados no item 5.2.2.

Tabela 4.14 - Resultados do ensaio FS17. (Experimento 2).

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	N <sub>i</sub> (g/L)	A	pH
0,0	0,05	11,51	0,48	0,05	6,85
4,0	0,24	11,51	0,47	0,17	6,85
7,0	0,76	11,51	0,43	0,68	6,65
9,0	1,40	9,74	0,41	0,78	6,60
11,0	2,08	7,89	0,35	2,57	6,35
15,0	2,94	5,76	0,25	3,82	6,00
17,0	3,11	5,11	0,23	4,17	5,95
19,0	4,19	2,95	0,19	5,35	5,60
21,0	4,63	1,18	0,09	6,15	4,20
23,0	4,56	-	0,08	5,90	4,00
25,0	4,99	0,33	0,10	5,50	4,30
27,0	4,70	0,20	0,09	6,50	4,20

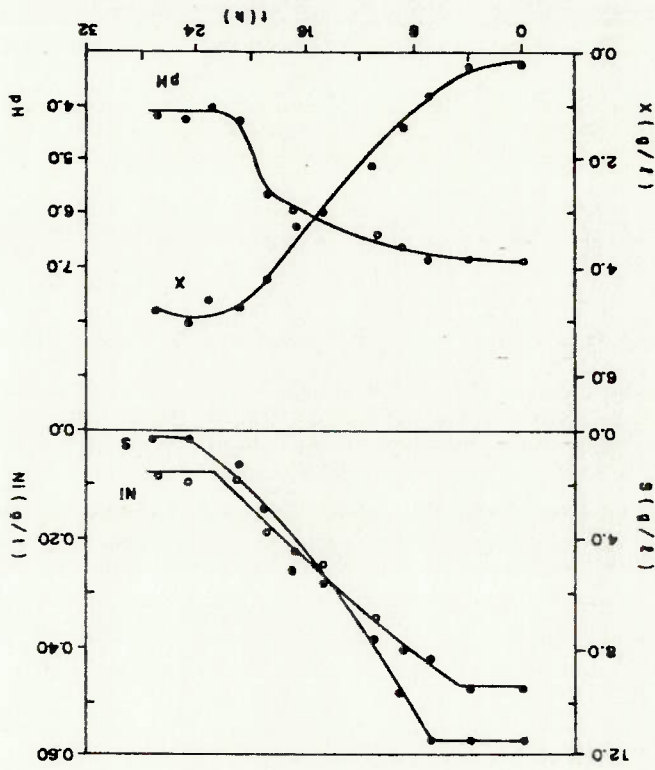
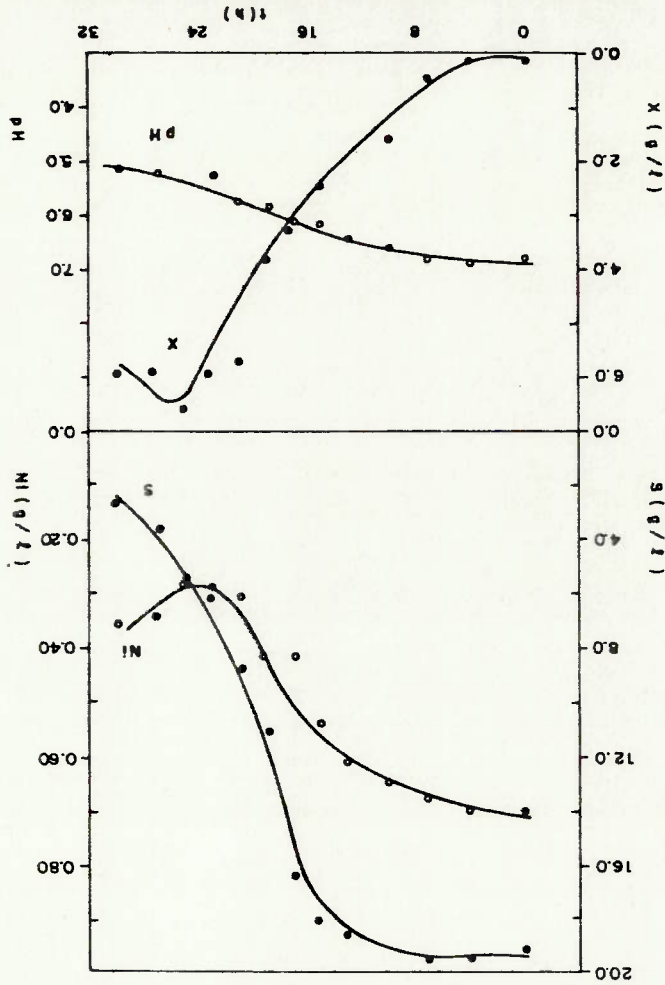


FIGURA 4.12 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS17 (EXPERIMENTO 2) (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S)

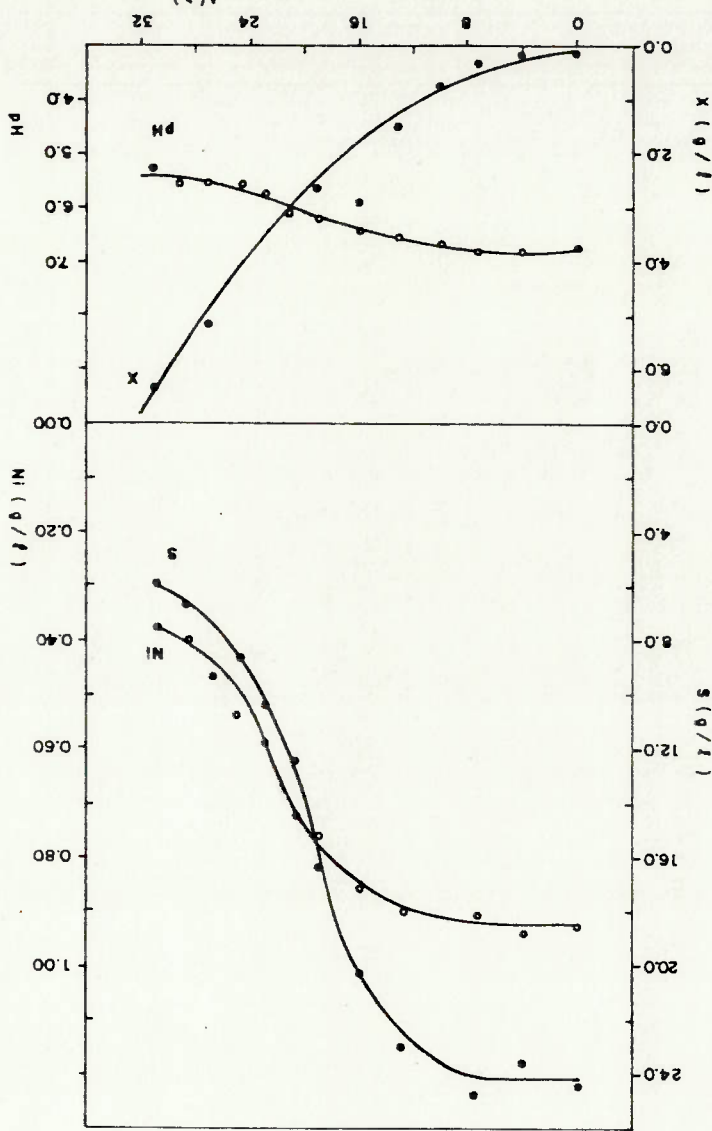
FIGURA 4.15 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULOSE (X) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (N) AO LONGO DO ENSAIO FS18 (EXPERIMENTO 2)



t (h)	X (g/L)	S (g/L)	N <sub>i</sub> (g/L)	A	pH
0,0	0,05	19,20	0,70	0,03	6,85
4,0	0,15	19,33	0,69	0,03	6,95
7,0	0,46	19,85	0,67	0,42	6,85
10,0	1,66	20,38	0,65	0,63	6,70
13,0	-	18,58	0,61	0,70	6,50
15,0	2,46	18,10	0,54	1,91	6,20
17,0	3,28	16,16	0,41	4,95	6,20
19,0	3,79	10,96	0,41	4,44	5,90
21,0	5,84	8,58	0,30	6,65	5,85
23,0	5,99	6,06	0,28	6,80	5,30
25,0	6,65	5,29	0,28	6,63	-
27,0	5,90	3,49	0,36	6,15	5,30
30,0	6,09	2,49	0,34	6,35	5,15

Tabela 4.15 - Resultados do ensaio FS18. (Experimento 2).

FIGURA 4.14 - VALORES DE PH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS19 (EXPERIMENTO 2)



t (h)	X (g/l)	S (g/l)	NI (g/l)	A	pH
0,0	0,05	24,45	0,93	0,02	6,75
4,0	0,12	23,57	0,94	0,06	6,85
7,0	0,32	24,80	0,91	0,22	6,80
10,0	0,75	-	0,90	0,64	6,70
13,0	1,50	22,96	0,86	1,40	6,55
16,0	2,91	20,11	0,77	3,10	6,40
19,0	2,67	16,16	0,72	2,70	6,20
21,0	-	12,13	0,62	4,00	6,05
23,0	-	10,27	0,59	4,70	5,80
25,0	-	8,73	0,54	5,23	5,70
27,0	5,15	9,35	-	6,50	5,60
29,0	4,21	6,80	0,60	6,73	5,60
31,0	6,35	5,89	0,57	6,76	5,35

Tabela 4.16 - Resultados do ensaio FS19. (Experimento 2).

Tabela 4.17 - Resultados do ensaio FS20. (Experimento 2).

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	Ni (g/L)	A	pH
0,0	0,11	2,60	0,13	0,04	6,75
2,0	0,05	2,63	0,12	0,06	6,70
3,0	-	2,73	0,12	0,05	6,70
4,0	-	2,63	0,12	0,04	6,60
5,0	0,16	2,52	0,12	0,06	6,70
6,0	0,21	2,54	0,12	0,14	6,60
7,0	0,25	2,43	0,12	0,20	6,55
8,0	0,35	2,26	0,11	0,31	6,55
9,0	-	-	-	0,49	6,45
9,5	0,61	2,04	0,09	0,57	6,30
10,5	-	-	-	0,72	6,05
11,5	-	-	-	1,43	5,70
12,0	-	-	-	1,65	5,35
12,5	1,49	0,47	0,03	1,91	4,75

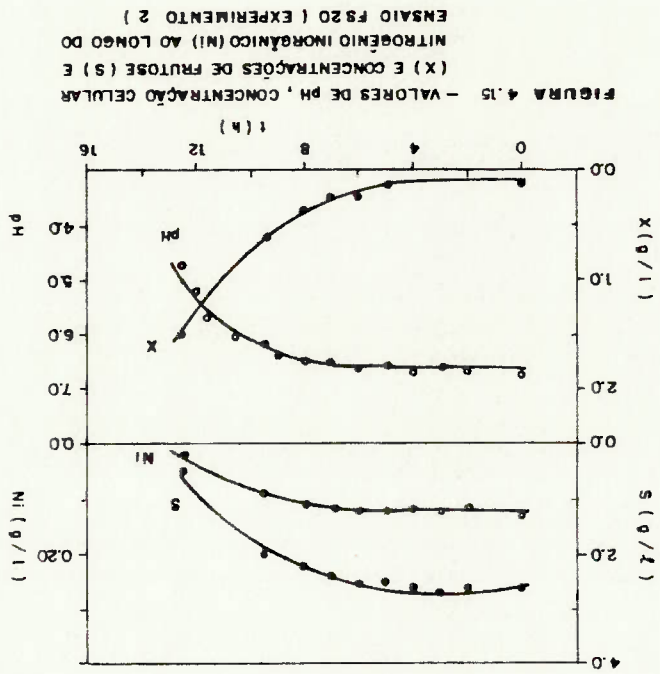
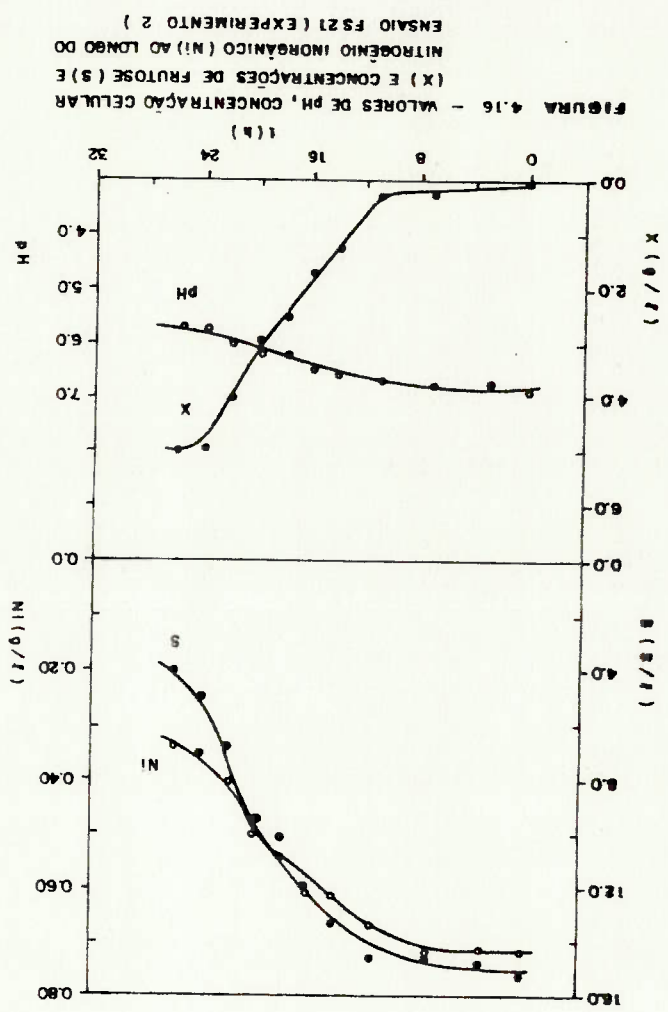


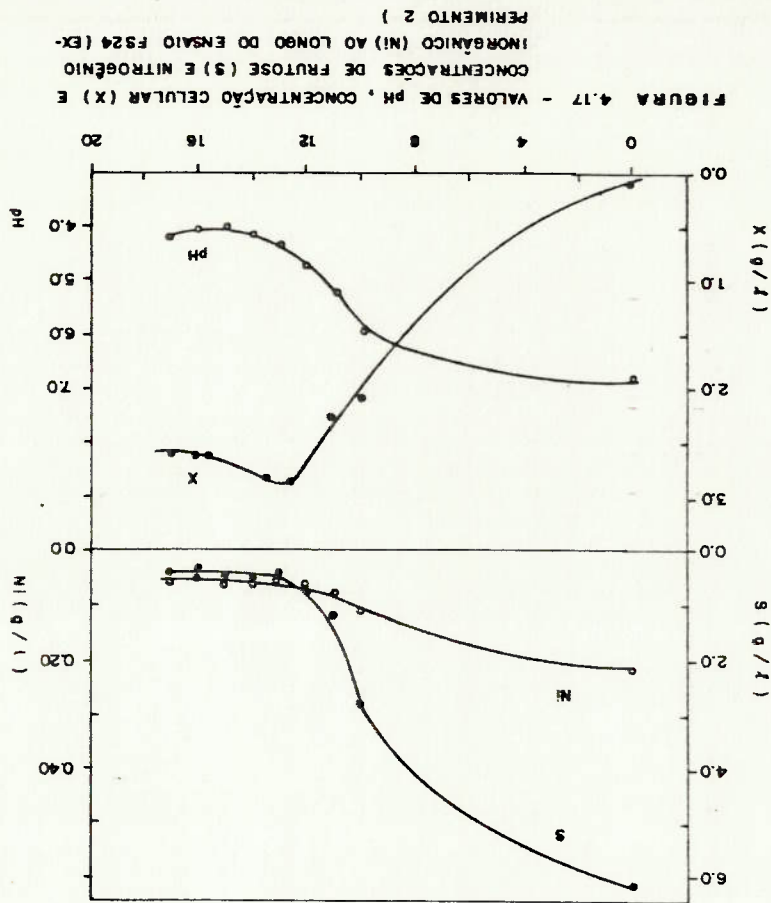
FIGURA 4.15 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS20 (EXPERIMENTO 2)

(X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S)



t (h)	X (g/l)	S (g/l)	N <sub>i</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,11	15,30	0,72	0,03	6,90
3,0	-	14,84	0,72	0,14	6,80
7,0	0,22	14,63	0,72	0,18	6,80
11,0	0,30	14,73	0,67	0,25	6,70
14,0	1,29	13,30	0,62	1,50	6,60
16,0	1,64	11,91	0,67	2,20	6,50
18,0	2,46	10,94	0,51	3,20	6,35
20,0	2,90	9,39	0,50	4,12	6,30
22,0	4,05	6,87	0,40	5,70	6,00
24,0	4,96	5,00	0,35	6,67	5,85
26,0	4,97	4,05	0,34	6,50	5,65

Tabela 4.18 - Resultados do ensaio FS21. (Experimento 2).

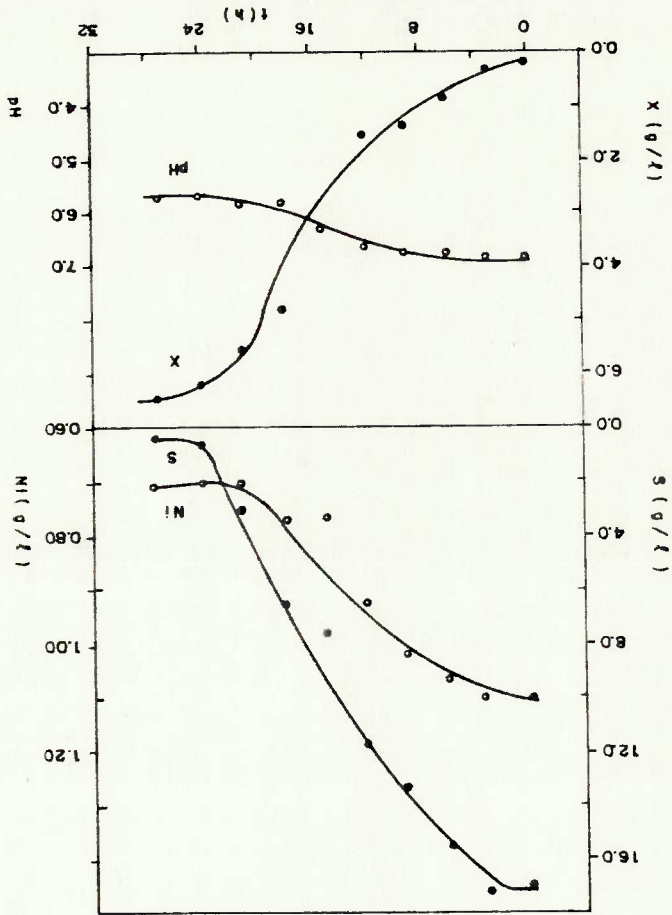


t (h)	X (g/L)	S (g/L)	NI (g/L)	A	pH
0,0	0,09	6,18	0,22	0,06	6,80
10,0	2,13	2,78	0,11	2,65	5,95
11,0	2,24	1,11	0,08	3,10	5,52
12,0	2,90	0,71	0,06	3,50	4,70
13,0	2,82	0,48	0,05	3,70	4,35
14,0	2,65	0,54	0,05	-	4,15
15,0	2,68	0,52	0,05	3,80	4,05
16,0	2,64	0,32	0,05	4,05	4,00
17,0	2,60	0,40	0,05	4,50	4,15

Tabela 4.19 - Resultados do ensaio FS24. (Experimento 2).



FIGURA 4.18 - VALORES DE PH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FS29 (EXPERIMENTO 2)



t (h)	X (g/L)	S (g/L)	NI (g/L)	A	pH
0,0	0,13	16,48	1,10	0,07	6,91
3,0	0,17	16,59	1,10	0,10	6,85
6,0	0,43	15,58	1,07	0,45	6,83
9,0	1,38	13,17	1,02	2,09	6,79
12,0	1,48	11,91	0,93	2,79	6,66
15,0	4,44	7,56	0,76	5,40	6,29
18,0	4,66	6,50	0,76	5,90	5,85
21,0	5,58	3,00	0,70	6,90	5,83
24,0	6,22	0,76	0,71	9,56	5,73
27,0	6,41	0,24	0,71	9,80	5,74

Tabela 4.20 - Resultados do ensaio FS29. (Experimento 2).

O aumento das concentrações iniciais de frutose e fosfatos de amônia e de potássio, não modificou as características gerais do desenvolvimento microbiano, já comentadas em 4.1.3.1. Notou-se uma menor variação de pH nos ensaios de concentrações mais elevadas devido a maior capacidade de tamponamento das soluções (cf. tabela 4.21).

Os ensaios realizados com concentrações iniciais de frutose maiores que 11,5 g/l e com 1,0 g EL/l não chegaram ao final da fonte de carbono nos intervalos em que foram acompanhados. Poder-se-ia imaginar que os cultivos iriam passar por novos períodos de adaptação para adequar os sistemas enzimáticos para produzir algum composto inicialmente presente no extrato de levedura (cf. 2.1.4.3). Esse novo período de adaptação (que poderia durar no máximo 12 h, cf. figura 4.9) não seria nada desejável pois haveria diminuição na produtividade celular.

No FS29 com 1,5 g EL/l para  $S_0 = 16,5$  g/l a limitação de substâncias pré-formadas ou o atraso no desenvolvimento não se fizeram sentir, pois ocorreu o consumo total da frutose (cf. tabela 4.20 e figura 4.18) com o correspondente aumento da concentração celular final. A maior quantidade das referidas substâncias teve outro efeito positivo, no início do cultivo, anulando a fase "lag" (cf. tabela 4.22).

Desta série de ensaios pôde-se concluir que para evitar a limitação ou atrasos no crescimento de *A. brasiliense* sp 245 devido à falta de substâncias presentes no extrato de levedura, deve-se man

#### 4.2.3 Discussão dos Resultados do E2

##### 4.2.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriano

ter uma relação máxima de 11 g de frutose por grama de EL, no início do cultivo, à temperatura de 38°C.

**Tabela 4.21** Tempo total de crescimento, valores iniciais e finais de pH, concentração celular, de frutose, de nitrogênio inorgânico para os ensaios do experimento 2.

ENSAIO	t <sub>F</sub> (h)	(pH) <sup>o</sup> (g/l)	(pH) <sub>F</sub> (g/l)	X <sub>o</sub> (g/l)	X <sub>F</sub> (g/l)	S <sub>o</sub> (g/l)	S <sub>F</sub> (g/l)	(Nt) <sub>o</sub> (g/l)	(Nt) <sub>F</sub> (g/l)
--------	-----------------------	----------------------------	----------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------------	----------------------------	----------------------------

FS20	12,5	6,75	4,75	0,11	1,49	2,60	0,47	0,13	0,03
FS14	14,0	6,95	4,30	0,11	2,82	5,21	0,09	0,25	0,03
FS24	13,0	6,80	4,15	0,09	2,82	6,18	0,50	0,22	0,05
FS17	25,0	6,85	4,30	0,20	4,99	11,51	0,33	0,48	0,10
FS21	24,0	6,90	5,85	0,11	4,96	15,30	4,05	0,72	0,35
FS18	25,0	6,85	5,30	0,15	6,65	19,20	5,29	0,70	0,28
FS19	31,0	6,75	5,35	0,12	6,35	24,45	5,89	0,93	0,57
FS23	18,0	6,75	5,00	0,08	1,88	5,55	1,65	0,16	0,01
FS29	27,0	6,91	5,74	0,13	6,41	16,48	0,24	1,10	0,71
ES1	9,5	6,70	6,90	0,10	0,28	-	-	0,24	0,26

FS23 - sem extrato de levedura ; FS29 - com 1,5 g EL/l  
 ES1 - sem frutose (ver 5.2.2)

Para outras temperaturas não se deve esperar que esta relação se altere substancialmente, pois como foi visto no item 4.1.3.1 os fatores de conversão de frutose e de nitrogênio inorgânico são constantes com a temperatura, para os ensaios com 1,0 g EL/l, o que indica, a grosso modo, que o metabolismo celular opera de forma idêntica, ainda que mais lentamente nas temperaturas mais baixas.

A tabela 4.21 reúne os valores iniciais e finais de grandezas medidas nos ensaios de E2 e que foram usados no cálculo dos fatores de conversão e produtividades que aparecem à tabela 4.22. Os valores de  $t_1$  e  $\mu_{max}$  que também constam desta última tabela foram tirados da figura 4.19.

Na figura 4.20 foram lançados os valores de  $\mu_{max}$ ,  $P_x$ ,  $Y_{X/S}$  e  $Y_{X/N_1}$  segundo a concentração inicial de frutose. Como se observa desta figura, os fatores de conversão apresentaram comportamento ligeiramente distinto; enquanto  $Y_{X/N_1}$  manteve-se praticamente constante com valor médio de  $14,3 \pm 1,9$  g cel/g N<sub>1</sub> não considerando os valores para FS23 e FS29 (ou  $14,5 \pm 1,9$  g cel/g N<sub>1</sub> não considerando apenas o FS23), o fator  $Y_{X/S}$  decresceu quando  $S_0$  aumentou de 2,6 até 11,5 g/l, e manteve-se então constante em  $0,45 \pm 0,02$  g cel/g frutose (incluindo aí o resultado do FS29) até  $S_0$  próximo a 20g/l. A variação de  $\mu_{max}$  com  $S_0$  apresenta um perfil característica da equação 2.24 constante da figura 2.6, indicando claramente a inibição do crescimento microbiano pelo substrato. Os resultados de  $\mu_{max} = f(S_0)$  obtidos neste E2 serão reunidos aos do E3 para obter uma equação única representando  $\mu = f(S)$ .

A figura 4.20 revela ainda que a produtividade celular manteve-se constante para  $S_0 > 5$  g/l, compensando o decréscimo da velocidade de específica de crescimento com a obtenção de concentrações celulares finais mais elevadas. Nesse aspecto é muito importante ressaltar que o consumo total do substrato no FS29 proporcionou aumento

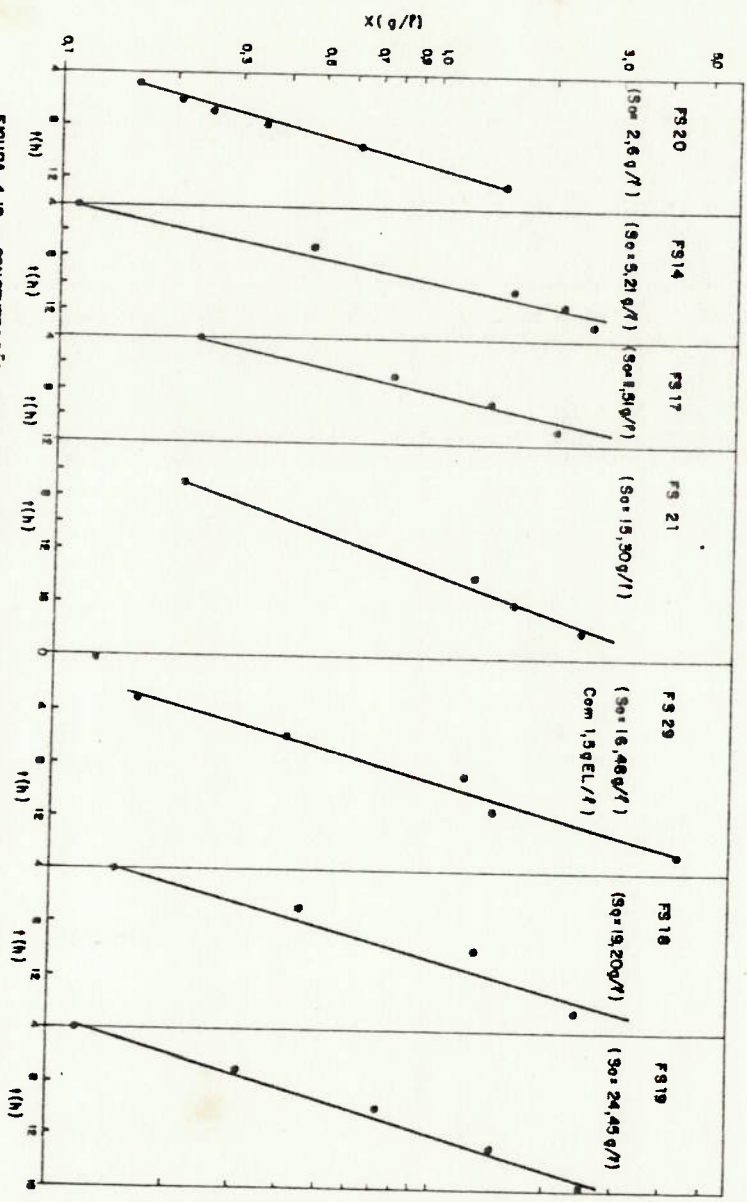


FIGURA 4.19 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) SEQUINDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA OS ENSAIOS DO EXPERIMENTO 2.

Tabela 4.22 Tempo para início do crescimento exponencial, velocidade de específica máxima de crescimento, fatores de conversão de frutose e nitrogênio inorgânico em células e produtividade segundo a concentração inicial de frutose. (Experimento 2).

ENSAIO	$S_0$ (g/l)	$S_0$ mm	$t_l$ (h)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{X/N}$ (g/g)	$P_x$ (g/l.h)
FS20	2,60	14,4	5,0	0,304	0,65	14,2	0,11
FS14	5,21	28,9	4,0	0,413	0,53	12,3	0,19
FS24	6,18	34,3	-	-	0,48	15,9	0,21
FS17	11,51	63,9	4,0	0,312	0,43	12,5	0,19
FS21	15,30	85,0	7,0	0,231	0,43	12,5	0,20
FS18	19,20	106,7	4,0	0,245	0,47	15,6	0,26
FS19	24,45	135,8	4,0	0,264	0,34	16,9	0,20
FS23	5,55	30,8	-	0,241	0,46	12,0	0,10
FS29	16,48	91,6	0	0,207	0,39	16,1	0,23
ES1	0	0	3,0	0,160	-	-	0,02

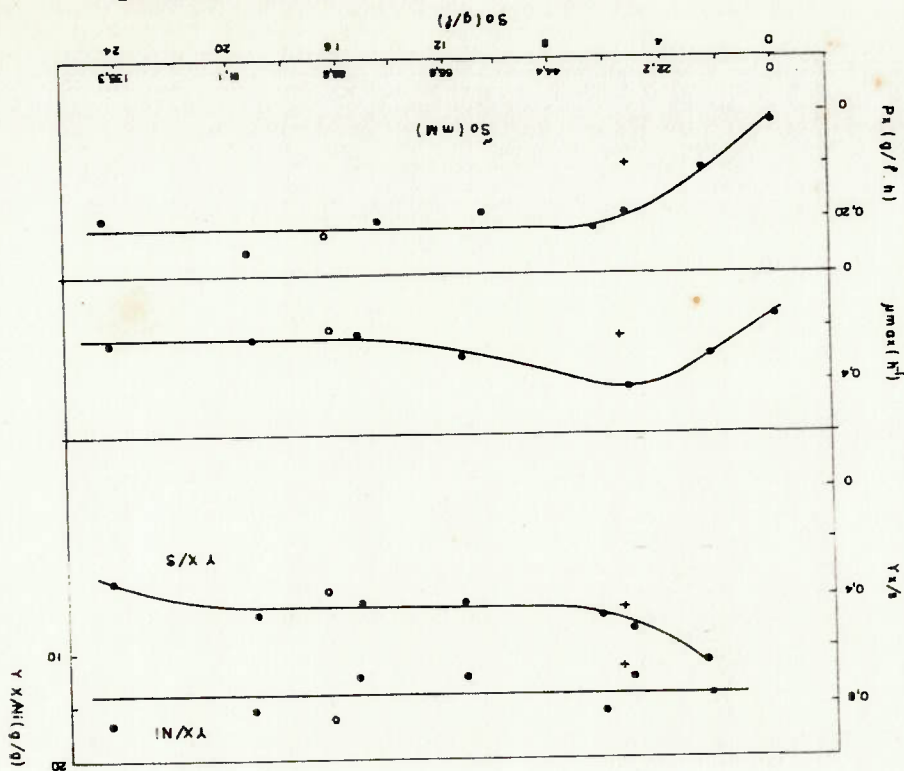


FIGURA 4.20 - VALORES DE  $\mu_{max}$ ,  $P_x$ ,  $Y_{X/S}$  E  $Y_{X/N}$  SEGUNDO A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE FRUTOSE, EXPERIMENTO 2 (+) SEM EL; (o) 1,0 g/L; (x) 1,5 g/L.

to do  $X_F$  da ordem de 22,6% em relação ao FS21, que teve  $S_0$  próximo ao do FS29.

#### 4.2.3.2 Determinação da Concentração Inicial de Frutose

mais Adequada ao Cultivo de *A. brasiliense* sp 245

Para o processo industrial deve-se utilizar a concentração inicial que proporcione os maiores fatores de conversão (que estão associadas aos custos dos reagentes e matérias-primas) e produtividade de (que é inversamente proporcional ao tamanho dos equipamentos e aos custos operacionais) e, no caso dos inoculantes, as maiores concentrações de células viáveis.

Para meios de cultura com 1,0 g FL/l, concentrações iniciais de frutose maiores do que 11,5 g/l não seriam vantajosas pois aumentariam os fatores de conversão nem a produtividade celular (cf. figura 4.20) e, ao mesmo tempo, desperdiçariam matérias-primas. Concentrações iniciais de frutose inferiores a 5,2 g/l trariam acen- tuados decréscimos na concentração celular final e na produtividade de, embora pudessem conduzir a fatores  $Y_{X/S}$  bastante elevados.

Assim, para programar os ensaios em processo descontínuo, em fermentador, pôde-se restringir a faixa de experimentação para  $5,0 < S_0 < 11,5$  g/l (com 1,0 g FL/l).

A utilização de mostos mais concentrados em frutose (16 g/l) e extrato de levedura (1,5 g/l) também se mostrou interessante e deveria ser experimentada em fermentador, principalmente devido a elevada concentração celular obtida no FS29.

O experimento 3 foi realizado com o intuito de estabelecer as melhores condições para a produção de *A. brasiliense* sp 245 em fermentador, em processo descontínuo, a partir dos resultados já obtidos no E1 e E2. Procurou-se também, neste experimento determinar as velocidades específicas de respiração celular e os coeficientes de transferência de oxigênio para diferentes condições de agitação e aeração.

Os ensaios realizados buscaram ainda estabelecer parâmetros adequados ao acompanhamento e controle do processo industrial e também determinar os coeficientes para utilização na análise econômica.

Todos os ensaios foram realizados segundo a metodologia descrita no item 3.4, à temperatura de 38°C. A tabela 4.23 apresenta as demais condições em que foram realizados os ensaios FDI a FD5, sabendo-se que se procurou utilizar concentrações iniciais de frutose entre 5 e 11 g/l, com concentração inicial de 1,0 g EL/l e 16 g frutose/l com a concentração inicial de 1,5 g EL/l conforme conclusões do E2 (cf. 4.2.3.2).

A seguir, separados em itens são apresentados os resultados obtidos em cada ensaio do E3. Os resultados das determinações de concentrações celulares (N), para todos os ensaios, estão agrupados no item 4.3.7. Nos itens relativos aos FD4 e FD5 (4.3.5 e 4.3.6), são calculados os valores de  $QO_2$  e  $k_L$  a segundo a sequência descrita no item 3.6.12.



O meio de cultura utilizado no FDI tinha a formulação básica descrita no item 3.2.5, mas não continha anti-espumante e a espuma intensa que se formou durante o cultivo dificultou o controle do pH, pois as gotas de solução de NaOH que eram introduzidas no tanque pela bomba acionada pelo controle automático, ficavam retidas na espuma.

Tentou-se adição manual de anti-espumante através de seringa esterilizada mas não foi possível controlar a espuma a contento. A tabela 4.24 e a figura 4.21 apresentam os resultados para o ensaio FDI; não foram efetuadas as dosagens de proteína celular e de concentração celular numérica (N).

Como se observa da figura 4.32, a porcentagem de oxigênio dissolvido diminuiu acentuadamente ao longo do ensaio, tendo chegado a 63% às 7,0 h de cultivo, mesmo para uma vazão específica de ar

4.3.2 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio FDI

Temperatura: 38 C  
 No ensaio FDI não foi usado anti-espumante. Nos demais, adicionou-se 0,05 ml de ANTIFOAM Q2-3255/l de meio de cultura (cf. 3.2.5).

Ensaio	So (g/l)	Conc. inicial extrato levedura (g/l)	Volume do meio de cultura (l)	Turbinas para Agitação	Vazão de ar (l/min)	Frequência de agitação (rpm)
FD1	4,97	1,0	7,5	1	8,0	500
FD2	8,15	1,0	10,0	2	4,0	500
FD3	8,97	1,0	10,0	2	3,5	550
FD4	12,19	1,0	10,0	2	4,0-6,9	500
FD5	16,04	1,5	10,0	2	11,5	500

Tabela 4.23 Condições dos ensaios do E3.

do FDI.

FDI, a porcentagem de oxigênio mínima foi de 73%, em lugar dos 63% tendo-se obtido uma concentração final cerca de 25% superior à do específica de ar de  $0,4 \text{ min}^{-1}$  (menos da metade da usada no FDI) e terior, deve-se observar que mesmo usando no ensaio FD2 uma vazão Em relação à dissolução de oxigênio, como mencionado no item an no ensaio FD2.

A tabela 4.25 e a figura 4.22 apresentam os resultados obtidos

### 4.3.3 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio FD2

\* Meio de cultura sem anti-espumante: espuma dificultou controle de pH.

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	NI (g/l)	A	pH*	M (mg/l)	% <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,20	4,97	0,24	0,34	7,00	0	88,0
1,0	0,40	4,95	0,24	0,37	7,00	0	91,0
2,0	0,58	4,73	0,24	0,46	7,00	0	89,0
3,0	0,72	4,42	0,21	0,65	7,00	21	82,0
4,0	1,08	4,39	0,21	1,46	6,90	183	81,0
5,0	1,50	3,06	0,16	2,00	7,00	233	79,0
6,0	2,11	1,86	0,10	2,79	6,75	251	77,0
7,0	2,88	0,29	0,03	3,40	6,45	296	63,0
8,0	2,92	0,09	0,02	3,00	6,60	363	84,0
9,0	2,38	0,09	0,01	2,10	6,65	424	90,0
10,0	-	-	-	-	6,65	490	92,0

Tabela 4.24 Resultados do ensaio FDI. (Experimento 3).

ção de  $1,07 \text{ min}^{-1}$  (cf. tabela 4.23).

FIGURA 4.21 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSES (S) ENTROGÊNIO INORGÂNICO (NI) E % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO F.D.1 (EXPERIMENTO 3).

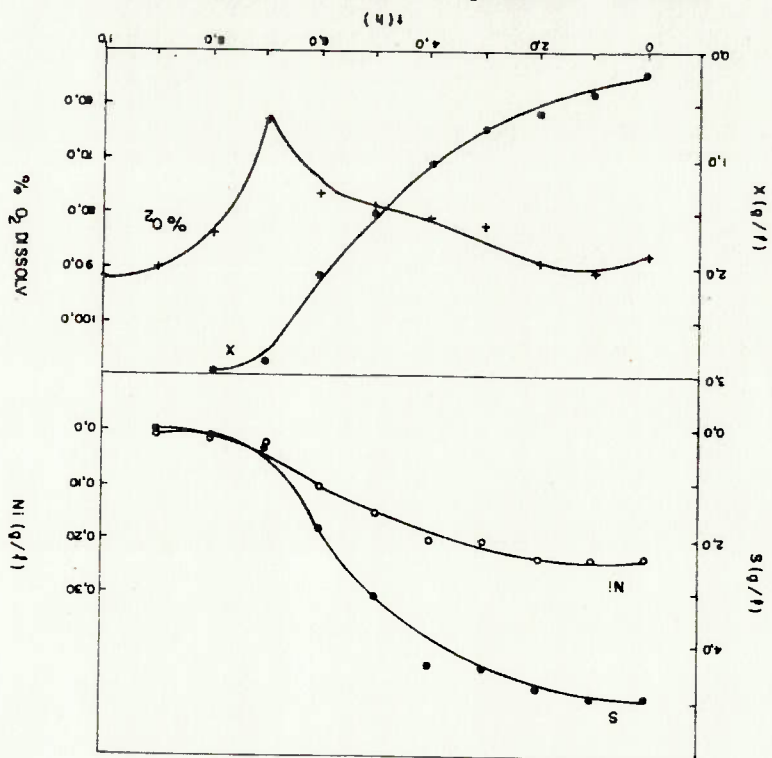
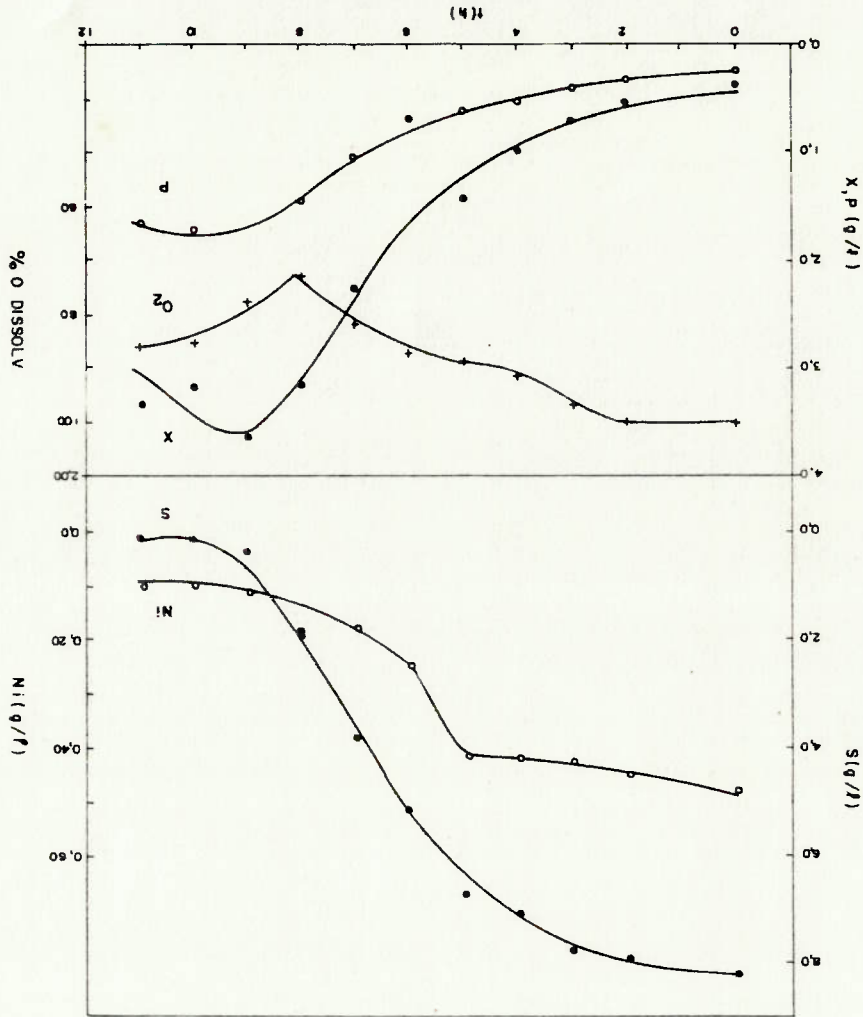


FIGURA 4.22 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S),  
 PROTEÍNA CELULAR (P) E DE NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) E % DE  
 OXIGÊNIO DISSOLVIDO A OLONGO DO ENSAIO FD2. (EXPERIMENTO 3)



t (h)	X (g/l)	S (g/l)	NI (g/l)	P (g/l)	A	pH	M (mg/l)	O <sub>2</sub> (l/min)	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,40	8,15	0,48	0,26	0,26	7,40	0	5,75	100,0
2,0	0,55	7,97	0,45	0,33	0,43	7,40	0	5,75	100,0
3,0	0,71	7,79	0,43	0,39	0,57	7,20	0	3,45	97,0
4,0	1,00	7,09	0,42	0,51	0,67	7,10	0	3,45	91,0
5,0	1,44	6,72	0,42	0,61	2,25	7,00	40	4,00	89,0
6,0	-	5,16	0,25	0,67	2,40	7,00	44	4,00	87,0
7,0	2,28	3,84	0,18	1,09	3,20	7,00	393	4,00	82,0
8,0	3,14	1,92	0,20	1,48	4,10	7,00	750	4,00	73,0
9,0	3,62	0,44	0,11	-	4,60	7,30	1050	4,00	78,0
10,0	3,18	0,16	0,10	1,74	4,73	7,30	1050	4,00	85,0
11,0	3,37	0,15	0,11	1,66	3,65	7,30	1050	4,00	86,0

Tabela 4.25 Resultados do ensaio FD2. (Experimento 3).

Assim, ainda que de forma indireta, pôde-se avaliar que o aumento do número de turbinas e da potência por unidade de volume foram eficientes para incrementar o coeficiente de transferência de oxigênio.

Ainda no tocante ao oxigênio dissolvido pôde-se notar que no final do ensaio (a exemplo do que já ocorrera no FD1, cf. figura 4.21) houve um sensível aumento na sua porcentagem, indicando o decréscimo da respiração celular, motivado pela diminuição da concentração da fonte de carbono. Ve-se então que a concentração de oxigênio por si só pode servir como indicativo das fases do processo, no caso de se optar por realizar o controle manual do mesmo.

#### 4.3.4 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio FD3

A tabela 4.26 e a figura 4.23 apresentam os resultados para o FD3, em que  $S_0 \approx 9,0 \text{ g/l}$ .

Neste ensaio pode-se verificar que o incremento da agitação para 550 rpm (em vez de 500 rpm usado no FD2) proporcionou um sensível aumento no coeficiente de transferência de oxigênio: com uma vazão específica de aerção ligeiramente inferior à do FD2 (0,35 contra 0,40  $\text{min}^{-1}$ ) e com uma concentração celular final cerca de 19% superior houve uma porcentagem mínima de oxigênio dissolvido de 92% contra os 73% que foram observados no FD2.

Esse resultados está de acordo com vários outros anteriormente estabelecidos  $|0,10,112,162,206|$ , de que o coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) é bem mais sensível à variação da frequência de agitação do que a da vazão de ar.

Tabela 4.26 Resultados do ensaio FD3. (Experimento 3).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A (g/l)	pH	M (mg/l)	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,34	8,97	0,56	0,20	0,35	7,00	0	100,0
2,0	0,44	8,28	0,56	0,34	0,49	7,00	38	100,0
4,0	0,84	7,47	0,54	0,50	1,17	7,00	238	98,0
5,0	1,18	6,49	0,48	0,77	1,70	7,00	424	96,0
6,0	1,80	5,13	0,44	1,01	2,35	7,00	435	96,0
7,0	2,46	2,15	0,22	1,30	3,29	7,00	668	94,0
8,0	3,70	-	-	1,73	4,05	6,90	992	92,0
9,0	4,30	0,35	0,17	1,84	4,25	6,90	1163	96,0
10,0	3,31	0,28	0,17	1,90	4,40	7,20	1163	100,0
11,0	3,15	0,28	0,17	2,02	3,95	7,30	1163	100,0

Observada flocculação a partir das 6 h de cultivo

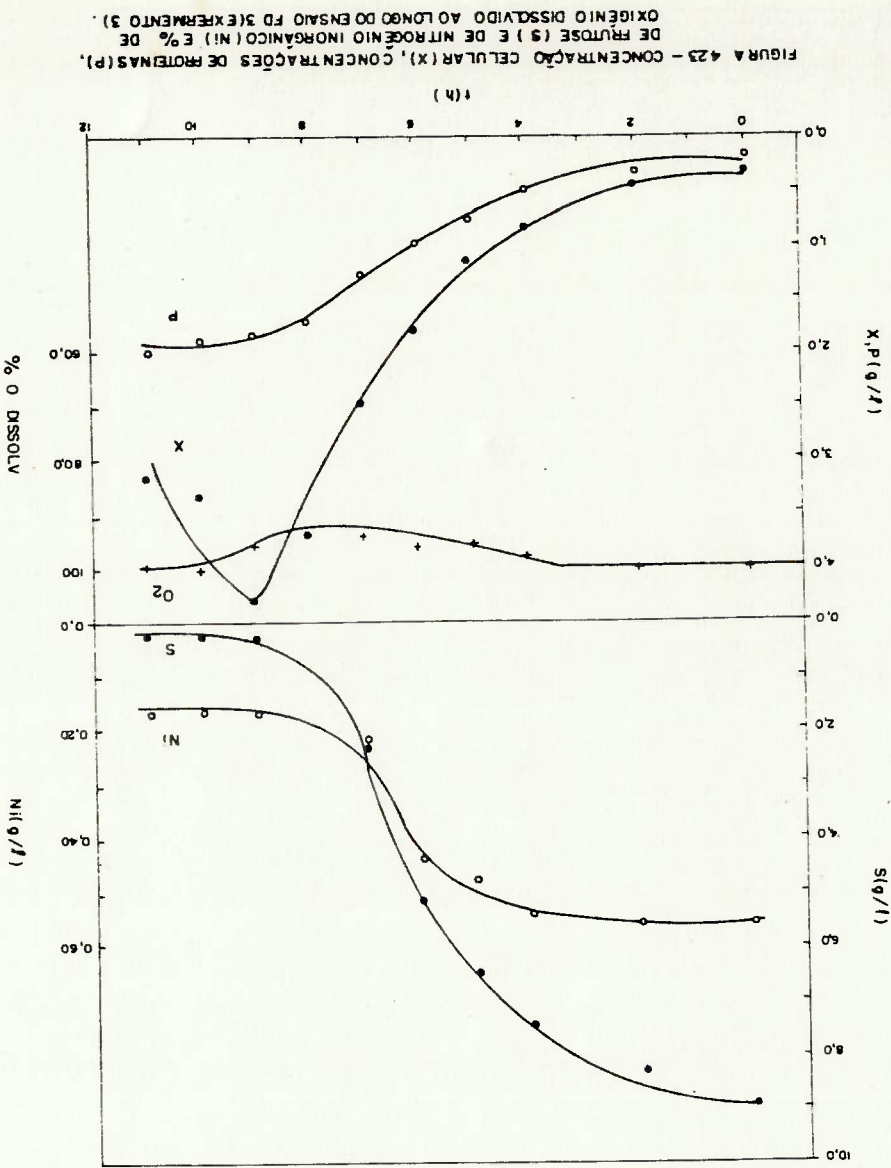


FIGURA 4.23 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS (P), DE FRUTOSE (S) E DE NITRÓGENIO INORGÂNICO (NI) E % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO FD 3 (EXPERIMENTO 3).

Foi observada a formação de dois tipos de flocos bacterianos caracterizados por sua densidade e aparência. Um dos tipos, menor e mais compacto sedimentava com rapidez quando em repouso e era facilmente colocado em suspensão quando a agitação era reiniciada. O outro tipo de floco apresentava tamanho maior, densidade menor e aparência de "algodão", com algumas ramificações ("fiapos" visíveis. Pensou-se inicialmente em contaminação por outras bactérias ou fungos, mas observações microscópicas efetuadas não demonstraram a presença de outros microrganismos que não *Azospirillum*.

Este segundo tipo de floco talvez tenha-se formado, principalmente, pela adesão inicial das células em bolhas de ar que depois permanecia ocluso, inflando o floco |005|.

Os flocos tornaram-se visíveis a partir das 6 h de cultivo, (o que corresponde aproximadamente à metade da fase exponencial, como pode ser visto na figura 4.29, e nessa altura as células também se mostravam amareladas quando eram separadas do caldo por filtração. Não ficavam tão rosadas como nos ensaios em incubador rotativo (cf. 4.1.3.1) mas a mudança de coloração não deixava dúvidas quanto ao acúmulo de carotenóides.

Como já comentado anteriormente, NUR et alii |135,136,137| encontraram uma estreita relação entre a formação de carotenóides e a agregação celular apenas para uma cepa (Cd) entre várias estudadas. Outros indícios de semelhança entre essa cepa e a sp 245 foram encontrados, e este assunto será retomado no item 4.39.

## 4.3.5 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio FD4

A tabela 4.27 e a figura 4.24 apresentam os resultados obtidos ao longo do ensaio FD4, enquanto na tabela 4.28 e na figura 4.25 encontram-se os resultados da aplicação de método dinâmico de medição da de  $k_L$  e  $QO_2$  em alguns instantes do cultivo. Seguindo a metodologia descrita no item 3.6.12, foram determinados os valores de  $k_L$  e  $QO_2$  que constam da tabela 4.29 e da figura 4.26.

Tabela 4.27 Resultados do ensaio FD4 (Experimento 3).

t (h)	X (g/L)	S (g/L)	Ni (g/L)	P (g/L)	A	pH	M (mg/L)	$QO_2$ (L/min)	% $O_2$ dissolv.
0,0	0,30	12,19	0,55	0,20	0,31	7,00	7,00	4,60	100,0
2,0	0,39	12,02	0,55	0,25	0,18	7,00	7,00	4,60	84,0
4,0	0,76	11,67	-	0,54	0,50	6,80	6,80	4,60	80,0
5,0	1,16	11,40	0,49	0,71	1,29	6,70	6,70	4,60	76,0
6,0	1,53	10,06	0,45	0,85	1,95	6,90	6,90	4,60	71,0
7,0	2,04	8,78	0,39	1,05	2,89	7,00	7,00	4,60	66,0
8,0	2,90	6,84	0,27	1,48	4,70	7,00	7,00	4,60	57,0
9,0	3,91	4,13	0,14	1,98	5,00	7,00	7,00	4,00	52,0
10,0	5,14	1,32	0,02	2,49	5,90	7,00	7,00	6,90	62,0
11,0	5,51	0,25	0,01	2,62	6,00	7,00	7,00	6,90	74,0
12,0	4,94	0,25	0,01	2,37	-	7,20	1085	6,90	72,0

Observada flocculação entre 0 e 4 h de cultivo



**Tabela 4.28** Resultados da aplicação do método dinâmico para determinação de  $k_{L,a}$  e  $QO_2$  ao cultivo de A. brasiliense em frutose. Ensaio FD4

t (s)	t = 1,5h		t = 3,0h		t = 5,5h		t = 6,5h		t = 7,5h		t = 8,5h		t = 9,5h		t = 10,5h		t = 11,5h		t = 12,0h	
	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>	t (s)	% O <sub>2</sub>
0	86,0	0	83,0	0	78,0	0	69,0	0	59,5	0	50,5	0	46,0	0	70,0	0	76,0	0	72,0	
20	86,0	30	82,5	30	73,5	30	66,5	30	54,0	20	48,0	20	36,0	10	68,0	10	75,0	10	71,0	
40	86,0	60	78,5	60	67,5	60	58,0	60	41,0	40	38,0	40	15,0	20	63,5	20	71,0	20	68,0	
60	85,0	90	76,5	90	61,5	90	50,0	90	29,5	60	26,0	60	8,0	30	57,5	30	67,0	40	61,0	
80	84,5	120	75,5	120	56,5	120	43,0	120	20,0	80	16,0	80	7,0	40	49,5	40	61,5	60	51,5	
100	83,0	150	74,5	150	52,5	150	36,5	150	12,0	100	7,0	100	22,0	50	41,0	50	54,5	80	40,0	
120	81,5	180	74,0	180	48,0	180	32,5	170	13,5	120	7,0	120	31,5	60	31,0	60	47,0	100	27,5	
140	81,0	210	74,0	210	45,5	210	29,5	190	30,0	140	21,0	140	38,0	70	22,0	70	39,0	120	16,5	
160	80,5	240	75,0	240	43,5	240	26,5	210	42,0	160	34,0	160	41,5	80	16,0	80	30,5	130	12,5	
180	80,0	270	79,0	270	41,5	270	24,0	230	49,0	180	39,0	180	43,0	90	12,0	90	22,0	140	10,0	
200	81,0	300	81,0	300	40,0	300	21,0	250	53,5	200	42,5	200	44,0	100	9,0	100	16,5	160	11,0	
220	82,0	330	82,0	330	50,0	320	22,0	270	55,8	220	44,5	220	44,5	130	12,0	110	13,0	170	23,0	
240	84,0	360	83,0	360	64,0	340	36,5	290	56,5	240	46,0	240	44,5	140	21,0	120	10,0	180	36,0	
260	86,0				69,0	360	48,5	310	57,8	260	47,0	260	47,0	150	31,5	130	25,0	190	46,0	
280	86,5				71,5	380	56,0	330	58,1	280	48,0	280	48,0	160	40,5	150	40,5	200	52,0	
300	86,0				73,0	400	60,0							170	47,0	170	52,0	210	57,0	
						420	62,0							180	52,0	180	57,5	220	30,0	
						440	64,0							200	59,0	190	61,0	230	53,0	
						460	65,0							220	62,5	200	64,5	250	66,0	
						480	65,8							230	64,0	220	68,5	260	67,0	

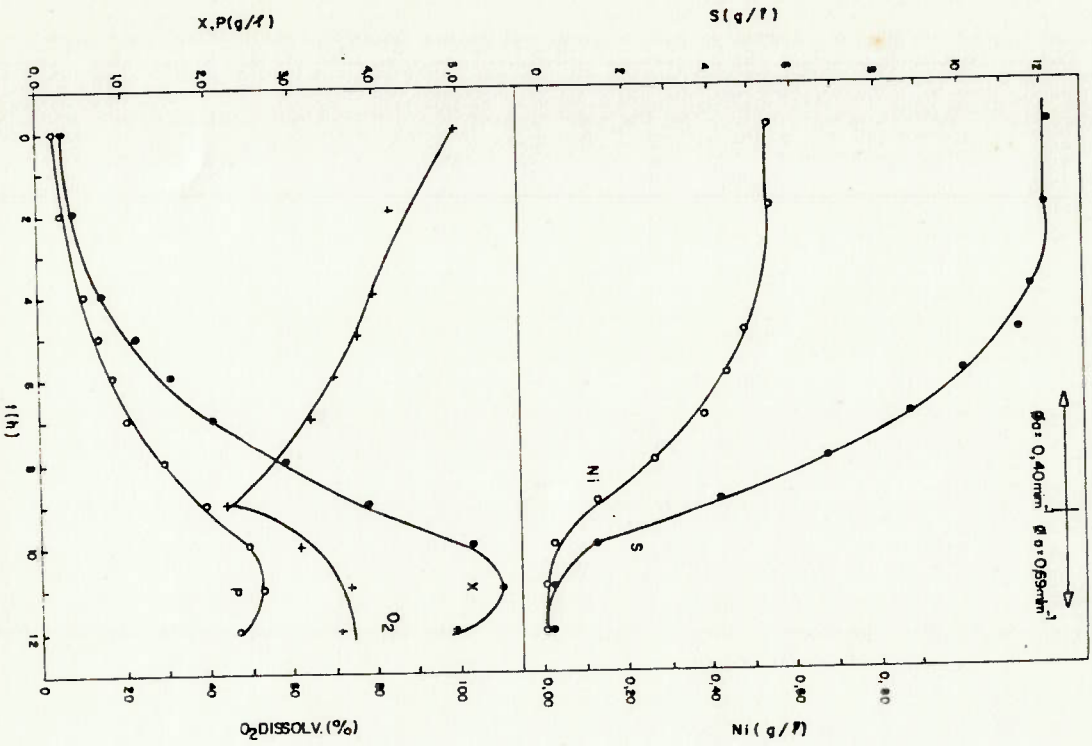


FIGURA 4.24 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S), PROTEÍNA CELULAR (P), NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) E % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO FD 4. (EXPERIMENTO 4)

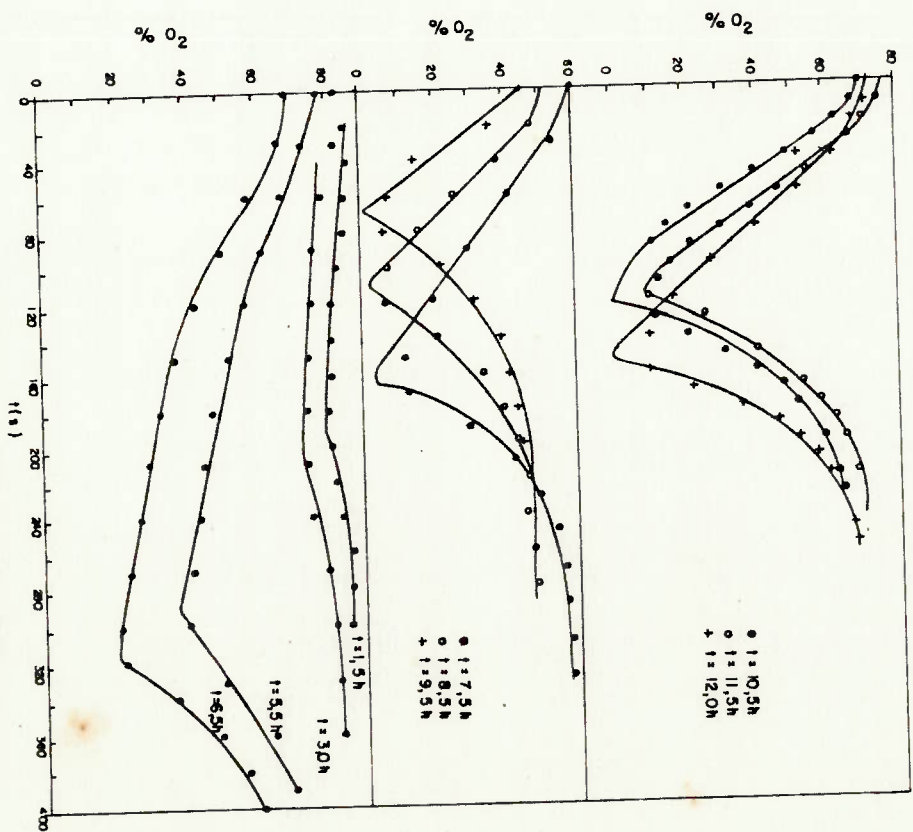


FIGURA 4.25 - APLICAÇÃO DO MÉTODO DINÂMICO PARA CÁLCULO DE CO<sub>2</sub> E K<sub>1</sub> EM DIVERSOS INSTANTES DO ENSAIO FD 4 (EXPERIMENTO 3)

Tabela 4.29 Concentração celular, vazão de ar, demanda total de oxigênio ( $Q_{O_2} \cdot X$ ), velocidade específica de respiração de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) e coeficiente de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ) ao longo do ensaio FD4. (Experimento 3)

tempo de cultivo (h)	X* (g/l)	vazão de ar (l/min)	$Q_{O_2} \cdot X$	$Q_{O_2}$	$K_{La}$ ( $10^2 s^{-1}$ )
1,5	0,35	4,60	0,98	2,80	2,29
3,0	0,57	4,60	0,79	1,37	2,31
5,5	1,25	4,60	2,39	1,91	1,37
6,5	1,72	4,60	2,18	1,27	2,73
7,5	2,47	4,60	7,44	3,01	2,68
8,5	3,30	4,60	11,21	3,40	2,60
9,5	4,40	6,90	14,56	3,31	3,90
10,5	5,35	6,90	15,83	2,96	3,41
11,5	5,40	6,90	15,07	2,79	2,93
12,0	4,95	6,90	11,97	2,42	3,69

\* Os valores de X foram interpolados da curva da figura 4.27.  $Q_{O_2} \cdot X$  dado em  $10^{-4} \text{ mmol } O_2 / l \cdot s$  e  $Q_{O_2}$  em  $10^{-4} \text{ mmol } O_2 / g \text{ cel.} \cdot s$

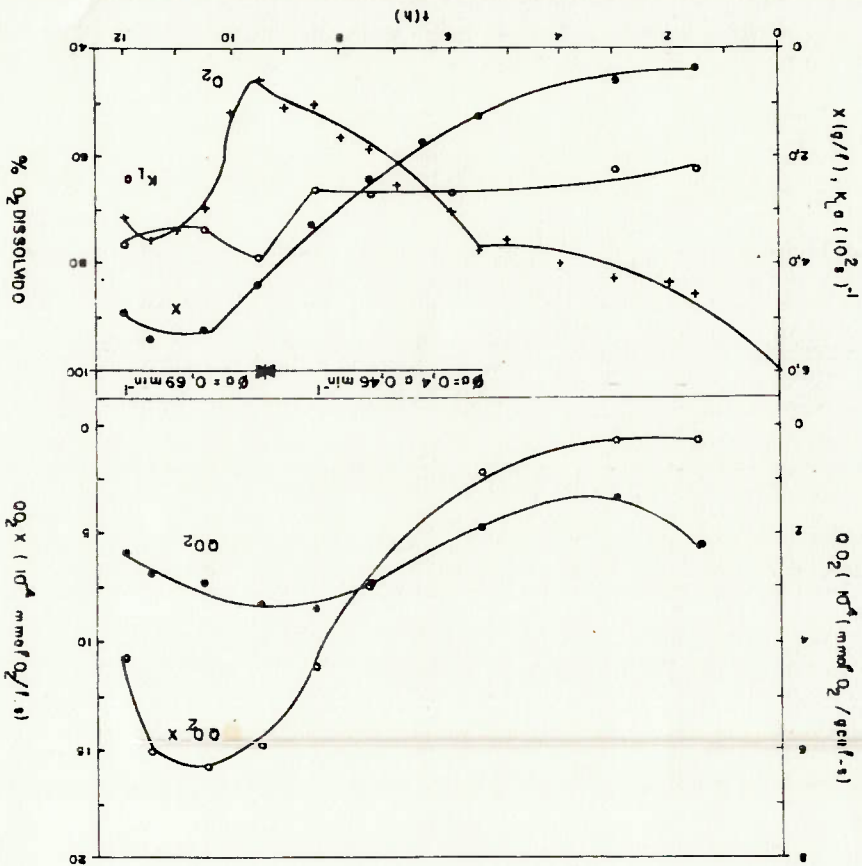


FIGURA 4.26 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), PORCENTAGEM DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO ( $Q_{O_2}$ ), DEMANDA TOTAL DE OXIGÊNIO ( $Q_{O_2} \cdot X$ ) E COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO ( $K_{La}$ ) AO LONGO DO ENSAIO FD4 (EXPERIMENTO 3)

Desta última figura pode-se avaliar que a velocidade específica de respiração não é constante durante a fase exponencial (de 2 a 10 h, cf. figura 4.29) como seria de se esperar. Observou-se um incremento de 2,5 vezes no valor de  $QO_2$  entre o início da fase exponencial e o seu valor máximo, que ocorreu para 8,5 h de cultivo. Esse aumento do  $QO_2$  estava possivelmente relacionado com a diminuição do oxigênio dissolvido, como já foi observado por NUR et alii [36] para *A. brasiliense* Cd. Essa possibilidade é reforçada pela posterior diminuição de  $QO_2$  quando  $O_2$  voltou a aumentar, após 9,5h de cultivo (cf. figura 4.24).

Da tabela 4.29 e da figura 4.26 pode-se também perceber a influência da aerção no coeficiente de transferência de oxigênio. Às 9 h de cultivo a vazão de ar foi modificada de 4,0 para 6,9 l/min, para aumentar a concentração de oxigênio dissolvido e, em consequência, facilitar a aplicação do método dinâmico. O valor de  $k_L a$  que vinha se mantendo desde as 6,5 h em torno de  $2,65 \cdot 10^{-2} s^{-1}$  ( $95,4 h^{-1}$ ) aumentou rapidamente para  $3,90 \cdot 10^{-2} s^{-1}$  ( $140 h^{-1}$ ) decaindo do posteriormente para  $2,93 \cdot 10^{-2} s^{-1}$  e terminando o cultivo em  $3,69 \cdot 10^{-2} s^{-1}$  ( $133 h^{-1}$ ).

Ou seja, a um aumento de cerca de 70% na aerção corresponderam acréscimos da ordem de 10 a 50% no  $k_L a$  que fez supor que também neste caso o coeficiente de transferência de oxigênio poderia ser proporcional à vazão de ar elevada a uma potência positiva, mas inferior a 1,0, como já foi encontrado por diversos autores [206].

Na figura 4.28 deve-se comentar o comportamento observado para  $CO_2$  e para  $k_{La}$ . Este manteve-se praticamente constante, em torno de  $2.10^{-2} s^{-1}$  ( $72 h^{-1}$ ) ao longo do cultivo, em decorrência de terem ficado constantes também a agitação e a aeração. Ou seja, as variações físico-químicas e biológicas ocorridas ao longo do cultivo influenciaram pouco a  $CO_2$  e  $k_{La}$ .

procedimento indicado, e a cultura manteve-se em crescimento exponencial entre 4 e 11 h (cf. figura 4.29).  
vado da tabela 4.30 conseguiu-se manter o pH entre 6,0 e 7,0 com o mínimo desse controlador na escala industrial. Como pode ser observado nas tabelas 4.11 e 4.21) e pensando-se em eliminar a necessidade de controle automático de pH, promovendo-se periodicamente a adição de NaOH e medindo-se o valor de pH após cada adição. Foi adotado esse procedimento levando-se em consideração que o crescimento bacteriano não é muito sensível à variação de pH, como pode ser verificado dos cultivos em agitador rotativo, em que houve crescimento exponencial para variações de pH bem pronunciadas (cf. tabelas 4.11 e 4.21) e pensando-se em eliminar esse controlador na escala industrial. Como pode ser observado da tabela 4.30 conseguiu-se manter o pH entre 6,0 e 7,0 com o procedimento indicado, e a cultura manteve-se em crescimento exponencial entre 4 e 11 h (cf. figura 4.29).

Neste ensaio foi eliminado o controle automático de pH, promovendo-se periodicamente a adição de NaOH e medindo-se o valor de pH após cada adição. Foi adotado esse procedimento levando-se em consideração que o crescimento bacteriano não é muito sensível à variação de pH, como pode ser verificado dos cultivos em agitador rotativo, em que houve crescimento exponencial para variações de pH bem pronunciadas (cf. tabelas 4.11 e 4.21) e pensando-se em eliminar esse controlador na escala industrial. Como pode ser observado da tabela 4.30 conseguiu-se manter o pH entre 6,0 e 7,0 com o procedimento indicado, e a cultura manteve-se em crescimento exponencial entre 4 e 11 h (cf. figura 4.29).  
os resultados encontrados na tabela 4.31.

diversas medidas de  $CO_2$  e  $k_{La}$  pelo método dinâmico (cf. 3.6.12) e a 100% durante todo o cultivo (cf. tabela 4.30). Foram efetuadas medidas de  $CO_2$  dissolvido que ficaram próximas de 100% durante todo o cultivo (cf. tabela 4.30). Foram efetuadas medidas de  $CO_2$  dissolvido que ficaram próximas de 100% durante todo o cultivo (cf. tabela 4.30).  
dezas medidas ao longo do cultivo. Note-se que na figura 4.27 não foram lançados os valores de %  $CO_2$  dissolvido que ficaram próximos de 100% durante todo o cultivo (cf. tabela 4.30). Foram efetuadas diversas medidas de  $CO_2$  e  $k_{La}$  pelo método dinâmico (cf. 3.6.12) e os resultados encontrados na tabela 4.31.

#### 4.3.6 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio FDS

Tabela 4.30 Resultados do ensaio FDS. (Experimento 3).

t (h)	X (g/l)	S (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A	pH*	M* (mg/l)	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,30	16,04	0,83	0,20	0,29	7,00	0	100,0
2,0	0,53	16,04	0,87	0,33	0,39	6,90	0	100,0
4,0	1,51	14,53	0,86	0,70	1,68	6,50	4	100,0
6,0	2,05	13,96	0,74	1,00	3,20	6,20	700	100,0
8,0	3,67	9,32	0,62	1,88	4,30	6,90	801	100,0
9,0	4,22	6,96	0,51	2,18	4,90	6,80	992	99,0
10,0	4,93	3,85	0,38	2,55	5,40	6,80	1506	100,0
11,0	6,06	-	0,20	-	6,58	6,80	2058	94,0
12,0	6,16	0,26	0,17	3,45	6,10	7,20	2160	100,0
13,0	6,66	0,29	0,18	3,79	5,25	7,25	2160	100,0

Melo de cultura com 1,5 g EI/l  
 \* pH não controlado - adição manual de NaOH

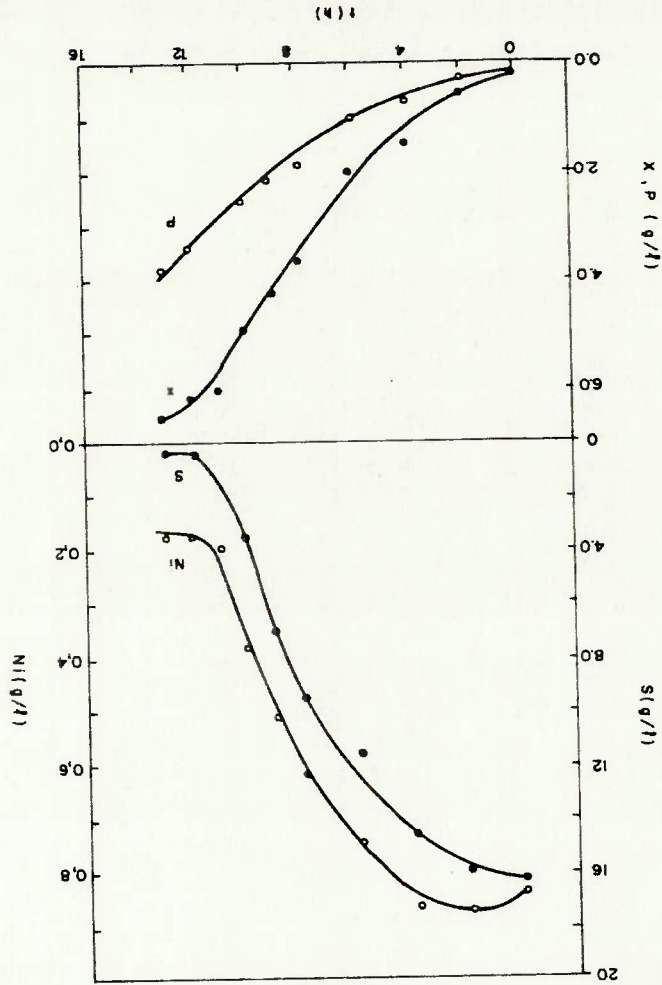


FIGURA 4.27 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), E CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE (S), PROTEÍNA CELULAR (P) NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) AO LONGO DO ENSAIO FDS (EXPERIMENTO 3)

Fluíram muito pouco na variação de  $k_{La}$ .

Por outro lado, a velocidade específica de respiração decaiu praticamente ao longo de todo o ensaio, provavelmente em resposta à concentração de oxigênio dissolvido que ficou constante, perto da saturação (cf. tabela 4.27).

A discussão conjunta dos resultados de  $\text{O}_2$  para os ensaios FD4 e FD5 será efetuada no item 4.3.9.

**Tabela 4.31** Concentração celular (X), demanda total de oxigênio ( $\text{QO}_2$ .X), velocidade específica de respiração ( $\text{QO}_2$ ) e coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) ao longo do ensaio FD5. (Experimento 3).

tempo de cultivo (h)	X* (g/l)	( $\text{QO}_2$ .X) ( $\frac{10^{-4} \text{mmol O}_2}{\text{l.s}}$ )	$\text{O}_2$ ( $\frac{10^{-4} \text{mmol O}_2}{\text{g cel.s}}$ )	$k_{La}$ ( $10^2 \text{s}^{-1}$ )
2,5	0,90	5,79	6,43	2,49
4,5	1,40	5,96	4,25	2,26
5,5	1,85	9,37	5,06	2,55
6,5	2,5	8,52	3,41	2,07
7,5	3,1	9,69	3,12	1,83
8,5	3,9	9,80	2,51	2,03
9,5	4,5	9,59	2,13	1,57
10,5	5,3	12,57	2,37	1,93
11,5	6,1	12,78	2,09	1,91
12,5	6,4	8,37	1,31	1,88

\*Valores de X interpolados da curva da figura 4.38

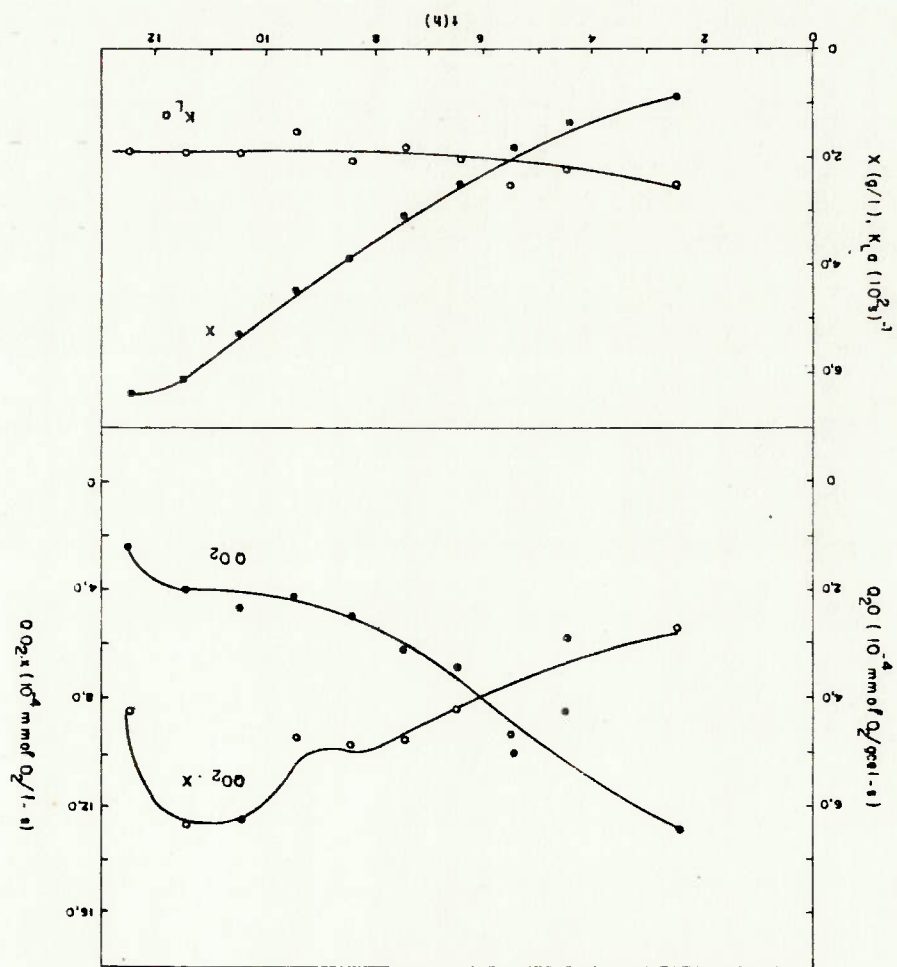


FIGURA 4.28 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), VELOCIDADE ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO ( $Q_{O_2}$ ), DEMANDA TOTAL DE OXIGÊNIO ( $Q_{O_2} \cdot X$ ) E COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO ( $K_L a$ ) AO LONGO DO ENSAIO FD 5 (EXPERIMENTO 3).



## 4.3.7 Concentrações Celulares (N) dos Ensaios do E3

A tabela 4.32 reúne as concentrações celulares numéricas finais, determinadas por contagem em câmara de Petroff Hauser (cf. 3.6.2) para os ensaios do E3 e também para o ensaio FS29 (experimento 2). Desta mesma tabela constam também as concentrações celulares massicas e as de proteína celular e as relações X/N (massa celular unitária) e P/N (conteúdo protéico celular). A variação dessas grandezas segundo as condições dos ensaios serão analisados no item 4.3.9.

**Tabela 4.32** Concentrações celulares (N,X) e de proteína celular (P) para as amostras finais dos ensaios do E3 e FS29.

Ensaio	tempo de cultivo (h)	So (g/l)	(aprox.) (g/l)	concent. ext. leved. (g/l)	N	X (g/l)	P (g/l)	X/N	P/N
--------	----------------------	----------	----------------	----------------------------	---	---------	---------	-----	-----

FD2	10	8	1,0	1,7	3,18	1,74	1,9	1,0	1,0
FD3	10	9	1,0	3,1	3,31	1,90	1,1	0,6	0,6
	11	9	1,0	3,7	3,15	2,02	0,9	0,6	0,6
FD4	12	12	1,0	3,0	4,94	2,37	1,7	0,8	0,8
FD5	12	16	1,5	2,0	6,16	3,45	3,1	1,8	1,8
	13	16	1,5	2,1	6,66	3,79	3,2	1,8	1,8
FS29	27	16	1,5	1,0	6,41	-	6,5	-	-

N dado em  $10^{12}$  cel/l ; X/N dado em  $10^{-12}$  g/cel ;

P/N dado em  $10^{-12}$  g prot/cel

#### 4.3.8 Influência da Concentração Inicial de Frutose nos Fato-

res de Conversão e Produtividades no Cultivo de *A. bra-*

*siliense* em Fermentador

Na tabela 4.33 foram reunidos os valores iniciais e finais de diversas grandezas dos ensaios do E3, para facilitar os cálculos dos fatores de conversão e produtividades que constam da tabela 4.34. Nesta última também aparecem as velocidades específicas máximas de crescimento e os tempos para início das fases exponenciais, que foram determinados a partir da figura 4.29.

Na figura 4.30 onde foram lançados essas grandezas em função de  $S_0$  nota-se que os valores para  $S_0 \approx 16 \text{ g/l}$  não estão inteiramente de acordo com o esperado, tendo em vista que no ensaio FD5 foi usado 1,5 g EL/l e que os resultados do FS29 tinham sido bastante anormais (cf. 4.2.2 e tabela 4.22). Esperavam-se aumentos da ordem de, no mínimo, 25% na concentração celular (X) em relação ao ensaio com  $S_0 = 12 \text{ g/l}$  (FD4). O que se observou, ao invés disso, foi um aumento de apenas 12,5% na concentração celular mássica, acompanhado de decréscimos de 33,3% na concentração celular numérica e de 16% em  $Y_{X/S}$  e 7% em  $Y_{X/N}$ .

Em termos de produtividades o ensaio FD5 também apresentou resultados pouco animadores, pois, se  $P_X$  do FD5 aumentou em 4% em relação à do FD4,  $P_N$  diminuiu 37%.

Comparando-se as condições e os resultados do FS29 (cf. 4.2.2) com os do FD5 (cf. 4.3.6) observa-se que a maior diferença entre ambos poderia estar na manutenção da altas porcentagens de oxigênio dissolvido no FD5 (cf. tabela 4.30), enquanto no FS29 essa porcentagem não foi medida e, possivelmente, caiu bastante ao longo do ensaio. No item seguinte, procurar-se-á verificar a influência desse parâmetro sobre o comportamento de *A. brasiliense* sp 245.

**Tabela 4.33** Tempo final de crescimento, concentrações iniciais e finais de células, frutose, nitrogênio inorgânico e proteína para o ensaio do experimento 3.

Ensaio	$t_F$ (h)	$X_0$ (g/l)	$X_F$ (g/l)	$S_0$ (g/l)	$S_F$ (g/l)	$(N)_0$ (g/l)	$(N)_F$ (g/l)	$P_0$ (g/l)	$P_F$ (g/l)	N
FD1	8,0	0,20	2,92	4,97	0,09	0,24	0,02	-	-	-
FD2	9,0	0,40	3,62	8,15	0,40	0,48	0,11	0,26	1,70	1,7
FD3	9,0	0,34	4,30	8,97	0,30	0,56	0,17	0,20	1,84	3,1
FD4	11,0	0,30	5,51	12,19	0,25	0,55	0,01	0,20	2,62	3,0
FD5	12,0	0,30	6,20	16,04	0,17	0,83	0,17	0,20	3,45	2,0

N dado em  $10^{12}$  cel/l

**Tabela 4.34** Tempo para início da fase exponencial, velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{max}$ ), fatores de conversão de frutose em células ( $Y_{X/S}$ ,  $Y_{N/S}$ ) e em proteína ( $Y_{P/N}$ ), fatores de conversão de nitrogênio inorgânico em células ( $Y_{X/N}$ ,  $Y_{N/N}$ ) e em proteína ( $Y_{P/N}$ ) e produtividades celulares ( $P_X$ ,  $P_N$ ) para os ensaios do experimento 3.

Ensaio	$t_1$ (h)	$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	$Y_{X/S}$	$Y_{N/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{X/N}$	$Y_{N/N}$	$Y_{P/N}$	$P_X$	$P_N$
FD1	2,0	0,33	0,56	-	-	12,31	-	-	0,34	-
FD2	2,0	0,29	0,42	2,19	0,19	8,41	4,59	3,9	0,36	1,9
FD3	2,0	0,34	0,46	3,58	0,19	10,15	7,95	4,2	0,44	3,4
FD4	2,0	0,33	0,44	2,51	0,20	9,65	5,56	4,5	0,47	2,7
FD5	4,0	0,20	0,37	1,26	0,20	8,94	3,03	4,9	0,49	1,7

$Y_{X/S}$  dado em g cel/g frutose;  $Y_{N/S}$  dado em  $10^{11}$  cel/g frutose;  
 $Y_{P/S}$  dado em g prot/g frutose;  $Y_{X/N}$  dado em g cel/g N;  
 $Y_{N/N}$  dado em  $10^{12}$  cel/g N;  $Y_{P/N}$  dado em g prot/g N;  
 $P_X$  dado em g cel/l.h;  $P_N$  dado em  $10^{11}$  cel/l.h

FIGURA 4.30 - INFLUENCIA DESDE NA CONCENTRACAO CELULAR FINAL (N) NAS  
 PRODUTIVIDADES, NOS FATORES DE CONVERSAO E NA VELOCIDADE  
 ESPECIFICA MAXIMA DE CRESCIMENTO DE A. BRASILENSE SP 245  
 A 38°C. (EXPERIMENTO 3)

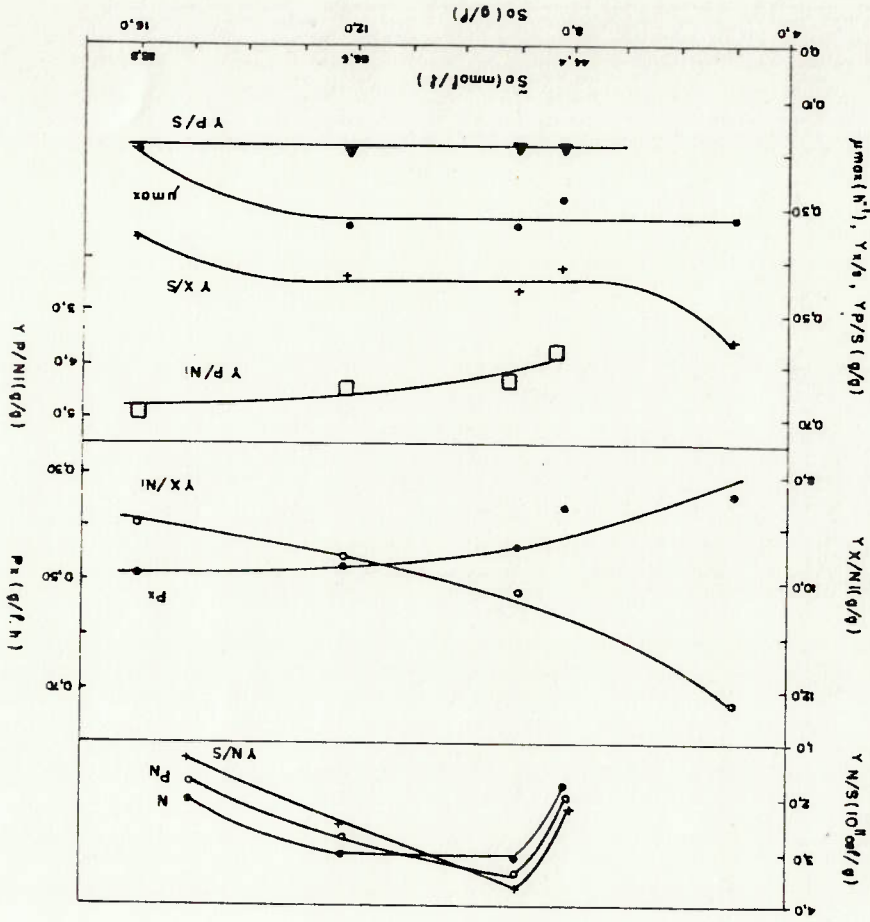
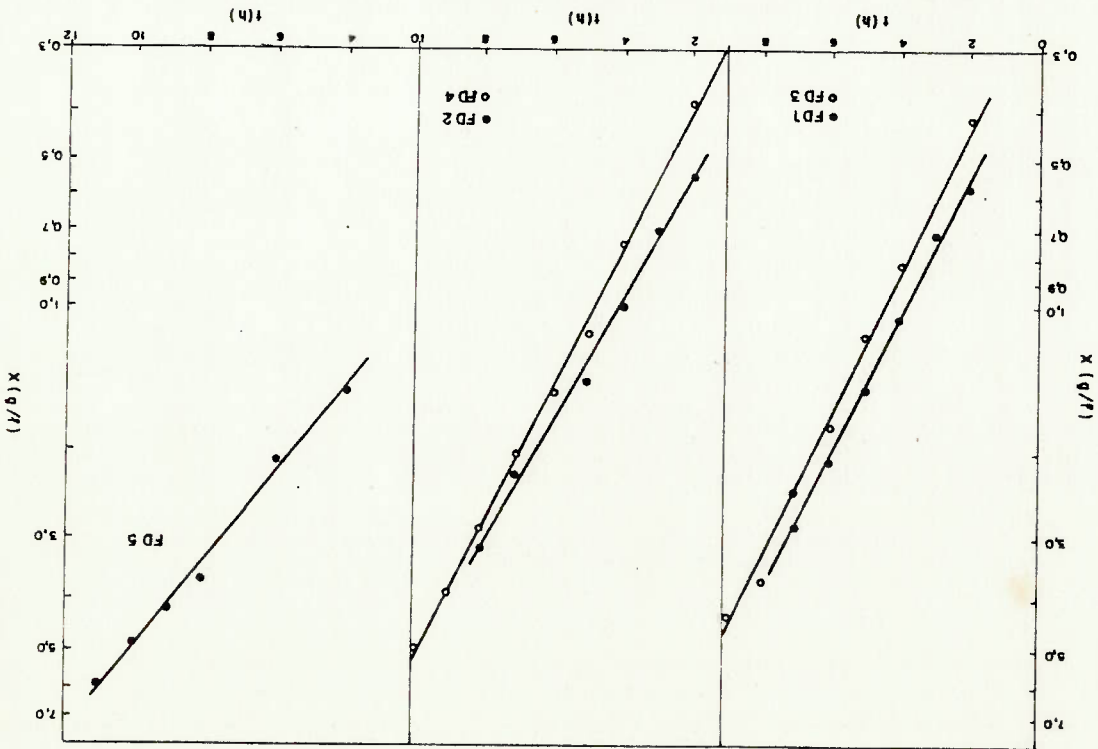


FIGURA - 4.29 - CONCENTRACAO CELULAR (X) EM FUNCAO DO TEMPO DE CULTIVO  
 PARA OS ENSAIOS DO EXPERIMENTO 3.



Os resultados obtidos nos ensaios efetuados em fermentador com meios de cultura contendo 1,0 g FL/l permitiram estreitar a faixa de concentração inicial de frutose mais adequada ao cultivo de *A. brasiliense* sp 245. Da figura 4.30, levando-se em consideração a concentração celular (N) e a produtividade  $P_N$ , pôde-se definir que o  $S_0$  deveria estar entre 9 e 12 g/l. Na avaliação econômica (capítulo 7) serão utilizadas as condições e resultados do ensaio FD3.

#### 4.3.9 Influência do Oxigênio Dissolvido sobre Alguns Parâmetros Fisiológicos de *A. brasiliense* sp 245

De uma forma geral, a ordem de grandeza para a massa média de células bacterianas é  $10^{-12}$  g/cel [10111,183].

Para *A. brasiliense* encontraram-se poucas informações que pudessem servir para comparação. Em um artigo de OKON et alii [142] existe uma estimativa para células de *S. lipoternum* cultivadas aerobicamente, indicando ser a massa média celular de  $2,0$  a  $3,0 \cdot 10^{-12}$  g/cel. Os resultados apresentados na tabela 4.32 assemelham-se aos acima mencionados, a não ser no ensaio FS29.

A variação na massa celular média observada poderia ser motivada pelas condições de cultivo (principalmente oxigenação e disponibilidade de nutrientes), pelo acúmulo intracelular de nutrientes ou carotenóides ou PHB, como discutido a seguir.

Nas condições vigentes nos cultivos em fermentador, não havia possibilidade de formação de PHB, uma vez que as tensões de oxigênio dissolvido eram elevadas (acima de 50%), não permitindo o acúmulo apreciável dessa substância [191]. Entretanto, os mesmos autores citados determinaram que em agitador rotativo, a velocidade ótima para formação de PHB era de 150 rpm, e que nessas condições as células podiam acumular até 75% do seu peso em PHB, dependendo

da relação C/Nitrog. Lembrando-se que a velocidade de agitação no ensaio FS29 era de 200 rpm, e que a concentração celular obtida era bastante elevada ( $N=1,0 \cdot 10^{12}$  cel/l), o que provavelmente causou lixiviação de oxigênio (ou pelo menos porcentagens de  $O_2$  dissolvido inferiores a 30%), pode-se supor que as células acumularam PHB ao final do ensaio FS29.

Em muitos dos cultivos de *A. brasilense* sp 245 em frutose, tanto em incubador rotativo quanto em fermentador, notou-se a formação de carotenóides, pois conforme já foi mencionado, as células apresentavam-se amareladas ou rosadas.

A formação de carotenóides em duas cepas de *A. brasilense* foi determinada em condições de velocidades específicas de crescimento não muito altas (da ordem de  $0,12 \text{ h}^{-1}$ ). Nessas condições, o conteúdo de carotenóides da cepa Cd estava diretamente relacionado com a tensão de oxigênio no meio de cultura, na faixa de  $0,02$  a  $0,18 \text{ atm}$  (10 a 86% da saturação).

Entretanto, apesar da importância dos carotenóides na possibilidade de flocculação, na mudança de coloração (e portanto da relação entre absorvância e concentração celular), eles não poderiam explicar quantitativamente a variação da massa celular observada nos ensaios do E3 (cf. tabela 4.32), pois o máximo valor encontrado por NUR et alii [135, 136] foi de aproximadamente  $1 \text{ mg/g cel}$ , ou seja  $0,1\%$  da massa celular.

Em vista disso, a causa mais provável para as diferenças de massa celular média e de proteína por célula observadas, principalmente para o FD5, seria o aumento do teor protéico em decorrência da alta porcentagem de oxigênio dissolvido ou da maior disponibilidade de substâncias orgânicas no extrato de levedura ou na menor velocidade específica de crescimento. Para avaliar qual desses fatores poderia ter um peso maior, foi construída a figura 4.31 onde

se lançaram os valores das porcentagens de proteína celular e de oxigênio dissolvido ao longo dos cultivos para os ensaios FD2 a FD5.

Em *A. brasiliense* Cd, NUR et alii [136] depararam-se com uma situação em que o conteúdo protéico celular era dependente da tensão de oxigênio dissolvido, aumentando de 35% em proteína para 55% quando  $P_{O_2}$  aumentava de 0,02 para 0,21 atm.

Na figura 4.31 pode-se notar que para *A. brasiliense* sp 245 o comportamento é semelhante: nos ensaios FD2, FD3 e FD4 a porcentagem de proteína diminuiu quando  $P_{O_2}$  diminuiu e nos dois primeiros ela voltou a aumentar quando  $P_{O_2}$  aumentou. No FD4 talvez não se tenha sentido o incremento de %P por não se ter acompanhado por mais tempo o comportamento microbiano. Esse decréscimo no teor protéico poderia estar ligado também à alta velocidade de crescimento ( $\mu_{max}$  de 0,29 a  $0,34h^{-1}$  nos três ensaios, cf. tabela 4.34 que não permitia o acúmulo de substâncias de reserva.

No FD5 o comportamento foi um pouco diferente: houve um decréscimo do teor protéico apenas antes da cultura entrar em crescimento exponencial ( $t_L = 4$  h, cf. tabela 4.34) e daí em diante a %P manteve-se praticamente constante em torno de 50%. É difícil dizer qual fator foi mais importante para esse resultado, pois neste caso, conjugaram-se favoravelmente os três: altas tensões de  $P_{O_2}$ , velocidade específica de crescimento não tão elevada ( $0,20 h^{-1}$ ) e meio enriquecido, que pode contribuir com substâncias facilmente "acumuláveis" pelas bactérias.

Dos outros três ensaios (FD2, FD3, FD4), entretanto, dada a igualdade de concentração de extrato de levedura e a proximidade das velocidades específicas de crescimento pode-se concluir que o microrganismo mostrou uma tendência a acumular maiores porcentuais de proteína para  $P_{O_2}$  mais elevadas, exatamente como observado para

Outra influência importante do oxigênio observada para A. *brasiliense* Cd foi a diminuição da velocidade específica de respiração com o aumento de  $P_{O_2}$ , como pode ser observado do gráfico da figura 4.32, construído a partir de um outro apresentado por NUR et alii [135]. Como se pode observar, os valores de  $\bar{Q}O_2$  variaram de  $14.10^{-4}$  mmol  $O_2$ /g.s para  $P_{O_2} = 0,007$  atm até  $9.10^{-4}$  em  $P_{O_2} = 0,21$  atm (concordando em quase toda a faixa com a curva geral da figura 2.5) e são um pouco inferiores aos reportados para A. *brasiliense* sp 7 (cf. tabela 2.3) em malato que variaram (considerando um teor protéico médio de 50%) de  $6,5.10^{-4}$  a  $12,2.10^{-4}$  mmol  $O_2$ /g cel.s [104].

Na figura 4.32 foram também lançados os valores de  $\bar{Q}O_2$  medidos no ensaio FD4 para a cepa sp 245 e nota-se que, embora as curvas apresentem comportamentos similares na faixa de  $P_{O_2}$  comum a ambas, os valores para a cepa sp 245 são cerca de 3 a 5 vezes inferiores aos da cepa Cd.

Essas diferenças podem ter sido motivadas por vários fatores como temperatura, velocidade específica de crescimento, composição do meio de cultura, etc. Para eliminar a influência de um desses fatores ( $\mu$ ) foram calculados, pela expressão (4.1) os fatores molares de conversão de oxigênio em células:

$$\tilde{Y}_{X/O} = \frac{\bar{Q}O_2}{\mu} \quad (4.1)$$

Da figura 4.32, para  $P_{O_2} = 0,126$  atm (60% de oxigênio dissolvido) para a cepa Cd,  $\bar{Q}O_2 = 12.10^{-4}$  mmol  $O_2$ /g.s, e esse valor foi determinado em quimiostato, com  $D = 0,08$  h $^{-1}$  [136]. Assim:

$$\tilde{Y}_{X/O} = \frac{0,08}{3600 \text{ s}} \cdot \frac{12.10^{-4}.10^{-3} \text{ mol } O_2}{1} \text{ g cel.s}$$



FIGURA 4.32 - VARIAÇÃO DE  $pO_2$  COM A TENSÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO  
 (P<sub>02</sub>) PARA AS CEPAS CD(●) E SP245(○).  
 CEPA ED-ADAPTAÇÃO DE (136).

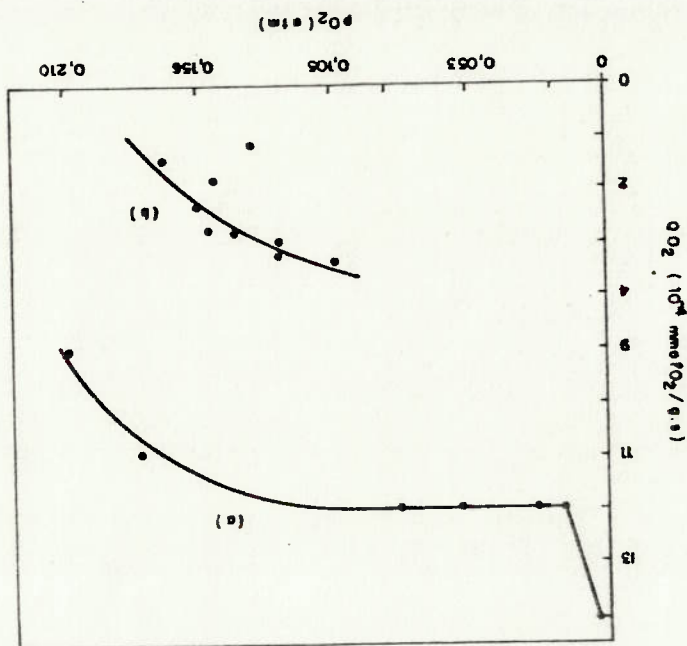
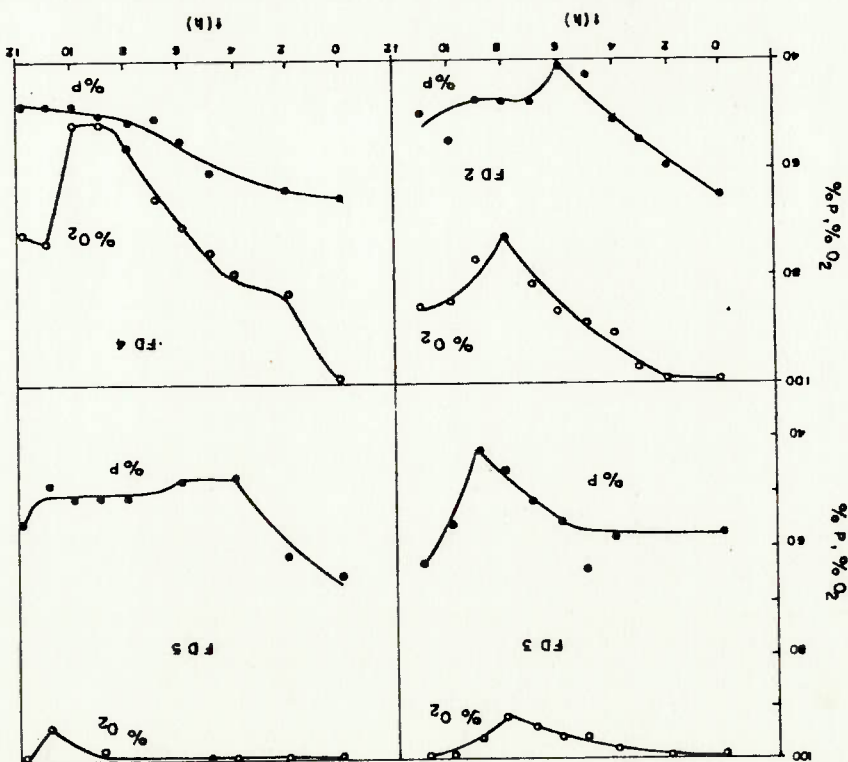


FIGURA 4.31 - PORCENTAGEM DE PROTEÍNA CELULAR (%P) E DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (% $O_2$ ) AO LONGO DOS ENSAIOS DO E3.



$$\bar{y}_{X/O} = 18,5 \frac{\text{g cel}}{\text{mol O}_2}$$

Efetuadao cálculo similar para o mesmo  $\text{PO}_2$ , no caso da cepa sp 245, no FD4 crescendo com  $\mu_{\text{max}} = 0,33 \text{ h}^{-1}$

$$\bar{y}_{X/O} = \frac{3600 \text{ s}}{0,33} \cdot \frac{3 \cdot 10^{-7} \text{ mol O}_2}{1 \text{ g cel} \cdot \text{s}}$$

$$\bar{y}_{X/O} = 305,6 \frac{\text{g cel}}{\text{mol O}_2}$$

Essa grande diferença nos fatores de conversão indica que a cepa sp 245 apresentava eficiência bioenergética muito superior, motivada pela temperatura mais favorável (38 °C em lugar de 30 °C da cepa Cd) e pela presença de compostos orgânicos no extrato de levedura que "economizam" energia de transformação |186,188,204| e portanto, oxigênio.

No ensaio FD5 a velocidade específica de respiração apresentou comportamento absolutamente distinto do ensaio FD4, pois como pode ser visto na figura 4.28, ela foi decrescente com o passar do tempo de cultivo. As principais diferenças entre os dois ensaios foram as maiores concentrações de frutose e extrato de levedura no FD5 e o fato da concentração de oxigênio dissolvido durante o FD5 ter sido sempre superior a 90%, o que não ocorreu no FD4 (cf. tabelas 4.27 e 4.30).

Calculando-se os fatores de conversão de oxigênio em células, pela equação 4.1, no início, no meio e no final da fase exponencial de crescimento, encontram-se:

$$t = 4 \text{ h} : \bar{y}_{X/O} = 101,0 \frac{\text{g cel}}{\text{mol O}_2}$$

$$t = 7,5 \text{ h} : \bar{y}_{X/0} = 185,2 \frac{\text{g cel}}{\text{mol O}_2}$$

$$t = 11 \text{ h} : \bar{y}_{X/0} = 277,8 \frac{\text{g cel}}{\text{mol O}_2}$$

Os valores crescentes de  $\bar{y}_{X/0}$  com o tempo de cultivo, indicando maior eficiência biossintética no final do crescimento, mostram que o efeito inibitório da frutose (cf. equação 4.2, item 4.3.10), além de diminuir a velocidade de crescimento, influi decisivamente no dispêndio de energia para manutenção das funções celulares, como explicado em [130,153,188].

Deve-se salientar ainda que os maiores valores de  $\bar{y}_{X/0}$  observã-

dos no FD4 em relação ao FD5, mesmo nos finais dos cultivos (quando o efeito inibitório da frutose já não se faria sentir) poderiam estar ligados ao aparecimento de maior quantidade de citocromos c

motivados pela concentração de oxigênio dissolvido mais baixa do

FD4, como já foi demonstrado por LALANDE & KNOWLES [110] (cf. 2.4.2).

Em função dos resultados obtidos podem-se efetuar algumas recomendações para a operação do fermentador, principalmente no tocante à manutenção de concentração de oxigênio dissolvido mais baixa, que importa em eficiências biossintéticas mais elevadas e necessárias, de outro lado, de menores coeficientes de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ), e, portanto, de condições menos energéticas de aeração e agitação.

Essa última conclusão pode ser alcançada através da figura 4.32 usando os valores de  $\bar{O}_2$  para  $P_{O_2} = 0,105 \text{ atm}$  (50% da saturação) ou  $P_{O_2} = 0,189 \text{ atm}$  (90% da saturação) e a equação 2.7, com

$$k_{La}(C^*-C) = \bar{O}_2 \cdot X$$

e admitindo-se concentração celular  $X = 5,0$  g/l em ambos os casos:

$$\text{para } C = 90\% , \bar{Q}O_2 = 1.10^{-4} \frac{\text{mmol } O_2}{\text{g.s}}$$

$$\Rightarrow k_{La} = 2,09.10^{-2} s^{-1} = 74,9 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{para } C = 50\% , \bar{Q}O_2 = 3,5.10^{-4} \frac{\text{mmol } O_2}{\text{g.s}}$$

$$\Rightarrow k_{La} = 1,46.10^{-2} s^{-1} = 52,6 \text{ h}^{-1}$$

#### 4.3.10 Comparação entre os Resultados do Cultivo Descontínuo

de *A. brasiliense* sp 245 em Agitador e em Fermentador

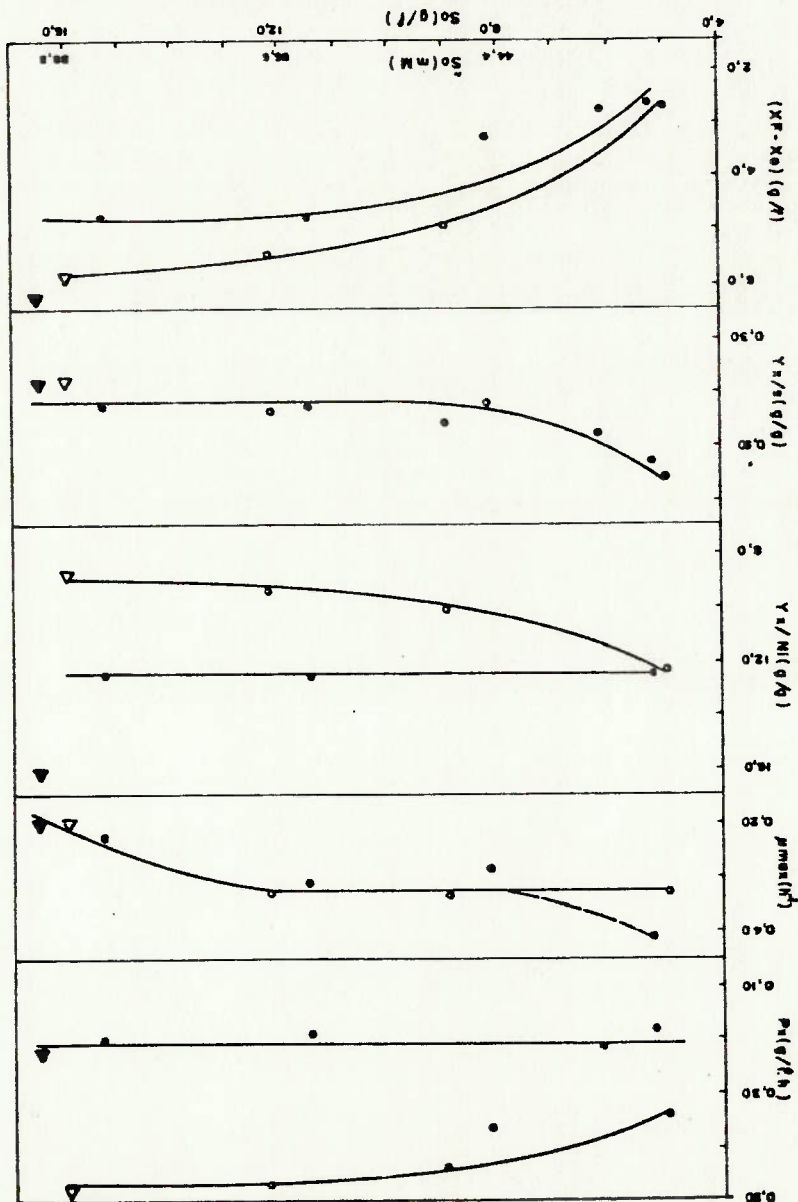
A partir das tabelas 4.21, 4.22, 4.33 e 4.34 foi construída a figura 4.33 onde foram lançadas diversas grandezas em função da concentração inicial de frutose, para o intervalo comum aos experimentos.

Observou-se que na velocidade específica máxima de crescimento e no fator de conversão  $Y_{X/S}$  praticamente não houve diferenças entre os cultivos em agitador e em fermentador.

Os resultados de  $\mu_{max}$  em função da concentração inicial de frutose confirmam a existência de inibição pelo substrato, como sugerido no item 2.5.1 (cf. figura 2.7). Para calcular a função  $\mu = \mu(S)$  foi utilizado o método de MARQUARDT |21| conforme também aplicado recentemente por GORDANO |077|. A função resultante do tipo da eq. 2.18 (equação de ANDREWS |002|), dada por:

$$\mu = \frac{0,52 \cdot S}{1,43 + S + S^2/17,03} \quad (4.2)$$

FIGURA 4.33 - COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE CULTIVOS DESCONTINUOS DE  
 A. BRASILIENSE SP 245 COM FRUTOSE  
 FERMENTADOR : (●) - 1,0 g EL/L ; (▲) 1,5 g EL/L  
 INCUBADOR ROTAT : (○) - 1,0 g EL/L ; (△) 1,5 g EL/L



Os objetivos principais dos ensaios do E4 foram avaliar a facilidade de obtenção de regimes permanentes no cultivo contínuo de *A. brasiliense* sp 245 e determinar, as variações na produtividade e nos fatores de conversão em função de diferentes vazões específicas de alimentação.

#### 4.4.1 Objetivos e Condições dos Ensaios do E4

#### 4.4 Experimento 4 (E4)

ma a 0,30 g/l. ordem de 0,10 a 0,15 g/l e nos ensaios em fermentador estava próxima elevada, uma vez que  $X_0$  nos ensaios em incubador rotativo era da ordem (cf. tabelas 4.22 e 4.34) e concentração celular inicial mais mentalmente a dois fatores: diminuição da fase "lag" no fermentador 2,5 vezes em relação à do agitador. Esse aumento foi devido fundamentalmente a produtividade neste equipamento aumentou cerca de 20% em relação ao fermentador. Nas concentrações de  $S_0$  de 0,5 a 1,0 g/l, notou-se que houve um grande aumento no processo em fermentador. Quanto à produtividade celular, notou-se que houve um grande aumento com o aumento de  $S_0$ .

de cultura com 1,0 e 1,5 g EL/l e no fermentador decresceu continuamente. São  $Y_{X/N}$  que no incubador rotativo manteve-se constante para meios Comportamento não esperado foi observado para o fator de conversão

$$S_0 = 16 \text{ g/l com } 1,5 \text{ g EL/l.}$$

um incremento também para a concentração celular numérica, para na faixa de  $S_0 \approx 16 \text{ g/l}$ . Os resultados da tabela 4.32 confirmam de cerca de 0,5 g/l para  $S_0$  na faixa de 5 g/l até cerca de 1,0 g/l pior à obtida em incubador rotativo, com a diferença aumentando A concentração celular obtida em fermentador foi ligeiramente superior

Foram realizados dois ensaios em cultivo contínuo (segundo a metodologia descrita em 3.5), com frutose como fonte de carbono. A temperatura em ambos foi de 38 °C, como em todos os do E2 e do E3. Um dos ensaios (F1) foi realizado com meio de cultura de concentração de frutose aproximadamente na faixa determinada pelo E3 ( $S_0 = 8,40$  g/l) com 1,0 g de extrato de levedura/l; neste ensaio, usou-se frequência de agitação de 530 rpm, com vazões de ar entre 3,0 e 4,0 l/min ( $\phi = 2,0$  min<sup>-1</sup>).

No outro ensaio (F2) utilizou-se meio de cultura de composição aproximada ao FD5 ( $S_0 = 16$  g/l, com 1,5 g de extrato de levedura/l) para verificar se, em cultivo contínuo, o microrganismo poderia suprir os efeitos inibitórios causados pelo substrato e apresentar altas produtividades celulares. No F2, para tentar evitar a limitação de oxigênio sentida no F1 (cf. tabela 4.35) a frequência de agitação e a vazão de ar foram aumentadas, respectivamente, para 660 rpm e 6,0 l/min ( $\phi = 3,0$  min<sup>-1</sup>).

#### 4.4.2 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio F1

A tabela 4.35 e a figura 4.34 apresentam os resultados obtidos no F1. Na figura 4.35 não foram lançados os valores da % de oxigênio dissolvido por ter essa grandeza apresentado flutuações que aparentemente não estiveram ligadas ao desenvolvimento microbiano. Observou-se que a turbina superior encontrava-se próxima à superfície do líquido, causando intensa aspersão do mesmo contra as paredes do fermentador e aerção superficial irregular que motivou a flutuação observada. Deve-se observar que, mesmo com o aumento da vazão específica de aerção a partir das 42,5 h de cultivo (cf. tabela 4.35) a cultura esteve desde as 55 h com porcentagem de oxigênio dissolvido inferior a 10%, numa situação de limitação de oxigênio

Tempo de processo cont. (h)	X (g/l)	S (g/l)	Ni (g/l)	Absor-bância	% <sup>2</sup> dissolv.	massa NaOH p/manut. pH const (mg/l)
-----------------------------	---------	---------	----------	--------------	-------------------------	-------------------------------------

0,0	3,95	0,13	0,08	5,00	20,0	0
3,0	3,54	0,13	0,05	3,90	41,0	210
6,0	3,51	0,14	0,07	3,70	37,0	610
9,0	3,55	0,13	0,05	3,52	44,0	1190
12,0	3,61	0,12	0,05	3,05	46,0	1340
21,0	3,62	0,13	0,05	3,52	54,0	2800
23,0	3,89	0,11	0,04	3,57	58,0	3110

26,5	3,68	0,11	0,04	3,55	41,0	3930
29,5	3,46	0,11	0,03	3,40	34,0	4610
32,5	3,36	0,30	0,08	3,47	39,0	5290
35,5	3,73	0,11	0,12	3,47	36,0	5880

38,5	-	0,50	0,07	3,68	26,0	6720
41,5	4,03	0,33	0,06	3,82	12,0	7570
44,5	4,12	0,11	0,06	3,75	7,0	8420
47,5	4,03	0,11	0,06	3,62	14,0	9820
51,5	4,09	0,12	0,06	3,47	12,0	10960
55,5	4,05	0,12	0,07	3,47	9,0	12050
57,5	4,06	0,15	0,09	3,70	8,0	12570

70,0	2,52	3,24	0,22	3,65	6,0	15990
75,0	2,28	3,37	0,20	3,30	9,0	17450
78,0	2,19	3,66	0,20	3,15	5,0	18520
81,0	2,38	3,15	0,20	3,52	5,0	19370

de 0 a 23 h :  $D_1 = 0,179 \text{ h}^{-1}$  ; de 23,5 a 37,5 h :  $D_2 = 0,180 \text{ h}^{-1}$   
 de 37,5 a 57,5 :  $D_3 = 0,283 \text{ h}^{-1}$  ; de 57,5 a 81,0 h :  $D_4 = 0,381 \text{ h}^{-1}$

de 0 a 42,5 h :  $\phi_1 = 1,5 \text{ min}^{-1}$  ; de 42,5 a 81 h :  $\phi_2 = 2 \text{ min}^{-1}$

$S_0 = 8,40 \text{ g/l}$  ;  $(Ni)_0 = 0,39 \text{ g/l}$

Tabela 4.35 Resultados do ensaio FCl. (Experimento 4).



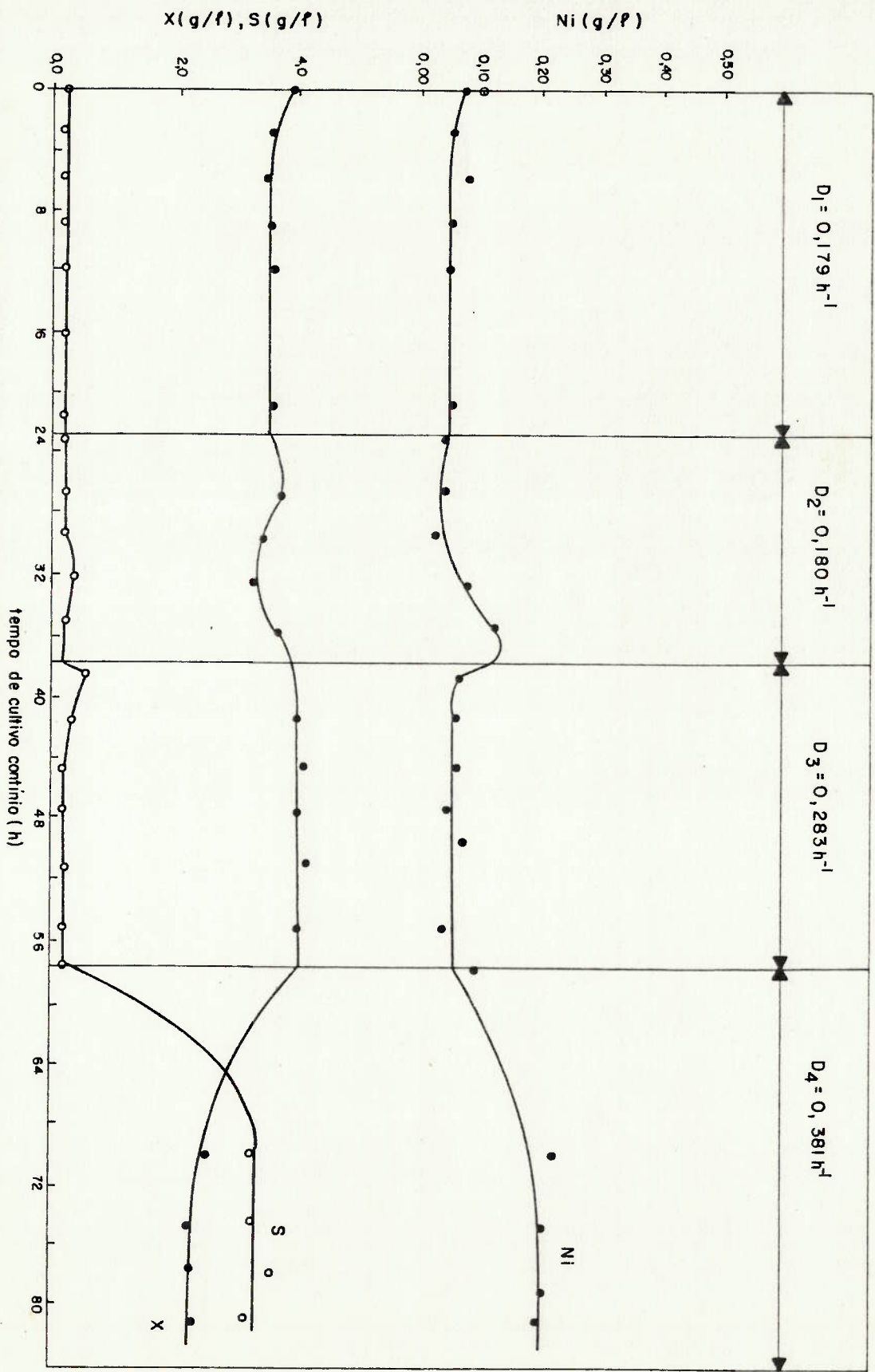


FIGURA 4.34 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÃO DE FRUTOSE E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) PARA O CULTIVO CONTÍNUO DE *A. BRASILENSE* SP 245 NO ENSAIO FCI (EXPERIMENTO 4).

Durante o cultivo, tentou-se uma modificação na vazão específica de alimentação que não foi bem sucedida: às 23 h, ao se mudar a vazão de alimentação, não se conseguiu mantê-la constante, tendo-se observado, durante algum tempo, decréscimo da mesma; após algum tempo, não se conseguiu estabilizá-la, procurou-se novo ajuste que proporcionasse uma vazão constante. Assim, o valor  $D_2 = 0,180 \text{ h}^{-1}$  é um valor médio para todo o intervalo entre 23,5 e 37,0 h.

Como se observa da figura 4.34, foram obtidos três regimes permanentes, cujos principais resultados estão reunidos na tabela 4.36 e na figura 4.36 (ver 4.4.4). Apesar da limitação de oxigênio entre o primeiro e o segundo regimes permanentes foram obtidos praticamente os mesmos valores para concentrações de células e de fruto se residual. A formação de pequenos flocos foi observada praticamente ao longo de todo o cultivo.

**Tabela 4.36** Vazões específicas de alimentação, concentrações, fatores de conversão e produtividades para os regimes permanentes do ensaio FCL. (Experimento 4).

parâmetro	regime permanente	
	de 9,0 a 23 h de 41,5 a 57,5 h	de 70,0 a 81,0 h
D ( $\text{h}^{-1}$ )	0,179	0,283
$X_j$ ( $\text{g}/\ell$ )	3,67	4,06
$S_0$ ( $\text{g}/\ell$ )	8,40	8,40
$S_j$ ( $\text{g}/\ell$ )	0,12	0,12
$(N)_0$ ( $\text{g}/\ell$ )	0,39	0,39
$(N)_j$ ( $\text{g}/\ell$ )	0,05	0,07
Massa NaOH para manutenção pH ( $\text{mg}/\ell \cdot \text{h}$ )	120	313
$Y_{X/S}$ ( $\text{gcel}/\text{gfrut}$ )	0,44	0,49
$Y_{X/N_1}$ ( $\text{gcel}/\text{g N}_1$ )	10,6	12,4
$P_X$ ( $\text{g}/\ell \cdot \text{h}$ )	0,66	1,15
		0,89
		12,5
		0,46
		307
		2,34
		8,40
		3,36
		0,39
		0,21

#### 4.4.3 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio FC2

A tabela 4.37 e a figura 4.35 apresentam os resultados obtidos ao longo de todo o ensaio FC2 enquanto da tabela 4.38 constam as concentrações celulares numéricas em alguns instantes do ensaio, com seus correspondentes valores de X e P.

Como se observa da figura 4.35 foram obtidos dois regimes permanentes, para os valores das vazões específicas  $0,158$  e  $0,182 \text{ h}^{-1}$ , devendo-se notar que este último valor representa 91% da máxima velocidade específica obtida em cultivo descontínuo, no ensaio FD5 (cf. tabela 4.34). A tabela 4.39 apresenta os valores médios das grandezas nos regimes permanentes e os fatores de conversão e produtividade. Pequenos flocos foram observados durante todo o cultivo.

Na primeira etapa do ensaio FC2, caracterizada pela vazão específica,  $D_1 = 0,106 \text{ h}^{-1}$  o sistema não alcançou regime permanente, devido, ao que parece, à limitação da concentração de oxigênio dissolvido que entre 18 e 24 h esteve entre 2,0 e 4% da saturação ( $P_{O_2}$  entre  $0,004$  e  $0,008 \text{ atm}$ ). As condições de agitação e aeração (que tinham sido alteradas tentando evitar exatamente a limitação de oxigênio (como foi exposto em 4.4.1) não foram suficientes para assegurar a oxigenação necessária à cultura e essa limitação tal-vez tenha sido agravada se a cepa sp 245 tiver comportamento similar à Cd também para valores de  $P_{O_2}$  abaixo de  $0,01 \text{ atm}$  em que a velocidade específica de respiração aumentou sensivelmente, como pode ser visto na figura 4.32.

Na variação de  $P_{O_2}$  com a tensão de oxigênio dissolvido estaria também a explicação para o fato da cultura ter alcançado regimes permanentes com concentrações celulares da mesma ordem de grandeza (e até superiores, como no segundo regime permanente) daquela que motivou a limitação já referida.

Tabela 4.37 Resultados do ensaio FC2. (Experimento 4)

Tempo de contínuo (h)	X (g/l)	S (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A	M (mg/l)	O <sub>2</sub> dissolvido %
-----------------------	---------	---------	----------	---------	---	----------	-----------------------------

0,0	4,95	4,63	0,24	2,31	5,70	0	4,0
12,0	5,45	0,29	0,12	2,18	5,50	600	28,0
15,0	5,35	0,29	0,14	2,69	5,60	675	21,0
18,0	4,07	0,35	0,18	2,18	4,65	1080	2,0
21,0	5,18	0,31	0,19	-	6,20	2174	3,0
24,0	4,33	0,24	0,23	2,27	6,40	2897	4,0
36,0	4,44	3,68	0,41	2,05	5,35	3585	32,0
39,0	5,12	4,15	0,40	2,46	5,71	4269	20,0
42,0	4,53	3,43	0,30	2,30	5,15	5191	13,0
45,0	5,09	1,28	0,21	2,59	5,90	6152	8,0

60,0	5,32	4,36	0,36	2,54	6,05	10271	12,0
63,0	5,01	4,12	0,40	2,35	5,75	10853	12,0
66,0	4,60	4,18	0,37	2,27	5,30	11413	10,0
69,0	4,85	4,95	0,34	2,39	5,50	-	9,0
72,0	5,07	3,90	0,34	2,41	5,80	13618	9,0

85,0	7,15	1,01	0,24	2,62	7,10	19131	6,0
87,0	6,60	0,43	0,24	2,44	6,57	20013	6,0
89,0	6,74	0,21	0,24	2,79	6,65	20895	6,0
91,0	7,16	0,26	0,24	2,79	7,60	21777	6,0
93,0	6,89	0,28	0,24	-	7,50	22350	6,0

de 0 a 45 h :  $D_1 = 0,106 \text{ h}^{-1}$  ; de 45 a 72 h :  $D_2 = 0,158 \text{ h}^{-1}$   
 de 72 a 93 h :  $D_3 = 0,182 \text{ h}^{-1}$  ;  $\phi = 3,0 \text{ min}^{-1}$

$S_0 = 16,22 \text{ g/l}$  ;  $(N_i)_0 = 0,800 \text{ g/l}$

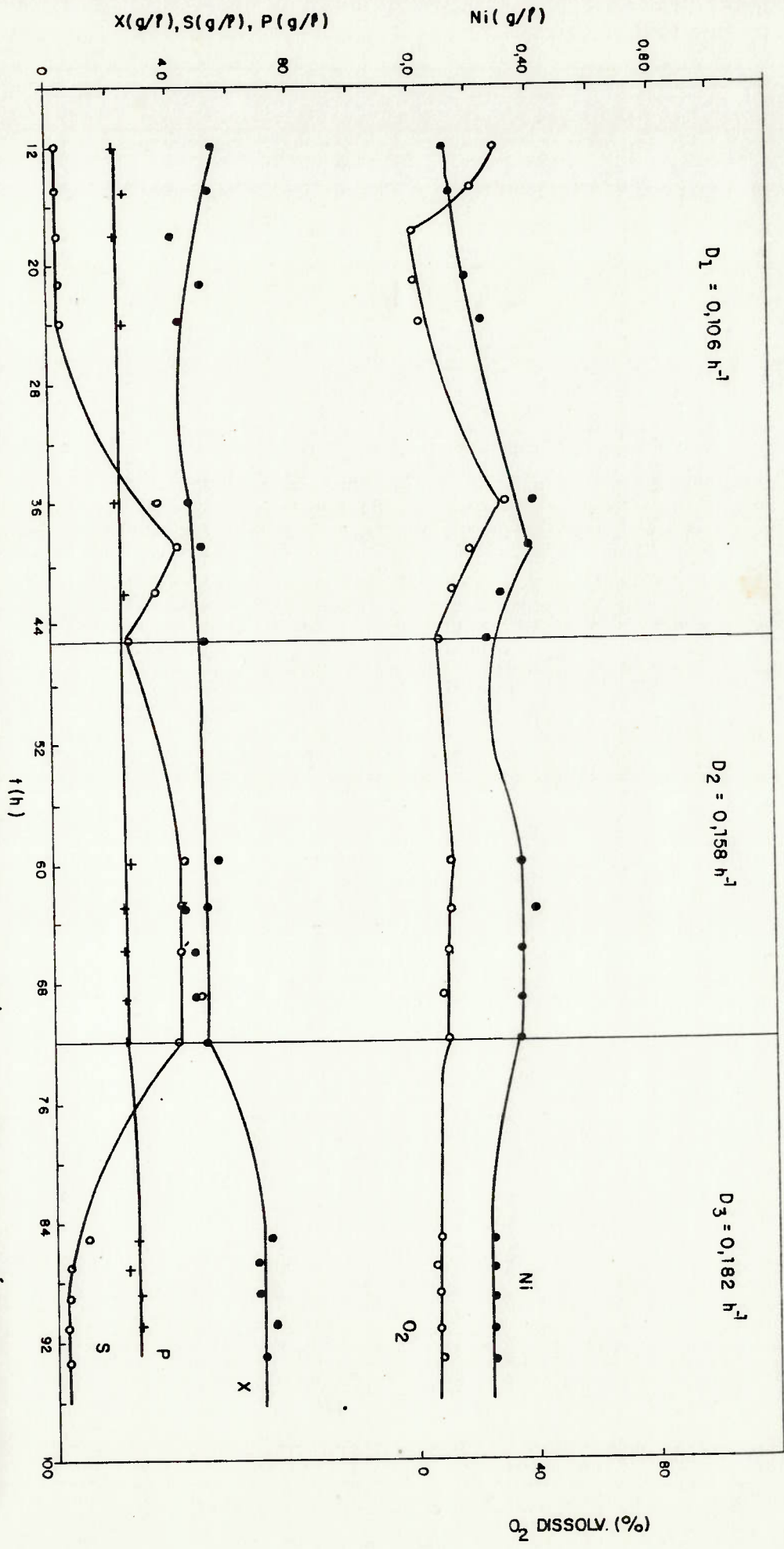


FIGURA 4.35 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE FRUTOSE(S), NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) PROTEÍNA(P)E% DE  $O_2$  DISSOLVIDO PARA O CULTIVO CONTÍNUO DE A. BRASILENSE SP 245 NO ENSAIO FC 2 (EXPERIMENTO 4)

No início do cultivo contínuo havia alto residual de frutose com baixa tensão de oxigênio dissolvido e a tendência da cultura seria aumentar a concentração celular e, portanto, o produto  $\text{O}_2 \cdot X$  (que representa a demanda global de oxigênio), superaria o produto  $k_L a C^*$  (que representa o máximo suprimento de oxigênio) e importaria uma severa limitação de oxigênio à cultura, que traria como consequência o rápido decréscimo da concentração celular, com o aumento simultâneo das concentrações de frutose e de nitrogênio inorgânico. Com a diminuição da demanda global de oxigênio a sua concentração tenderia a aumentar, fazendo com que  $\text{O}_2$  diminuisse até um valor tal que  $\text{O}_2 \cdot X$  praticamente equilibrasse o suprimento de oxigênio e permitisse o estabelecimento do regime permanente.

Os teores proteicos encontrados neste ensaio apresentam mais uma forte evidência de que também são dependentes da concentração de oxigênio dissolvido, como já discutido no item 4.3.9. No ensaio FD5 em que a tensão de oxigênio esteve sempre próxima a 0,21 atm, a porcentagem de proteína celular variou entre 48 e 66% (com valor médio em torno de 50%, cf. figura 4.31) quando  $\mu_{\text{max}}$  era de  $0,20 \text{ h}^{-1}$ . Já no FC2 para velocidade específica de crescimento de mesma ordem de grandeza ( $0,182 \text{ h}^{-1}$ ) e tensão de oxigênio de 0,013 atm, o conteúdo proteico era de 41% (cf. tabela 4.38). Ou seja, para velocidades de crescimento próximas, o conteúdo proteico foi fortemente influenciado pelo  $\text{pO}_2$ .

Essa conclusão (e outras a que se chegou no item 4.3.9) é importante por mostrar que a cepa *A. brasiliense* sp 245 apresenta propriedades fisiológicas semelhantes às das *A. brasiliense* Cd, para a qual existem diversos estudos específicos |072,135,136,137,191|.

**Tabela 4.38** Concentração celular (X,N), e de proteína celular (P) e relações massa por célula (X/N), proteína por célula (P/N) e conteúdo celular protéico (P/X) durante o ensaio FC2. (Experimento 4).

Tempo de cultivo (h)	D (h <sup>-1</sup> )	N	X (g/l)	P (g/l)	X/N	P/N	P/X
----------------------	----------------------	---	---------	---------	-----	-----	-----

42,0	0,106	1,8	4,53	2,30	2,5	1,3	0,51
45,0	0,106	2,5	5,09	2,59	2,0	1,0	0,51
66,0	0,158	0,96	4,60	2,27	4,8	2,4	0,49
69,0	0,158	0,98	4,85	2,39	4,9	2,4	0,49
72,0	0,158	1,4	5,07	2,41	3,6	1,7	0,48
89,0	0,182	2,1	6,74	2,79	3,2	1,3	0,41

N dado em (10<sup>-12</sup> cel/l) ; X/N dado em (10<sup>-12</sup> g/cel)

P/N dado em 10<sup>-12</sup> g prot/cel) ; P/X dado em (g prot/g cel)

**Tabela 4.39** Vazões específicas de alimentação, concentrações, fatores de conversão e produtividades para os regimes permanentes do ensaio FC2. (Experimento 4).

Regime Permanente	de 60 a 72 h	de 85 a 93 h
-------------------	--------------	--------------

D (h <sup>-1</sup> )	0,158	0,182
X <sub>j</sub> (g/l)	4,97	6,91
N <sub>j</sub> (10 <sup>12</sup> cel/l)	1,2	2,1
S <sub>0</sub> (g/l)	16,22	16,22
S <sub>j</sub> (g/l)	4,30	0,30
(N <sub>1</sub> ) <sub>0</sub> (g/l)	0,80	0,80
(N <sub>1</sub> ) <sub>j</sub> (g/l)	0,36	0,24
F <sub>j</sub> (g/l)	2,39	2,91
massa NaOH para manutenção		
pH constante (mg/l.h)	279	402
Y <sub>X/S</sub> (g cel/g Frut)	0,42	0,43
Y <sub>X/N<sub>1</sub></sub> (g cel/g N <sub>1</sub> )	11,30	12,34
Y <sub>P/S</sub> (g prot/g Frut)	0,20	0,18
Y <sub>P/N<sub>1</sub></sub> (g prot/g N <sub>1</sub> )	5,43	5,20
Y <sub>N/S</sub> (10 <sup>12</sup> cel/g Frut)	0,10	0,13
Y <sub>N/N<sub>1</sub></sub> (10 <sup>12</sup> cel/g N <sub>1</sub> )	2,73	3,75
P <sub>X</sub> (g/l.h)	0,79	1,26
P <sub>N</sub> (10 <sup>11</sup> cel/l.h)	1,90	3,82

#### 4.4.4 Influência da Vazão Específica e da Concentração de Frutose nos Fatores de Conversão e Produtividades

A figura 4.36 apresenta as concentrações celulares, os fatores de conversão e as produtividades em função da vazão específica de alimentação para os regimes permanentes obtidos nos ensaios FC1 e FC2. Pode-se observar que os resultados obtidos para o ensaio FC1 estão bem de acordo com a teoria do cultivo contínuo  $|001,058,067,073,153|$  notando-se que a partir de uma certa vazão específica o regime permanece obtido elevado residual do nutriente limitante (frutose) e decréscimo na concentração e produtividades celulares. Deve-se observar, entretanto, que a equação 4.2 prevê (fazendo-se  $du/ds = 0$ ) um valor máximo de  $0,329 \text{ h}^{-1}$  para a velocidade específica de crescimento e, então, esse deveria ser o máximo valor para a vazão específica de alimentação, caso a equação 4.2 fosse aplicável ao cultivo contínuo. Como se observa da tabela 4.36 e da figura 4.36, conseguiu-se, no ensaio FC1 um regime permanente para um valor da vazão específica ( $0,381 \text{ h}^{-1}$ ) cerca de 16% superior ao previsto pela equação 4.2, levando à conclusão de que no cultivo contínuo os efeitos inibitórios da frutose sobre o microorganismo eram menos sentidos do que no descontínuo.

Para o ensaio FC2, a limitação de oxigênio e a variação de  $QO_2$  (cf. 4.4.3) modificaram totalmente o comportamento esperado, a ponto de residual de frutose na vazão específica  $D_2 = 0,152 \text{ h}^{-1}$  ser muito maior do que o da vazão  $D_3 = 0,182 \text{ h}^{-1}$

Apesar dessas limitações, os fatores de conversão não foram muito afetados. O de conversão de frutose em células ( $Y_{X/S}$ ) ficou praticamente constante para toda faixa de vazão específica e decaiu ligeiramente para a concentração mais elevada de frutose e de extrato de levedura. Já o fator  $Y_{X/N}$  aumentou com o aumento da



vazão específica, tanto para o F1 quanto para o F2, sugerindo que também para o ensaio F1 pudesse ter ocorrido uma situação de decréscimo do conteúdo protéico celular em função das baixas concentrações de oxigênio dissolvido observados nos dois últimos regimes permanentes. O aumento de  $Y_{X/N_1}$  do F2 em relação ao F1 certamente foi motivado pelo aumento do extrato de levedura.

A produtividade celular também se comportou segundo o esperado, tendo-se demarcado, no caso do F1 uma região de vazão específica (D  $\approx$  0,28 h<sup>-1</sup>) para a qual a produtividade era máxima. Para o F2 não foi possível demarcar tal região, com a possibilidade de que  $P_X$  (e também  $P_N$ ) viesse a aumentar, com o aumento da vazão específica de alimentação.

O aumento da produtividade no F2 em relação ao F1 para uma dada vazão específica deve-se tão somente à diferença de  $S_0$ , uma vez que os fatores de conversão são praticamente idênticos (cf. fig. 4.36).

Embora não se disponha dos valores da concentração celular N no ensaio F1, para calcular a produtividade  $P_N$ , pode-se fazer uma estimativa das mesmas, a partir dos resultados obtidos nos ensaios FD3, FD5 e F2, que foram reunidos na tabela 4.40.

Como se observa desta última tabela os ensaios realizados em condições de temperatura, concentrações de frutose e extrato de levedura e velocidades específicas de crescimento semelhantes, conduziram a concentrações celulares mássicas e fatores de conversão também semelhantes e no caso dos ensaios FD5-F2 a concentrações celulares numéricas idênticas.

Assim, pode-se adotar com razoável segurança o valor  $N = 3,1 \cdot 10^{12}$  cel/l para o regime permanente com  $D = 0,28$  h<sup>-1</sup> no ensaio F1, o que conduz a um valor de  $P_N = 8,7 \cdot 10^{11}$  cel/l.h.

Tabela 4.40 Comparação entre parâmetros de ensaios contínuo e descontínuo de cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em frutose.

Ensaio	FD3	FC1	FD5	FC2
$S_0$ (g/l)	8,97	8,40	16,04	16,22
EL (g/l)	1,0	1,0	1,5	1,5
$\mu$ ou D ( $h^{-1}$ )	0,34	0,28	0,20	0,18
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,46	0,45	0,37	0,42
X (g/l)	4,30	4,06	6,20	6,91
$N$ ( $10^{12}$ cell/l)	3,1	-	2,1	2,1

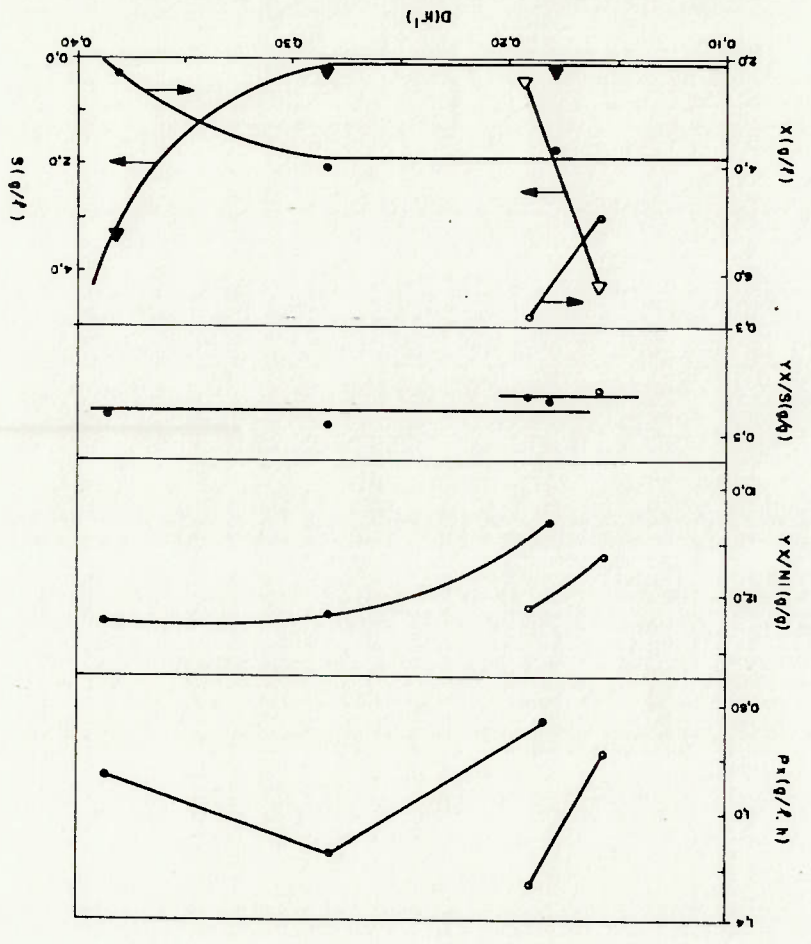


FIGURA 4.36 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) E DE FRUTOSE RESIDUAL (S), FATORES DE CONVERSÃO ( $Y_{X/S}$  e  $Y_{X/N}$ ) E PRODUTIVIDADE (P) SEGUNDO A VAZÃO ESPECÍFICA DE ALIMENTAÇÃO (PARA OS REGIMENS PERMANENTES DOS ENSAIOS DO EXPERIMENTO 4)

•, ▲ - ENSAIO FC1 ( $S_0 = 8,40$  g/l,  $1,0$  g E.L./l)

○, △ - ENSAIO FC2 ( $S_0 = 16,22$  g/l,  $1,5$  g E.L./l)

Este valor é 2,3 vezes superior ao obtido no segundo regime permanente de FC2, mas, provavelmente, a produtividade celular nas condições deste último ensaio ainda poderá aumentar, com o aumento da vazão específica.

Em face dos resultados obtidos até o momento, pode-se recomendar, para o processo contínuo, a produção de *A. brasiliense* em meio de cultura com 8,0 g de frutose e 1,0 g de EL por litro, com a vazão específica de alimentação entre 0,25 e 0,30 h<sup>-1</sup>, restando verificar posteriormente se o aumento da concentração inicial de frutose e de extrato de levedura conduzirá, efetivamente, ao aumento da concentração celular e da produtividade celular.

Em relação ao ensaio descontínuo em fermentador (FD3) que será utilizado para a avaliação econômica (cf. 4.3.8) o regime permanentemente do ensaio FDI com D=0,28 h<sup>-1</sup> apresentou, fatores de conversão  $Y_{X/S}$  e  $Y_{X/N_1}$  e produtividade ( $P_X$ ) respectivamente 6,5, 22,2 e 161,4 % superiores. Usando-se o valor recém calculado para a produtividade  $P_N$ , encontra-se que ela é 156 % superior à obtida em processo descontínuo (cf. tabela 4.34).

## 4.5 Parâmetros para Acompanhamento e Controle da Produção de A.

brasiliense sp 2454.5.1 Absorbância

Em todas as amostras coletadas durante os cultivos de A. bra-  
siliense sp 245 em frutose foram efetuadas, em paralelo, determina-  
ções de absorbância e concentração celular massica.

A figura 4.37 apresenta os resultados de X e A para seis en-  
saios descontínuos típicos, que cobrem condições bem variadas: cul-  
tivos em incubador rotativo (FS1, FS7, FS15, FS18) e em fermenta-  
dor (FD1, FD5), a 34°C (FS1, FS7), a 38°C (FS18, FD1, FD5) e a 40°C  
(FS15), com concentrações iniciais de frutose de 5,0 (FS1, FS7,  
FS15, FD1, 16,0 (FD5) e 19,2 g/l (FS18) e sem extrato de levedura  
(FS1), com 1,0 g EL/l (FS7, FS18, FS15, FD1) e com 1,5gEL/l (FD5).  
Como se observa, em quase todas as condições a absorbância acom-  
panhou bem de perto a concentração celular, principalmente nas fa-  
ses "lag" e exponencial.

Na fase de declínio houve algumas diferenças entre as grandezas  
devido à flocculação (como no FD5), à formação de carotenóides  
(FS18).

Apesar das diferenças, foi calculada para cada ensaio, a regres-  
são linear entre X e A e em todas elas a hipótese da dependência  
linear não pôde ser rejeitada ao nível de probabilidade de 5% |203|.  
Através de métodos estatísticos |050,179| foi possível agrupar  
as regressões relativas a todos os ensaios dos experimentos 1, 2,  
3 e 4 (21 cultivos, cf. tabela 3.2) em uma única equação, dada  
por:

$$X = 0,153 + 0,777 \cdot A \quad (r=0,964)$$

Essa expressão pode ser utilizada "em linha", como mencionado no item 2.6.2, para avaliação da concentração celular e também para o controle do processo descontínuo.

Para o cultivo contínuo, o mesmo tipo de análise foi efetuado, tendo-se lançado na figura 4.38 as concentrações celulares e, as absorvâncias ao longo dos ensaios FC1 e FC2. Existem, nitidamente, situações de total dissociação entre X e A, como nos primeiros períodos de ambos os cultivos, o terceiro do FSL e o último do FS2. Além disso, talvez em parte por causa do açúcar residual (que interferia na coloração da suspensão), talvez em parte pela agregação celular, às vezes os valores de X e A estavam muito próximos (2º período do FSL) e às vezes, embora com as mesmas variações, encontravam-se bem distantes (4º período do FSL).

Assim, para o cultivo contínuo de *A. brasiliense* sp 245 em frutose, não se recomenda utilizar a absorvância para o controle do processo.

Como revisito no item 2.6.2, a absorvância tem sido também utilizada para a determinação da velocidade específica de crescimento, no processo descontínuo, mas com essa finalidade deve-se tomar um pouco mais de cuidado na sua utilização.

E prática comum (116,122,207,208) estabelecer o "crescimento exponencial da absorvância" a partir de gráficos monolgarítmicos de A contra o tempo e então calcular a velocidade específica através de:

$$\mu_A = \frac{\ln A/A_0}{t - t_0} \quad (4.4)$$

Ocorre que a definição de  $\mu_X$  leva, no crescimento exponencial, a

FIGURA 438 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X, ●) E ABSORBÂNCIA (A, ○) PARA CULTIVOS CONTÍNUOS DE A. BRASILENSE SP 245 EM FRUTOSE (D - VAZÃO ESPECÍFICA DE ALIMENTAÇÃO)

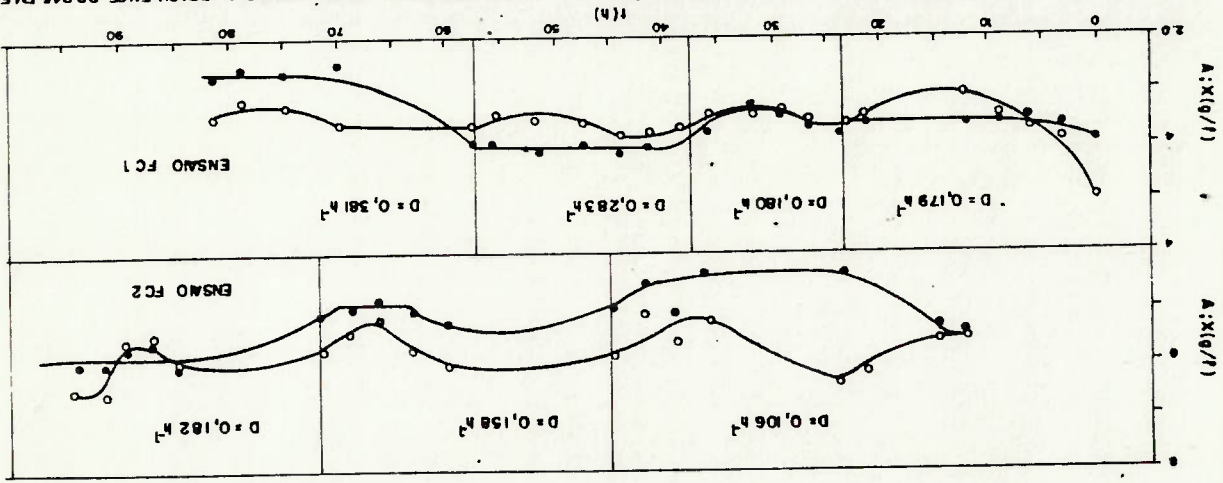
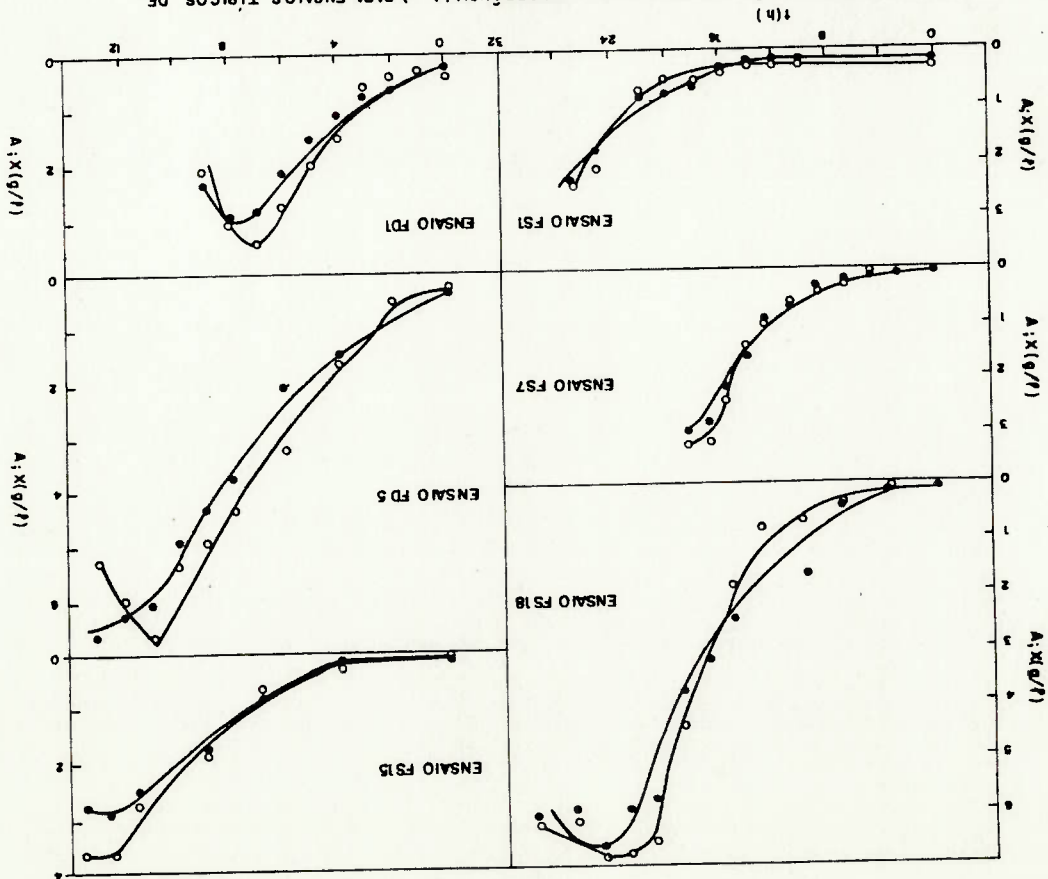


FIGURA 437 - CRESCIMENTO DESCONTÍNUO A. BRASILENSE SP 245 EM FRUTOSE PARA ENSAIOS TÍPICOS DE



A utilização da concentração celular numérica para o controle "em linha" da produção de *A. brasiliense*, além das dificuldades li-

#### 4.5.2 Concentração Celular (N) e de Proteína

Concluindo, pode-se estabelecer que para usar a absorbância para o cálculo da velocidade específica de crescimento é necessário conhecer a relação  $X = X(A)$ .

Usando-se o exemplo do ensaio FDI em que a absorbância aumentou, na fase exponencial, de 0,46 a 3,40 em 5 h (cf. tabela 4.24) e a equação (4.3) pode-se calcular, pela equação (4.4),  $\mu^A = 0,40h^{-1}$  e pela equação (4.7),  $\mu^X = 0,34h^{-1}$ , com uma diferença percentual de 17,5%. O valor de  $\mu$  calculado por regressão linear com todos os pontos experimentais da fase exponencial do ensaio FDI foi  $0,33h^{-1}$  (cf. figura 4.29 e tabela 4.34).

E, evidentemente, as equações (4.4) e (4.7) são idênticas apenas quando  $k_1 = 0$ .

$$\mu^X = \frac{\ln \frac{k_1 + k_2^A}{k_1 + k_2^A}}{t - t_0} \quad (4.7)$$

tem-se, por simples substituição:

$$X = k_1 + k_2^A \quad (4.6)$$

Quando a relação entre A e X é do tipo expresso pela equação (4.6) (do qual a equação (4.3) é um exemplo prático):

$$\mu = \frac{\ln X/X_0}{t - t_0} \quad (4.5)$$

gadas a equipamentos, já mencionadas em 2.6.3, encontra também as ligadas a aspectos fisiológicos propriamente ditos e que são difíceis de prever e/ou evitar.

Dentre estes últimos encontra-se a modificação do massa celular média das células (e, portanto, do volume celular), como foi determinado tanto para cultivo contínuo (cf. tabela 4.38) quanto para descontínuo (cf. tabela 4.32).

Outra dificuldade, talvez ainda mais séria, para a utilização de contadores eletrônicos de partículas é a formação de agregados celulares, que ocorreu em diversas condições de cultivo de *A. bra-siliense* sp 245 em frutose.

Então, no momento, não parece adequada a utilização deste método de medida para o controle da produção, pelo menos até que consigam definir condições de pouca floculação.

Para a utilização da proteína celular, as dificuldades também são grandes, a começar pela coleta e preparo automatizados da amostra (cf. 2.6.5) e continuando com a variação do conteúdo protéico celular observado nos cultivos descontínuos (cf. tabela 4.32) e contínuos (cf. tabela 4.38).

Apesar dessas dificuldades, aplicou-se aos resultados de X e P dos ensaios FD2, FD3, FD4 e FD5 a mesma metodologia aplicada aos resultados de X e A (cf. 4.5.1), tendo-se obtido, com 40 pontos experimentais, a regressão:

$$X = -0,0173 + 1,943.P \quad (r=0,987) \quad (4.8)$$

Tendo em vista o baixo valor do coeficiente linear desta reavaliação (4.8) testou-se a hipótese estatística da nulidade deste coeficiente linear  $|050,179|$ , tendo-se concluído que não se pode rejeitar a hipótese de significância de 1,0% e a regressão corrigida é



em estado estacionário ou de declínio. crescimento e evitando que o reator fique em operação com células do processo descontínuo, indicando rapidamente o término. Esse parâmetro poderá, então, ser de grande utilidade no controle de bactérias, ela subia de forma acentuada.

a diminuição da demanda global ( $QO_2 \cdot X$ ) de oxigênio por parte da concentração tendia a decrescer e ao término da fonte de carbono, com o comportamento (cf. figura 4.31). Ao longo do ensaio a concentração dissolvida nos cultivos descontínuos, nota-se um mesmo padrão. Por outro lado, observando-se as curvas da concentração de oxigênio do processo de crescimento celular através dessa grandeza. previstas e/ou equacionadas, dificilmente se poderia fazer o controle em vista que essas variações não podem, por enquanto, ser

cultura e a concentração de oxigênio dissolvido. se sp 245 em frutose variou em resposta à composição do meio de respiração celular medida nos cultivos descontínuos de *A. brasiliense*. Como foi discutido no item 4.3.9, a velocidade específica de

#### 4.5.3 Oxigênio Dissolvido e Respiração Celular

sempre encontrar uma correlação simples entre  $X$  e  $P$ . ocorreram com os resultados de  $X$  e  $A$  (cf. figura 4.38) não foi possível. No caso do cultivo contínuo (ensaio FC2), a exemplo do que já em frutose, foi 51,5%. co celular médio nos cultivos descontínuos de *A. brasiliense* sp 245, Deve-se notar que, com base na equação (4.9), o conteúdo proteico

$$X = 1,942 \cdot P \quad (r=0,987) \quad (4.9)$$

dada por:

Nos ensaios em incubador rotativo, houve, como era previsto, de-  
créscimo do pH do meio de cultura, em resposta ao consumo de amô-  
nia (cf. 2.3). De forma geral, essa variação foi bem caracteriza-  
da, tendo-se iniciado, devido ao tampão fosfato utilizado, aproxi-  
madamente na metade do crescimento exponencial. Nos ensaios de  
concentrações iniciais mais elevadas de frutose, e de fosfato, a  
variação foi menor do que nos cultivos de concentrações mais bai-  
xas.

Assim, não se conseguiu nenhum tipo de correlação entre pH e X  
ou pH e Ni, como prevista em [16], que pudesse servir para o con-  
trole do processo.

A massa de NaOH adicionada para manutenção do pH constante se-  
ria também um indicador interessante do estágio do processo. Entre-  
tanto, a defasagem que se observou entre o crescimento celular e a  
utilização do nitrogênio inorgânico (cf. figuras 4.22, 4.23, 4.27)  
também não permitiu encontrar nenhuma correlação aplicável no con-  
trole do processo.

5 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO - ENSAIOS  
 COM GLICEROL COMO PRINCIPAL FONTE DE CARBONO

5.1 Experimento 5 (E5)

5.1.1 Objetivos e Condições dos Ensaios do E5

O E5 teve dois objetivos principais: determinar a temperatura mais apropriada para a produção industrial de *A. brasiliense* sp 245 com glicerol como fonte de carbono e verificar se havia diauxia entre glicerol e algum componente do extrato de levedura.

A tabela 5.1 apresenta as temperaturas dos ensaios do E5. Todos os ensaios que constam da tabela 5.1 foram realizados em incubador rotativo (cf. 3.3) com frequência de 200 rpm.

O meio de cultura usado nos ensaios do E5 tinha a formulação básica apresentada no item 3.2.5, com 2,5 a 3,0 g de glicerol e 1,0g EL por litro; no ensaio GS20 não foi adicionado extrato de levedura e nos E51 a E56 foi adicionado 1,0 g EL/l, sem glicerol.

**Tabela 5.1** Temperaturas em que foram realizados os ensaios do E5 , segundo a principal fonte de carbono.

Extrato de Levedura	Glicerol	Temperatura (°C)
ES6	GS17	30
ES5	GS5	32
ES2	GS1	34
ES3	GS11,GS20*	36
ES1	GS6,GS9	38
ES4	GS4	40

\* Sem extrato de levedura.

São apresentados a seguir, em ordem cronológica, os ensaios do E5. A temperatura de 38°C foram efetuados dois ensaios com glicérol e extrato de levedura (GS6 e GS9). As tabelas 5.2 a 5.9 e as figuras 5.1 a 5.8 apresentam os resultados para os ensaios com glicérol, enquanto as tabelas 5.10 a 5.15 e a figura 5.9, os ensaios com extrato de levedura como fonte de carbono.

### 5.1.3 Discussão dos Resultados do E5

#### 5.1.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriano

Uma primeira característica muito interessante de todos os cultivos com glicérol e E1 foi o longo período decorrido até ao início da utilização do nitrogênio inorgânico presente no meio de cultura. No ensaio GS1, por exemplo, N1 ficou praticamente constante durante as 16 primeiras horas das 24 que o crescimento levou para terminar. Nem sempre a demora no consumo do nitrogênio inorgânico foi tão longa, mas pode-se afirmar que em todos os ensaios com glicérol e extrato de levedura (não importando a temperatura) houve um período de crescimento celular (e de consumo de glicérol) sem que houvesse o decréscimo de N1. Esses períodos foram acompanhados por valores de pH constantes, ou ligeiramente ascendentes e quando se iniciava o consumo de nitrogênio inorgânico o pH decrescia sem alcançar em nenhum caso, o valor 6,0.

#### 5.1.2 Resultados dos Ensaios do E5

Tabela 5.2 Resultados do ensaio GSI. (Experimento 5 - T=34°C).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>i</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,05	2,24	0,23	0,01	6,80
3,0	0,07	2,34	0,23	0,07	6,80
6,0	-	2,30	0,24	0,15	6,80
8,0	0,08	2,12	0,24	0,27	6,90
10,0	0,23	1,91	0,24	0,46	6,85
12,0	0,36	1,80	0,24	0,57	6,85
14,0	0,54	1,58	0,24	0,95	6,90
16,0	0,68	1,61	0,24	1,05	7,00
18,0	0,82	1,21	0,22	1,35	6,85
20,0	1,01	0,64	0,21	1,47	6,75
22,0	1,22	0,43	0,22	1,66	6,75
24,0	1,28	0,13	0,18	1,68	6,75

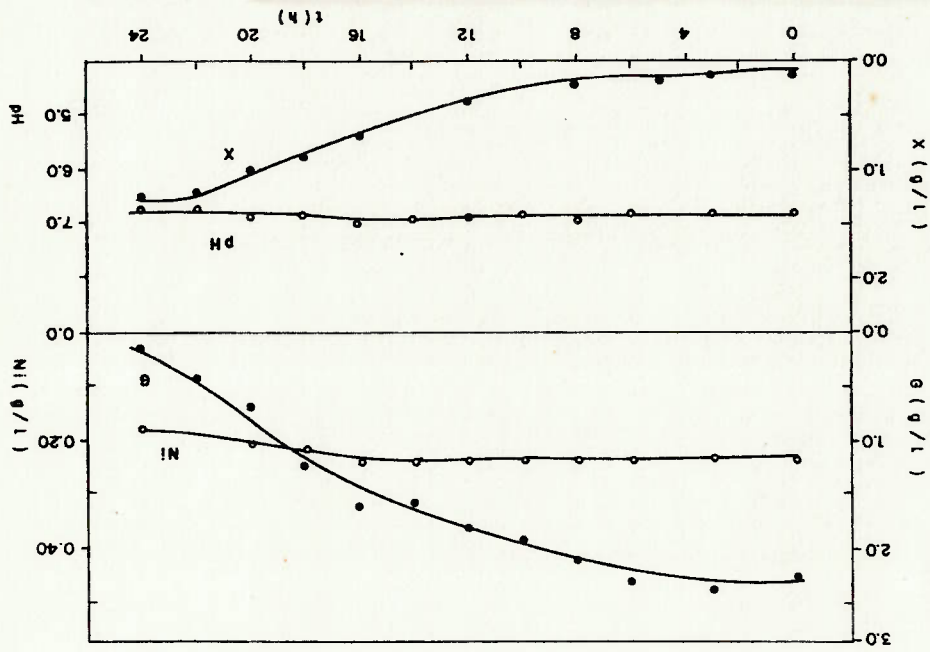


FIGURA 5.1 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL (G) E NITROGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO ENSAIO GSI (EXPERIMENTO 5)

Tabela 5.3 Resultados do ensaio GS4. (Experimento 5 - T=40°C).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>2</sub> (g/l)	A	pH
-------	---------	---------	----------------------	---	----

0,0	0,04	3,30	0,25	0,01	6,85
3,0	0,03	3,24	0,25	-	6,85
5,0	0,09	3,03	0,23	0,06	6,80
7,0	0,11	2,89	0,23	0,12	6,90
9,0	0,24	2,33	0,23	0,21	6,80
11,0	0,49	2,33	0,22	0,41	6,75
13,0	-	1,83	0,23	0,69	6,60
15,0	0,69	-	0,23	0,71	6,75
18,0	0,75	1,49	0,23	0,81	6,65
20,0	0,77	1,46	0,23	0,90	6,60
23,0	0,57	-	0,24	0,83	6,70

Observada intensa floculação desde o início do cultivo

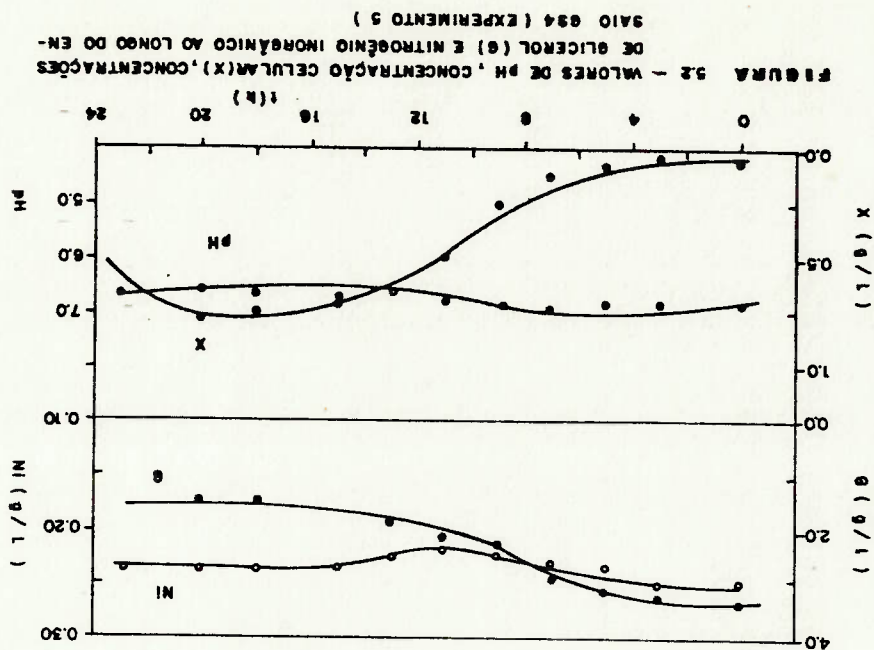


Tabela 5.4 Resultados do ensaio G55. (Experimento 5 - T=32°C).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>1</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,10	3,30	0,26	0,05	6,70
3,0	0,08	3,21	0,24	0,13	6,70
6,0	0,18	3,12	0,24	0,21	6,70
9,0	0,42	2,91	0,24	0,43	6,70
11,0	0,56	2,87	0,24	0,40	6,75
13,0	0,71	-	0,25	1,00	7,15
15,0	0,81	2,23	0,24	1,17	7,15
17,0	0,96	2,27	0,23	1,42	7,10
19,0	1,15	1,86	0,22	1,54	7,00
21,0	1,46	1,51	0,20	1,72	6,50
23,0	1,32	1,02	0,19	1,81	6,30
25,0	1,71	0,42	0,17	2,07	6,15
27,0	2,05	0,20	0,15	1,75	6,25
29,0	1,91	0,17	0,15	1,39	6,30

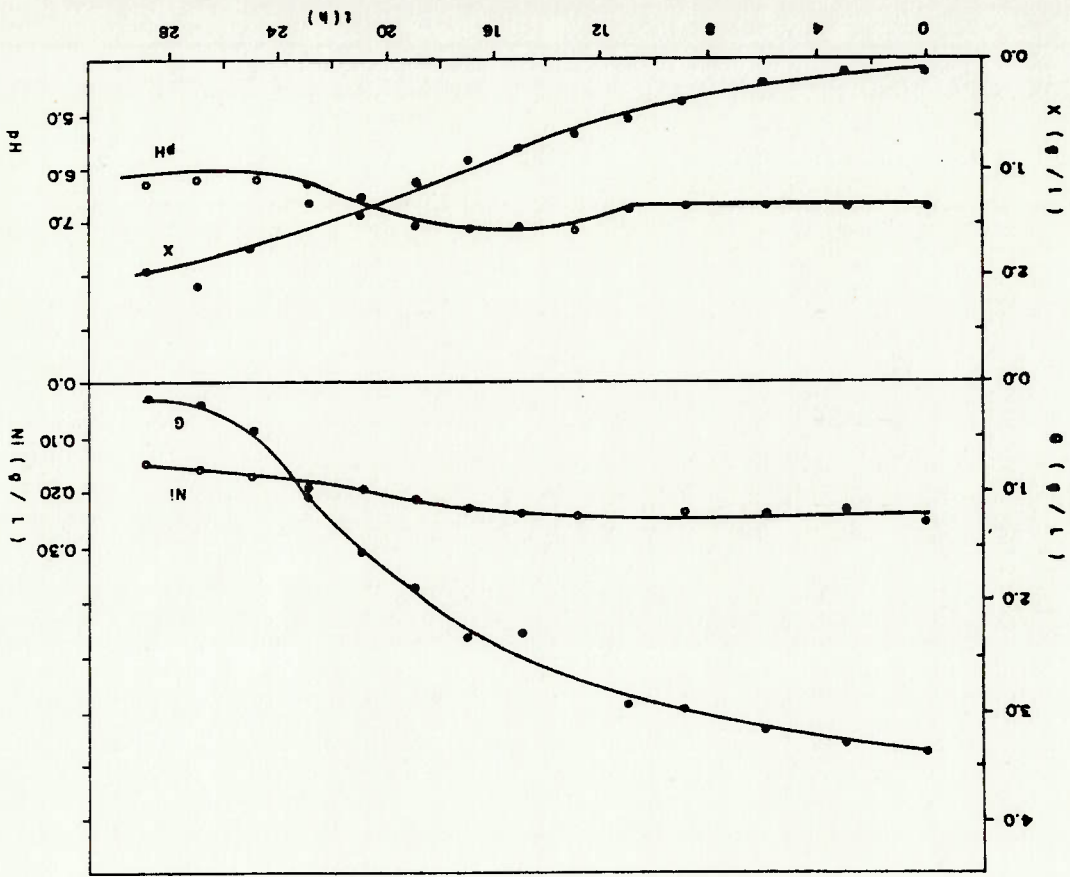


FIGURA 5.3 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL (G) E MITOGENÍO INORGÂNICO AD LONGO DO ENSAIO G55 (EXPERIMENTO 5)

Tabela 5.5 Resultados do ensaio G56. (Experimento 5 - T=38°C).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>i</sub> (g/l)	A	pH
-------	---------	---------	----------------------	---	----

0,0	0,06	3,23	0,26	0,03	7,15
3,0	0,12	3,21	0,24	0,15	6,90
6,0	0,30	3,09	0,23	0,35	6,70
9,0	0,75	2,65	0,23	0,70	6,75
11,0	0,96	2,27	-	0,94	6,70
13,0	1,14	1,85	0,24	1,50	7,05
15,0	1,54	1,15	0,22	1,87	6,95
17,0	1,90	0,89	0,19	2,08	6,80
19,0	2,32	0,10	0,17	2,60	6,65
21,0	2,12	0,32	0,16	2,20	6,30
23,0	2,26	0,21	0,17	1,67	6,20
25,0	2,09	0,21	0,17	1,65	6,10

Observada flocculação a partir das 15h de cultivo

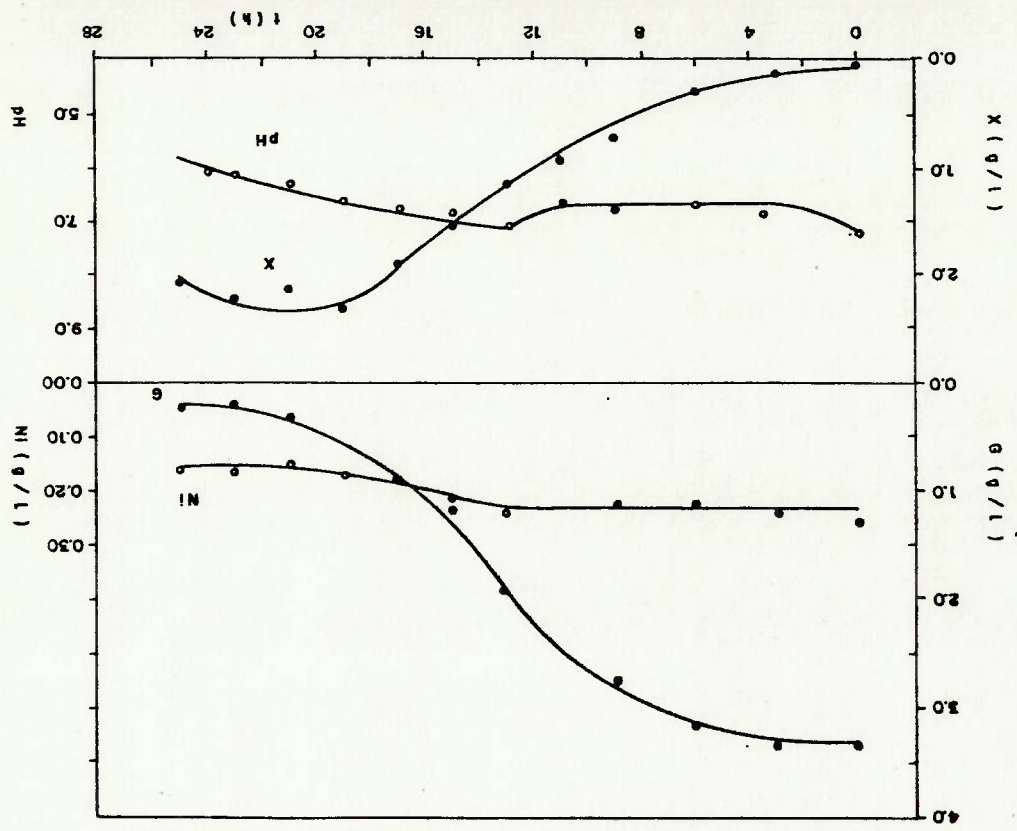


FIGURA 5.4 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GRÍGULOS (G) E NITROGÊNIO MORGÂNICO AO LONGO DO ENSAIO G56 (EXPERIMENTO 5)



Tabela 5.6 Resultados do ensaio G59. (Experimento 5 - T=38°C).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>i</sub> (g/l)	A	pH
-------	---------	---------	----------------------	---	----

0,0	0,14	3,32	0,24	0,07	6,77
2,0	0,14	3,19	0,23	0,17	6,81
4,0	0,24	3,16	0,23	0,26	6,82
6,0	0,38	2,99	0,23	0,49	6,82
8,0	0,71	2,62	0,24	0,68	6,82
9,0	0,81	2,62	0,23	0,76	6,82
10,0	0,93	2,35	0,23	1,05	6,80
12,0	1,14	1,93	0,23	-	6,75
14,0	1,44	1,43	0,21	1,68	6,70
16,0	1,90	0,91	-	1,83	6,55
18,0	2,45	0,34	0,18	2,42	6,52
20,0	2,31	0,24	0,17	2,72	6,53
22,0	2,48	0,25	0,17	2,70	6,50

Observada flocculação a partir de 6h de cultivo.

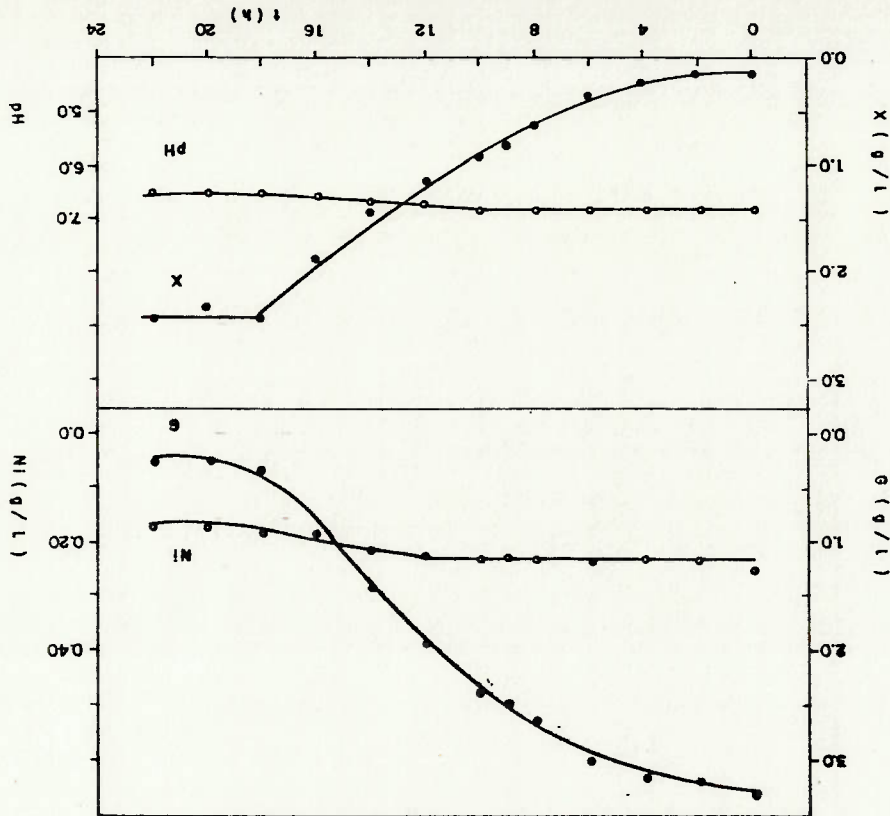


FIGURA 55 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GRICEROL (G) E NITROGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO EN- SAIO G59 (EXPERIMENTO 5)

Tabela 5.7 Resultados do ensaio GS11. (Experimentos 5 e 6 - T=36°C).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>2</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,06	3,14	0,26	0,04	6,80
3,0	0,12	2,98	0,26	0,13	6,84
6,0	0,35	2,63	0,25	0,40	6,80
8,0	0,60	2,86	0,25	0,58	6,80
10,0	0,82	2,22	0,25	1,03	6,85
11,0	0,98	-	-	0,80	6,79
14,0	1,23	1,37	0,23	1,78	6,62
16,0	1,53	0,88	0,20	2,17	6,50
18,0	1,83	0,37	0,19	2,52	6,35
20,0	1,91	0,38	0,17	2,78	6,27
22,0	2,49	0,04	0,16	2,80	6,28

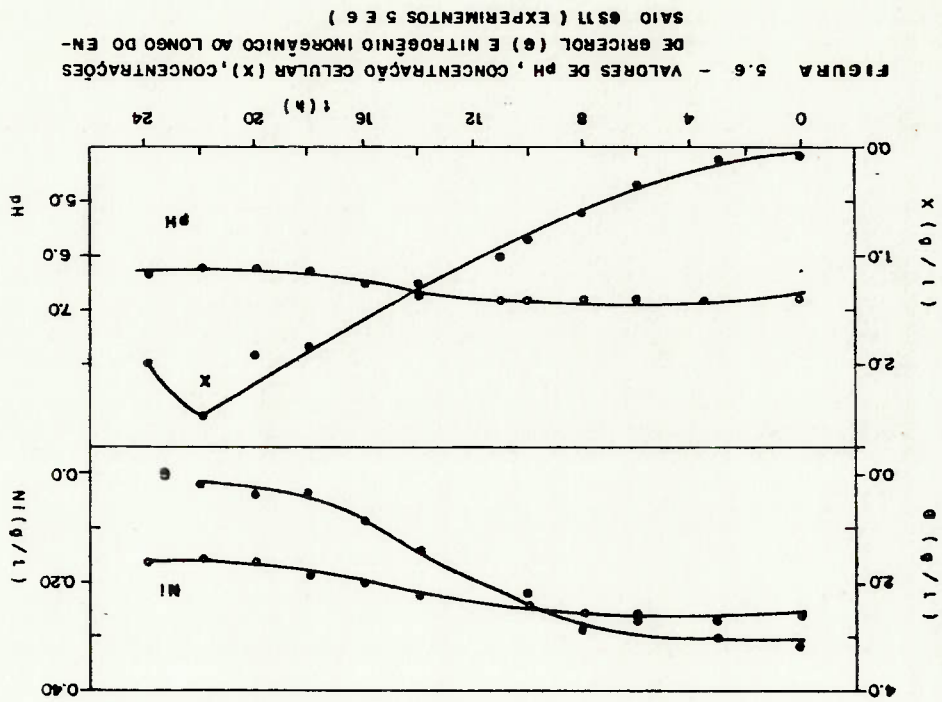


FIGURA 5.6 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GRICEROL (●) E NITROGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO EN-SAIO GS11 (EXPERIMENTOS 5 E 6)

Tabela 5.8 Resultados do ensaio GS17. (Experimento 5 - T=30°C).

t (h)	X (g/L)	G (g/L)	N <sub>2</sub> (g/L)	A	pH
0,0	0,07	3,40	0,26	0,06	6,91
3,0	0,09	-	0,25	0,17	6,82
6,0	0,16	3,43	0,25	0,26	6,90
9,0	0,34	3,23	0,25	0,40	6,89
12,0	0,57	2,86	0,25	0,63	6,87
15,0	0,74	2,69	0,25	0,76	6,85
18,0	0,92	2,44	0,24	1,27	6,84
21,0	1,17	1,93	0,22	1,48	6,78
24,0	1,28	1,28	0,19	1,55	6,71
27,0	1,67	-	0,17	-	6,45
30,0	1,83	0,15	0,16	1,95	6,43
33,0	1,83	0,19	0,16	1,51	6,34
36,0	1,77	0,14	0,15	1,20	6,30

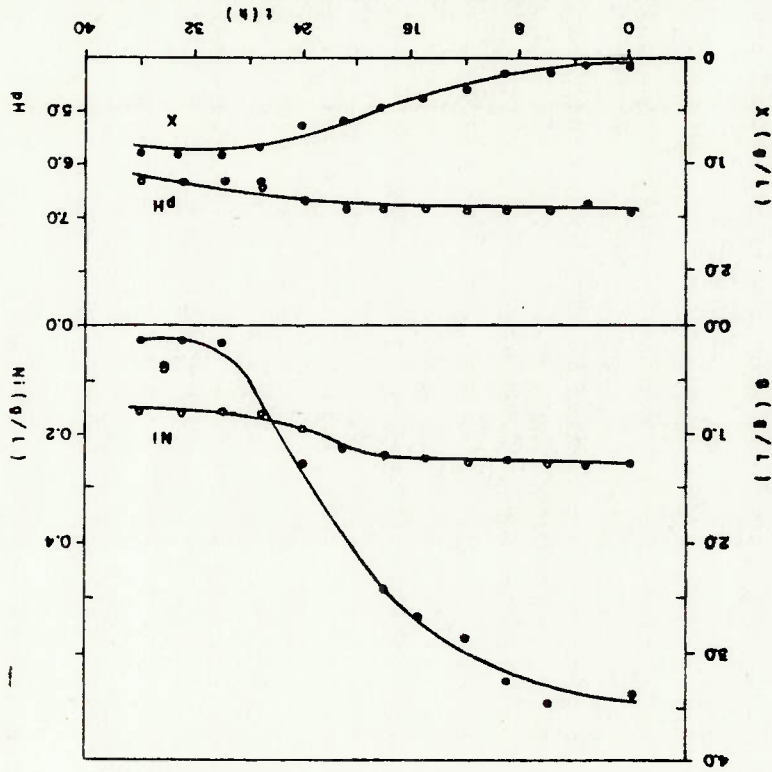


FIGURA 5.7 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL (G) E NITROGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO ENSAIO GS17 (EXPERIMENTO 5)

Tabela 5.9 Resultados do ensaio GS20: Experimentos 5 e 6 - T=36°C.

t	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>I</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,08	2,71	0,26	0,04	7,00
3,0	0,09	2,97	0,25	0,07	7,00
6,0	0,12	2,83	-	0,08	7,33
9,0	0,14	3,00	0,25	0,13	7,30
12,0	0,14	2,73	0,25	0,12	7,28
15,0	0,15	2,78	0,26	0,17	-
21,0	0,31	2,45	0,23	0,33	7,26
24,0	0,42	2,26	0,21	0,43	7,06
27,0	0,51	2,04	0,20	0,50	7,10
32,0	0,84	1,53	0,17	0,70	6,81
36,0	1,25	0,83	0,15	1,52	6,51
40,0	1,47	0,05	0,10	1,86	6,50
44,0	1,49	0,05	0,10	1,80	6,40

Observada floculação a partir de 3 h de cultivo

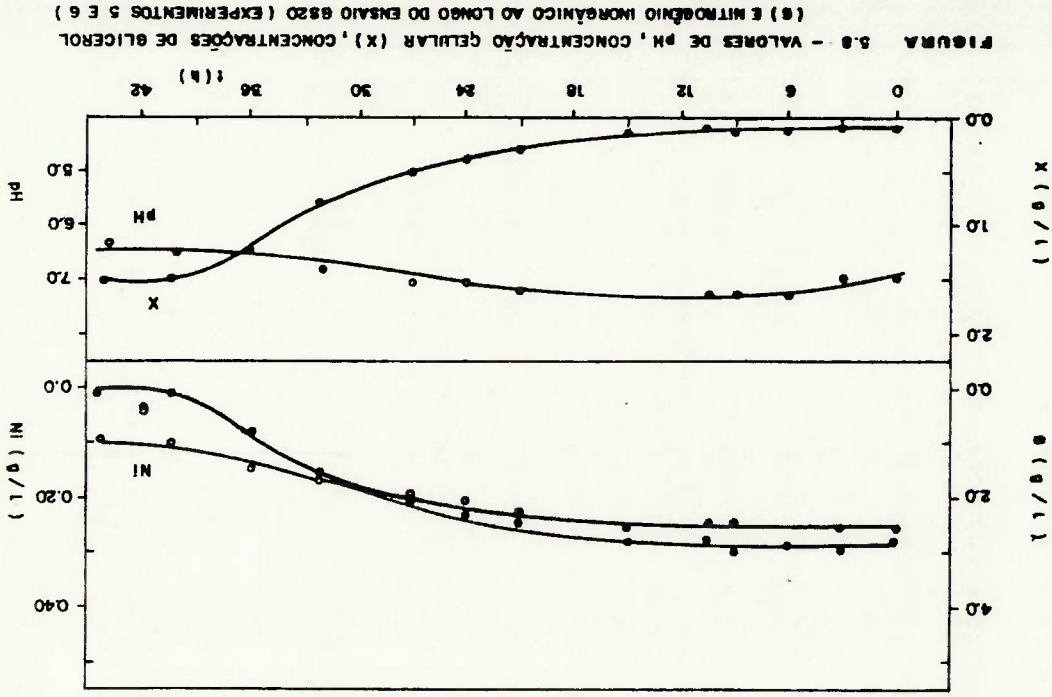


Tabela 5.10 Resultados do ensaio ES1. (Experimento 5 - T=38°C).

t	X	N <sub>i</sub>	A	pH
0,0	0,10	0,24	0,05	6,70
3,0	0,10	0,25	0,11	6,70
5,5	0,13	0,25	0,15	6,75
7,5	0,18	0,26	0,18	6,75
9,5	0,28	0,26	0,24	6,85
12,0	0,28	0,26	0,25	6,90

Tabela 5.11 Resultados do ensaio ES2. (Experimento 5 - T=34°C).

t	X	N <sub>i</sub>	A	pH
0,0	0,10	0,24	0,05	6,70
3,0	0,08	0,24	0,10	6,70
5,5	0,14	0,25	0,17	6,70
7,5	0,18	0,25	0,21	6,80
9,5	0,23	0,25	0,26	6,85
12,0	0,29	0,27	0,35	6,85
14,0	0,28	0,27	0,33	6,90

Tabela 5.12 Resultados do ensaio ES3. (Experimento 5 - T=36°C).

t	X	N <sub>i</sub>	A	pH
0,0	0,06	0,24	0,01	7,02
2,0	0,07	0,23	0,07	7,09
4,0	0,08	0,23	0,12	7,05
5,0	0,10	0,23	0,15	7,08
6,0	0,12	0,24	0,17	7,05
8,0	0,17	0,24	0,20	7,08
9,0	0,19	0,25	0,25	7,09
10,0	0,21	0,25	0,30	7,09
12,0	0,28	0,26	0,30	7,15

Tabela 5.13 Resultados do ensaio ES4. (Experimento 5 - T=40°C).

t	X	N <sub>i</sub>	A	pH
0,0	0,06	0,25	0,05	6,80
2,0	0,08	0,25	0,09	6,85
4,0	0,10	0,27	0,08	6,88
6,0	0,14	0,26	0,09	6,89
8,0	-	0,27	0,07	6,94
10,0	0,20	0,28	0,12	6,97
12,0	0,20	0,29	0,17	6,98
14,0	0,26	-	0,23	7,02

Tabela 5.14 Resultados do ensaio ES5. (Experimento 5 - T=32°C).

t	X	N <sub>i</sub>	A	pH
0,0	0,06	0,29	0,07	6,92
3,0	0,11	0,27	0,08	6,92
6,0	0,14	0,28	0,12	6,96
8,0	0,20	0,27	0,08	6,98
12,0	0,32	0,28	0,23	7,09
14,0	0,30	0,28	0,23	7,10
17,0	0,30	0,28	0,29	7,11

Tabela 5.15 Resultados do ensaio ES6. (Experimento 5 - T=30°C).

t	X	N <sub>i</sub>	A	pH
0,0	0,06	0,29	0,05	6,87
3,0	0,08	0,28	0,06	6,91
6,0	-	0,26	0,11	6,93
8,0	0,16	0,26	-	6,98
12,0	0,29	0,27	0,21	7,07
14,0	0,26	0,27	0,24	7,10
17,0	0,27	0,27	0,26	7,13

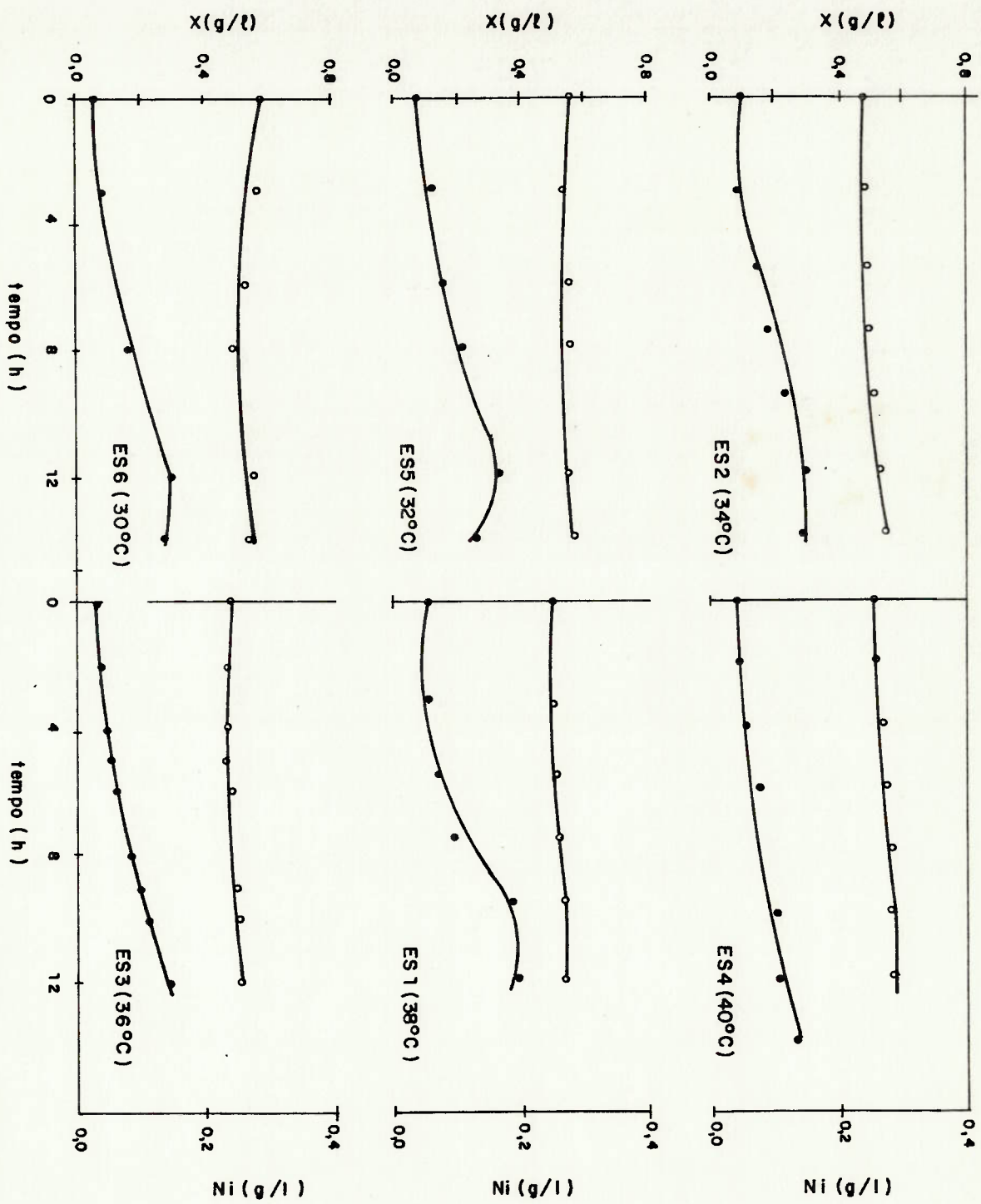


FIGURA 5.9 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (•, X) E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO INORGÂNICO (O, NI) SEGUNDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA OS ENSAIOS COM EXTRATO DE LEVEDURA COMO FONTE DE CARBONO. EXPERIMENTO 5.

Parece fora de dúvida que nesse período de concentração constante de nitrogênio inorgânico, o microrganismo estivesse utilizando nitrogênio combinado presente no extrato de levedura (cf. 2.1.4) através de reações de decomposição de aminoácidos e proteínas e de transaminação já discutidas no item 2.1.2.2 e representadas na figura 2.4.

Outra evidência muito forte dessa utilização apareceu quando se realizaram os ensaios E.1 a E.6 e se percebeu que a concentração de nitrogênio inorgânico permaneceu praticamente constante ou aumentou (Fig. 5.9) ao longo dos cultivos. Nesses ensaios a transformação do nitrogênio orgânico do extrato de levedura foi suficiente para suprir as necessidades da cultura e no final dos ensaios houve uma pequena liberação de nitrogênio inorgânico amoniacal para o meio de cultura, que foi acompanhada de aumento de pH em todos os casos.

Esses resultados indicam que nessas condições *A. brasilense* sp. 245 apresentava mecanismos de transporte ativo de amônia para fora das células, pois (admitindo-se que o extrato de levedura contivesse 60% de proteínas solúveis, cf. 2.1.4.3) a partir de 1,0 g FL/% poder-se-ia formar cerca de 7 mM de amônia (não levando em consideração que parte da amônia formada estaria sendo consumida no anabolismo) e essa concentração seria suficiente para sair da célula por difusão, uma vez que o meio de cultura continha cerca de 20 mM de amônia.

A possibilidade de liberação de amônia em determinadas condições (e, principalmente, em fixação de nitrogênio) é muito importante pensando-se do ponto de vista da associação microrganismo-planta e precisa ser melhor estudada, efetuando-se experimentos em que não se coloque amônia no meio de cultura e se faça variar os tipos e as concentrações das substâncias orgânicas nitrogenadas |052053,208.



Outro aspecto que deve ser ressaltado: notou-se a ocorrência de floculação em alguns ensaios com glicerol (cf. tabelas 5.3, 5.5, 5.6 e 5.9) principalmente nos realizados nas temperaturas mais elevadas (38 e 40°C) e o realizado a 36°C sem extrato de levedura (GS20). Nos outros ensaios os flocos, se ocorreram, não eram visíveis a olho nu. (Posteriormente, em alguns cultivos com glicerol + HL a 36°C para preparo do inóculo em fermentador eles foram notados; ver item 5.4).

Mais uma vez a floculação pôde ser associada, ainda que de forma qualitativa à formação de carotenóides, |135|, pois os ensaios com maior densidade de flocos eram também os mais amarelados ou róseados. Entretanto, apesar da formação de flocos as culturas tiveram desenvolvimento aparentemente normal, em termos de velocidades específicas, fatores de conversão e produtividades, como será visto mais adiante.

A tabela 5.16 reúne os valores iniciais e finais de pH, X, G e NI, para os ensaios do H5 com glicerol como fonte de carbono, com o intuito de facilitar os cálculos dos fatores de conversão e da produtividade (cf. equações do item 3.7.1), que estão reunidos na tabela 5.17.

A partir das figuras 5.10 e 5.11 foram calculadas as velocidades específicas máximas de crescimento celular e como se observa, para cada ensaio foram obtidas duas fases de crescimento exponencial, a não ser para o GS20 (sem extrato de levedura).

Apesar da ocorrência das duas fases de crescimento foram calculados os fatores de conversão e a produtividade apenas em relação ao tempo total de crescimento por se entender que num processo industrial seria importante o máximo aproveitamento do substrato principal (cf. figura 5.13).

Não foi possível associar a floculação à ocorrência das duas fa-

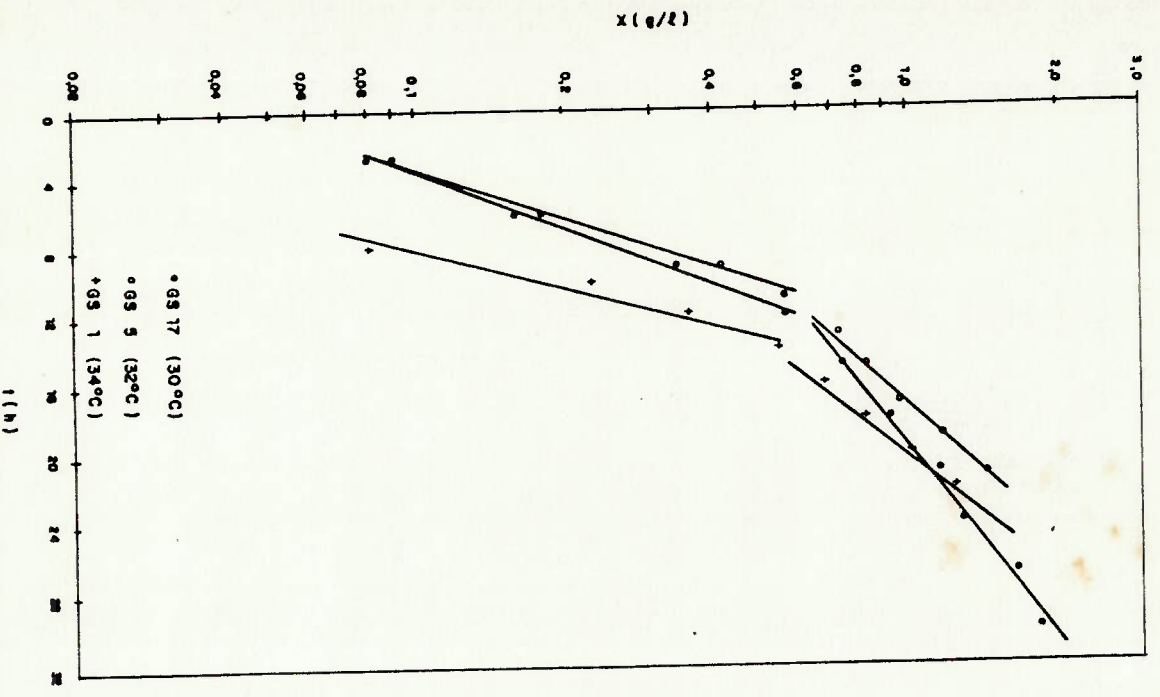


FIGURA 510 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) SEGUNDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA OS ENSAIOS COM GLICEROL DO EXPERIMENTO 5

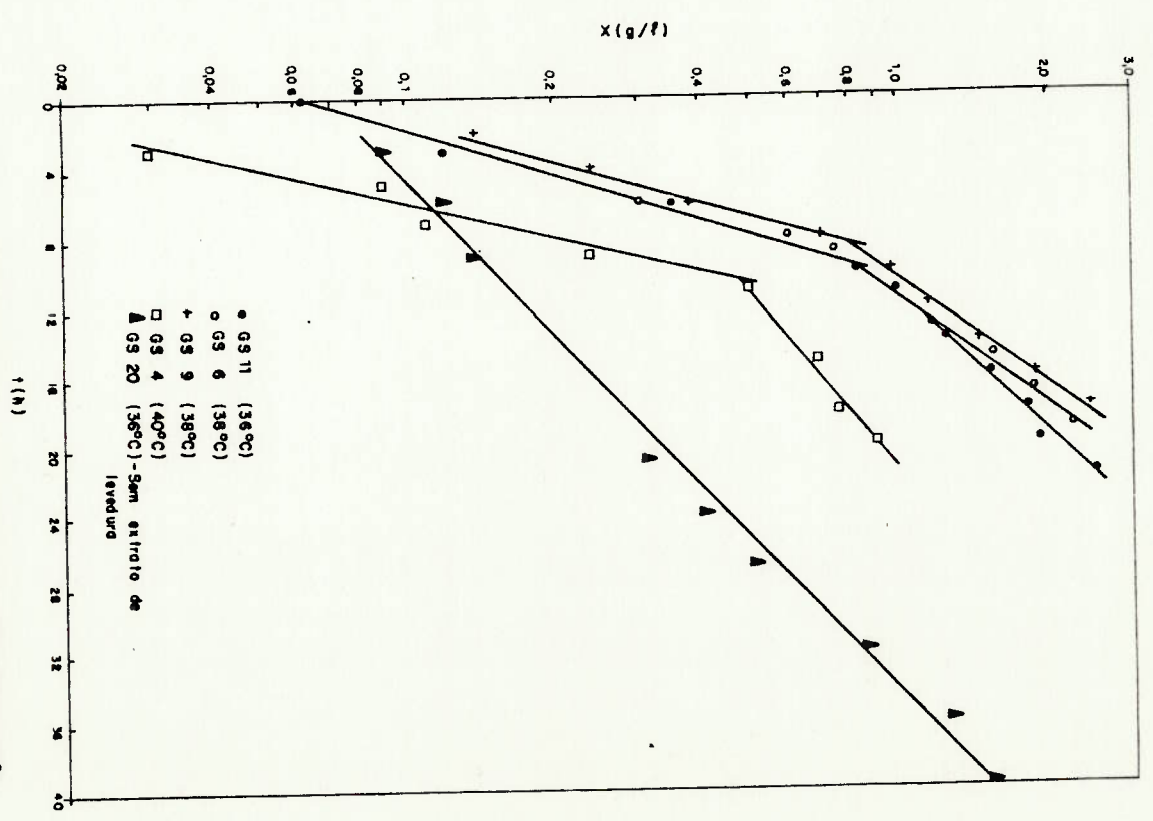


FIGURA 511 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) SEGUNDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA OS ENSAIOS COM GLICEROL DO EXPERIMENTO 5.

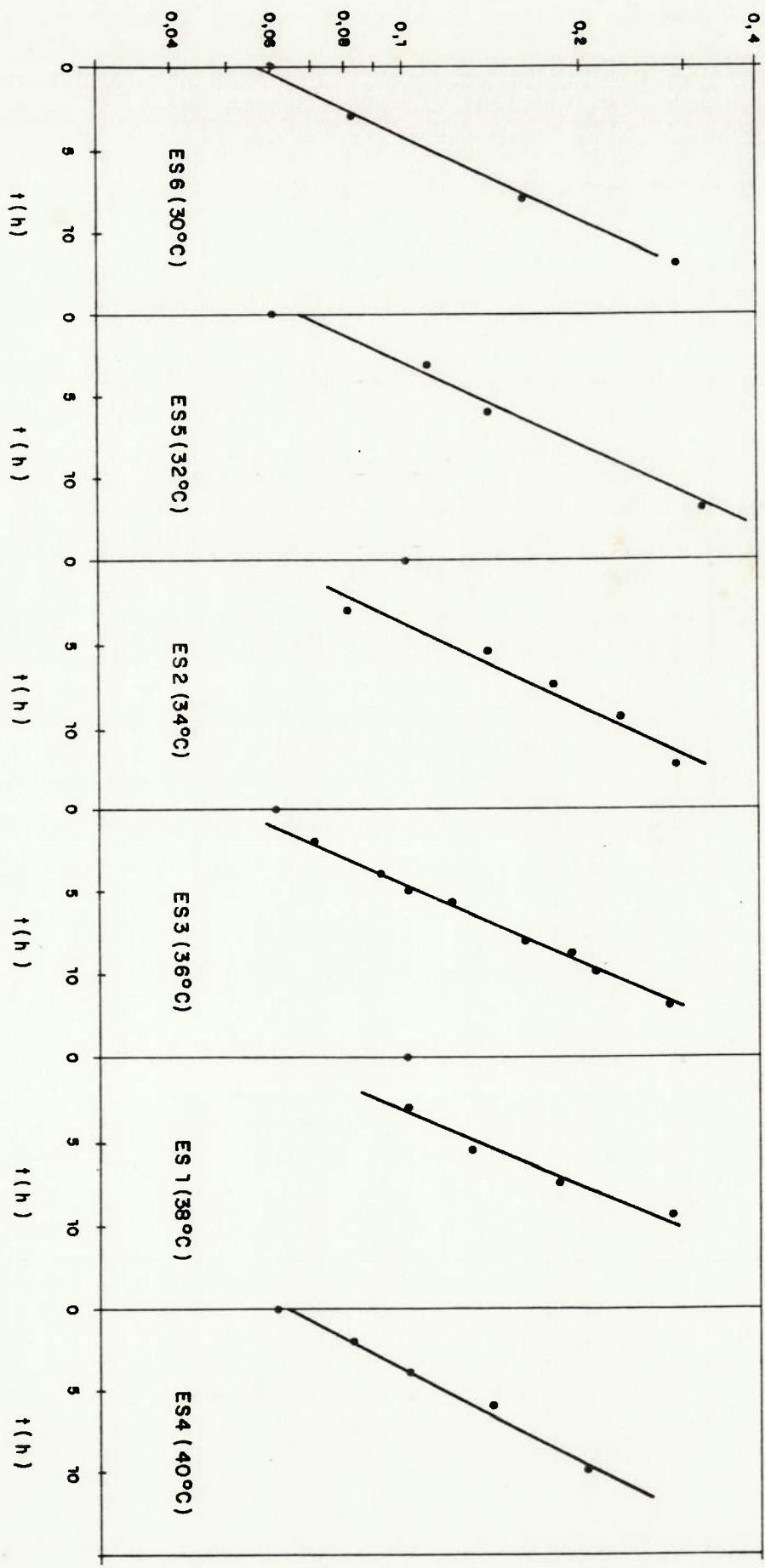


FIGURA 5.12 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) SEGUNDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA OS ENSAIOS COM EXTRATO DE LEVEDURA COM FONTE DE CARBONO DO EXPERIMENTO 5.

ses de crescimento, pois estas ocorreram mesmo em ensaios em que não se notou floculação (GS1, GS5, GS11, GS17).

Uma observação importante quanto às fases de crescimento é que a transição entre elas ocorreu para os ensaios a 30, 32 e 34°C em valores próximos a  $X = 0,6$  g/l (cf. figura 5.10) e para os ensaios a 36 e 38°C por volta de  $X = 0,8$  g/l. Essa relativa proximidade foi um dos fatores que levou a supor a existência do crescimento diauxico, imaginando que algum dos componentes do extrato de levedura pudesse servir como componente preferencial em relação ao glicérol, como foi recentemente observado para *A. brasiliense* que contém sucinato antes de frutose [129]. Essa hipótese (diauxia) foi reforçada por se obter apenas uma fase exponencial de crescimento quando não se usou extrato de levedura no meio de cultura (cf. fig. 5.8 e 5.10).

**Tabela 5.16** Tempo total de crescimento, valores iniciais e finais de pH, da concentração de células ( $X_0, X_F$ ), de glicérol ( $G_0, G_F$ ) e de nitrogênio inorgânico ( $Ni_0, Ni_F$ ) para os ensaios com glicérol do experimento 5.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de Crescimento (h)	(pH) <sub>0</sub>	(pH) <sub>F</sub>	(g/l) <sub>0</sub>	(g/l) <sub>F</sub>	(g/l) <sub>0</sub>	(g/l) <sub>F</sub>	(g/l) <sub>0</sub>	(g/l) <sub>F</sub>
GS17	30	30	6,91	6,43	0,07	1,83	3,40	0,15	0,26	0,16
GS5	32	29	6,70	6,30	0,09	1,91	3,30	0,17	0,25	0,15
GS1	34	22	6,80	6,75	0,05	1,22	2,24	0,43	0,23	0,22
GS11	36	22	6,80	6,28	0,06	2,49	3,14	0,04	0,26	0,16
GS6	38	21	7,15	6,30	0,06	2,35	3,23	0,33	0,25	0,16
GS9	38	18	6,77	6,50	0,14	2,45	3,32	0,30	0,24	0,18
GS4	40	20	6,85	6,60	0,04	0,77	3,30	1,46	0,25	0,23
GS20*	36	40	7,00	6,50	0,08	1,47	2,71	0,05	0,26	0,10

\* sem extrato de levedura

**Tabela 5.17** Início das fases exponenciais de crescimento, velocidades específicas máximas, fatores de conversão e produções para os ensaios com glicérol do experimento 5.

Ensaio	Temperatura (°C)	Início da fase expon. (h)	$\mu_{max}$ na 1ª fase (h <sup>-1</sup> )	Início da 2ª fase exponenc. (h)	$\mu_{max}$ na 2ª fase (h <sup>-1</sup> )	$X/G$ (g/g)	$X/Ni$ (g/g)	$P$ (g/l.h)
--------	------------------	---------------------------	---	---------------------------------	---	-------------	--------------	-------------

GS17	30	3	0,206	15	0,061	0,54	18,2	0,059
GS5	32	3	0,238	11	0,092	0,59	17,4	0,062
GS1	34	-	0,309	14	0,101	0,58	27,9	0,053
GS11	36	0	0,264	14	0,087	0,77	26,1	0,110
GS6	38	3	0,268	9	0,117	0,79	24,1	0,109
GS9	38	2	0,267	8	0,122	0,77	36,1	0,128
GS4	40	3	0,323	15	0,050	0,39	60,8	0,037
GS20*	36	3	0,075	-	-	0,68	12,0	0,046

\* sem extrato de levedura

A figura 5.12 apresenta os gráficos monolgarítmicos de  $X$  contra  $t$  para os ensaios ES1 a ES6 e pode-se observar que, para todos, houve fases de crescimento exponencial, cujas velocidades específicas máximas encontram-se na tabela 5.18. Em conjunto com as produtividades celulares, esses valores foram lançados na figura 5.14.

**Tabela 5.18** Tempo total de crescimento, concentrações iniciais e finais de células e nitrogênio inorgânico, tempo para início da fase exponencial, velocidade específica de crescimento e produtividade para os ensaios com extrato de levedura como fonte de carbono do experimento 5.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de cresc. (h)	$X_0$ (g/l)	$X_F$ (g/l)	$Ni_0$ (g/l)	$Ni_F$ (g/l)	Início expon. (h)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$P$ (g/l.h)
--------	------------------	---------------------	-------------	-------------	--------------	--------------	-------------------	--------------------------------	-------------

ES6	30	12	0,06	0,29	0,28	0,27	0	0,138	0,019
ES5	32	12	0,06	0,32	0,29	0,28	0	0,136	0,022
ES2	34	12	0,08	0,29	0,24	0,27	3	0,140	0,018
ES3	36	12	0,06	0,28	0,24	0,26	2	0,147	0,018
ES1	38	9,5	0,10	0,28	0,24	0,26	3	0,157	0,019
ES4	40	14	0,06	0,26	0,25	0,29	0	0,122	0,014

FIGURA 5.14 - VALORES DE  $\mu_{max}$  E  $P_x$  SEGUNDO A TEMPERATURA DE CULTIVO PARA OS ENSAIOS COM EXTRATO DE LEVEDURA DO EXPERIMENTO 5.

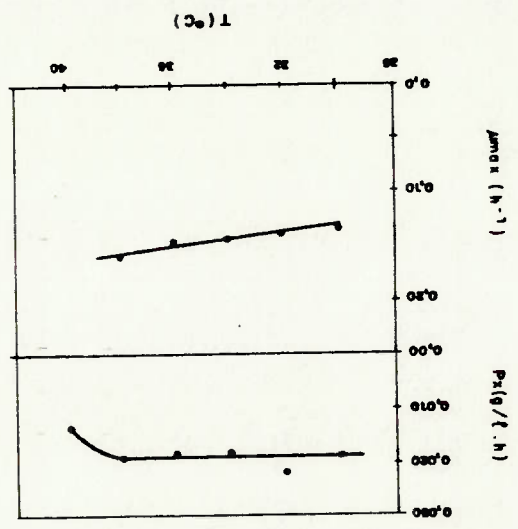
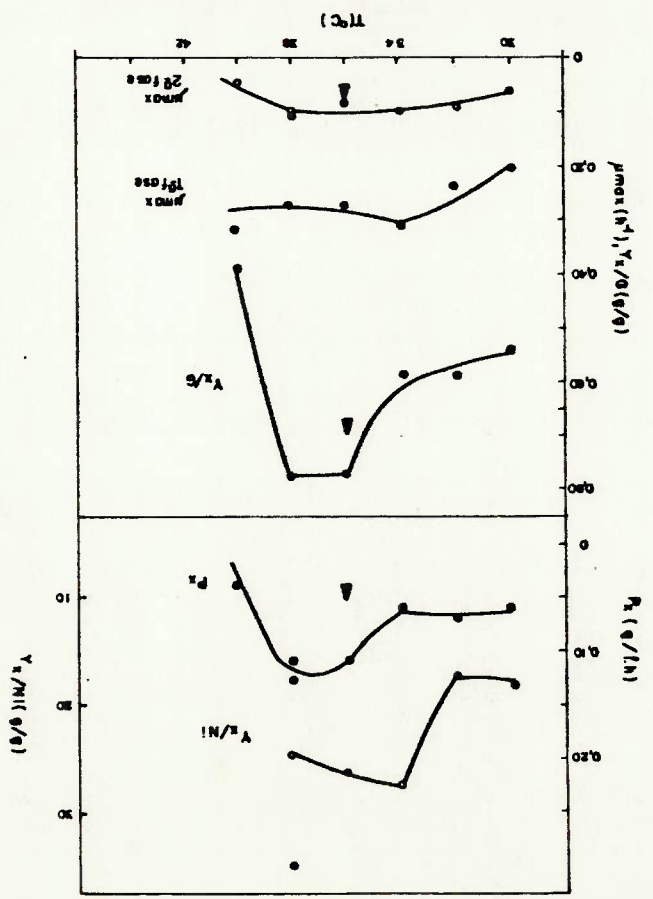


FIGURA 5.13 - VALORES DE  $\mu_{max}$ ,  $P_x$ ,  $Y_{x/g}$ ,  $Y_{x/N}$  NI SEGUNDO A TEMPERATURA DE CULTIVO PARA OS ENSAIOS COM GLICEROL DO EXPERIMENTO 5.



A comparação das concentrações celulares finais e das velocidades específicas de crescimento desses ensaios da tabela 5.18 (com EL, sem glicerol) com as dos ensaios das tabelas 5.16 e 5.17 (com glicerol, com EL) mostrou claramente que a ocorrência das duas fases de crescimento nos ensaios com glicerol não se devia à diauxia. Se algum componente do EL fosse responsável pelo crescimento celular nas primeiras fases, esperar-se-ia que as concentrações celulares finais dos ensaios ES1 a ES6 fossem da mesma ordem de grandeza das concentrações "de transição" entre as duas fases dos ensaios com glicerol, e, mais ainda, que as velocidades específicas de crescimento também tivessem valores parecidos | 106,129,156,206 |.

As concentrações finais nos cultivos com EL ficaram em torno de 0,30 g/L, enquanto nos ensaios com glicerol e EL as concentrações finais, como já mencionado, chegaram a 0,6 - 0,8 g/L.

As velocidades específicas máximas também foram diferentes, pois com glicerol e extrato de levedura variaram (na 1ª fase) de 0,206 a 0,323 h<sup>-1</sup>, enquanto apenas com EL os valores de  $\mu_{max}$  variaram de 0,122 a 0,157 h<sup>-1</sup>.

Devem ser notados ainda dois fatos que dificilmente eram apenas coincidência: o valor de  $\mu_{max}$  do GS20 (sem EL) era muito próximo ao da 2ª fase do ensaio GS11 com glicerol + EL (cf. tabela 5.17) e mais interessante que isso, a soma das velocidades específicas dos ensaios ES3 (EL sem glicerol,  $\mu_{max} = 0,147$  h<sup>-1</sup>) com a do ensaio GS20 (glicerol sem EL,  $\mu_{max} = 0,075$  h<sup>-1</sup>) era apenas 16% inferior ao  $\mu_{max}$  (= 0,264 h<sup>-1</sup>) da primeira fase do GS11.

Esses fatos sugerem a existência de dois sistemas de assimilação de nitrogênio funcionando quase independentemente e em paralelo durante a primeira fase do crescimento exponencial e que um desses sistemas se torna inoperante na segunda fase de crescimento.

Diante do que se conhece a respeito da assimilação de aminoáci-

dos e amônia em bactérias (cf. 2.1.3.2) é provável que na primeira fase de crescimento estivessem atuando na produção de glutamína (cf. figura 2.4) tanto o sistema GS-GOGAT quanto GDH e que na segunda fase esta última enzima passasse a exercer funções catabólicas | 208 | , funções essas que, do que tudo indica, também estavam presentes no crescimento em glicérol sem extrato de levedura, a exemplo do que foi demonstrado para o crescimento de *A. brasiliense* sp 7 em malato e amônia | 208 | .

Essa hipótese torna-se bastante plausível quando se recorda que nos cultivos com extrato de levedura como fonte de carbono houve aumento da concentração interna de amônia (cf. figura 5.9) , aumento de glicérol e extrato de levedura, e indutor da atividade biossintética de GDH | 016,141, 160,199 | .

Uma observação final a respeito dos ensaios GS6 e GS9, feitos em duplicata. Como pode ser visto das tabelas 5.5, 5.6, 5.16, 5.17 e das figuras 5.4, 5.5, 5.12 3 5.13 houve uma boa reprodutibilidade de entre esses ensaios. As pequenas diferenças entre eles parecem provir do uso, no GS9, de inóculo mais concentrado do que no GS6 (cf. tabela 5.16) . Essa boa reprodutibilidade demonstrou (e esse é o ponto que se deseja enfatizar) que, apesar de algumas limitações, o incubador rotativo é um sistema poderoso para a coleta de dados, mais a mais quando os cultivos não envolvem fungos filamentosos, limitações severas de oxigênio ou tempos muito longos que propiciem a evaporação de água do meio de cultura.



### 5.1.3.2 Determinação da Temperatura mais Apropriada para

Cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em Glicerol

A figura 5.13 apresentou um quadro bem definido que levou à escolha da faixa de temperatura de 36 a 38°C como ótima para o cultivo de *A. brasiliense* sp 245 uma vez que tanto o fator de conversão  $Y_{X/G}$  quanto a produtividade celular eram máximas neste intervalo e o fator  $Y_{X/N}$  apresentava-se também bastante elevado.

Assim, a partir dessa figura 5.13 e das informações sobre flocculação (cf. tabelas 5.3, 5.5, 5.6) optou-se pela temperatura de 36°C para a continuidade dos ensaios visando o desenvolvimento do processo de produção de *A. brasiliense* sp 245 com glicerol como principal fonte de carbono.

### 5.2 Experimento 6 (E6)

#### 5.2.1 Objetivos e Condições dos Ensaios do E6

O objetivo principal dos ensaios E6 foi estudar a variação das velocidades de crescimento, fatores de conversão e produtividades com a concentração inicial de glicerol e de extrato de levedura. Todos os ensaios do E6 (cf. tabela 5.19) foram efetuados em incubador rotativo (cf. 3.3) a 200 rpm e à temperatura de 36°C, segundo as conclusões do E5.

Foi utilizado como ponto de partida o meio de cultura descrito no item 3.2.5, com 1,0 g EL/l. As concentrações de fosfatos de amônio e de potássio foram alteradas de acordo com a concentração de glicerol, a não ser nos ensaios E51 (cujo meio de cultura tinha a composição descrita em 3.2.5, sem glicerol) e GS19.

Este último ensaio foi programado tendo em vista que no GS16 (tabela 5.22) não houve consumo total de glicerol. Como no GS15, com  $G_0 \approx 7,0$  g/l houve consumo quase total do mesmo (cf. tabela 5.21), procurou-se aumentar  $G_0$  e EL na proporção de 50% em relação ao GS15. Ao mesmo tempo, notando-se um grande excedente de Ni nesse último, diminuíram-se as concentrações de fosfato, mantendo-as nos mesmos níveis do GS15 ( $3,75$  g  $(NH_4)_2HPO_4$  +  $7,5$  g  $K_2HPO_4/l$ ).

**Tabela 5.19** Concentrações iniciais de glicerol e de extrato de levedura em que foram realizados os ensaios do E6.

Ensaio	$G_0$ (g/l)	Extrato de levedura (g/l)
ES3	0,0	1,0
GS13	1,5	1,0
GS11	3,0	1,0
GS14	5,0	1,0
GS15	7,0	1,0
GS16	9,0	1,0
GS19	10,0	1,5
GS20	3,0	0

5.2.2 Resultados dos Ensaio do E6

Nas tabelas 5.20 a 5.24 e nas figuras 5.15 a 5.18 são apresentados os resultados dos ensaios do E6 (cf. tabela 5.19). Os resultados dos ensaios GS11, GS20 e ES3 já foram apresentados no E5 (cf. tabelas 5.7, 5.9 e 5.12 e figuras 5.6, 5.8 e 5.9). Foram efetuadas duas medidas da concentração celular numérica no GS19, que serão apresentadas na tabela 5.37, item 5.3.8.

Tabela 5.20 Resultados do ensaio GS13. (Experimento 6).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>I</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,06	1,63	0,14	0,05	6,75
3,0	0,13	1,50	0,14	0,15	6,83
6,0	0,30	1,36	0,13	0,40	6,76
8,0	0,62	1,06	0,14	0,61	6,81
10,0	0,74	0,76	0,13	0,73	6,82
12,0	0,90	0,39	0,12	1,25	6,70
13,0	1,08	0,24	0,11	1,60	6,55
14,0	1,02	0,29	0,11	1,94	6,54
15,0	1,09	0,09	0,11	1,75	6,50
16,0	1,17	0,04	0,11	1,60	6,53
18,0	1,15	-	0,11	1,60	6,52

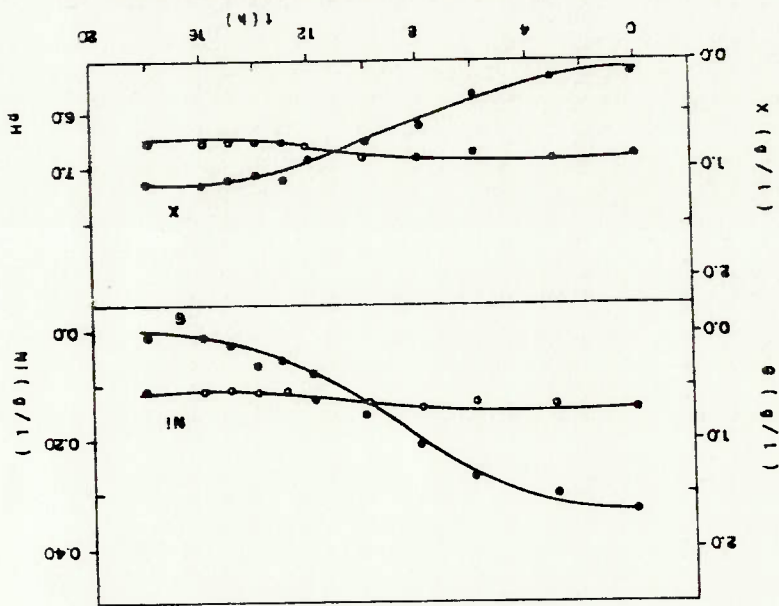


FIGURA 5.19 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL (G) E NITROGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO ENSAIO GS13 (EXPERIMENTO 6)

Tabela 5.21 Resultados do ensaio GS14. (Experimento 6)

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>2</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,04	5,30	0,45	0,11	6,92
3,0	0,11	5,24	0,45	0,11	6,97
6,0	0,26	4,62	0,43	0,33	6,95
9,0	0,65	4,25	0,44	0,68	6,94
12,0	0,95	4,17	0,44	1,28	6,88
15,0	1,44	3,35	0,42	1,83	6,80
18,0	1,83	2,50	0,37	2,30	6,71
21,0	2,50	1,51	0,33	2,90	6,62
24,0	3,16	0,30	0,30	3,25	6,50
27,0	4,11	0,33	0,29	2,30	6,50
30,0	2,67	0,13	0,29	2,15	6,49

observada floculação a partir de 24 h de cultivo

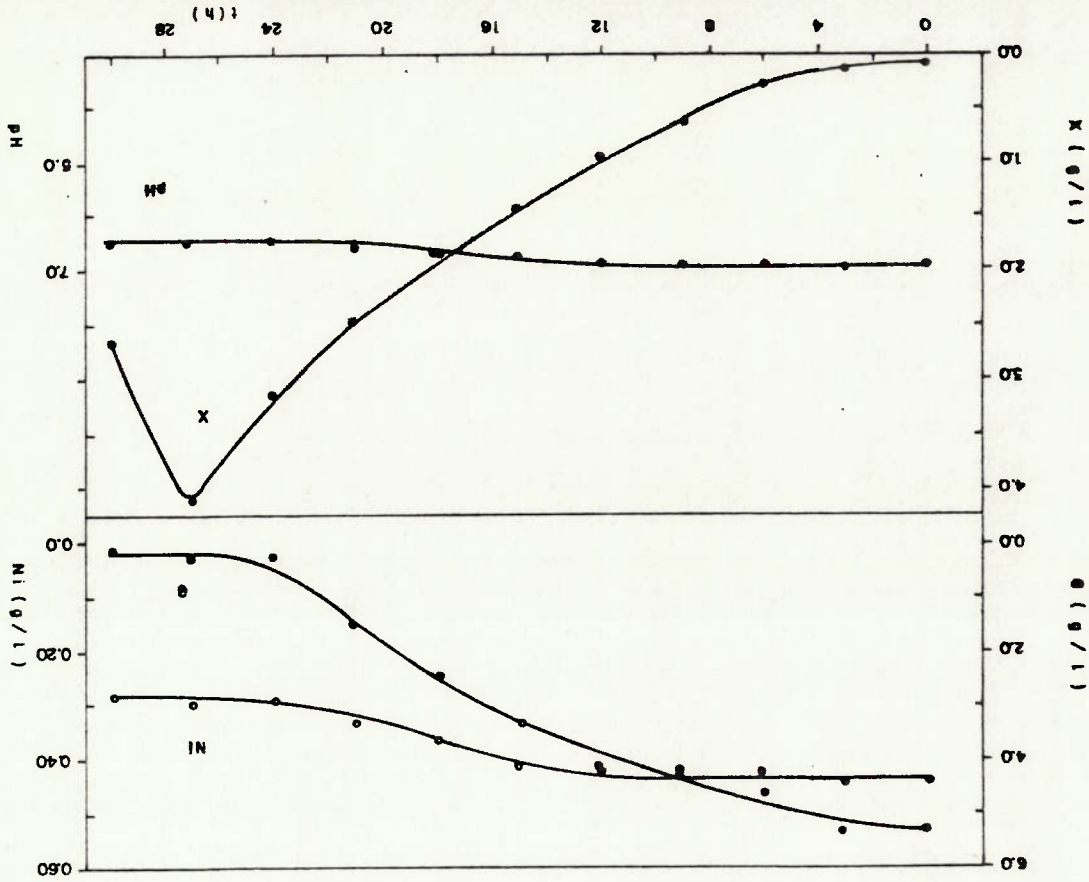


FIGURA 5.16 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL (G) E NITROGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO ENSAIO GS14 (EXPERIMENTO 6)

Tabela 5.22 Resultados do ensaio GS15. (Experimento 6).

t (h)	X (g/L)	G (g/L)	N <sub>i</sub> (g/L)	A	pH
-------	---------	---------	----------------------	---	----

0,0	0,06	7,02	0,64	0,09	6,95
3,0	0,13	7,40	0,64	0,09	6,95
6,0	0,22	6,76	0,65	0,31	6,94
9,0	0,66	6,69	0,62	0,65	6,93
12,0	0,99	6,22	0,66	1,30	6,93
15,0	1,69	5,07	0,59	1,41	6,78
18,0	2,71	3,58	0,54	2,22	6,70
21,0	3,70	2,44	0,50	2,83	6,64
24,0	3,53	1,68	0,47	3,20	6,53
25,5	-	1,13	0,44	3,30	6,50
27,0	5,10	0,91	0,44	3,75	6,51
30,0	4,53	-	0,42	4,57	6,49
33,0	3,72	0,11	0,44	3,69	6,54

Observada flocculação a partir de 24 h de cultivo

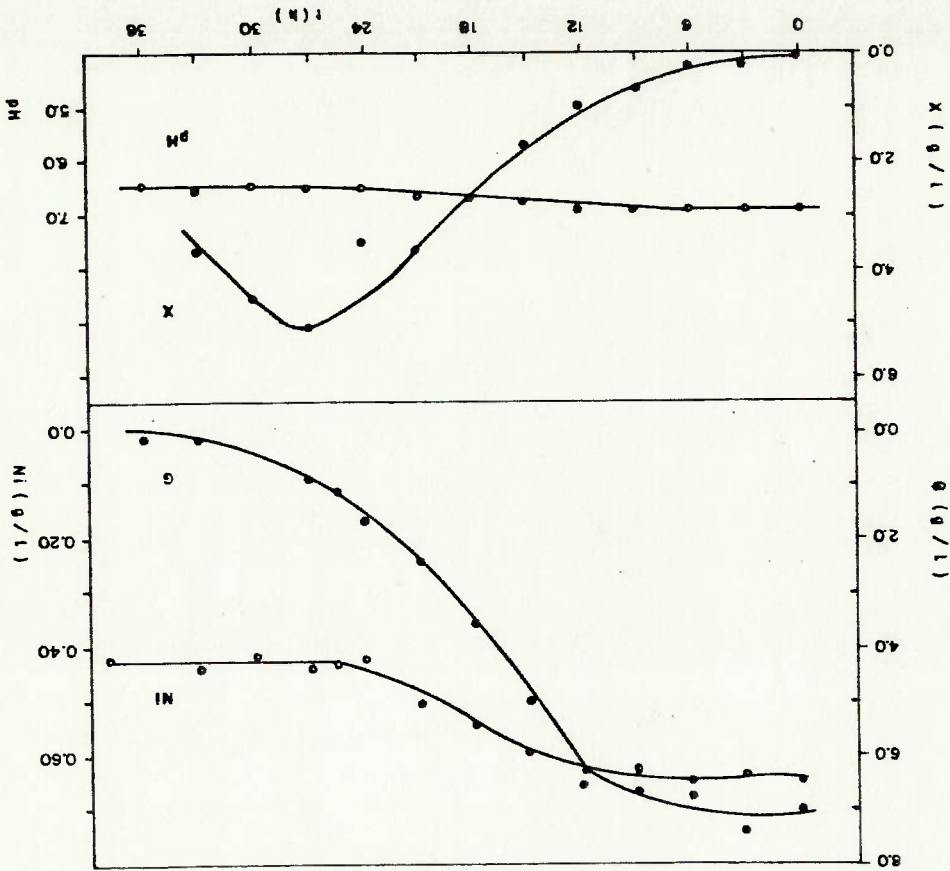


FIGURA 5.17 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GRIGEROL (G) E NITROGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO ENSAIO GS15 (EXPERIMENTO 6)

Tabela 5.23 Resultados do ensaio GS16. (Experimento 6).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>i</sub> (g/l)	A	pH
-------	---------	---------	----------------------	---	----

0,0	0,08	8,94	-	0,05	6,89
4,0	0,14	-	0,90	0,13	6,97
8,0	0,41	8,41	0,90	0,45	6,95
12,0	0,82	8,08	0,93	1,18	6,91
15,0	1,21	7,58	0,88	1,85	6,85
18,0	1,86	6,43	0,82	2,23	6,79
21,0	2,43	5,64	0,77	2,75	6,73
24,0	3,00	4,72	0,73	3,00	6,64
27,0	4,04	-	-	3,80	6,59
30,0	-	2,17	0,61	4,62	6,49
33,0	4,56	2,02	0,60	4,73	6,52
36,0	4,59	1,50	0,59	-	6,44
39,0	4,94	1,00	0,59	-	6,48
42,0	4,98	0,39	0,57	4,78	6,42

Observada floculação a partir de 27 h de cultivo

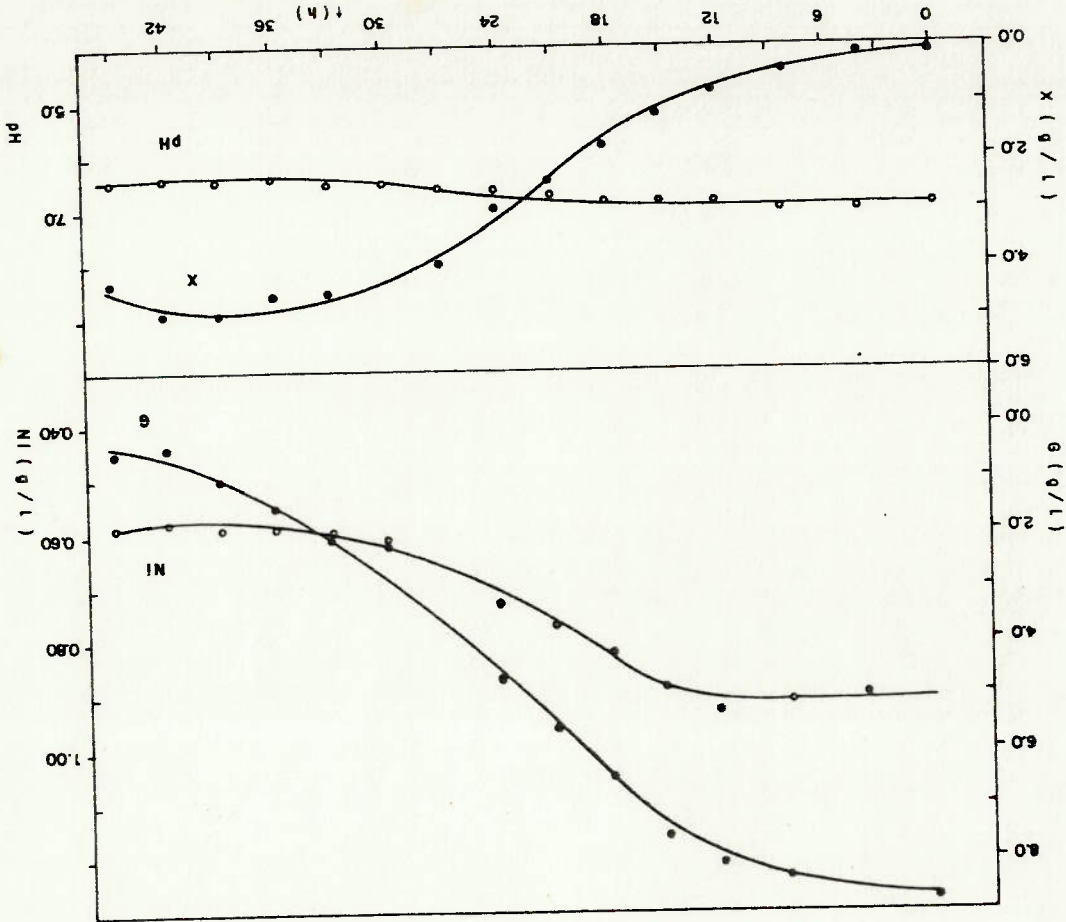


FIGURA 5.18 - VALORES DE pH, CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), CONCENTRAÇÕES DE GLICEROL (G) E NITRÔGÊNIO INORGÂNICO AO LONGO DO ENSAIO GS16 (EXPERIMENTO 6)

Tabela 5.24 Resultados do ensaio GS19. (Experimento 6).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	N <sub>1</sub> (g/l)	A	pH
0,0	0,09	9,80	0,64	0,01	7,07
3,0	0,10	9,49	0,62	0,11	7,06
6,0	0,38	9,04	0,63	0,38	7,25
9,0	0,84	9,24	0,63	1,30	7,25
12,0	1,60	-	0,61	1,80	7,22
15,0	1,80	8,66	-	2,53	7,00
18,0	2,18	7,43	0,52	2,75	6,88
21,0	2,39	6,19	0,47	3,55	6,88
24,0	2,73	4,78	0,42	3,85	6,91
27,0	3,38	4,10	0,39	4,30	6,80
30,0	3,71	3,03	0,34	4,80	6,66
33,0	4,27	2,54	0,31	5,10	6,35
36,0	5,34	1,63	0,22	5,75	6,40
39,0	4,81	1,48	0,22	5,73	6,50

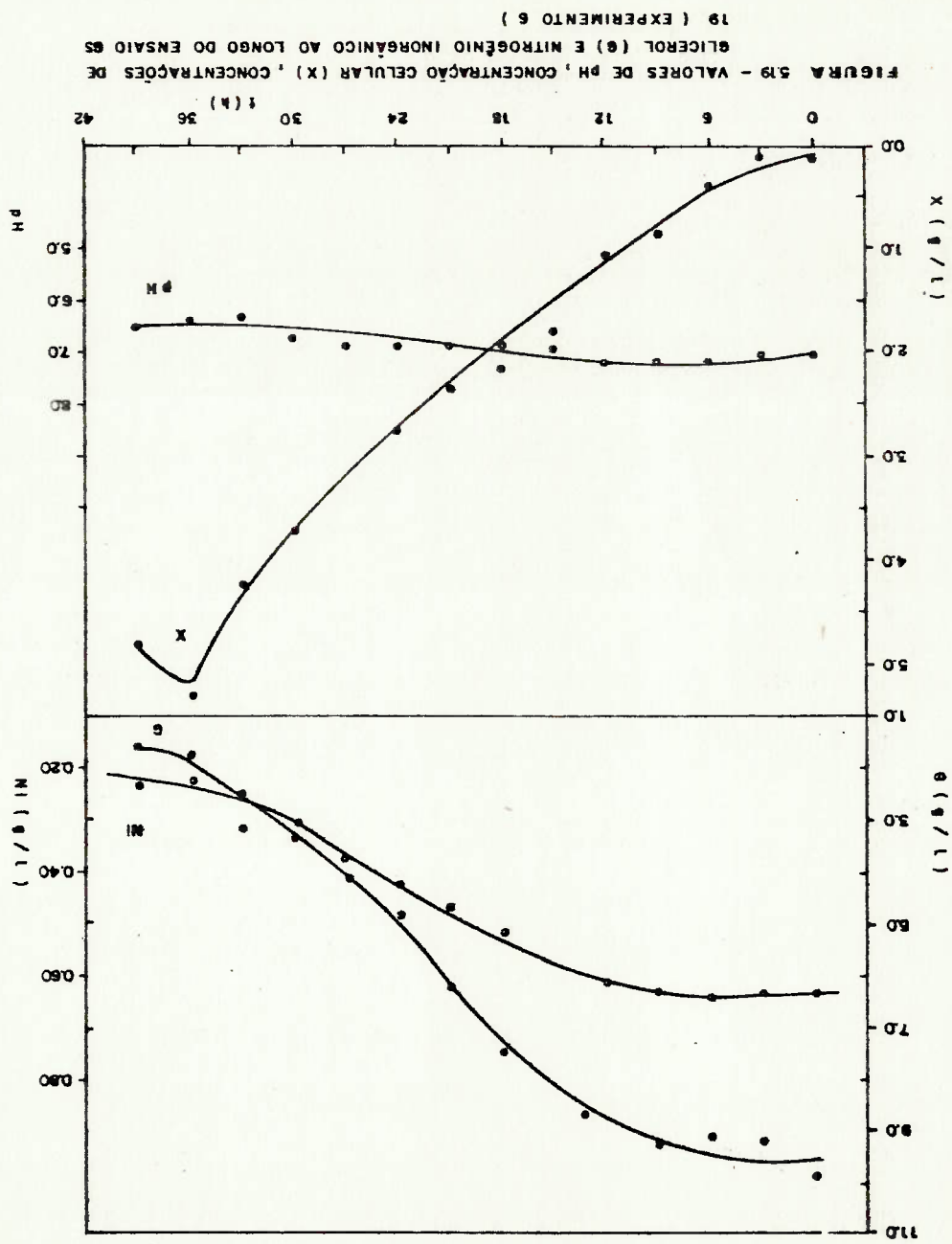
5.2.3 Discussão dos Resultados do E6

5.2.3.1 Análise Geral do Comportamento Bacteriano

Na tabela 5.25 foram reunidos os tempos totais de crescimento e os valores iniciais e finais de pH, X, G, N<sub>1</sub> que permitiram calcular os fatores de conversão e as produtividades que constam da tabela 5.26.

Nas figuras 5.20, 5.21 e 5.22 foram lançados os gráficos mono-logarítmicos de X em função do tempo para todos os ensaios do E6 e foram calculadas as velocidades específicas de crescimento exponencial que também constam da tabela 5.26.

Em todos os ensaios do E6 foram obtidas duas fases de crescimento exponencial, a exemplo do que já ocorrera nos ensaios do E5. Também da mesma forma, em todos os ensaios do E6 com glicerol extrato de levedura foram observados períodos iniciais em que a concentração de N<sub>1</sub> ficou praticamente constante enquanto a concen-





**Tabela 5.25** Tempo total de crescimento, valores iniciais e finais de pH; das concentrações de células ( $X_0, X_F$ ), glicerol ( $G_0, G_F$ ) e nitrogênio inorgânico ( $Ni_0, Ni_F$ ) para os ensaios do experimento 6.

Ensaio	Tempo de crescim. (h)	(pH) <sub>0</sub>	(pH)	X <sub>0</sub> (g/l)	X <sub>F</sub> (g/l)	G <sub>0</sub> (g/l)	G <sub>F</sub> (g/l)	(Ni) <sub>0</sub> (g/l)	(Ni) <sub>F</sub> (g/l)
GS13	14	6,75	6,83	0,06	1,08	1,63	0,20	0,14	0,11
GS11	22	6,80	6,28	0,06	2,49	3,14	0,04	0,26	0,16
GS14	27	6,92	6,62	0,04	4,11	5,30	0,33	0,45	0,29
GS15	27	6,95	6,51	0,06	5,10	7,02	0,45	0,64	0,44
GS16	33	6,89	6,42	0,08	4,56	8,94	2,02	0,91	0,60
GS19*	36	7,07	6,40	0,09	5,25	9,80	1,63	0,64	0,31
GS20**	40	7,00	6,50	0,08	1,47	2,71	0,05	0,26	0,10
ES3	12	7,02	7,15	0,06	0,28	-	-	0,24	0,26

\* com 1,5 g EL/l ; \*\* sem EL

**Tabela 5.26** Tempo para início das fases exponenciais de crescimento, velocidades específicas, fatores de conversão e produtividades para os ensaios do experimento 6.

Ensaio	G <sub>0</sub> (g/l)	G <sub>0</sub> mm	Início Expon. (h)	Início Expon. (h)	H <sub>max</sub> fase (h <sup>-1</sup> )	H <sub>max</sub> fase (h <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/G</sub> (g/g)	Y <sub>X/Ni</sub> (g/g)	P <sub>X</sub> (g/l.h)
GS13	1,63	17,7	0	0,289	8	0,107	0,71	28,3	0,073
GS11	3,14	34,1	0	0,264	14	0,087	0,77	26,1	0,110
GS14	5,30	57,6	0	0,306	12	0,095	0,81	26,6	0,151
GS15	7,02	76,3	0	0,257	9	0,108	0,77	25,2	0,187
GS16	8,94	97,2	0	0,201	15	0,096	0,65	14,5	0,136
GS19*	9,80	106,5	3	0,305	15	0,050	0,63	15,6	0,143
GS20**	2,71	29,3	3	0,075	-	-	0,68	12,0	0,046
ES3	0	0	2	0,147	-	-	-	-	0,018

\* com 1,5 g EL/l ; \*\* sem EL.

tração celular aumentava e a de glicerol diminuía.

Essas observações confirmam o que já foi exposto no item 5.1.3.1 de que a ocorrência das duas fases de crescimento era motivado pela transformação dos compostos nitrogenados presentes no extrato de levedura em amônia e que era assimilada por dois sistemas enzimáticos (GDH e GS-GOGAT) em paralelo durante a primeira fase de crescimento e apenas por um (GS-GOGAT) durante a segunda fase.

Um reforço muito importante para a validação da hipótese apre-

sentada foi obtido com os resultados do ensaio GS19, (cf. tabela

5.24 e figuras 5.19 e 5.22). Como observado no item precedente, a

concentração celular de "transição" entre as fases de crescimento

para o ensaio GS11, a 36 °C, era 0,8 g/l. Nos demais ensaios

de E6 em que se usou 1,0 EL/l, independentemente da concentração de

glicerol a concentração de "transição" situou-se entre 0,6 e 0,9g/l

(cf. figuras 5.20 e 5.21).

Entretanto, no ensaio GS19 com 1,5 g EL/l, a concentração de

"transição" era de 1,5 g EL/l (cf. figura 5.22), demonstrando que

a maior disponibilidade de amônia proveniente dos aminoácidos e

proteínas do extrato de levedura prolongou a ação biossintética da

GDH.

Os valores da tabela 5.26 foram lançados em gráficos na figura

5.23 e a primeira observação a ser feita diz respeito às velocidades

des específicas máximas de crescimento, que ficaram praticamente

constantes:  $\mu_{max}$  da primeira fase  $\approx 0,28 \text{ h}^{-1}$  para  $1,5 < G_0 < 7,0$

e  $\mu_{max}$  da segunda fase  $\approx 0,107 \text{ h}^{-1}$  para  $1,5 < G_0 < 9,0$ . No caso da

velocidade da primeira fase notou-se um pequeno decréscimo quando

$G_0 \approx 9,0 \text{ g/l}$ , denotando um início de inibição pelo substrato, que

foi evitada ao se usar meio de cultura mais rico em extrato de le-

vedura.

5.33  
 Outro efeito positivo da concentração mais elevada do EL foi o aumento da concentração celular final do GS19 em relação ao GS16 em cerca de 15%. Embora esse aumento não seja assim tão expressivo

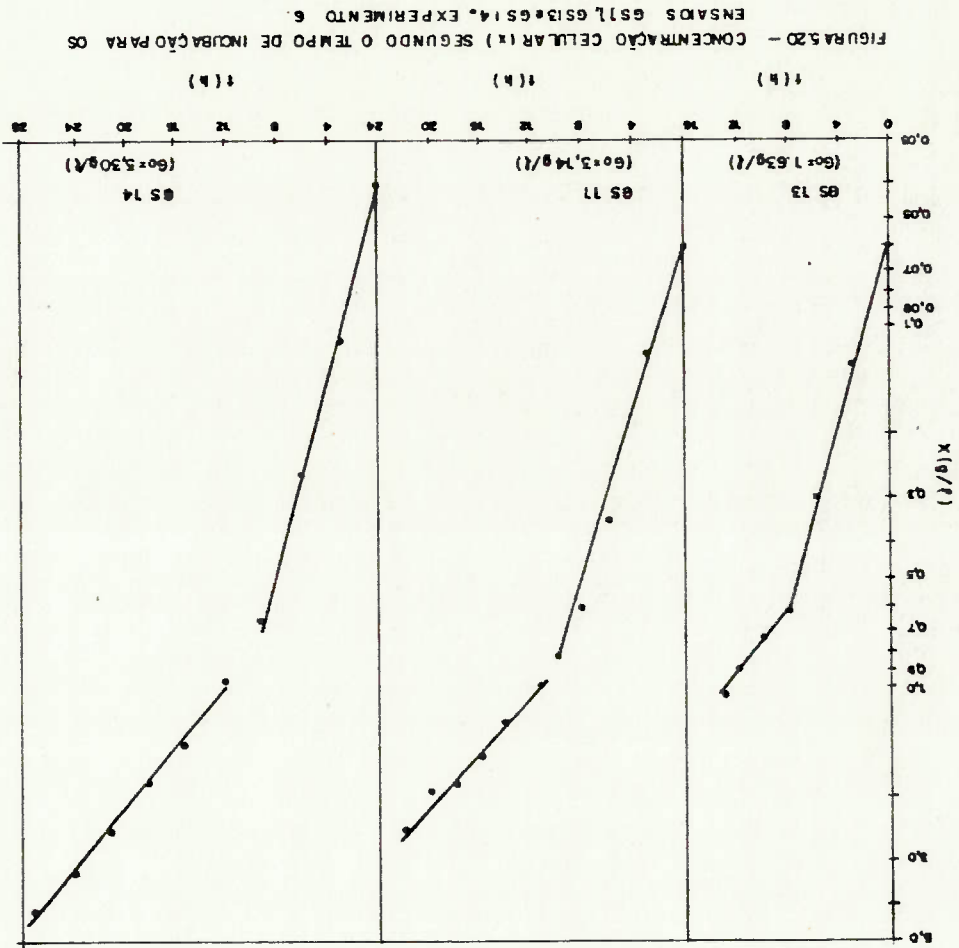
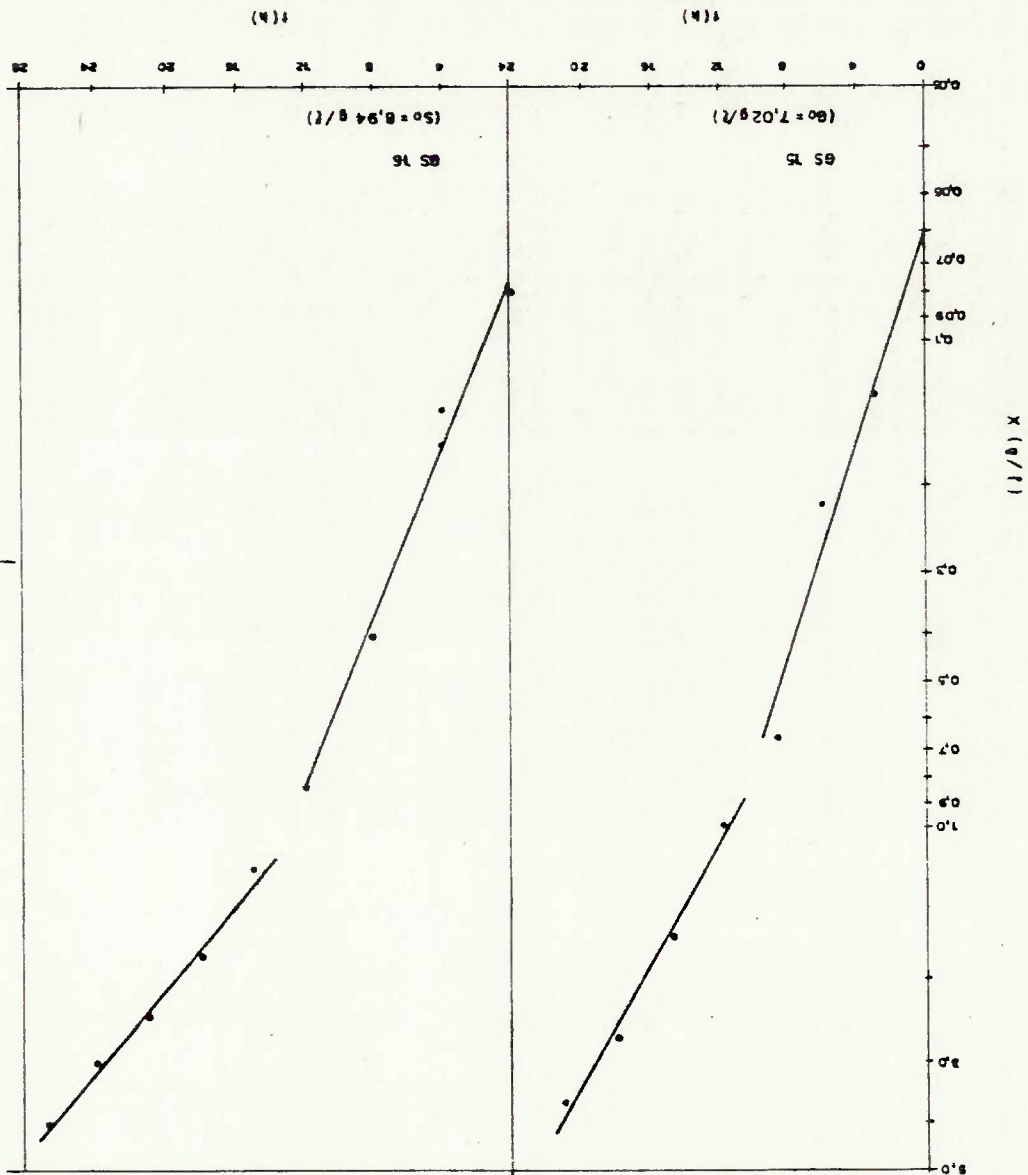


FIGURA 5.21 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (%) SEQUENDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA OS ENSAIOS GS 15 e GS 16 EXPERIMENTO 6



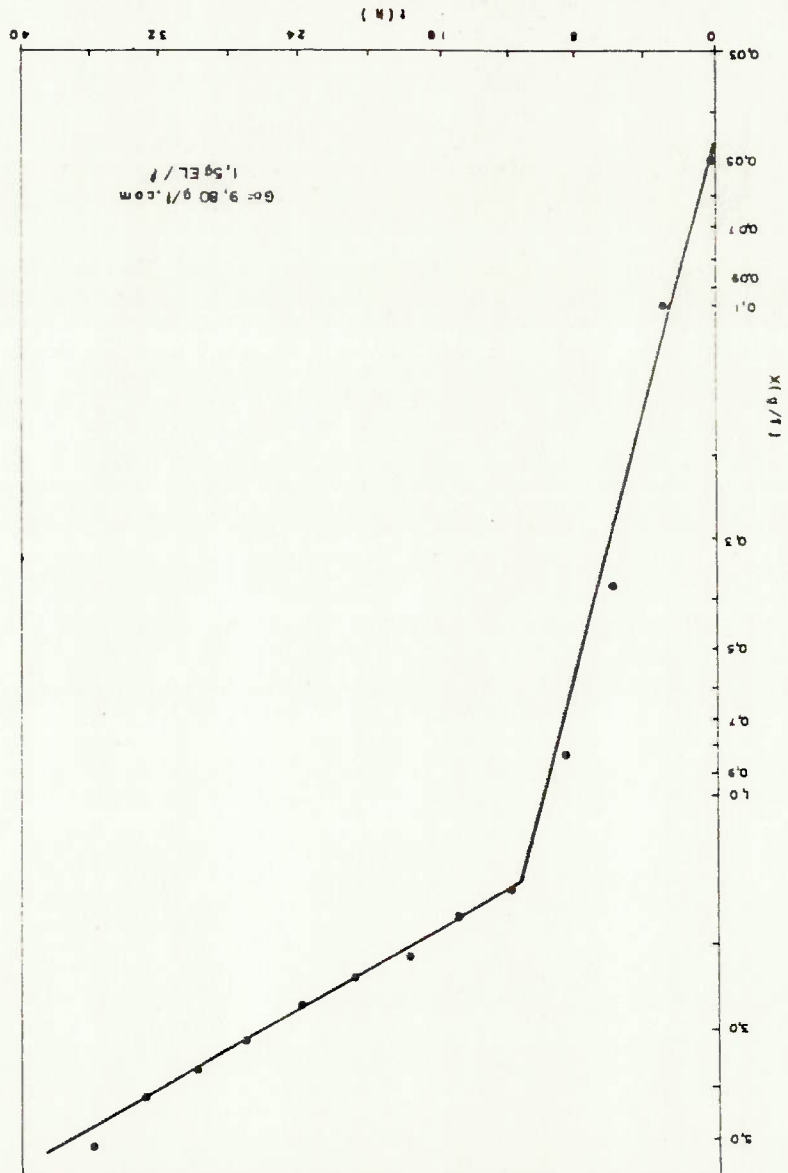
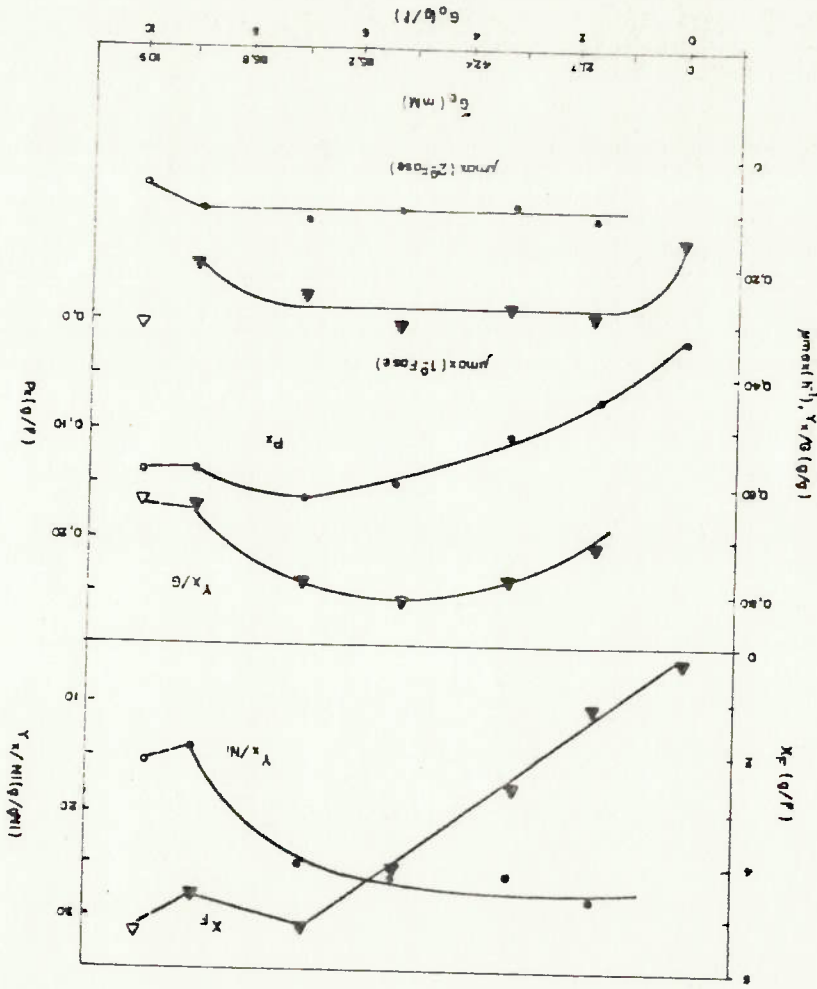


FIGURA 5.22 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X) SEGUNDO O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA OS 18 EXPERIMENTOS 6.

FIGURA 5.23 - VALORES DE  $j_{max}$ ,  $P_x$ ,  $Y_x/G$ ,  $Y_x/N$  SEGUNDO A CONCENTRACAO INICIAL DE GLICEROL. (EXPERIMENTO 6)



extrato de levedura ( $G_0 = 10 \text{ g/l}$ ,  $EL = 1,5 \text{ g/l}$ ) poderia haver int̄ em quanto à utilização de meio mais concentrado em glicerol e  $7,0 \text{ g/l}$ .

Assim, para o cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em glicerol (com  $1,0 \text{ g EL/l}$ ) escolheu-se uma faixa de concentração com  $G_0$  entre  $3,0$  e  $7,0 \text{ g/l}$ .

A concentração celular final foi crescente até  $G_0 = 7,0 \text{ g/l}$  e de pois decresceu ligeiramente e esse comportamento foi acompanhado pela produtividade celular.

o valor para  $G_0 = 7,0 \text{ g/l}$  fosse apenas 7% inferior ao máximo. ra o fator  $Y_{X/N_1}$  o máximo ocorreu para  $1,6 < G_0 < 5,0 \text{ g/l}$ , embora faixa de 3 a 7  $\text{g/l}$  ele teve valores bem próximos ao máximo. Já pa o fator de conversão  $Y_{X/G}$  foi máximo para  $G_0 = 7,0 \text{ g/l}$  mas na

taneamente aos requisitos.

figura 5.23 que não havia um único valor de  $G_0$  que atendesse simu da tores de conversão fossem máximos, pode-se observar, a partir de glicerol em que a concentração celular, a produtividade e os fa Levando-se em conta que interessava escolher uma concentração

Adequada ao Cultivo de *A. brasiliense* sp 245

5.2.3.2 Determinação da Concentração de Glicerol mais

dura. ela ocorreu, independentemente, da concentração de extrato de levedura. Quanto à floculação, observou-se que nos ensaios com  $G_0 > 5 \text{ g/l}$  sobre a cultura.

gura 5.23), devido aos efeitos inibitórios já citados do glicerol valores muito mais baixos para as três grandezas referidas (cf. Fi. Certamente um cultivo com  $G_0 = 10 \text{ g/l}$  e  $EL = 1,0 \text{ g/l}$  apresentaria levedura interrompeu a tendência decrescente de  $Y_{X/G}$ ,  $Y_{X/N_1}$  e  $P_X$ . vo, deve-se notar que a utilização de meio mais rico em extrato de

resse, principalmente pelo aumento da concentração celular, embora restasse a dúvida sobre o correspondente incremento na concentração celular numérica (N)

### 5.3 Experimento 7 (E7)

#### 5.3.1 Objetivos e Condições dos Ensaio do E7

O experimento 7 teve como objetivo encontrar a concentração inicial de glicerol mais adequada ao cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em processo descontínuo, em fermentador; buscou também determinar a influência de diferentes grandezas (principalmente da concentração de oxigênio dissolvido) na velocidade específica de respiração e no coeficiente de transferência de oxigênio.

De acordo com os resultados obtidos no E6 (cf. 5.2.3.2) foram programados ensaios com concentração inicial de glicerol entre 3 e 7 g/l. Foi também programado um ensaio (correspondente ao GS19, cf. 5.2.1) com  $G_0 = 10$  g/l e 1,5 EL/l. Da mesma forma que no experimento precedente, procurou-se manter a relação

$$\frac{3}{|\text{glicerol}|} = \frac{1,32}{|(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4|} = \frac{2,64}{|\text{K}_2\text{HPO}_4|}$$

A tabela 5.27 apresenta as condições em que foram efetuados os ensaios do E7, que seguiram a metodologia geral descrita no item 3.4. Todos os ensaios foram realizados a 36°C, segundo as conclusões do E5.

Nos ensaios G6 e G7 foram medidos a velocidade específica de respiração  $QO_2$  e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) pelo "método dinâmico" (cf. 3.6.12).



Este ensaio, realizado nas condições apresentadas na tabela 5.27 foi interrompido às 10 h de cultivo, quando ainda havia 59,5% do glicerol inicialmente presente. A tabela 5.28 e a figura 5.24 apresentam os resultados obtidos até à paralisção. A interrupção no ensaio foi motivada pelo aparecimento de floccos bacterianos muito grandes. Quando se parou a agitação e a aeração observou-se que a maior parte dos flocos decantou, mas uma outra parcela flutuou: esses últimos eram distórficos, com ramificações, enquanto os que decantaram eram quase esféricos, sem ramificações ou prolongamentos. Devido à vazão de ar relativamente baixa ( $\phi = 0,2 \text{ min}^{-1}$ ) houve

### 5.3.2 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GD2

Nas amostras finais dos ensaios GD3 a GD7 foram efetuadas determinações da concentração celular numérica (N), que serão apresentadas no item 5.3.8.

OBS: Ensaios GD2 e GD3 sem anti-espumante. Os demais com 0,05 ml de ANTIFOAM/Q2-3255/l de meio de cultura.

Ensaio	Go (g/l)	Conc. inicial ext. Levedura (g/l)	Volume de meio de cultura (l)	Vazão de ar (l/min)	Frequência de agitação (rpm)
GD2	3,26	1,0	10,0	2,0	440
GD3	5,14	1,0	10,0	5,0	440
GD4	2,37	1,0	10,0	4,2	440
GD5	8,40	1,0	10,0	5,0	440
GD6	10,40	1,5	10,0	5,0-6,0	440
GD7	3,97	1,0	11,5	5,5	440

Tabela 5.27 Condições dos ensaios do E7.

Tabela 5.28 Concentração celular, de glicérol, de proteína celular, de nitrogênio inorgânico e de proteína celular, absorvância, massa de NaOH adicionada, % de oxigênio dissolvido durante o ensaio GD2 (Experimento 7).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A	M (mg/l)	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,19	3,26	0,27	0,17	0,19	0	100,0
2,0	0,28	3,09	0,27	0,19	0,24	0	70,0
3,0	0,31	3,29	0,26	0,19	0,32	1,0	65,0
4,0	0,44	2,90	0,26	0,25	0,42	1,0	62,0
5,0	0,52	-	0,26	0,41	0,50	1,0	63,0
6,0	0,68	2,74	0,27	0,45	0,58	1,0	58,0
7,0	0,78	2,40	0,25	0,45	0,55	1,0	60,0
8,0	0,85	2,52	0,26	0,49	0,56	3,0	59,0
9,0	1,01	2,18	0,26	0,51	0,57	43,5	58,0
10,0	1,13	1,94	0,25	-	0,60	43,5	57,5

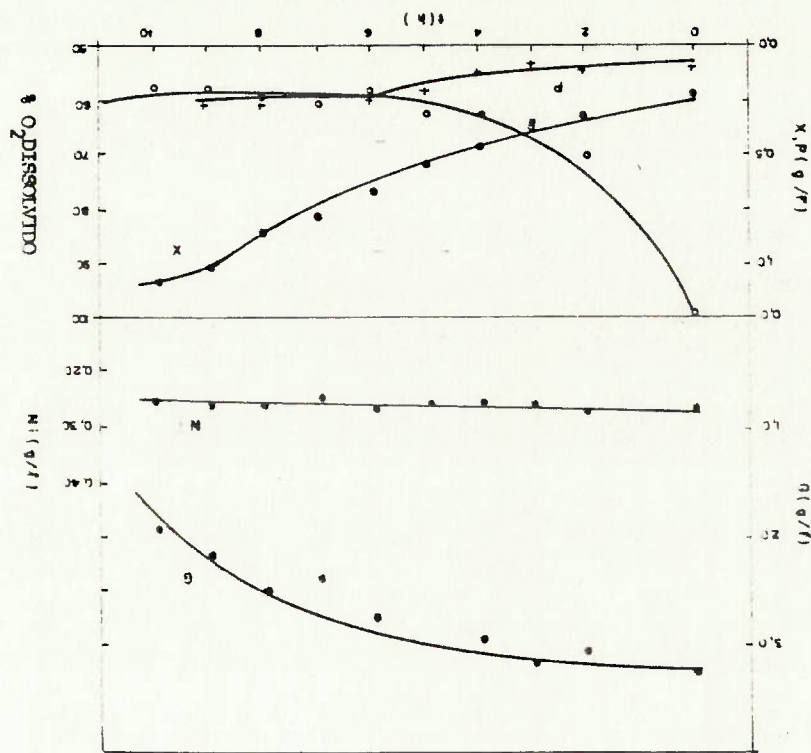


FIGURA 5.24 - CONCENTRAÇÕES DE CELULAS (X), GLICÉROL (G) E NITRÔGENIO INORGÂNICO (Ni), E PROTEÍNA CELULAR (P) E % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO GD2 (EXPERIMENTO 7)

um decréscimo da inicial na porcentagem de oxigênio dissolvido que se manteve quase constante, em torno de 59% a partir das 5 h de cultivo, denotando que a demanda total de oxigênio manteve-se inalterada, apesar de a concentração celular ter duplicado entre as 5 e às 10 horas (cf. figura 5.24).

Praticamente constante ao longo das 10 h de cultivo manteve-se a concentração de nitrogênio inorgânico, mostrando, mais uma vez, que na fase inicial do crescimento bacteriano os compostos presentes no extrato de levedura eram as principais fontes de nitrogênio para a cultura. Essa falta de consumo de nitrogênio inorgânico fez com que o pH se mantivesse também quase inalterado como o demonstra a pequena massa de NaOH adicionada ao reator. Mesmo sem ter chegado ao final do cultivo foi possível perceber duas fases exponenciais no crescimento microbiano o que será discutido no item 5.3.9.

### 5.3.3 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GD3

Os resultados do ensaio GD3 encontram-se na tabela 5.29 e na figura 5.25.

Observou-se flocculação ao longo de todo o ensaio, mas de muito menor intensidade do que ao GD2, sendo os flocos mais densos que o meio de cultura.

O cultivo transcorreu normalmente até às 16 h, quando havia cerca de 10% do glicerol inicialmente presente. Houve problemas de formação de espuma, pois o meio não continha anti-espumante e, por causa disso, o pH manteve-se na faixa de  $7,0 \pm 0,2$ , sendo que no início do cultivo (até 9,0 h) estava em 7,0. Deve-se notar que esse intervalo inicial coincide com o do pequeno consumo de nitrogênio inorgânico, como pode ser visto na figura 5.25.

Tabela 5.29 Concentração celular, de glicérol, de nitrogênio inorgânico e de proteína celular, absorvância, massa de NaOH adicionada, % de oxigênio dissolvido durante o ensaio GD3. (Experimento 7).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A	M (mg/l)	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,21	5,14	0,48	0,16	0,21	0	100,0
2,0	0,30	5,21	0,48	0,17	0,17	0	100,0
4,0	0,50	5,18	0,47	0,33	0,29	0	100,0
5,0	0,65	4,98	0,46	0,44	0,37	0	98,0
6,0	-	4,85	0,46	0,37	0,46	0	97,0
7,0	1,06	4,41	0,46	0,61	0,60	0	96,0
8,0	-	4,24	0,46	0,62	0,69	0	96,0
9,0	1,35	3,95	0,44	0,69	1,32	0	95,0
10,0	-	3,45	0,43	0,77	1,50	22,0	92,0
11,0	1,85	3,05	0,41	0,81	1,68	24,0	90,0
13,0	2,21	1,76	0,33	1,10	2,50	257	83,0
14,0	1,94	1,14	0,29	1,07	3,05	346	84,0
15,0	2,56	-	0,25	1,55	3,60	594	83,0
16,0	2,62	0,50	0,26	1,50	3,22	594	86,0

Obs.: Observada floculação desde o início do cultivo.

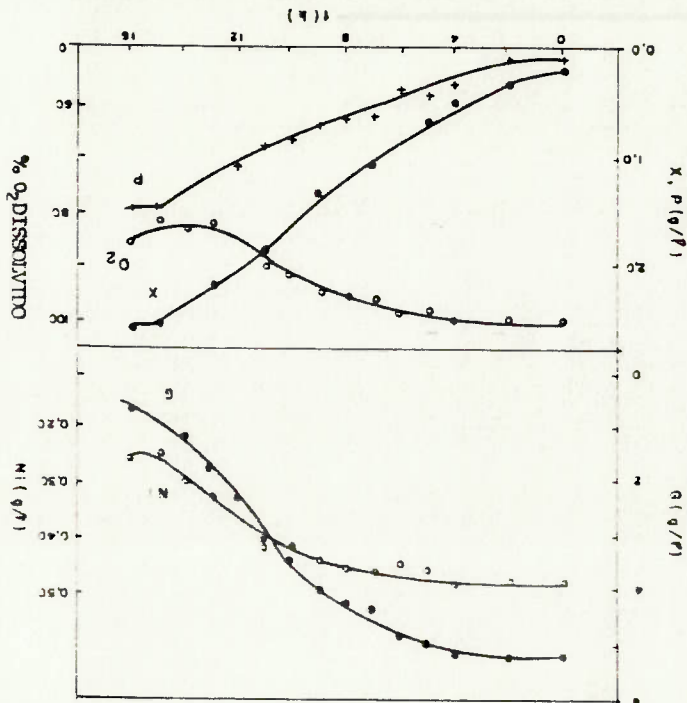


FIGURA 5.25 — CONCENTRAÇÕES DE CELULAS (X), DE GLICÉROL, DE NITROGÊNIO INORGÂNICO (Ni) E DE PROTEÍNA (P) EM % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO GD3 (EXPERIMENTO 7)

#### 5.3.4 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GD4

Os resultados do GD4 encontram-se na tabela 5.30 e na figura 5.26. O ensaio foi interrompido às 11 h de cultivo, quando ainda estavam presentes 35% do glicérol inicialmente presente, devido à formação de flocos semelhantes aos já descritos no item 5.3.2 (GD2).

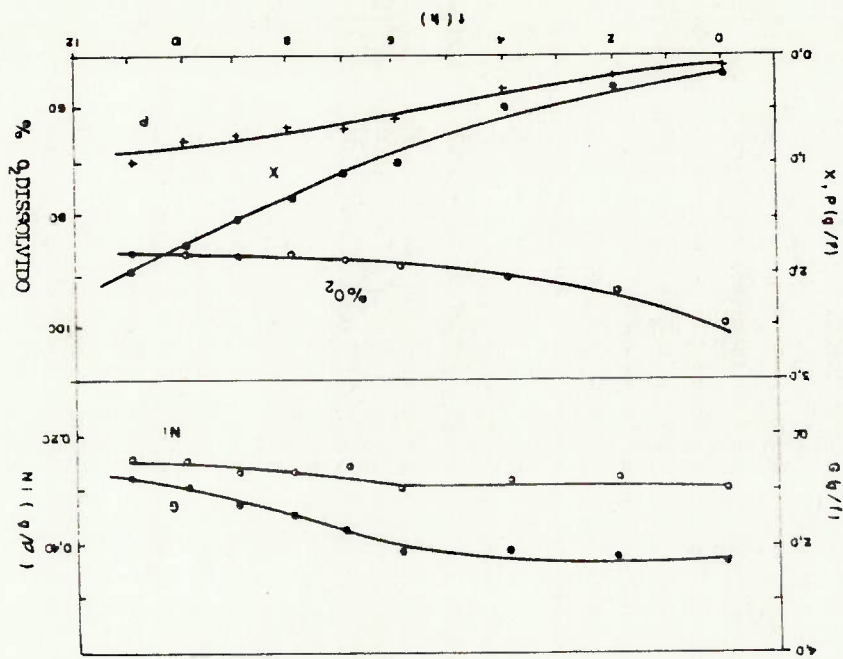
No ensaio GD4 notou-se que o inóculo do cultivo em fermentador, em incubador rotativo nas condições especificadas nos itens 3.4.2 e 3.4.3, já se apresentava floculado. Imaginando que essa floculação inicial pudesse ser a responsável pelo enorme aumento observado, foram tomadas algumas medidas para diminuí-la ou evitá-la, que serão descritas nos itens seguintes.

Uma conclusão importante pôde ser tirada da observação da relação entre as porcentagens de oxigênio dissolvido e a floculação nestes três primeiros ensaios. No GD2 a porcentagem de oxigênio dissolvido foi menor do que 80% a partir das 1,5 h de cultivo e observou-se intensa floculação, que no GD4 também foi observada embora a porcentagem de oxigênio fosse superior a 80% em todo o ensaio. E, finalmente, no GD3 a floculação não foi tão intensa, embora a porcentagem de oxigênio também não tenha caído abaixo de 80% em momento algum. Dessa forma, concluiu-se que a concentração de oxigênio dissolvido não era determinante da floculação da cultura. A mesma coisa pode ser dita em relação à vazão de ar (que determina maior quantidade e tamanho das bolhas), pois no GD2 e GD4 ela variou muito (2 a 4,2 l/min, cf. tabela 5.27) com o mesmo tipo de resultado, enquanto no GD3 e GD4 houve vazões próximas com resultados bem diversos.

**Tabela 5.30** Concentração celular, de glicérol, de nitrogénio inorgânico, de proteína celular, absorvância, massa de NaOH adicionada e % de oxigénio dissolvido durante o ensaio GD4 (Experimento 7).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A	M (mg/l)	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,19	2,37	0,30	0,14	0,20	0	100
2,0	0,31	2,20	0,28	0,19	0,29	0	94
4,0	0,51	2,11	0,28	0,35	0,44	0	92
6,0	0,97	2,15	0,30	0,61	0,59	0	89
7,0	1,07	1,69	0,26	0,65	0,67	0	88
8,0	1,32	1,48	0,27	0,65	0,69	4	87
9,0	1,52	1,29	0,27	0,69	0,71	5	87
10,0	1,74	0,99	0,25	0,73	1,35	6	87
11,0	2,02	0,82	0,25	1,06	1,08	6	86

Observada intensa floculação a partir das 6 h de cultivo



**FIGURA 5.35** - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), DE GLICÉROL (G), DE NITROGÉNIO INORGÂNICO (NI) E % DE OXIGÉNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO GD4 (EXPERIMENTO 7)

No preparo do inóculo do GD5 foram incubados no "shaker", dez erlenmeyers (e não seis como normalmente se fazia, cf. 3.4.3) e aproveitados os cinco que, visualmente, apresentavam menor floculação.

Os resultados das grandezas medidas ao longo do ensaio encontram-se na tabela 5.31 e na figura 5.27.

Os resultados de  $\bar{QO}_2$  e  $k_{La}$  em alguns momentos do ensaio, calculados segundo a sequência descrita em 3.6.12, constam da tabela 5.32 e da figura 5.28. Os valores da concentração celular e da porcentagem de oxigênio dissolvido que constam destas últimas foram interpoladas da figura 5.27.

Neste ensaio notou-se floculação desde o início do cultivo, mas com muito menor intensidade do que no GD2 e GD4. Praticamente todos os flocos decantaram quando em repouso.

As curvas de  $\bar{QO}_2$  e  $\bar{QO}_2 \cdot X$  (figura 5.28) apresentaram comportamentos inesperados, com regiões nitidamente diferentes ao longo do tempo. Como isso também ocorreu nos ensaios seguintes (GD6 e GD7) preferiu-se deixar a discussão em conjunto para o item 5.3.10. O mesmo se aplica para os coeficientes de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) que serão discutidos no item 6.6.

Tabela 5.31 Concentração celular, de glicérol, de nitrogênio inorgânico, de proteína celular, absorvância, massa de NaOH adicionada e % de oxigênio dissolvido durante o ensaio GDS (Experimento 7).

t (t)	X (g/l)	G (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A	M (mg/l)	% O <sub>2</sub> dissolv.
-------	---------	---------	----------	---------	---	----------	---------------------------

0,0	0,20	8,40	0,64	-	0,22	0	100
2,0	0,38	8,14	0,65	0,23	0,22	107	100
4,0	0,57	7,92	0,62	0,37	0,37	311	100
6,0	0,91	7,49	0,60	0,61	0,52	311	99
8,0	1,29	7,04	0,56	0,63	0,69	450	99
9,0	1,51	6,45	0,51	0,63	0,78	450	100
10,0	1,70	5,91	0,51	0,75	1,08	450	100
11,0	2,25	5,38	0,48	1,09	1,43	609	96
12,0	2,17	3,98	0,38	-	2,10	650	96
14,0	2,65	-	0,33	1,19	-	906	96
16,0	3,01	0,51	0,32	1,52	3,90	1113	100
18,0	2,74	0,30	0,32	1,45	3,30	1113	100

Observada floculação desde o início do cultivo

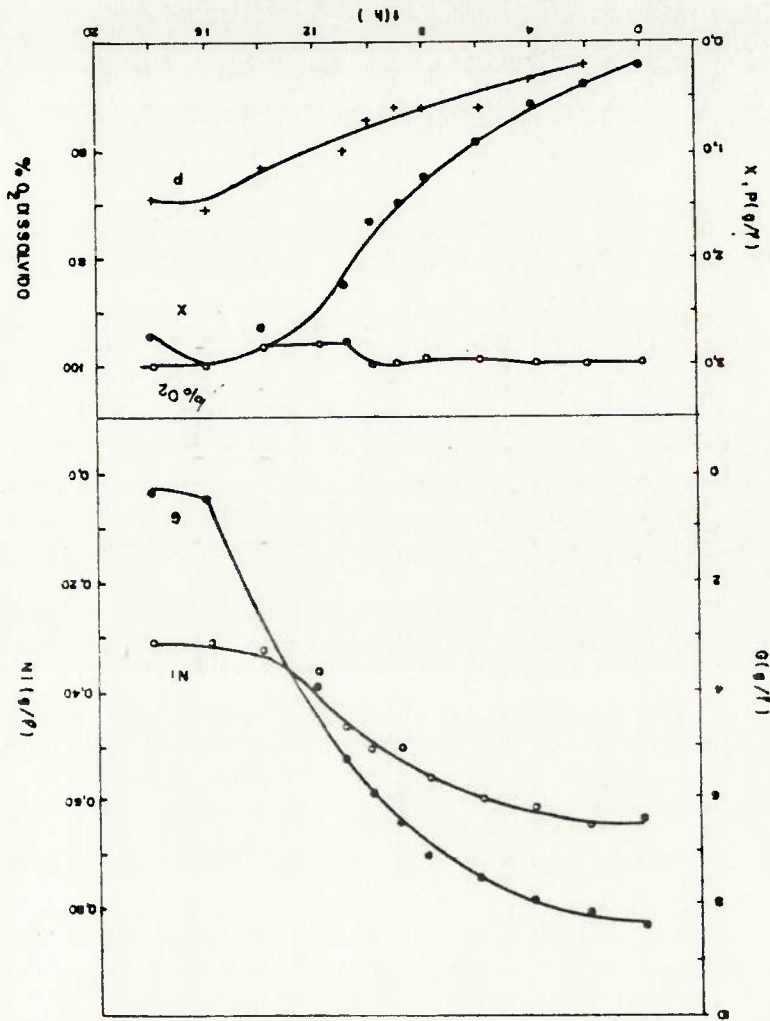


FIGURA 5.27 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), DE GLICÉROL (G), DE NITROGÊNIO INORGÂNICO (Ni) E DE PROTEÍNA CELULAR (P) E % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO GDS (EXPERIMENTO 7).



Tabela 5.32 Concentração celular (X), porcentagem de O<sub>2</sub> dissolvido, demanda total de oxigênio (QO<sub>2</sub>.X), velocidade específica de respiração (QO<sub>2</sub>) e coeficiente de transferência de oxigênio (k<sub>L</sub>a) durante o ensaio GDS (Experimento 7).

t (h)	X (g/L)	% O <sub>2</sub> dissolv.	QO <sub>2</sub> .X (10 <sup>-4</sup> mmol O <sub>2</sub> /L.s)	QO <sub>2</sub> (10 <sup>-4</sup> mmol O <sub>2</sub> /g.s)	k <sub>L</sub> a (10 <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
3,5	0,55	100	1,03	1,87	-
5,0	0,75	100	3,63	4,84	1,99
6,0	0,91	99	3,56	3,91	2,75
7,0	1,15	99	3,63	3,16	2,04
10,0	1,70	100	8,93	5,25	2,24
12,0	2,50	96	12,05	4,82	3,03
13,0	2,75	96	11,24	4,09	3,19
14,0	2,80	96	11,79	4,21	2,35
17,0	2,85	100	2,59	0,91	2,01
18,0	2,75	100	1,39	0,51	-

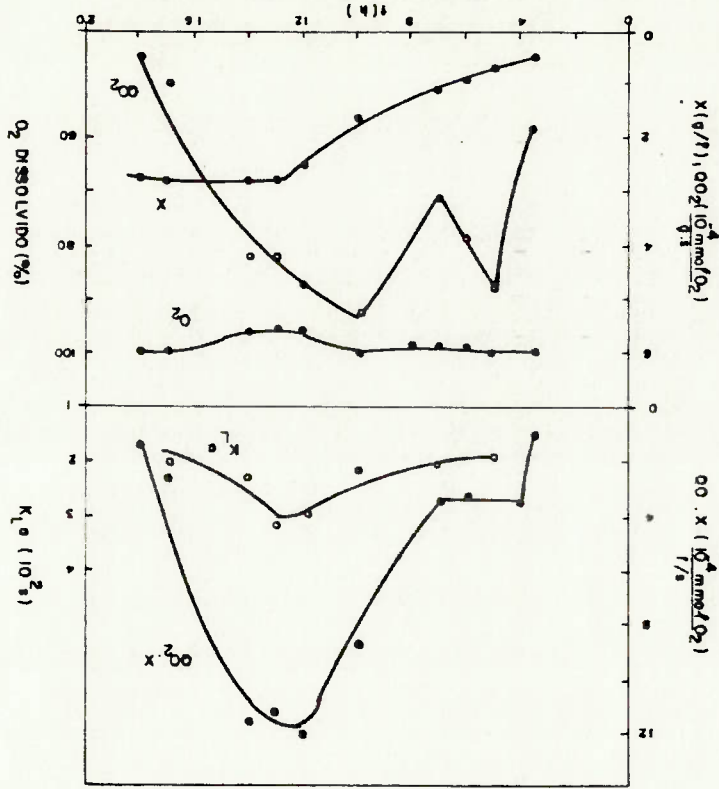


FIGURA 5.28 - CONCENTRAÇÃO CELULAR (X), % O<sub>2</sub> DISSOLVIDO, DEMANDA GLOBAL DE O<sub>2</sub> (QO<sub>2</sub>.X), VELOCIDADE ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO (QO<sub>2</sub>), COEF. DE TRANSF. DE O (k<sub>L</sub>a) AO LONGO DO ENSAIO GDS 5. (EXPERIMENTO 7).

O ensaio GD6 foi efetuado em fermentador nas condições aproximadas do GS19 (cf. tabela 5.24 e figura 5.18), com meio de cultura mais rico em glicerol (10,3 g/l) e EL (1,5 g/l), segundo as conclusões apresentadas no item 5.2.3.2.

Também neste caso foi adotado o procedimento já descrito no GD5 de escolher os frascos com menor floculação para compor o inóculo do fermentador.

As tabelas 5.33 e 5.34 e as figuras 5.29 e 5.30 apresentam os resultados obtidos.

A exemplo do observado no GD5 houve pouca floculação e consumo praticamente total do glicerol. Os flocos do GD6 decantaram quando em repouso.

Os resultados destes dois ensaios (GD5 e GD6) confirmaram a hipótese levantada na apresentação do GD4 (cf. 5.4.2.3) de que os flocos que o inóculo trazia eram os principais responsáveis pela formação dos flocos mais leves e distorções observados no GD2 e GD4. Uma possibilidade é que os flocos pré-formados fossem envolvidos por bolhas de ar no fermentador, servindo então esse conjunto como ponto de apoio para o crescimento dos flocos irregulares.

Tabela 5.33 Concentração celular, de glicérol, de nitrogênio inorgânico, de proteína celular, absorvância, pH e % de oxigênio dissolvido durante o ensaio GD6 (Experimento 7).

t (h)	X (g/L)	G (g/L)	Ni (g/L)	P (g/L)	A	pH	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,23	10,30	1,01	0,13	0,20	7,05	100,0
2,0	0,37	9,95	1,03	0,25	0,24	7,22	91,0
4,0	0,48	9,73	1,01	0,28	0,38	7,20	96,0
6,0	0,79	9,79	-	0,46	0,57	7,15	93,0
7,0	1,17	10,75	1,07	0,61	0,50	7,12	93,0
8,0	1,20	8,75	1,01	0,66	0,70	7,10	92,0
9,0	1,35	-	-	0,75	1,11	7,14	92,0
10,0	1,41	8,29	0,99	0,78	1,45	-	90,0
11,0	1,61	7,74	0,97	0,80	1,70	7,05	88,0
12,0	2,06	7,24	0,91	0,99	2,13	7,00	86,0
14,0	2,38	5,78	0,85	1,30	3,10	6,85	84,0
16,0	3,56	3,69	0,73	1,82	4,20	6,84	79,0
18,0	4,37	0,40	0,63	2,19	5,00	6,70	82,0
20,0	3,76	0,35	0,62	2,17	3,85	6,50	92,0

Observada flocculação desde o início do cultivo

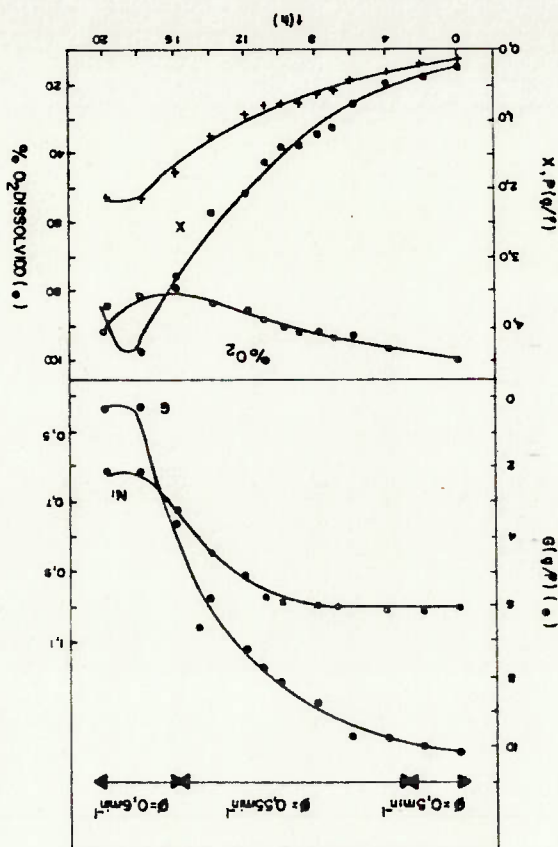


FIGURA 5.29 - CONCENTRAÇÃO DE CELULAS (X), DE GUCEROL (G), DE NITROGÊNIO INORGÂNICO (Ni) E DE PROTEÍNA CELULAR (P) E % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO GD 6. (EXPERIMENTO 7).

Tabela 5.34 Concentração celular (X), porcentagem de O<sub>2</sub> dissolvido (X), demanda total de oxigênio (QO<sub>2</sub>.X), velocidade específica de respiração (QO<sub>2</sub>), coeficiente de transferência de oxigênio (k<sub>L</sub>a) durante o ensaio GD6 (Experimento 7).

t (h)	X (g/l)	% O <sub>2</sub> dissolv.	QO <sub>2</sub> .X (10 <sup>-4</sup> mmol O <sub>2</sub> /l.s)	QO <sub>2</sub> (10 <sup>-4</sup> mmol O <sub>2</sub> /g.s)	k <sub>L</sub> a (10 <sup>2</sup> s) <sup>-1</sup>
2,5	0,40	97	1,82	4,55	2,52
4,5	0,60	95	2,38	3,97	2,40
6,5	0,80	94	2,75	3,44	2,82
9,5	1,50	90	9,42	6,28	2,66
13,0	2,30	85	10,71	4,66	2,25
16,5	3,50	80	11,58	3,31	2,19
18,5	4,35	84	10,79	2,48	2,57
20,0	3,75	92	3,98	1,06	2,42

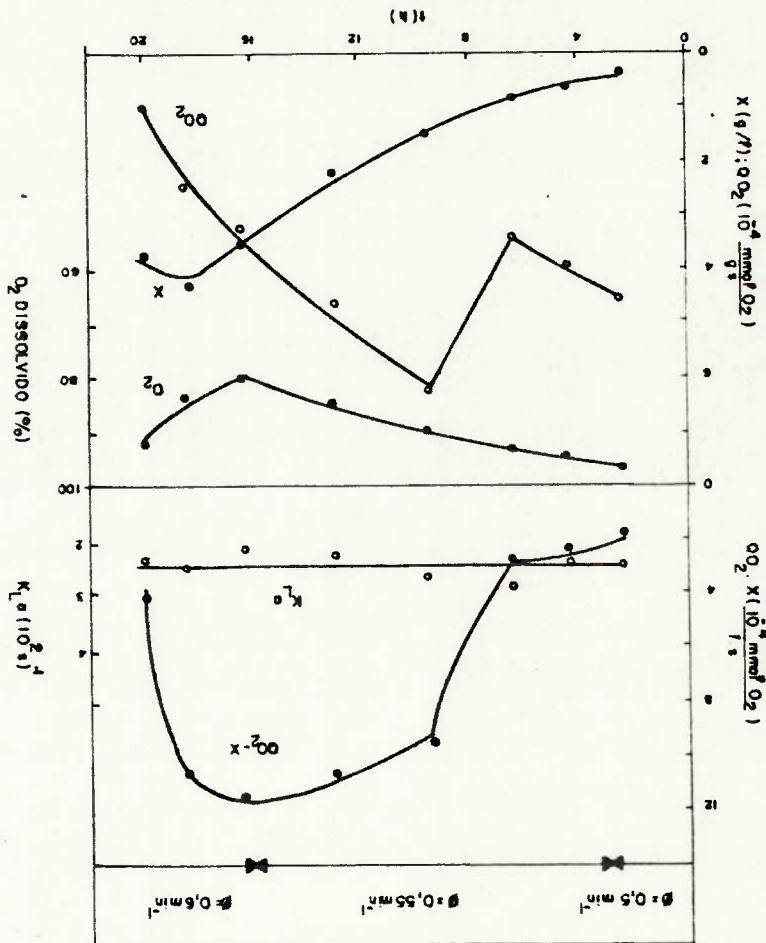


FIGURA 5.30- CONCENTRAÇÃO DE CELULAS (X), % DE O<sub>2</sub> DISSOLVIDO (O<sub>2</sub>), DEMANDA GLOBAL DE OXIGÊNIO (QO<sub>2</sub>.X), VELOCIDADE ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO (QO<sub>2</sub>) E COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO (k<sub>L</sub>a) DURANTE O ENSAIO GD6 (EXPERIMENTO 7).

### 5.3.7 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GD7

Neste ensaio GD7 procurou-se evitar a interferência da floclulação inicial no cultivo, pela diminuição da idade do inóculo. A utilização nos ensaios precedentes foi determinada a partir do ensaio GS11, observando as figuras 5.6 e 5.11.

Nesta última determinara-se que a segunda fase exponencial para o cultivo a 36°C com  $G_0 \approx 3,0$  g/l perdurava até 22 h. Assim, a decisão de retirar os frascos do incubador rotativo para inoculação do fermentador com 18 h procurara obter altas concentrações celulares, evitando a utilização de culturas na fase estacionária.

Com a repetição da floclulação nos frascos com 18 h de cultivo (que deve-se frisar, não ocorreria no GS11, cf. tabela 5.7) decidiu-se antecipar a retirada dos frascos do incubador rotativo para 14 horas, aproximadamente no início da segunda fase de crescimento (cf. tabela 5.17).

Para compensar a menor concentração celular no incubador rotativo e manter uma concentração inicial no fermentador próxima às utilizadas nos outros ensaios GD, aumentou-se o volume do inóculo para 1,5 litros e o volume total do meio de cultura para 11,5 litros (o que corresponde a uma porcentagem de inóculo de 13%).

Com esse procedimento conseguiu-se concentração celular inicial ( $X_0 = 0,24$  g/l) compatível com a obtida nos outros ensaios GD (cf. tabela 5.38) e também se reduziu muito a quantidade de flocos ao final do ensaio, em comparação com as observadas nos GD2 e GD4 (que tinham concentrações iniciais de glicerol menores do que a do GD7 e não chegaram a se completar).

Então parece claro que se recomenda a diminuição da idade do inóculo, como forma de reduzir a floclulação durante o cultivo em fermentador.

Tabela 5.35 Concentração celular, de glicerol, de nitrogênio inorgânico, de proteína celular, absorbância, pH e porcentagem de O<sub>2</sub> dissolvido durante o ensaio GD7 (Experimento 7).

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	Ni (g/l)	P (g/l)	A	pH	% O <sub>2</sub> dissolv.
0,0	0,24	3,97	0,28	-	0,29	6,85	100,0
2,0	0,76	3,44	0,30	0,48	0,70	-	86,0
4,0	1,10	2,75	0,28	0,65	1,50	7,08	85,0
5,0	1,44	2,14	0,26	1,02	1,75	7,10	84,0
6,0	1,50	1,56	0,24	1,05	1,90	6,94	83,0
7,0	1,66	1,16	0,23	1,17	1,80	6,93	70,0
9,0	2,10	0,12	0,19	1,20	2,00	6,88	81,0
10,0	2,12	0,10	0,19	0,95	1,80	6,96	90,0
11,0	2,00	0,19	0,19	0,94	1,60	7,10	93,0

Observada floculação a partir das 9,0 h de cultivo

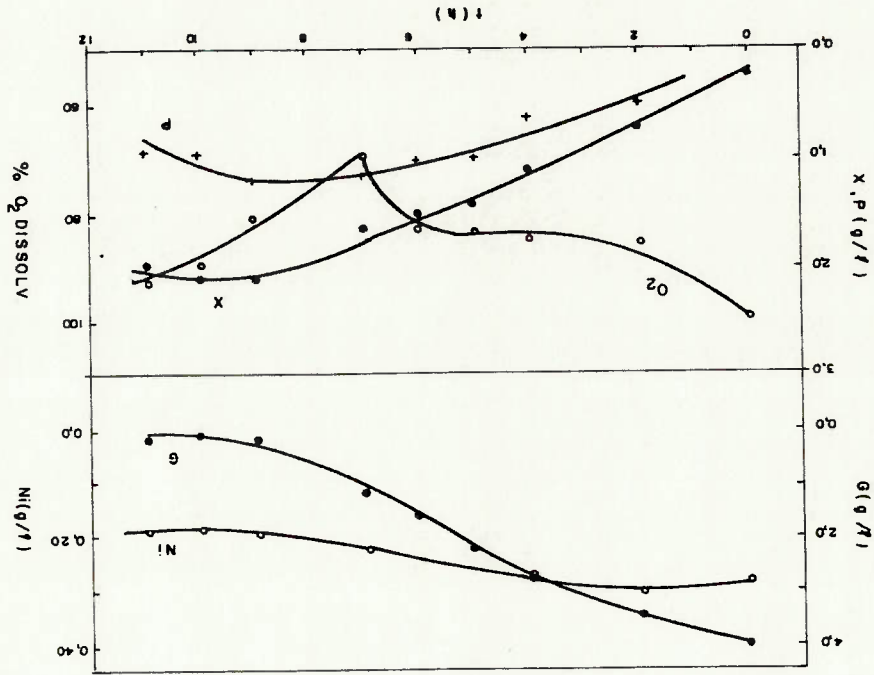


FIGURA 5.34 - CONCENTRAÇÃO DE CELULAS (X), DE GLICEROL (G), DE NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI), DE PROTEÍNA CELULAR E % DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO AO LONGO DO ENSAIO GD7 (EXPERIMENTO 7).

Tabela 5.36 Concentração celular (X), porcentagem de oxigênio dissolvido, demanda total de oxigênio, velocidade específica de respiração (QO<sub>2</sub>) e coeficiente de transferência de oxigênio (K<sub>L</sub>a) durante o ensaio GD7 (Experimento 7).

t (h)	X (g/l)	% O <sub>2</sub> dissolvido	QO <sub>2</sub> .X (10 <sup>-4</sup> mmol O <sub>2</sub> /l.s)	QO <sub>2</sub> (10 <sup>-4</sup> mmol O <sub>2</sub> /g.s)	K <sub>L</sub> a (10 <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
3,0	0,95	85	9,78	10,29	2,34
4,0	1,10	85	6,62	6,02	2,88
5,0	1,35	84	11,01	8,16	2,27
6,0	1,50	83	11,86	7,71	2,11
7,0	1,75	70	12,20	6,97	2,55
8,0	2,00	76	14,24	7,12	2,65
9,0	2,10	81	3,97	1,89	-
10,0	2,15	90	2,24	1,04	-

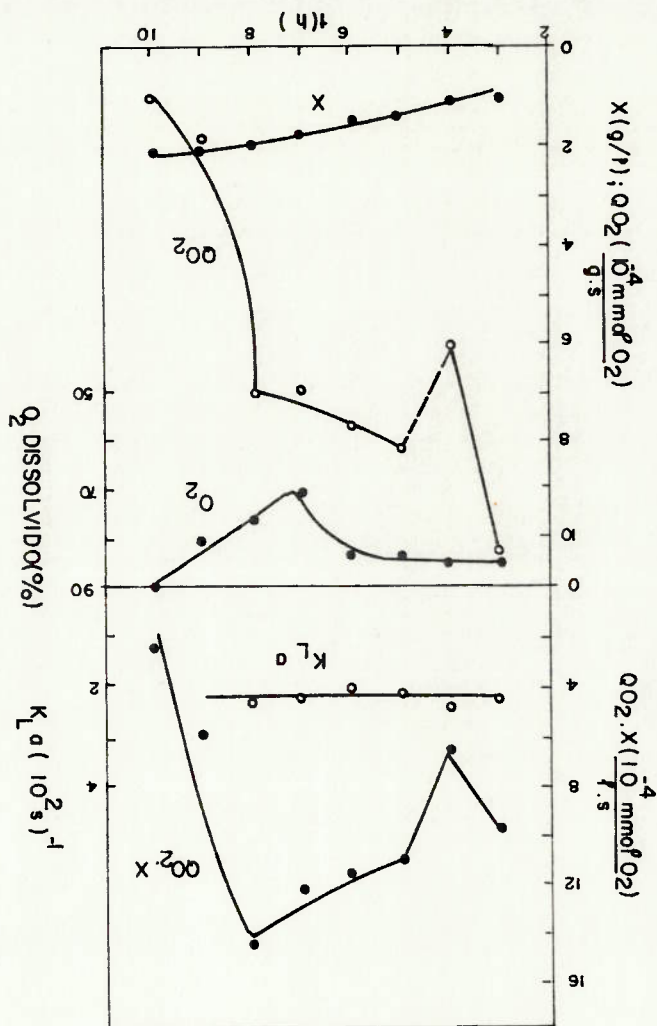


FIGURA 5.32 - CONCENTRAÇÃO DE CELULAS, % DE O<sub>2</sub> DISSOLVIDO, DEMANDA GLOBAL DE OXIGÊNIO (QO<sub>2</sub>.X), VELOCIDADE ESPECÍFICA DE RESPIRAÇÃO (QO<sub>2</sub>) E COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO AO LONGO DO ENSAIO GD7 (EXPERIMENTO 7).

Os resultados das grandezas medidas no GD7 encontram-se nas tabelas 5.35 e 5.36 e nas figuras 5.31 e 5.32. Ao longo do ensaio GD7 o controlador de pH esteve desligado e como se pode observar da tabela 5.35, a variação dessa grandeza foi muito pequena, o que veio confirmar os resultados obtidos em incubador rotativo (cf. tabela 5.25).

### 5.3.8 Concentrações Celulares Numéricas (N) nos Ensaios do E7

A tabela 5.37 apresenta as concentrações celulares numéricas para alguns instantes de ensaios do E7, acompanhados de outras informações relevantes para análise dos resultados. Para comparação foram também incluídos os resultados obtidos no GS19.

Tabela 5.37 Concentrações celulares (N) e de proteína celular (P) para algumas amostras de ensaios do E7 e do GS19.

Ensaio	Tempo de Cult. (h)	G <sub>0</sub> (g/l) (aprox)	Concn. Extr. Leved. (g/l)	N (10 <sup>-12</sup> cel/l)	X (g/l)	P (g/l)	X/N	10 <sup>-12</sup> g/cel	P/N	10 <sup>-12</sup> g prot/cel	
GD3	15	5,1	1,0	1,75	2,56	1,50	1,5		0,9		
GD5	16	8,4	1,0	2,04	3,01	1,52	1,5		0,7		
GD5	18	8,4	1,0	2,16	2,74	1,45	1,3		0,7		
GD6	12	10,3	1,5	0,45	2,06	0,99	5,2		2,5		
GD6	18	10,3	1,5	1,52	4,37	2,19	2,9		1,5		
GD6	20	10,3	1,5	1,50	3,76	2,17	2,5		1,4		
GD7	9	4,0	1,0	0,60	2,10	1,20	3,5		2,0		
GD7	10	4,0	1,0	0,71	2,12	0,95	3,0		1,3		
GS19	30	10,0	1,5	2,20	3,71	-	1,7		-		
GS19	33	10,0	1,5	2,61	4,27	-	1,6		-		



A formação dos flocos esféricos não influíu muito nas contagens celulares, porque a diluição (100 a 200 vezes) e a adição de formaldeído (cf. 3.6.2) associados a vigorosa agitação eram suficientes para desmanchá-los. No caso dos agregados filamentosos o mesmo não acontecia e, por esse motivo, os resultados obtidos nas contagens efetuadas nos ensaios GD2 e GD4 foram desprezadas.

A massa celular (X/N) nos ensaios do E7 esteve entre 1,3 e  $5,2 \cdot 10^{-12}$  g/célula, valores compatíveis com os encontrados para o cultivo com frutose (cf. tabela 4.32) e de acordo com a literatura [010,111,177]. É bastante interessante que nos ensaios em que foram efetuadas determinações em diversos instantes do cultivo, os valores de X/N sejam sempre decrescentes com o passar do tempo. Esse parece ser um comportamento bem geral, que demonstra o acúmulo e a utilização de substâncias durante o ciclo de vida de cada microrganismo [209]. Da mesma forma que a massa bacteriana o conteúdo proteico por célula decresceu nos finais dos ensaios também como resultado da utilização pelas células. Esta diminuição entretanto, é bastante complexa dependendo ainda da concentração de oxigênio dissolvido, como será analisado no item 5.3.10.

As células cultivadas em fermentador apresentavam massa média cerca de 50% superior a das cultivadas em incubador rotativo em condições semelhantes de temperatura e nutrientes (ensaios GD5 e GD19) e esse incremento talvez tenha sido motivado pelas melhores condições de aeração e agitação, indicando também a influência do oxigênio dissolvido sobre a formação e/ou utilização de proteínas de reserva.

Em termos de processo para produção de inoculantes, a utilização de meio de cultura enriquecido surtiu pouco efeito, pois as concentrações celulares numéricas nos ensaios GD5 e GD6 não foram muito diferentes.

### 5.3.9 Influência da Concentração Inicial de Glicerol nos Fatores de Conversão e Produtividades no Cultivo de *A. brasili*

#### Lense em Fermentador

De uma forma geral nos ensaios em fermentador com glicerol como fonte de carbono houve a formação de flocos e agregados bacterianos, cuja presença é indesejável no preparo de inoculantes (cf. 2.7.1).

Como salientado nos ensaios GD2 e GD4 (itens 5.3.2 e 5.3.4, respectivamente) foram notados dois tipos de flocos: um constituido de flocos esféricos que sedimentavam quando em repouso; e o outro com flocos irregulares, com ramificações, que flutuavam quando em repouso.

Aparentemente, os flocos deste segundo tipo provinham da interação dos flocos já presentes no inóculo, com a aeração e/ou agitação. Ao diminuir a quantidade desses flocos pré-formados no inóculo, a formação dos flocos do segundo tipo diminuiu grandemente.

Não se teve uma indicação segura acerca dos motivos que levaram à formação dos flocos do primeiro tipo. Dentre as muitas hipóteses apresentadas na tabela 2.9 | 005 |, a concentração de oxigênio dissolvido, a vazão de ar, a concentração de glicerol e/ou de extrato de levedura não eram as mais importantes.

Deve-se notar, entretanto, que a flocculação observada não inviabilizou o crescimento celular (como fora relatado em outras condições | 167 |), pois nos ensaios que não foram interrompidos houve concentração total do glicerol, com aumentos expressivos da concentração celular, como pode ser avaliado da análise da tabela 5.37 e 5.38.

Como os ensaios GD2 e GD4 não chegaram ao término preferiu-se excluí-los na comparação de fatores de conversão e produtividades que aparecem na tabela 5.39.

**Tabela 5.38** Tempo total de crescimento, concentrações iniciais e finais de células, glicérol, nitrogênio inorgânico e proteína celular e concentração celular numérica final para os ensaios do Experimento 7.

Ensaio	t <sub>F</sub> (h)	X <sub>0</sub> (g/L)	X <sub>F</sub> (g/L)	G <sub>0</sub> (g/L)	G <sub>F</sub> (g/L)	(N <sub>i</sub> ) <sub>0</sub> (g/L)	(N <sub>i</sub> ) <sub>F</sub> (g/L)	P <sub>0</sub> (g/L)	P <sub>F</sub> (g/L)	N <sub>10<sup>12</sup> cel/L</sub>
GD3	16	0,21	2,62	5,14	0,50	0,48	0,26	0,16	1,50	1,75
GD5	16	0,20	2,80	8,40	0,51	0,64	0,32	0,16	1,52	2,12
GD6	18	0,23	4,37	10,30	0,40	1,01	0,63	0,13	2,19	1,50
GD7	9	0,24	2,10	3,97	0,12	0,28	0,19	0,29	2,00	0,60

Para efeito de velocidades específicas de crescimento, entretanto, eles puderam ser utilizados, pois houve a clara definição, em ambos os casos, das fases exponenciais de crescimento, como pode ser visto da figura 5.33. A partir desta e da 5.34 foram calculadas as velocidades específicas de crescimento para ambas as fases de todos os ensaios, que aparecem na tabela 5.40.

**Tabela 5.39** Fatores de conversão e produtividades para os ensaios do Experimento 7.

En-salo	G <sub>0</sub> (g/L)	mm	Y <sub>X/G</sub> g cel / g glic.	Y <sub>N/G</sub> g glic. / 10 <sup>11</sup> cel	Y <sub>P/G</sub> g prot / g glicérol	Y <sub>X/Ni</sub> g Ni / g cel	Y <sub>N/Ni</sub> g Ni / 10 <sup>11</sup> cel	Y <sub>P/Ni</sub> g prot / g Ni	P <sub>X</sub> g cel / L.h	P <sub>N</sub> 10 <sup>11</sup> cel / L.h
GD7	3,97	42,1	0,48	3,22	0,47	20,7	66,7	19,0	0,21	0,67
GD3	5,14	55,9	0,52	3,77	0,29	10,9	79,6	6,1	0,15	1,17
GD5	8,40	91,3	0,33	2,69	0,17	8,1	66,3	4,3	0,16	1,32
GD6	10,30	112,0	0,42	1,52	0,21	10,9	39,5	5,4	0,23	0,83

FIGURA 534 - CONCENTRAÇÃO CELULAR SEGUNDO O TEMPO DE CULTIVO PARA O ENSAIO GD 6. (EXPERIMENTO 7).

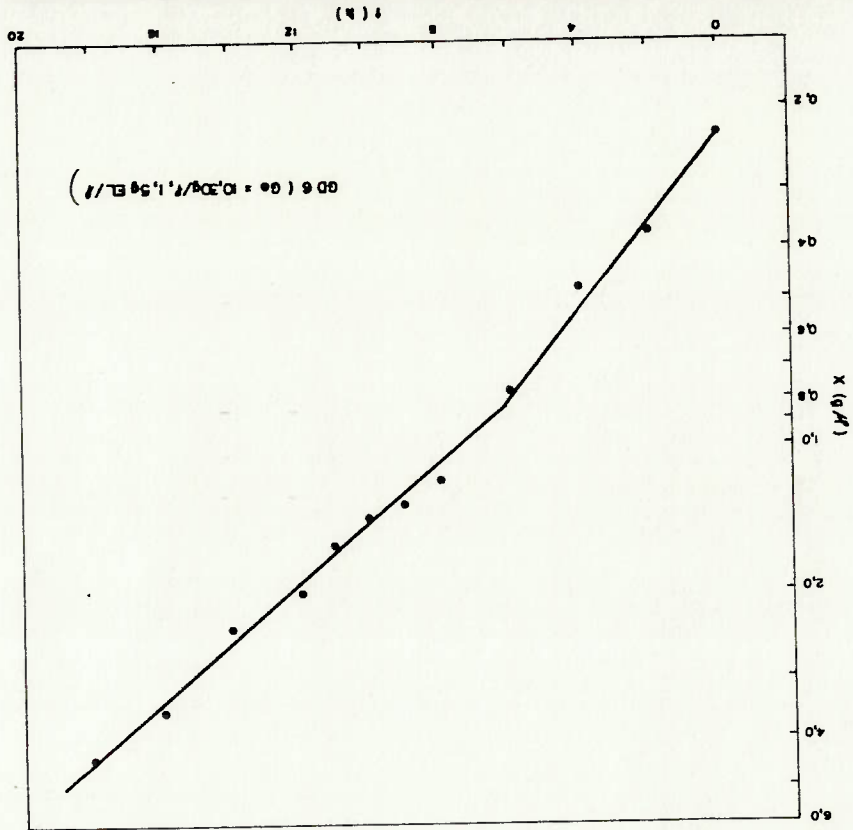


FIGURA 533 - CONCENTRAÇÃO CELULAR SEGUNDO O TEMPO DE CULTIVO PARA ENSAIOS DO EXPERIMENTO 7.

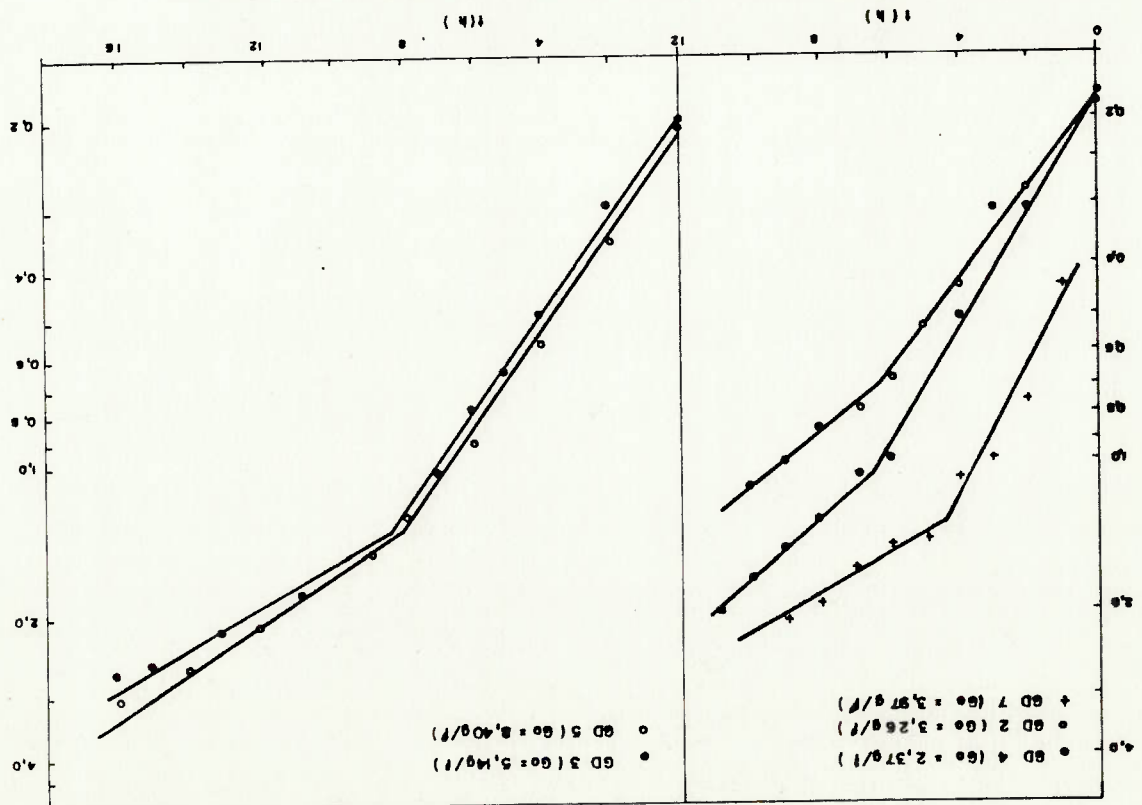


Tabela 5.40 Início das fases de crescimento exponencial e velocidade des específicas máximas em cada fase para os ensaios do Experimento 7.

Ensaio	$G_0$ (g/l)	$G_0$ (mm)	Início 1ª Fase Expon. (h)	$\mu_{max}$ 1ª Fase (h <sup>-1</sup> )	Início 2ª Fase Expon. (h)	$\mu_{max}$ 2ª Fase (h <sup>-1</sup> )
GD4	2,37	25,8	0,0	0,269	6,6	0,143
GD2	3,26	35,4	0,0	0,212	6,4	0,128
GD7	3,97	42,1	1,0	0,270	4,6	0,090
GD3	5,14	55,9	0,0	0,235	7,8	0,105
GD5	8,40	91,3	0,0	0,230	7,5	0,119
GD6	10,30	112,0	0,0	0,214	6,4	0,138

Procurou-se também definir com maior rigor o início da 2ª fase, calculando-se a intersecção entre as duas regressões lineares de cada ensaio.

Na figura 5.35 foram lançados os valores dos fatores de conversão, produtividades e velocidades específicas de crescimento em

função de  $G_0$ .

Os valores de  $\mu_{max}$  em ambas as fases de crescimento mostraram-se praticamente constantes entre 2,4 e 10,30 g glicero1/l, independentemente do preparo do inóculo, ou da formação de flocos estéril

cos ou filamentosos.

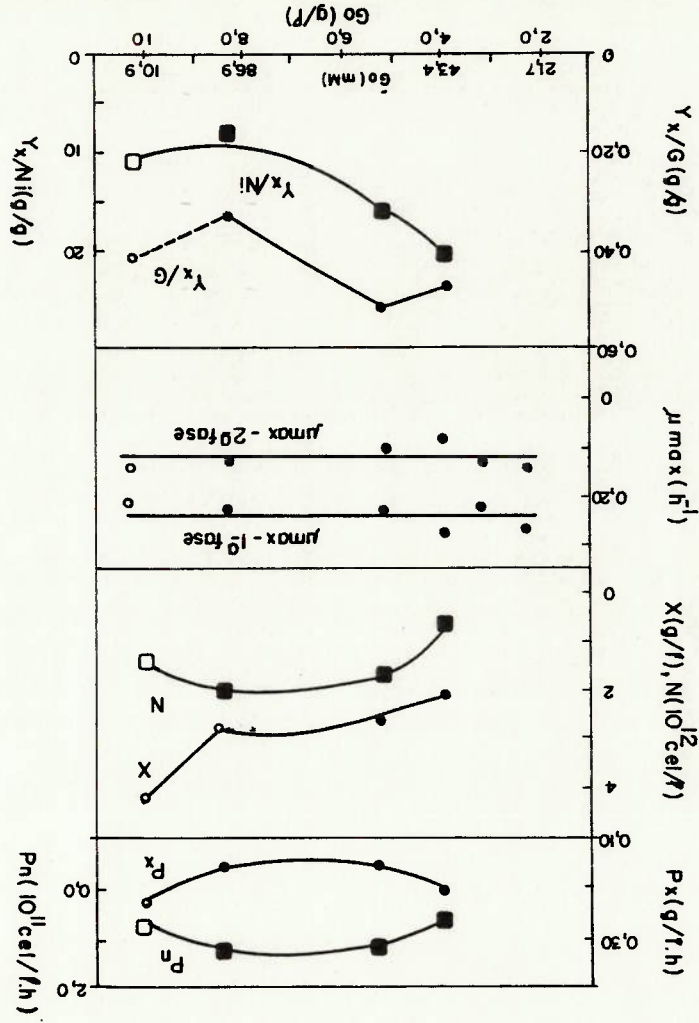
A partir da tabela 5.40 e da figura 5.35 puderam-se estabelecer os valores médios de  $\mu_{max} = 0,238 \text{ h}^{-1}$  para a 1ª fase e  $\mu_{max} = 0,120 \text{ h}^{-1}$  para a 2ª fase de crescimento.

A figura 5.35 mostra claramente que a utilização do meio de cul

tura mais rico em extrato de levedura aumentou a massa celular média no final do cultivo (como já fora calculado na tabela 5.37) em relação aos ensaios onde se usou menos EL, ao mesmo tempo em que

interrompeu a tendência declinante dos fatores de conversão  $Y_{X/G}$  e  $Y_{X/N}$ , confirmando o que já ocorrera com o GS19 (cf. figura 5.23).

FIGURA 5.35 - VALORES DE  $X$ ,  $N$ ,  $\mu_{max}$ ,  $Y_x/G$ ,  $Y_x/N$ ,  $P_x$  e  $P_n$  SEGUNDO A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICEROL PARA OS ENSAIOS DO EXPERIMENTO 2



As produtividades refletiram o aumento de massa celular do ensaio GD6, pois enquanto a numérica ( $P^N$ ) passou por um patamar de valores mais elevados e decresceu para o ensaio com mais extrato de levedura, a mássica ( $P^X$ ) teve comportamento exatamente inverso, alcançando o seu máximo para o citado ensaio.

Assim, para o processo industrial de produção de inoculantes, em processo descontinuo não se recomenda a utilização de meios com mais extrato de levedura, devendo-se preferir meios de cultura com concentração inicial de glicérol em torno de 5 g/l (com 1,0 g FL/l), em que os fatores de conversão  $Y_{X/G}$  e  $Y_{X/N}$  e a produtividade eram elevados e a concentração celular numérica encontrada era 82,5% da máxima.

### 5.3.10 Influência do Oxigênio Dissolvido Sobre Alguns Parâme-

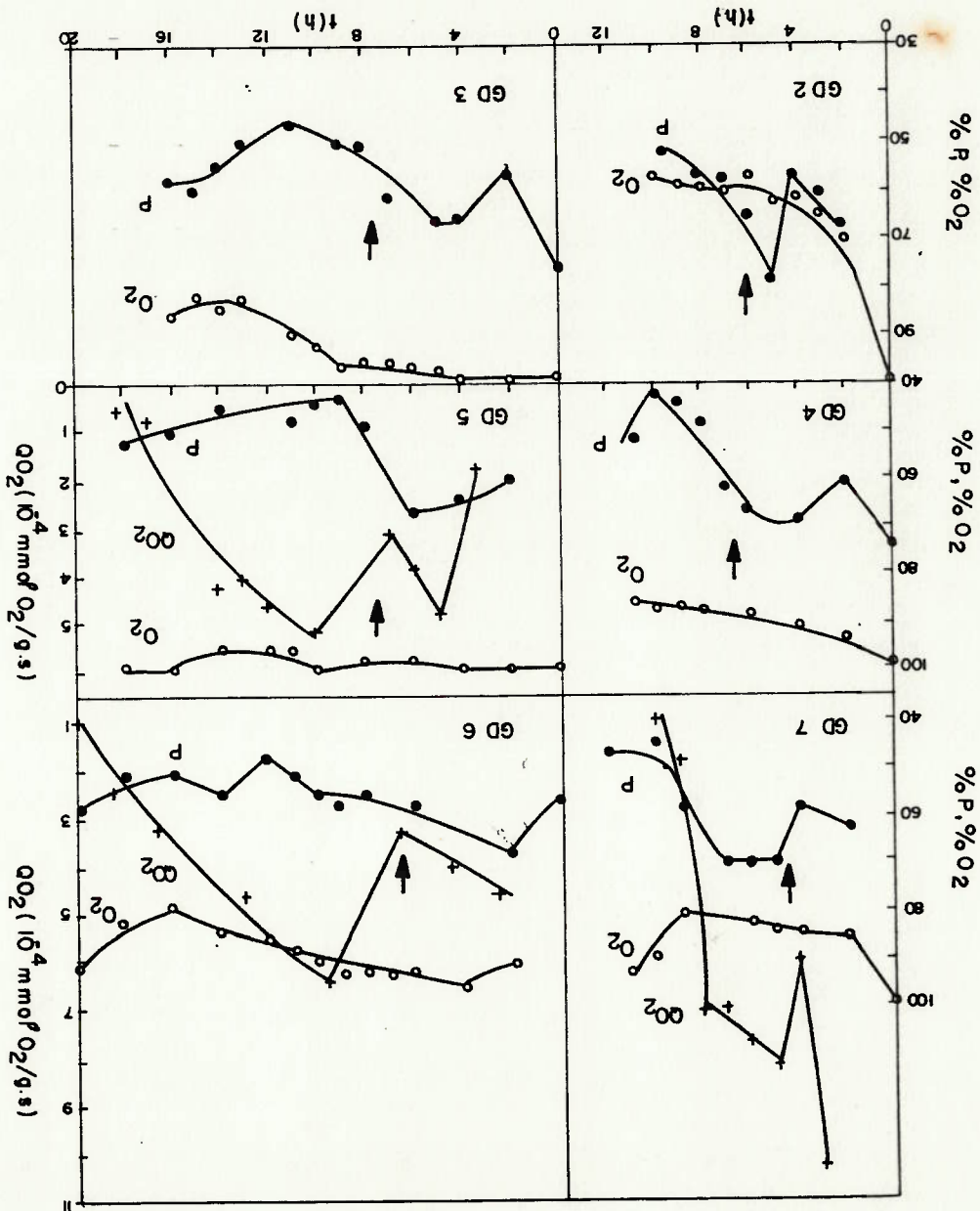
tros Fisiológicos de *A. brasiliense* sp 245

A figura 5.36 apresenta as porcentagens de oxigênio e de proteína na ao longo de todos os ensaios do E7 e as velocidades específicas de consumo de oxigênio para alguns deles.

Como se observa, a ocorrência das duas fases de crescimento alternou profundamente a evolução de  $\mu$  e do  $QO_2$  ao longo do tempo em todos os ensaios. A não ser no GD7, em todos os outros houve um máximo pronunciado na porcentagem de proteína celular durante a primeira fase de crescimento que poderia significar que o micrororga- nismo estaria direcionando alguns dos compostos nitrogenados presentes no extrato de levedura para a produção de proteínas de reserva. Nessas primeiras fases não se sentiu a influência do oxigênio dissolvido sobre esse processo de acumulação.

No decorrer das segundas fases de crescimento, em todos os casos, houve o decréscimo do teor proteico, até um nível próximo a

FIGURA 5.36- PORCENTAGEM DE PROTEÍNA (%P), DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (%O<sub>2</sub>) E VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CONSUMO DE O<sub>2</sub> (QO<sub>2</sub>) AO LONGO DOS ENSAIOS DO E 7. AS FLECHAS INDICAM A TRANSIÇÃO ENTRE AS FASES DE CRESCIMENTO.





5.63 45% e depois, em alguns ensaios (GD3, GD4, GD5, GD6), notou-se um aumento do teor proteico até níveis entre 51 e 58%. Esse aumento coincide com o incremento da porcentagem de oxigênio dissolvido, indicando que ao terminar as proteínas de reserva anteriormente acumuladas, a porcentagem de proteínas poderia ser função da porcentagem de oxigênio dissolvido, como já foi discutido no item 4.3.9 e observado também para a linhagem *A. brasiliense* Cd 136, 137|.

No caso da velocidade específica de respiração ( $\dot{Q}O_2$ ) observou-se comportamento semelhante nos três ensaios em que ela foi medida: valores elevados no início das fases de crescimento que decresceram rapidamente, apesar de velocidades específicas constantes (cf. tabela 5.40 e figura 5.35).

Neste caso não houve uma correlação  $\dot{Q}O_2 = f(P_{O_2})$  tão bem definida como a da figura 4.32, embora isso talvez se deva à pequena quantidade de valores experimentais disponíveis.

A ocorrência de valores de  $\dot{Q}O_2$  bem distintos para as duas fases de crescimento, indicava eficiências energéticas e diferentes. Os valores médio dos fatores de conversão de oxigênio em células ( $\bar{Y}_{X/O}$ ); calculados pela expressão (4.1) encontram-se na tabela 5.41.

**Tabela 5.41** Fatores de conversão médios\* de oxigênio em células ( $\bar{Y}_{X/O}$ ) para as fases de crescimento de *A. brasiliense* em glicerol. Experimento 7.

ENSAIO		1ª Fase	2ª Fase
GD5	209,1	72,7	
GD6	184,3	86,0	
GD7	98,0	33,5	

\* Valores são a média de todos os pontos de cada fase

A obtenção de menores fatores de conversão de oxigênio em células na 2ª fase também vem confirmar a hipótese de que na primeira fase os sistemas de assimilação de amônia GDH e GS-GOGAT atuam em conjunto, enquanto na segunda fase apenas GS-GOGAT cumpriria essa função (cf. 5.1.3.1). Tendo em mente o exposto em 2.1.2.2 de que este último sistema requer 1 mol de ATP por mol  $\text{NH}_4^+$  enquanto a assimilação via GDH não gasta energia, é fácil perceber que a assimilação de 1 mol de amônia (com a correspondente formação de material celular) pelos sistemas em paralelo requer menos energia do que quando feita isoladamente por GS-GOGAT.

Duas fases de respiração celular foram encontradas em cultivos de *Graphium* sp em hidrocarbonetos, sem extrato de levedura. Nesses cultivos as velocidades de respiração e de liberação de calor eram mais elevadas na segunda fase e o acúmulo de substâncias metabólicas foi a hipótese apresentada |200|. Deve-se salientar, entretanto, que as fases de respiração não motivaram distintas fases de crescimento.

Uma observação final a respeito do ensaio GD7: como se recorda, o procedimento de inoculação foi modificado para diminuir a flocculação (cf. 5.3.7). Essa mudança além de atingir o objetivo pretendido causou outras diferenças na fisiologia celular, como pode ser percebido pelo aumento da concentração celular de transição entre as fases de crescimento (cf. 5.3.9), pela diminuição acentuada nos fatores de conversão de oxigênio em células (cf. tabela 5.41), pelo aumento da velocidade específica de respiração e pela variação no comportamento protéico ao longo do cultivo (cf. figura 5.36). Ou seja, a modificação que a princípio parecia amplamente benéfica por diminuir a flocculação teve outros efeitos que talvez não sejam desejáveis.

Fica, então, mais um ponto a pesquisar: qual a melhor forma de



te o aparecimento das duas fases à mudança do tipo de fonte de nitrogênio utilizada pelo microrganismo e segundo a hipótese lançada no item 5.1.1.3 à modificação nos sistemas enzimáticos de assimilação de amônia.

**Tabela 5.42** Tempo para início do consumo de nitrogênio inorgânico ( $t_{N_i}$ ) e tempo de início da 2ª fase de crescimento exponencial, para os ensaios do experimento 7.

Ensaio	$t_{N_i}$ (h)	Tempo para início 2ª fase (h)
GD2	6,5	6,4
GD3	8,0	7,8
GD4	6,5	6,6
GD5	5,5	7,5
GD6	11,0	6,4
GD7	4,5	4,6

Deve-se salientar que se tentou aplicar o mesmo tipo de análise aos ensaios em incubador rotativo (E5 e E6) mas não se pôde chegar a conclusões semelhantes, provavelmente devido ao maior intervalo entre amostragens que se usou naqueles ensaios, que dificultou a determinação acurada dos  $t_{N_i}$ 's.

Os tempos para início da segunda fase de crescimento e para consumo de nitrogênio inorgânico no ensaio GD6 (cf. tabela 5.41) foram surpreendentemente diferentes, indicando, de acordo com a hipótese formulada, que a enzima GDH foi inibida ou reprimida antes do término do consumo da amônia formada a partir dos aminoácidos e proteínas do extrato de levedura.

Uma indagação muito pertinente a esse respeito surge de imedia-

to: por que a utilização preferencial dos compostos nitrogenados orgânicos foi percebida quando a fonte de carbono era glicerol e não quando era frutose? Entretanto, deve-se frisar que observan- do-se mais detalhadamente os ensaios em fermentador com frutose (E3) percebeu-se que, em alguns deles (FD2, figura 4.22; FD3, figu- ra 4.23; FD5, figura 4.27) houve períodos iniciais em que N<sub>i</sub> ficou constante, enquanto X aumentava e S diminuía, sem que aparecessem duas fases de crescimento exponencial.

Essa diferença no comportamento microbiano vem demonstrar que são necessários estudos mais detalhados sobre os sistemas da assi- milação de nitrogênio em *A. brasiliense* sp 245 principalmente a res- peito da possibilidade de sua interferência com as enzimas de dis- similação do glicerol e as da glicogênese, a fim de melhor expli- car os fenômenos observados e também por que não ocorrem, de forma tão pronunciada, nos cultivos com frutose.

### 5.3.12 Comparação entre os Resultados do Cultivo Descontínuo

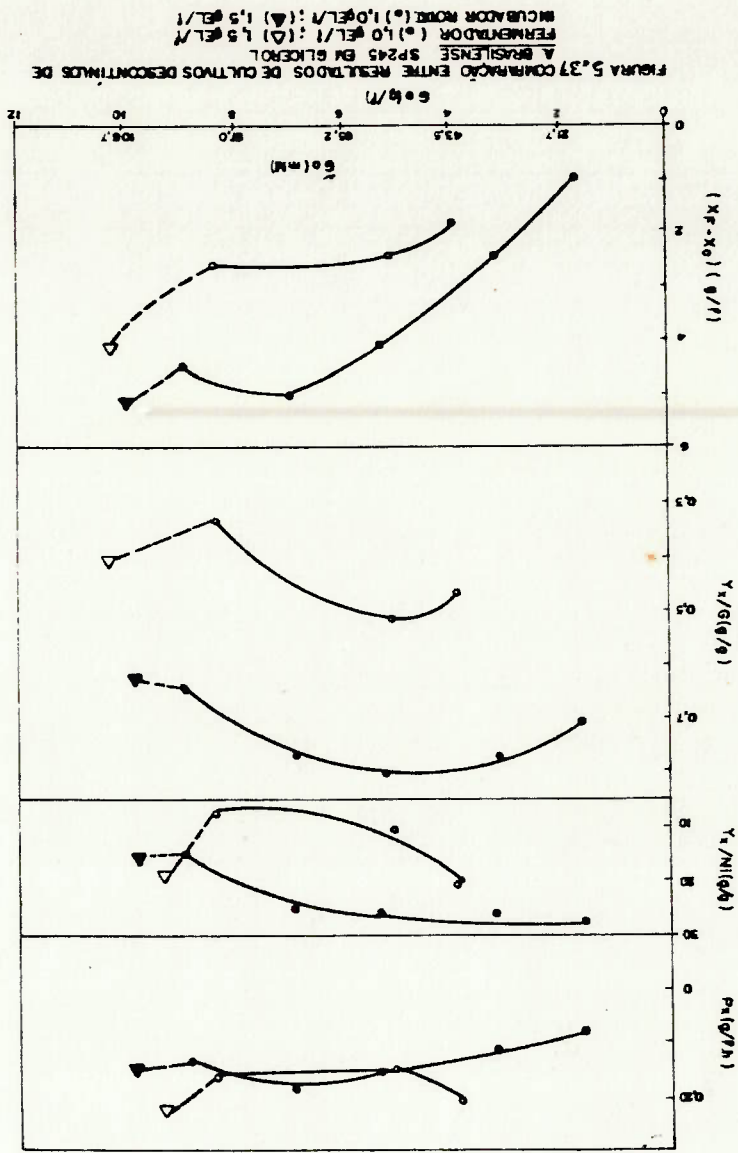
de *A. brasiliense* em Glicerol, em Incubador Rotativo e em Fermentador, com Glicerol

Na figura 5.38 foram lançados os valores de  $(X^E - X^O)$ ,  $Y^X/G$ ,  $Y^X/N_i$  e  $P^X$  para os ensaios descontínuos realizados em incubador rotativo (E6) e em fermentador (E7), em função de  $G_0$ .

As velocidades específicas máximas de crescimento não aparecem na figura 5.38, mas podem ser facilmente comparados examinando-se as figuras 5.23 e 5.35. Tanto em incubador rotativo quanto em fer- mentador houve duas fases de crescimento bem caracterizadas, quan- do o meio de cultura tinha extrato de levedura e glicerol. Pequē nas diferenças nos valores e na variação com  $G_0$  foram notadas para ambas as fases: enquanto em fermentador  $\mu_{max} = 0,238 h^{-1}$  para a

5.68  
 faixa de 4,0 a 10,9 g de glicerol/l, em incubador rotativo obtve-  
 se  $\mu_{max} = 0,280 \text{ h}^{-1}$  para  $1,6 < G_0 < 7,0 \text{ g/l}$  e notou-se um início  
 de inibição para  $G_0 > 7,0 \text{ g/l}$ , inibição que foi suprimida quando  
 se utilizou maior quantidade de extrato de levedura. Na 2ª fase  
 de crescimento, por sua vez, a velocidade específica de crescimen-  
 to em fermentador foi superior à obtida em incubador rotativo(0,120  
 e  $0,107 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente).

As concentrações celulares e os fatores de conversão ( $Y_{X/G}$  e  
 $Y_{X/N}^{I_1}$ ), entretanto, apresentaram-se bem diferentes do esperado,  
 pois os valores em fermentador foram menores do que os obtidos em  
 incubador rotativo para idênticas condições iniciais de glicerol,  
 a não ser por um valor de  $Y_{X/N}^{I_1}$ , no ensaio em que se usou  
 1,5 g EL/l.  
 Nas condições específicas do fermentador (disponibilidade de nu-



trientes, altas concentrações de oxigênio dissolvido) é possível que houvesse a produção de proteínas extracelulares, como já observado para *Bacillus licheniformis* |075| ou de lipopolissacarídeos, como já foi observado para *A. brasiliense* em outras condições |040|.

Deve-se ressaltar que a hipótese de produção de alguma substância extracelular poderia explicar muito bem a ocorrência de floculação (cf. tabela 2.9) que sempre foi muito mais evidente nos saios em fermentador do que naqueles realizados em incubador rotativo.

Finalmente, a partir da figura 5.37 pode-se observar que houve uma coincidência muito grande nos resultados da produtividade celular, no intervalo de concentração inicial que foi definido como o mais interessante para o cultivo de *A. brasiliense* sp 245 (cf. 5.2.3.2 e 5.3.9). Nos dois sistemas de cultivo em comparação, a produtividade celular massica esteve em torno de 0,15 g/l.h, para o intervalo de 5 a 9 g de glicerol/l.

Observando os resultados de  $(X_P - X_0)$ ,  $Y_{X/G}$ ,  $Y_{X/N}$  e  $P_X$  em conjunto (figura 5.38) poder-se-ia chegar à conclusão de que no caso específico, a produção de inoculantes em incubador rotativo poderia ser mais vantajosa do que em fermentador. Entretanto, seriam necessárias duas informações adicionais para validá-las completamente: a determinação das concentrações celulares numéricas que em muitas condições não mantem estreita correlação com as concentrações celulares massicas e a realização de uma avaliação econômica que levasse em consideração os altos custos operacionais do cultivo massivo de bactérias em incubador rotativo. Talvez fosse interessante, de todo modo, estudar um pouco melhor as condições vigentes nos cultivos em incubador rotativo (principalmente quanto ao oxigênio dissolvido e velocidades de respiração da cultura) de modo a poder entender a sua influência sobre os bons resultados obtidos e, se possível, reproduzi-las em fermentador.

5.4.1 Objetivos e Condições do Ensaio GCl

O objetivo do E8 era determinar as melhores condições para a produção de inoculantes em processo contínuo, com glicerol como fonte de carbono.

O experimento 8 foi composto apenas pelo ensaio GCl, que foi realizado nas condições estabelecidas nos experimentos 6 e 7 (cf. 5.1.3.2 e 5.3.9), ou seja a 36°C, com  $G_0 = 5,0 \text{ g/l}$  e  $1,0 \text{ g FL/l}$  no meio de cultura.

As demais condições do GCl foram as expostas no item 3.5.

5.4.2 Resultados Experimentais e Discussão do Ensaio GCl

O ensaio GCl foi preparado e conduzido em condições que já se determinara levar a pouca floculação: o inóculo em incubador rotativo foi retirado com 14 h de cultivo (cf. 5.3.7) e o processo contínuo foi iniciado após 12 h do cultivo descontinuo.

Essas medidas mostraram-se efetivas pois durante todo o cultivo foram observados flocos esféricos muito pequenos, que sedimentavam quando em repouso.

A tabela 5.43 apresenta os resultados obtidos ao longo do cultivo e como se pode observar da figura 5.38, o sistema atingiu quatro regimes permanentes.

As concentrações, fatores de conversão e produtividades para estes regimes encontram-se na tabela 5.44 e na figura 5.39.



Tabela 5.43 Resultados do ensaio GC1 (Experimento 8)

t (h)	X (g/l)	G (g/l)	NI (g/l)	A	O <sub>2</sub> dissolv. (%)	M (mg/l)
0,0	2,40	-	0,35	3,41	20	0
3,0	2,26	-	-	2,50	54	500
6,0	2,12	0,30	-	1,81	50	590
9,0	2,18	-	0,22	1,73	84	670
12,0	2,19	0,29	0,22	1,92	88	690
22,0	2,19	0,26	0,22	1,69	71	970
25,0	2,18	0,29	0,22	-	76	1070
28,0	2,24	0,25	0,22	2,38	74	1130
31,0	2,39	0,22	0,21	3,00	40	1440
34,0	2,39	0,49	-	3,00	50	1640
45,0	2,52	0,45	-	3,00	46	2560
48,0	2,56	0,40	0,20	2,62	34	3130
51,0	2,64	0,59	-	2,59	25	3320
54,0	2,64	0,63	0,19	-	24	3730
58,0	2,58	0,39	0,21	2,56	23	4150
70,0	2,70	0,46	0,19	1,50	24	5390
73,0	2,27	1,47	0,26	2,05	20	5680
77,0	1,74	2,04	0,28	2,03	24	6100
83,0	1,74	2,38	0,31	2,27	26	6610
88,0	1,78	2,06	0,29	2,40	24	7240
94,0	1,74	2,02	0,29	-	24	7910

de 0 a 27 h: D<sub>1</sub> = 0,039 h<sup>-1</sup>; de 27 a 46 h: D<sub>2</sub> = 0,126 h<sup>-1</sup>  
 de 46 a 70h: D<sub>3</sub> = 0,163 h<sup>-1</sup>; de 70 a 94 h: D<sub>4</sub> = 0,240 h<sup>-1</sup>  
 G<sub>0</sub> = 5,03 g/l; (NI)<sub>0</sub> = 0,38 g/l

As 70 e 88 h de cultivo foram determinadas as concentrações celulares numéricas, tendo-se obtido respectivamente 1,10.10<sup>12</sup> e 0,75.10<sup>12</sup> cel/l, e da tabela 5.44 também constam as produtividades celulares para esses dois regimes.

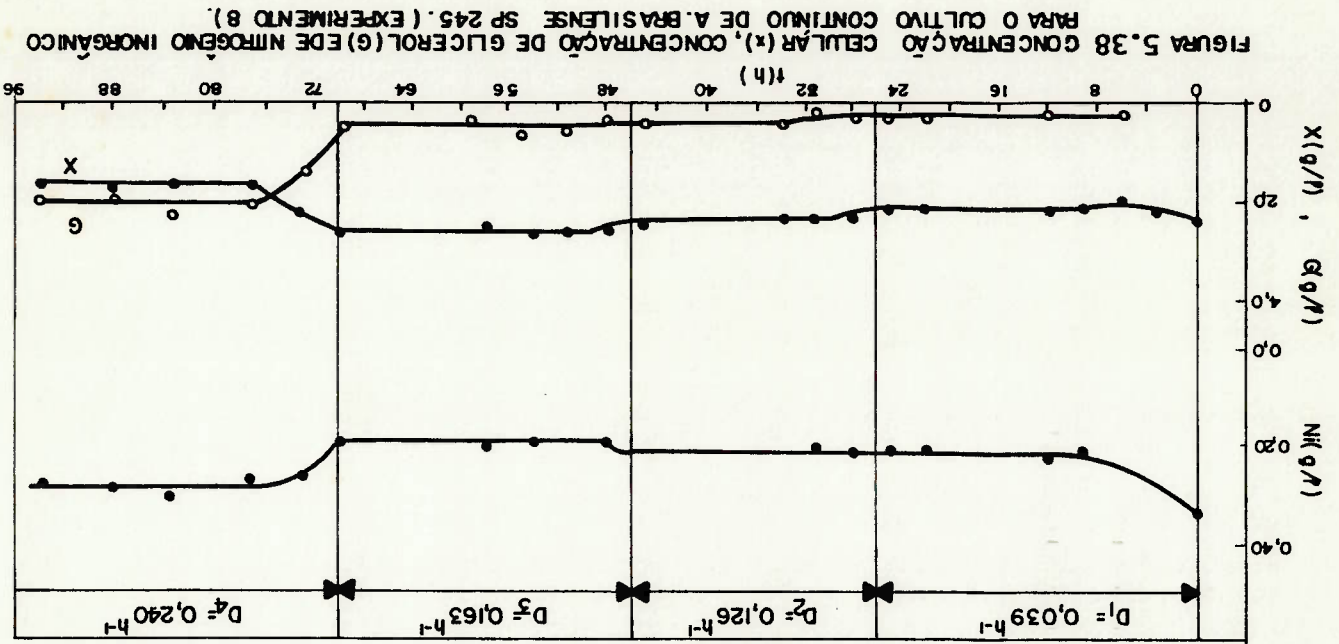
**Tabela 5.44** Vazões específicas de alimentação (D), concentrações, fatores de conversão e produtividades para os regimes permanentes do ensaio GCI (Experimento 8).

regime permanente		Parâmetro		
6 a 25 h	31 a 45 h	48 a 70 h	77 a 94 h	
0,039	0,126	0,163	0,240	D (h-1)
2,17	2,43	2,62	1,75	X <sub>J</sub> (g/ℓ)
-	-	1,10	0,75	N <sub>J</sub> (10 <sup>12</sup> cel/ℓ)
5,03	5,03	5,03	5,03	G <sub>O</sub> (g/ℓ)
0,29	0,47	0,49	2,12	G <sub>J</sub> (g/ℓ)
0,38	0,38	0,38	0,38	(N <sub>I</sub> ) <sup>o</sup> (g/ℓ)
0,22	0,21	0,20	0,29	(N <sub>I</sub> ) <sub>J</sub>
25,3	80,0	102,7	106,5	M (mg/ℓ.h)
0,46	0,53	0,58	0,60	Y <sub>X/G</sub> (g/g)
13,6	14,2	14,6	19,4	Y <sub>X/N<sub>I</sub></sub> (g/g)
-	-	2,42	2,57	Y <sub>N/G</sub> (10 <sup>11</sup> cel/g)
-	-	61,1	8,3	Y <sub>N/N<sub>I</sub></sub> (10 <sup>11</sup> cel/g)
0,085	0,306	0,427	0,420	P <sub>X</sub> (g/ℓ.h)
-	-	1,79	1,80	P <sub>N</sub> (10 <sup>11</sup> cel/ℓ.h)

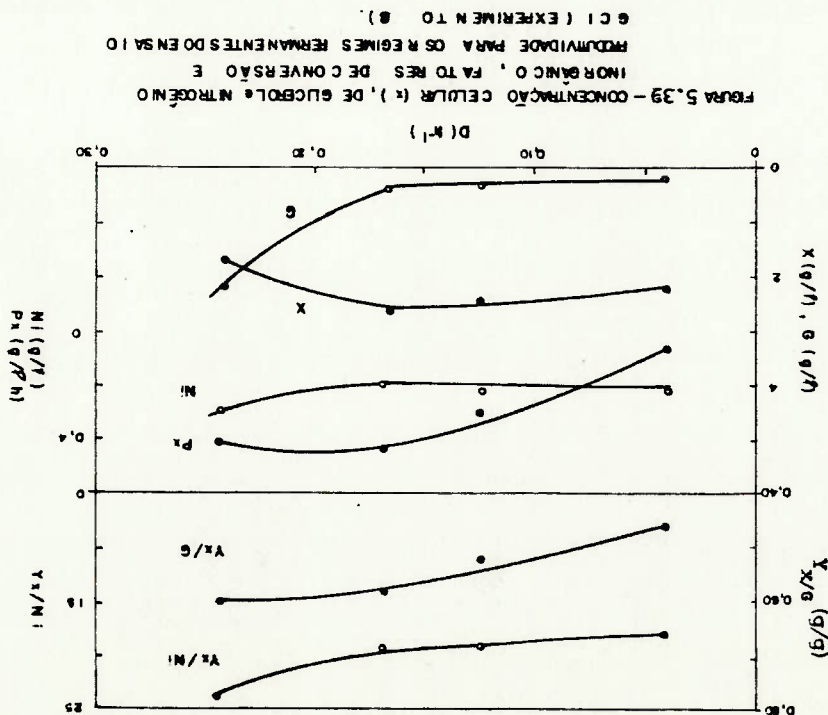
Deve-se observar que o último regime permanente foi obtido em uma vazão específica de alimentação ligeiramente superior à velocidade específica máxima da primeira fase de crescimento no ensaio GD3 (cf. tabela 5.40).

Esta elevada velocidade específica de crescimento no processo contínuo, não resultou em células com massa média inferior às das obtidas na vazão estérica  $D_3 = 0,163 \text{ h}^{-1}$  (2,33 contra  $2,38 \cdot 10^{-12} \text{ g/cel}$  respectivamente). Os valores obtidos, embora cerca de 50% superiores ao obtido no GD3 ( $X/N = 1,5 \cdot 10^{-12} \text{ g/cel}$ , cf. tabela 5.37), são tão perfeitamente enquadrado na faixa dos resultados obtidos para os demais ensaios com glicerol ( $1,3$  a  $3,0 \cdot 10^{-12} \text{ g/cel}$ , cf. tabela 5.37).

A figura 5.39 mostra que o ensaio GCL permitiu delimitar um valor da vazão específica ( $D = 0,163 \text{ h}^{-1}$ ) a partir da qual a concentração celular nos regimes permanentes tende a decrescer. Nessa vazão específica, as produtividades celulares ( $P_X, P_N$ ) são máximas e o residual de glicerol corresponde a 10% da concentração inicial e o fator de conversão de células em glicerol ( $Y_{X/G}$ ) se encontrava muito próximo do máximo.



Em relação às condições ótimas estabelecidas para o processo descontínuo (cf. 5.3.9), o cultivo com  $D = 0,163 \text{ h}^{-1}$  apresentou concentrações celulares (X e N) praticamente idênticas (cf. tabelas 5.37 e 5.44),  $Y_{X/G}$  cerca de 11,5% superior e  $Y_{N/G}$  inferior; o fator de conversão de nitrogênio inorgânico em biomassa ( $Y_{X/N_i}$ ) foi 43,1% superior no contínuo, enquanto o de transformação em células ( $Y_{N/N_i}$ ) foi 23,2% inferior. As produtividades no processo contínuo foram expressivamente superiores às do descontínuo, com diferenças percentuais de 185% para  $P_X$  e de 53% para  $P_N$ . As consequências de ordem econômica das diferenças apontadas serão estudadas no capítulo 7.



Para o controle do processo de produção de A. brasilense sp 245 em glicerol, não foi possível obter nenhuma relação simples entre as grandezas medidas (A, pH, M,  $\text{O}_2$ , P) e a concentração celular. De um lado, a floculação interferiu decisivamente na absorban-  
cia da suspensão e por outro, a ocorrência das duas fases de cres-  
cimento alterou profundamente a velocidade de respiração e o con-  
teúdo protéico.

A única grandeza de medida rápida que poderá auxiliar na sina-  
lização do término do processo descontinuo é a concentração de oxí-  
gênio dissolvido, que tende a subir rapidamente ao final da fonte  
de carbono.

6.1 Temperaturas mais apropriadas e energias de ativação

A escolha das temperaturas mais apropriadas para o processo industrial (38°C com frutose, 36°C com glicerol) baseou-se principalmente na diminuição da floculação bacteriana e na manutenção de válores elevados para os fatores de conversão e produtividades. Estes parâmetros, como pode ser visto nas figuras 4.11 e 5.13, apresentam comportamento algo diferente com a variação da temperatura, pois com frutose as variações foram pequenas e suaves e com glicerol foram bem mais abruptas.

Diferenças também foram notadas na variação de  $\mu_{max}$  com a temperatura, construindo-se gráficos "tipo Arrhenius" para os diversos substratos e para as duas fases de crescimento em glicerol que aparecem na figura 6.1. Na tabela 6.1 foram reunidas as regressões calculadas com os respectivos intervalos de temperatura e a partir da equação 2.1 determinaram-se as energias de ativação.

Na figura 6.1 pode-se observar que há diferenças profundas nos mecanismos que controlam o crescimento com frutose, com extrato de levedura e na segunda fase de crescimento com glicerol, em relação à primeira fase com glicerol. Enquanto nos três primeiros casos a temperatura para o valor máximo da velocidade específica de crescimento era 38°C, no último era 34°C. E como se pode perceber das figuras 5.13 e 6.1 acima de 34°C a velocidade de crescimento na primeira fase com glicerol manteve-se praticamente constante.

No cultivo com glicerol talvez fosse interessante, no processo industrial, efetuar a primeira parte do cultivo a 34°C e a segunda a 38°C, com o intuito de aumentar a produtividade. Para isso, en-

tretanto, seria necessário determinar a resposta do microrganismo a essa variação, principalmente em sua viabilidade celular e nos fatores de conversão.

Tabela 6.1 Determinação da energia de ativação (Ea) para o crescimento de *A. brasiliense* sp 245 em diferentes substratos.

Substrato	Intervalo de temperatura (°C)	Regressão*	Ea (kcal/mol)	Equação nº
Frutose	30 a 38	$\ln \mu_{max} = 23,51 - 7575/Ta$	15,00	6.1
Glicerol (1ª Fase)	30 a 34	$\ln \mu_{max} = 31,85 - 10137/Ta$	20,07	6.2
Glicerol (2ª Fase)	32 a 38	$\ln \mu_{max} = 13,92 - 4968/Ta$	9,84	6.3
Ext. levedura	32 a 38	$\ln \mu_{max} = 5,86 - 2398/Ta$	4,75	6.4

\* a partir das tabelas 4.12, 5.17 e 5.18.

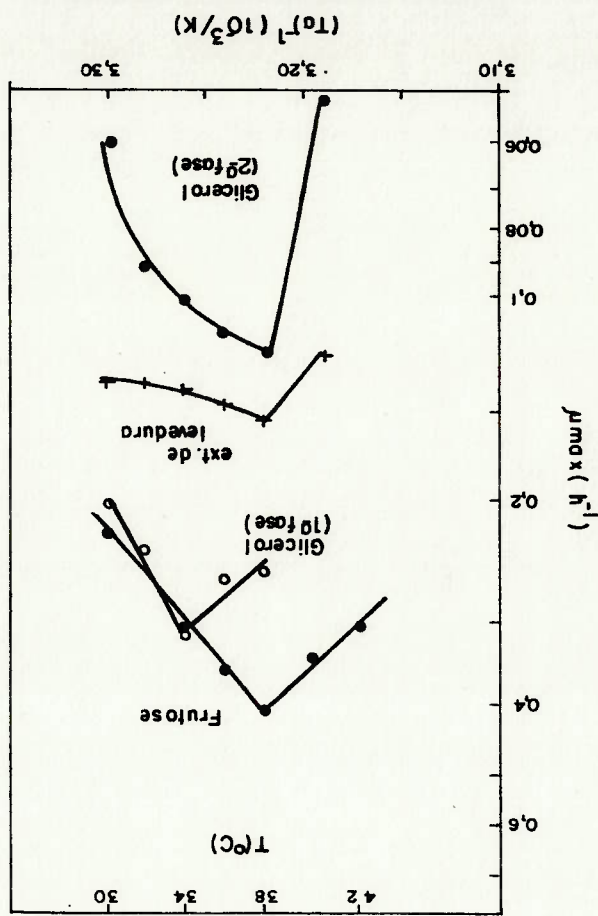


FIGURA 6.1 - DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO PARA O CRESCIMENTO DE *A. BRASILIENSE* EM DIVERSOS SUBSTRATOS.

As energias de ativação calculadas para os cultivos com frutose

e na primeira fase com glicérol (tabela 6.1) encontram-se nas fai-

cas mencionadas no item 2.2.2. A determinada para o crescimento

em extrato de levedura, bem inferior a 10 kcal/mol parece indicar

que a etapa limitante do processo encontra-se ligada à difusão de

nutrientes ou de produtos do metabolismo, como indicado por WANG

et alii | 206 |. Já a determinada para segunda fase de crescimento

em glicérol está muito próxima do valor mencionado (10 kcal/mol) pã

ra permitir afirmar com segurança que fenômenos difusivos estariam

relacionados com o aparecimento das duas fases de crescimento.

Deve-se notar que a partir da regressão "tipo Arrhenius" deter-

mina-se também a energia de crescimento (Eo) da equação de Casola-

ri (eq. 2.2).

Neste caso, entretanto, tal equação não ajustou os valores expē

rimentais, uma vez que o fator pré-exponencial deveria ser constan-

te e igual a  $3,35 \cdot 10^{22} \text{ h}^{-1}$  e nas regressões da tabela 6.1 este fa-

tor variou de  $350 \text{ h}^{-1}$  (para extrato de levedura) a  $6,79 \cdot 10^{13} \text{ h}^{-1}$

(para a 1ª fase de glicérol).

A equação de Belshradek', (eq. 2.5), revista por McMEKIN et

alii | 123 |, tem aplicação um pouco mais difícil pois envolve três

parâmetros (a, d,  $\alpha$ ) numa equação não linearizável. Para cada um dos

substratos citados na tabela 6.1 ela foi resolvida por tentativas,

utilizando-se como critério o método dos mínimos quadrados | 121 |.

As equações resultantes foram:

(6.5) para frutose, entre 30 e 38°C :  $\mu = 1,05 \cdot 10^{-3} (T-10)$  1,79

para glicérol (1ª fase) entre

(6.6) 30 e 34°C :  $\mu = 2,69 \cdot 10^{-4} (T-10)$  2,21

para glicérol (2ª fase) entre

(6.7) 30 e 38°C :  $\mu = 8,43 \cdot 10^{-5} (T-8)$  2,13



As figuras 6.2 e 6.3 reúnem as concentrações celulares as velas das preponderantemente para os resultados obtidos em fermentador. cidades específicas de crescimento, as produtividades, e os fatores molares de conversão em função das concentrações molares de frutose e de glicérol para os ensaios dos experimentos 3 e 7 (cf.

Para facilitar as comparações entre resultados obtidos com substratos diferentes, diversas grandezas, serão expressas em base molar, |006,130,147,188|, principalmente as concentrações de frutose (g), de glicérol (g) e os fatores de conversão ( $\bar{Y}_{X/S}$ ,  $\bar{Y}_{X/M}$ ). Por outro lado, pensando-se no desenvolvimento do processo industrial de produção de *A. brasiliense* as comparações serão efetuadas preponderantemente para os resultados obtidos em fermentador.

cidades Específicas, Fatores de Conversão e Produtividades

6.2 Influência das Concentrações Iniciais dos Substratos nas Velas

De todo modo, pode-se observar, a partir das figuras 4.11, 5.13 e 6.1 que os cultivos com glicérol são mais sensíveis à variação de temperatura do que os com frutose, indicando a necessidade de sistemas de controle mais precisos, no caso do processo de produção com glicérol.

res aos valores ótimos. nível determinar as funções  $\mu = \mu(T)$  para as temperaturas superiores Devido ao reduzido número de pontos experimentais não foi possível ocorrer para a equação relativa ao extrato de levedura.

Segundo estas equações, o "zero biológico", para *A. brasiliense* sp 245 estaria entre 8 e 10°C. Para frutose e glicérol os experimentos encontram-se próximos ao valor previsto (cf. 2.2.2), o que não

para extrato de levedura entre 32 e 38 °C :  $\mu = 1,76 \cdot 10^{-2} (T-8)^{0,64}$  (6.8)

tabelas 4.33, 4.34, 5.38, 5.39 e figuras 4.30 e 5.35).

As concentrações celulares e as produtividades nos cultivos com frutose foram quase sempre superiores às obtidas nos cultivos com glicerol como fonte de carbono. Apenas para  $S_0 \approx 90$  mM com 1,5 g EL/L, a concentração celular numérica foi ligeiramente inferior à obtida no ensaio com mesma concentração de glicerol e 1,0 g EL/L. Deve-se notar, entretanto, que ao se aumentar a concentração de extrato de levedura para 1,5 g/L (com  $S_0 = 110$  mM), N também diminuiu, embora em ambos os casos a concentração celular massica tivesse aumentado. O aumento da concentração do extrato de levedura, independentemente da fonte de carbono, parece ter facilitado o acúmulo de proteínas e outras substâncias de reserva, pois as células apresentavam ao final dos ensaios FD5 (cf. tabela 4.32) e GD6 (cf. tabela 5.37) as maiores massas médias e os maiores conteúdos celulares protéicos dentre os ensaios em fermentador.

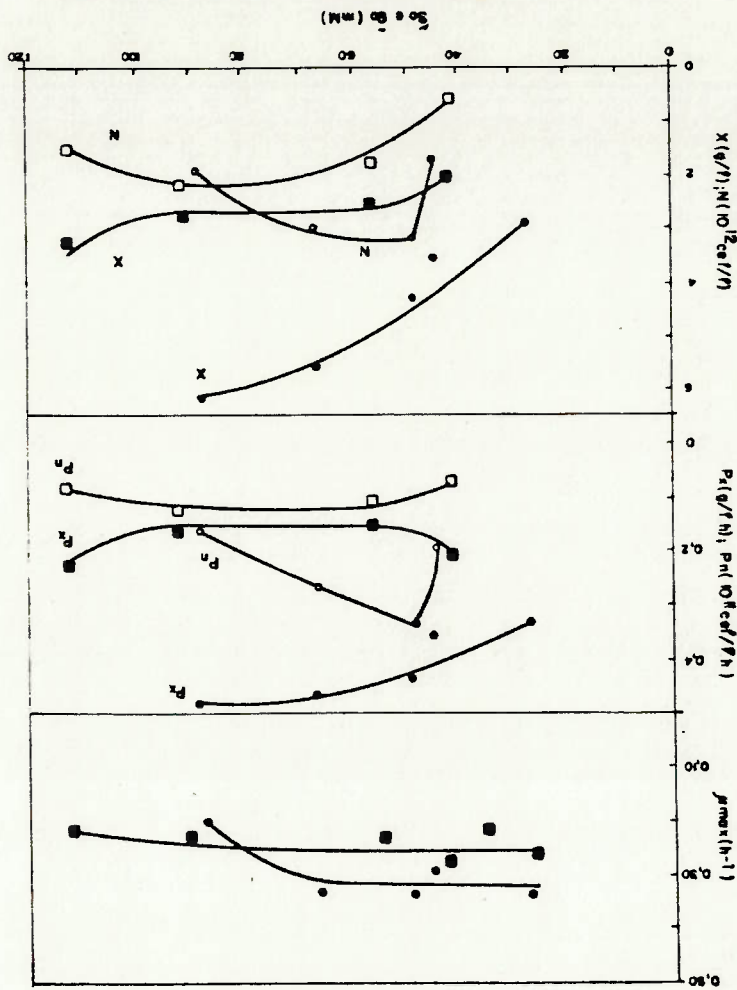
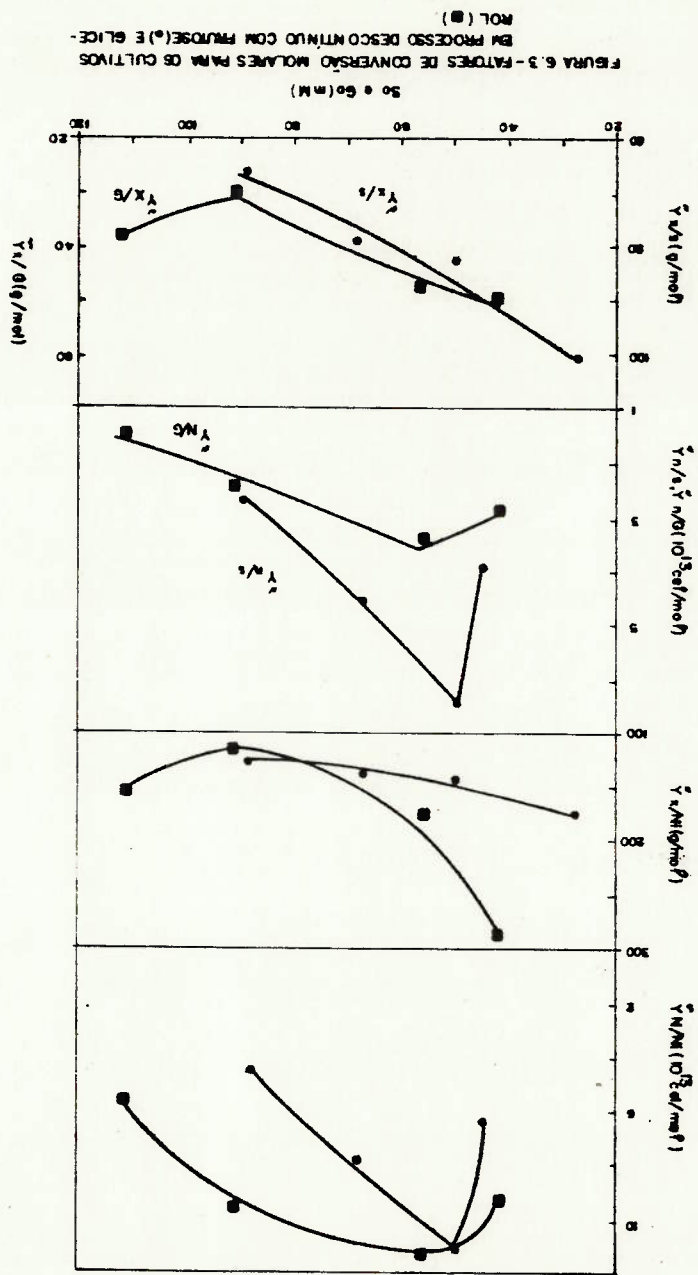


FIGURA 6.2 - CONCENTRAÇÕES E PRODUTIVIDADES CELULARES E VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRESCIMENTO PARA OS CULTIVOS EM PROCESSO DESCOMBINADO EM FERMENTADOR COM FRUTOSE (●) E GLICEROL (□).



As velocidades específicas de crescimento em frutose e glicérol (1ª fase) apresentaram comportamento semelhantes, podendo-se notar o efeito inibitório do substrato sobre o desenvolvimento celular; entretanto, a inibição por frutose (cf. equação 4.2) fez-se sentir para concentrações superiores a 65 mM, enquanto para glicérol a inibição só foi percebida para  $G_0$  superior a 100 mM.

Os fatores de conversão de substrato e de nitrogênio inorgânico em células apresentaram comportamentos, praticamente, independentes de ser frutose ou glicérol a fonte de carbono. A tendência geral dos referidos fatores de conversão foi (acima de um certo valor de  $S_0$  ou  $G_0$ ) diminuir com o aumento da concentração da fonte de carbono, confirmando a assertiva de STOUTHAMER [187] de que os microrganismos "em situações de não-limitação tendem a desperdiçar energia e nutrientes".

Na comparação dos valores numéricos dos fatores  $\bar{Y}_{X/S}$  e  $\bar{Y}_{X/G}$  não se deve estranhar que, para a mesma concentração molar,  $\bar{Y}_{X/S}$  seja aproximadamente o dobro de  $\bar{Y}_{X/G}$ , pois essa diferença desaparece quando se faz o cálculo baseando-se no número de átomos de carbono nas moléculas dos substratos.

Efetuar a comparação dos fatores de conversão da figura 6.3 com os dados de literatura não é muito fácil, devido, principalmente, à complexidade do meio de cultura [147, 186, 188].

Entretanto, a comparação pode ser feita utilizando-se os resultados dos ensaios sem extrato de levedura (FS23 e GS20) que tem a composição de "meio mínimo" [182]. Esses resultados (cf. tabela 4.22 e 5.26) foram:  $\bar{Y}_{X/S} = 82,8$  g/mol frutose e  $\bar{Y}_{X/G} = 62,6$  g/mol glicérol e são superiores aos encontrados para *Aerobacter aerogenes* ( $\bar{Y}_{X/S} = 76,1$  g/mol e  $\bar{Y}_{X/G}$  de 41,8 a 45,0 g/mol), para *Aerobacter cloacae* ( $\bar{Y}_{X/G} = 48,2$  g/mol) [147] e para *E. coli* ( $\bar{Y}_{X/S} = 75,6$  g/mol,  $\bar{Y}_{X/G} = 46,0$  g/mol) [006]. Por outro lado,  $\bar{Y}_{X/S}$  de *A. brasiliense*

sp 245 é ligeiramente inferior ao valor por nós calculado para *A. brasiliense* sp 7, já citado em 2.1.1.1.

Em termos de parâmetros para definição do processo industrial, as grandes diferenças entre a utilização de frutose ou de glicérol encontram-se nas produtividades celulares. Como pode ser observado na figura 6.2,  $P_X$  para uma dada concentração de frutose foi sempre mais do dobro do valor obtido na mesma concentração de glicérol. No caso da produtividade  $P_N$  a diferença não é tão expressiva embora no ponto do seu valor máximo para frutose ( $S_0 \approx 50$  mM) ela seja três vezes superior à obtida com glicérol.

Essa diminuição das produtividades nos cultivos com glicérol deve-se, evidentemente, à ocorrência das duas fases de crescimento exponencial (cf. tabela 5.40) e é um motivo a mais para procurar a explicação para esse fenômeno e maneiras de evitá-lo ou diminuir a sua influência.

As produtividades obtidas na produção de *A. brasiliense* sp 245 com frutose em processo descontínuo, que variaram de 0,34 a 0,49 g/ℓ.h também são bem superiores às encontradas na literatura (cf. tabela 2.6) que variaram, para o mesmo substrato de 0,018 |129| a 0,140 g/ℓ.h |008|.

### 6.3 Influência da Vazão Específica de Alimentação nos Fatores de Conversão e Produtividades

A figura 6.4 reúne os valores das concentrações de células e substratos residuais, fatores de conversão e produtividades dos ensaios FCI e GCI, que tiveram concentrações iniciais respectivamente de 46,7 e 54,7 mM, em frutose e glicérol.

A grande diferença entre os cultivos e que apresenta, consequentemente, as concentrações celulares nos regimes permanentes começam a decrescer. Para frutose esse valor é de  $0,28 \text{ h}^{-1}$  e para glicérol é de  $0,16 \text{ h}^{-1}$  e essa diferença traduz-se em uma diferença ainda mais expressiva entre as produtividades dos dois processos, pois enquanto com frutose a produtividade máxima alcançou  $1,15 \text{ g/l.h}$ , com glicérol ela não passou de  $0,43 \text{ g/l.h}$ .

Deve-se considerar, entretanto, que mesmo esse valor de produtividade apontado como baixo em face de outros obtidos neste trabalho, é muito superior aos constantes da tabela 2.7 e que foram obtidos em cultivos contínuos com malato como fonte de carbono.

Os fatores de conversão dos substratos em células tiveram comportamento ligeiramente diferente entre si, por  $\bar{Y}_{X/G}$  aumentou continuamente com a vazão específica, enquanto  $\bar{Y}_{X/S}$  teve um ponto de máximo no intervalo considerado. Em relação aos valores,  $\bar{Y}_{X/S}$  não foi o dobro de  $\bar{Y}_{X/G}$  como seria de se esperar em função do número de átomos de carbono nas moléculas dos substratos (cf. 6.2). Em vez disso, o valor máximo para  $\bar{Y}_{X/S}$  é apenas 1,75 vezes o valor máximo de  $\bar{Y}_{X/G}$ , mostrando que no processo contínuo a eficiência biológica sintética |186,187| do processo com glicérol foi superior à do com frutose.

Ao mesmo tempo, a comparação dos valores de  $\bar{Y}_{X/S}$  e  $\bar{Y}_{X/G}$  obtidos para as correspondentes concentrações molares dos substratos nos processos contínuo ( $\bar{Y}_{X/S} = 97; \bar{Y}_{X/G} = 54 \text{ g/mol}$ ) e descontínuo ( $\bar{Y}_{X/S} = 89$  e  $\bar{Y}_{X/G} = 45 \text{ g/mol}$ ) mostram que o contínuo é mais eficiente na transformação dos substratos em biomassa.

Os fatores de conversão de nitrogênio inorgânico em células no processo contínuo tiveram comportamento diferente em função do substrato limitante. Como se observa da figura 6.4  $\bar{Y}_{X/N}$  para o



#### 6.4 Influência da Fonte de Carbono na Floculação

Em diferentes condições ao longo de todos os experimentos realizados, foi observada a formação de flocos de *Azospirillum brasilense* se sp 245.

A partir dos experimentos E1 e E5 foi possível observar que o aumento da temperatura favorece a formação dos flocos, tanto para os cultivos em glicerol quanto em frutose.

A ausência do extrato de levedura não foi motivo para floculação num cultivo com frutose a 34 °C (FS1) mas em temperatura mais elevada (38°C) falta desse suplemento apressou o aparecimento do referido fenômeno (FS23). Já para glicerol, o ensaio GS11 a 36°C com extrato de levedura não apresentou floculação, enquanto no GS20 sem EL ela esteve presente desde as 3 horas de cultivo. Ou seja, neste caso o cultivo com glicerol mostrou-se mais suscetível à floculação em decorrência da composição do meio de cultura.

Nos ensaios do E2 que foram realizados na faixa de concentração iniciais de frutose entre 0 e 136 mM notou-se a formação de flocos apenas para o ensaio já referido, sem extrato de levedura (FS23). Nos demais a concentração crescente de frutose embora inibitória ao crescimento (cf. figura 4.20) não causava floculação.

No E6 realizado na faixa de  $G_0$  entre 0 e 109 mM observou-se floculação para o já referido ensaio sem extrato de levedura e para todos os outros com extrato de levedura para  $G_0 > 55$  mM ( $G_0 > 5g/l$ ). Nos ensaios em processo descontinuo realizados em fermentador

(E3) foi observada floculação para  $50 < S_0 < 66,7$  mM com 1,0 g EL/L; quando  $S_0$  aumentou para 90 mM e EL para 1,5 g/L ela não foi notada. Nos ensaios com glicerol em fermentador (E7) a floculação foi uma constante em toda a faixa de concentração estudada ( $26 < G_0 < 113$  mM) com 1,0 ou 1,5 g EL/L. Houve situações em que apareceram dois ti-



6.12 pos de flocos (cf. 5.3.2) sendo que um deles resultava da inteiração dos flocos presentes no inóculo com a agitação e aeração (cf. 5.3.7).

Nos cultivos contínuos (E4 e E8) houve pequena formação de flocos, quer nos ensaios com frutose quer naqueles com glicérol. Então, de uma forma geral, pode-se afirmar que há uma tendência maior à floculação nos ensaios com glicérol como fonte de carbono em relação àqueles com frutose. Os possíveis motivos para tal já foram discutidos no item 5.3.12 e uma hipótese que merece melhor consideração diz respeito à formação de substâncias extra-celulares que poderiam servir como matriz para agregação | 040,075,176 |.

## 6.5 Velocidades de Respiração e Conteúdo Protéico

As velocidades específicas de respiração de *A. brasiliense* sp 245 foram determinadas em dois ensaios com frutose (FD4 e FD5) e em três com glicérol (GD5, GD6 e GD7) e elas variaram de acordo com a fonte de carbono, as condições e a fase do cultivo.

Na tabela 6.2 foram reunidos alguns valores dos diferentes ensaios, tendo-se escolhido pontos no início do cultivo na metade e no final da fase exponencial para os ensaios com frutose e no início, nas metades da 1ª e da 2ª fases exponenciais e no final do cultivo, para os ensaios com glicérol.

Para possibilitar a comparação dos valores por nós determinados com os da literatura (tabela 2.3), os primeiros foram transformados para  $\text{mmol O}_2/\text{g prot.s.}$ , usando-se os respectivos valores do conteúdo protéico, extraídos das figuras 4.31 e 5.36.

Observa-se, ao se comparar os ensaios com frutose e as primeiras fases com glicérol (a não ser no GD7 cuja concentração inicial de substrato é a menor dentre as da tabela 6.2), que os valores de  $\text{O}_2$  (em base protéica) não diferem muito entre si, confirmando o exposto no item 2.1.1.2 de que os rendimentos energéticos a partir de glicérol e de frutose são equivalentes. As diferenças observadas podem estar relacionadas com a energia para assimilação de amônia (cf. 5.3.10), com as concentrações de oxigênio dissolvido (cf. 4.3.9 e 5.3.10) e com as concentrações iniciais de substratos (cf. 6.2).

A comparação dos valores obtidos na tabela 6.2 com os dados de literatura reunidos na tabela 2.3 mostra que, de uma forma geral as velocidades específicas de respiração de *A. brasiliense* sp 245 em frutose eram inferiores às de *A. brasiliense* sp 7 e essa diferença chegou a ser expressiva (2 a 3 vezes) dependendo do autor (054,

122 | e da fase de crescimento considerados. Neste caso, evidente-

mente, as diferenças podem ser originadas das cepas diferentes, e

também das variações no conteúdo protéico celular, que foram obser-

vadas em todos os ensaios realizados com a cepa sp 245.

Tanto nos cultivos em frutose quanto em glicérol, esse teor

protéico foi influenciado pela velocidade específica de crescimen-

to, pela composição do meio de cultura e, principalmente, pela con-

centração de oxigênio dissolvido no meio de cultura (cf. figuras

4.31 e 5.36), com a tendência em aumentar o teor protéico com o au-

mento dessa última grandeza (cf. figuras 4.31 e 5.36).

**Tabela 6.2** Velocidades específicas de respiração ( $\text{O}_2$ ) e porcenta-  
gem de proteína celular para ensaios de crescimento de  
*A. brasiliense* sp 245 em frutose e em glicérol.

Ensaio	Tempo de cultivo (h)	$\text{O}_2$		% P	$\text{O}_2$	
		$10^{-4}$ mmol $\text{O}_2$	g.cel.s		$10^{-4}$ mmol $\text{O}_2$	g.prot.s
FD4	$S_0 = 67,7$ mm EL = 1,0 g/l	3,0	1,37	63	2,17	4,93
FD5	$S_0 = 88,9$ EL = 1,5 g/l	4,5	4,25	48	8,85	6,24
GDS	$G_0 = 91,3$ mm EL = 1,0 g/l	3,5	1,87	65	3,11	5,38
GDS	$G_0 = 91,3$ mm EL = 1,0 g/l	6,0	3,91	67	5,38	9,09
GDS	$G_0 = 91,3$ mm EL = 1,0 g/l	13,0	4,09	45	9,09	1,79
GDS	$G_0 = 91,3$ mm EL = 1,0 g/l	17,0	0,91	51	3,11	4,74
GD6	$G_0 = 112,0$ mm EL = 1,5 g/l	2,5	4,55	65	7,00	8,85
GD6	$G_0 = 112,0$ mm EL = 1,5 g/l	4,5	3,97	62	6,40	6,24
GD6	$G_0 = 112,0$ mm EL = 1,5 g/l	13,0	4,66	50	9,32	4,74
GD6	$G_0 = 112,0$ mm EL = 1,5 g/l	18,5	2,48	55	4,51	4,93
GD7	$G_0 = 43,1$ mm EL = 1,0 g/l	3,0	10,29	60	17,15	10,38
GD7	$G_0 = 43,1$ mm EL = 1,0 g/l	4,0	6,02	58	10,38	10,10
GD7	$G_0 = 43,1$ mm EL = 1,0 g/l	7,0	6,97	69	10,10	3,43
GD7	$G_0 = 43,1$ mm EL = 1,0 g/l	9,0	1,89	55	3,43	3,43

## 6.6 Coeficientes de Transferência de Oxigênio

Na tabela 6.3 foram reunidos os valores médios de  $k_{La}$  para diversas condições experimentais, em ensaios com frutose ou com  $\bar{g}\bar{l}$  cerol como fonte de carbono.

Desta mesma tabela também constam os valores de potência aerada por unidade de volume ( $P_G/V$ ) que foi calculada utilizando-se a metodologia descrita por TERRON | 194 |.

Desta tabela pode-se perceber que os coeficientes de transferência de oxigênio, não foram, aparentemente, muito afetados pela fonte de carbono principal, o que facilita o equacionamento conjunto de todos os resultados.

Sendo assim, procurou-se avaliar qual das equações, dentre a de Cooper (eq. 2.8), Riet (eq. 2.9) e Richards (eq. 2.10) representa a forma estatística os resultados e a melhor correlação foi obtida para uma regressão do tipo da de Riet, dada por:

$$k_{La} = 1,4 \cdot 10^{-2} \left( \frac{P_G}{V} \right)^{0,4} \cdot V_S^{0,5} \quad (r=0,90) \quad (6.9)$$

A figura 6.5 apresenta a regressão encontrada, devendo-se notar que o ponto experimental relativo ao FD5 não foi considerado. As correlações originadas da análise dimensional (cf. eq. 2.11 a 2.14) não se ajustaram satisfatoriamente aos resultados da tabela 6.3, provavelmente por não se ter considerado adequadamente as variações das grandezas físico-químicas envolvidas (viscosidade, difusividade, densidade).

Tabela 6.3 Velocidade de agitação ( $N_r$ ), vazão de ar ( $\dot{Q}_{ar}$ ), coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ), velocidade superficial ( $V_s$ ) e potência dissipada por unidade de volume ( $P_G/V$ ) em cultivos de *A. brasiliense* sp 245 em frutose ou glicerol.

Ensaio	$N_r$ (s <sup>-1</sup> )	$\dot{Q}_{ar}$ (10 <sup>-5</sup> m <sup>3</sup> /s)	$k_{La}$ (10 <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	$V_s$ (10 <sup>-3</sup> m/s)	$P_G/V$ (W/m <sup>3</sup> )
FD4	8,33	6,67	2,27	1,91	11988
	8,33	7,67	2,63	2,19	11900
	8,33	11,50	3,39	3,29	11400
FD5	7,33	19,17	2,10	5,48	7090
GD5	7,33	8,33	2,45	2,38	8004
GD6	7,33	8,33	2,52	2,38	8004
	7,33	9,17	2,55	2,62	7932
	7,33	10,00	2,36	2,86	7851
GD7	7,33	9,17	2,47	2,62	6899

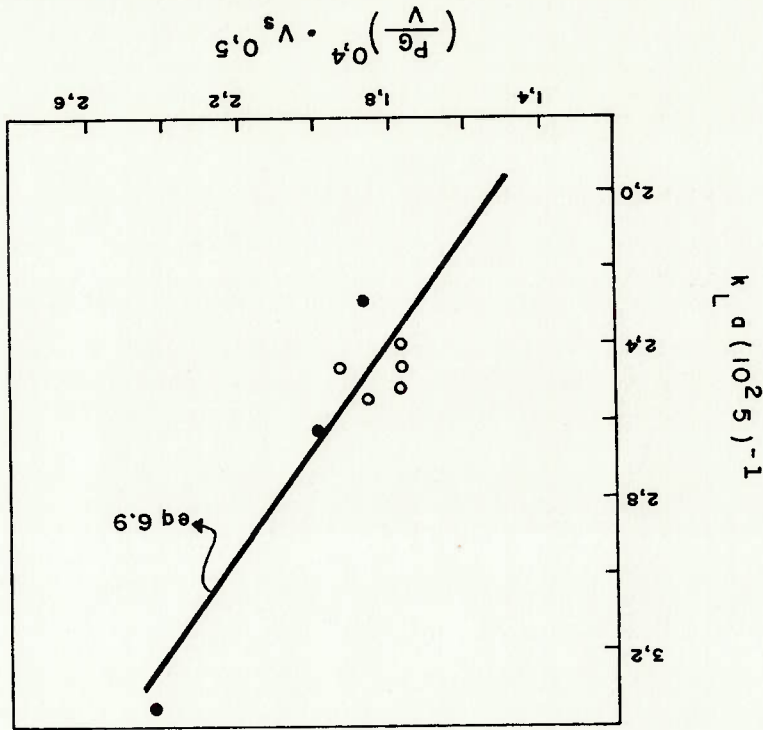


FIGURA 6.5 - CORRELAÇÃO DE RIET APLICADA AO CULTIVO DE *A. BRASILIENSE* SP 245 EM FRUTOSE (○) OU EM GLICEROL (●).

## 7 - AVALIAÇÃO ECONÔMICA PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE

*A. brasiliense* sp 245 EM FRUTOSE E EM GLICEROL

### 7.1 Objetivos e Metodologia da Avaliação

O desenvolvimento de um processo químico ou bioquímico comporta diversas etapas. Desde a "idéia inovadora" até a colocação de um produto no mercado, pelo menos três estágios distintos são normalmente desenvolvidos: a pesquisa fundamental, a pesquisa-piloto e a pesquisa industrial de demonstração |049|. Entre cada um desses estágios é imprescindível a realização de uma avaliação econômica do processo, como forma de determinar a possível competitividade do produto no mercado e avaliar a sensibilidade dos custos aos diversos fatores de produção |010,060,120,152,189|.

Este capítulo 7 tem exatamente tal finalidade, procurando estabelecer, com os resultados dos experimentos apresentados nos capítulos precedentes associados aos resultados agronômicos mencionados no capítulo 1 e no item 2.7.2, um processo de inoculante à base de *Azospirillum brasilense* sp 245 para uso em trigo e efetuar a avaliação preliminar da viabilidade de um empreendimento que vise a se a produzi-lo, em função de algumas alternativas de processo sugeridas.

Para a avaliação econômica será usada a metodologia do cálculo da taxa interna de retorno |025,094|, usando-se como indicador da viabilidade a taxa mínima de atratividade de 15% ao ano |094,170|. Os custos de insumos, matérias-primas e investimentos referem-se à primeira semana de abril de 1988, quando a Obrigaçao do Tesouro Nacional (OTN) valia CZ\$ 951,77 e o dólar norte-americano estava cotado em cerca de CZ\$ 120,00.

No final do capítulo será feita uma rápida avaliação do impacto

econômico potencial para o país decorrente da substituição de uma parcela dos fertilizantes nitrogenados por inoculante, na cultura do trigo.

## 7.2 Processo de Produção de Inoculante à Base de *Azospirillum Bra-*

*silense* sp 245

A figura 7.1 apresenta o diagrama de blocos para o processo prô- posto, que é, em linhas gerais, semelhante ao utilizado na produ- ção de inoculantes à base de *Rhizobium* |165,034,170,195|. Como se observa, há duas linhas paralelas de processamento: a do preparo da turfa (veículo) e a da produção de *A. brasilense* sp 245.

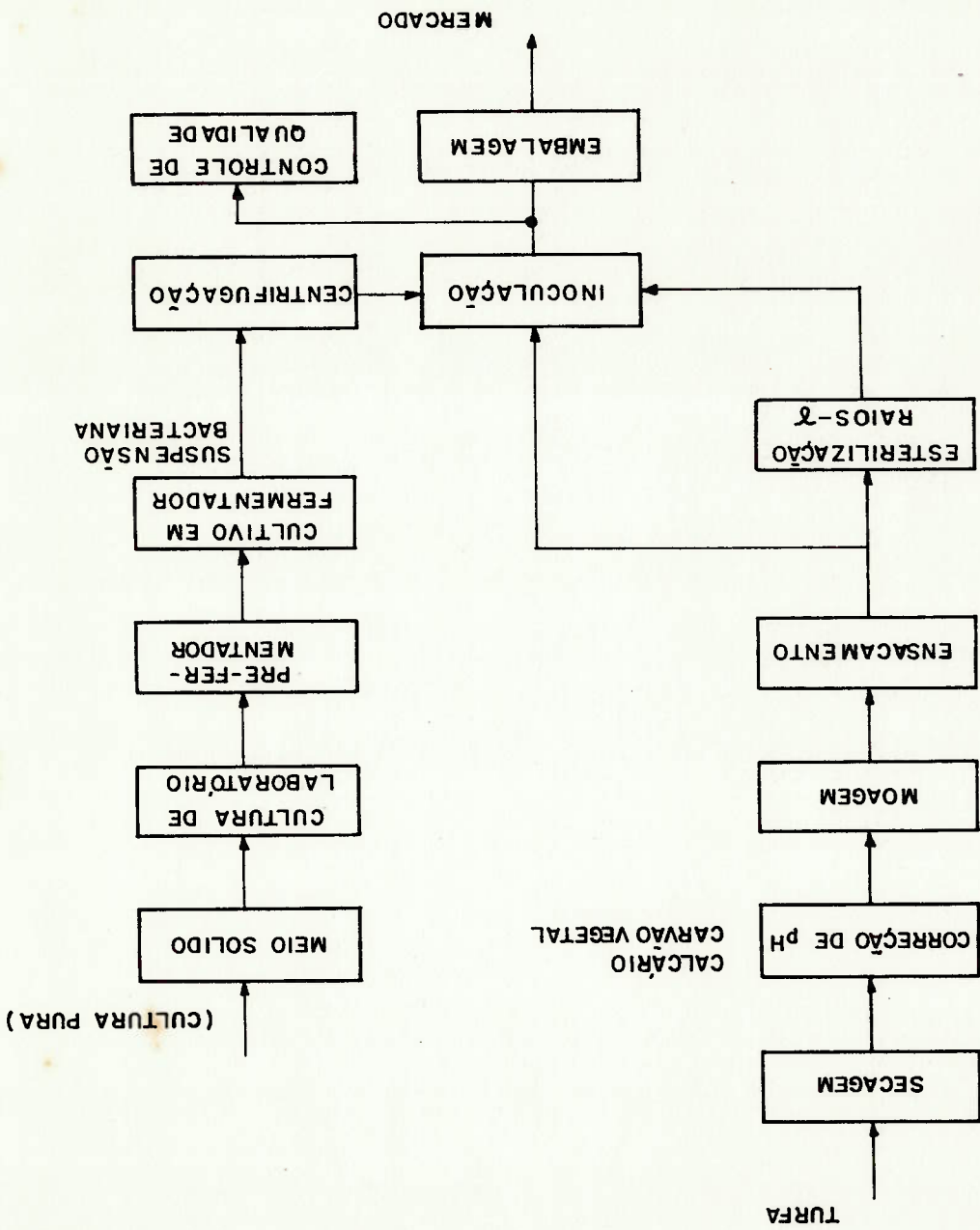
A turfa será extraída através de retro-escavadeira, seca até 10% de umidade em secadores descontínuos que usarão lenha como com- bustível e logo após terá seu pH corrigido para 7,0, com adição de calcário (cerca de 1% do peso seco da turfa |165|). Em seguida, se- rá moída em moinhos de bolas ou de martelos até granulometria de 200 mesh, e ensacada em sacos de 500 g, sendo que se colocará 350 g de turfa moída em cada um.

Para diminuir a concorrência com outras espécies microbianas, a turfa será esterilizada por radiação  $\gamma$  e, após 3 a 5 dias (para comprovação da esterilidade) inoculada com suspensão concentrada de *A. brasilense* sp 245.

Em função dos estudos realizados nesta tese, podem ser propos- tos quatro alternativas para a etapa da produção das bactérias em fermentador, que estão reunidas na tabela 7.1. Os valores de  $K_L$  foram estimados a partir dos resultados dos ensaios FD4 e GS5 e a vazão de ar foi calculada pela equação 6.9.

Ao sair do fermentador, a suspensão bacteriana será submetida

FIG. 7.1 - DIAGRAMA DE BLOCOS PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES  
 A BASE DE *A. BRASILENSE* SP 245





a uma centrifugação, uma vez que em nenhuma das alternativas propostas a concentração celular alcançará  $3,3 \cdot 10^{13}$  células/ , como

estabelecido no item 2.7.2.

Tabela 7.1 Condições de processo e resultados esperados para a produção de *A. brasiliense* sp 245 em diversas alternativas.

CONDIÇÕES E COEFICIENTES TÉCNICOS	ALTERNATIVA			
	A	B	C	D
FONTE DE CARBONO: GLICEROL	FONTE DE CARBONO: FRUTOSE	FONTE DE CARBONO: GLICEROL		
PROCESSO	PROCESSO	PROCESSO	PROCESSO	PROCESSO
DESCONTÍNUO	CONTÍNUO	DESCONTÍNUO	CONTÍNUO	CONTÍNUO

#### Méio de Cultura

Fonte de carbono (g/l)

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  (g/l)

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  (g/l)

Ext. de levedura (g/l)

#### Condições

Temperatura (°C)

pH (controlado)

$K_L a$  necessário (h<sup>-1</sup>)

Agitação (rpm)

Aeração (m<sup>3</sup>/min)

#### Coefficientes

$t_f$  (h) ou  $D$  (h<sup>-1</sup>)

X (g/l)

N ( $10^{12}$  cel/l)

$P_X$  (g/l.h)

$P_N$  ( $10^{11}$  cel/l.h)

10,0	8,5	5,0	10,0
2,64	2,24	2,64	2,64
5,28	4,48	5,28	5,28
1,0	1,0	1,0	1,0
38	38	36	36
7,0	7,0	7,0	7,0
108	108	90	90
90	90	90	90
1,80	1,80	1,30	1,30
10,0	0,28	15,0	0,16
5,0	4,0	2,8	2,6
4,3	3,1	1,8	1,1
0,45	1,15	0,15	0,43
4,3	8,7	1,2	1,8

Após a centrifugação de 150 ml da suspensão bacteriana serão injetados, através de um dosador automático, no saco contendo a turfa esterilizada.

O produto final (uma "dose" de inoculante) constituiu-se então de um saquinho de 500 g contendo 350 g de turfa esteril e 150 ml de suspensão bacteriana com  $3,3 \cdot 10^{13}$  cel/.

Os saquinhos inoculados são enfardados (10 ou 20 por fardo) e armazenados em depósito coberto e não exposto ao Sol. Duas doses por hectare serão utilizadas para inocular as sementes de trigo.

Para efeito de balanço material deve-se salientar que, consideradas as concentrações celulares previstas na tabela 7.1 e a desejada após a centrifugação, cada metro cúbico de suspensão bacteriana na que sai do fermentador será suficiente para produzir 868, 626, 363 e 242 doses de inoculante nas alternativas A, B, C e D, respectivamente.

### 7.3 Capacidade de Produção

Para o estudo comparativo das alternativas de produção estabeleceu-se um módulo de processamento composto por 2 reatores de capacidade útil de 3.000 litros. Essa dimensão permitirá, também, com parar os custos calculados com os de inoculantes à base de *Rhizobium* |170|.

Considerando-se regime de produção de 150 dias corridos por ano, e 24 h por dia, com tempos de carga, descarga e esterilização de 5 h no processo descontínuo calculou-se a produção total em cada alternativa, como demonstrado na tabela 7.2.

Desta tabela consta também a necessidade total e diária de turfa em cada alternativa.

Tabela 7.2 Capacidade de produção de 2 reatores em 3.600 h de trabalho segundo as alternativas propostas.

Alternativa	Parâmetros			
	A	B	C	D

Tempo total por batelada (h)	15	-	20	-
Nº de bateladas	480	-	360	-
Vazão esp. (h <sup>-1</sup> )	-	0,28	-	0,16
Volume total produzido (m <sup>3</sup> )	1440	6048	1080	3456
Doses/m <sup>3</sup>	868	626	363	242
Produção total (10 <sup>3</sup> doses)	1250	3780	392	836
Massa total de turfa úmida (t)	7800	2400	250	530
Massa diária de turfa úmida (t)	5,3	16,0	1,7	3,5

Levando-se em conta que a área total plantada com trigo no Brasil na safra de 1988 deverá chegar a 3,4 milhões de hectares [043] e que para cada hectare serão necessárias 2 doses do inoculante, vê-se que uma indústria trabalhando com o processo A poderia atender a cerca de 18% do mercado, enquanto as outras alternativas da tabela 7.2 atenderiam a 55 (B), 6 (C) e 12% (D).

#### 7.4 Mão-de-Obra Necessária

A tabela 7.3 apresenta a estimativa da mão-de-obra necessária para as diversas seções da indústria, admitindo-se 3 turnos normais de trabalho de 8 h cada um.

Tabela 7.3 Estimativa de mão-de-obra necessária para uma unidade de produção de inoculantes. (Entre parênteses os números para o processo B).

Seção	Funcionários nível superior	Funcionários nível médio	Funcionários não especializados	Total
-------	-----------------------------	--------------------------	---------------------------------	-------

Extração e preparo da turfa	-	01	02 (04)	03 (05)
Fermentação e controle qualidade	02	03	-	05
Centrifugação	-	03	-	03
Inoculação	-	03	03 (15)	06 (18)
Embalagem	-	-	02 (04)	02 (04)
Depósito	-	01	01 (02)	02 (03)
Escritório e serviços gerais	-	02	03	05
TOTAL	02	13	11 (28)	26 (43)

### 7.5 Investimentos Necessários

Para o cálculo dos investimentos necessários para o processo foi feito o levantamento de preços dos equipamentos listados na tabela 7.4.

Os custos totais para aquisição e instalação dos equipamentos foram estimados em CZ\$ 50.000.000,00 para os processos A, C e D, e CZ\$ 67.000.000,00 no processo B.

Os custos de prédio industrial, galpão de processamento da turfa, armazém de turfa esterilizada e de produto acabado, almoxarifado, laboratório de controle de qualidade e escritório, com área total construída de 700 m<sup>2</sup> para os processos C e D e de 1000 m<sup>2</sup> para os processos A e B foram orçados, respectivamente em CZ\$ 15.000.000,00 e CZ\$ 22.000.000,00.

Tabela 7.4 Equipamentos necessários para a produção de inoculantes à base de *A. brasiliense* sp 245.

QUANTIDADE	DESCRIÇÃO
01	Retrosacavadeira para extração de turfa
01	Caminhão para 6 toneladas
01	Secador descontínuo a lenha, com capacidade de 2 t de turfa úmida por batelada, com ciclo completo de 6 horas
(2 no proc.B) 01	Moinho de bolas, corpo de aço carbono, bolas de porcelana, capacidade de processamento de 1500kg por batelada de 2 horas
01	Máquina ensacadeira com capacidade de preenchimento de 600 saquinhos por hora
(2 no proc.B) 01	Fermentador de aço inoxidável AISI 304, com capacidade útil de 3000 litros (diâmetro 1,35 m, altura 2,0 m), com 3 agitadores tipo turbina de 6 pás, com 0,45 m de diâmetro; anel para distribuição de ar e vapor, camisa para aquecimento e resfriamento e acessórios para o controle de pH, temperatura e acessórios para 2,0 HP para 90 rpm; válvulas para carga, descarga, limpeza, esterilização e segurança.
02	Pre-fermentadores de aço inoxidável AISI 304 para 300 litros de capacidade útil (diâmetro 6,6 m altura 100 cm) equipado com duas turbinas de 6 pás de 0,20 m, anel de distribuição de ar e de vapor; motor de 1/20 HP para 120 rpm
(não são necessários nos processos B e D) 02	Tanque pulmão com capacidade de 3000 litros, em aço carbono, fechado, esterilizável por vapor direto para 1000 litros de suspensão a centrifugar/h e capacidade de concentração de 8 a 30 vezes com tanque para 500 litros de centrifugação
01	Caldeira vertical a lenha, fogo tubular para produção de 500 kg de vapor a 1,2 ate por hora. Alimentação manual de lenha
01	Compressor de ar, vazão de 220 m <sup>3</sup> /h à pressão de 0,50 ate
01	Filtros de ar, elemento filtrante ago sintetizado, vazão de 100 m <sup>3</sup> /h
02	Máquina dosadora para suas seringas injetoras para 150 ml, capacidade de inoculação de 6 saquinhos/ minuto.
(3 no proc.B) 01	

Estima-se que todos os investimentos sejam feitos em um ano,

com capital próprio e que a unidade esteja produzindo no ano seguinte.

7.6 Avaliação dos Custos de Produção

7.6.1 Custos Fixos

A tabela 7.5 apresenta os custos fixos para as alternativas estudadas.

Tabela 7.5 Custos fixos anuais para a produção de inoculantes à base de *A. brasilense* sp 245 segundo os processos alternativos.

Item	Alternativa		
	A	B	C e D
Mão-de-Obra permanente	5965	6155	5965
Depreciação de equipamentos e construções	2880	3560	2600
Seguros	1440	1780	1300
Remuneração do investimento	10800	13350	9750
Custos administrativos	1054	1242	981
<b>TOTAL</b>	<b>22139</b>	<b>26087</b>	<b>20596</b>

A mão-de-obra permanente refere-se aos funcionários de nível superior, aos de nível médio do escritório e aos do depósito. Os salários pagos por nível são estimados em 20 salários de referência para os funcionários de nível superior, 7 para os de nível médio e 2 para os não especializados, acrescentando-se um percentual de 60% para cobertura dos encargos sociais. O salário mínimo de referência em abril de 1988 era de CZ\$ 4.932,00.

Preve-se vida útil do empreendimento de 25 anos | 170 | com valor residual nulo, o que importa em um custo de depreciação de 4% sobre o investimento.

Os custos de seguros são estimados em 2% ao ano sobre o investimento e para a remuneração do capital próprio estabelecem-se 15% ao ano |170|.

Finalmente, para os custos gerais de administração estimou-se cerca de 5% da somatória dos outros custos fixos.

#### 7.6.2 Custos Variáveis

##### 7.6.2.1 Custo de Extração e Preparo da Turfa

o custo da turfa enquanto matéria-prima é irrelevante, devendo-se computar apenas o valor agregado na extração, processamento e esterilização. O custo da mão-de-obra será calculado mais adiante. O custo da extração se resume ao óleo diesel para a retro-escavadeira (20 l/h, a CZ\$ 29,40/l) com rendimento de 6 toneladas de turfa úmida por turno de 8 h.

Essas 6 toneladas, processadas em 3 bateladas de secador tem a unidade diminuída de 50 a 10%, transformando-se em 3,30 toneladas de turfa seca. Nas três bateladas gasta-se 1,5 t de lenha (a CZ\$ 2.400,00/t) e produz-se turfa suficiente para 9500 doses de inoculantes.

Então a extração e o preparo da turfa custam CZ\$ 0,88/dose.

Deve-se notar que com a produção diária mencionada, no processo A, são necessários 130 dias de trabalho e no C e D respectivamente 41 e 88 dias.

A menor necessidade de mão-de-obra será levada em consideração no item 7.6.2.3.

O custo da esterilização da turfa por radiação  $\gamma$  é difícil de calcular devido aos custos variáveis do transporte de ida e volta até a uma empresa que preste esse tipo de serviço (como a EMBRARAD,

em Cotia, SP).

para contornar essa dificuldade na presente avaliação econômica, considerar-se-á um acréscimo da ordem de 20% sobre os custos diretos da produção do inoculante para cobrir os custos de transporte e esterilização (cf. tabela 7.10).

#### 7.6.2.2 Custos da Produção de *A. brasiliense* sp 245

Os custos diretos do processo de produção de *A. brasiliense* sp 245 são os do meio de cultura, de energia, de vapor para esterilização, da água de processo e do ar estéril e da operação subsequente de centrifugação.

A tabela 7.6 apresenta os custos da formulação dos meios de cultura e a tabela 7.7 os das utilidades mencionadas. Os custos de energia elétrica, vapor, ar estéril e água de processo foram obtidos junto a uma indústria de São Paulo e os preços das matérias-primas foram consultadas junto a fornecedores de reagentes para laboratório.

Tabela 7.6 Custos dos meios de cultura para a produção de *A. brasiliense* sp 245 nos processos alternativos propostos\*.

Componente	Custo (Cz\$ / m <sup>3</sup> )		Custo (Cz\$/kg)	Componente	Custo (Cz\$ / m <sup>3</sup> )	
	A	B			C e D	
Frutose	4800	48000	4800	Frutose	-	5000
Glicerol	1000	-	1000	Glicerol	-	4593
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1740	4593	1740	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8765	3900
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1660	8765	1660	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	162	162
Extrato levedura	3900	3900	3900	Extrato levedura	65	65
Outros sais	-	162	-	Outros sais	65	65
Água	65	65	65	Água	22475	22475
TOTAL	-	65485	-	TOTAL	56260	22475

\* Composição dos meios na tabela 7.1 e item 3.2.5.



7.12 Tabela 7.7 Custo de utilidades para diversas alternativas de produção de A. *brasiliense* sp 245.

Utilidade	Custo unitário (Cz\$)	Utilização por batelada ou por hora				Custo Anual (10 <sup>3</sup> Cz\$)
		A	B	C	D	
Água de resfriamento	7,0/m <sup>3</sup>	50	-	50	-	168
Vapor	200/t	1,0	-	1,0	-	960
Ar estéril	0,5/Nm <sup>3</sup>	1080	108	1170	78	260
Elétrica	5,0/kWh	6,7	0,45	9,0	0,45	16
Bateladas ou horas de consumo		480	3600	360	3600	-
Custo Total das Utilidades (10 <sup>3</sup> Cz\$)						1404
						203
						1072
						148

O custo da centrifugação resume-se à energia elétrica utilizada, englobados em outros itens de custo. Estima-se que, por batelada de 3,0 m<sup>3</sup>, a energia utilizada seja de 6 kWh, com custo total de Cz\$ 30,00.

7.6.2.3 Custos de Mão-de-Obra

A tabela 7.8 apresenta os custos da mão-de-obra variável, representada, nos processos A, C e D por 10 funcionários de nível médio e 10 não especializados, e no processo B também por 10 de nível médio e 26 não especializados. No caso dos processos C e D, as equipes de extração e preparo da turfa (cf. tabela 7.3 e item 7.5.3.1) são contratadas por 2 e 3 meses, respectivamente.

7.13  
 Tabela 7.8 Custos de mão-de-obra variável para as alternativas de produção de *A. brasiliense* sp 245.

I t e m		A	B	C	D
Homens-mês-nível médio		50	50	47	48
Custo anual nível médio (10 <sup>3</sup> Cz\$)		2762	2762	2596	2651
Homens-mês-não-especializado		50	130	44	46
Custo anual não-especializado (10 <sup>3</sup> Cz\$)		789	2052	694	726
Custo Mão-de-Obra Variav. (10 <sup>3</sup> Cz\$)		3551	4814	3290	3377

Na tabela 7.9 estão reunidos os custos variáveis totais, segundo as alternativas propostas.

Tabela 7.9 Custos variáveis anuais da produção de inoculantes à base de *A. brasiliense* sp 245 (Custos em 10<sup>3</sup> Cz\$).

I t e m		A	B	C	D
Extrato prep. turfa		1100	3326	345	736
Meio de cultura		65485	56260	22475	22475
Utilidades		1404	203	1072	148
Centrifugação		15	30	11	18
Mão-de-obra		3551	4814	3290	3377
Total dos Custos Variáveis (10 <sup>3</sup> Cz\$)		71555	64633	27193	26754

7.6.3 Custos Totais e Unitários de Produção

Na tabela 7.10 estão resumidos os custos anuais de produção, pela reunião das tabelas 7.5 e 7.9 e foram calculados os custos de

produção, considerando a capacidade estimada para cada alternativa-

va.

**Tabela 7.10 Custos totais e unitários de produção de inoculantes à base de A. brasilense sp 245, segundo as alternativas de processo propostas e incidências porcentuais dos itens sobre o custo. (Custos em 10<sup>3</sup>Cz\$).**

Item	Alternativa			
	A	B	C	D
	Custo	Custo	Custo	Custo
	%	%	%	%

<b>Custos Fixos</b>	22139	26087	20596	20596
Mão-de-obra perman.	5965	6155	5965	5965
Depreciação e Seguros	4320	5340	3900	3900
Remuneração de invest.	10800	13350	9750	9750
Custos administr.	1054	1242	981	981
<b>Custos Variáveis</b>	71555	64633	27193	26754
Ext. prep. turfa	1100	3326	345	736
Meio de cultura	65485	56260	22475	22475
Utilidades e centrif.	1419	233	1083	166
Mão-de-obra	3551	4814	3290	3377
	3,2	4,4	5,7	5,9
	1,3	0,2	1,9	1,9
	58,2	51,7	39,2	39,6
	10,0	3,1	0,6	1,3
	63,6	59,4	47,4	47,1

Custos Totais s/esteril. 93694 83,3 90725 83,3 47789 83,3 47350 83,3

Custos Totais c/esteriliz. 112432 100 108870 100 57347 100 56820 100

Doses Produzidas(10<sup>3</sup>) 1250 3780 392 836

Custo Unitário (Cz\$/dose) 89,95 28,80 146,29 67,97

Custo Unitário (OTN/dose) 0,095 0,030 0,154 0,071

**7.7 Receitas Esperadas**

**7.7.1 Preço de Venda do Inoculante**

A fixação de preço de venda de um novo produto é uma questão de licada. Normalmente, usa-se como base o preço de um concorrente ou de um substituto |107|.

No caso do inoculante para trigo poder-se-ia utilizar, então,

como base, o preço do fertilizante nitrogenado que se espera substituir. Segundo a planilha de cálculo do Valor Básico de Custeio (VBC) pra trigo elaborada pela Companhia de Financiamento da Produção (comunicação pessoal, 1988) o custo de fertilizante (relativo a 10 kg N no plantio + 70 kg uréia na cobertura por hectare) seria da ordem de 2.444,95/ha (a preços de abril/88). Então, segundo esse critério, a dose de inoculante para trigo poderia ser vendida no máximo a Cz\$ 1.222,48. Lembrando que serão usadas duas doses por hectare.

Entretanto, objetivando que o lançamento desse produto possa contribuir para a diminuição efetiva dos custos de produção (e, a médio prazo, também os preços aos consumidores) adotou-se como critério que a utilização do inoculante deveria baixar o custo da utilização do nitrogênio, que atualmente é da ordem de 8,3 do VBC da lavoura para cerca de 0,83%.

Segundo a planilha já mencionada, o VBC do plantio de um hectare de trigo era, em abril/88, Cz\$ 29.457,28 e dessa forma, o preço da dose do inoculante será fixada, para efeito da presente avaliação econômica em Cz\$ 122,15.

### 7.7.2 Receitas Esperadas e Lucro Líquido

As receitas brutas esperadas com a venda de todo a produção (cf. tabela 7.2) ao preço definido no item anterior constam da tabela 7.11, onde também foram lançados as despesas operacionais (estimadas em 20% da receita bruta) e as previsões de despesas com impostos de renda (35% do lucro operacional).

Tabela 7.11 Receitas brutas, despesas operacionais e com imposto de renda e lucro líquido em três alternativas\* de produção de inoculantes à base de *A. brasilense* sp 245. (Valores em 10<sup>3</sup>Cz\$).

Item	Alternativa		
	A	B	D
Receita Bruta	152.687	461.727	102.117
Custos de Produção	112.432	108.870	56.820
Lucro Bruto	40.255	352.857	45.297
Desp. Operacionais	30.537	92.345	20.423
Lucro Operacional	9.718	260.512	24.874
Despesas Imp. Renda	3.401	91.179	8.706
Lucro Líquido	6.317	169.333	16.168

\* não foram lançados os valores para a alternativa C em que o custo de produção ultrapassaria o preço de venda.

### 7.8 Indicadores Econômicos

A tabela 7.12 apresenta diversos indicadores econômicos |094| para as alternativas de produção. Para facilitar a consulta posterior, alguns itens do fluxo de caixa são apresentados em OTN.

Tabela 7.12 Indicadores econômicos para três alternativas de produção de inoculantes à base de *A. brasilense* sp 245.

Alternativa	ITENS		
	(10 <sup>3</sup> Cz\$) (10 <sup>3</sup> OTN)	(10 <sup>3</sup> Cz\$) (10 <sup>3</sup> OTN)	(10 <sup>3</sup> Cz\$) (10 <sup>3</sup> OTN)
A	72.000	89.000	93,51
B	152.687	160,42	485,13
C	112.432	118,13	114,39
D	30.537	32,08	97,02
E. Lucro Líquido	6.317	6,64	177,91
<b>INDICADORES</b>			
A. Investimento	23,0	132,4	38,5
Taxa Int. de Retorno (%)	43,8	9,0	37,5
Ponto de Nivelamento (%)	73,6	23,6	55,6
Custos Totais/Rec.Bruta (%)	4,1	36,7	15,8
Lucro Líquido/Rec.Bruta (%)	8,8	190,3	24,9

Das quatro alternativas de produção consideradas (cf. tabela 7.1) a avaliação econômica mostrou que a indústria que utilizasse frutose, em processo contínuo, apresentaria o melhor desempenho econômico, com taxa interna de retorno muito superior à mínima aceitável (15% a.a.). O baixo ponto de nivelamento dessa alternativa (cf. tabela 7.12) contribui para a segurança do empreendimento e a elevada relação lucro líquido/investimento assegura o retorno do capital investido em menos de um ano de produção. Resultados satisfatórios também seriam obtidos por uma empresa que adotasse o processo D (glicerol, contínuo), enquanto que para adotar a alternativa A (frutose, descontínuo), os riscos seriam bem maiores.

Analisando as razões para as diferenças acentuadas nos resultados dos econômicos, sobretudo, de imediato o aspecto da produtividade celular (cf. tabela 7.1), que permitiria ao processo B uma capacidade de produção 3 vezes superior à do A e 4,5 vezes do D.

No processo A outro fator viria agravar a situação, a ponto de fazê-lo apresentar custo de produção 32,3% superior ao do processo D (cf. tabela 7.10) e esse fator seria o alto custo da frutose pois enquanto o custo dessa matéria-prima representaria 67,1% dos custos variáveis do processo A, o custo do glicerol contribuiria com apenas 18,7% dos custos variáveis da alternativa C (cf. tabelas 7.6 e 7.10).

Os empreendimentos que utilizassem os processos A e D teriam grandes possibilidades de melhorar seu desempenho econômico pois uma rápida análise de sensibilidade | 094 | mostrou que diminuição nos custos totais de 5%, mantidos os outros fatores constantes, fãria as taxas internas de retorno aumentar para 29,1 e 41,4%, res-

7.18 pectivamente. No caso da alternativa B o impacto seria menor, pois com a mesma alteração a taxa de retorno se elevaria para 135,0%.

De qualquer maneira, deve-se frisar que haveria muitas possibilidades da diminuição dos custos do produto, quer através do aumento da produtividade quer pelo decréscimo dos custos dos fatores de produção. Uma das formas a considerar, com fortes impactos sobre todas as alternativas será a utilização de matérias-primas comerciais (em vez de reagentes de laboratório), e de suplementos proteicos que são subprodutos industriais, como levedura de destilaria, água de maceração de milho, etc.

No caso dos processos com glicerol, a produtividade foi limitada por fatores. (o aparecimento de duas fases de crescimento exponecial e a floculação) que poderão ser melhor estudados de modo a permitir viabilizar até mesmo o processo descontínuo de produção.

Outros aspectos - aumento da concentração celular no fim do cultivo para evitar a centrifugação, diminuição das concentrações de fosfato e de amônio, métodos de cultivo em processo semi-contínuo com cortes ou em descontínuo alimentado, níveis ótimos de agitação-aeração, por exemplo - também deverão ser estudados para otimizar o processo e permitir, quem sabe, diminuir os custos de produção em um nível tal que os inoculantes para trigo venham a incidir em 0,4 a 0,5% no custeio do trigo, como hoje ocorre com os inoculantes para soja |042|.

#### 7.10 Impactos Econômicos Potenciais |126|

Confirmando-se que a utilização de *A. brasiliense* sp 245 poderá vir a substituir até 60 kg de nitrogênio por hectare na cultura de trigo |014|, pode-se calcular a economia para o produtor e para o setor agrícola como um todo, da difusão dessa tecnologia, sem qual-

7.19 quer outra alteração no sistema de produção, na área plantada e até mesmo na produtividade agrícola.

Como salientado no item 7.7.1, o custo do fertilizante utilizado na lavoura do trigo seria de CZ\$ 2.444,95/ha. A substituição desse insumo por inoculante específico custaria ao agricultor CZ\$ 244,30, de acordo com o preço de venda estipulado neste trabalho, com uma economia de CZ\$ 2.200,65/ha, correspondente a US\$ 18,34/ha. A área plantada com trigo no Brasil é de 3,4 milhões de hectares, o que representaria uma economia potencial de 7,5 bilhões de cruzados ou 62 milhões de dólares.



Dos experimentos e análises realizados neste trabalho, as seguintes conclusões puderam ser obtidas:

- o crescimento de *A. brasiliense* sp 245 com frutose como fonte de carbono era mais rápido do que com glicérol; sem suplementação de extrato de levedura as velocidades específicas máximas de crescimento em processo descontínuo com frutose eram  $0,21 \text{ h}^{-1}$  a  $34^\circ \text{C}$  e  $0,24 \text{ h}^{-1}$  a  $38^\circ \text{C}$ , enquanto com glicérol era  $0,075 \text{ h}^{-1}$  a  $36^\circ \text{C}$ ;

- a adição de extrato de levedura aos cultivos com frutose era vantajosa, do ponto de vista do processo de produção: as velocidades de crescimento aumentaram substancialmente (máxima de  $0,41 \text{ h}^{-1}$  a  $38^\circ \text{C}$ ) e foi obtida produtividade celular 94% superior à obtida a  $38^\circ \text{C}$ , sem extrato de levedura;

- a adição de extrato de levedura aos cultivos com glicérol causou, em todos os ensaios, o aparecimento de duas fases exponenciais de crescimento;

- mesmo com duas fases de crescimento a suplementação com extrato de levedura nos cultivos com glicérol era vantajosa, do ponto de vista de processo, uma vez que a produtividade celular duplicou em relação ao cultivo sem extrato de levedura;

- o aparecimento de duas fases de crescimento nos cultivos de *A. brasiliense* sp 245 em glicérol e extrato de levedura não era devido à diauxia;

- o aparecimento de duas fases de crescimento nos cultivos de *A. brasiliense* sp 245 em glicérol e extrato de levedura devia-se ao consumo preferencial de compostos nitrogenados presentes no extrato de levedura;

nas primeiras fases de crescimento exponencial de *A. brasiliense* sp 245 em glicerol e extrato de levedura pareciam atuar em paralelo os dois sistemas de assimilação de amônia (GDH e GS-GOGAT) enquanto na segunda fase, um deles (provavelmente GDH) deixava de ter funções biossintéticas;

os fatores de conversão de glicerol em células eram muito mais sensíveis à variação da temperatura do que os de frutose; enquanto os últimos mativeram-se constantes entre 30 e 42 °C,  $Y_{X/S} = 0,56$  g/g; os primeiros variaram de 0,3 g/g (40 °C) até 0,78 g/g (na faixa de 36 a 38°);

para o processo de produção de *A. brasiliense* sp 245 com frutose a temperatura mais apropriada era 38 °C, enquanto com glicerol era 36 °C;

as velocidades específicas de crescimento nos diversos substratos, nas regiões em que elas eram crescentes com a temperatura, puderam ser ajustadas pela equação de Arrhenius e também pela de Belshádek; as energias de ativação calculadas foram: frutose: 15,0 kcal/mol; glicerol (1ª fase): 20,1 kcal/mol; glicerol (2ª fase): 9,9 kcal/mol; extrato de levedura: 4,75 kcal/mol. A temperatura do "zero biológico" para *A. brasiliense* sp 245 estava entre 8 e 10 °C;

*A. brasiliense* sp 245 pode utilizar compostos presentes no extrato de levedura como fontes de carbono, com fatores de conversão, constante entre 30 e 40 °C, de 0,22 g cel/g FL; os crescimentos eram exponenciais em toda a faixa de temperatura citada, com velocidades crescentes de 0,14 (a 30 °C) a 0,16 h<sup>-1</sup> (a 38,0°C);

*A. brasiliense* sp 245 nos cultivos com extrato de levedura como fonte de carbono transformava compostos nitrogenados do substrato em amônia e expelia-a para o meio de cultura através de um sistema de transporte ativo;

- a massa média de células de *A. brasiliense* sp 245, cultivadas em condições de não-acúmulo de PHB, variou de  $0,9$  a  $5,2 \cdot 10^{-12}$  g/cel; o crescimento de *A. brasiliense* sp 245 em processo descontínuo foi inibido pela concentração inicial de frutose, de uma forma descrita por uma equação tipo Andrews; em processo contínuo esse substrato não era tão inibitório quanto no descontínuo;
- temperaturas superiores a  $36^\circ\text{C}$  para o cultivo em glicerol e  $38^\circ\text{C}$  para frutose favoreceram o aparecimento de flocos esféricos de *A. brasiliense* sp 245. O mesmo efeito ocorreu quando se utilizou concentrações de glicerol superiores a  $5$  g/l (em incubador rotativo) ou a  $2,4$  g/l (em fermentador, processo contínuo ou descontínuo); de uma forma geral, houve uma tendência maior à floculação nos cultivos com glicerol;
- a presença de flocos bacterianos no inóculo do fermentador acarretava o aparecimento de um outro tipo de flocos, ramificados e menos densos do que o meio de cultura; uma forma de evitar o aparecimento desse tipo de flocos foi diminuir o tempo de cultivo do inóculo;
- houve associação bastante clara entre a floculação e a formação de carotenóides, para os cultivos com glicerol ou com frutose; para evitar limitação no crescimento de *A. brasiliense* sp 245 devido à falta de substâncias presentes no extrato de levedura era suficiente manter uma relação mínima de  $1$  g de extrato de levedura por  $11$  g de frutose ou por  $6$  g de glicerol;
- as faixas de concentrações iniciais de frutose e de glicerol que se delimitaram nos ensaios em incubador rotativo como interessantes para a experimentação em fermentador foram:  $5,0 < S_0 < 11,5$  g/l e  $3,0 < G_0 < 7,0$  g/l;
- a produtividade celular nos ensaios em processo descontínuo em fermentador com frutose aumentou cerca de  $2,5$  vezes em relação à

- do incubador rotativo, com idênticos fatores de conversão de substrato em células;
- nos ensaios com glicérol a produtividade celular teve os mesmos valores, nos processos descontínuos em incubador rotativo e em fermentador, e o fator de conversão  $Y_{X/G}$  no fermentador foi cerca de metade do obtido no incubador;
  - A. brasiliense sp 245 apresentou tendência a diminuir sua velocidade específica de respiração com o aumento da concentração de oxigênio no meio de cultura, para cultivos com frutose;
  - a porcentagem de oxigênio dissolvido no meio de cultura influíu diretamente no conteúdo protéico celular, em cultivos com fruto-  
se; nos cultivos com glicérol essa influência só foi percebida nas segundas fases de crescimento;
  - em diversas características (floculação, formação de carotenoi-  
des, variação do teor protéico e da velocidade específica de res-  
piração com a concentração de oxigênio dissolvido) a estirpe A.  
brasiliense sp 245 se assemelha à A. brasiliense Cd;
  - as concentrações iniciais de glicérol e de frutose que se deter-  
minaram nos ensaios em processo descontínuo, em fermentador como  
mais interessante para a produção de A. brasiliense sp 245 foram  
 $9 > S_0 > 12$  g/l e  $G_0 = 5$  g/l, com 1,0 g RL para ambos os subs-  
tratos.
  - os coeficientes de transferência de oxigênio em alguns cultivos  
em fermentador foram ajustados por uma equação tipo - Riet;
  - no cultivo contínuo com frutose ( $S_0 = 8,40$  g/l) a produtividade  
era máxima para a vazão específica D -  $0,28$  h<sup>-1</sup>;

8.5 os fatores de conversão  $Y_{N/X}$ ,  $Y_{N/N_1}$  e a produtividade ( $P_N$ ) no ponto de produtividade máxima no cultivo contínuo com frutose eram respectivamente 4,6, 21,9 e 156% superiores aos obtidos para o processo descontínuo de substrato próxima à usada no contínuo;

no cultivo contínuo com glicerol ( $G_0 = 5,0 \text{ g/l}$ ) a produtividade era máxima para a vazão específica  $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ ;

os fatores de conversão  $Y_{N/G}$ ,  $Y_{N/N_1}$  e a produtividade ( $P_N$ ) no ponto de produtividade máxima no cultivo contínuo com glicerol eram respectivamente 35,8, 23,2 inferiores e 53,0% superiores aos obtidos para o processo descontínuo de concentração de substrato próxima à usada no contínuo;

a produtividade máxima obtida no processo contínuo com frutose era 4,8 vezes superior à obtida no processo contínuo com glicerol;

para os cultivos descontínuos (em incubador e em fermentador) com frutose foi possível estabelecer uma relação linear única entre concentração celular ( $X$ ) e absorvância que poderia ser utilizada no controle do processo de produção; o mesmo tipo de relação foi obtido entre a concentração celular ( $X$ ) e a de proteína (P) nos cultivos descontínuos em fermentador e, por essa relação, o teor protéico médio de *A. brasiliense* sp 245 era 52%;

os meios de cultura com 1,5 g EL/l independentemente da fonte de carbono, parecem ter facilitado o acúmulo de proteínas e outras substâncias de reserva, sem aumentar a produtividade de  $P_N$ , não sendo interessante utilizá-los na produção de inoculantes;

As produtividades celulares obtidas neste trabalho no cultivo de *A. brasiliense* sp 245 em frutose em processo descontínuo são 2,5 a 3,5 vezes superiores aos valores encontrados na literatura, enquanto as obtidas em processo contínuo são cerca de 6,5 vezes superiores.

- Os fatores de conversão de frutose e de glicérol em *A. brasilien-* se sp 245 sem extrato de levedura, eram superiores aos apontados para outras bactérias, como *Aerobacter aerogenes*, *Aerobacter clo-* cae e *Escherichia coli*.
- os custos de produção de uma dose de inoculante à base de azos- *pirlillum brasilense* sp 245 variaram segundo o processo e a fonte de carbono, tendo-se obtido os valores de Cz\$ 28,80 (contínuo, frutose); Cz\$ 67,97 (contínuo, glicérol), Cz\$ 89,95 (desconti- nuo, frutose) e Cz\$ 146,29 (descontínuo, glicérol);
- a avaliação econômica efetuada demonstrou que para a implanta- ção de uma indústria de inoculantes à base de *Azospirillum brasī- lense* sp 245 deve-se preferir o processo contínuo com frutose, seguido do contínuo com glicérol;
- confirmando-se os resultados agronômicos relativos à substitui- ção de fertilizantes nitrogenados por inoculantes à base de *A. brasilense* sp 245, os produtores de trigo diminuiram em cerca de 8% os custos de produção e haveria uma economia global da ordem de Cz\$ 8 bilhões de cruzados (67 milhões de dólares) para o se- tor.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 001 | AIBA, S.; HUMPHREY, A.E. & MILLIS, N. Biochemical Engineering, 2<sup>nd</sup> ed, New York, Academic Press, 1973.
- 002 | ANDREWS, J.F. A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates. Biochem. Eng. J., New York, 10(6):707-723, 1968.
- 003 | ARMINGER, W.B. Instrumentation for Monitoring and Controlling Bioreactors. IN: Moo-Young, M. (ed.). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.2, pp.133-148.
- 004 | ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA - ABQUIM - Anuário da Indústria Química, São Paulo, 1986, 412p.
- 005 | ATKINSON, B. & DAUD, I.S. Microbial flocs and flocculation in fermentation process engineering. Adv. Biochem. Engin., Berlin, 4:41-124, 1976.
- 006 | ATKINSON, B. & MAVITTUNA, F. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. London, Macmillan Publ., 1983, 1119p.
- 007 | AXELSSON, H.A.C. Centrifugation. IN: Moo-Young, M. (ed.). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon, 1985, V.2, pp.325-346.
- 008 | BACHHAWAT, A.K. & GHOSH, S. Iron Transport in *Azospirillum brasilense*: Role of the siderophore Spirillobactin. J. Gen. Microbiol., London, 133(7):1759-1765, 1987.
- 009 | BADER, F.G. Modeling Mass Transfer and Agitator Performance in Multiturbine Fermentors. Biotechnol. Bioeng., New York, 30(1):37-51, 1987.
- 010 | BAILEY, J.F. & OLLIS, D. Biochemical Engineering Fundamentals, 2<sup>nd</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 1986, 984p.

- 011 | BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant. Soil, Dordrecht, 90(1):35-45, 1986.
- 012 | BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Can. J. Microbiol, Ottawa, 29(8): 924-929, 1983.
- 013 | BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Inoculation of field grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp in Brazil. Biol. Fert. Soils, 4(1):37-40, 1987.
- 014 | BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; MENDEL, J.; ROCHA, R. & DOBEREINER, J. Inoculation of field grown wheat with *Azospirillum brasilense* inoculants in peat and oil. IN: International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, 4, Rio de Janeiro, August, 1987. ABSTRACT, 1987, p.169.
- 015 | BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Host - Plant Specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem., 12:433-439, 1980.
- 016 | BANI, D. BARBERIO, C.; BAZZICALUPO, M. FAVILLI, F.; GALLORI, E. & POLSINELLI, M. Isolation and Characterization of Glutamate Synthase Mutants of *Azospirillum brasilense*. J. Gen. Microbiol., London, 119:239-244, 1980.
- 017 | BARAK, R.; NUR, I. & OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. J. Appl. Bacteriol., Oxford, 53 (3):399-403, 1982.
- 018 | BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. Aerotactic Response of *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol., Washington, 152 (2):643-649, 1982.



- 019 | BAZIN, M.J. Microbial Population Dynamics, Boca Raton (FL), CRC Press, 1982.
- 020 | BAZIN, M.J. & PROSSER, J.I. Physiological Models in Micro-  
biology, Boca Raton, (FL), CRC Press, 2V (em publicação).
- (catálogo CRC Press, 1987, pg. 34).
- 021 | BECKING, J.H. Pleomorphism in *Azospirillum*. IN: KINGMÜLLER,  
W. (ed.). *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology,  
Berlin, Springer-Verlag, 1985, pp.253-262.
- 022 | BERNFELD, P. Amylases  $\alpha$  and  $\beta$ . IN: COLOWICK, S.P. & KAPLAN,  
N.O. (eds.). Methods in Enzymology, New York, 1:149-150,  
1955.
- 023 | BERGERSEN, F.J. The Effects of Phosphate Concentration on  
 $N_2$  and  $NH_4^+$  - Grown *Klebsiella pneumoniae*. J.Gen.Microbiol.  
London, 84(2):412-414, 1974.
- 024 | BERGERSEN, F.J. Oxygen and the physiology of diazotrophic  
microorganisms. IN: VEERGER, C. & NEWTON, W.E. (eds.). Ad-  
vances in Nitrogen Fixation Research, The Hague, Martinus  
Nijhoff, 1984, pp.171-180.
- 025 | BLANK, L.T. & TARGUIN, A.J. Engineering Economy, New York,  
McGraw-Hill, 2nd ed, 1983, 520p.
- 026 | BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER,  
J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp on nitrogen  
accumulation by field-grown wheat. Plant Soil, Dordrecht,  
95:109-121, 1986.
- 027 | BONOMI, A. Technological development for the industrial  
production of *Rhizobium japonicum*. IN: SIMPÓSIO ANUAL DA  
ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11: São Pau-  
lo, novembro, 1986. Anais \_\_\_\_\_ V.1, São Paulo, Publica-  
ção ACIESP nº 51, 1986, pp.290-305.

- 028 | BOTHE, H.; KLEIN, B.; STEPHAN, M.P. & DOBEREINER, J. Trans-  
formations of Inorganic Nitrogen by *Azospirillum* spp. Arch.
- 029 | BRASIL - Ministério da Fazenda - Superintendência Nacional  
do Abastecimento - Portaria nº 21 de 21/04/88. (D.O.U. -  
22/04/88).
- 030 | BROWN, C.M. Ammonia Assimilation and Utilization in Bacteria  
and Fungi. IN: PAYNE, J.W. (ed): Microorganisms and Nitrogen  
Sources, Chichester, John Wiley, 1980, pp.511-535.
- 031 | BRUNETTO, G. & CONCONE, B.R.V. Agitação e Aeração em Fermen-  
tadores. IN: BORZANI, W.; LIMA, U.A. & AQUARONE, E. Bio-  
tecnologia - Engenharia Bioquímica. São Paulo, Edgard Blü-  
cher, 1975, V.3, p.137-167.
- 032 | BULL, D.N. Automation and Optimization of Fermentation Proc-  
esses. Ann Rep. Ferm. Proces., New York, 6:359-375, 1983.
- 033 | BULL, D.N. Instrumentation for Fermentation Process Control.  
IN: MOO-YOUNG, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Ox-  
ford, Pergamon Press, 1985, V.2, pp.149-163.
- 034 | BURTON, J.C. *Rhizobium* Species. IN: Microbial Technology,  
New York, 2nd ed. Academic Press, 1979, V.1, pp.29-59.
- 035 | CASOLARI, A. A Model Description Microbial Inactivation and  
Growth Kinetics. J. Theor. Biol., London, 88(1):1-34, 1981.
- 036 | CHAKRABARTI, S.K.; MISHRA, A.K. CHAKRABARTI, P.K. Cytochromes  
in *Azospirillum brasilense*. Curr. Microbiol., New York,  
11:343-348, 1984.
- 037 | CHAPMAN, C.M.; NIENOW, A.W.; COOKE, M. & MIDDLETON, J.C. Part  
III. Three  
ticle-gas-Liquid Mixing in Stirred Vessels. Part III. Three  
Phase Mixing. Chem. Eng. Res. Des., 61:167,181, 1983a.
- 038 | CHAPMAN, C.M.; NIENOW, A.W.; COOKE, M. & MIDDLETON, J.C. Part  
IV - Mass  
ticle-gas-Liquid Mixing in Stirred Vessels. Part IV - Mass

- R.5
- Transfer and Final Conclusions. Chem. Eng. Res. Des., 61: 182-185, 1983b.
- |039| CHARLES, M. Fermenter Design and Scale-up. IN: Moo-Young, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.2, pp.57-75.
- |040| CHOMA, A.; RUSSA, R.; MAYER, H. & LORKIEWICZ, Z. Chemical Arch. Analysis of *Azospirillum* lipopoly saccharides. Microbiol., Berlin, 146:341-345, 1987.
- |041| CLARA, R.W. & KNOWLES, R. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase in ammonium grown and nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol., Ottawa, 30:1222-1228, 1984.
- |042| COMPANHIA DE FINANCIAMENTO DA PRODUÇÃO - CFP - Custo de Produção Agrícola, Brasília, 1987, 230p.
- |043| COMPANHIA DE FINANCIAMENTO DA PRODUÇÃO - CFP - Informativo CFP, Brasília, 8(18):10-11, semana de 16.05 a 20.05 de 1988.
- |044| COONEY, C. Measurement of Heat Evolution During Fermentation - Cambridge, MIT, 1966, (MSc Thesis).
- |045| COONEY, C.L. Growth of Microorganisms. IN: REHM, H.J. & REED, G. (eds): Biotechnology, Weinheim, Verlag Chemie, 1981, V.1, pp.73-112.
- |046| COOPER, C.M.; FERNSSTRON, G.A. & MILLER, S.A. Performance of agitated gas liquid contactors. Ind. Eng. Chem., New York, 36(6):504-509, 1944.
- |047| CORBETT, K. Design, Preparation and Sterilization of Fermentation Media. IN: MOO-YOUNG, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.1, pp.128-139.
- |048| CORDTS, M.L. & GIBSON, J. Ammonium and Methylammonium Transport in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol., Washington, 169(4):1632-1638, 1987.

- 049 | CRAVEIRO, A.M. Programa de Biotecnologia do IPT: Desenvolvi-  
 mento de processos fermentativos e enzimáticos. IN: SIM-  
 PÓSIO DA ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11,  
 São Paulo, nov. 1986 - ANAIS, V.2 São Paulo, Publicação  
 ACIESP nº 51, 1986, pp.58-72.
- 050 | CROW, E.L. Statistics Manual, New York, Dover, 1960, p.145-  
 194.
- 051 | CRUEGER, W. & CRUEGER, A. Biotechnology. A text of Indus-  
 trial Microbiology, Sunderland, Sinauer Ass., 1984, 308p.
- 052 | DAS, A. & MISHRA, A.K. Effect of Inorganic Nitrogen Sources  
 on Growth & Acetylene Reduction in *Azospirillum brasilense*.  
Indian J. Exp. Biol., New Delhi, 20(8):590-594, 1982.
- 053 | DAS, A. & MISHRA, A.K. Effect of Yeast Extract, Casamino  
 Acids, Peptone & various L-Amino-Acids on Growth & Acetylene  
 Reduction in *Azospirillum brasilense*, Indian J. Exp. Biol.,  
 New Delhi: 20(10):751-755, 1982.
- 054 | DAS, A & MISHRA, A.K. Utilization of Fructose by *Azospirillum*  
*brasilense*. Can. J. Microbiol., Ottawa, 29(9):1213-1217,  
 1983.
- 055 | DAS, A. & MISHRA, A.K. Aerotolerant growth in *Azospirillum*  
*brasilense* Induced by Dihydroxyphenyl Iron Binding Com-  
 pound. Curr. Microbiol., New York, 11(6):313-316, 1984.
- 056 | DAS, A. & MISHRA, A.K. Various physiological Aspects Assoc̄  
 ated with Metabolism of Fructose and Malate in *Azospirillum*  
*brasilense*. Indian. J. Exp. Biol., New Delhi, 22(10):536-  
 538, 1984.
- 057 | DAWES, E.A. Microbial Energetics. Glasgow, Blackell, 1982,  
 185p.
- 058 | DIAS, J.M.C.S. Aplicação do método dinâmico de medida da ve-  
locidade específica máxima de crescimento celular à fer-

- mentação alcoólica contínua de mosto de melago. São Paulo, Escola Politécnica da USP, 1982, 225p. (Dissertação de Mestrado).
- 059 | DIAS, J.M.C.S.; FACCIOTTI, M.C.R. & SCHMIDELL, W. Influência de micronutrientes e de extrato de levedura no crescimento de *Azospirillum brasilense* em incubador rotativo. Rev. Microbiol., São Paulo, 18(3):249:257, Jul/set. 1987.
- 060 | DIAS, J.M.C.S.; NOVAES, F.V.; CRUZ, E.R. & SOARES, R.P. Avã liação Técnica e Econômica do Funcionamento de Microdestilarias, Brasília, EMBRAPA, 1983, 39p.
- 061 | DIMMLING, W. Feedstocks for Large-scale-Fermentation Processes. IN: SCHELEGEL, H.G. & BARNEA, J. (eds). Microbial Energy Conversion. Göttingen, Erich Goltze KG, 1976, pp. 499-513.
- 062 | DOBEREINER, J. Ten Years *Azospirillum*. IN: KINGMULLER, W. (ed). Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology. Bayreuth, Alemanha. Set. 1983 Birkhauser, Basel, 1983, pp. 9-23.
- 063 | DOBEREINER, J. (citada em) Grão da Prosperidade. Veja, São Paulo, 20(18):68-75, maio 1988.
- 064 | DOBEREINER, J. & DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. IN: NEWTON, W.E. & NYMAN, C.J. (eds): In-ternational Symposium on Nitrogen Fixation, 1, Proceedings, Pullman, Washington State University Press, 1976, pp. 518-538.
- 065 | DOBEREINER, J. & PEDROSA, F.O. Nitrogen Fixing Bacteria in Non Leguminous Crop Plants. Madison, Science Tech., 1987, 155p.

- 066 | DOELLE, H.W. Basic Metabolic Processes. IN: REHM, H.J. & REED, G. (eds). Biotechnology, Weinheim (W. Germany), 1981, V.1, pp.113-210.
- 067 | DORN, P.A. Fermentação Contínua. IN: BORZANI, W.; LIMA, U. A. & AQUARONE, E. (eds). Biotecnologia, Engenharia Bioté- mica, São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 1975. V.3, pp.112-134. IN: DUNN, G.M. Nutritional Requirements of Microorganisms. IN: MOO-YOUNG, M. (ed), Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.1, pp.113-126.
- 069 | DUPAS, G. Frutos do atraso. ISTO É, São Paulo, nº 596:273-274, 25/05/88.
- 070 | EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA (Centro Nacional de Pesquisa de Trigo). Recomendações técnicas para a cultura do trigo, Passo Fundo, Sd, 22p.
- 071 | ESENER, A.A.; ROELS, J.A. & KOSSEN, N.W. Theory and Application of Unstructured Growth Models: Kinetic and Energetic Aspects. Biotechnol. Bioeng., New York, 25(12):2803-2841.
- 072 | ESKEW, D.C.; FOCHT, D.D. & TING, I.P. Nitrogen fixation, denitrification and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. Appl. Environ. Microbiol.
- 073 | FIECHER, A. Batch and Continuous Culture of Microbial Plant and Animal Cells. IN: REHM, H.J. & REED, G. (eds). Biotechnology, Verlag Chemie, Weinheim, 1981, V.1, pp.453-505.
- 074 | FORAGE, R.G.; HARRISON, D.E.F. & PITT, D.E. Effect of Environment on Microbial Activity. IN: MOO YOUNG, M. (ed.) Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.1, pp.251-280.

- STOUTHAMER, A.H. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. App. Microbiol. Bio-technol., Berlin, 24(2):106-112, 1987.
- 076 | FU, C. & KNOWLES, R. Oxygen tolerance of uptake hydrogenase in *Azospirillum* sp. Can. J. Microbiol., Ottawa, 32(12) : 897-900, 1986.
- 077 | GIORDANO, R.L.C. Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Amido: Inibição pelo Produto, São Paulo, EPUSP, 1987, 203p (Dissertação de Mestrado).
- 078 | GOEBEL, E.M. Carbohydrate Catabolism in *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum*. Phd Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg. Virginia, Aug. 1980, 162p.
- 079 | GOEBEL, E.M. & KRIEG, N. Fructose Catabolism in *Azospirillum brasiliense* and *Azospirillum lipoferum*. J. Bacteriol., Washington, 159(1):86-92, 1984.
- 080 | GOMA, G. Cultures Microbiennes - Agitation, Aeration Mesures, Toulouse, Laboratoire de Genie Biochimique, INSA, 1983, 33p (mimeo).
- 081 | GORDON, J.K. & MOORE, R.A. Ammonium and Methylammonium Transport by the Nitrogen-Fixing Bacterium *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., Washington, 148(2):435-442, 1981.
- 082 | GOTTSCHALK, G. Bacterial Metabolism, New York, Springer - Verlag, 1979. 265p.
- 083 | GROSZ, R.; STEPHANOPOULOS, G. & SAN, K.Y. Studies on On-Line Bioreactor Identification. III - Sensitivity Problems with Respiratory and Heat Evolution Measurements. Biotechnol. Bioeng., New York, 26(10):1198-1208, 1984.

- 084 | GURARD, B.M. & SNELL, E.F. Biochemical Factors in Growth .  
IN: Manual of Methods for General Bacteriology. Washington  
American Society of Microbiology, 1981, pp.113-142.
- 085 | GUPTA, K.D. & GHOSH, S. Identification of a Phosphoenolpy-  
ruvate: Fructose 1 - Phosphotransferase System in *Azospiri-*  
*illum brasiliense*. J. Bacteriol., Washington, 160(3): 1204 -  
1206, 1984.
- 086 | HALDENWANG, L. & BEHRENS, U. Influence of Phosphate Concen-  
tration on the Respiratory Activity of *Azotobacter vine-*  
*landii*. Zeit. Allgem. Mikrob., 23(8):491-494, 1983.
- 087 | HARDY, R.W.F. Nitrogen Fixation and Crop Productivity. IN:  
RECHIGL JR. M. (ed). CRC Handbook of Agricultural Produc-  
tivity, V.1 - Plant Productivity. Boca Raton, (FL) CRC  
Press, 1982, pp.103-116.
- 088 | HARTMANN, A. & BURRIS, R.H. Regulation of Nitrogenase Ac-  
tivity by Oxygen in *Azospirillum brasiliense* and *Azospiri-*  
*illum lipoferum*. J. Bacteriol., Washington, 169(3):944-948  
1987.
- 089 | HARTMANN, A.; FU, H. & BURRIS, R.H. Regulation of Nitro-  
genase Activity by Ammonium Chloride in *Azospirillum* sp .  
J. Bacteriol., Washington, 165(3):864-870, 1986.
- 090 | HARTMANN, A. & KLEINER, D. Ammonium (methylammonium) trans-  
port by *Azospirillum* spp. FEMS Microbiol. Lett., Amster-  
dam, 15(1):65-67, 1982.
- 091 | HEIJNEN, J.J. & RIET, K. Vant'. Mass Transfer, Mixing and  
Heat Transfer Phenomena in Low Viscosity Bubble Column  
Reactors. Chem. Eng. J., Amsterdam, 28:1321-1342, 1984.
- 092 | HEGAZI, N.A. Survival of *Azospirillum* spp in Various Sub-  
strates used as Bacterial Carriers. IN: International  
Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, 4, Rio de



- 093 | HELLER, K.B.; LIN, E.C.C. & WILSON, T.H. Substrate Specificity and Transport Properties of the Glycerol Facilitator of *E. coli*. J. Bacteriol., Washington, 144(1):274-278, 1980.
- 094 | HIRSCHFELD, H. Viabilidade Técnico-Econômica de Empreendimentos, São Paulo, Atlas, 1987, 211p.
- 095 | HUNTER, I.S. Nutrient Uptake and Assimilation. IN: MOO-YOUNG, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.1, pp.141-158.
- 096 | HUREK, T.; REINHOLD, B. & NIEMANN, E. Effect of Oxygen on  $\text{NH}_4^+$ -Grown Continuous Culture of *Azospirillum* spp and Diazotrophic Rods Closely Associated with Kallar Grass - Can. J. Microbiol., Ottawa, 33(10):919-922, 1987.
- 097 | HUREK, T.; REINHOLD, B.; NIEMANN, E.G.; FENDRIK, I.  $\text{N}_2$ -Dependent growth of *Azospirillum* spp in batch cultures at low concentrations of oxygen. IN: KINGMULLER, W. (ed) - *Azospirillum* III - Genetics, Physiology, Ecology. Bayreuth W. Germany, 1987.
- 098 | INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - Determinação de glicérol por oxidação por período de sôdio. São Paulo, 1985, 4p. (Documento Interno DQEQ/AB-01.01)
- 099 | JONES, C.W. Bacterial Respiration. IN: MOO-YOUNG, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.1, pp.507-520.
- 100 | KAFAROV, V.V.; VINAROV, A.Y. & GORDEEV, L.S. Modeling of bioreactors. Intern. Chem. Eng., New York, 27(4):615-641, 1987.
- 101 | KAFAROV, V.V.; VINAROV, A.Y. & GORDEEV, L.S. Modeling of bioreactors. Intern. Chem. Eng., New York, em publicação.

- 102 | KARGI, F. & MOO-YOUNG, M. Transport Phenomena in Bio processes. IN: MOO-YOUNG, M. (ed.). Comprehensive Biotechnology Oxford, Pergamon Press, 1985, V.2, pp.5-56.
- 103 | KLIENER, D. Ammonium Uptake by Nitrogen Fixing Bacteria. I Azobacter vinelandii. Arch. Microbiol., Amsterdam, 104:163 -169, 1975.
- 104 | KLOSS, M.; IWANNEK, K.H. & FENDRIK, I. Physiological Properties of *Azospirillum brasilense* sp 7 in a Malate Limited Chemostat. J. Gen. App. Microbiol., 29:447-457, 1983.
- 105 | KOCH, A.L. Growth Measurements. IN: Manual of Methods for General Bacteriology. Washington American Soc. for Microbiology, 1981, pp.179-207.
- 106 | KOMPALA, D.S.; RAMKRISHNA, D. & TSAO, G.T. Cybernetic Modeling of Microbial Growth on Multiple Substrates. Biotechnol. Bioeng., New York, 26(11):1272-1281, 1984.
- 107 | KOTLER, P. Marketing, São Paulo, Atlas, 1980, 596p.
- 108 | KRIEG, N.R. Enrichment and Isolation. IN: Manual of Methods for General Bacteriology. Washington. American Society of Microbiology, 1981, pp.113-142.
- 109 | KRIEG, N.R. & HOFFMAN, R.S. Microaerophilily and Oxygen Toxicity. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto (Ca), 40:107-130, 1986.
- 110 | TALANDE, R. & KNOWLES, R. Cytochrome Content in *Azospirillum brasilense* sp 7 Grown Under Aerobic and Denitrifying Conditions. Can. J. Microbiol., Ottawa, 33:151-156, 1987.
- 111 | LAMANNA, C.; MALLETT, M.F. & ZIMMERMAN, L.N. Basic Bacteriology : Its Biological and Chemical Background, Williams & Wilkins, 4ed, 1973.
- 112 | LEE, Y.H. & LUK, S. Aeration. Ann. Rep. Ferment. Proc., New York, 6:101-145, 1983.

113 | LEHNINGER, A. Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier Ed., 1976.

114 | LIN, E.C.C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto (Ca), 30:535-78 1976.

115 | LINEK, V.; VACEK, V. & BENES, P. A critical Review and Experimental Verification of the correct use of the Dynamic Method for the Determination of Oxygen Transfer in Aerated Agitated Vessels to Water Electrolyte Solutions and Viscous Liquids. Chem. Eng. J., Amsterdam, 34(1):11-34, 1987.

116 | LOH, W.H.T.; RANGLES, C.I.; SHARP, W.R. & MILLER, R.H. Intermediate Carbon Metabolism of *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol., Washington, 158(1):264-268, 1984.

117 | LOPES, L.S. & GIARDINI, A.R. Sobrevida de *Rhizobium japonicum* em turfa esterilizada com raios gama. Bragantia, Campinas, 39:205-209, 1980.

118 | LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R. J. Measurements with the Folinphenol Reagent. J. Biol. Chem. 193(1):265-275, 1951.

119 | MACEDO, G.R. Influência do pH e da temperatura na produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 337. São Paulo, EPUSP, 1982, 111p. (Dissertação de Mestrado).

120 | MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Economic Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Processes. Bio-technol. Bioeng., New York, 26(9):1003-1025, 1984.

121 | MARGUARDT, D.W. An algorithm for least-squares estimation of non linear parameters. J. Soc. Indust. App. Math., 11 (2):431-441, 1963.

122 | MARTINEZ-DRETS, G.; GALLO, M.D.; BURPEE, C. & BURKIS, R. H. Catabolism of Carbohydrates and Organic Acids and Expression

- of Nitrogenase by *Azospirillum*. J. Bacteriol., Washington 159(1):80-85, 1984.
- 123 | MCMEEKIN, T.A.; CHANDLER, R.E.; DOE, P.E.; GARLAND, C. D. ;  
OLLEY, J.; PUTROS, S. & RATROWSKY, D.A. Model for Combined  
Effect of Temperature and Salt Concentration/Water Activity  
on the Growth Rate of *Staphylococcus xylosum*. J. Appl.  
Bacteriol., Oxford, 62:543-550, 1987.
- 124 | MEYER, H.; KAPPELI, O. & FIECHTER, A. Growth Control in  
Microbial Cultures. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto (Ca),  
39:299-319, 1985.
- 125 | MOHR, P.W. & KRAWIEC, S. Temperature Characteristics and  
Arrhenius Plots for Nominal Psychrophiles, Mesophiles and  
Thermophiles. J. Gen. Microbiol., London, 121:311-317,  
1980.
- 126 | MOREIRA FILHO, C.A. & SILVA, M.E. A avaliação dos impactos  
econômicos. Rev. Brs. Technol., Brasília, 19(2):29-34, 1987.
- 127 | MOSER, A. Imperfectly Mixed Bioreactor Systems. IN: MOO-  
YOUNG, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Per-  
gamon Press, 1985, V.2, pp.77-98.
- 128 | MUDAHAR, M.S. & HIGNETT, T.P. Energy Efficiency in Nitrogen  
Fertilizer Production. Energy Agricul., Amsterdam, 4,(2):  
159-177, 1985.
- 129 | MUKHERJEE, A. & GHOSH, S. Regulation of Fructose Uptake and  
Catabolism by Succinate in *Azospirillum brasilense*. J.  
Bacteriol., Washington, 169(9):4361-4367, 1987.
- 130 | NAGAI, S. Mass and Energy Balance for Microbial Growth Ki-  
netics. Adv. Biochem. Eng., Berlin, 11:49-83, 1979.
- 131 | NASCIMENTO, G.G.F. & TAAVARES, F.C.A. Ocorrência de plasmí-  
dios em linhagens bacterianas fixadoras assimbióticas de  
nitrogênio. Rev. Microbiol., S. Paulo, 18(4):344-348, out/  
dez 1987.

- 132 | NAVARRO, J.M. & DURAND, G. Fermentation Alcoolique. *Influenc*  
 ce de la temperatura sur l'accumulation d'alcool dans les  
 cellules de levure. *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur) Paris  
 129B(2):215-221, 1978.
- 133 | NELSON, L.M. & KNOWLES, R. Effect of oxygen and nitrate on  
 nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum bra-*  
*siliense* grown in continuous culture. *Can. J. Microbiol.*,  
 Ottawa, 24(11):1395-1403, 1978.
- 134 | NIENOW, A.W.; KONNO, M. & BUJALSKI, W. Studies on three-  
 phase mixing - a review and recent results. *Chem. Eng. Res.*  
 Des., 64(1):35-42, 1986.
- 135 | NUR, I.; STEINITZ, Y.L.; OKON, Y. & HENIS, Y. Carotenoid  
 composition and function an nitrogen - fixing bacteria of  
 the genus *Azospirillum*. *J. Gen. Microbiol.*, London, 122  
 (1):27-32, 1981.
- 136 | NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. Effect of Dissolved Oxygen  
 Tension on Production of Carotenoids, Poly- $\beta$ -hydroxybutira  
 te, Succinate-Oxidase and Superoxide Dismutase by *A. brasl-*  
*lense* Cd Grown in Continuous Culture. *J. Gen. Microbiol.*,
- London, 128(12):2937-2943, 1982.
- 137 | NUR, I.; OKON, Y. & HENIS, Y. The role of oxygen concentra-  
 tion in the synthesis of carotenoids, poly- $\beta$ -hydroxybutira  
 te and succinate oxidase in continuous culture of *Azospiri-*  
*illum*. *Israel J. Bot.*, Jerusalem, 31:221-227, 1982.
- 138 | NYNS, E.-J. Biomethanation Process. IN: RHM, H.-J. *Bio-*  
*technology*, Weinheim, Verlag-Chemie, 1981-1987, V.8, pp.  
 207-268.
- 139 | OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agricul-  
 ture. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, 3(9):223-228, 1985.

- 140 | OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. Factors Affecting Growth and Nitrogen Fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol., Washington, 127(3):1248-1254, 1976.
- 141 | OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. Carbon and Ammonia Metabolism of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol., Washington, 128(2):592-597, 1976.
- 142 | OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in Association with Plants. Appl. Environ. Microbiol. Washington, 33(1):85-88, 1977.
- 143 | OKON, Y.; FALIK, E.; HADAS, R.; SARIG, S. YAHALOM, E. & TAL, S. Morphology and Physiology of Roots Inoculated with *Azospirillum*. IN: International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, Rio de Janeiro, aug. 1987. ABSTRACT, p.84.
- 144 | OKON, Y.; HOUGHINS, J.P.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. - Growth of *Spirillum lipoferum* at Constant Partial Pressures of Oxygen and the Properties of its Nitrogenase in Cell-Free Extracts. J. Gen. Microbiol., London, 98(2):87-93, 1977.
- 145 | OKON, Y.; NUR, I. & HENNIS, Y. Effect of oxygen concentration on electron components and microaerobic properties of *A. brasilense*. IN: KINGMULLER, W. (ed). Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology. Birkhauser, Basel, 1983. pp.115-126.
- 146 | OLDSHUE, J.Y. Mixing in Fermentation Processes. Ann. Rep. Ferment. Proc., New York, 6:75-99, 1983.
- 147 | PAYNE, W.J. Energy Yields and Growth of Heterotrophs. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto (Ca), 24:17-52, 1970.

- 148 | PEDROSA, F.O.; STEPHAN, M.; DOBEREINER, J. & YATES, M.G. Hy-  
drogen Uptake Hydrogenase Activity in Nitrogen Fixing  
*Azospirillum brasilense*. J. Gen. Microbiol., London, 128  
(1):161-167, 1982.
- 149 | PEDROSA, F.O. & YATES, M.G. Effect of chelating agents and  
nickel ions on hydrogenase activity in *Azospirillum brasili-  
ense*, *A. lipoferrum* and *Derxia gummosa*. FEMS Microbiol.  
Lett., Amsterdam, 17:101-106, 1983.
- 150 | PEPPLER, H.J. Yeast Extracts. IN: ROSE, A.H. (ed). Eco-  
nomic Microbiology, London, Academic Press, 1982, V.7  
pp.293-312.
- 151 | PERRY, R.H. & GREEN, D. Perry's Chemical Engineer Handbook,  
New York, 6 ed., McGraw-Hill, 1984.
- 152 | PETER, M.S. & TIMMERHAUS, K.D. Plant Design and Economics  
for Chemical Engineers, 3 ed, Tokyo, McGraw-Hill, 1980.
- 153 | PIRT, S.J. Principles of Microbe and Cell Cultivation, Ox-  
ford, Blackwell, 1975, 274p.
- 154 | POST, E.; KLEINER, D. & OELZE, J. Whole Cell Respiration  
and nitrogenase activities in *Azobacter vinelandii* growing  
in oxygen controlled continuous culture. Arch. Microbiol.,  
Amsterdam, 134:68-72, 1983.
- 155 | POSTMA, P.W. & LENGELER, J.W. Phosphoenolpyruvate: carbo-  
hydrate phosphotransferase system of bacteria. Microbiol.  
Rev., 49:232-269, 1985.
- 156 | RAMKRISHNA, D.; KOMPALA, D.S. & TSAO, G.T. Are Microbes Op-  
timal Strategists? Biotechnol. Progress, New York, 3(3):  
121-126, 1987.
- 157 | RATKOWSKY, D.A.; LOWRY, R.K.; McMEKIN, T.A.; STOKES, A.N. &  
CHANDLER, R.E. Model for bacterial growth rate through-  
out the entire biokinetic temperature range. J. Bacteriol.

Washington, 154(3):1222-1226, 1983.

158 | RATKOWSKY, D.A.; OLLEY, J.; MCMEEKIN, T.A. & BALL, A. Relation Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. J. Bacteriol., Washington, 149(1):1-5, 1982.

159 | Ratledge, C. Fermentation Substrates. IN: Ann. Rep. Ferm. Process., New York, 1:49-71, 1978.

160 | RATTI, S.; CURTI, B.; ZANNETTI, G. & GALLI, E. Purification and Characterization of Glutamate Synthase from *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol., Washington, 163(2):724-729, 1985.

161 | RICHEY, D.P. & LIN, E.C.C. Importance of Facilitated Diffusion for Effective Utilization of Glycerol by *E. coli*. J. Bacteriol., Washington, 112(2):784-790, nov. 1972.

162 | RIET, K. Vant'. Mass Transfer in Fermentations. Trends Biotechnology, Amsterdam, 1(4):113-120, 1983.

163 | ROBSON, R.L. & POSTGATE, J.R. Oxygen and Hydrogen in Biological Nitrogen Fixation. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto (Ca), 34:183-207, 1980.

164 | ROELS, J.A. Energetics and Kinetics in Biotechnology, Amsterdam, Elsevier, 1983.

165 | ROUGHLEY, R.J. The Preparation and Use of Legume Seed Inoculants. Plant and Soil, Hague, 32:675-701, 1970.

166 | RUCH, F.E.; LENGELER, J. & LIN, E.C.C. Regulation of Glycerol Catabolism in *Klebsiella aerogenes*. J. Bacteriol., Washington, 119(1):50-56, 1974.

167 | SADASIVAN, T. & NEYRA, C.A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and Cyst Formation. J. Bacteriol., Washington, 163(2):716-723, 1985.



- 1973, 166p.
- | 177 | SISTROM, W.R. A vida dos micróbios, São Paulo, Pioneira, 489p.
- | 176 | SCRIBAN, R. (coord.). Biologia, São Paulo, Manole, 1985
- Chem. Eng., New York, 26(2):217-230, 1986.
- the Design and Operation of Bioreactors. Part II. Intern.
- | 175 | SCHUGERL, K. Reaction Engineering Fundamentals Relating to
- Chem. Eng., New York, 26(2):204-216, 1986.
- the Design and Operation of Bioreactors. Part I. Intern.
- | 174 | SCHUGERL, K. Reaction Engineering Fundamentals Relating to
- ford, Pergamon Press, 1985, V.2, pp.99-118.
- IN: MOO-YOUNG, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Ox-
- | 173 | SCHUGERL, K. Nonmechanically Agitated Bioreactor Systems.
- Washington, 151(2):971-975, 1982.
- Nitrogen Catabolic Enzymes in *Bacillus* sp. J. Bacteriol.,
- | 172 | SCHREIER, H.J.; SMITH, T.M. & BERKLOHR, R.W. Regulation of
- Ind. Alim., Bruxelas, 33(2):44-47, 1975.
- brane filtrante dans le dosage de protines. Revue Ferm.
- tion empirique pour la correction d'interference de la mem
- | 171 | SCHMIDT, W.; DIAS, J.M.C.S. & LOVIZZARO, C.F.V. Une equa-
- cultura. Fertilizantes, São Paulo, 8(1):10-13, 1986.
- bilidade econômica da produção de inoculantes para a agrí-
- | 170 | SCHALCH NETO, J.A. & BARRAL, M.F. Estudo preliminar da via-
- 1209-1218, 1984.
- Product Estimation. Biotechnol. Bioeng., New York, 26(10)
- Identification. IV - Utilization of pH Measurements for
- | 169 | SAN, K.Y. & STEPHANOPOULOS, G. Studies on On-Line Bioreactor
- Biotechnol. Bioeng., New York, 26(10):1189-1197, 1984.
- Identification. II - Numerical and Experimental Results.
- | 168 | SAN, K.Y. & STEPHANOPOULOS, G. Studies on On-Line Bioreactor

- 178 | SOBOKTA, M.; PROKOP, A.; DUNN, I.J. & EINSELE, A. Review of Methods for the Measurement of Oxygen Transfer in Microbial Systems. Ann. Rep. Ferment. Proc., New York, 5:127-210, 1982.
- 179 | SPIEGEL, M.S. Estadística, São Paulo, McGraw-Hill, 1972. pp. 401-445.
- 180 | STANBURY, P.F. & WHITAKER, A. Principles of Fermentation Technology, Oxford, Pergamon Press, 1984.
- 181 | STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. New York, American Public Health Society, 30th ed, 874p, 1971.
- 182 | STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L. & PAINTER, P.R. The Microbial World. 5th ed., New Jersey, Prentice-Hall, 1986. 689p.
- 183 | STEPHANOPOULOS, G. & SAN, K.Y. Studies on On-Line Bioreactor Identification. I. Theory. Biotechnol. Bioeng., New York 26(10):1176-1188, 1984.
- 184 | STOUT, B.A. Energía para Agricultura Mundial, Roma, FAO/ONU, 1980, 303p.
- 185 | STOUTHAMER, A.H. Energetic Aspects of the Growth of Microorganisms. IN: HADDOCK, B.A. & HAMILTON, W.A. (eds). Microbial Energetics, Cambridge, Soc. Gen. Microbiol., 1977, pp. 285-315.
- 186 | STOUTHAMER, A.H. Theoretical calculations on the influence of the inorganic nitrogen source on parameters for aerobic growth of microorganisms. J. Microbiol. and Serology, Wageningen, 43(3/4):351-367, 1977.
- 187 | STOUTHAMER, A.H. Energy - Yielding Pathways. IN: The Bac-teria. New York, Academic Press, 1978, V.6, p.389-462.

- 188 | STOUTHAMER, A.H. & VERSEVELD, H.W. Stoichiometry of Microbial Growth. IN: MOO-YOUNG, M. (ed). Comprehensive Biotechnology, Oxford, Pergamon Press, 1985, V.1, pp. 215-238.
- 189 | SWARTZ, R.W. The Use of Economic Analysis of Penicillin Manufacturing Costs in Establishing Priorities for Fermentation Process Improvement. Ann. Rep. Ferment. Proc., New York, 3:74-110, 1979.
- 190 | TAGUCHI, H. & HUMPHREY, A.E. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. J. Ferm. Technol., Tokyo, 12(12):881-889, 1966.
- 191 | TAL, S. & OKON, Y. Production of the Reserve Material Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Microbiol., Ottawa, 31(7):608-613, 1985.
- 192 | TARRAND, J.J.; KRIEG, N. & DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoternum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoternum* (beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol., Ottawa, 24(8):967-980, 1978.
- 193 | TECHNICON AUTO-ANALYSER II. Industrial Method, nº 285 Technicon Industrial Systems. Tarry town (N.Y.), 1973. 73p.
- 194 | TERRON, L.R. Conceitos Fundamentais da Agitação de Líquidos. Rev. Bras. Eng. Quím., São Paulo, 8(4):5-29, 1986.
- 195 | THOMPSON, J.A. Production and Quality Control of Legume Inoculants. IN: BERGERSEN, F.J. (ed). Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation, Chichester, John Wiley 1980, pp.489-533.
- 196 | TIBELIUS, K.H. & KNOWLES, R. Effect of Hydrogen and Oxygen on Uptake Hydrogenase Activity in Nitrogen Fixing and Am-

- monium Grown *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol.,  
 Ottawa, 29(9):1119-1125, 1983.
- |197| TILAK, K.V.B.R.; LAKSHMI-KUMARI, M. & NAUTYAL, C.S. Current  
 Science, 48(9):41-42, 1979.
- |198| TSAI, J.C.; ALDEGBAMI, S.L. & VILA, G.R. Phosphate limited  
 culture of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol., Wash-  
 ington, 139(2):639-645, 1979.
- |199| TYLER, B. Regulation of the Assimilation of Nitrogen Com-  
 pounds. Ann. Rev. Bioch. Palo Alto (Ca), 47:127-162, 1978.
- |200| VOLESKY, B.; LUONG, H.T. & THAMBIMUTHU, K.V. The Application  
 of Dynamic Calorimetry to Natural Gas Fermentation. Can.  
J. Chem. Engineer., Ottawa, 56(4):526-529, 1978.
- |201| VOLPON, A.G.T.; DE-POLLI, H. & DOBERREINER, J. Physiology of  
 Nitrogen Fixation in *Azospirillum lipoferum* Br 17 (ATCC  
 29709). Arch. Microbiol., Amsterdam, 128:371-375, 1981.
- |202| VOSE, P.B. Developments in nonlegume  $N_2$  - fixing systems .  
Can. J. Microbiol., Ottawa, 29(8):837-850, 1983.
- |203| YAMANE, T. Statistics - An Introductory Analysis, New York,  
 Harper, 2nd ed., 1967, 919p.
- |204| YAMANE, T. & SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in Microbial  
 Processes. Adv. Bioch. Eng., Berlin, 30:148-194, 1984.
- |205| YOSHIDA, F. Aeration and Mixing in Fermentation. Ann. Rep.  
Ferm. Proc., New York, 5:1-34, 1982.
- |206| WANG, D.J.C.; COONEY, C.L.; DEMAIN, A.L.; DUNNILL, P.; HUM-  
 PHREY, A.E. & LILLY, M.E. Fermentation and Enzyme Tech-  
nology, New York, John Wiley, 1979, 374p.
- |207| WESTBY, C.A.; CUSTHALL, D.S. & VIGIL, G.V. Metabolism of  
 Various Carbon Sources by *Azospirillum brasilense*. J.  
Bacteriol., Washington, 156(3):1369-1372, 1983.

- R.23
- |208| WESTBY, C.A.; ENDERLIN, C.S.; STEINBERG, N.A.; JOSEPH, C.M.  
& MECKS, J.C. Assimilation of  $^{13}\text{NH}_4^+$  by *Azospirillum bra*  
*siliense* grown under nitrogen limitation and excess. J.  
Bacteriol., Washington, 169(9):4211-4214, 1987.
- |209| WILLIAMS, F.M. A Model of Cell Growth Dynamics. J.Theoret.  
Biol., London, 15:190-205, 1967.
- |210| ZLOKARNIK, M. Sorption Characteristics for Gas-Liquid Con-  
tacting in Mixing Vessels. Adv. Bioch. Eng., Berlin, 8:  
133-151, 1978.