

**Bacillus stearothermophilus 11d-15: ANÁLISE DO METABOLISMO E DAS
CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS E ADEQUAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO EM
QUIMIOSTATO USANDO MEIO DEFINIDO À BASE DE SACAROSE E XILOSE**

GILDO ALMEIDA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

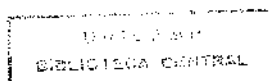
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Gildo Almeida da Silva
Aldo Focesi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

29/01/93

C A M P I N A S

Estado de São Paulo - Brasil

janeiro, 1993



A meus pais e irmãos

A Angela, Adriana e Erik

DEDICO

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Professor Dr. Aldo Focesi Júnior, pela segura orientação e apoio na execução deste trabalho e contribuição para a minha formação científica;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA);

À Universidade Estadual de Campinas, de modo particular ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, pela oportunidade que foi dada para conclusão deste trabalho;

Ao Professor Brian S. Hartley, pela orientação da parte experimental realizada no Centre for Biotechnology do Imperial College of Science Technology and Medicine (Londres);

À Chefia do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNPUV);

Aos Colegas do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, de modo especial à Dra. Loiva Maria de Mello Freire e ao Dr. Jorge Tonietto, pelo inestimável apoio e estímulo dispensados;

Aos amigos Gustav e Daisy Westhoff e Dra. Dionea Meinhardt pelo apoio e incentivo;

Às Funcionárias da EMBRAPA/CNPUV. Márcia Rita Saim Perozzo, Maria Luíza Beltrami, Maria Antonieta Luvison, Nêmore Gazzola Turchet, Jaqueline Maria Pompermayer Zeni, Rosane Rigon de Quevedo e Beatriz Maria Fontanive Confortin pela execução dos serviços de datilografia e ao Eng. civil Dr. Jorge Luiz Cenci pelos desenhos gráficos efetuados.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- [A] - concentração de xilose (mM)
- AC - concentração de ácido acético observado (mM)
- AC' - concentração de ácido acético esperado (mM)
- AcDH - acetaldeído desidrogenase
- AcK - acetato quinase
- ADH - álcool desidrogenase
- A_{1pi} - área do padrão interno na solução padrão
- A_{1p} - área do produto na solução padrão
- A_{2pi} - área do padrão interno na amostra
- A_{2p} - área do produto na amostra
- [B] - concentração dos agentes que reagem com a xilose (mM)
- C_p - concentração do produto na amostra
- D - vazão específica ou taxa de diluição (h^{-1})
- D_c - taxa de diluição crítica (h^{-1})
- d_c - taxa de decaimento (h^{-1})
- D_M - valor de D no qual a produção de células é máxima (h^{-1})
- E - energia de ativação ($kJ\ mol^{-1}$)
- EDTA - ácido etileno-diamino-tetra-acético
- EMP - via Embden-Meyerhof-Parnas
- ET - etanol (mM)
- F - vazão de alimentação do meio ($l.h^{-1}$)
- F1,6BP - frutose-1,6-difosfato
- FAD - flavina-adenina-dinucleotídeo
- FDH - formato desidrogenase
- FDH_M - formato desidrogenase de membrana
- FDH_S - formato desidrogenase solúvel
- FR - fumarato redutase

- F_o - concentração de ácido fórmico observado (mM)
 F_o' - concentração de ácido fórmico esperado (mM)
 H^+ - representa o ânio hidrido, ou seja, um próton com um par de elétron que está envolvido na redução do NAD ou NADP
 j_L - taxa específica de lise (h^{-1})
 j_M - taxa específica de morte celular sem lise (h^{-1})
 k - taxa constante de reação
 K_0 - fator pré-exponencial
 K_d - taxa específica de morte (h^{-1})
 K_m - constante de Michaelis (M)
 K_s - constante de saturação de substrato (M)
 K_y - taxa de diluição necessária para se atingir $1/2 Y_{MAX}$ ou taxa específica de manutenção (h^{-1})
LDH - lactato desidrogenase
 m - coeficiente de manutenção ($mmol_s(g_x.h)^{-1}$)
MDH - malato desidrogenase
NAD - nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADP - fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
 θ_g - tempo de geração (min.)
 p - concentração de produto no reator (mM)
PCK - fosfoenolpirúvico carboxiquinase
PDC - piruvato descarboxilase
PDH - piruvato desidrogenase
PFL - piruvato formato liase
PFL_M - via da piruvato formato liase modificada
 p_i - produto inibidor
PS - peso seco ($g.l^{-1}$)
PTA - fosfato transacetilase
 P_{1pi} - concentração do padrão interno no padrão

P_{1p} - concentração do produto na solução padrão

P_{2pi} - concentração do padrão interno na amostra

q_{ET} - taxa específica de formação de etanol ($\text{mmol}_p(\text{g}_x.\text{h})^{-1}$)

Q_{ET} - taxa volumétrica de formação de etanol ($\text{mmol}_p(\text{l.h})^{-1}$)

q_p - taxa específica de formação de produto ($\text{mmol}_p(\text{g}_x.\text{h})^{-1}$)

Q_p - taxa volumétrica de formação de produto ($\text{mmol}_p(\text{l.h})^{-1}$)

q_s - coeficiente metabólico ou taxa específica de consumo de substrato ($\text{mmol}_s(\text{g}_x.\text{h})^{-1}$)

Q_s - taxa volumétrica de consumo de substrato ($\text{mmol}_s(\text{l.h})^{-1}$)

Q_{SC} - consumo de substrato para crescimento ($\text{mmol}_s(\text{l.h})^{-1}$)

Q_{SM} - consumo de substrato para manutenção ($\text{mmol}_s(\text{l.h})^{-1}$)

R - constante dos gases ($8,31 \text{ J K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)

r^2 - coeficiente de determinação

$r_{M-AC/ET}$ - relação molar entre o ácido acético e o etanol

$r_{M-Fo/AC}$ - relação molar entre o ácido fórmico e o ácido acético

$r_{MAC}|_{ET}$ - relação molar entre o ácido acético observado (AC) e o esperado (AC'), com base no etanol

$r_{mFo}|_{AC}$ - relação molar entre o ácido fórmico observado (Fo) e o esperado (Fo'), com base no ácido acético

$r_{mFo}|_{ET}$ - relação molar entre o ácido fórmico observado (Fo) e o esperado (Fo'), com base no etanol

s - concentração de substrato limitante no reator (mM)

$\tilde{s}$ - teor de substrato limitante no regime estacionário (mM)

s_0 - teor de substrato limitante do reservatório (mM)

s_c - substrato disponível para o crescimento (mM)

s_M - substrato disponível para a manutenção (mM)

s_p - substrato do "pool" intracelular (mM)

T - temperatura em graus Kelvin

t - tempo (h)

- TPP - pirofosfato de tiamina
 t_h - tempo de residência hidráulica (h)
 V - volume de trabalho (l)
 vvm - volume por volume de meio
 x - concentração celular no reator ($g.l^{-1}$)
 x_i - xilose
 $\bar{x}$ - concentração celular no regime estacionário ($g.l^{-1}$)
 x_d - concentração de células mortas ($g.l^{-1}$)
 x_{TOT} - concentração de células totais ($g.l^{-1}$)
 x_v - concentração de células viáveis ($g.l^{-1}$)
 Y_{ATP} - células produzidas por mol de ATP formado ($g_x.mol_{ATP}^{-1}$)
 $Y_{AC/SAC}$ - fator de conversão ácido acético/sacarose ($mol_{ET}.mol_{SAC}^{-1}$)
 Y_E - fator de conversão efetivo célula/substrato ($g_x.mol_{SO}^{-1}$)
 $Y_{ET/SAC}$ - fator de conversão etanol/sacarose ($mol_{ET}.mol_{SAC}^{-1}$)
 $Y_{ET/Xi}$ - fator de conversão etanol/xilose ($mol_p.mol_s^{-1}$)
 Y_M - fator de conversão relacionado com a manutenção ($g_x.mol_s^{-1}$)
 $Y_{P/S}$ - fator de conversão produto/substrato ($mol_p.mol_s^{-1}$)
 Y_{tp} - fator de conversão teórico produto/substrato ($g_p.mol_s^{-1}$)
 $Y_{X/SC}$ - fator de conversão verdadeiro célula/substrato ($g_x.mol_s^{-1}$)
 $Y_{X/S}$ - fator de conversão total célula/substrato ($g_x.mol_s^{-1}$)
 PK - piruvato quinase
 μ - taxa específica de crescimento (h^{-1})
 μ_{MAX} - taxa específica máxima de crescimento (h^{-1})

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	1
RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
Microrganismo.....	26
Preparo do Inóculo.....	26
Processos de Cultivo.....	27
Batelada.....	27
Contínuo.....	28
Medidas de Crescimento.....	28
Determinação de Açúcares.....	29
Determinação de Etanol.....	30
Determinação de Produtos Ácidos de Fermentação, O ₂ e CO ₂	30
Meios de Cultura.....	32
Modelos.....	33
RESULTADOS.....	34
1. Crescimento de <u>Bacillus stearothermophilus</u> 11d-15 e sobre a Formação de Produtos de Fermentação em Meio Complexo BSTCM-Xi.....	34
2. Crescimento de <u>Bacillus stearothermophilus</u> em Meio Definido, Tendo Sacarose como Fonte de Carbono e em Aerobiose.....	43
2.1. Transição de Aerobiose para Anaerobiose.....	46
2.2. Ação do CaCl ₂ sobre o Crescimento e Metabolismo Celular.....	49
2.2.1. Crescimento em Diferentes Valores de D em Meio com e sem Adição de CaCl ₂ ; Obtenção do Fator de Conversão Verdadeiro (Y _{x/sc}) e do Coeficiente de Manutenção (m).....	51
2.2.2. Atividade Metabólica Durante Processos de Transição.....	63

3.	Comportamento de <u>Bacillus stearothermophilus</u> em Meio Definido Tendo Xilose como Fonte de Carbono.....	66
3.1.	Crescimento em Diferentes Concentrações de Vitaminas Aliadas a Diferentes Teores de Macronutrientes.....	66
3.2.	Inibição do Crescimento em Meio Definido Tendo Xilose como Fonte de Carbono G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi.....	69
3.3.	Determinação dos Agentes Promotores da Reação Marrom Presentes no Meio G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi.....	72
3.4.	Recuperação do Crescimento e Estabilidade da bactéria em Meio G(1/2MICNa-1/2MACK)-Xi	74
3.5.	Participação de Aminoácidos e Vitaminas no Crescimento e na Formação de Produtos de Fermentação, em Cultura Contínua.....	80
3.5.1.	Condições Parcialmente Aeróbicas (0,1 vvm de ar). Regime Estacionário.....	80
3.5.2.	Transição das Condições Parcialmente Aeróbicas (0,1 vvm de ar) para Anaeróbicas.....	85
4.	Crescimento de <u>Bacillus stearothermophilus</u> lld-15 em Meio Contendo Hidrolisado de Palha, em Cultura Contínua e em Condições Parcialmente Aeróbicas	93
	DISCUSSÃO.....	94
	BIBLIOGRAFIA.....	142
	APÊNDICE A.....	162
	APÊNDICE B.....	163
	APÊNDICE C.....	165

ABSTRACT

Bacillus stearothermophilus is a facultatively anaerobic thermophilic microorganism capable of growing on several carbon sources. The ability of growing or producing ethanol on different substrates depends upon its enzymatic apparatus and cultural conditions. This research analyses the metabolism and the ability of the strain Bacillus stearothermophilus lld-15 of growing and producing ethanol anaerobically, in a complex medium with xylose as carbon source in continuous culture; examines the conditions for growth improvement of the microorganism grown on sucrose and xylose in completely defined medium in batch and in continuous culture; and determines the conditions to reduce the lag-phase for ethanol production as soon as the anaerobiosis is set up. In complex medium, the microorganism showed the best performance at pH 6,5. The Y_{ATP} (gram dry weight of microorganism per mol of ATP formed) depended on external pH values and changed from 4,6 to 10,8 $g_x \cdot mol_{ATP}^{-1}$. The molar ratio of 1:1:2 (ethanol:Acetic-acid:formic acid) expected from phosphoroclastic cleavage of pyruvic acid was not always obeyed, suggesting changes in the PFL pathway. The growth of Bacillus stearothermophilus on defined medium (BSTSM) having sucrose as carbon source was inhibited by precipitates formed during autoclaving process. The precipitation problem was solved when iron chloride concentration was reduced from 7,0 (BSTSM) to 1,0 $mg \cdot l^{-1}$ (medium G). In batch and with BSTSM medium, the maximum dry weight obtained was 0,308 $g_x \cdot l^{-1}$ with abrupt fall in cell concentration; in chemostat culture, the steady-state was not attained. In batch and with the medium G, the biomass concentration reached. 1.192 $g_x \cdot l^{-1}$, presenting the expected decelerating and stationary growth phases; in continuous culture, the microorganism showed a good growth stability and the steady-state was achieved. This striking difference is expected since the iron precipitates

interfere with vital cellular processes. The results attained with the medium G, made it available to study, in chemostat, the behaviour of the bacteria, in different conditions. The microorganism grown on medium G without CaCl_2 addition has shown to be extremely sensitive to the transition between fully (2 vvm air) or partially aerobic (0.1 vvm air) steady-state growth to anaerobic growth, presenting "anaerobic lysis" with a specific lysis rate (j_L) of 0.03 h^{-1} . j_L was dilution rate and initial aeration independent. Under partially aerobic conditions (0.1 vvm air) and in continuous culture, the bacteria showed high growth stability. The metabolic activity measured by CO_2 evolution during transition from partially aerobic steady-state growth to anaerobic steady-state growth has suggested the involvement of pyruvate dehydrogenase (PDH) and formate dehydrogenase (FDH) on pyruvate metabolism. At low dilution rate, the dry biomass concentration and the cellular yield coefficient have shown to be dilution rate dependent. The CaCl_2 addition to the medium G reduced the maintenance energy requirement to $1.428 \text{ mmol} \cdot (\text{g}_x \cdot \text{h})^{-1}$ in regard to $1.698 \text{ mmol} \cdot (\text{g}_x \cdot \text{h})^{-1}$ obtained without the above nutrient addition and with no difference between death rate (K_d). The K_d value, defined as a constant that is numerically equal to the dilution rate at which $Y_{X/S} = Y_{\text{MAX}}/2$, showed that CaCl_2 is used as activator. When the carbon source was changed to xylose, the medium composition had to be modified due to inhibition problems. Xylose and Na_2HPO_4 were identified as the main components of the medium that promote the non-enzymatic browning reaction at 70°C , which is responsible by this kind of inhibition. As KH_2PO_4 was used instead of Na_2HPO_4 , the inhibitor formation was no longer observed. The microorganism showed absolute requirement only for thiamine at 70°C and no growth factor was required at 65°C . The vitamins (biotin, thiamine pyrophosphate, pyridoxine, nicotinic acid, riboflavin and myo-

inositol) and amino acids (aspartic acid and glutamic acid) added to the medium did not affect the microorganism growth but they have stimulated the lactic acid production, separately. The vitamin and amino acid interaction has increased the ethanol production, ethanol yield and specific ethanol production and has decreased the lactic acid formation. The transition between steady-state partially aerobic growth to anaerobic conditions using medium with and without vitamins and amino acids has revealed that the former affects the ethanol production and the later reduces the impact of anaerobic conditions on the bacterial growth. An important aspect should be pointed out is that, with the improved defined medium (G₆₅-F)TPP⁻, the maximum viable counts of 10⁹ cell per ml was obtained and the microorganism started producing ethanol as soon as the anaerobiosis was established. The microorganism grew well in diluted wheat-straw hydrolysate chemostat culture when macronutrients of the medium (G₆₅-F)TPP⁻ were used, despite the browning colour of the medium indicates the presence of inhibitors. It was concluded that Bacillus stearothermophilus 11d-15 can be used for thermal xylose-rich industrial pollutant waste treatment. A defined medium, without growth factors, suitable for this obligate thermophile growth in partially aerobic conditions, and which allows the immediate ethanol production as soon as the anaerobiosis is set up, was developed. A detailed analysis of the PFL pathway led to an alternative metabolic pathway for ethanol and CO₂ production. It was also observed that this microorganism does not follow the quantitative theory of chemostat due to the existence of the maintenance energy requirement.

RESUMO

Bacillus stearothermophilus é uma bactéria termofílica anaeróbica facultativa capaz de crescer em diversas fontes de carbono. A capacidade de crescer e de produzir etanol em diferentes substratos depende de seu aparato enzimático e das condições de cultivo. O presente trabalho analisa, em sistema contínuo, o metabolismo e a capacidade de a linhagem Bacillus stearothermophilus lld-15 crescer e produzir etanol anaerobicamente, em meio complexo, tendo xilose como fonte de carbono; examina, em batelada e cultura contínua, as condições culturais para melhorar o crescimento do microrganismo em meio definido, tendo sacarose e xilose como fontes de carbono; e determina as condições para que o microrganismo inicie a formação de etanol, tão logo a anaerobiose seja estabelecida. Em meio complexo, o microrganismo apresentou um bom desempenho em pH 6,5. O Y_{ATP} se mostrou altamente dependente do pH externo, tendo variado de 4,6 a 10,8 $g_x \cdot mol_{ATP}^{-1}$. A razão molar 1:1:2 (etanol: ácido acético:ácido fórmico) esperada pela clivagem fosforoclástica do ácido pirúvico nem sempre foi obedecida, sugerindo alteração na via piruvato formato liase. Foi observada severa dificuldade de o microrganismo iniciar crescimento, indicando inadequação do meio de cultura e/ou formação de substâncias inibidoras. O crescimento da bactéria em meio definido (BSTSM), tendo sacarose como fonte de carbono, foi inibido por precipitados que se formaram durante a autoclavagem. A redução do teor de cloreto de ferro de 7,0 (meio BSTSM) para 1,0 $mg \cdot l^{-1}$ (meio G) eliminou esse problema. Com o meio BSTSM em batelada, o peso seco máximo alcançado foi de 0,308 $g \cdot l^{-1}$, não tendo sido observada a fase de desaceleração e ocorrendo uma queda abrupta na concentração celular; em cultura contínua, o regime estacionário não foi atingido. Com o meio G em batelada, conseguiu-se uma concentração celular de 1,192 $g \cdot l^{-1}$ e foram

detectadas as fases de desaceleração e estacionária; em cultura contínua, a bactéria mostrou um crescimento estável e foi alcançado o regime estacionário esperado. Essa acentuada resposta é previsível, pois precipitados de ferro interferem em processos vitais das células. Os resultados obtidos com o meio G possibilitaram estudos, em processo contínuo, do comportamento da bactéria em diferentes situações. O microrganismo manifestou extrema sensibilidade à transição das condições completa (2vvm) ou parcialmente aeróbicas (0,1 vvm) para anaeróbicas, apresentando "lise anaeróbica", com uma taxa específica de lise (j_l) de $0,03 \text{ h}^{-1}$. O j_l independeu da taxa de diluição e da aeração inicial. Em condições parcialmente aeróbicas (0,1 vvm de ar), a bactéria teve um crescimento altamente estável. A atividade metabólica medida através da evolução de CO_2 , durante a transição das condições aeróbicas para anaeróbicas, sugeriu haver o envolvimento da piruvato desidrogenase e da formato desidrogenase no metabolismo do piruvato. A concentração e o fator de conversão de células se mostraram dependentes da taxa de diluição quando baixas taxas foram empregadas. A adição de CaCl_2 ao meio G resultou numa redução da energia de manutenção para $1,428 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ em comparação com $1,698 \text{ mmol} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$ sem a adição do nutriente, enquanto que nenhuma alteração foi observada na taxa de morte (K_d). O valor de K_u , definido como sendo uma constante numericamente igual à taxa de diluição na qual $Y_{x/s} = Y_{\text{MAX}}/2$, indicou que o CaCl_2 agiu como ativador. Quando a fonte de carbono foi alterada para xilose, a composição química do meio teve que ser modificada devido a novos problemas de inibição. A xilose e o sal Na_2HPO_4 foram identificados como principais componentes do meio que formam, não enzimaticamente, uma reação marrom a 70°C , responsável pela inibição. A substituição do Na_2HPO_4 por KH_2PO_4 eliminou a formação do inibidor. A bactéria apresentou absoluto requerimento por tiamina a 70°C e nenhum fator

de crescimento foi requerido a 65 °C. As vitaminas (biotina, pirofosfato de tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina e mio-inositol) e os aminoácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) adicionados ao meio não afetaram o crescimento do microrganismo, mas estimularam, separadamente, a produção de ácido láctico. A interação vitamina-aminoácido aumentou a formação de etanol, o fator de conversão de etanol e a taxa específica desse produto e reduziu sensivelmente a produção de ácido láctico. A transição de culturas parcialmente aeróbicas em regime estacionário para condições anaeróbicas, usando meio com e sem vitaminas e aminoácidos, revelou que as vitaminas afetam a formação de etanol e que aminoácidos reduzem o impacto das condições anaeróbicas sobre a bactéria. Deve ser considerado, ainda, que, com o meio definido melhorado, a biomassa viável máxima atingida foi de 10^9 células.ml⁻¹ e que a bactéria iniciou a formação de etanol tão logo a anaerobiose foi estabelecida. Em cultura contínua, a bactéria revelou ter um bom crescimento e estabilidade em meio de hidrolisado de palha de trigo diluído, quando adicionados os macronutrientes do meio (G₆₅-F)TPP⁻, embora o hidrolisado tenha apresentado a coloração marrom característica da presença de inibidores. Concluiu-se que stearothermophilus lld-15 pode ser utilizado em processos térmicos de tratamento de resíduos industriais à base de xilose. Um meio definido, sem fatores de crescimento, adequado ao cultivo da bactéria, em condições parcialmente aeróbicas, e que permite a formação de etanol imediatamente após o estabelecimento da anaerobiose, foi proposto. Uma análise detalhada da via PFL levou à proposição de uma via metabólica alternativa para a formação de etanol e CO₂. Constatou-se, ainda, que, devido à energia de manutenção, a bactéria não obedece à teoria quantitativa do quimiostato.

INTRODUÇÃO

Antigos processos, como a produção de etanol a partir do material biológico por fermentação, têm se tornado hoje economicamente viáveis, graças ao aumento expressivo do preço do petróleo. A fermentação para formação de etanol se constitui numa alternativa para resolver problemas energéticos atuais e futuros. Entre nós, no Brasil, foi criado, em 1975, o Programa Nacional do Alcool - Pró-Alcool, com a finalidade de fornecer uma alternativa aos combustíveis líquidos à base de petróleo. No contexto mundial, o Pró-Alcool é, aliás, o único programa que atingiu projeções economicamente importantes (Leite, 1990).

A produção de etanol a partir de fontes biológicas se faz principalmente por ação metabólica de linhagens de Saccharomyces cerevisiae. Os principais problemas de fermentações realizadas por tais microrganismos são: i) aeração, pois necessitam de O_2 para síntese de material celular, e nestas condições o valor de $Y_{p/s}$ se reduz; ii) refrigeração de grandes volumes, uma vez que as temperaturas de fermentação podem atingir valores que comprometem a viabilidade celular e iii) limitação do espectro de substrato utilizado.

Muitos pesquisadores têm procurado manter o uso de leveduras no processo fermentativo, melhorando, não apenas seu aparato fisiológico, através de manipulação genética, mas também procurando associar técnicas que facilitem o emprego de determinados substratos na formação de etanol. Leveduras termotolerantes, quando incubadas em meio contendo celulase obtida de Trichoderma viride, são capazes, por exemplo, de converter celulose em etanol (Mccracken & Gong, 1982). Esse processo se mostra desvantajoso porque, além de dispendioso, pressupõe o emprego de enzimas celulolíticas para que a levedura atue.

Para obtenção de uma maior amplitude de substrato para a formação de etanol, são procuradas, além de linhagens produtivas, condições de cultivo e meio de cultura favoráveis ao crescimento e formação do produto. A xilose é o principal componente de hemicelulose que compreende de 30 a 40% da biomassa renovável. Por este motivo, esta pentose tem sido muito estudada no sentido de ser utilizada por microrganismos capazes de convertê-la em produtos economicamente viáveis. Se a xilose fosse prontamente assimilável por Saccharomyces cerevisiae, este seria o microrganismo ideal para a produção de etanol. Como essa levedura não consegue utilizar xilose como fonte de carbono, outras leveduras foram estudadas, tais como Candida shehatae, Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis (Delgenes, et al., 1986; Alexander et al., 1987), Kluyveromyces marxianus (Delgenes, et al., 1986), Candida tropicalis (Jeffries, 1982) e Pichia stipitis (Delgenes, et al., 1986; Alexander et al., 1987; Slininger et al., 1990; Ferrari et al., 1992) xilose em etanol. Uma linhagem de Candida lusitaniae se mostrou capaz de transformar, além de D-xilose, também D-celobiose em etanol (Maleszka et al., 1982).

Embora diferentes leveduras, meios e condições de cultivo, entre outros, tenham sido amplamente explorados, um processo ideal economicamente importante não se encontra disponível. A título de ilustrar as dificuldades encontradas daremos mais ênfase à levedura Pachysolen tannophilus cujo comportamento foi estudado numa mistura de açúcares (D-manose, D-xilose, D-glicose e D-galactose), simulando o complexo observado em licor sulfídrico. Nestas condições, a levedura atinge de 76 a 84% do fator de conversão teórico com a linhagem selvagem e de 83 a 90% com um mutante selecionado para crescer mais rápido em meio contendo D-galactose. A formação de ácido acético, xilitol e L-arabinitol causa uma significativa perda no fator de conversão nas duas linhagens (Neirinck et al., 1982). Os autores concluem que o microrganismo

possui capacidade de formar diversas hidrolases, produzir etanol e sobreviver em licor sulfídrico. A mistura de açúcares utilizada por Neirinck et al. (1982) corresponde a mais de 90% dos açúcares presentes nos polissacarídeos de muitas fontes vegetais. As hemiceluloses são heteropolímeros ramificados de D-xilose, D-manose, D-glicose, D-galactose, L-arabinose e ácidos D-glicorônicos que, se submetidas à hidrólise ácida moderada, podem ser quebradas em seus açúcares constituintes (Kabel et al., 1983). A capacidade de produção de etanol a partir dessas fontes de carbono depende do microrganismo e das condições de cultivo empregadas no sistema. A formação e acúmulo de produtos como xilitol e arabitol depende do valor de pH utilizado no processo fermentativo (Kabel et al., 1983). O nível de oxigênio do meio afeta não somente a massa e a morfologia das células, mas também a produção de etanol e formação de xilitol (Baillargeon et al., 1983).

O estudo do metabolismo dos microrganismos envolvidos nos processos fermentativos é de suma importância para a compreensão dos desvios observados nos parâmetros cinéticos. Xilose pode ser convertida a etanol por Pachysolen tannophilus, com formação de dióxido de carbono, ácido acético e grandes quantidades de xilitol. O acúmulo de xilitol no meio revela baixa atividade ou inibição da xilulose desidrogenase. A formação de ácido acético deve-se, provavelmente, à utilização do etanol pelo microrganismo, principalmente quando a concentração de xilose atinge valores muito baixos. Segundo Mütze & Wandrey (1983), quando a produção de etanol aumenta, a quantidade de carbono incorporado às células diminui, mas aumenta o carbono incorporado ao xilitol. Os acúmulos de ácido acético e de xilitol reduzem o valor de $Y_{p/s}$. O uso de etanol (Rychtera, 1979; Schneider et al., 1981; Maleszka & Schneider, 1982) e o acúmulo de xilitol (Neirinck et al., 1985) no meio representam, portanto os dois principais fatores que podem limitar

a produção de etanol por leveduras que utilizam xilose como fonte de energia e carbono. O Xilitol exerce uma menor inibição sobre os processos oxidativos que a xilose (Neirinck et al., 1985).

Para uso industrial, é importante investigar o comportamento de microrganismos diante de substratos naturais. Açúcares de hidrolisado de madeira podem ser fermentados, em batelada, por culturas não aeradas de Pachysolen tannophilus, em 36 horas, (Deverell, 1983). Fermentações, em grande escala, de hidrolisado de madeira foram realizadas com uma linhagem de Pichia stipitis obtendo-se valores $Y_{p/s}$ de 0,43 a 0,45 $g_p \cdot g_s^{-1}$, o que corresponde, aproximadamente, a 90% do valor teórico (Wayman et al., 1986). Segundo esses autores, o tipo de hidrólise empregado influencia o processo fermentativo. Quando a madeira foi submetida à pré-hidrólise com 2% de SO_2 , e vapor a 200 psig, a concentração de etanol foi de 55 $g_{ET} \cdot l^{-1}$, o que representa 7% por volume, um bom valor para se obter uma destilação economicamente viável. O teor teórico máximo de etanol possível de se obter, com base na composição da madeira, é de 478 $l \cdot t^{-1}$. Foi conseguido um fator de conversão de 372 $l \cdot t^{-1}$ de madeira, o que corresponde a 75% do valor teórico. No processo de auto-hidrólise foram obtidos apenas 273 $l \cdot t^{-1}$, correspondendo a 57% do valor teórico. Tal redução talvez se deva à formação de glicosídeos no processo de auto-hidrólise. Na ausência de pré-hidrólise, a maior fração desses açúcares está na forma de glicosídeos e se o metanol for o solvente utilizado, a maioria dos açúcares estará na forma de metil-glicosídeo (Feldman et al., 1988). O SO_2 adicionado no processo de pré-hidrólise não exerce efeito tóxico sobre o microrganismo (Wayman et al., 1986).

Existem microrganismos mais eficientes que outros quanto a sua capacidade de utilização de substrato. Uma competição entre a eficiência de Pachysolen tannophilus e Candida brassicae, em processos simultâneos de sacarificação e fermentação de material lignocelulósico, mostrou que o primeiro microrganismo foi sempre o

melhor tanto com o meio simulado como com o natural. Isto se deve ao fato de Candida brassicae utilizar preferencialmente glicose como fonte de carbono. A fonte vegetal de onde o material celulósico foi obtido, assim como o tratamento desse material interferem no desempenho do microrganismo na produção de etanol (Punnapayak & Emert, 1986).

Processos fermentativos têm sido estudados com a finalidade de melhorar o perfil dos microrganismos capazes de metabolizar a xilose. Em sistemas contínuos com reciclo de células, Pachysolen tannophilus chega a produzir $2,4 \text{ g}_{\text{ET}}(\text{l.h})^{-1}$. Com um $Y_{\text{p/s}}$ da ordem de $0,3 \text{ g}_\text{p}.\text{g}_\text{s}^{-1}$. Tanto o fator de conversão como a taxa volumétrica de formação de produto são influenciados pelo suprimento de oxigênio no meio (Chung et al., 1986). Os autores mostraram ainda que, embora o valor de Q_p seja substancialmente mais baixo, ou seja, $0,42 \text{ g}_\text{p}(\text{l.h})^{-1}$, a produção de etanol se processa mesmo em condições nas quais o crescimento celular se torna zero. Candida shehatae utiliza xilose para a produção de etanol com baixos valores de $Y_{\text{p/s}}$ (Preez & Van der Walt, 1983; Alexander et al., 1987).

Muitas variações sobre o tema foram utilizadas para resolver este problema. Células imobilizadas foram empregadas no estudo da transformação de xilose em etanol. Com células livres de Pichia stipitis, os níveis iniciais de pentose no meio afetaram pouco a produção de etanol, chegando a atingir, em 5 dias, 22 g.l^{-1} e, em 8 dias, 40 g.l^{-1} em meio contendo 5% a 10% de xilose, respectivamente. A concentração máxima de etanol (19,5%) foi obtida com células imobilizadas num bioreator contínuo de leito fixo, com uma concentração de xilose de 5% e com um t_h de 35 h. Os valores de Q_p foram marcadamente superiores aos obtidos com células livres (Linko et al., 1986). No processo simultâneo de isomerização e fermentação da xilose, foi observado, em batelada com células de Saccharomyces cerevisiae livres, um comprometimento da atividade

enzimática e da viabilidade celular e verificou-se ainda que, em sistema contínuo com células imobilizadas, o número de microrganismos vivos se reduz significativamente (Suihko & Poutanen, 1984).

A maioria das leveduras responsáveis por importantes fermentações industriais fermentam D-xilose a etanol, indicando que essas leveduras possuem todas as enzimas necessárias ao metabolismo da xilose, com exceção da xilose isomerase (Suihko & Drazic, 1983). A presença de xilitol (0,34% p/v) em fermentações realizadas por Saccharomyces cerevisiae (Suihko & Poutanen, 1984) revela que a xilitol desidrogenase é a enzima que falta no sistema metabólico dessa levedura. Existem leveduras enzimaticamente mais versáteis no que diz respeito ao metabolismo da xilose. Rhodospordium toruloides converte D-xilose em D-xilulose através de uma reação redutiva $\text{NADPH} + \text{H}^+$ dependente (xilose redutase) e de outra reação oxidativa NAD dependente (xilitol desidrogenase) (Soumalainen et al., 1989). Foi observado, por outro lado, que Rhodotorula gracilis converte, diretamente, xilose em xilulose através da ação da xilose isomerase (Höfer et al., 1971), sendo esta via mais característica de microrganismos procariotos. Como Rhodospordium toruloides é hoje classificado como Rhodotorula glutinis e tem como sinônima Rhodotorula gracilis (Van Rij, 1984), pode-se concluir que a levedura possui os dois sistemas de conversão de xilose em xilulose e que, possivelmente, a via a ser usada depende das condições de cultivo.

Para a obtenção de linhagens mais eficientes no processo de fermentação da xilose, têm-se buscado recursos na área de genética de microrganismos. Fusão de protoplasto de leveduras que supostamente possuem xilose isomerase com Saccharomyces cerevisiae foi tentada. O produto de fusão se mostrou, como é de se esperar, tão instável (segregação em tipos parentais) que foi impossível se fazer uma avaliação detalhada por resultados (Suihko & Drazic,

1983).

Foi sugerido, então, usar a tecnologia do DNA recombinante para transferir gens de microrganismos possuidores de xilose isomerase para células de leveduras sabidamente boas produtoras de etanol. Foi transferido gen da xilose isomerase (xilA) intato de Escherichia coli para Saccharomyces cerevisiae, mas não houve expressão. Foi efetuada, então, a remoção do promotor natural do gen da xilose isomerase e substituído pelo promotor de levedura Tpr5, que torna possível a expressão do gen sob controle do promotor da levedura tanto em Escherichia coli quanto em Saccharomyces cerevisiae. Mesmo assim, o nível de expressão foi muito baixo (Ho et al., 1983). Schizosaccharomyces pombe, clonada com o gen de xilose isomerase de Escherichia coli, foi capaz de crescer em meio contendo xilose como a única fonte de carbono e de fermentar a pentose diretamente a etanol. A formação do produto dependeu, no entanto, da fonte de nitrogênio. Mesmo com o gen da xilose isomerase presente, a produção de etanol foi lenta e a produção de xilitol ainda se manteve ativa (Chang et al., 1986). Os autores acham que o passo limitante no processo de produção de etanol a partir de xilose está na isomerização desta pentose para xilulose.

Técnicas de hibridação também foram usadas para obtenção de linhagens melhoradas de levedura. Hibridação de dois mutantes de Pachysolen tannophilus, eth 2-1 e $\text{NO}_3\text{-NO}_3\text{-4}$, foi efetuada para obter novas linhagens incapazes de crescer em etanol, mas com atividades metabólicas importantes para formação desse produto. O mutante eth 2-1 não cresce em etanol e $\text{NO}_3\text{-NO}_3\text{-4}$ possui níveis enzimáticos da via pentose fosfato aumentados (Clark et al., 1986). Essa hibridação resultou numa redução do consumo de etanol, em condições aeróbicas, mas nenhum dos segregantes produziu quantidades de etanol significativamente maiores que o mutante

NO₃-NO₃-4. A presença de três produtos de fermentação não identificados, detectados por HPLC, indicam desvios metabólicos que podem ser a causa do insucesso.

A composição química do meio de cultura afeta de modo decisivo o metabolismo de cada microrganismo em particular, atuando sobre o crescimento e sobre a formação de produtos. Aumentando o teor de cálcio no meio de cultura, foi possível reduzir a "lag phase" e obter um correspondente aumento na taxa específica de crescimento (Balatti, 1991). Os teores de etanol e de xilitol produzidos por Pachysolen tannophilus e Candida guilliermondii dependem da limitação de biotina no meio (Lee et al., 1988). Os resultados mostraram que a limitação dessa vitamina conduz a uma redução no crescimento e na taxa de utilização de xilose. Pachysolen tannophilus, segundo os autores, possui um maior requerimento por biotina que Candida guilliermondii. No entanto, essa última produz preferencialmente xilitol em relação ao etanol, enquanto que Pachysolen tannophilus forma preferencialmente etanol em relação ao xilitol. Há ainda a possibilidade de outros componentes do meio influenciarem o comportamento dos microrganismos. Pouco se sabe a respeito da ação de nutrientes sobre o comportamento de microrganismos que usam a xilose para crescimento e formação de etanol. De modo geral, os trabalhos realizados para estudar esses microrganismos usam meio complexo. Nesses casos, pouca informação detalhada pode ser tirada dos resultados obtidos. Das leveduras utilizadas, apenas Candida curvata, Candida utilis e Candida tropicalis foram capazes de utilizar completamente a xilose num meio contendo 15 g.l⁻¹ de xilose e 15 g.l⁻¹ de glicose, após três dias de fermentação. Destas, apenas Candida curvata utilizou a xilose simultaneamente com glicose (Heredia & Ratledge, 1988). Era de se esperar que o microrganismo utilizasse preferencialmente a glicose como fonte de carbono e, logo em seguida, a xilose fosse usada como fonte alternativa, caracterizando um comportamento

típico de diauxia. Tal característica faz com que esse microrganismo tenha boa possibilidade de ser utilizado nos processos nos quais existam misturas de açúcares como nos hidrolisados de madeira e palha.

Como pode ser visto, esforços têm sido despendidos para tornar leveduras capazes de serem utilizadas em processos fermentativos que viabilizem a formação industrial de etanol a partir de xilose.

O uso de xilose por bactérias tem sido estudado com a finalidade de formação de diversos produtos. Klebsiella oxitoca ATCC 8724 produz energia para o crescimento e manutenção celular a partir da oxidação da xilose e, em condições anaeróbicas, converte a pentose em 2,3-butanodiol (Jansen et al., 1984). Uma linhagem de Escherichia coli foi transformada, através de um plasmídeo especialmente produzido, contendo o gen da xilose isomerase ligado a um gen promotor forte e possuindo o gen repressor inativado, para formar xilose isomerase em grandes quantidades (Lastick et al., 1986). A produção dessa enzima é importante porque pode ser usada como agente catalítico para converter xilose em xilulose, e esta ser, finalmente, transformada em etanol por Saccharomyces cerevisiae ou outras leveduras economicamente importantes (Gong et al., 1981; Chiang et al., 1981) ou ainda participar do processo de isomeria da glicose.

Bactérias, especialmente as termofílicas, foram também submetidas à investigação com o mesmo propósito. O cultivo aeróbico desses microrganismos entre 40 e 70 °C é estimulante, por apresentar, entre outros fatores, economia no processo de resfriamento e menor risco de contaminação e ainda, por essas bactérias possuírem altos valores de μ e níveis enzimáticos mais elevados (Aiba et al., 1984).

O uso de bactérias anaeróbicas termofílicas e extremamente termofílicas, em processos fermentativos, apresentam uma série de vantagens, tais como, valores altos $Y_{x/s}$ devido à utilização de uma faixa mais ampla de substrato; alta taxa de "turnover"; altos valores de $Y_{p/s}$ e pouca produção de biomassa; fermentações rápidas devido à alta atividade metabólica; pouco ou nenhum perigo de contaminação durante o processo fermentativo; maior facilidade de manter as condições anaeróbicas; possibilidade de destilação contínua de produtos voláteis durante a fermentação; maior eficiência de sistemas de fermentação a vácuo. Mesmo que os processos de aquecimento devam ser estabelecidos, esses são mais fáceis de serem executados que os sistemas de resfriamento. Além disso, a viscosidade do meio decresce com o aumento da temperatura, fazendo com que se reduza a energia requerida para manter o sistema homogêneo. Substratos de baixa solubilidade em temperatura ambiente se tornam mais disponíveis em temperaturas mais elevadas (Wiegel, 1980). Além da facilidade de recuperação dos produtos voláteis de fermentação, é citado ainda como vantagem, o fato de se poderem obter enzimas termoestáveis (Lind, 1989). A mais importante das vantagens apresentadas, segundo o autor, ainda é aquela que se refere à possibilidade desses microrganismos utilizarem uma variedade mais ampla de substrato. Assim, o microrganismo que utiliza celulose e xilose como fontes de carbono deve possuir a celulase necessária ao processo de hidrólise e as enzimas requeridas para a transformação da xilose em xilulose. Comparando o processo termofílico com o processo combinado de hidrólise enzimática/fermentação com leveduras e levando em consideração a utilização de pentose, produção de celulase e baixa tolerância a etanol, Lind (1989) mostra que há uma redução substancial nos custos de produção de etanol devido à formação *in situ* de celulase.

Apesar das vantagens citadas, o uso de bactérias termofílicas apresenta alguns problemas que devem ser superados, tais como:

baixa tolerância ao etanol; formação de ácidos orgânicos juntamente com a produção de etanol; baixa tolerância ao substrato; sensibilidade a inibidores; necessidade, em elevadas quantidades, de fatores de crescimento complexos; pouco conhecimento básico a respeito da fisiologia e bioquímica desses microrganismos. Ainda há de se considerar que o uso de microrganismos termofílicos e mesofílicos não é um processo tecnológico de rotina, como é o de leveduras. Muitos trabalhos têm mostrado a superioridade de linhagens de Zymomonas mobilis em produzir etanol em relação a leveduras, mas, até o momento, países grandes produtores de etanol, como o Brasil, não possuem uma única planta industrial que opere com esta bactéria no processo de produção de etanol para combustível.

De um modo geral, em qualquer desenvolvimento de processos fermentativos devem-se contemplar a seleção do microrganismo, determinação das condições ótimas para crescimento e formação de produto e a modificação da estrutura genética com a finalidade de aumentar a produção. Procura-se ajustar o metabolismo do microrganismo para produzir a quantidade mínima necessária de metabólitos essenciais (fatores de crescimento) e secundários e formar, o máximo possível, o produto desejado. Para tal, é imprescindível que se conheça seu metabolismo em diferentes condições de cultivo. O conhecimento das vias biossintéticas é muitas vezes insuficiente para permitir que se façam modificações deliberadas em determinados pontos das vias metabólicas e, assim, atingir os objetivos desejados. Muitos pesquisadores tentam superar os problemas fisiológicos encontrados, utilizando meios complexos (Vienne & Stockar, 1983), sem antes determinar os fatores limitantes, supérfluos ou tóxicos de um determinado processo.

Usando meio complexo e um sistema de remoção contínua do etanol produzido, Atkinson et al., (1975) investigaram a capacidade de o

Bacillus stearothermophilus produzir etanol em anaerobiose e em cultura contínua, concluindo que o microrganismo não é adequado para a produção de etanol. Foi observado, no entanto, que essa bactéria termofílica produz altos níveis de álcool desidrogenase (ADH) (Kolb et Harris, 1971; Atkinson et al., 1972), e portanto, pode ser usada para produção de etanol se não houver desvio do esqueleto de carbono para a síntese de outros metabólitos. O Bacillus stearothermophilus lld-15 obtido por Payton e Hartley (1985) é um mutante deficiente para a formação de ácido láctico, produto este resultante de um importante desvio da via normalmente usada para a formação de etanol.

Para se obterem produtos de fermentação de uma forma economicamente viável, principalmente por microrganismos manipulados geneticamente, se torna necessário estudar os aspectos que digam respeito à nutrição e às condições de cultivo. Os requerimentos nutricionais só podem ser determinados por intermédio de meios de composição química definida. Ficou determinado que, para o crescimento, a referida linhagem apresenta, em meio definido, absoluta dependência de metionina, biotina, ácido nicotínico e tiamina (Amartey et al., 1991a). Os autores mostraram que o pulso realizado com triptona e extrato de levedura exerceu maior efeito sobre o crescimento do microrganismo que aquele obtido com o aminoácido e as vitaminas acima relacionadas. Isto indica que os componentes complexos (triptona e extrato de levedura) possuem outros atributos nutricionais importantes. Esses atributos podem envolver características nutricionais ou simplesmente atuar de forma indireta sobre a bactéria por tornar mais adequada a composição química do meio.

O extrato de levedura atua, no meio de cultura, de forma bastante diversificada. Pode servir como fonte de micronutrientes, quelar seletivamente os metais, ou, também, possuir fatores que reduzem a taxa de crescimento da população, diminuem as atividades

biossintéticas e impedem que se detecte sensibilidade a micronutrientes (Summers et al., 1979). Esses autores, usando regimes estacionários de culturas contínuas para otimização de meios definidos, mostraram que Cellulomonas sp. e Bacillus cereus possuíam extrema sensibilidade às variações nas concentrações de micronutrientes. O meio assim otimizado permitiu que se operasse em taxas de diluições críticas de 0,571 e 0,467 h⁻¹ para Cellulomonas e Bacillus, respectivamente. Os componentes complexos do meio podem ainda evitar uma adaptação dos microrganismos às condições estressantes impostas pelo meio definido. A proteína M, associada à virulência de Streptococcus tipo A, era formada apenas em meio complexo. A síntese dessa proteína, em meio definido, só foi possível depois de sucessivas fases de adaptação da bactéria em cultura contínua (Davies et al., 1968).

O pH do meio exerce importantes alterações na atividade geral de microrganismos. O valor de pH tem uma profunda influência não somente sobre a atividade, mas também sobre a formação de enzimas. Com Klebsiella pneumoniae, as atividades e a síntese máximas de glicose desidrogenase e gluconato desidrogenase se deram em valores de pH de 5,5 a 6,0. Acima de 7,5 nenhuma atividade foi detectada (Hommes et al., 1989). O pH do meio pode ainda interagir com determinados componentes do meio de cultura de modo a afetar o crescimento de microrganismos. A concentração de biomassa de culturas de Klebsiella pneumoniae ou Bacillus stearothermophilus, crescidas em meio sintético, em processo contínuo e com limitação de potássio, aumentou progressivamente quando o pH do meio foi alterado de 7,0 para 8,5. Segundo Buurman et al., (1989), o aumento na concentração de biomassa não se deveu ao acúmulo de polímeros, mas pareceu ser decorrente de um decréscimo, pH-dependente, no requerimento mínimo de K⁺ pela célula. É interessante observar que esse efeito do pH não ocorreu quando sais de amônio não foram

adicionados ao meio. Quando o glutamato foi usado como fonte de nitrogênio, Bacillus stearothermophilus, além de reduzir sua sensibilidade ao pH, elevou o teor de potássio intracelular. Quando sais de amônio foram adicionados progressivamente ao fermentador, o teor de potássio intracelular diminui e as taxas metabólicas aumentaram. Isso mostra a importância das interações complexas que os meios de cultura, mesmo definidos, podem exibir.

Muitas vezes o acúmulo de determinados produtos do metabolismo depende da concentração de nutrientes do meio. A produção de glutatona por Penicillium chrysogenum e o acúmulo intracelular de glutamato, alanina e glutamina, em meio definido tendo NH_4Cl como única fonte de nitrogênio, foram estimulados pelo aumento na concentração desse sal (Schwartz et al., 1988).

Outro aspecto de maior interesse e muito estudado é a influência de nutrientes minerais sobre o crescimento e metabolismo de microrganismos (Kida et al., 1991; Savarachorn et al., 1991; Sikdar et al., 1991; Kida et al., 1991).

A formação de etanol por qualquer que seja o microrganismo deve ser vista como um processo metabólico alternativo para a oxidação do $\text{NADH}+\text{H}^+$ produzido durante a oxidação parcial do substrato. Em condições anaeróbicas, a principal via metabólica do Bacillus stearothermophilus é a EMP acoplada à via PFL, produzindo uma relação molar entre o ácido fórmico, ácido acético e etanol de 2:1:1, respectivamente (Mackray & Vaughn, 1957). Uma outra via importante é aquela que resulta na formação de ácido láctico por redução direta do ácido pirúvico, catalisada pela LDH.

A linhagem Bacillus stearothermophilus lld-15 utilizada neste trabalho é, como anteriormente mencionado, um mutante deficiente em formar ácido láctico (Hartley e Shama, 1987). Assim, a produção de etanol depende apenas das condições que permitam uma maior atividade das enzimas da via PFL. Apesar de o microrganismo ter apresentado um $Y_{p/s}$ igual ao que se obtém com levedura (Hartley &

Shama, 1987), observa-se, sob o ponto de vista teórico, uma nítida desvantagem do uso do Bacillus stearothermophilus lld-15 para formação desse produto (via PFL), quando comparado com levedura (via PDC). A via PFL tem um Y_{tp} de 1 mol de etanol por mol de glicose consumida, ou seja, $0,256 \text{ (g}_p \cdot \text{g}_s^{-1})$. Microrganismos que possuem PDC apresentam um Y_{tp} de 2 mols de etanol por mol de glicose, o que corresponde a $0,512 \text{ (g}_p \cdot \text{g}_s^{-1})$. Neste último caso, dois mols de CO_2 são liberados e o esqueleto de carbono restante se transforma em etanol. Além disso, todos os H^+ são captados por moléculas de NAD e utilizados na redução do acetaldeído para a formação do etanol. Na via PFL indicada para Bacillus stearothermophilus lld-15, mesmo que esqueletos de carbono estivessem disponíveis, a formação adicional de etanol não seria possível em virtude da falta do poder redutor necessário ao processo. No entanto, a via PFL possui, nas moléculas dos ácidos fórmico e acético, o poder redutor e o esqueleto de carbono necessários para a formação adicional de etanol, respectivamente. A única forma de se aumentar o Y_{tp} , por essa via, seria através da oxidação do ácido fórmico, pela FDH, e da ação simultânea da AcDH. Assim, 2 mols de NAD seriam reduzidos pela FDH para cada mol de glicose utilizada, perfazendo um total de $4 \text{ NADH} + \text{H}^+$. Uma AcDH catalisaria a formação de 1 mol de ácido acético em 1 mol de acetaldeído, usando 1 mol $\text{NADH} + \text{H}^+$ produzido na oxidação do ácido fórmico. Finalmente, com o mol de $\text{NADH} + \text{H}^+$ restante, a ADH reduziria 1 mol de acetaldeído, formando 1 mol de etanol. Desta forma, microrganismos que utilizassem a via PDC ou PFL poderiam se equivaler com relação ao Y_{tp} . Neste caso, a via PFL liberaria CO_2 em condições anaeróbicas, o que não está previsto na via proposta por Hartley & Shama (1987) e Hartley et al. (1987) (Apêndice A). A formação de CO_2 , segundo os autores, se deve à participação da PDH no processo anaeróbico de produção de etanol, resultando em 2 mols

de etanol e 2 mols de CO_2 por mol de glicose. Uma outra alternativa para a formação de CO_2 seria a participação da via pentose fosfato. A hipótese mais provável seria a participação da FDH no processo. O ácido acético seria um produto intermediário na formação de etanol. Neste caso, a acetil-CoA poderia se transformar completamente em ácido acético, com uma produção total líquida de 4 mols de ATP, ao invés de 3 mols por mol de glicose utilizada. Se Bacillus stearothermophilus lld-15 possuir uma alta energia de manutenção em condições anaeróbicas, esse balanço energético será vantajoso sobretudo para o microrganismo. Tem sido observado que o ácido acético produzido pelo metabolismo de células vegetativas de Clostridium thermosaccharolyticum é convertido a etanol pelas células esporulantes (Hsu & Ordal, 1970). Uma outra alternativa seria o desvio da fonte de carbono para a formação de etanol com pouca ou nenhuma formação de ácido acético. Tem-se conseguido, com inibidores metabólicos, fazer com que Fusarium oxysporum produzisse etanol a partir de xilose, com significativa repressão na formação de ácido acético, atingindo valores de $Y_{p/s}$ quase iguais aos valores Y_{tp} (Singh et al., 1991).

A relação molar de 2:1:1 vista anteriormente só será possível mediante a inibição da FDH. Hartley & Shama (1987) não observaram atividade da FDH em extrato de células cultivadas em anaerobiose. Isso não significa, necessariamente, a inexistência ou a não participação da enzima no processo. A falha na detecção da PDH pode estar vinculada à perda da sua atividade devido ao contato da enzima com o ar durante o preparo da amostra. A FDH de Methanobacterium formicicum, durante 3 minutos na presença de ar, perde completa e irreversivelmente sua atividade (Schauer & Ferry, 1982).

Seria de grande valia que a inibição e o estímulo da FDH pudessem ser controlados através das condições de cultivo, como são os processos de esporulação, de resistência a altas temperaturas,

formação de determinados produtos do metabolismo, entre outros. A produção de etanol por Clostridium thermosaccharolyticum é positivamente correlacionada com a fase de esporulação (Hsu & Ordal, 1970). Se isto for verdadeiro para o Bacillus stearothermophilus lld-15, as condições de cultivo podem, de fato, estabelecer as diretrizes básicas para a produção de etanol. Esses autores relatam que a formação de etanol se torna importante no momento em que as células se mostram alongadas e apresentam esporos.

Quanto aos estudos cinéticos, foi demonstrado que, em cultura contínua, os processos de crescimento e esporulação estão negativamente correlacionados (Dawes & Thornley, 1970). Conclui-se que o crescimento e a formação de etanol também possuem correlação negativa, ou seja, quando a esporulação se estabelece, o crescimento se reduz de forma significativa e a formação de etanol acompanha o processo esporulativo. Nesse caso, o emprego de um sistema de fermentação em duplo estágio se faz necessário. Diferentes condições de cultivo podem ser estabelecidas de modo a estimular o crescimento no estágio inicial e induzir a produção de etanol, no estágio posterior. O valor de μ , neste último estágio, em condições ideais, deve ser baixa ou aproximadamente zero.

A formação de produtos que não está vinculada ao crescimento pode ser de dois tipos, com base no valor de q_p : q_p independe de μ ou varia com μ de uma forma complexa. A produção de esporos se enquadra neste último caso (Dawes & Thornley, 1970). O etanol, sendo produto final do metabolismo energético, está parcialmente ligado ao crescimento e parcialmente independente da taxa de crescimento. A formação desse produto final resulta ou do requerimento de energia de manutenção ou do desacoplamento do sistema de produção de ATP. O fato é que, não havendo ligação total entre a formação de produto e o crescimento, a atividade sintética

decai em função do tempo. Pelo sistema de fermentação em duplo estágio (Fig. A-Apêndice B), a formação de células e enzimas necessárias ao processo produtivo deve ocorrer no primeiro estágio, enquanto que a produção de etanol se estabelece no segundo. Desta forma, é imperativo que, no primeiro estágio, o estímulo ao crescimento não provoque um "lag", como ocorre com Candida tropicalis (Jeffries, 1982) e com Pachysolen tannophilus (Slininger et al., 1982), no processo de formação de etanol, no estágio produtivo. Nessa fase, deseja-se que o crescimento seja evitado e que todo o fluxo de substrato siga a via PFL para a formação de etanol. As condições de cultivo como anaerobiose, pH, temperatura, entre outras, podem vir a ser as alternativas escolhidas para inibir o estágio de formação de etanol. Se a atividade celular em formar o referido produto decair com o tempo, o retorno dessa célula para o primeiro estágio parece ser de grande importância para restabelecer a atividade e para permitir que formas celulares em dormência voltem a crescer. Na fermentação acetona-butanol, a performance do processo contínuo de duplo estágio tem-se mostrado superior quando comparada com o sistema de único estágio, com base na concentração de butanol presente no efluente, produtividade volumétrica e utilização de substrato (Gray & Walls, 1983).

No processo industrial de formação de etanol, é conveniente que se desenvolvam meios sintéticos de baixo custo, sem necessidade de adicionar produtos industrializados, como extrato de levedura, peptona, extrato de carne, assim como aminoácidos e vitaminas, entre outros. O meio definido apresentado por Amartei et al. (1991a), à base de sacarose não se mostra, mesmo em condições aeróbicas e na presença de três vitaminas e um aminoácido, próprio ao seu crescimento da linhagem lld-15. O referido meio deve possuir fatores inibitórios ou deficiências nutricionais importantes que precisam ser removidos. Com essa baixa formação de células em meio definido, torna-se difícil estabelecer estratégias adequadas para a

fase de produção de etanol (anaeróbica). Portanto, o desenvolvimento dessas linhagens em meio definido, mesmo utilizando sacarose como fonte de carbono, ainda se constitui um problema a ser solucionado.

Este trabalho tem como principais objetivos, investigar, em quimiostato, o metabolismo do Bacillus stearothermophilus lld-15 e sua capacidade de crescer e de produzir etanol em anaerobiose, usando meio complexo à base de xilose; estabelecer, em batelada e em cultura contínua, as condições culturais para melhorar seu crescimento em meio definido, tendo sacarose como fonte de carbono; e determinar, em sistema contínuo e em aerobiose, as condições necessárias para seu crescimento em meio definido à base de xilose, de modo que a fase "lag" para formar etanol, durante a transição de aerobiose para anaerobiose, seja curta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismo - Bacillus stearothermophilus NCA1503 é uma bactéria anaeróbica facultativa e termofílica obrigatória. A partir desta linhagem, Hartley & Payton (1983) e Payton & Hartley (1985) obtiveram o mutante PSII capaz de crescer em condições anaeróbicas, em meio complexo, tendo a glicose como fonte de carbono. Através da técnica de resistência a substrato suicida (ácido fluoropirúvico), esses autores conseguiram, a partir do mutante PSII, um novo mutante denominado Bacillus stearothermophilus lld-15. A nova linhagem, tida como deficiente para a produção de ácido láctico, por não possuir LDH, foi obtida do Centre for Biotechnology do Imperial College of Science and Medicine.

As culturas foram crescidas e mantidas por dois diferentes processos:

A. em meio complexo sólido, contendo por litro: 2,0 g de extrato de levedura (Oxoid), 5,0 g de peptona (Oxoid), 1,0 g de extrato de carne (Oxoid), 3,0 g de glicose (Fisons) e 25,0 g de agar (Difco). O crescimento em tubo de ensaio, contendo meio sólido inclinado, foi efetuado a 65 °C. Após o crescimento, os tubos foram mantidos a temperatura de 4 °C.

B. em meio líquido definido: durante o processo contínuo de crescimento, alíquotas de meio de cultura, contendo células na fase exponencial de crescimento, foram transferidos para tubos universais estéreis e mantidas a baixas temperaturas (-30 °C).

Preparo do Inóculo- O inóculo foi preparado adicionando-se a 40 ml de meio de cultura, 10 ml de suspensão de células, contendo, aproximadamente, 10^8 células.ml⁻¹ e tendo sido mantida, em 1:5, a relação volume de meio: volume total do recipiente. No caso de células mantidas em meio sólido, as suspensões foram preparadas lavando-se a superfície do meio complexo sólido com o meio a ser usado no preparo do inóculo. Cinco frascos de Erlenmeyer de 250 ml,

devidamente inoculados, foram incubados a 65 °C num agitador rotatório MKX (Lh-Fermenter Ltd. Bells Hill. UK) regulado para 200 rotações por minuto (rpm), durante, aproximadamente, 16 horas.

Processos de Cultivo

Batelada - Os estudos foram realizados em fermentador (Lh-Fermentation 2000 series Ltd. Bells Hill. UK) com volume máximo de trabalho de 1 litro, equipado com: amplificador automático 2100-controle de pH 2115, amplificador 2200-controle de temperatura 2218, amplificador 2300-controle de PO_2 2316A, controle de espuma 2700, controle de fluxo de gás 2700, controle de velocidade 2516, mostrador de medida 2020 e indicador de pontos predeterminados 2030. O volume de trabalho utilizado foi de 1 litro. A agitação foi mantida a 600 rpm, utilizando duas turbinas de disco com lâminas planas. O movimento circulatório e o vórtice foram evitados por ação de quatro chicanas. A aeração foi realizada através de tubo de aeração com um anel perfurado situado abaixo da turbina inferior. O fluxo de entrada de gás foi medido e controlado por rotâmetro. O pH foi medido com eletrodo do tipo Ingold esterilizável e mantido, no valor predeterminado, através da adição de KOH 4N. O controle de espumas foi feito por adição de uma solução de dimetilpolisiloxana ($0,25 \text{ ml.l}^{-1}$). O antiespumante e o KOH foram adicionados por meio de bombas peristálticas acionadas automaticamente. O fermentador foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 30 min., contendo 1 litro de meio de cultura ou água destilada. Quando esta última era utilizada, o fermentador era esvaziado em capela de fluxo laminar. A conexão entre o reservatório contendo o meio estéril e o fermentador foi feita através de tubos de silicone com conexões rápidas rosqueáveis. Por meio da bomba peristáltica (Eyla-Microtube Pump-Rikakikai Ltd. Tokio), foram transferidos 900 ml do meio do reservatório para o fermentador. Após ter atingido as condições de cultivo desejadas, 100 ml de uma suspensão de células (10^8 ml^{-1}), na

fase exponencial, foram transferidos para o fermentador de forma asséptica.

Contínuo - O sistema contínuo foi estabelecido adicionando-se, ininterruptamente ao fermentador, meio de cultura estéril através de bomba peristáltica (Eyla-Microtube Pump-Rikakikai Ltd. Tokio). O volume de trabalho foi mantido constante por meio de sifão, de modo que o fluxo de entrada fosse igual ao de saída. A vazão foi medida através de pipeta instalada no tubo de conexão entre o fermentador e a bomba. Amostras foram tomadas após 5 vezes o tempo de residência hidráulico (t_h). O sistema foi considerado em regime estacionário quando, ao serem analisadas estatisticamente (delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições), as absorvâncias (A_{600}) obtidas no intervalo de duas horas não apresentavam diferenças significativas. Além da densidade óptica, o regime estacionário foi comprovado pela evolução de CO_2 nos gases de saída e pelo consumo de O_2 detectados por meio de análise contínua desses dois componentes nos gases de saída do fermentador.

Medidas de Crescimento - O crescimento do microrganismo foi acompanhado por determinação da densidade óptica, evolução de CO_2 e consumo de O_2 . Para a determinação da densidade óptica, as alíquotas coletadas foram submetidas a tratamento de estabilização, que consiste em adicionar formaldeído concentrado (37-40%) na proporção de 1 ml de formaldeído: 10 ml de amostra (Pringle & Mor 1975). Após fixação, as amostras foram diluídas de modo a fornecer uma densidade Óptica entre 0,100 e 0,200.

O peso seco foi determinado sem o processo de fixação. Apesar desse procedimento ser igualmente conveniente para a determinação de peso seco, não foi aqui utilizado porque o sobrenadante foi sempre usado para análises químicas. Alíquotas de 50 ml foram colhidas e imediatamente submetidas à centrifugação a 12.000 rpm, sob refrigeração (4 °C). Foi utilizada centrífuga Sorvall-RC-5B

Refrigerated Superspeed Centrifuge equipada com rotor SS-34. O sobrenadante foi congelado (-30°C) para posterior análise química, e as células foram submetidas a três lavagens sucessivas com água destilada. Para cada lavagem, correspondeu uma centrifugação. As células, devidamente lavadas, foram suspensas em água destilada e transferidas para placas de vidro previamente pesadas. Após 3 dias em estufa a 70°C , diversas pesagens foram feitas, tendo sido considerado peso constante quando o peso das amostras, medido o intervalo de 24 horas, não mais apresentava alterações significativas.

A determinação de células viáveis foi efetuada pelo método do Número Mais Provável (NMP), (Mayou, 1976).

Determinação de Açúcares - A concentração de açúcar residual foi determinada segundo Dubois et al. (1965). Esse procedimento consiste em adicionar a 1 ml de sobrenadante, 50 μl de uma solução de 80% de fenol (BDH) redistilado e 5 ml de H_2SO_4 concentrado (BDH, 95,5% e de densidade 1,84). Este último foi adicionado diretamente sobre a mistura, com pipeta de 5 ml de escoamento (10 a 20 segundos). A reação se processou em tubos de ensaio medindo 20mm de diâmetro por 150 mm de comprimento. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos. Após nova homogeneização, os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C por 15 minutos, tendo sido, em seguida, medida a densidade óptica em espectrofotômetro Shimadzu UV 240, em 490 e 480 nm para hexoses e pentoses, respectivamente. O branco foi preparado utilizando-se água destilada no lugar da amostra.

Uma curva padrão foi construída com 7 concentrações de xilose ou sacarose que variaram, em intervalos regulares, de 10 a 70 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, tendo como branco água destilada. Uma análise de regressão linear foi feita, usando o método dos quadrados mínimos, para achar o coeficiente angular (a), o intercepto (b) e o

coeficiente de determinação r^2 da equação $y = ax + b$, onde x corresponde à absorbância e y à concentração de açúcar em estudo. A concentração de açúcares na amostra foi determinada pela equação linear obtida. Quando necessário, as amostras foram diluídas de modo a se ter uma absorbância dentro dos limites encontrados na curva padrão.

Determinação de Etanol - A concentração de etanol no sobrenadante foi medida por cromatografia gás-líquida, empregando-se um cromatógrafo Philips Pu 4500 equipado com detector de ionização de chama e coluna de vidro de 1,5 m de comprimento e 3,5 mm de diâmetro interno. A coluna foi empacotada com Poropak Q 80-100 mesh (Walters Associates, Inc, Milford, Mass.) e operada isotermicamente a 180 °C. As temperaturas de injetor e do detector foram ajustadas para 225 e 250 °C, respectivamente. A chama foi mantida com uma mistura de ar e hidrogênio num fluxo constante de 240 a 40 ml.min⁻¹, respectivamente. O gás de arraste (N₂) teve seu fluxo mantido em 40 ml.min⁻¹. O n-propanol foi usado como padrão interno. O volume total de injeção foi de 1 µl. As áreas foram calculadas por meio de computador integrador Shimadzu Chromotopac C-R3A. Para se obter um fator de resposta médio, foram feitas 3 corridas cromatográficas.

Determinação de Produto Ácidos de Fermentação, O₂ e CO₂ - As análises cromatográficas dos ácidos fórmico, acético, pirúvico, láctico e succínico seguiram a metodologia empregada por Drummond e Shama (1982) com a seguinte modificação:

Metilação - 2 ml de amostra centrifugada ou de solução padrão foram transferidos para frascos de 28,4 ml (1 oz UK) com tampa de borracha. Foram adicionados 5 µl de uma solução de 10% (v.v⁻¹ = volume de padrão interno/volume de metanol a 40%) do padrão interno (ácido n-valérico), 2 ml de metanol e 0,75 ml de uma solução de 50%

de H_2SO_4 (v.v⁻¹). A mistura foi incubada a 50 °C por 30 min. Depois de atingir a temperatura ambiente, 1 ml de água desionizada e 0.5 ml de clorofórmio foram adicionados à mistura. A extração foi efetuada por vigorosa agitação manual durante 5 minutos, seguindo uma rotina padronizada.

A solução padrão possui por litro de água desionizada: 5,0 g de ácido fórmico (Sigma), 2,5 g de acetato de sódio (Fisons), 2,5g de ácido pirúvico (Sigma), 2,5 g de ácido láctico (Sigma) e 2,5 g de ácido succínico (Sigma).

Procedimento Cromatográfico - Depois de terem sido efetuadas a metilação e a extração, a amostra e o padrão foram mantidos a -30 °C por 40 minutos. A fase clorofórmio-ésteres de metila (1 µl) foi injetada num cromatógrafo a gás líquido Philips PU 4500 equipados com detector de ionização de chama, programador linear de temperatura e coluna de vidro, medindo 2,40 m de comprimento por 3,5 mm de diâmetro. A coluna foi empacotada com 10% de adipato de dietileno glicol (DEGA) e 2% de ácido fosfórico num suporte sólido de diatomácea C 100/120 mesh (Phase Separation Ltd., Clwyd. UK). A amostra e o padrão foram injetados utilizando-se uma seringa Hamilton de capacidade máxima de 1 µl.

A temperatura da coluna foi linearmente programada. O programa consistiu em manter a temperatura inicial em 50 °C por 1 minuto e, em seguida, aumentar para 130 °C, numa taxa de 16 °C.min⁻¹. A temperatura final foi mantida por 18 minutos. O injetor e o detector foram operados a 225 a 250 °C, respectivamente, durante todo o processo analítico. Os fluxos de hidrogênio e nitrogênio foram fixados em 40 ml.min⁻¹ e o de ar, em 240 ml.min⁻¹.

As áreas dos picos foram calculadas usando o computador integrador Shimadzu Chromatopac C-R3A. Para se obter um fator médio de respostas, foram feitas três corridas de calibração. Os teores de produtos presentes na amostra foram determinados comparando as áreas dos picos de cada produto da amostra com as áreas dos

respectivos picos presentes na solução padrão, a qual possui uma concentração de produtos apropriada.

Para o cálculo da concentração dos produtos de fermentação foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C_p = [(P_{1p}/A_{1p})A_{2p}]P_{2pi} / [(P_{1pi}/A_{1pi})A_{2pi}]$$

se $P_{2pi} = P_{1pi}$,

então: $C_p = [(P_{1p}/A_{1p})A_{2p}] / [(1/A_{1pi})A_{2pi}]$

Os teores de CO_2 e O_2 , presentes nos gases de saída do fermentador, foram analisados através de espectrômetro de massa (Quadrupole Mass Spectrometer SX200-VG Gas Analysis Middlewich-England) equipado com módulo de pressão total, mostrador digital, compatibilidade de unidade analisadora e interface SI para controle direto por computador (Apple). O equipamento foi operado segundo instruções do fabricante.

Meios de Cultura - Os diferentes meios de cultura estão relacionados no apêndice C. Quando o substrato utilizado é a xilose, os meios apresentam, na identificação, o código "Xi". Não havendo indicação, o substrato usado é a sacarose. Em todos os casos, a fonte de carbono, o cloreto de amônio, o sulfato de magnésio e o fosfato de potássio foram esterilizados separadamente do restante do meio, em autoclave a $121^\circ C$. Ao atingir a temperatura ambiente, as partes foram misturadas em condições estéreis, em capela de fluxo laminar. As vitaminas e a metionina foram esterilizadas através de filtros (Millipore Corp.) com diâmetro de poro de $0,2 \mu$ e adicionadas ao meio estéril.

Modelos - Os modelos matemáticos utilizados para o cálculo dos dados em termos dos diversos parâmetros de crescimento (Pirt, 1975) foram os seguintes:

O valor de μ foi calculado com base na equação resultante do balanço de células em cultura contínua: $dx/dt = x(\mu - D)$.

As equações de regressão e os coeficientes de determinação foram obtidos através de um programa escrito em linguagem ST BASIC para computador ATARI 520 ST expandido para 1 Mb RAM.

O valor de K_s foi obtido em processo contínuo pela equação: $D_M = \mu_{MAX} \{1 - K_s / (K_s + s_0)\}^{1/2}$. Os $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ foram calculados pelas equações: $Y_{X/S} = dx/ds$ e $Y_{P/S} = dp/ds$, respectivamente. O (q_s) foi obtido segundo a fórmula: $q_s = 1/x(ds/dt)$ ou $q_s = \mu/Y_{X/S}$ e o Q_s foi obtido por: $Q_s = q_s \cdot x$ ou $Q_s = ds/dt$. O valor de m foi calculado por: $1/Y_{X/S} = 1/Y_{X/SC} + m(1/\mu)$. Os valores de $Y_{X/SC}$ foram obtidos por: $\mu/Y_{X/S} = \mu(1/Y_{X/SC}) + m$. Os q_p e os Q_p foram determinados por: $q_p = 1/x(dp/dt)$ e $Q_p = (q_p)x = Dp$, respectivamente. O valor de Y_{ATP} foi obtido, em anaerobiose, por: $Y_{ATP} = Y_{X/S}/n$, onde, n = mols de ATP disponíveis devido ao metabolismo de um mol de substrato, e $Y_{X/S} = g_X \cdot mol_s^{-1}$.

RESULTADOS

1. Crescimento de Bacillus stearothermophilus lld-15 e Formação de Produtos de Fermentação em Função do pH.

Bacillus stearothermophilus lld-15, quando cultivado em meio complexo (BSTCM), tendo xilose como fonte de carbono e submetido a condições anaeróbicas, se comportou de forma estável em diferentes valores de pH. Contudo, é importante salientar que houve uma expressiva dificuldade em iniciar seu crescimento. De cada 5 frascos de Erlenmeyer inoculados, apenas 2 a 3 apresentavam crescimento. As culturas, ao serem transferidas para o fermentador, esboçavam um ligeiro crescimento seguido de uma completa inibição. O experimento foi iniciado após, aproximadamente, 30 dias de sucessivas inoculações.

A Figura 1 apresenta o comportamento de Bacillus stearothermophilus lld-15 em diferentes valores de pH e em processo contínuo. Comparando-se as médias pelo teste de Tukey, observa-se que os valores de PS e de Q_s foram maiores em valores de pH 6,5 e 7,0. O $Y_{X/S}$, em pH 8,0, foi maior que aqueles observados nos demais valores de pH, sendo essa diferença altamente significativa. Não houve diferença significativa entre os tratamentos referentes ao pH 6,5 e 7,0.

A Figura 2 mostra a formação de etanol e dos ácidos acético, fórmico e succínico, em função do pH. O ácido pirúvico não foi encontrado no meio e o ácido láctico foi produzido apenas em pH 6,2. A maior produção de etanol foi obtida em pH 6,5.

As relações molares (ácido fórmico:etanol:ácido acético) encontradas foram de 2:1,28:1,40; 2:1,53:1,09; 2:0,99:1,13 e 2:0,3:1,25 para os valores de pH 6,2, 6,5, 7,0 e 8,0, respectivamente. As Figuras 3(a), 3(b) e 3(c) apresentam o logaritmo de $r_{mFo}|_{AC}$, de $r_{mFo}|_{ET}$ e de $r_{mAC}|_{ET}$ em função do pH. Os três gráficos foram construídos levando em consideração a relação molar

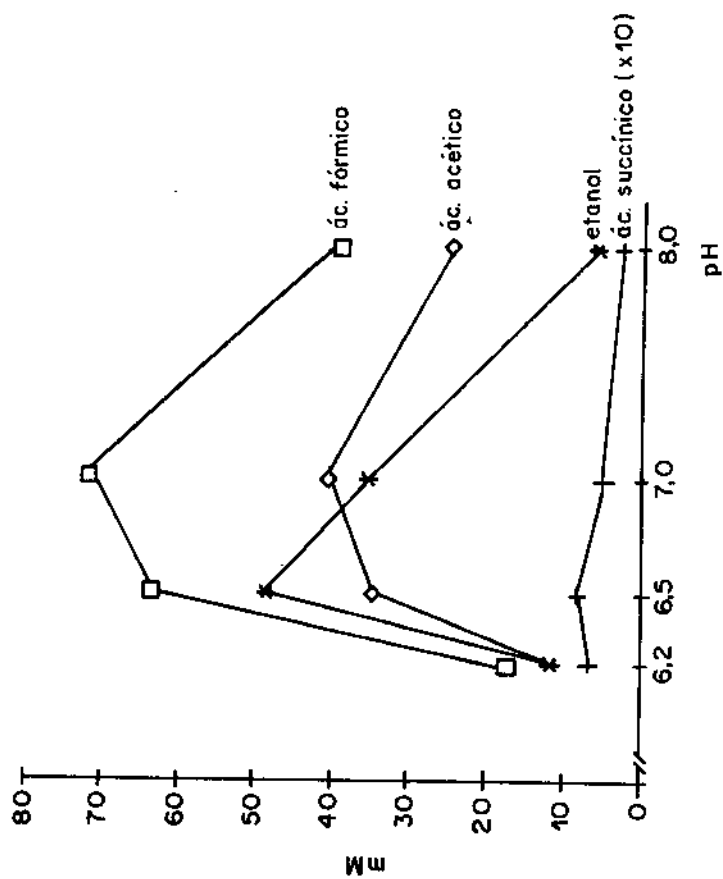


Fig. 2. Formação de etanol e dos ácidos fórmico, acético e succínico por *B. stearothermophilus* 11d-15, em função do pH. Condições de cultivo: meio - BSTM; temperatura - 65°C; agitação - 200 rpm; anaerobiose - N_2 (4 l.min⁻¹); taxa de diluição - 0,1 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM).

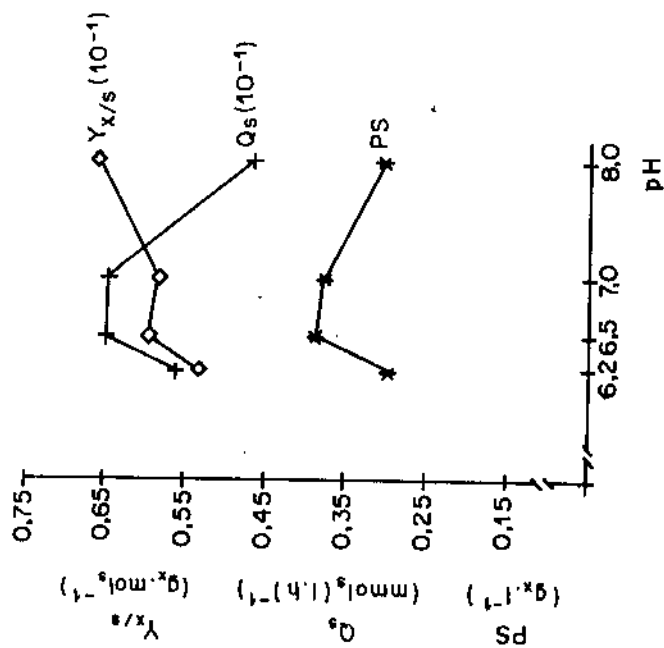


Fig. 1. Influência do pH sobre o crescimento de *B. stearothermophilus* 11d-15 expresso em peso seco (PS - g.l⁻¹), taxa volumétrica de consumo de substrato (Q_s - mmol.s(1.h)⁻¹), e fator de conversão ($Y_{x/s}$ - g.x-mol⁻¹). Condições de cultivo: meio - BSTM; temperatura - 65°C; agitação - 200 rpm; anaerobiose - N_2 (4 l.min⁻¹); taxa de diluição - 0,1 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM).

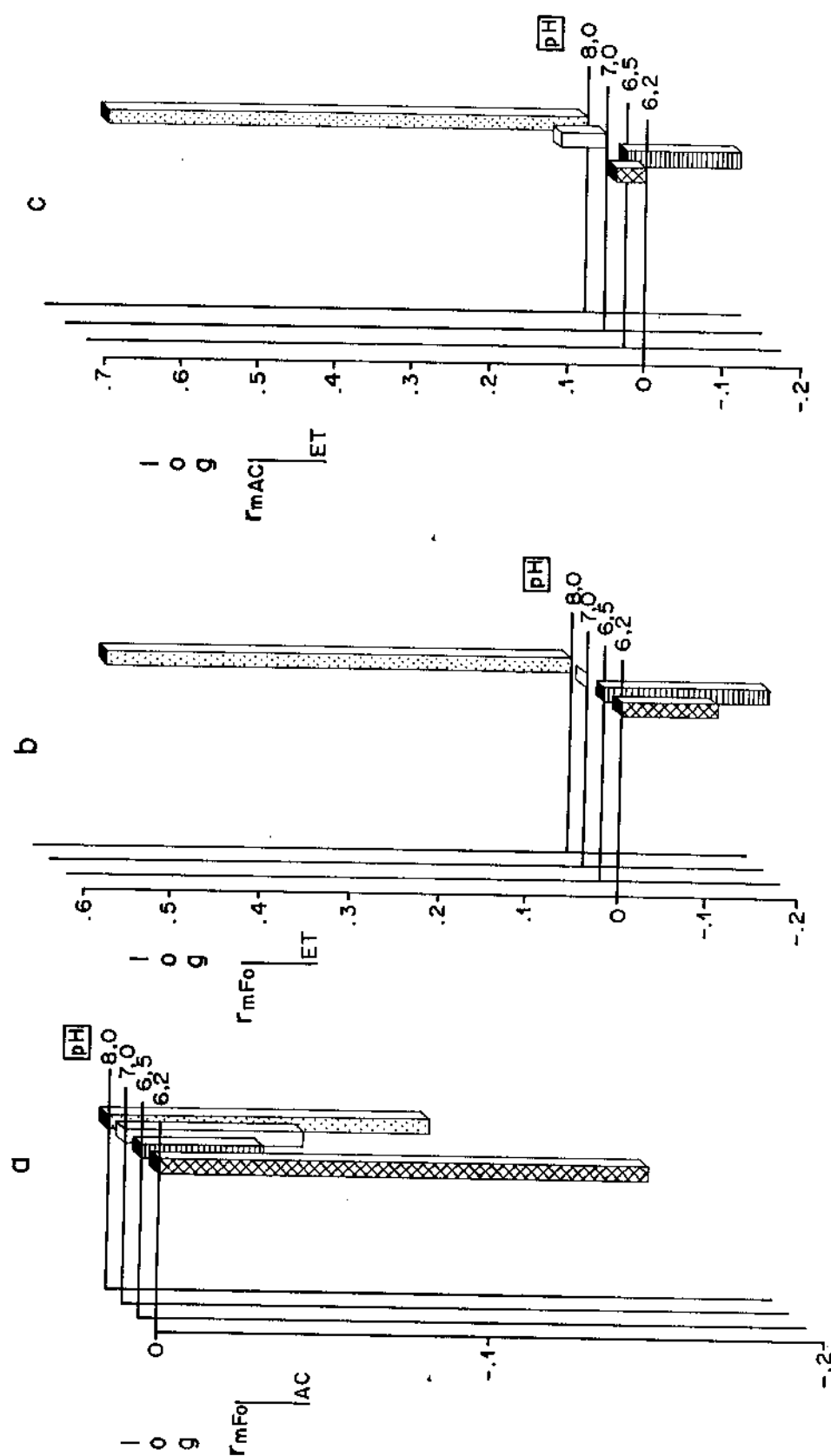


Fig. 3. Logaritmo da relação molar entre o ácido fórmico observado e o esperado, tendo como base de cálculo o ácido acético ($\log r_{mFo|AC}$) (a) e o etanol ($\log r_{mFo|ET}$) (b), e o logaritmo da relação molar entre ácido acético observado e esperado, tendo o etanol como base de cálculo ($\log r_{mAC|ET}$) (c), em diferentes valores de pH.

estabelecida pela via PFL. Definiu-se, portanto, esse tipo de relação molar como :

$$r_{mFo}|_{AC} = dFo/dFo'|_{AC}$$

$$r_{mFo}|_{ET} = dFo/dFo'|_{ET}$$

$$r_{mAC}|_{ET} = dAC/dAC'|_{ET}$$

tomando-se o logaritmo de cada um desses valores tem-se:

$$\log r_{mFo}|_{AC} = \log(dFo/dFo')|_{AC}$$

$$\log r_{mFo}|_{ET} = \log(dFo/dFo')|_{ET}$$

$$\log r_{mAC}|_{ET} = \log(dAC/dAC')|_{ET}$$

quando o log de uma dessas relações for zero, a relação molar, definida para a via PFL dos produtos envolvidos, é obedecida. Na Figura 3(a), foi observada uma tendência do ácido acético ser ligeiramente mais abundante no meio que o ácido fórmico. Pode-se, através do gráfico obter o percentual do valor observado (Fo) em relação ao esperado (Fo');

$$\begin{aligned} \text{para} & \quad dFo/dFo'|_{AC} \\ \text{fazendo} & \quad \log r_{mFo}|_{AC} = R_{MLFo} \\ & \quad Fo\% = [(\text{antilog } R_{MLFo})100] \end{aligned}$$

observou-se que o ácido fórmico presente no meio correspondeu a 71,28%, 91,75%, 88,21% e 79,91% do esperado, com base no ácido acético obtido em pH 6,2, 6,5, 7,0 e 8,0, respectivamente. Na Figura 3(b), a formação do etanol foi maior que a correspondente em ácido fórmico para valores de pH ácido (6,2 e 6,5).

O valor percentual de Fo para $dFo/dFo'|_{ET}$ foi de 78,01% e de 65,18% para pH 6,2 e 6,5 respectivamente. Comparando-se as Figuras 3(a) e 3(b), nestes dois valores de pH, verifica-se que em pH 6,5 o valor do $\log r_{mFo}|_{AC}$ é o que mais se aproxima de zero e o $\log r_{mFo}|_{ET}$ é o que mais se distancia de zero. Em pH 7,0, a relação molar

(etanol:ácido fórmico) 1:2, prevista para a via PFL, foi obedecida, pois $\log r_{mFo}|_{ET}$ assume valor zero. O $\log r_{mFo}|_{AC}$ voltou a se distanciar de zero, significando que a relação molar (ácido fórmico:ácido acético) 2:1 não foi mantida. O valor percentual de Fo para $dFo/dFo'|_{ET}$ foi, aproximadamente, de 100% em pH 7,0. Na Figura 3(b) e em pH 8,0, pode-se observar que a produção de etanol foi menor que a concentração equivalente em ácido fórmico presente no meio. O valor do ácido corresponde a 330% do valor esperado. Neste mesmo pH, o $\log r_{mFo}|_{AC}$ se distancia ainda mais de zero (Fig. 3(a)). A Figura 3(c) mostra que apenas em pH 6,5 a formação de etanol supera a de ácido acético. Os valores percentuais de AC para $dAC/dAC'|_{ET}$ foram de 109,45%, 71,04%, 114,30% e 412,91% para valores de pH 6,2 e 6,5, 7,0 e 8,0, respectivamente.

O maior valor de $Y_{ET/S}$, em pH 6,5, indica que neste pH a formação de etanol é favorecida. Foi obtido, neste pH, um $Y_{ET/S}$ de 0,745, o que corresponde a 89,4% do valor teórico. Se for levado em conta o Y_{tp} com base na via PDC de levedura, cujo valor é de 1,667 ($\text{mol}_p \cdot \text{mol}_s^{-1}$), este $Y_{ET/S}$ representa apenas 44,7%. Em valores de pH 6,2, 7,0 e 8,0, os fatores de conversão, considerando a via PFL, foram de 23,40%, 65,52% e 15,00%, respectivamente. Pela via PDC, a equivalência foi de 11,70%, 32,76% e 7,50% para os valores de pH 6,2, 7,0 e 8,0, respectivamente.

A Figura 4 apresenta os valores de $Y_{p/s}$ para os ácidos acético, fórmico e succínico e etanol. O maior $Y_{ET/S}$ foi obtido em pH 6,5. Houve diferença altamente significativa entre os valores médios de $Y_{ET/S}$ obtidos em pH 6,2, 6,5 e 7,0. O teste de Tukey revelou diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade entre as médias de $Y_{ET/S}$ obtidas em pH 6,2, 6,5 e 7,0. Não houve diferença entre os valores encontrados em pH 6,2 e 8,0.

Os maiores fatores de conversão para o ácido acético foram obtidos em pH 6,5 e 7,0 que diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Houve diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, entre os fatores de conversão do ácido fórmico obtidos nos diferentes valores de pH. Os fatores de conversão dos ácidos acético e fórmico mais baixos foram observados em pH 6,2 e os mais altos em pH 7,0.

Os fatores de conversão do ácido succínico obtidos em pH 6,2 e 6,5 não diferiram entre si, mas apresentaram diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, com relação aos valores observados em pH 7,0 e 8,0.

Observa-se que o aumento do pH de 6,5 para 8,0 afeta principalmente o fator de conversão do etanol (Fig. 4). O traçado das curvas referente aos ácidos acético e fórmico revela um comportamento muito semelhante entre ambos. Pela análise de regressão feita, considerando os fatores de conversão dos dois ácidos nos quatro diferentes valores de pH, foi obtida a equação:

$$Y_{Fo/S} = 1,943(Y_{Ac/S}) - 0,114; (r^2 = 0,980)$$

O $Y_{Fo/S}$ médio do ácido fórmico aumenta de forma linear, à razão de 1,943 $\text{mol}_p.\text{mol}_s^{-1}$ por $Y_{Ac/S}$. Como era de se esperar, a regressão linear para a formação dos dois ácidos também mostrou um r^2 de 0,994. A equação obtida foi:

$$\text{mM}_{Fo} = 1,968(\text{mM}_{Ac}) - 7,099$$

a produção média de ácido fórmico, portanto, aumenta de forma linear, à razão de 1,968 mM por mM de ácido acético formado.

A Figura 5 expõe os valores de $Y_{p/s}$ para os ácidos fórmico e acético e para o etanol obtidos apenas com a fração de xilose que participa diretamente da formação destes produtos. Esta fração pode ser obtida sabendo-se que:

$$ds = ds'' + ds'$$

onde: s = substrato total usado pelo microrganismo; s' = substrato usado pela via PFL; s'' = substrato que não participa da via PFL

O fator de conversão com base em s' seria:

$$Y_{P/S'} = dp / (ds - ds'')$$

$$Y_{P/S'} = dp / ds'$$

Com base na relação molar substrato/produto, ds' pode ser definido como:

$$ds' = K(dp_{ET} + dp_{AC})$$

logo:

$$Y_{P/S'} = (1/K)[dp / (dp_{ET} + dp_{AC})]$$

K é uma constante de proporcionalidade que depende do substrato usado. Para a xilose, K assume o valor de 0,6. A Figura 5 mostra que, quando o $Y_{ET/S'}$ diminui, o $Y_{AC/S'}$ aumenta. Para o ácido fórmico em relação ao etanol, esse comportamento se dá a partir do pH 6,5.

Através da análise de regressão linear de $Y_{ET/S'}$ e de $Y_{AC/S'}$, obteve-se a seguinte equação:

$$Y_{AC/S'} = -1,0006(Y_{ET/S'}) + 1,6672; (r^2 = 0,999)$$

significando que $Y_{AC/S'}$ diminui de forma linear, à razão de -1,0006 por aumento de $Y_{ET/S'}$.

Para $Y_{AC/S'}$ e $Y_{Fo/S'}$, a equação obtida foi:

$$Y_{Fo/S'} = 1,4286(Y_{AC/S'}) + 0,2012; (r^2 = 0,890)$$

Observa-se, neste caso, que o aumento de $Y_{Fo/S'}$, em relação ao aumento de $Y_{AC/S'}$, não mais corresponde ao valor de aproximadamente 2, como foi verificado na análise de regressão feita com base no teor total de xilose utilizada.

O $Y_{Fo/S'}$, em pH 8,0 (Fig. 5), foi de 2,145, ou seja, 28,674% mais alto que o Y_{tp} (1,667) permitido pela via PFL.

A Figura 6 aponta as taxas específicas de consumo de substrato (q_s) e de formação de produtos (q_p), nos diferentes valores de pH. A análise de regressão entre q_s e pH resultou na seguinte equação:

$$q_s = - 1,679\text{pH} + 28,456; \quad (r^2 = 0,839)$$

Como se observa, a taxa específica de consumo diminui à razão aproximada de $1,679 \text{ mmol}_s \cdot (\text{g}_x \cdot \text{h})^{-1}$ por unidade de pH aumentada.

Os valores de pH interferiram significativamente sobre as taxas específica de formação de etanol e dos ácidos acético e fórmico. As maiores taxas específicas de formação de etanol foram obtidas em valores de pH 6,5, enquanto que as mais altas taxas específicas dos referidos ácidos se deram em pH 7,0.

As taxas específicas de formação de ácido succínico observadas em pH 6,2 e 6,5 não apresentaram diferença significativa, mas diferiram ao nível de 1% de probabilidade das obtidas em pH 7,0 e 8,0.

Os $Y_{\text{ATP}} (\text{g}_x \cdot \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1})$, nos diversos valores de pH, puderam ser calculados diretamente a partir de $Y_{x/s} (\text{g}_x \cdot \text{mol}_s^{-1})$ e $Y_{p/s} (\text{mol}_p \cdot \text{mol}_s^{-1})$, com base nas vias glicolítica e PFL. Tendo-se a xilose como substrato e considerando-se a formação dos ácidos láctico, acético e succínico, o total líquido de ATP formado em anaerobiose seria de 1 mol de ATP por mol de ácido láctico e 2 mols de ATP por mol de ácido acético ou ácido succínico. Os valores encontrados em pH 6,2, 6,5, 7,0 e 8,0 foram de 10,839, 5,513, 4,645 e 6,381 ($\text{g}_x \cdot \text{mol}_{\text{ATP}}^{-1}$), respectivamente.

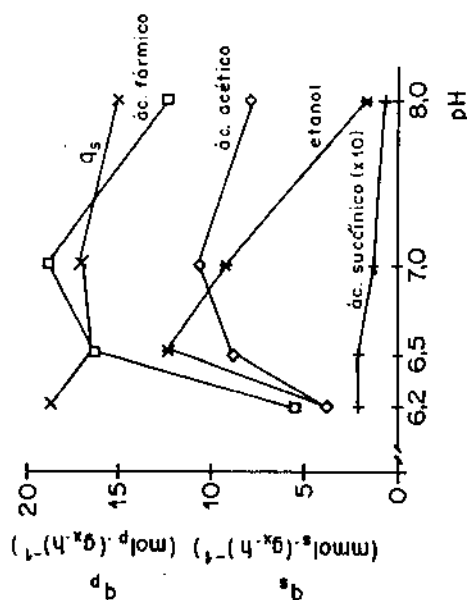


Fig. 6. Efeito do pH sobre as taxas específicas de consumo de xilose (q_s) e de formação de produtos (q_p) de culturas de *B. stearotheophilus* lld-15. Condições de cultivo: meio BSTCM; temperatura - 65°C ; agitação - 200 rpm; anaerobiose - N_2 (4 l.min $^{-1}$); taxa de diluição - 0,1 h $^{-1}$; substrato - xilose (66,607 mM).

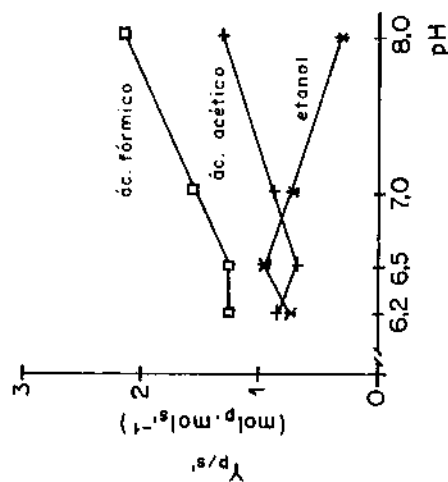


Fig. 5. Variação de $Y_{p/s}$ em função de alteração do pH. *B. stearotheophilus* lld-15 foi cultivado em cultura contínua no meio BSTCM, tendo xilose como substrato, em anaerobiose - N_2 (4 l.min $^{-1}$), a 65°C , com uma taxa específica de crescimento (μ) de 0,1 h $^{-1}$ e com uma velocidade de agitação de 200 rpm.

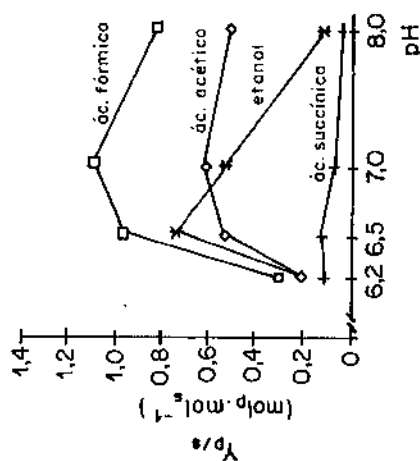


Fig. 4. Variação de $Y_{p/s}$ em função da alteração do pH. *B. stearotheophilus* lld-15 foi cultivado em cultura contínua no meio BSTCM, tendo xilose como substrato, em anaerobiose - N_2 (4 l.min $^{-1}$), a 65°C , com uma taxa específica de crescimento (μ) de 0,1 h $^{-1}$ e com uma velocidade de agitação de 200 rpm.

2. Crescimento de Bacillus stearothermophilus Ild-15 em Meio Definido, Tendo Sacarose como Fonte de Carbono e em Aerobiose.

Apesar da aparente estabilidade da bactéria no meio complexo, foi observado, no experimento anterior, que a bactéria apresentava dificuldade em iniciar seu crescimento em fermentador a 70°C. Ficou, portanto, demonstrado que o meio complexo não era capaz de fazer com que o microrganismo superasse esse problema. Requerimento nutricional não podia ser a causa do fenômeno, porque, uma vez iniciado o crescimento, o microrganismo se comportava normalmente, atingindo o regime estacionário esperado.

Durante a preparação do meio de cultura, constatou-se que este se tornava turvo antes da esterilização e marrom, com sedimento escuro, após autoclavagem. A precipitação de sais não foi evitada pelos agentes quelantes do meio (EDTA e ácido cítrico). Por este motivo, além do meio BSTSM, foram preparados 40 l de meio com adição de apenas 1,0 mg.l⁻¹ de FeCl₃, o qual foi denominado meio G. À metade deste meio, foi acrescentado CaCl₂, de modo a se obter uma concentração final de 5,0 mg.l⁻¹. A estabilidade do microrganismo foi, portanto, investigada, em condições aeróbicas (2,0 vvm de ar) nos meios BSTSM e G sem e com adição de CaCl₂. Nestes três meios, a xilose foi substituída pela sacarose.

A redução feita no teor de FeCl₃ do meio não mais causou precipitação de ferro. O meio ficou transparente e sem coloração. A adição de 5,0 mg.l⁻¹ de CaCl₂ foi suficiente para provocar turvação. Mesmo assim, este meio foi usado para comparar, em batelada, o efeito dos dois diferentes precipitados sobre a bactéria.

Pode ser visto na Figura 7(a) que, durante o crescimento da bactéria, em batelada, não foi detectada a fase "lag" e a máxima

produção de células ocorreu em duas horas. O μ_{MAX} obtido pela equação de regressão linear ($r^2 = 0,997$), foi de $0,832 \text{ h}^{-1}$, o que corresponde a um θ_g de 50 minutos. Ao mesmo tempo, não foi observada a fase de desaceleração. O declínio no crescimento ocorreu logo após a bactéria ter atingido a formação máxima de célula.

A Figura 7(b) apresenta o comportamento da bactéria em meio G sem e com a adição de cálcio. Observa-se que, em ambos os casos, a produção de células foi significativamente maior que aquela obtida com o meio BSTSM (Fig. 7(a)). O meio G, sem adição de cálcio, apresentou uma fase "lag" de, aproximadamente, 2 horas, enquanto que no meio G, com adição de $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de CaCl_2 , esta fase não foi detectada. A fase de desaceleração pode ser observada no meio G com e sem adição de cálcio.

O μ_{MAX} determinado pela equação de regressão linear ($r^2 = 0,990$), foi de $0,690 \text{ h}^{-1}$, para o microrganismo crescido em meio G sem adição de CaCl_2 . O μ_{MAX} no meio G com adição de CaCl_2 não foi determinado por ter apresentado uma fase exponencial muito curta. O Bacillus stearothermophilus lld-15 apresentou, aparentemente, um μ_{MAX} mais alto no meio BSTSM que no meio G.

Deve-se enfatizar que várias transferências de inóculo foram feitas para que houvesse crescimento do microrganismo nos diferentes meios, em fermentador. Esse problema tem ocorrido tanto em meio complexo como em meio definido.

O comportamento do Bacillus stearothermophilus crescido em cultura contínua, usando os meios BSTSM e G sem adição de CaCl_2 , está apresentado na Figura 8. Constata-se que, no meio BSTSM, o microrganismo não encontra condições de estabilidade e nem consegue atingir um crescimento razoável. Em 20 horas, a bactéria se encontrava ainda numa fase de adaptação às novas condições de cultivo. A partir daí, houve uma reação transiente de aumento da massa celular, mas sem atingir a estabilidade própria do processo

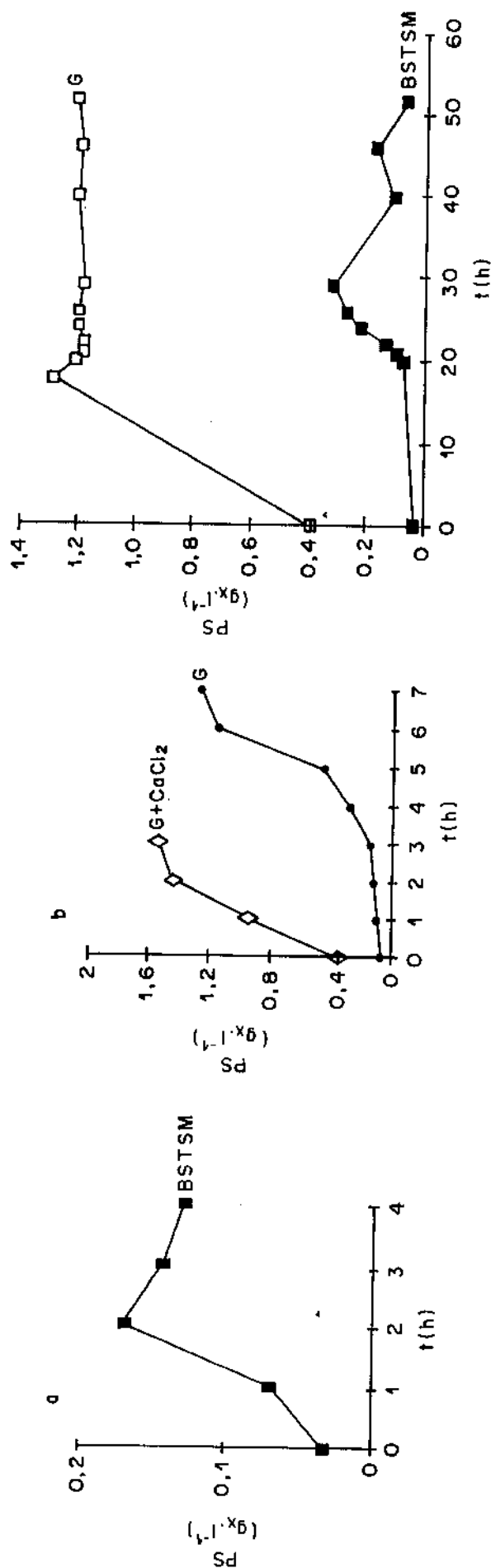


Fig. 7. Crescimento de *B. stearrowthermophilus* 11d-15 em três diferentes meios de cultura. Condições de cultivo: meio - BSTSM (a); meio G sem adição de $CaCl_2$ (b); meio G + 5,0 mg.1⁻¹ de $CaCl_2$ (c); temperatura - 70°C; agitação - 600 rpm; aeração - 2 vvm de ar; batelada; substrato - sacarose (24,214 mM).

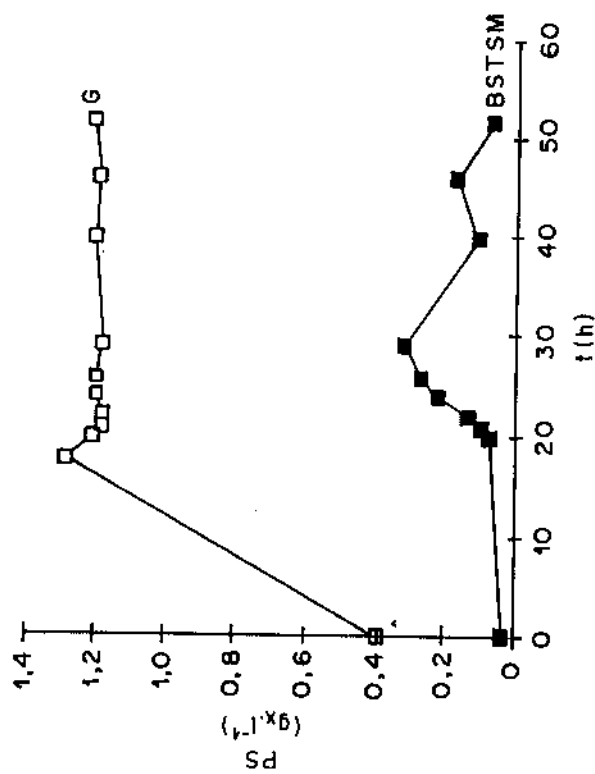


Fig. 8. Crescimento de *B. stearrowthermophilus* 11d-15 nos meios G e BSTSM em cultura contínua. Condições de cultivo: temperatura - 70°C; agitação - 600 rpm; aeração - 2 vvm de ar; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - sacarose (24,214 mM).

contínuo. Isso mostra que a taxa específica de crescimento celular pode variar com o tempo, dependendo da composição química do meio de cultivo. A oscilação observada sempre mostra a tendência de se obter um platô cada vez mais baixo. Isso pode ser visto nos períodos de tempo compreendidos entre 20 e 50 horas.

No meio G, constatou-se que o microrganismo atingiu o regime estacionário em 20 horas, ou seja, o correspondente a $5 t_h$, e que se manteve estável durante todo o período que durou o experimento (52 h).

Convém salientar que no meio complexo (BSTCM) utilizado no experimento anterior não foi observada precipitação. Isso se deve ao fato de que componentes deste meio possuem características quelantes importantes capazes de evitar a precipitação de sais de ferro. Tais componentes podem estar presentes no extrato de levedura e triptona. Mesmo assim, deve-se considerar que o referido meio não está, por definitivo, livre da formação de precipitados.

O precipitado, observado no meio BSTSM, foi provocado pela adição de $7,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ FeCl}_3$. O meio G, caracterizado pela redução na adição de FeCl_3 de $7,0 \text{ mg.l}^{-1}$ para $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, se mostrou adequado ao crescimento aeróbico do Bacillus stearothermophilus lld-15 e livre de formação de precipitados que comprometem o crescimento.

Ficou ainda para ser identificado os fatores responsáveis pela inibição que se observa com freqüência no início da fermentação. O precipitado de sais de ferro não está envolvido neste tipo de inibição, pois, mesmo com os meios G e $\text{G} + \text{CaCl}_2$, foi necessário se efetuar repetidas inoculações, para se iniciar o crescimento.

2.1. Transição de Aerobiose para Anaerobiose.

O meio G, sendo mais adequado ao crescimento de Bacillus stearothermophilus lld-15, foi considerado o meio base para investigações sobre processos transientes e participação de alguns

componentes do meio na manutenção do crescimento e na formação de produtos de fermentação.

A Figura 9 apresenta a resposta do microrganismo à transição do processo aeróbico para o anaeróbico. Inicialmente, o regime estacionário foi atingido em condições aeróbicas (2 vvm de ar) com um D de $0,240 \text{ h}^{-1}$. Quando as condições anaeróbicas foram estabelecidas, o crescimento foi sensivelmente afetado. O valor de d_c , definido como $d_c = j_L + D$, observado no intervalo de 52 e 68 horas, e calculado pela equação:

$$x = x_0 e^{-(j_L + D)t}$$

ou
$$x = 1752976,3583 e^{-0,273t}; \quad (r^2 = 0,999)$$

foi de $0,273 \text{ h}^{-1}$ e obtendo-se, portanto, um j_L de $0,033 \text{ h}^{-1}$. A redução de D de $0,240$ para $0,1 \text{ h}^{-1}$ e nem o sistema de batelada foram capazes de recuperar o crescimento.

A Figura 10 mostra a resposta da bactéria a diferentes vvm de ar e à transição de aerobiose para anaerobiose. O volume de ar foi reduzido para $0,1 \text{ vvm}$, visando diminuir o impacto anaeróbico durante a transição.

Como o μ_{MAX} da bactéria poderia estar bem abaixo de $0,240 \text{ h}^{-1}$, optou-se, arbitrariamente, por fixar o valor de D em $0,070 \text{ h}^{-1}$, ao invés de $0,240 \text{ h}^{-1}$. Com a modificação, a permanência do microrganismo no fermentador se tornou maior; o t_h , neste caso, foi de 14 h e 17 min. contra 4 h e 10 min. do experimento anterior.

Os resultados indicam que o crescimento não foi significativamente afetado pela redução do volume de ar de $0,5$ para $0,1 \text{ vvm}$. Mas a anaerobiose modificou, sensivelmente, o comportamento da bactéria. O valor de d_c , para a fase de transição, no intervalo de 76 e 101 horas, foi de $0,0995$, calculado pela equação:

$$x = x_0 e^{-(j_L + D)t}$$

ou
$$x = 1742,068 e^{-0,0995t}; \quad (r^2 = 0,996)$$

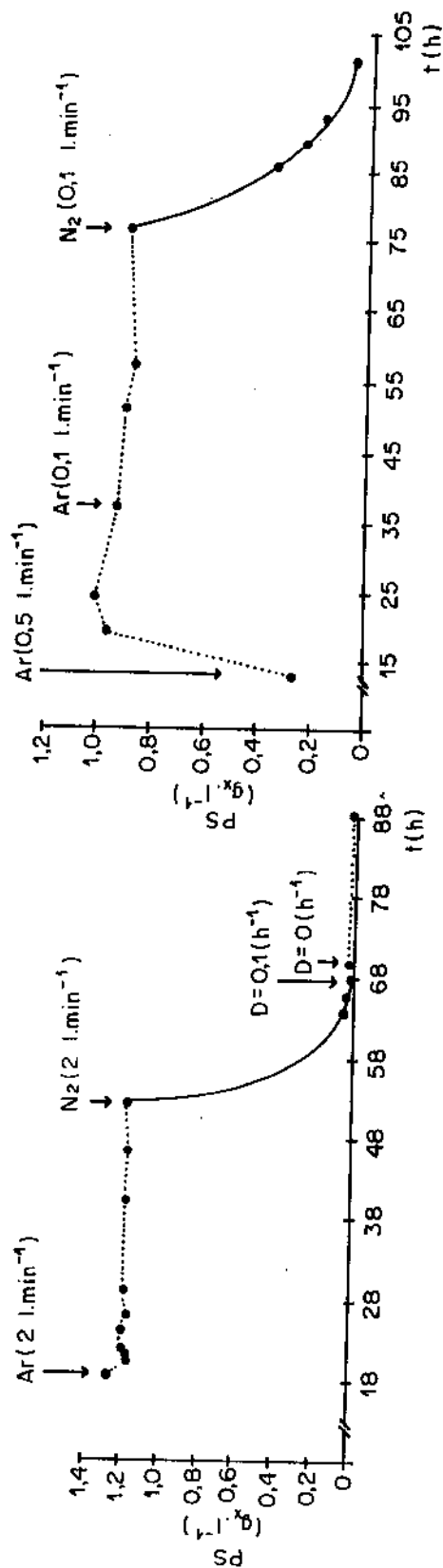


Fig. 9. Resposta do *B. stearrowthermophilus* 11d-15 à transição de aerobiose para anaerobiose. Após ter atingido o regime estacionário em condições aeróbicas (2 vvm de ar), o ar foi substituído por N_2 livre de oxigênio (indicado pela seta). Na tentativa de recuperar o crescimento do microrganismo, a taxa de diluição foi alterada para $0,1 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ e finalmente instaurou-se o sistema batelada. Condições de cultivo: meio - G; temperatura - 70°C ; agitação - 600 rpm; aeração - como indicada; substrato - sacarose (24,214 mM); taxa de diluição inicial - $0,240 \text{ h}^{-1}$, e alterada como indicada. Linha cheia indica a parte do gráfico traçado com os valores calculados pela equação: $X=1752976,36e-0,273t$, $r^2 = 0,999$.

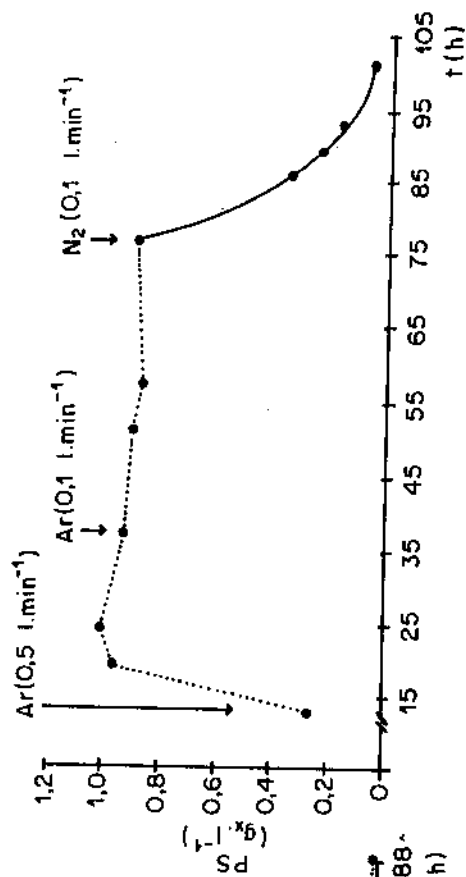


Fig. 10. Comportamento de *B. stearrowthermophilus* 11d-15 em função do fluxo de ar e da transição de aerobiose para anaerobiose. Após ter atingido o regime estacionário em $0,5 \text{ vvm}$ de ar, o fluxo deste foi alterado para $0,1 \text{ vvm}$. Tendo sido estabelecido o novo regime, as condições anaeróbicas foram instauradas, substituindo o ar por $0,1 \text{ (l.min}^{-1}\text{)}$ de N_2 livre de oxigênio, como indicado pela seta. Condições de cultivo: meio - G; temperatura - 70°C ; agitação - 600 rpm; aeração - como indicada; substrato - sacarose (24,214 mM); taxa de diluição - $0,070 \text{ h}^{-1}$. Linha cheia indica o traçado obtido com os valores calculados pela equação $X=1742,07e-0,099t$, $r^2 = 0,996$.

O j_l foi, portanto de $0,030 \text{ h}^{-1}$.

2.2. Ação do CaCl_2 sobre o Crescimento e Metabolismo Celular

Foi observado no experimento anterior, que a bactéria apresenta um bom crescimento em condições parcialmente aeróbicas. No entanto, quando a aeração foi interrompida, iniciou-se um processo lítico, que pareceu ser irreversível. A irreversibilidade poderia ser controlada por agentes estabilizadores, como CaCl_2 , ou por um processo de adaptação do microrganismo às novas condições. Foram, então, preparados três meios de cultura com níveis diferentes de CaCl_2 : G - meio G sem adição de CaCl_2 , G1 - meio G com adição de $5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de CaCl_2 ; G2 - meio G com adição de $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de CaCl_2 . O microrganismo foi cultivado nestes meios em condições parcialmente aeróbicas ($0,1 \text{ vvm}$ de ar), com um μ de $0,070 \text{ h}^{-1}$. Em G1d o microrganismo foi mantido no meio G1 com um μ de $0,136 \text{ h}^{-1}$ e em G2d a bactéria foi crescida no meio G2 com um μ de $0,240 \text{ h}^{-1}$.

A Figura 11(a) mostra a ação do CaCl_2 sobre o comportamento da bactéria. Considerando, inicialmente, apenas G, G1 e G2, observa-se que o menor crescimento e o menor $Y_{x/s}$ foram obtidos em G2. A análise estatística revelou diferenças, altamente significativas, entre o crescimento do microrganismo nas três condições, o mesmo ocorrendo com o $Y_{x/s}$.

Quando o valor de D do meio G1 foi alterado de $0,07 \text{ h}^{-1}$ para $0,136 \text{ h}^{-1}$ (G1d) e o do meio G2 para $0,240 \text{ h}^{-1}$ (G2d), a bactéria mostrou sensibilidade ao meio G1, não atingindo o regime estacionário, e o arraste de células foi inevitável. Na Figura 11(a), pode-se constatar que, em G2d, a bactéria apresentou um crescimento e um $Y_{x/s}$ significativamente maiores que nas demais condições estudadas. Os valores de q_s e de Q_s (Fig. 11(b)) foram mais altos em G2d. O q_s , no entanto, foi menor em G1.

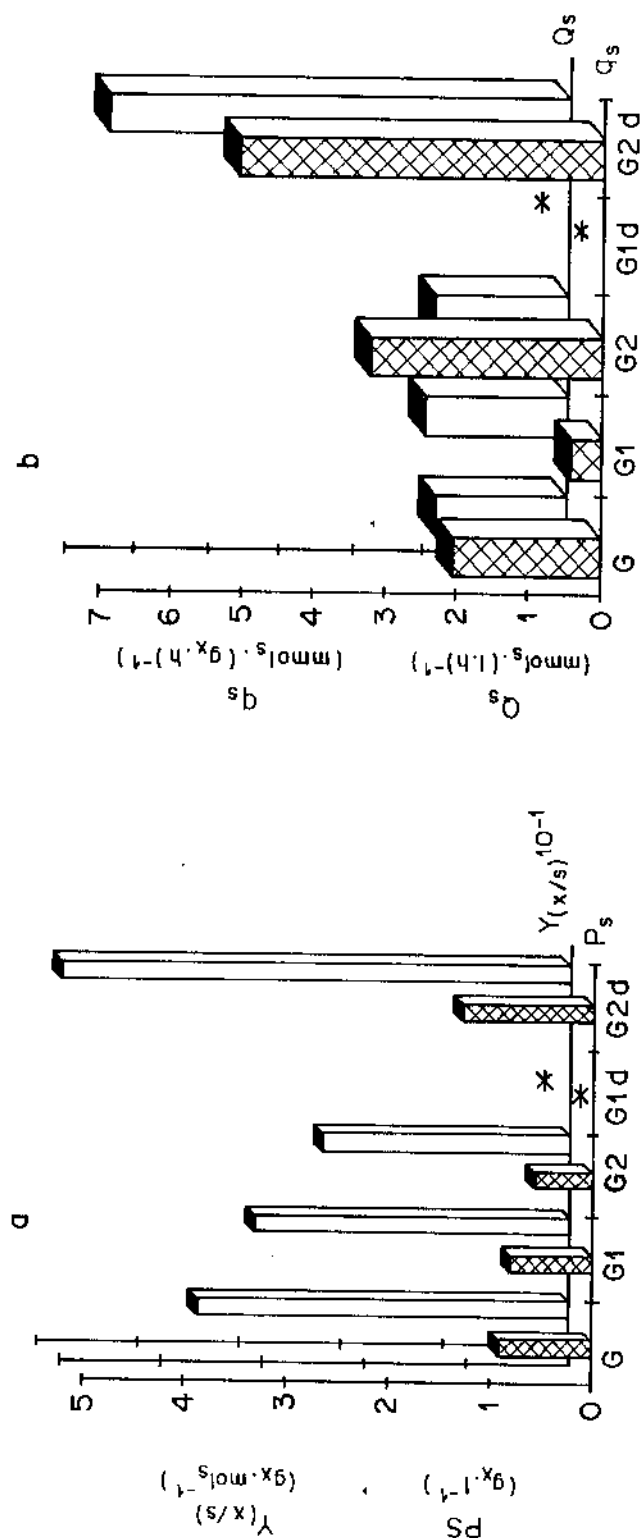


Fig. 11. Influência da adição de $CaCl_2$ e de diferentes taxas de diluição sobre o comportamento do *B. stearothermophilus* 11d-15. (a) crescimento e fator de conversão e (b) taxa específica (q_s) e volumétrica (Q_s) de consumo de substrato. Condições de cultivo: meio G - sem adição de cálcio; meio G1 - G com 5,0 mg.l⁻¹ de $CaCl_2$; meio G2 - G com 2,5 mg.l⁻¹ de $CaCl_2$. A taxa de diluição para estes três meios foi de 0,070 h⁻¹. G1d corresponde ao cultivo do microrganismo em meio G1, mas com uma taxa de diluição de 0,136 h⁻¹, e G2d se refere ao cultivo do *Bacillus* em meio G2, mas com uma taxa de diluição de 0,240 h⁻¹; temperatura - 70°C; pH - 7,0; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; substrato - sacarose (24,214 mM); taxa de diluição - como indicada. *Regime estacionário não atingido.

Pelas concentrações (Fig. 12(a)), pelos fatores de conversão (Fig. 12(b)) e pelas taxas específicas de formação (Fig. 13) de etanol e de ácido acético, percebe-se a influência da adição de 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂ e a importância da taxa de diluição sobre o metabolismo da bactéria.

O meio G com e sem 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂ permitem igual crescimento do microrganismo.

2.2.1. Crescimento em Diferentes valores de D, em Meio com e sem Adição de CaCl₂; Obtenção do Fator de Conversão Verdadeiro ($Y_{x/sc}$) e do Coeficiente de Manutenção (m).

A Figura 14 apresenta a resposta do microrganismo crescido em meio G, sem metionina, no qual foi adicionado CaCl₂ (2,5 mg.l⁻¹) e em diferentes taxas específicas de crescimento. A metionina foi removida do meio porque, em condições parcialmente aeróbicas, foi verificado que a bactéria não requer este aminoácido para seu crescimento. Observa-se que o número de células cresce quando μ aumenta de 0,06 a 0,36 h⁻¹; há um período de estabilidade no número de células a partir de 0,36 a, aproximadamente, 0,60 h⁻¹. Quando μ aumenta para 0,66 h⁻¹, o número de células se reduz, mas a cultura atinge o regime estacionário. Mesmo com um D de 0,78 h⁻¹, não se observa arraste total; o regime estacionário se estabelece, embora a concentração celular se mantenha em níveis baixos. O mesmo comportamento se verifica com o $Y_{x/s}$. O valor de q_s aumenta com o incremento de μ . É importante observar que, ao contrário dos demais parâmetros, Δ_s se mantém constante durante a variação de μ na faixa de 0,06 a 0,66 h⁻¹.

A taxa volumétrica de consumo para a manutenção [$(\mu \cdot Y_m^{-1})x$] foi alta, quando μ foi mantido em 0,06 h⁻¹ (Figs. 15(a) e 15(b)). À medida que a taxa de diluição aumenta, o consumo de substrato destinado ao crescimento [$(\mu \cdot Y_{x/sc}^{-1})x$] acompanha o comportamento

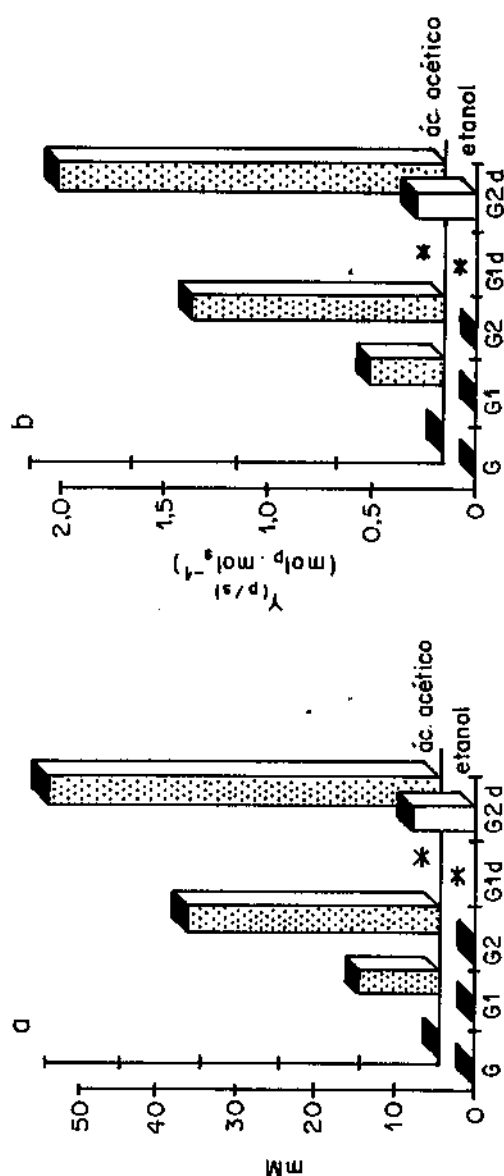


Fig. 12. Produções de etanol e ácido acético por *B. stearothermophilus* 11d-15 em diferentes condições de cultivo. (a) concentração dos produtos (mM) e (b) fator de conversão (Y_p/s). Condições de cultivo: meio G - sem adição de cálcio; meio G1 - G com 5,0 mg.l⁻¹ de CaCl₂; meio G2 - G com 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂. A taxa de diluição para estes três meios foi de 0,070 h⁻¹. G1d corresponde ao cultivo do microrganismo em meio G1, com uma taxa de diluição de 0,136 h⁻¹, e G2d se refere ao cultivo do *Bacillus* em meio G2, com uma taxa de diluição de 0,240 h⁻¹; temperatura - 70°C; pH - 7,0; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; substrato - sacarose (24,214 mM); taxa de diluição - como indicada. *Regime estacionário não atingido.

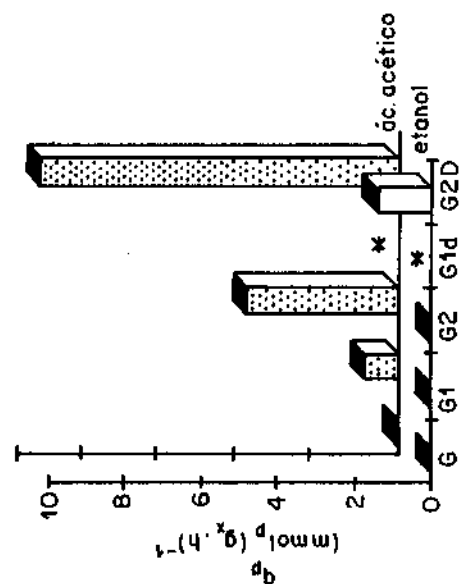


Fig. 13. Taxa específica de formação de produtos (q_p) por *B. stearothermophilus* 11d-15 em diferentes condições de cultivo. (a) concentração dos produtos (mM) e (b) fator de conversão (Y_p/s). Condições de cultivo: meio G - sem adição de cálcio; meio G1 - G com 5,0 mg.l⁻¹ de CaCl₂; meio G2 - G com 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂. A taxa de diluição para estes três meios foi de 0,070 h⁻¹. G1d corresponde ao cultivo do microrganismo em meio G1, com uma taxa de diluição de 0,136 h⁻¹, e G2d se refere ao cultivo do *Bacillus* em meio G2, com uma taxa de diluição de 0,240 h⁻¹; temperatura - 70°C; pH - 7,0; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; substrato - sacarose (24,214 mM); taxa de diluição - como indicada. *Regime estacionário não atingido.

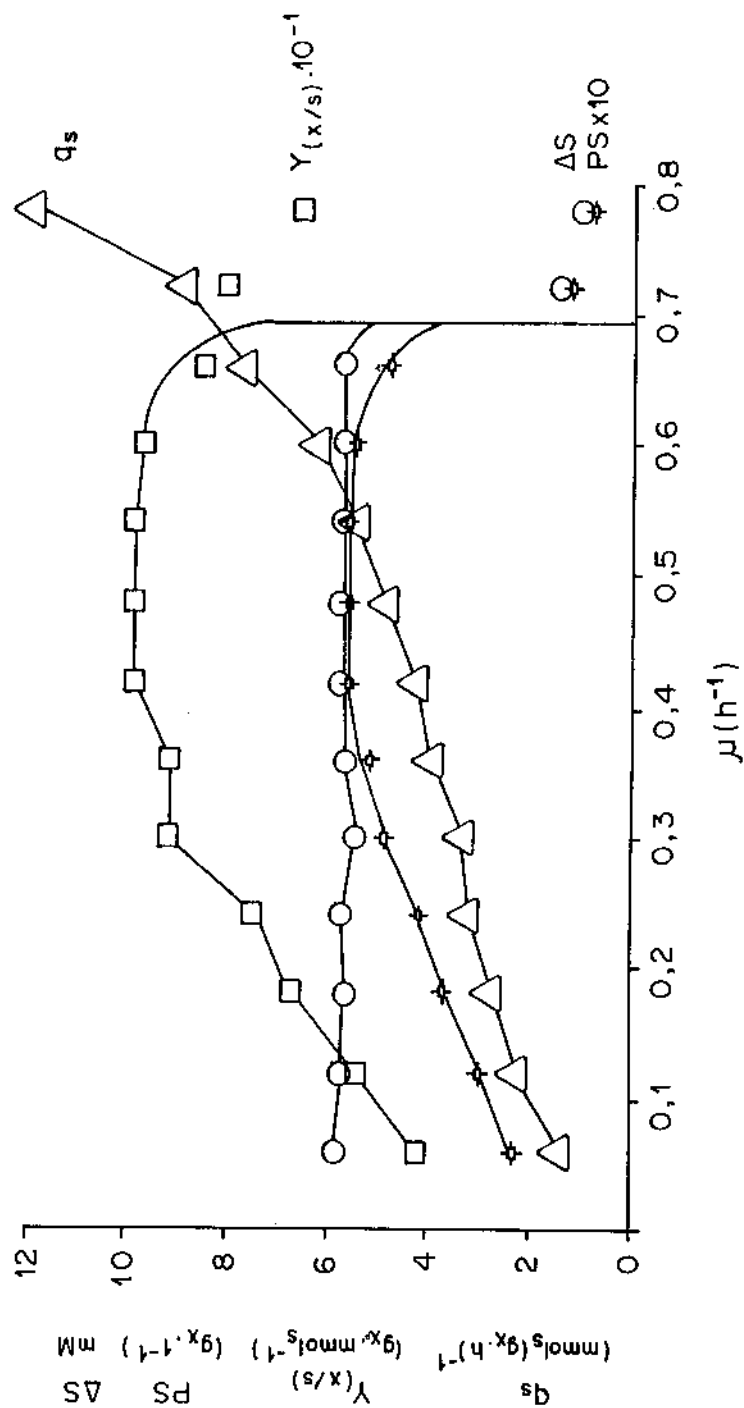


Fig. 14. Efeito da taxa específica de crescimento sobre a formação de células, $Y_{(x/s)} \cdot q_s$ e ΔS . Condições de cultivo: meio - G com adição de 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂ e sem metionina; temperatura - 70°C; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; taxa específica de crescimento - como indicada; substrato - sacarose (5,843 mM).

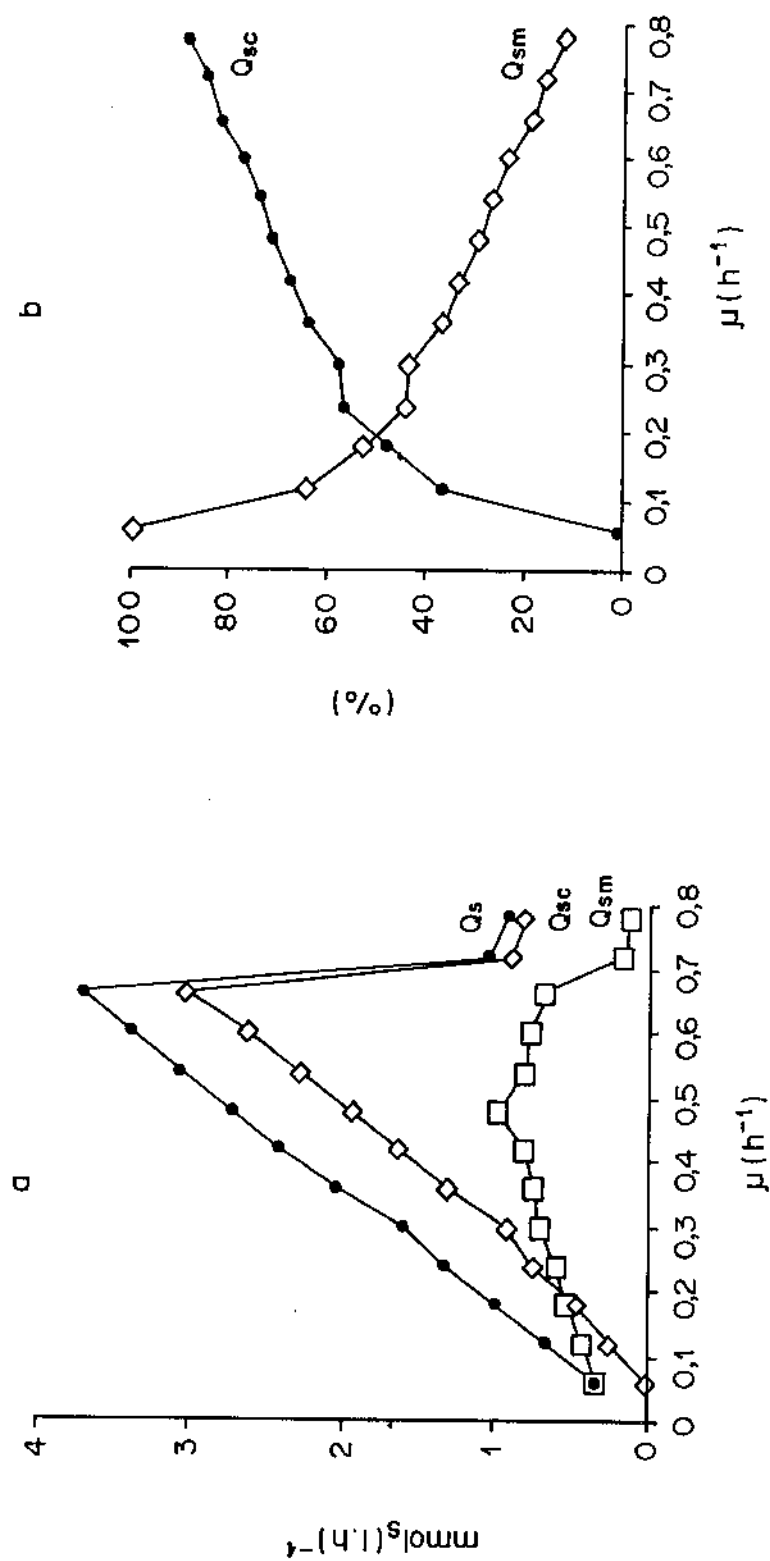


Fig. 15. Taxa volumétrica de consumo de substrato em função da taxa específica de crescimento. Q_s = consumo total, Q_{sc} = consumo destinado ao crescimento e Q_{sm} = consumo para a manutenção. Condições de cultivo: meio - G com adição de 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂ e sem metionina; temperatura - 70°C; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; taxa específica de crescimento - como indicada; substrato - sacarose (5,843 mM).

gráfico relativo ao consumo total $[(\mu \cdot Y_{x/s}^{-1})x]$. Em termos percentuais (Fig. 15(b)), observa-se que, com o aumento de μ , o consumo de substrato para o crescimento aumenta, mas o consumo para a manutenção celular decresce. Verificou-se que a concentração celular se mantém constante (Fig. 14), quando o consumo para o crescimento atinge 63% do consumo total (Fig. 15(b)).

A variação nos parâmetros fisiológicos do microrganismo, quando este é mantido em meio sem adição de CaCl_2 e em diferentes valores de μ está apresentada na Figura 16(a). Observa-se, como no meio com adição de CaCl_2 (Fig. 15), que a concentração celular cresce com o aumento da taxa de diluição, nos limites de 0,12 a 0,36 h^{-1} , o mesmo ocorrendo com os demais parâmetros. A Figura 16(b) revela que a taxa volumétrica de consumo de substrato para formação de células, em termos percentuais, cresce, com um correspondente decréscimo no consumo de substrato para a manutenção, em função do aumento de μ . O valor percentual da taxa volumétrica de consumo para o crescimento, em 0,36 h^{-1} , foi de, aproximadamente, 59% do consumo total.

A Figura 17 contempla um gráfico da dupla recíproca de $1/Y$ contra $1/\mu$, para obtenção dos coeficientes de manutenção celular, nos meios com e sem adição de CaCl_2 . Foram encontrados coeficientes de manutenção de 1,428 e 1,698 $\text{mmol}_s \cdot (\text{g}_x \cdot \text{h})^{-1}$ nos meios com e sem adição de cálcio, respectivamente. Verifica-se que a faixa linear se encontra apenas nos valores de μ compreendidos entre 0,12 e 0,36 h^{-1} .

O fator de conversão máximo teórico foi calculado pela equação da regressão linear entre os diferentes valores de μ e as taxas específicas de consumo de substrato (Fig. 18). Percebe-se, pelo comportamento gráfico e pelos valores numéricos, que é desprezível a diferença existente entre os valores $Y_{x/sc}$ nos dois meios. Os

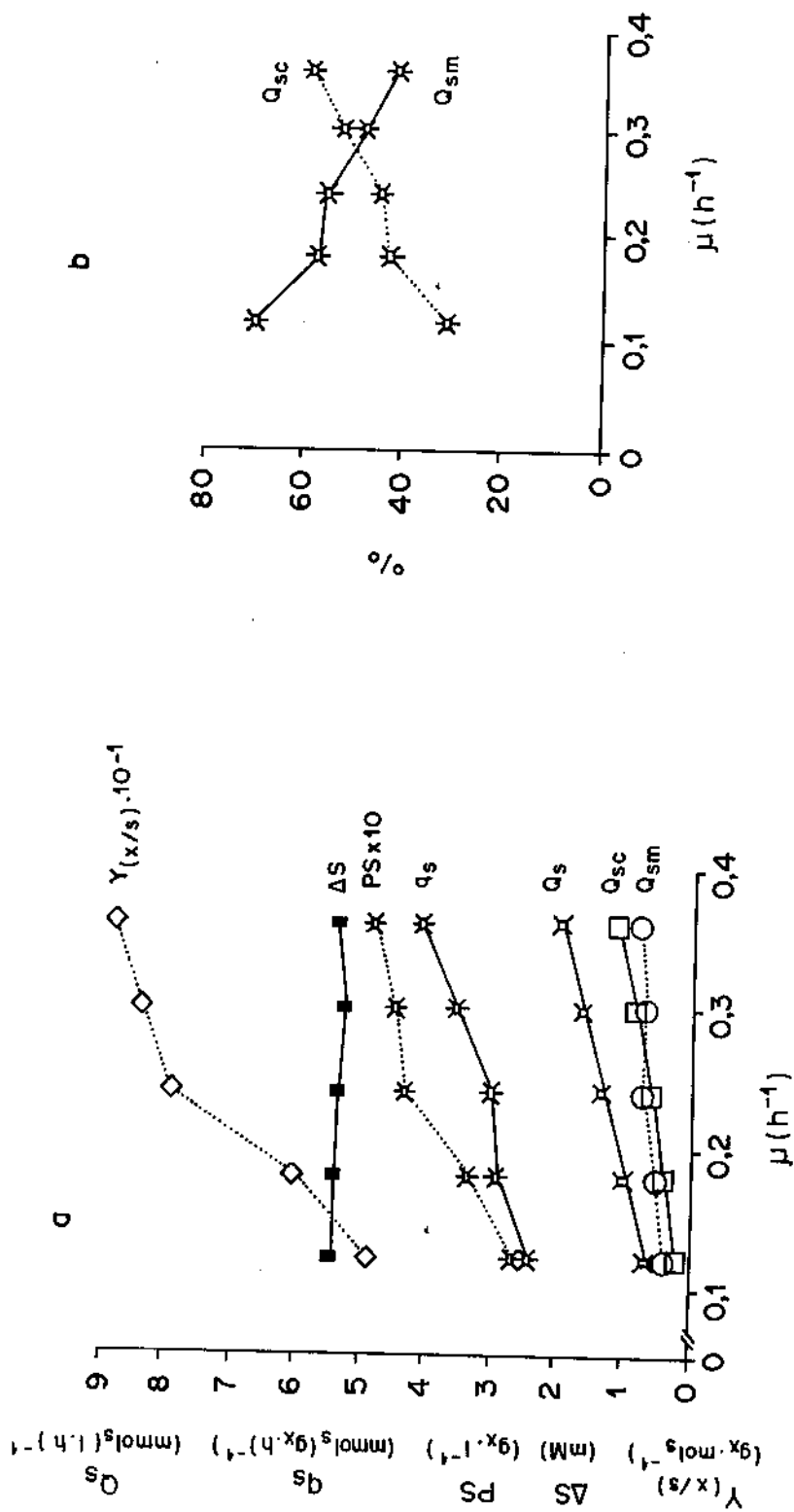


Fig. 16. Efeito da taxa específica de crescimento sobre a produção de células, $Y(x/s)$, q_s , ΔS e Q_{sc} = consumo total, Q_{sm} = consumo destinado ao crescimento e Q_{sm} = consumo para a manutenção. Condições de cultivo: meio - G sem adição de $CaCl_2$ e sem metionina; temperatura - 70°C; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; taxa específica de crescimento - como indicada; substrato - sacarose (5,843 mM).

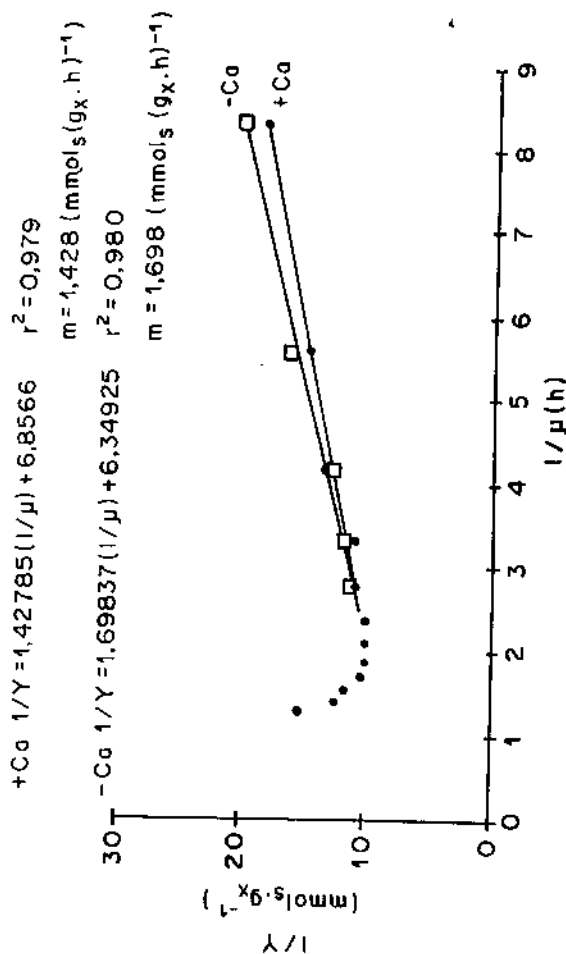


Fig. 17. Gráfico da dupla recíproca de $1/Y$ contra $1/\mu$ para *B. stearothermophilus* cultivado em condições limitantes de sacarose com (●) e sem (□) adição de CaCl_2 . Condições de cultivo: meio G sem metionina; temperatura - 70°C ; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; aeração 0,1 vvm de ar; taxa específica de crescimento - como indicada; substrato - sacarose (5,843 mM).

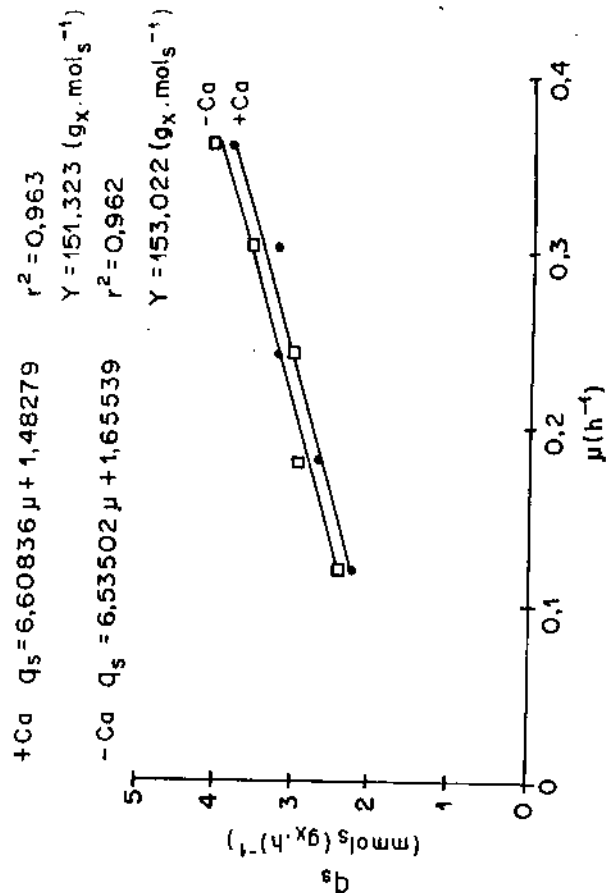


Fig. 18 Taxa específica de consumo de sacarose em função da taxa específica de crescimento de culturas de *B. stearothermophilus* 11d-15 mantidas em condições limitantes de sacarose com (●) e sem (□) adição de CaCl_2 . Condições de cultivo: meio G sem metionina; temperatura - 70°C ; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; taxa específica de crescimento - como indicada; substrato - sacarose (5,843 mM).

fatores de conversão máximos encontrados nos meios com e sem adição de cálcio foram 151,323 e 153,022 $g_x \cdot mol_s^{-1}$, correspondendo a 44,7 e 44,2 % do mol de substrato, respectivamente. É preciso considerar que os valores de m e de $1/Y_{x/sc}$ calculados foram obtidos com equações diferentes para se evitar números decorrentes de extrapolações.

Os valores de $Y_{x/sc}$, nas taxas de diluição compreendidas entre 0,12 e 0,60 h^{-1} para o microrganismo cultivado em meio com adição de 2,5 $mg \cdot l^{-1}$ de $CaCl_2$ e entre 0,12 a 0,36 h^{-1} sem adição de cálcio, foram calculados por:

$$Y_{x/sc} = \mu x / [(\mu x / Y_{x/s}) - m x]$$

obtendo-se uma média de 142,25 $g_x \cdot mol^{-1}$ e de 158,52 $g_x \cdot mol^{-1}$, respectivamente.

Pode-se observar, na Figura 14 que, dentro de certos limites de μ , q_s é realmente uma função linear de μ , ou seja,

$$q_s = \mu (1/Y_{x/sc}) + m$$

como apresentado na figura 18. O valor de m dentro deste limite de μ seria:

$$\mu/Y_{x/s} = \mu (1/Y_{x/sc}) + m$$

$$m = \mu/Y_{x/s} - \mu/Y_{x/sc}$$

No entanto, verifica-se que, a partir de 0,54 h^{-1} (Fig. 14), q_s varia, em relação a μ , de uma forma exponencial, ou seja,

$$q_s = (q_s)_0 e^{q\mu}$$

$$q_s = 0,936 e^{3,204\mu}; \quad (r^2 = 0,981)$$

Os coeficientes $(q_s)_0$ e q foram, portanto, de 0,936 $mmol_s(g_x \cdot h)^{-1}$ e 3 h e 12 min., respectivamente.

Em virtude da dificuldade de se obter um arraste de células completo em taxas de diluição acima de μ_{MAX} , o processo dinâmico para o cálculo desse parâmetro não foi utilizado. Para a obtenção de K_s foi considerado o valor de μ_{MAX} calculado em batelada, ou seja, $0,69 \text{ h}^{-1}$. A concentração de $\tilde{s}$ sendo muito pequeno ou quase desprezível no meio, torna sua análise química difícil e imprecisa. Logo, a obtenção de K_s pela equação:

$$\mu = \mu_{MAX} \tilde{s} / (K_s + \tilde{s})$$

fica prejudicada. O cálculo de K_s , envolvendo a concentração de substrato contido no reservatório (s_0), ao invés de $\tilde{s}$, se torna mais preciso. Para tal, é necessário considerar que:

$$\tilde{x} = Y_{x/s}(s_0 - \tilde{s})$$

$$D\tilde{x} = DY_{x/s}(s_0 - \tilde{s})$$

como

$$\tilde{s} = K_s D / (\mu_{MAX} - D)$$

logo:

$$D\tilde{x} = DY_{x/s} \{s_0 - [K_s D / (\mu_{MAX} - D)]\}$$

Essa equação representa a produtividade de células no processo, para cada valor de D . A derivada primeira da equação, em relação a D , é positiva e a derivada segunda é negativa. Isso significa que a função é crescente e convexa. Portanto, achando-se a derivada primeira e igualando a zero, acha-se o valor de D , onde a produtividade é máxima, ou seja:

$$D_M = \mu_{MAX} \{ 1 - [K_s / (K_s + s_0)]^{1/2} \}$$

A Figura 19 indica a variação da produtividade em função da taxa específica de crescimento. A produtividade de células (Dx) atingiu o máximo $0,326 \text{ g}_x \cdot (\text{l.h})^{-1}$, quando a taxa específica de crescimento foi de $0,6 \text{ h}^{-1}$. Assim, K_s foi determinado pela equação acima, tendo sido encontrado o valor de $1,01 \times 10^{-4} \text{ M}$.

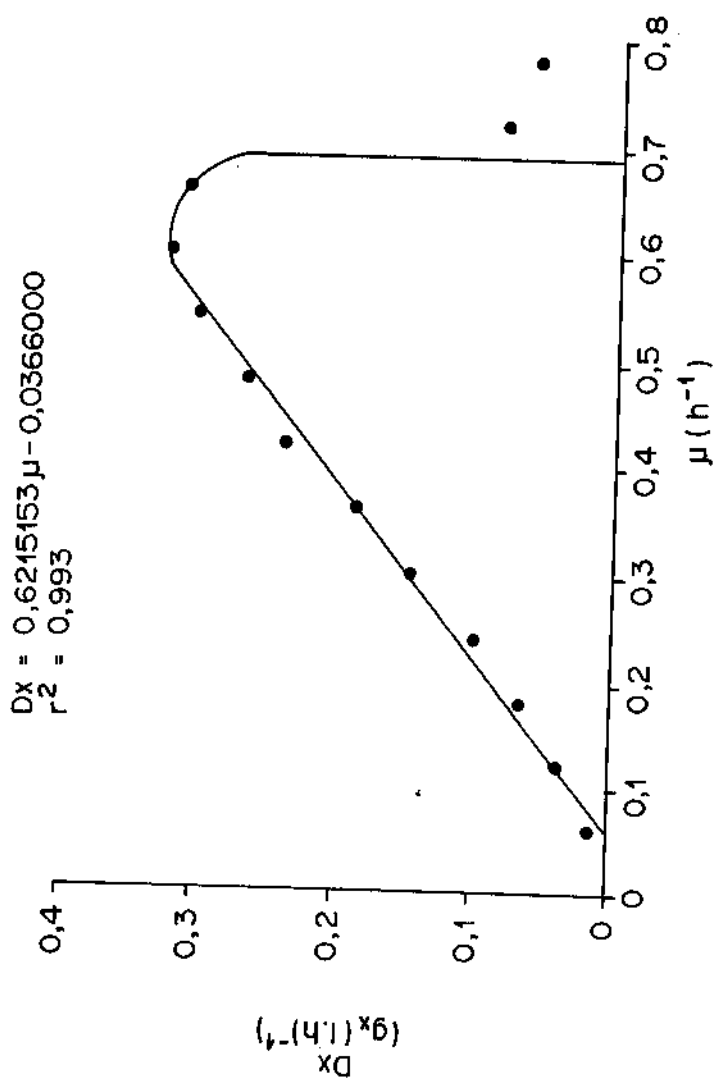


Fig. 19. Produtividade de células de *B. stearothermophilus* IId-15 crescidas em condições limitantes de sacarose. Condições de cultivo: meio - G com adição de 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂ e sem metionina; temperatura - 70°C; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; aeração - 0,1 vvm de ar; taxa específica de crescimento - como indicada; substrato - sacarose (5,843 mM). A equação se refere a faixa de μ entre 0,06 e 0,6h⁻¹.

A taxa específica de crescimento crítica, D_c ou μ_c ($0,690 \text{ h}^{-1}$), foi obtida pela equação:

$$D_c = [(\mu_{\text{MAX}} s_0) / (K_s + s_0)].$$

A eficiência de utilização de substrato é definida como a relação entre Y_E e $Y_{X/S}$. Assim :

$$Y_E/Y_{X/S} = (x/s_0) / [x/(s_0 - s)]$$

$$Y_E/Y_{X/S} = (s_0 - s) / s_0$$

$$Y_E/Y_{X/S} = \{s_0 - [K_s D / (\mu_{\text{MAX}} - D)]\} / s_0$$

O valor deste parâmetro foi de 99,99% no D_m .

A relação entre $Y_{X/S}$ e D foi semelhante àquela encontrada em reações de enzimas não alostéricas (Fig. 14), entre velocidade inicial de reação e concentração de substrato, ou seja,

$$Y_{X/S} = Y_{\text{MAX}} \mu / (\mu + K_u)$$

linearizando: $1/Y_{X/S} = (\mu + K_u) / Y_{\text{MAX}} \mu$

$$1/Y_{\text{MAX}} = (K_u/Y_{\text{MAX}}) 1/\mu + 1/Y_{\text{MAX}}$$

A solução desta equação leva ao mesmo resultado que se obteve na Figura 17, mas com um desdobramento para o cálculo da constante K_u . Isso mostra que $m = K_u/Y_{\text{MAX}}$. O CaCl_2 exibe efeito ativador, uma vez que, o valor de K_u é menor em meio no qual esse sal foi adicionado ($G + \text{CaCl}_2$: $K_u = 0,216 \text{ h}^{-1}$; G : $K_u = 0,260 \text{ h}^{-1}$). O traçado gráfico representa um comportamento semelhante à inibição enzimática competitiva, quando o cálcio não é adicionado.

Foi visto, anteriormente, que j_L teve um valor aproximado de $0,03 \text{ h}^{-1}$. É importante saber se o microrganismo, por exibir um K_u menor no meio com adição de cálcio, teve seu metabolismo alterado pela ação ativadora do CaCl_2 adicionado, ou se esse fato se deveu apenas a uma redução no valor de K_d . Para calcular K_d é necessário

considerar a variação de x_v , dentro do fermentador, ou seja,

$$dx_v/dt = \mu x_v - Dx_v - (j_m + j_l)x_v$$

No regime estacionário,

$$d\bar{x}_v/dt = 0$$

logo: $\mu \bar{x}_v = D\bar{x}_v + (j_m + j_l)\bar{x}_v$

ou $\mu = D + j_m + j_l$

onde: $K_d = j_m + j_l$

O arraste de células totais (x_{TOT}), ou seja, células viáveis (x_v) mais células mortas totais (x_d), deve ser compensado pelo crescimento das células viáveis (x_v). Caso contrário, haverá um arraste completo. Assim, pode-se expressar:

$$\mu \bar{x}_v = D\bar{x}_v + D\bar{x}_d$$

logo: $\bar{x}_v = D\bar{x}_{TOT} / (D + K_d)$

Com esta equação, pode-se calcular o número de células viáveis em diferentes taxas de diluição. Para tal, é necessário saber o valor de K_d com base no número de células totais viáveis, de onde, por diferença, se obtém o número de células não viáveis (x_d). A contagem de células totais em câmara de Thomas ou Neubauer não oferece precisão, para o caso do Bacillus stearothermophilus lld-15, por formar, em determinadas condições de cultivo, longos filamentos. O mesmo problema ocorre com a contagem de células em placas de Petri. Uma vez que, cada colônia crescida em meio sólido deve representar um indivíduo, o filamento resultante da não separação das células leva a uma redução importante no número de células viáveis. Além disso, esta linhagem não apresenta um bom crescimento em meio sólido. Isso se deve, provavelmente, à sensibilidade do microrganismo à mudança de estado físico do meio de cultura e não a um possível choque de temperatura durante a transferência das células do fermentador para a placa de Petri. Foi

observado que o microrganismo não perde viabilidade quando removido de altas (70 °C) para baixas (-20 °C) temperaturas, e nem de -20 °C para 70 °C, desde que o meio, a ser submetido ao congelamento, seja líquido. A difusão de produtos de fermentação em meio sólido é mais lenta que em meio líquido. Esses produtos se concentram em torno da microcolônia impedindo, desta forma, seu desenvolvimento. Como a contagem de células viáveis pelo método do NMP (número mais provável) se processa em meio líquido, este método, apesar de demorado, tem dado excelentes resultados. Pode-se, no entanto, pela equação acima, calcular o valor de K_d sem que se recorra a determinações imprecisas e demoradas de células viáveis. Assim, o rearranjo da equação:

$$x_v = Dx_{TOT}/(D + K_d)$$

conduz a

$$x_{TOT} = x_v + (1/D)x_v K_d$$

Traçando-se um gráfico de x_{TOT} contra $1/D$, obtém-se uma reta cuja inclinação representa $x_v K_d$ e o intercepto, x_v . Os valores de K_d do microrganismo foram 0,064 e 0,066 h⁻¹, quando crescido em meio com e sem adição de cálcio, respectivamente. Como pode ser visto, os valores de K_d , nos dois meios, são bem próximos.

2.2.2. Atividade Metabólica Durante Processos de Transição.

Em condições parcialmente aeróbicas, espera-se que parte do CO₂ evoluído se origine da descarboxilação do ácido pirúvico por ação direta da PDH. Não está ainda esclarecido se a FDH também pode participar do processo de evolução de CO₂, em condições parcialmente aeróbicas, assim como se a PDH é, verdadeiramente, a enzima responsável pela formação de CO₂ em condições anaeróbicas, como sugerem Hartley e Shama (1987). Na tentativa de esclarecer esses pontos, a evolução de CO₂, medida por espectrometria de massa, foi acompanhada durante os processos de transição. A Figura

20 mostra essa evolução, expressa em porcentagem do produto nos gases de saída do fermentador, em diferentes condições de transição.

A seção "A" corresponde à liberação de CO_2 pelo microrganismo, durante a transição de aerobiose para anaerobiose, em cultura contínua. Antes e após o período de transição, permitiu-se que a cultura atingisse o regime estacionário. Nota-se que, nesta parte do gráfico, a produção de CO_2 é reduzida a valores desprezíveis, ou seja, 0,015%, e assim permanece por, aproximadamente, 35 horas. Após este período de tempo, percebe-se que o CO_2 , embora em concentrações bem mais baixas que em aerobiose, volta a ser produzido, indicando haver o acionamento de um novo sistema enzimático capaz de restabelecer a liberação do gás. O novo regime estacionário se estabelece, quando sua concentração, nos gases de saída, atinge 0,65%.

Quando a aeração foi restabelecida (parte B), observou-se uma imediata resposta do microrganismo à produção de CO_2 , atingindo valores, nos gases de saída, acima de 10%.

Após ter sido atingido novo regime estacionário (seção C), o ar foi novamente substituído por N_2 e o processo contínuo foi modificado para batelada. Nessas condições, o microrganismo não produziu CO_2 .

Quando o sistema contínuo foi instaurado (parte D), a liberação de CO_2 se iniciou imediatamente, atingindo o regime estacionário em 25 horas e com uma porcentagem de 0,65% nos gases de saída.

Quando a aeração foi reiniciada (seção E), o microrganismo respondeu ao estímulo imediatamente. É importante que o comportamento do microrganismo em D e E se assemelha muito com aquele obtido em A e em B.

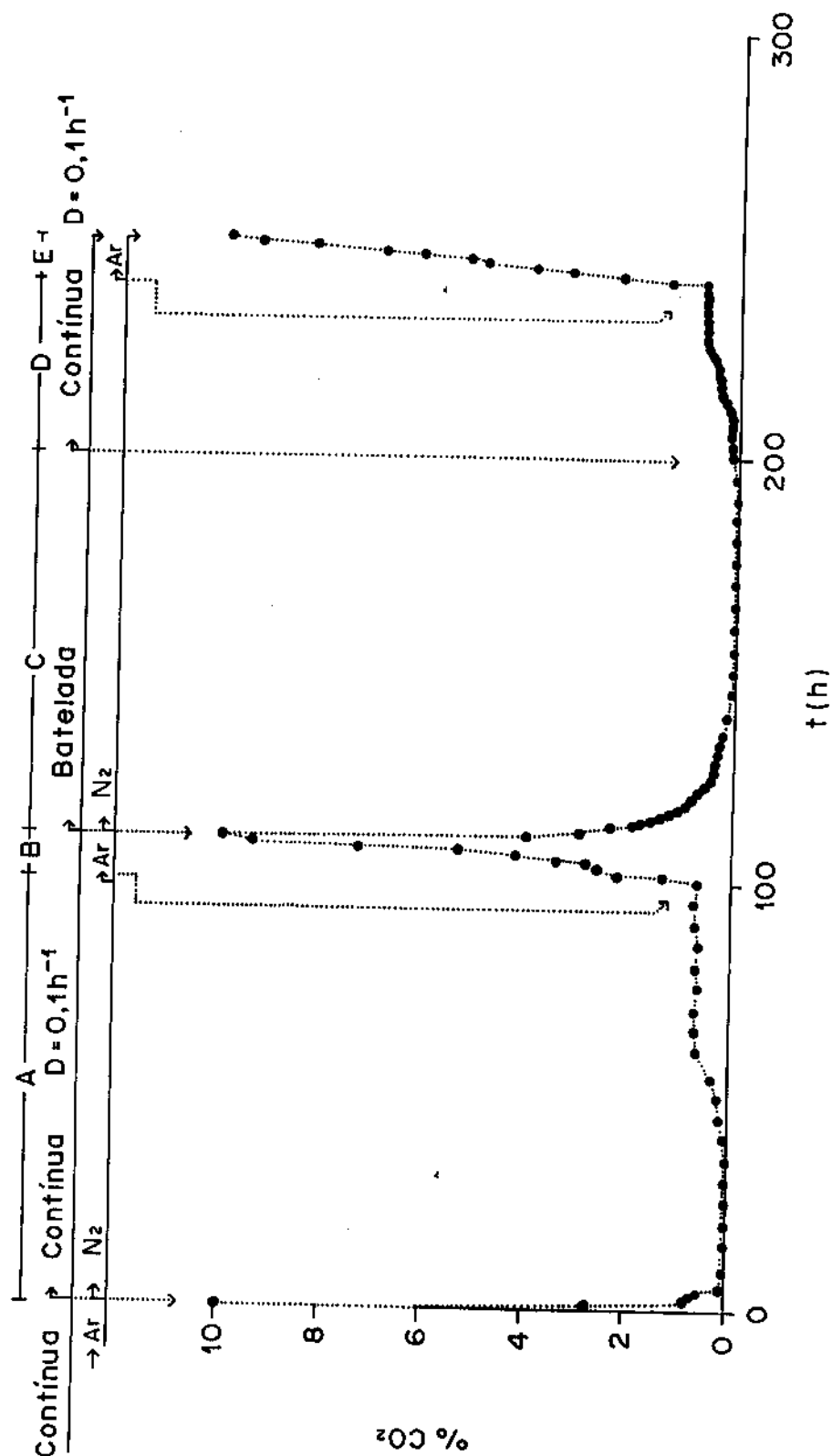


Fig. 20. Evolução de CO₂ durante a transição da fase aeróbica para anaeróbica em sistema contínuo e em batelada (A e C, respectivamente), da fase anaeróbica para aeróbica em cultura contínua (B e E, respectivamente) e do processo de batelada para contínuo em anaerobiose (D). Condições de cultivo: meio - G com adição de 2,5 mg.l⁻¹ de CaCl₂ e sem metionina; temperatura - 70°C; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; fluxo de gases - 0,1 l.min⁻¹ de ar ou N₂; taxa de diluição - 0,1 h⁻¹; substrato - sacarose (116,857 mM).

3. Comportamento de Bacillus stearothermophilus 11d-15 em Meio Definido Tendo Xilose como Fonte de Carbono.

3.1. Crescimento em Diferentes Concentrações de Vitaminas Aliadas a Diferentes Teores de Macronutrientes.

O meio G, estudado e otimizado nos experimentos anteriores, tendo-se mostrado adequado ao crescimento do microrganismo, serviu de base para investigar o comportamento dessa bactéria em meio definido, usando xilose como fonte de carbono.

Quando a sacarose do meio G foi substituída pela xilose, a ação inibitória sobre o crescimento, que sempre se observou no início do processo contínuo, foi ainda mais intensa. A inibição podia ser provocada pela interação da xilose com componentes do meio de cultura e uma forma de minimizar este efeito seria diminuir a concentração desses componentes. Foi observado que a concentração dos micronutrientes (incluindo cálcio) podia ser reduzida à metade sem afetar o comportamento geral do microrganismo; a presença ou ausência de EDTA também não alterava o crescimento. Então, o meio G foi preparado reduzindo-se a concentração dos micronutrientes à metade, sem adição de EDTA e sem metionina. Este meio foi designado meio G(1/2-MIC) (Apêndice C).

Como os macronutrientes podem também interagir com a xilose, resultando em produtos inibitórios, foi comparado o meio G(1/2MIC), contendo concentrações originais de macronutrientes (1), com o mesmo meio possuindo, porém, a metade da concentração original de macronutrientes (1/2). O ácido cítrico também foi reduzido à metade de sua concentração normal.

Além dos micronutrientes, estudos preliminares com sacarose indicaram que os teores de biotina e ácido nicotínico do meio podiam ser reduzidos de 100 para 34 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Assim, a relação das três vitaminas, biotina:tiamina:ácido nicotínico, seria de

34:100:34 $\mu\text{g.l}^{-1}$, respectivamente.

A Figura 21 mostra o comportamento do microrganismo num esquema fatorial de 2×2 , onde duas condições diferentes de concentrações de vitaminas (V-34:100:34 e V-100:100:100 para biotina:tiamina:ácido nicotínico, respectivamente) se combinam com duas outras de macronutrientes (MN-1, sendo a concentração de macronutrientes original do meio G e MN-1/2, representando a metade da concentração dos macronutrientes deste meio). O crescimento e o $Y_{x/s}$ foram menores no meio onde houve a combinação (V-34:100:34) com (MN-1/2). O menor q_s e o maior $Y_{x/s}$ foram obtidos na combinação (V-34:100:34) com (MN-1). Este último fator tendeu a ser maior sempre que a concentração de macronutrientes correspondeu àquela do meio G original (MN-1). O Q_s foi sempre maior quando o teor de vitamina do meio obedeceu a relação (V-100:100:100), independentemente da concentração de macronutrientes estudada.

A Figura 22 apresenta as concentrações de produtos de fermentação em função da composição química do meio. Foi na combinação (V-34:100:34) com (MN-1/2) que o teor de etanol se mostrou maior em relação ao ácido acético. As relações molares etanol/ácido acético foram, respectivamente, 1,057, 2,362, 0,273 e 0,792 para as combinações (V-34:100:34)-(MN-1), (V-34:100:34)-(MN-1/2), (V-100:100:100)-(MN-1/2) e (V-100:100:100)-(MN-1). Não foram detectados os ácidos fórmico e pirúvico em nenhuma das condições. Na combinação (V-100:100:100)-(MN-1), enquanto a formação de ácido succínico é inibida, a produção de ácido láctico é estimulada.

As taxas específicas de formação de produtos (Fig. 23) respondem às combinações em estudo. A maior taxa específica de etanol foi observada na combinação (V-34:100:34)-(MN-1/2), enquanto que a de ácido acético foi em (V-100:100:100)-(MN-1/2) e a de ácido láctico em (V-100:100:100)-(MN-1).

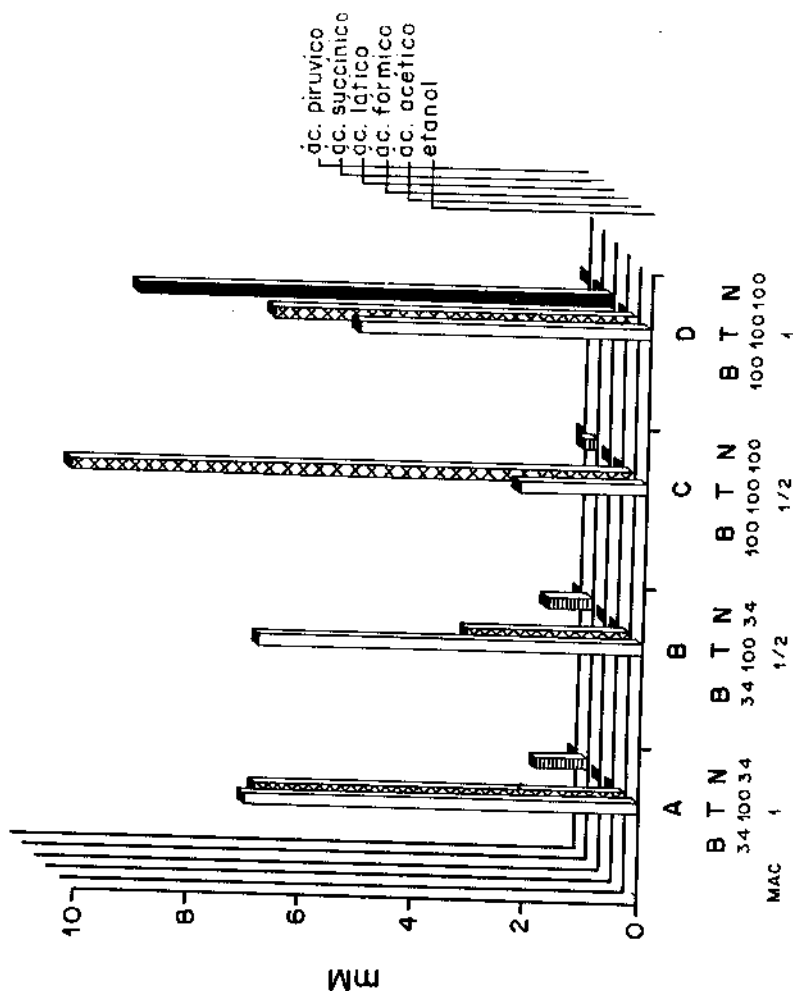


Fig. 22. Formação de produtos de fermentação por *B. stearothermophilus* 11d-15 em meio definido, tendo xilose como fonte de carbono, em função da composição química do meio de cultivo. Condições de cultivo: meio G(1/2MIC); aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 70°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). A- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (34:100:34 µg.1⁻¹) com a concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC); B- Igual a A com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); C- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (100:100:100 µg.1⁻¹) com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); D- Igual a C com a concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC).

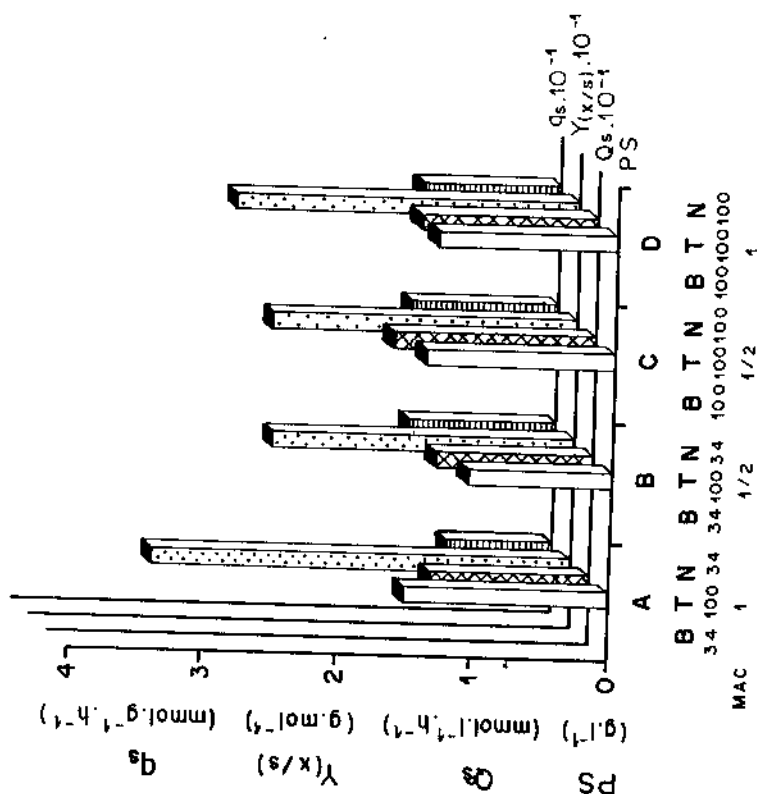


Fig. 21. Crescimento de *B. stearothermophilus* 11d-15 em meio definido, tendo xilose como fonte de carbono, em função da composição química do meio de cultivo. Condições de cultivo: G(1/2MIC); aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 70°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). A- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (34:100:34 µg.1⁻¹) com a concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC); B- Igual a A com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); C- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (100:100:100 µg.1⁻¹) com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); D- Igual a C com a concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC).

O fator de conversão de etanol (Fig. 24) não depende da concentração de macronutrientes e nem da interação vitaminas-macronutrientes, mas da ação isolada de vitaminas no meio. A relação (V-100:100:100) sempre causou redução no fator de conversão do etanol. O menor $Y_{p/s}$ de ácido acético foi obtido na combinação (V-34:100:34)-(MN-1/2) e o maior em (V-100:100:100)-(MN-1/2). O fator de conversão do ácido acético depende tanto da concentração de macronutrientes como do teor de vitaminas no meio.

A condição escolhida para o crescimento do microrganismo foi aquela onde, embora se tenha tido um menor crescimento e um menor $Y_{x/s}$, se obtiveram fatores de conversão maiores para o etanol e menores para o ácido acético, ou seja, a combinação (V-34:100:34)-(MN-1/2). Portanto, esse novo meio, sem metionina e EDTA, identificado como G(1/2MIC-1/2MAC), possui biotina, tiamina e ácido nicotínico na proporção de 34:100:34 ($\mu\text{g.l}^{-1}$), respectivamente.

3.2. Inibição do Crescimento em Meio Definido Tendo Xilose como Fonte de Carbono G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi.

Desde as primeiras fermentações, tem-se observado, com freqüência, existirem fatores que comprometem o crescimento celular, independentemente de o meio ser complexo ou definido. Com xilose, no entanto, o processo inibitório foi mais severo e mais freqüente que com sacarose. Na Figura 25(a) pode-se notar que, nas primeiras horas após a inoculação, o CO_2 evoluiu de forma normal. Logo em seguida, essa evolução se reduziu, atingindo valores muito baixos. A redução na evolução do gás demonstra que o metabolismo do microrganismo é severamente afetado pelas condições existentes no fermentador. Foi possível, no entanto, reverter o quadro inibitório com a diminuição da temperatura de 70 para 65 °C (Fig. 25(b)). Em tais condições, o aumento efetivo na formação de CO_2 se deu após um período de demora de 5 horas. Como se trata de processo contínuo

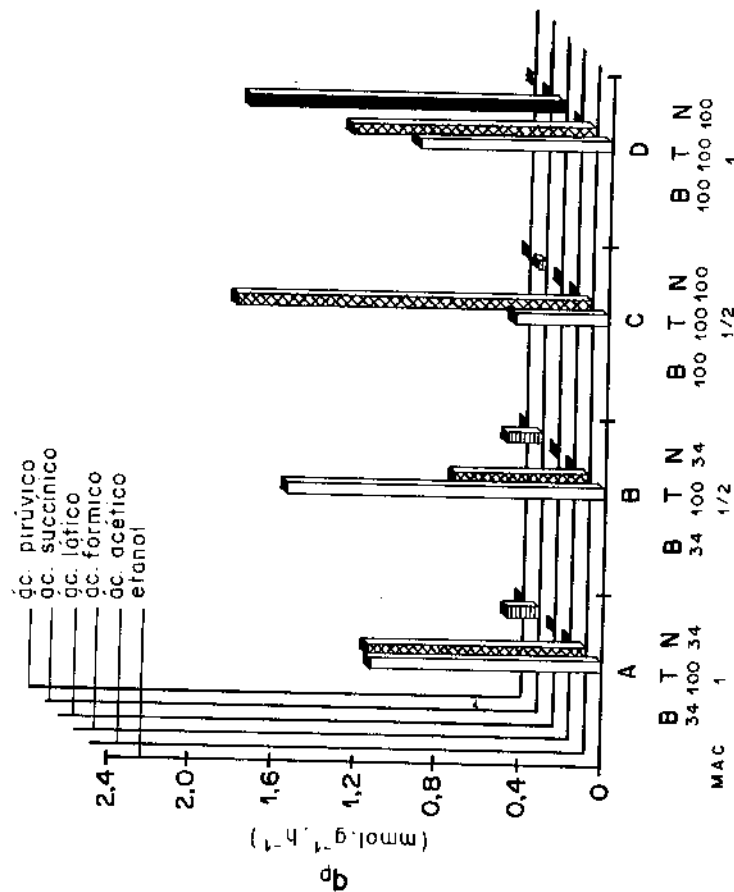


Fig. 23. Taxa específica de formação de produtos (q_p) de fermentação em função da composição química do meio de cultivo. Condições de cultivo: meio G(1/2MIC); aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 70°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). A- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (34:100:34 µg.l⁻¹) com a concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC); B- Igual a A com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); C- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (100:100:100 µg.l⁻¹) com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); D- Igual a C com a concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC).

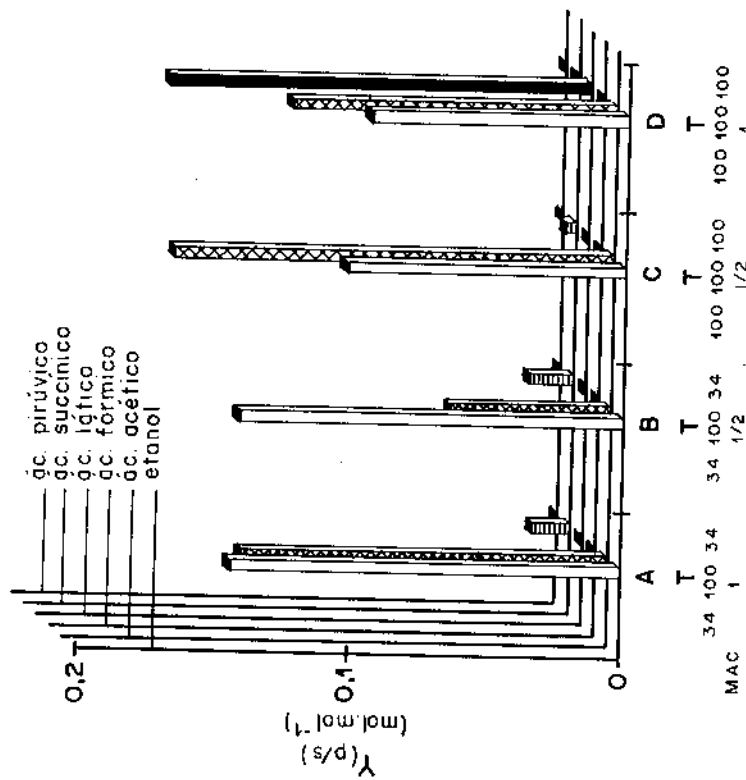


Fig. 24. Fator de conversão para formação de produtos (q_p) de fermentação em função da composição química do meio de cultivo. Condições de cultivo: meio G(1/2MIC); aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 70°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). A- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (34:100:34 µg.l⁻¹) com a concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC); B- Igual a A com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); C- Biotina:Tiamina:Ác. nicotínico (100:100:100 µg.l⁻¹) com 1/2 da concentração de macronutrientes do meio G(1/2MIC); D- Igual a C e concentração de macronutrientes igual a do meio G(1/2MIC).

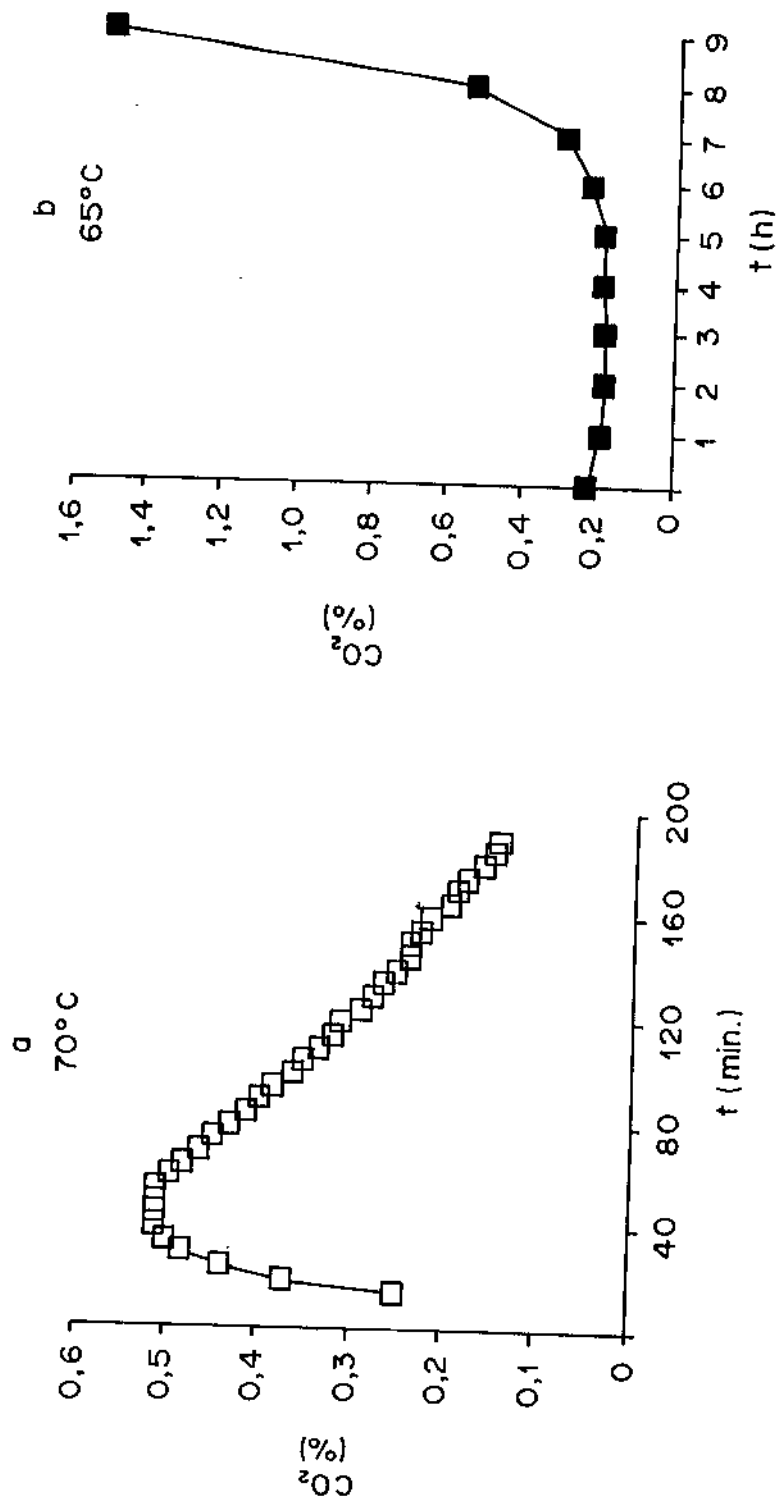


Fig. 25. Evolução de CO_2 após inoculação do *Bacillus stearothermophilus* 11d-15 a 70°C (a) e alteração da temperatura de 70 para 65°C após a concentração de CO_2 , nos gases de saída, ter atingido 0,22% (b). Condições de cultivo: meio G (1/2MTC-1/2MAC); aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - como indicada; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM).

com uma taxa de diluição de $0,240 \text{ h}^{-1}$, o tempo requerido para se obter uma resposta efetiva do microrganismo em termos de CO_2 foi $1,2 t_h$.

3.3. Determinação dos Agentes Promotores da Reação Marrom Presentes no Meio G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi.

A varredura espectrofotométrica efetuada nas misturas binárias de todos os componentes do meio com a xilose revelou que o único componente que formou reação marrom com a pentose, quando a mistura foi aquecida a 70°C , foi o Na_2HPO_4 . A Figura 26 mostra a varredura efetuada partindo-se do comprimento de onda de 400 a 180 nm. Observou-se que, com a combinação binária "xilose- Na_2HPO_4 " aquecida, a absorbância começou a aumentar aos 400 nm, atingindo um pico máximo em 295 nm (B). Quando a mistura não foi submetida ao aquecimento, a absorbância foi nula (A). A reação mais forte foi obtida com o meio G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi aquecido (D). Sem aquecimento, a absorbância foi nula (C). As absorbâncias, em 295 nm, para a mistura binária "xilose- Na_2PO_4 " e para o meio G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi aquecidos, foram 0,250 e 1,95, respectivamente. Quando, na mistura "xilose- Na_2HPO_4 ", o Na_2HPO_4 foi substituído pelo KH_2PO_4 , o aquecimento não provocou reação marrom (E).

Testes feitos com misturas binárias de "xilose- NaHCO_3 " mostraram forte reação marrom, mas nenhuma reação ocorreu com a combinação binária "xilose- NaCl ". Como a reação esteve sempre vinculada ao processo de inibição, necessitou-se substituir o componente Na_2HPO_4 do meio G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi por KH_2PO_4 . A fonte de sódio foi mantida na forma de NaCl . A adição deste sal ao meio teve que ser feita com cuidado, pois, embora muito fraca, a combinação terciária "xilose- KH_2PO_4 - NaCl " também provocou, reação marrom, quando a mistura foi aquecida. Testes com sacarose têm apresentado fracas reações com o Na_2HPO_4 , podendo, até mesmo, ser consideradas desprezíveis. Houve forte reação com arabinose, mas

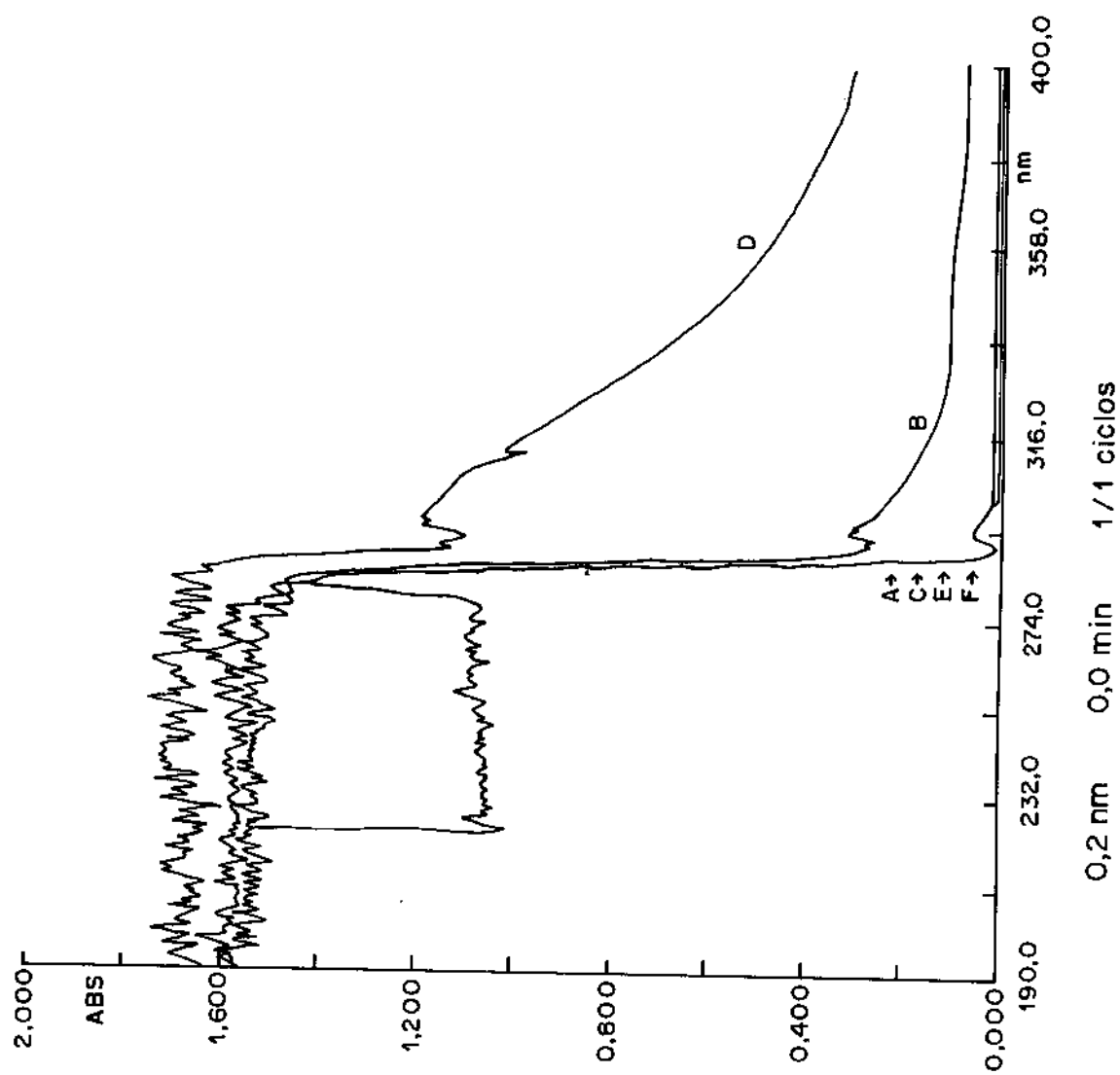


Fig. 26. Reação escura provocada pela combinação Xilose - NaH_2PO_4 ; A- Xilose + NaH_2PO_4 sem aquecimento; B- Xilose + NaH_2PO_4 com aquecimento (70°C) em estufa por 24 horas; C- Meio de cultura sem aquecimento; D- Meio de cultura com aquecimento (70°C) em estufa por 24 horas; E- Xilose + KH_2PO_4 sem aquecimento; F- Xilose + KH_2PO_4 com aquecimento (70°C) em estufa por 24 horas.

não com arabinitol. Convém salientar ainda que o xilitol também não reagiu com Na_2HPO_4 para a formação de pigmentos marrons.

Devido à nova formulação do meio, o código de identificação foi modificado para G(1/2MICNa-1/2MACK). Este meio possui biotina, tiamina e ácido nicotínico, na proporção de 34:100:34, respectivamente.

3.4. Recuperação do Crescimento e Estabilidade da Bactéria em Meio G(1/2MICNa-1/2MACK)-Xi.

Tendo-se substituído Na_2HPO_4 do meio G, principal agente causal da reação marrom, por KH_2PO_4 , foi determinada a capacidade de o novo meio de cultura recuperar e manter o crescimento. A Figura 27 mostra a alteração no crescimento do microrganismo em função do pH e sua recuperação a 70 e 65 °C. Quando o pH de uma cultura em regime estacionário a 70 °C foi modificado de 6,5 para 5,9, a formação de CO_2 passou de 8% para 0,5%, em, aproximadamente, 8 horas de cultivo contínuo. Alterando-se o pH de 5,9 para 6,5 e mantendo-se a temperatura em 70 °C, verificou-se que, mesmo num pH adequado ao crescimento, o meio não possibilitou a recuperação do mesmo. Quando, no entanto, a temperatura de cultivo foi modificada de 70 para 65 °C, a bactéria respondeu à mudança, imediatamente. Uma vez iniciado o crescimento, a temperatura pôde ser aumentada de 65 para 70 °C, e um novo regime estacionário foi atingido sem inibição da atividade metabólica.

Quando, porém, as três vitaminas foram removidas do meio, a bactéria alterou seu comportamento, apresentando oscilações na formação de CO_2 com fases de depressão e patamares de recuperação da atividade celular sempre mais baixos que o estágio anterior (Fig. 28). As flutuações observadas mostram um certo grau de sincronia celular. O teor de CO_2 nos gases de saída, no início da mudança do meio, foi de 6,1%, caindo para 1,85% em 36 horas.

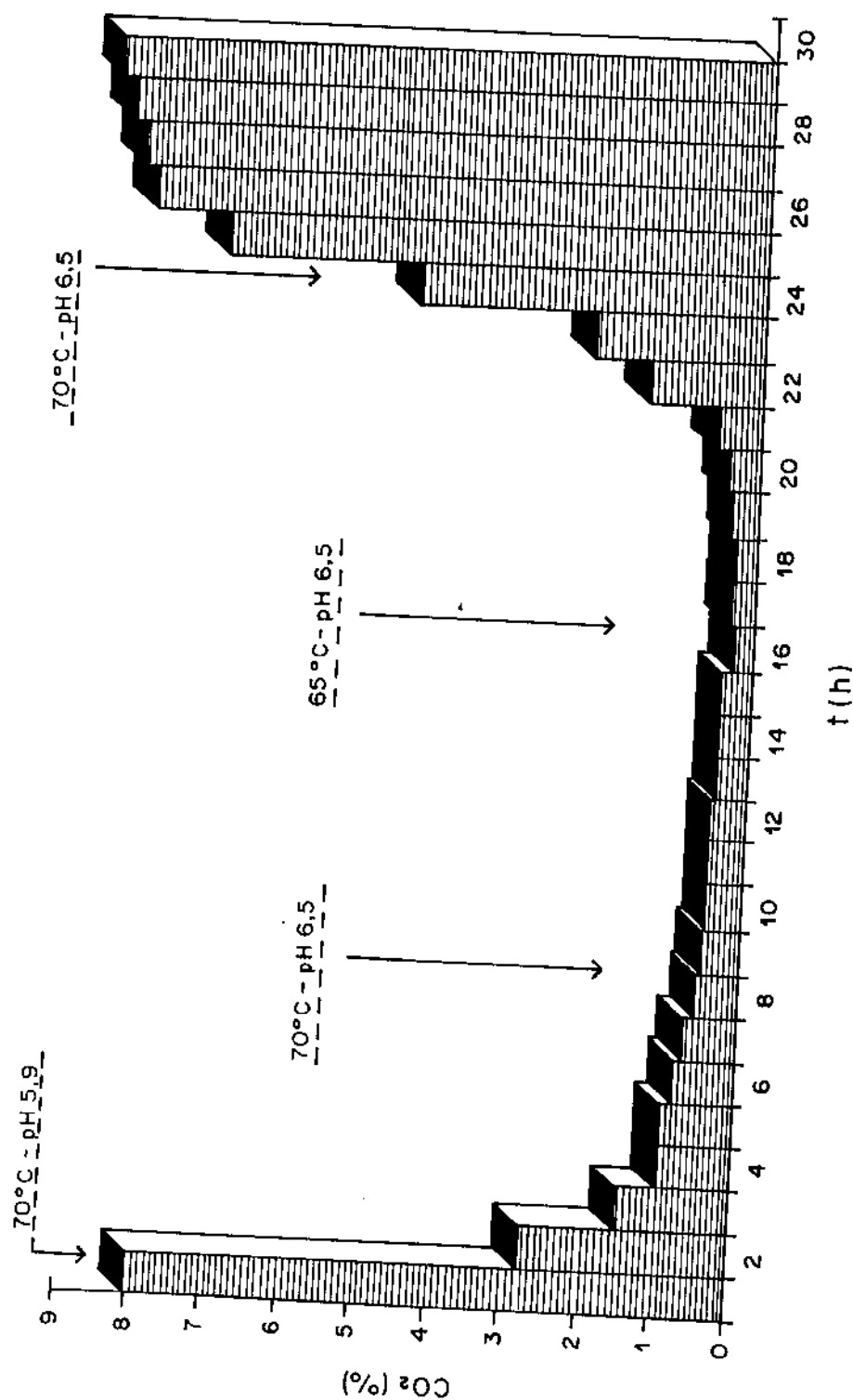


Fig. 27. Evolução de CO₂ em diferentes valores de pH e temperatura. A cultura *Bacillus stearothermophilus* 11d-15, após ter atingido o regime estacionário a 70°C e em pH 6,5, foi submetida a variação de pH de 6,5 para 5,9 e, após mente, para 6,5. O pH foi mantido constante e a temperatura, alterada de 70°C para 65°C para 5,9 e, nova de CO₂, nos gases de saída, ter atingido valores baixos. A temperatura foi alterada novamente para 70°C após o processo de recuperação do crescimento ter-se iniciado. Condições de cultivo: meio G (1/2MICNa-1/2MACK); aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - como indicado; temperatura - como indicada; taxa de diluição 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM).

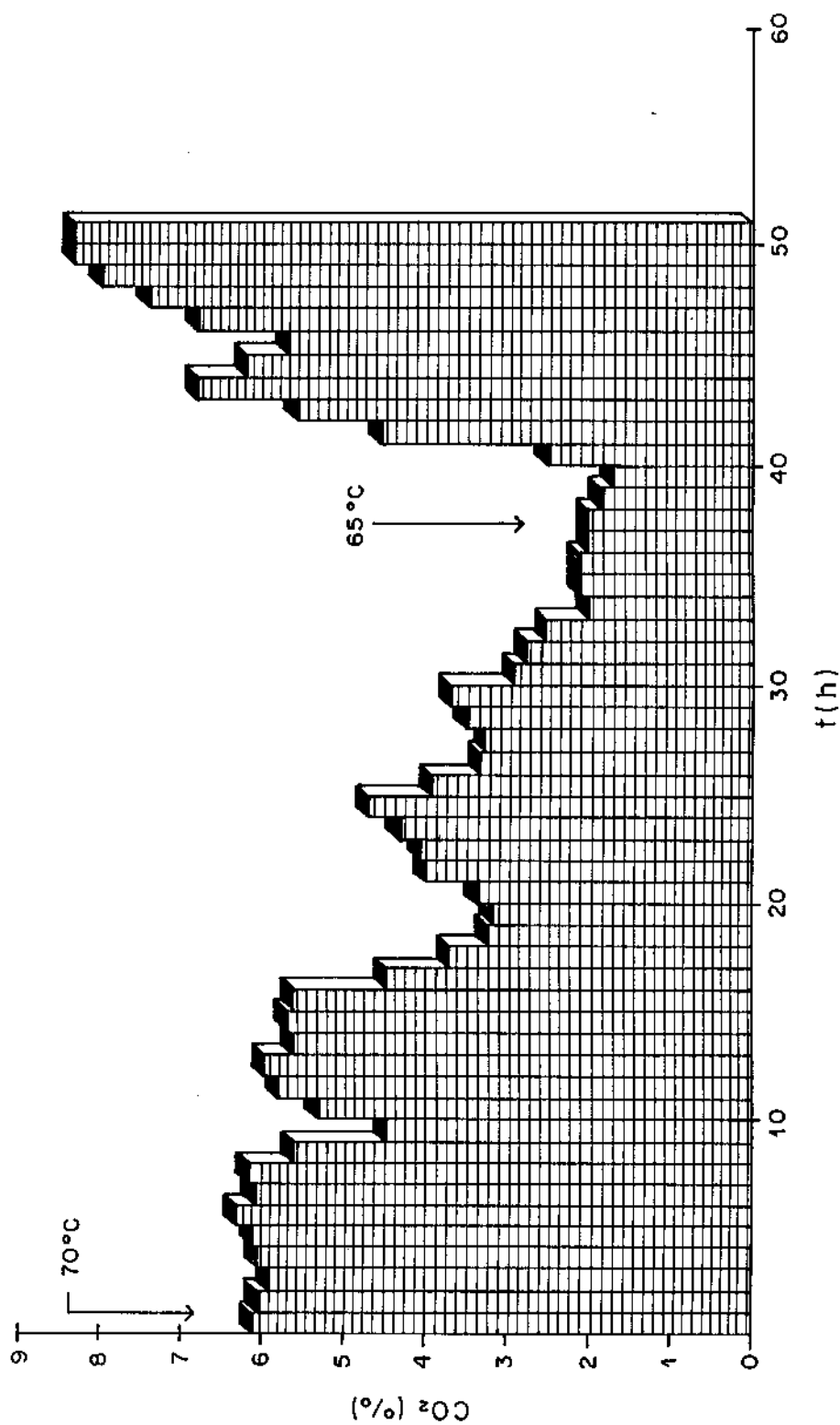


Fig. 28. Evolução de CO_2 em duas diferentes temperaturas. A cultura *Bacillus stearothermophilus* 11d-15, após ter atingido o regime estacionário a 70°C no meio G (1/2MCKa-1/2MCK), foi mantida na mesma temperatura e no mesmo meio, mas sem a presença de vitaminas. A alteração da temperatura, de 70°C para 65°C só se efetuou quando a concentração de CO_2 , nos gases de saída, ficou abaixo de 3%. Condições de cultivo: meio - como indicado; aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - como indicada; taxa de diluição - 0,150 h^{-1} ; substrato - xilose (66,607 mM).

Quando a temperatura foi alterada para 65 °C, a recuperação se efetuou de forma definitiva. Com isso, deduziu-se que pelo menos uma das vitaminas presentes no meio G(1/2MICNa-1/2MACK)-Xi é necessária para a manutenção do crescimento a 70 °C e que, a 65 °C, o microrganismo não exige a adição de fatores de crescimento ao meio de cultura.

Células, após terem atingido o regime estacionário a 65 °C num meio sem vitaminas, quando submetidas a um aumento de temperatura de 65 para 70 °C, reduziram, em 24 horas, de 11% para 3%, a presença de CO₂ nos gases de saída, com um correspondente aumento na percentagem de O₂ (Fig. 29). Adicionando-se TPP ao meio, foi possível recuperar o crescimento da bactéria sem ter que modificar a temperatura de cultivo. Comparando-se as Figuras 27 e 29, percebe-se que para a recuperação do crescimento através de vitaminas, o microrganismo deve exibir um nível de atividade metabólica mínimo. Quando o teor de CO₂ nos gases de saída atingiu 0,5% (Fig. 27), indicando baixa atividade metabólica, não foi mais possível a recuperação através de adição de vitaminas. Quando gases de saída apresentaram níveis de CO₂ de 3% (Fig. 29), ou seja, indicando um nível de atividade metabólica razoável, o TPP pôde recuperar o crescimento da bactéria a 70 °C.

Os resultados apresentados na Figura 30 denotam que os componentes da reação marrom inibem o crescimento da bactéria. Mesmo com o meio G(1/2MICNa-1/2MACK)-Xi, se o pH for controlado por adição de NaOH, a reação marrom processar-se-á gradativamente, até atingir o nível de inibição. A reação marrom ocorreu 18 horas após o controle de pH do meio ter sido mudado de KOH 4N para NaOH 4N. Nesse momento, a queda da produção de CO₂ e o aumento correspondente de O₂ nos gases de saída se tornaram evidentes.

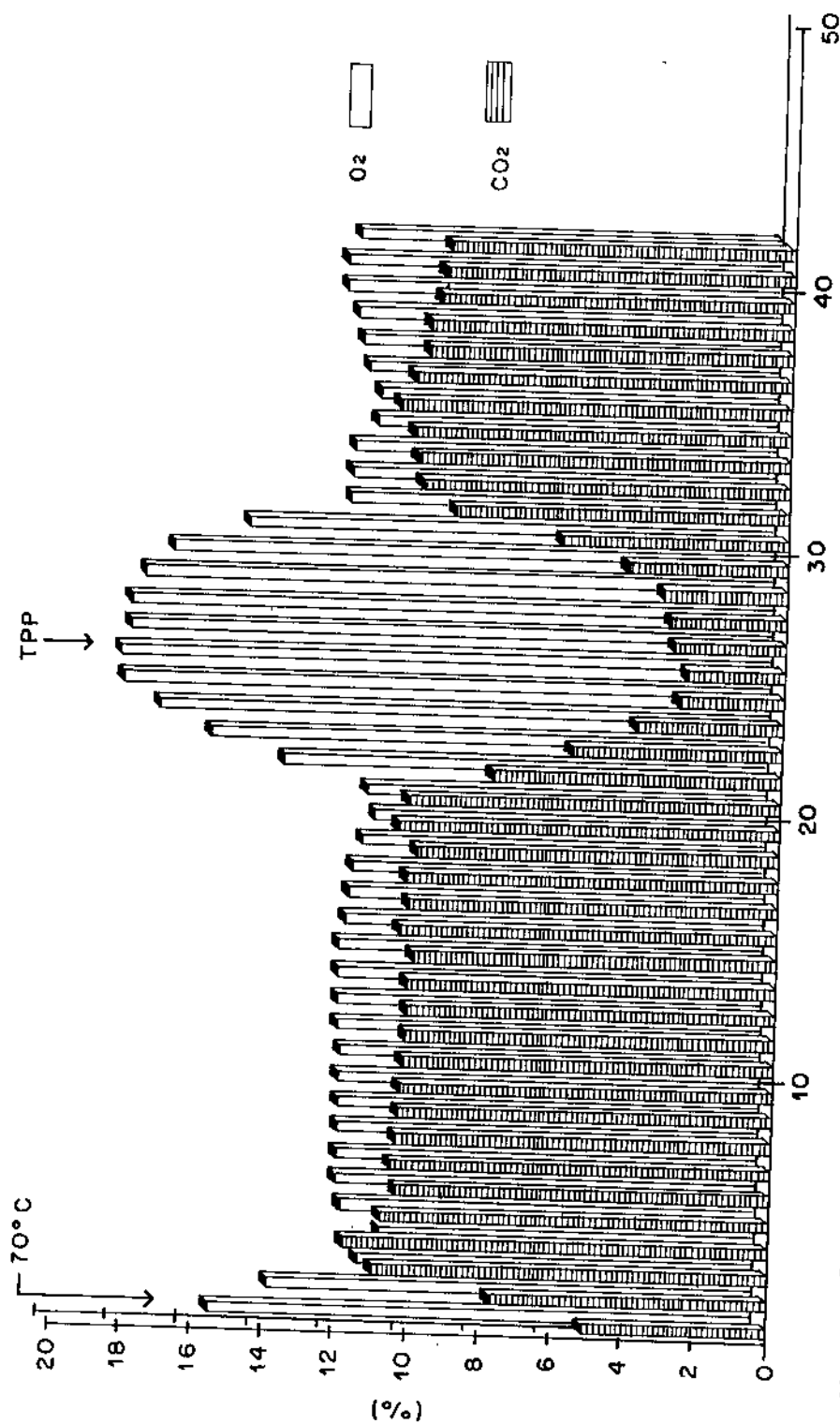


Fig. 29. Evolução de CO_2 e uso de O_2 , a $70^\circ C$, por *Bacillus stearothermophilus* 11d-15, após ter atingido o regime estacionário a $65^\circ C$, no meio G(1/2M/CNa-1/2MACK) sem vitaminas. A adição de TPP ao meio foi efetuada quando a concentração de CO_2 , nos gases de saída, ficou abaixo de 3%. Condições de cultivo: meio - como indicado; aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - $70^\circ C$; taxa de diluição - 0,1 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM).

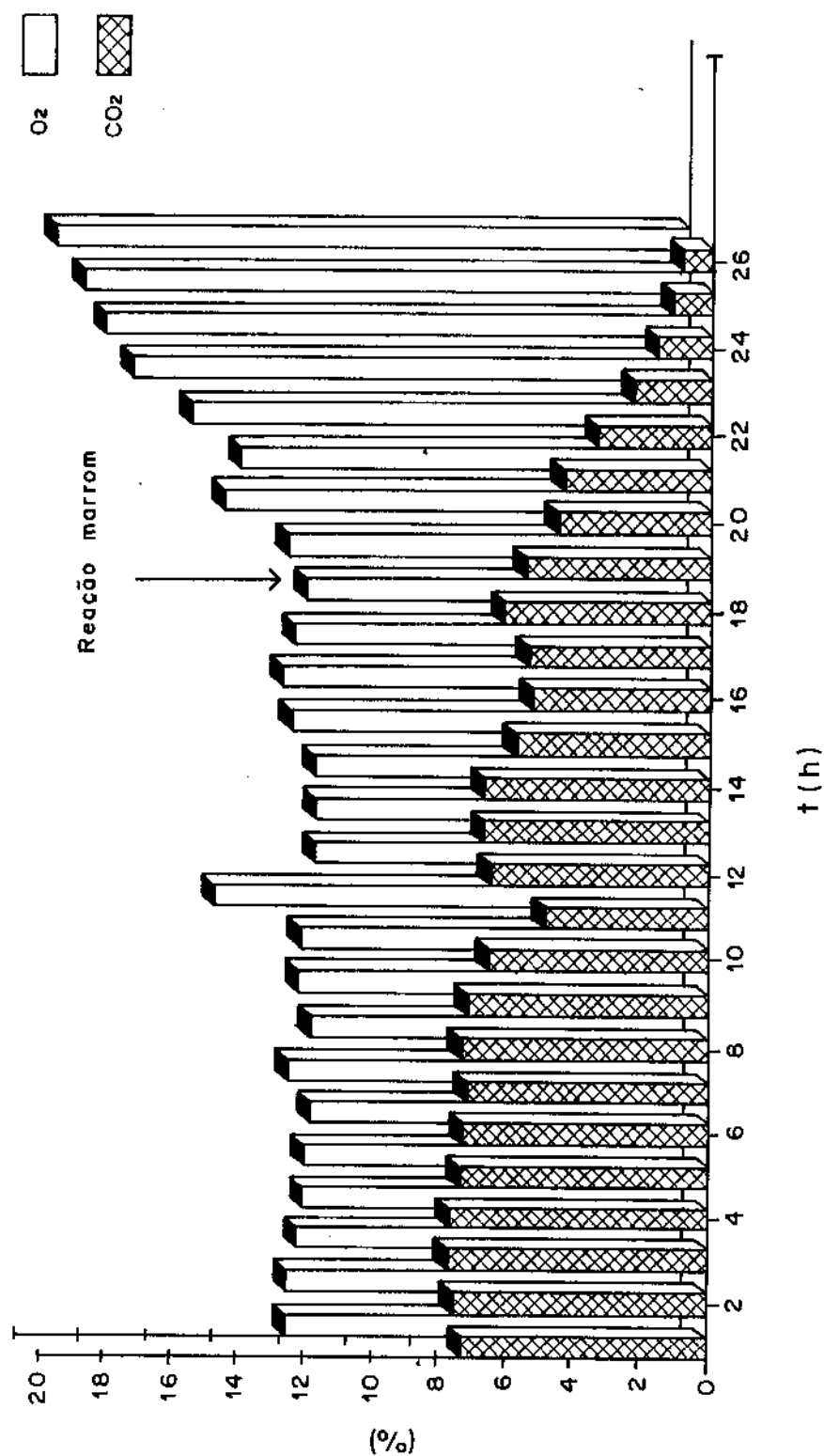


Fig. 30. Evolução de CO₂ e uso de O₂ por *B. stearotheophilus* 11d-15 crescido em meio G(1/2MNA-1/2MACK) sem vitaminas. O pH foi controlado pela adição automática de NaOH (4N). A seta indica o ponto no qual a reação marrom, provocada pela adição de NaOH, foi detectada. Condições de cultivo: aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,1 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM).

O meio G(1/2MICNa-1/2MACK)-Xi com adição de TPP, agora especialmente chamado de (G₇₀-F)TPP⁺ (Apêndice C), não recuperou a atividade da bactéria quando a taxa de diluição foi de 0,05 h⁻¹. Para que a recuperação se desse, foi necessário alterar, mais uma vez, a temperatura de trabalho de 70 para 65 °C (Fig. 31). Recuperada a atividade metabólica, a temperatura de cultivo pôde novamente ser aumentada para 70 °C, permitindo a manutenção da cultura em regime estacionário, sem apresentar inibição. O meio G(1/2MICNa-1/2MACK)-Xi sem vitaminas, agora chamado de (G₆₅-F)TPP⁻ (Apêndice C), recuperou a atividade metabólica e manteve o crescimento da bactéria em regime estacionário a 65 °C, atingindo 10⁹ células viáveis por mililitro de meio. A temperatura inicial de trabalho foi o principal fator do processo de recuperação da atividade celular.

3.5. Participação de Aminoácidos e Vitaminas no Crescimento e na Formação de Produtos de Fermentação, em Cultura Contínua.

3.5.1. Condições Parcialmente Aeróbicas (0,1 vvm de ar). Regime Estacionário.

Regimes estacionários foram obtidos em meios com e sem vitaminas, na ausência e presença de aminoácidos. As condições de cultivo foram: meio de cultura - (G₆₅-F) sem NaCl, contendo 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico; temperatura - 65 °C; pH - 6,5; aeração - 0,1 vvm de ar; agitação - 600 rpm; substrato - xilose (66,667 mM); taxa de diluição - 0,240 h⁻¹.

Quando foram adicionados os ácidos aspártico e glutâmico, suas concentrações foram, respectivamente, de 0,25 e 0,5 g.l⁻¹. As vitaminas (biotina, TPP, piridoxina, ácido nicotínico, riboflavina e mio-inositol), quando presentes, foram adicionadas na concentração individual de 10 mg.l⁻¹. O ácido oxálico foi usado porque em testes preliminares constatou-se que esse ácido estimula

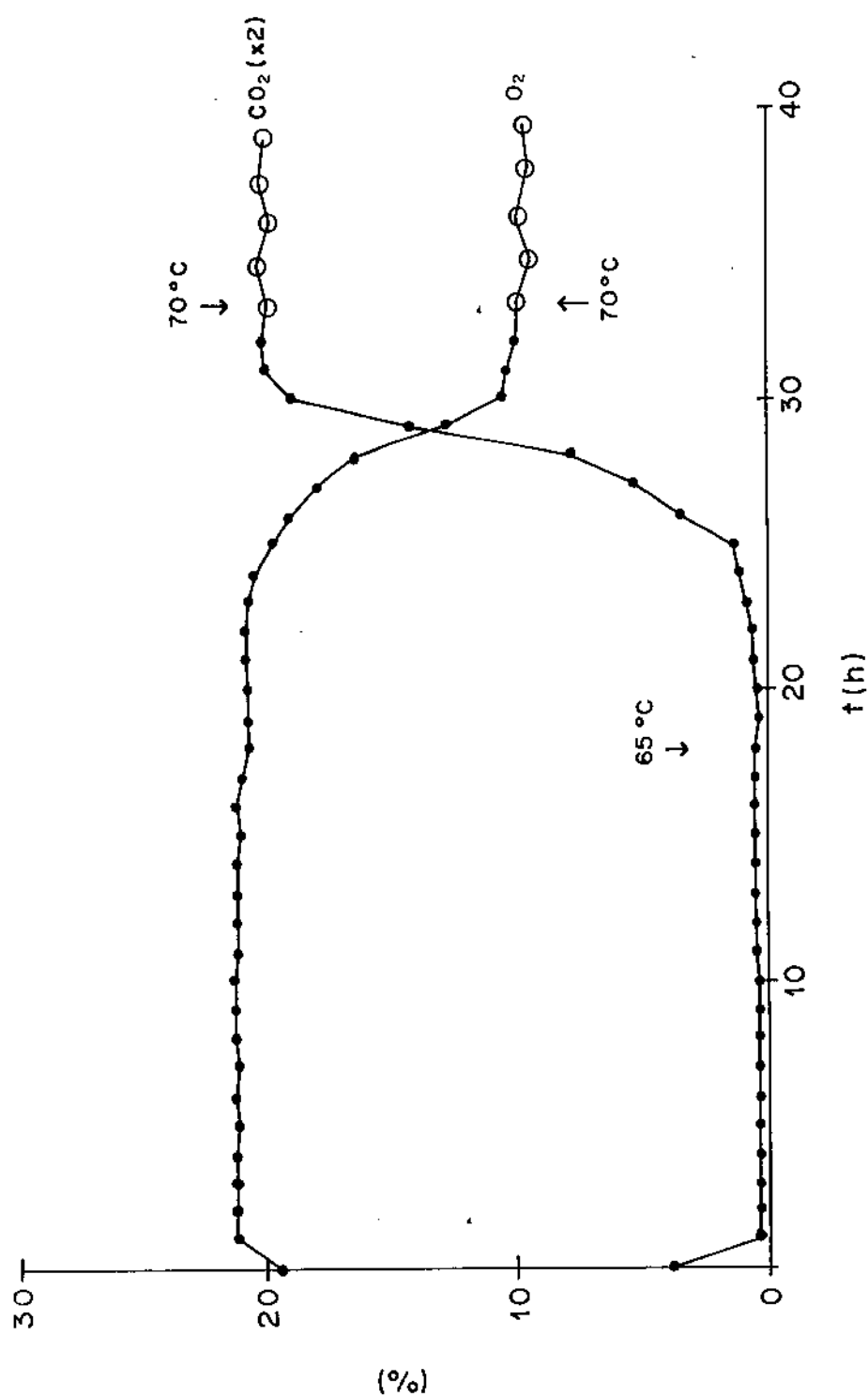


Fig. 31. Recuperação do crescimento do *Bacillus stearothermophilus* 11d-15 a 65°C , cultivado em meio (G₆₅-F)TPPT. O regime estacionário a 70°C foi quebrado pela alteração do pH de 6,5 para 4,9. Quando a concentração de CO_2 atingiu 1,85%, o pH foi novamente alterado de 4,9 para 6,5, mantendo-se a mesma temperatura. Após 18 h, a temperatura foi alterada para 65°C . Quando o regime estacionário a 65°C foi atingido, a temperatura foi modificada para 70°C . Condições de cultivo: aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - como descrito; temperatura - como descrita; taxa de diluição - $0,05\text{ h}^{-1}$; substrato - xilose (66,607 mM).

as formações de etanol e ácido acético. O mesmo foi observado quando a concentração de ácido cítrico foi aumentada de 0,1 para 0,5 g.l⁻¹.

Os ácidos aspártico e glutâmico foram os aminoácidos escolhidos neste experimento por serem precursores de todos os aminoácidos das famílias do aspartato (lisina, asparagina, metionina, treonina e isoleucina) e do glutamato (prolina, glutamina e arginina). Por sua vez, os ácidos aspártico e glutâmico têm como precursores os ácidos oxaloacético e α -cetoglutárico, respectivamente. Portanto, qualquer bloqueio no ciclo de Krebs pode comprometer o metabolismo do microrganismo, no que diz respeito à síntese destes aminoácidos.

A Figura 32(a) mostra que, em condições parcialmente aeróbicas, os dois aminoácidos e as vitaminas praticamente não afetaram o crescimento do microrganismo. Os aminoácidos parecem provocar uma diminuição no fator de conversão e um aumento na taxa específica de consumo.

Pode-se constatar, na Figura 32(b), que as formações de etanol e ácido acético se tornaram importantes quando os aminoácidos e as vitaminas estiveram presentes. A produção de ácido láctico foi estimulada na presença das vitaminas ou dos aminoácidos, isoladamente. Quando ausentes do meio, o teor deste ácido foi desprezível.

O fator de conversão e a taxa específica de formação de etanol e ácido acético, apresentados nas Figuras 33(a) e 33(b), respectivamente, foram maiores, quando os aminoácidos e as vitaminas estiveram presentes. Os aminoácidos adicionados isoladamente aumentaram o fator de conversão e a taxa específica de formação de ácido láctico.

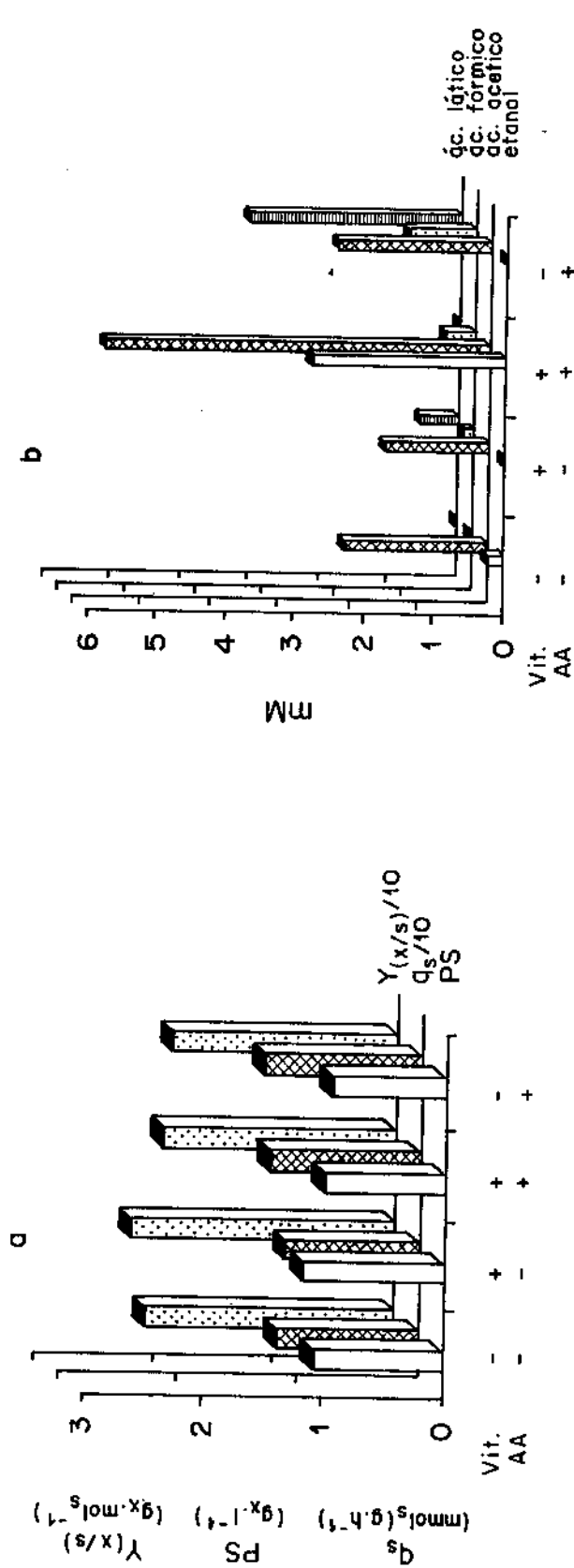


Fig. 32. Resposta do *B. stearotheophilus* lld-15 à adição dos ácidos aspártico (0,25 e 0,5 g.l⁻¹, respectivamente), na presença e ausência das vitaminas: riboflavina, piridoxina, biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico. a- apresenta peso seco (PS), taxa específica de consumo (q_s) e fator de conversão ($Y_{(x/s)}$), no regime estacionário. b- formação de produtos de fermentação, no regime estacionário. Condições de cultivo: meio (G₅-F)TPP- sem NaCl, com 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico - aeração - 0,1 vvm; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). AA- aminoácidos; Vit- vitaminas.

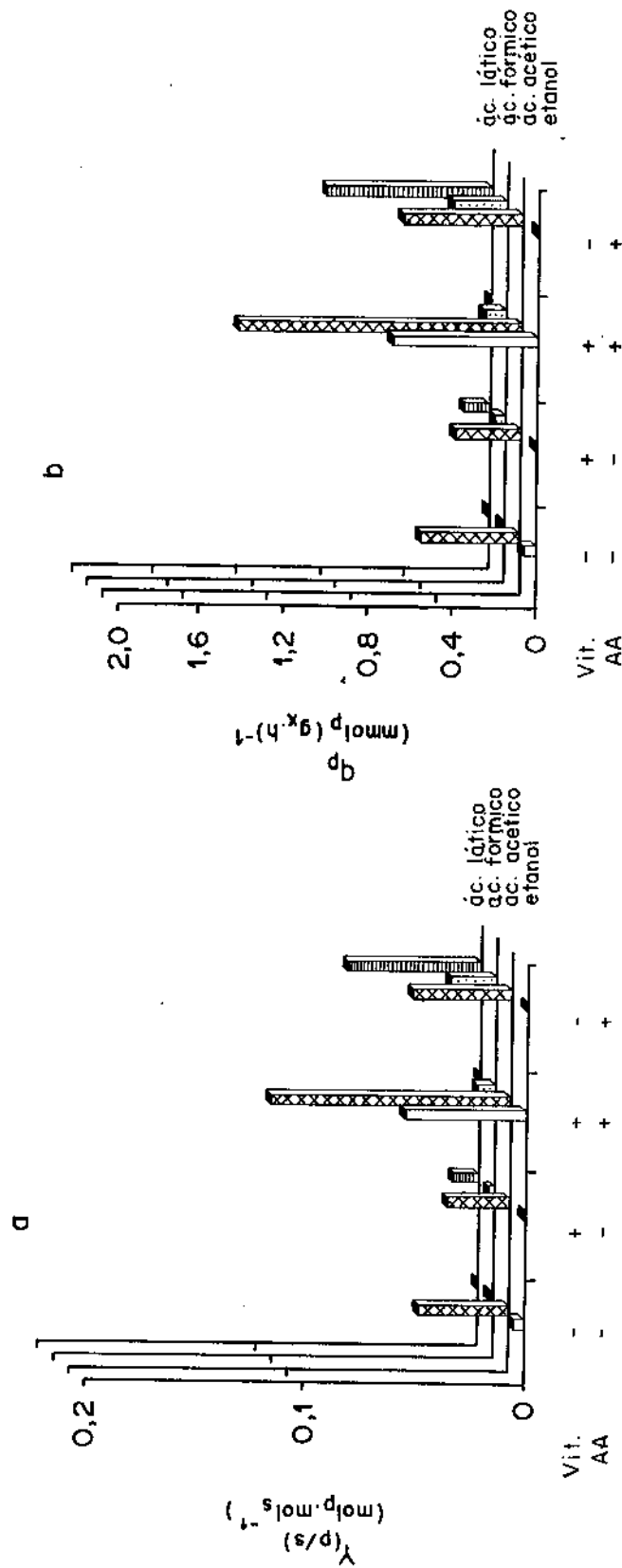


Fig. 33. Fator de conversão (a) e taxa específica de formação de produto (b) em função da adição, ao meio, dos ácidos aspártico e glutâmico (0,25 e 0,5 g.l⁻¹, respectivamente) e das vitaminas (riboflavina, pirofosfato de tiamina (TPP), biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico, na concentração individual de 10 mg.l⁻¹). Condições de cultivo: meio - (G₆₅-F)TPP sem NaCl, com 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico; aeração - 0,1 vvm; agitação - 800 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). AA- aminoácidos; Vit- vitaminas.

3.5.2. Transição das Condições Parcialmente Aeróbicas (0,1 vvm de ar) para Anaeróbicas.

Utilizando o mesmo meio e as mesmas condições do experimento anterior, foi investigado o comportamento do microrganismo face à transição das condições parcialmente aeróbicas para anaeróbicas na ausência e presença de vitaminas e de aminoácidos.

Os estudos, em condições transientes, revelaram que a adição dos aminoácidos foi importante para diminuir o impacto da alteração sobre o microrganismo. Pode-se observar, na Figura 34, que, duas horas após a mudança, as retas referentes às culturas com adição de aminoácidos tiveram menor inclinação. No final de 6 horas, foram formados dois grupos distintos de culturas. Aquelas que tiveram aminoácidos adicionados, apresentaram uma maior concentração de células. A adição de vitaminas ao meio não reduz o impacto que a mudança provoca sobre as células.

É interessante observar (Fig. 35) que a taxa específica de crescimento da bactéria, após 2 horas de transição, atingiu valores negativos apenas nos meios onde os aminoácidos não foram adicionados.

O aumento na produção de etanol se deu imediatamente após a mudança nas condições de aeração. A formação de etanol (Fig. 36(a)) e sua taxa específica (Fig. 36(b)), ao longo do tempo, foram estimuladas pela adição de vitaminas. A adição dos aminoácidos estimulou, com maior intensidade, a formação de ácido acético (Fig. 37(a)) e sua taxa específica (Fig. 37(b)).

A Tabela 1 contém os valores de $r_{M-AC/ET}$ obtidos nas diversas condições de cultivo. Percebe-se que a concentração de etanol foi maior que a de ácido acético em todas as condições onde as vitaminas estiveram presentes. A adição de aminoácidos ao meio contendo vitaminas fez com que a relação aumentasse.

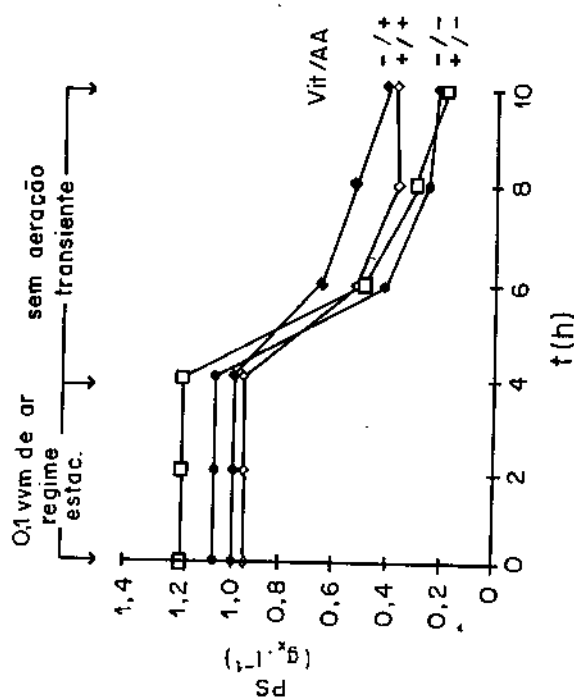


Fig. 34. Resposta do *B. stearothermophilus* 11d-15, em termos de peso seco (PS), à transição das condições parcialmente aeróbicas para anaeróbicas, na presença e ausência de vitaminas (riboflavina, pirofosfato de tiamina (TPP), biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico, na concentração individual de 10 mg.l⁻¹) e dos ácidos aspártico e glutâmico (0,25 e 0,5 g.l⁻¹, respectivamente). Condições de cultivo: meio - (G65-F)TPP- sem NaCl, com 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico; aeração - como indicada; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). AA- aminoácidos; Vit- vitaminas.

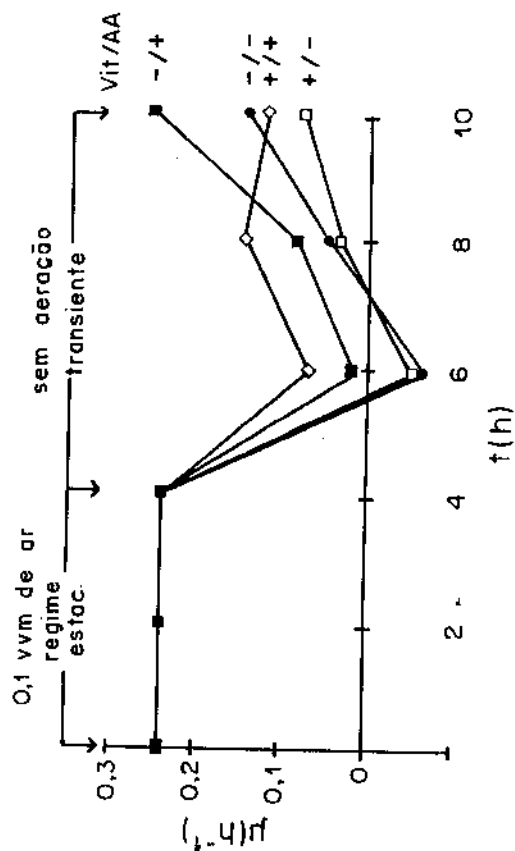


Fig. 35. Variação da taxa específica de crescimento (μ) do *B. stearothermophilus* 11d-15, no período de transição das condições parcialmente aeróbicas para anaeróbicas, na presença e ausência de vitaminas (riboflavina, pirofosfato de tiamina (TPP), biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico, na concentração individual de 10 mg.l⁻¹) e dos ácidos aspártico e glutâmico (0,25 e 0,5 g.l⁻¹, respectivamente). Condições de cultivo: meio - (G65-F)TPP- sem NaCl, com 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico; aeração - como indicada; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). AA- aminoácidos; Vit- vitaminas.

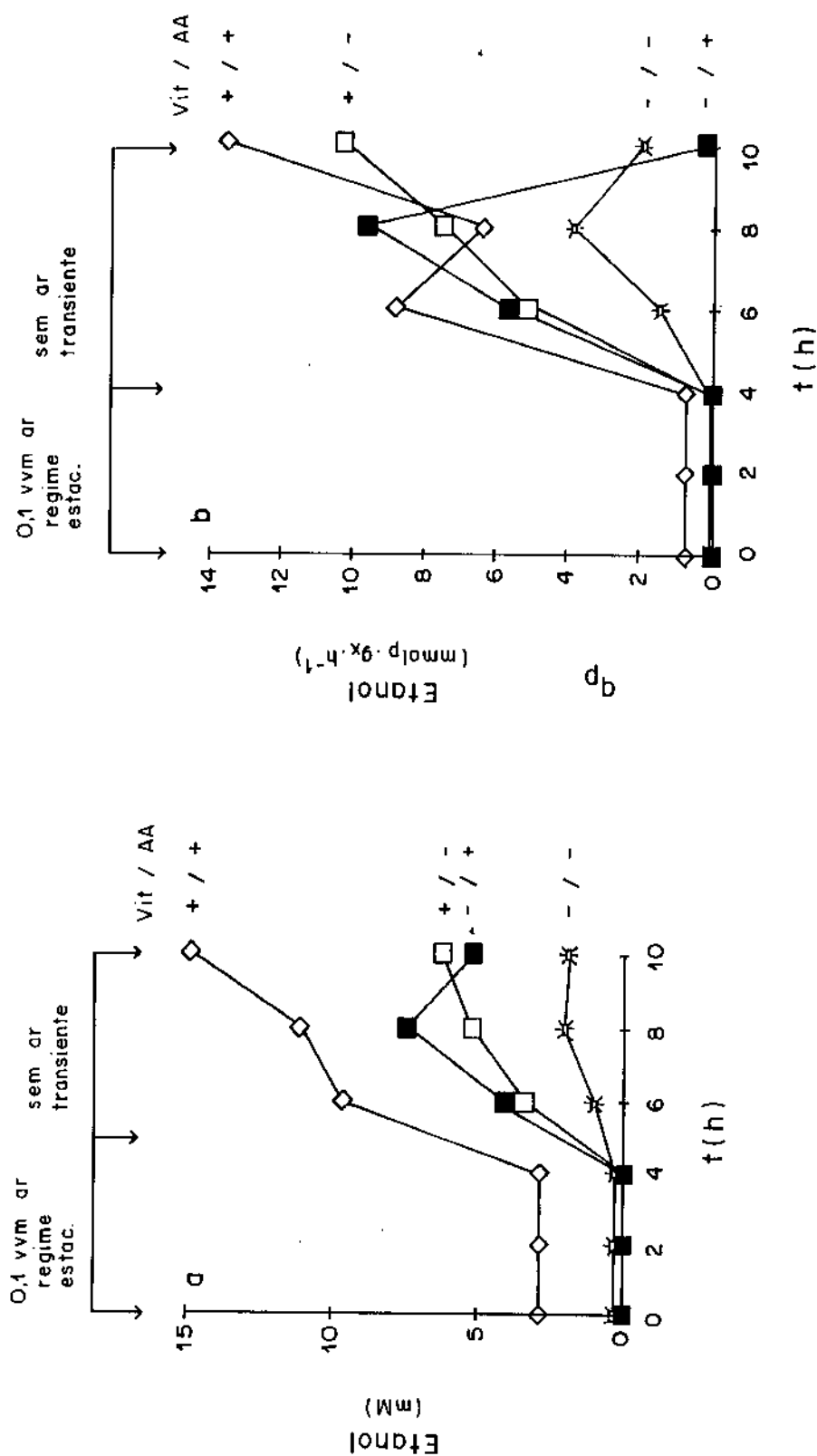


Fig. 36. Formação do etanol (a) e taxa específica de formação de etanol (b), durante o processo de transição das condições parcialmente aeróbicas para anaeróbicas, na presença e ausência de vitaminas (riboflavina, pirofosfato de tiamina (TPP), biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico, na concentração individual de 10 mg.l $^{-1}$) e dos ácidos aspártico e glutâmico (0,25 e 0,5 g.l $^{-1}$, respectivamente). Condições de cultivo: meio - (G-F)TPP- sem NaCl, com 1,0 g.l $^{-1}$ de ácido oxálico e 0,5 g.l $^{-1}$ de ácido cítrico; aeração - como indicada; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 650C; taxa de diluição - 0,240 h $^{-1}$; substrato - xilose (66,607 mM). AA- aminoácidos; Vit- vitaminas.

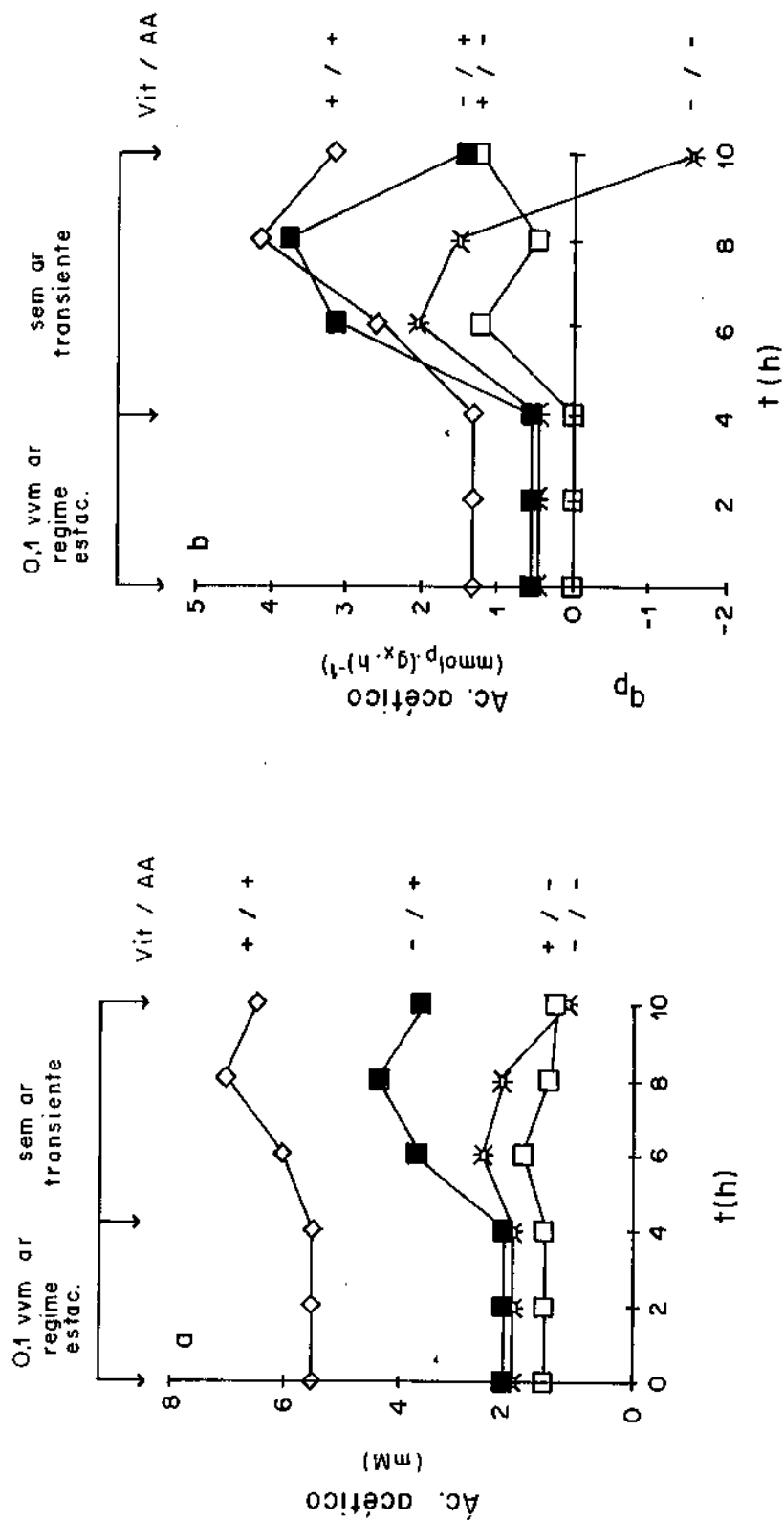


Fig. 37. Formação de ácido acético (a) e taxa específica do referido ácido (b), durante o processo de transição das condições parcialmente aeróbicas para anaeróbicas, na presença e ausência de vitaminas (riboflavina, pirofosfato de tiamina (TPP), biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico, na concentração individual de 10 mg.l⁻¹) e dos ácidos aspártico e glutâmico (0,25 e 0,5 g.l⁻¹, respectivamente). Condições de cultivo: meio - (G65-F)TPP- sem NaCl, com 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico; aeração - como indicada; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). AA- aminoácidos; Vit- vitaminas.

As Figuras 38(a) e 38(b) apontam a formação de ácido fórmico e a taxa específica de formação do ácido, respectivamente. Observa-se importantes oscilações que aparentemente independem dos aminoácidos ou das vitaminas adicionados. Como pode ser visto na Tabela 2, os valores de $r_{m-Fo/AC}$, em nenhuma condição, atingiram a relação de 2:1.

As Figuras 39(a) e 39(b) revelam que, em condições anaeróbicas, as vitaminas e os aminoácidos presentes no meio influenciaram no metabolismo, de forma a reduzir a formação de ácido láctico. A bactéria não formou o referido ácido, em condições parcialmente aeróbicas, quando as vitaminas e os aminoácidos não foram adicionados ao meio. Mas a produção do ácido se iniciou

Tabela 1. Valores de $r_{m-AC/ET}$ obtidos durante a transição de aerobiose para anaerobiose, em cultura contínua ($D = 0,240 \text{ h}^{-1}$), em meio (G65-F), na presença (+) e ausência (-) de vitaminas (piridoxina, biotina, mio-inositol, riboflavina e TPP), na concentração individual de 10 mg.l^{-1} e de aminoácidos (ácidos aspártico e glutâmico), na concentração de 0,25 e $0,5 \text{ g.l}^{-1}$, respectivamente.

$r_{m-AC/ET}$				
tempo (h)	Vit:AA (-:-)	Vit:AA (+:-)	Vit:AA (++:)	Vit:AA (-:++)
2	2,621	0,554	0,629	0,929
4	1,129	0,281	0,638	0,588
6	0,581	0,213	0,439	0,716

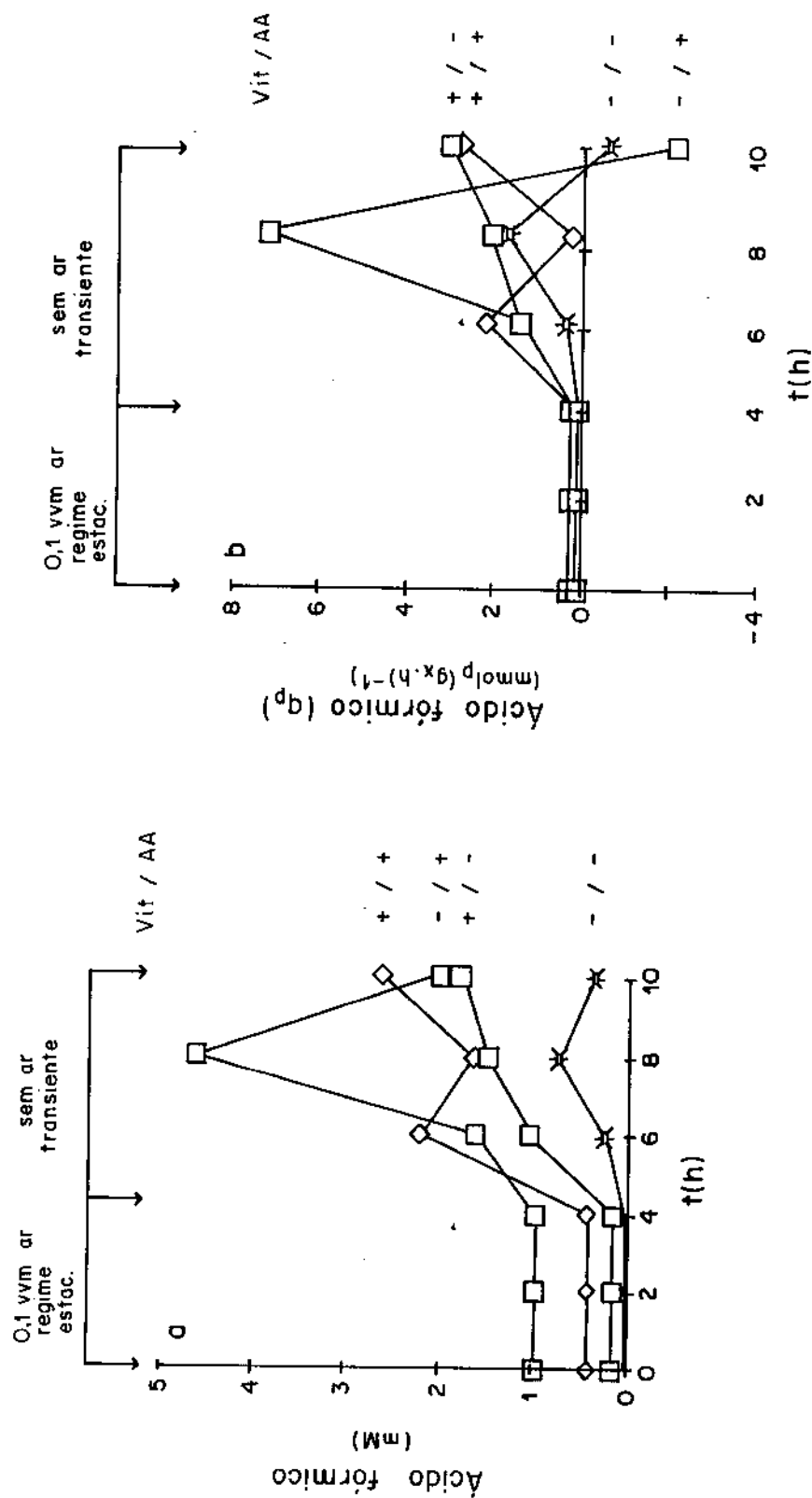


Fig. 38. Formação de ácido láctico (a) e taxa específica de formação de ácido (b), durante o processo de transição das condições parcialmente aeróbicas para anaeróbicas, na presença e ausência de vitaminas (riboflavina, pirofosfato de tiamina (TPP), biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico, na concentração individual de 10 mg.l⁻¹) e dos ácidos aspártico e glutâmico (0,25 e 0,5 g.l⁻¹, respectivamente). Condições de cultivo: meio - (G65-F)TPP sem NaCl, com 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico; aeração - como indicada; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). AA - aminoácidos; Vit - vitaminas.

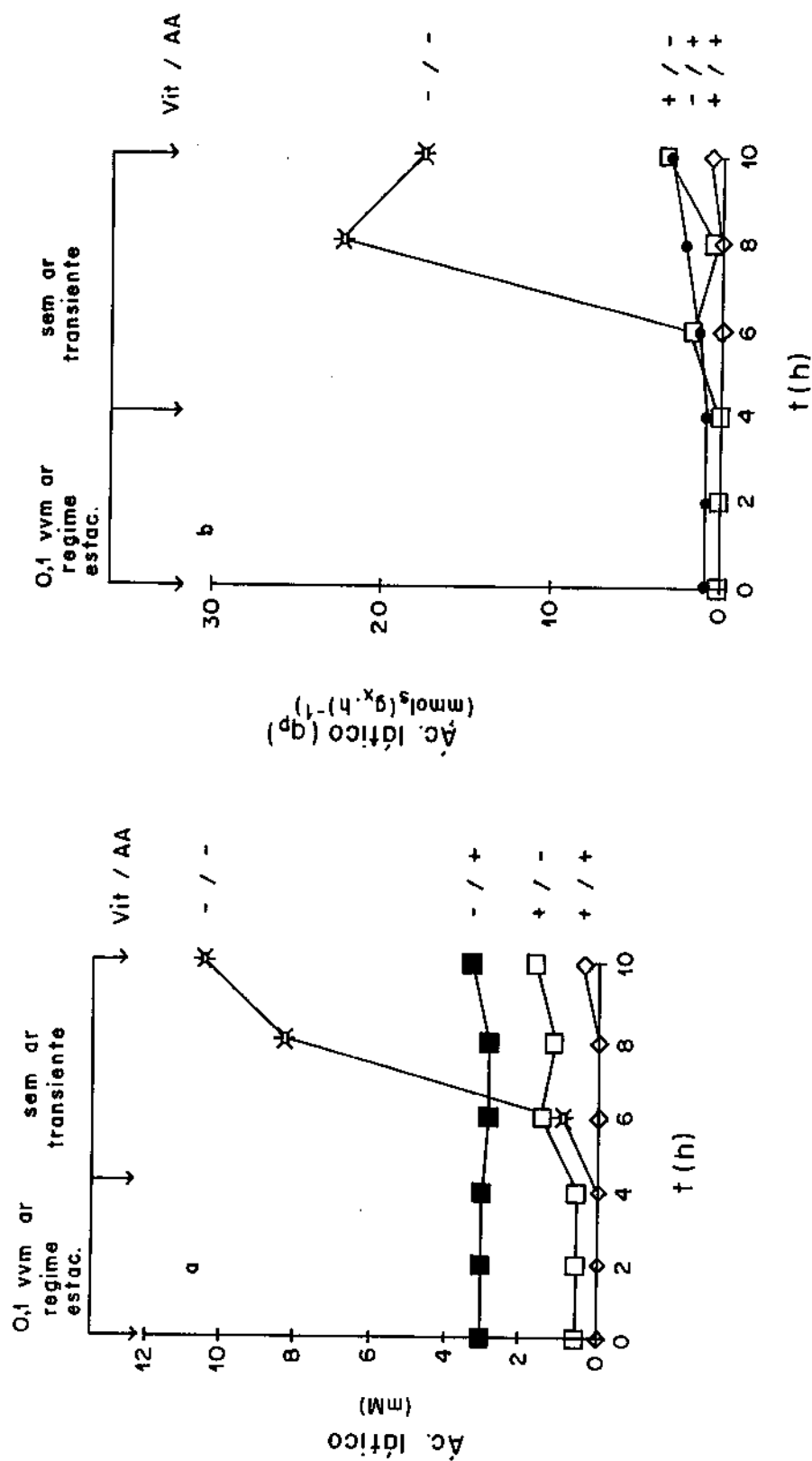


Fig. 39. Formação do ácido fórmico (a) e taxa específica de formação do ácido (b), durante o processo de transição das condições aeróbicas para anaeróbicas, na presença e ausência de vitaminas (riboflavina, pirofosfato de tiamina (TPP), biotina, piridoxina, mio-inositol e ácido nicotínico, na concentração individual de 10 mg.l⁻¹) e dos ácidos aspártico e glutâmico (0,25 e 0,5 g.l⁻¹, respectivamente). Condições de cultivo: meio - (G₆₅-F)TPP⁻ sem NaCl, com 1,0 g.l⁻¹ de ácido oxálico e 0,5 g.l⁻¹ de ácido cítrico; aeração - como indicada; agitação - 600 rpm; pH - 6,5; temperatura - 65°C; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹; substrato - xilose (66,607 mM). AA⁻ aminoácidos; Vit - Vitaminas.

imediatamente após o estabelecimento da anaerobiose, atingindo, em 6 horas, níveis elevados. Quando as vitaminas e os aminoácidos foram adicionadas, separadamente, o ácido láctico foi produzido mesmo em parcial aerobiose. Os aminoácidos se mostraram capazes de evitar oscilações importantes na formação do ácido, tanto na presença quanto na ausência das vitaminas.

Tabela 2. Valores de $r_{m-Fo/AC}$ obtidos durante a transição de aerobiose para anaerobiose, em cultura contínua ($D = 0,240 \text{ h}^{-1}$), em meio (G65-F), na presença (+) e ausência (-) de vitaminas (piridoxina, biotina, mio-inositol, riboflavina e TPP), na concentração individual de 10 mg.l^{-1} e de aminoácidos (ácidos aspártico e glutâmico), na concentração de 0,25 e $0,5 \text{ g.l}^{-1}$, respectivamente.

$r_{m-Fo/AC}$				
tempo (h)	Vit:AA (-:-)	Vit:AA (+:-)	Vit:AA (++)	Vit:AA (-: +)
2	0,098	0,556	0,367	0,438
4	0,333	1,034	0,238	1,055
6	0,308	1,374	0,407	0,551

4. Crescimento de Bacillus stearothermophilus lld-15 em Meio Contendo Hidrolisado de Palha, em Cultura Contínua e em Condições Parcialmente aeróbicas.

Os resultados obtidos com o microrganismo, usando a xilose contida no hidrolisado de palha como fonte de carbono, confirmam a boa estabilidade que proporcionam os componentes do meio (G₆₅-F) tanto em meio sintético como em meio complexo.

A concentração de células obtidas foi de 1,018 g.l⁻¹, com um fator de conversão de 32,153 g_x.mol_s⁻¹. As taxas específica e volumétrica de consumo foram, respectivamente, 7,464 mmol_s.(g_x.h)⁻¹ e 7,564 mmol_s.(l.h)⁻¹. A taxa volumétrica de formação de células foi de 0,244 g_x.(l.h)⁻¹.

Não foram detectadas formações importantes de etanol ou ácidos. No controle, o microrganismo não atingiu o regime estacionário, por esse motivo, os parâmetros fisiológicos não foram considerados.

DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho, ou seja, o estabelecimento das condições necessárias para que Bacillus stearothermophilus pudesse ser usado na formação de etanol foi satisfatoriamente atingido. Assim, através do estudo do metabolismo da bactéria, das alterações na composição química do meio e da adequação das condições de cultivo, definiu-se um sistema de fermentação de duplo estágio. A operação do processo respiro-fermentativo, característico do primeiro estágio, mostrou que o microrganismo cresce rapidamente em meio definido tendo xilose como fonte de carbono ($(G_{65}-F)TPP^-$), sem necessidade de adição de fatores de crescimento, em pH 6,5, com uma taxa de diluição de $0,240\ h^{-1}$, em condições parcialmente aeróbicas ($0,1\ vvm$ de ar) e ao mesmo tempo está adaptado para produzir etanol tão logo a anaerobiose se estabeleça. As condições de cultivo definidas no presente trabalho simplificam os estudos de otimização da produção de etanol, no segundo estágio, pois verificou-se que vitaminas devem ser adicionadas para impedir a formação de ácido lático e estimular a via PFL na formação de etanol.

As condições de cultivo afetam o metabolismo do microrganismo alterando as relações molares entre os produtos de fermentação. A acetil-CoA, por exemplo, formada pela via PFL participa de outros processos metabólicos que não estão relacionados com a síntese de etanol e de ácido acético. Este último pode ser um intermediário na formação de etanol, viabilizando, sob o ponto de vista teórico, o uso da bactéria na produção industrial deste produto. Para isto, é fundamental que o poder redutor armazenado na molécula de ácido fórmico, proveniente do metabolismo, esteja disponível ao processo, ou seja, os H^+ sejam captados por um sistema enzimático, como FDH, tendo NAD ou NADP como cofator, capaz de reduzir o acetaldeído. A

presença de CO_2 e a ausência de H_2 nos gases de saída reforçam a participação deste sistema e exclue a possibilidade da ação da formato liase no processo de descarboxilação do ácido fórmico.

Discutiremos em seguida as diferentes condições nas quais Bacillus stearothermophilus lld-15 foi estudado. Tem-se observado que esta linhagem apresenta nítida resposta à variação externa de pH. Pelos $Y_{x/s}$ obtidos nos diferentes valores de pH, percebe-se que a atividade da bactéria foi mais intensa em pH 6,2 e que o substrato não foi eficientemente utilizado para o crescimento. Como o μ nos diferentes valores de pH foi mantido constante, o q_s dependeu apenas, e de forma inversa, de $Y_{x/s}$. Os valores de q_s revelaram que a célula, nesse pH, passou a consumir, mais intensamente, a fonte de energia por unidade de tempo. Isso significa um maior desvio da fonte de carbono para a formação de produtos de fermentação ou simplesmente um aumento de m .

O mutante lld-15 tem se mostrado instável no que se refere à produção de ácido láctico. A formação do ácido depende das condições de cultivo pois, ao se alterar o pH de 6,2 para 6,5, sua produção foi paralisada.

O aparecimento de ácido láctico em pH 6,2 pode ser explicado pela maior afinidade da LDH por um ativador metabólico e/ou pela presença de inibidores da via PFL em valores de pH baixos. A concentração de F1,6BP requerida para a LDH de Lactobacillus casei atingir $1/2 V_{\text{MAX}}$ foi cerca de 1.000 vezes mais alta em pH 6,6 que em 5,5 (Holland & Pritchard, 1975). Acredita-se que as alterações encontradas nas concentrações de produtos finais de fermentação formados por diversas bactérias se devam à variação intracelular de F1,6BP (Vries et al., 1967; Vries et al., 1970; Gylswyk, 1977; Thomas et al., 1979; Sivakanesan & Dawes, 1980; Silley & Armstrong, 1984). Os níveis intracelulares de ativadores da LDH, como a F1,6BP, e de inibidores da via PFL, como as trioses fosfato, são os

principais fatores envolvidos no processo de mudança do comportamento de linhagens de Streptococcus com relação aos produtos finais de fermentação (Thomas et al., 1980). As condições de cultivo (Fordyce et al., 1984) e a concentração intracelular de fosfato inorgânico, AMP, ADP, ácido pirúvico e ácido fosfoenolpirúvico (Yamada & Carlsson, 1975) interferem na formação e no efeito ativador da F1,6BP. Existem também microrganismos que não respondem à sua ação ativadora (Yamada & Carlsson, 1975; Wallace, 1978).

É possível que a bactéria possua duas LDH distintas como ocorre com células de Clostridium thermohydrosulfuricum (Turunen et al., 1987). Segundo estes autores, células que produzem etanol como principal produto, possuem uma LDH (LDH_E) diferente daquelas que formam ácido lático como produto principal (LDH_L). A isoenzima LDH_E apresentou um requerimento quase que absoluto por F1,6BP. A isoenzima LDH_L é ativada pela F1,6BP apenas em temperaturas acima de 40 °C. Ambas as isoenzimas tiveram suas atividades ótimas a 70 °C, ou seja, correspondendo à temperatura ótima de crescimento da linhagem lld-15.

A presença de ácido lático em pH 6.2 pode ser ainda atribuída à quebra da "dormência genética", ou seja, a processos de desrepressão gênica provocados pelas condições de cultivo. Esse fenômeno tem sido descrito nas bactérias aeróbicas obrigatórias Alcaligenes eutrophus (Schlegel & Vollbrecht, 1980 ; Schlegel, 1984;) e Xanthobacter autotrophicus (Steinbüchel et al., 1983), com relação à presença de enzimas fermentativas, em condições limitantes de oxigênio. No caso específico do Bacillus stearothermophilus lld-15, o aparecimento de ácido lático não se trata de uma reversão ocorrida devido à reconhecida condição altamente seletiva do sistema contínuo, mas de uma alteração puramente fenotípica.

A presença, embora baixa, de ácido succínico no meio, como produto final de fermentação, significa a participação da ramificação redutiva da via dos ácidos tricarboxílicos no processo metabólico do Bacillus stearothermophilus. Sabe-se que, em condições aeróbicas, a via dos ácidos tricarboxílicos opera de modo cíclico. Em anaerobiose, porém, Escherichia coli usa esta via de forma ramificada, dando como produto final, ácido succínico ou ácido α -cetoglutarico (Amarasingham & Davis, 1965; Courtright & Henning, 1970). Pesquisas recentes têm mostrado que, em bactérias anaeróbicas obrigatórias, a reação de fixação de CO_2 catalisada pela PEP-carboxiquinase é a única pela qual compostos C_3 podem originar ácido oxaloacético (Schlegel, 1986). Na reação, 1 mol de CO_2 , liberado pela ação da FDH sobre 1 mol de ácido fórmico, é incorporado a 1 mol de ácido fosfoenolpirúvico, gerando 1 mol de GTP por mol de ácido oxaloacético formado. Em microrganismos, a presença de altas concentrações de CO_2 faz com que a reação seja direcionada para a formação do ácido oxaloacético. A redução do ácido recém-formado pela desidrogenase málica, tendo $\text{NADH} + \text{H}^+$ como coenzima, leva à formação do ácido málico. Este se transforma em ácido fumárico por intermédio de uma fumarase. O ácido fumárico é, por sua vez, reduzido a ácido succínico pela fumarato redutase (Hirsch et al., 1963), com capacidade de formar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Ataai & Shuler, 1985). Segundo Schlegel (1986), a localização da fumarato redutase na célula está de acordo com sua função no transporte de elétrons. A redução do ácido fumárico é um processo consumidor de prótons e, estando ligada à produção de um potencial de prótons (positivo no lado externo), a enzima deve estar localizada na superfície da membrana interna.

A participação da FDH no metabolismo do Bacillus stearothermophilus, é importante porque usa o potencial redutor do ácido fórmico para a síntese de ácido succínico e para a produção

adicional de etanol e ao mesmo tempo fornece o CO_2 necessário ao processo de fixação autotrófica na formação do ácido oxaloacético. Linhagens de Escherichia coli crescem em ácido málico apenas quando hidrogênio é suprido ao sistema ou se uma outra fonte de elétrons, como o ácido fórmico, estiver disponível no meio (Macy et al., 1976). Alcaligenes eutrophus, quando crescida em ácido fórmico, além da FDH fórmica, sintetiza a ribulose-1,5-difosfato carboxilase e ribulose-5-fosfatoquinase, enzimas responsáveis pela fixação de CO_2 . Foi evidenciado ainda que mutantes incapazes de fixar CO_2 , via ciclo de Calvin, não assimilam o ácido fórmico (Friedrich et al., 1979). A presença de duas FDH, uma solúvel (FDH_s) e outra ligada à membrana (FDH_m), tem sido demonstrada em Alcaligenes eutrophus (Friedrich et al., 1979), Escherichia coli e em Escherichia aurescens (Cole & Wimpenny, 1966; Gray et al., 1966). A FDH_s é especificamente formada quando o ácido fórmico é introduzido no sistema. A FDH_m , cuja função está ainda para ser elucidada, é formada inespecificamente (Friedrich et al., 1979). Em meio complexo, a produção de FDH_s (Gray et al., 1966) e da FDH_m (Cole & Wimpenny, 1966; Gray et al., 1966) é estimulada. Isso explica a maior formação de etanol e um melhor crescimento, por parte do Bacillus stearothermophilus lld-15, em meio complexo que em meio definido.

O ácido fórmico produzido pela bactéria mostra, pois, seu relevante papel no metabolismo, como agente redutor. O $\text{NADH}+\text{H}^+$ produzido durante a formação do ácido fosfoenolpirúvico não participa da redução do ácido fumárico por, no mínimo, uma questão estequiométrica. Durante toda a glicólise, 1 mol de $\text{NADH}+\text{H}^+$ é formado para cada mol de ácido fosfoenolpirúvico produzido. Como cada mol de ácido oxaloacético requer 1 mol de $\text{NADH}+\text{H}^+$ para a formação de ácido málico, uma outra fonte redutora deve estar disponível no sistema de modo a permitir que o ácido fumárico seja reduzido a ácido succínico. A FDH_m usa, provavelmente, FAD como

coenzima e, assim, participa da redução do ácido fumárico. Foi observado que a FDH de Methanobacterium formicicum possui um K_M muito baixo para o FAD, sugerindo que a enzima pode atuar como transportador de elétrons do ácido fórmico para sistemas enzimáticos FAD-dependentes (Schauer & Ferry, 1982). Tem-se demonstrado também que vesículas de membranas são fundamentais para a redução do ácido fumárico e que o $NADH+H^+$ não participa desse processo.

A presença de ácido succínico no líquido de fermentação, em todos os valores de pH estudados pode também ser devido ao meio complexo utilizado. O ácido aspártico deste meio pode promover a síntese de ácido fumárico e NH_3 livre através de uma desaminação não oxidativa catalisada pela aspartase. O ácido succínico seria então produzido por ação da fumarato redutase com participação do $FADH+H^+$, formado durante a descarboxilação do ácido fórmico.

De um ponto de vista geral, tem sido estabelecido que Bacillus stearothermophilus realiza a clivagem fosforoclástica, ou seja, fermenta a glicose, em condições anaeróbicas, produzindo ácido fórmico, etanol e ácido acético como os principais produtos de fermentação, com uma razão molar de 2:1:1, respectivamente, sem formação de CO_2 (McKray & Vaughn, 1957). Em pH 7,0, esta relação foi praticamente obedecida e, em todos os casos, houve formação de CO_2 . A mesma razão molar foi obtida por Hartley & Payton (1983), em pH 8,0. É prática comum sugerir a participação de vias metabólicas alternativas por meio de análises da relação molar desses três produtos de fermentação. Quando os resultados mostram uma razão de ácido fórmico para etanol somado com o ácido acético de 1:1, a PFL é considerada a principal enzima envolvida no processo de conversão do ácido pirúvico em condições anaeróbicas. Quando a relação é aproximadamente de 1:2, sugere-se o envolvimento da PDH no metabolismo anaeróbico do ácido pirúvico (Thomas et al., 1979;

Thomas et al., 1980; Fordyce et al., 1984). A participação do ácido fórmico em outras reações importantes pode afetar a relação sem significar, necessariamente, um envolvimento de outra via metabólica no processo. A ação da PDH no metabolismo do ácido pirúvico, em condições anaeróbicas, implicaria em modificações significativas nas propriedades de controle da enzima, pois, foi observado, em Escherichia coli, que a atividade da PDH, em anaerobiose, sofre um rápido e completo bloqueio (Hansen & Henning, 1966).

O desequilíbrio da relação (2:1:1) pode significar formação de etanol a partir de ácido acético por ação da AcDH que utiliza $\text{NADH}+\text{H}^+$ resultante da oxidação do ácido fórmico pela FDH_5 . Assim, os $\text{NADH}+\text{H}^+$ produzidos na formação do ácido pirúvico seriam responsabilizados pela redução final do acetaldeído. Na via PFL_M (Fig. 40), o ácido acético se posiciona como um intermediário na produção de etanol. Tem se verificado que o ácido acético oxida o $\text{NADH}+\text{H}^+$ na presença de extrato bruto de células de Sarcina ventriculi e que o NADP pode ser reduzido pelo ácido fórmico em condições anaeróbicas, mas na presença de ferredoxina. Esta última reação foi detectada apenas em condições anaeróbicas devido à sensibilidade da enzima ao oxigênio (Stephenson & Dawes, 1971). Apesar de este microrganismo diferir taxonomicamente do Bacillus stearothermophilus, existe a possibilidade de tanto $\text{NADH}+\text{H}^+$ como o $\text{NADPH}+\text{H}^+$, produzidos a partir do ácido fórmico, estarem envolvidos no processo de formação de etanol. A constante formação de CO_2 e as relações molares encontradas reforçam a possibilidade do envolvimento da FDH_5 e do ácido acético na produção de etanol.

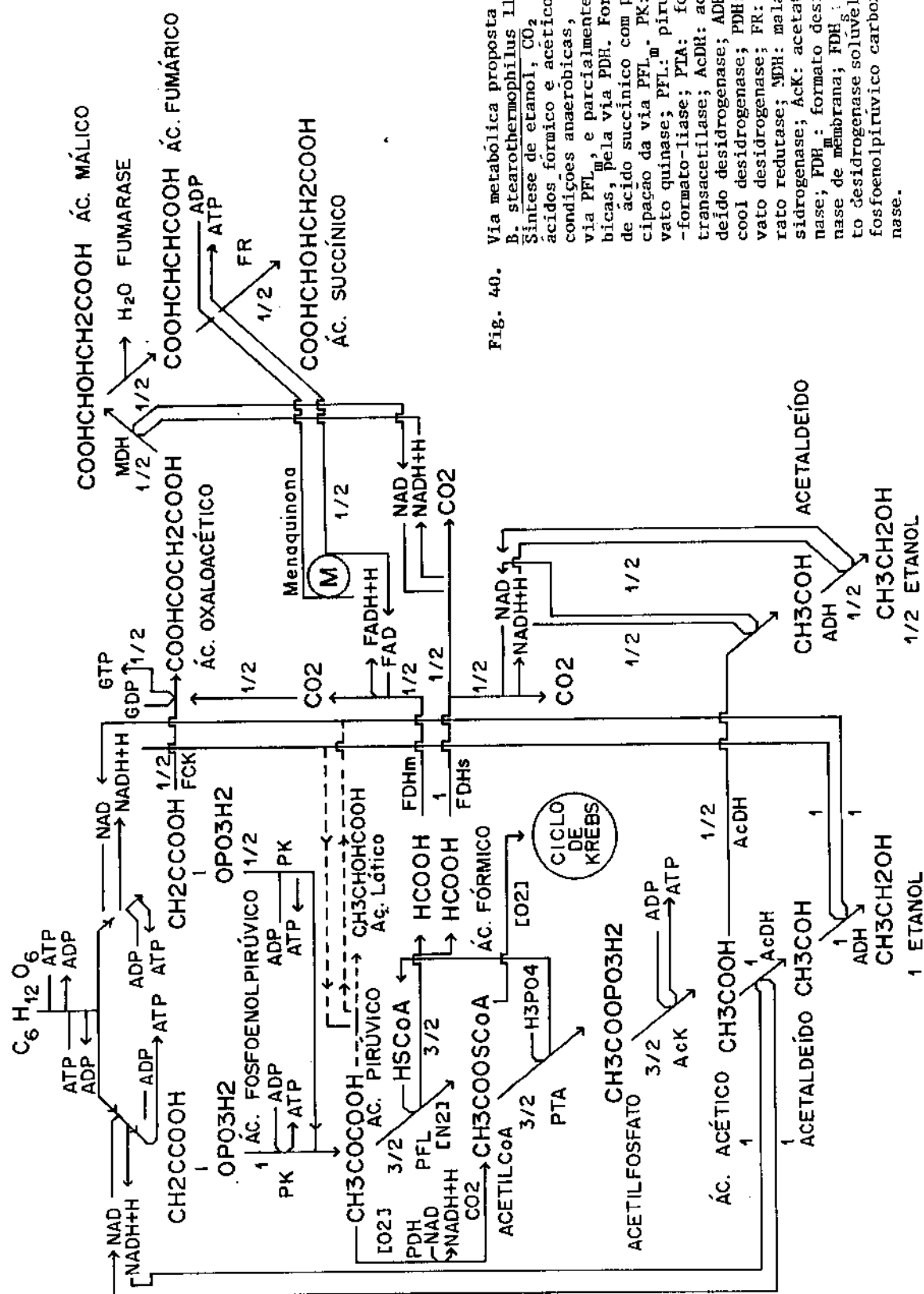


Fig. 40. Vía metabólica propuesta para *B. stearothermophilus* 114-15. Síntese de etanol, CO_2 e dos ácidos fórmico e acético, em condições anaeróbicas, pela via PFL, e parcialmente aeróbica, pela via PDH. Formação de ácido succínico com participação da via PFL. PK: piruvato-quinase; PFL: piruvato-formato-liase; PTA: fosfato-transacetilase; ACDH: acetaldéido desidrogenase; ADH: álcool desidrogenase; PDH: piruvato desidrogenase; FR: fumarato redutase; MDH: malato desidrogenase; ACD: acetato quinase; FDH: formato desidrogenase de membrana; FDH_s: formato desidrogenase solúvel; PK: fosfoenolpirúvico carboxiquinase.

A via PFL, apresentada por Thomas et al. (1979), Thomas et al. (1980) e Fordyce et al. (1984), por falta de esqueleto de carbono, mesmo havendo disponibilidade de poder redutor (ácido fórmico), torna impossível a obtenção de um $Y_{ET/S}$ ($\text{mol}_{ET} \cdot \text{mol}_S^{-1}$) maior que 1 para a glicose e maior que 0,833 para a xilose. Na via metabólica PFL_M sugerida (Fig. 40), o ácido fórmico desempenha uma função muito importante no metabolismo celular, participando tanto da síntese de etanol como de reações anapleróticas.

O fator de conversão do etanol, obtido em pH 6,5, ($Y_{ET/Xi} = 0,745 \text{ mol}_{ET} \cdot \text{mol}_{Xi}^{-1}$), representa 89,4% do valor teórico. É, sem dúvida, importante considerar que, enquanto o $Y_{ET/Xi}$ máximo teórico, para a via PFL, é de $0,833 \text{ mol}_{ET} \cdot \text{mol}_{Xi}^{-1}$, para a via PDC esse valor se eleva para $1,667 \text{ mol}_{ET} \cdot \text{mol}_{Xi}^{-1}$. Para fazer, portanto, comparações entre os $Y_{ET/Xi}$ do Bacillus stearothermophilus lld-15 e os de leveduras, é necessário considerar o fator de conversão teórico máximo obtido pela via PDC. Assim o $Y_{ET/Xi}$, em pH 6,5, passa a corresponder a 44,7% desse valor máximo.

Os valores de $Y_{ET/Xi}$ dependem, entre outros fatores, das condições de cultivo, do meio de cultura e do microrganismo usado. Apesar da variação encontrada na literatura (Detroy et al., 1982; Slininger et al., 1982; Schvester et al., 1983; Fein et al., 1984; Preez et al., 1984; Jeffries, 1985; Nigam et al., 1985a; Nigam et al., 1985b; Wayman & Tsuyuki, 1985; Alexander, 1986) leveduras apresentam, de um modo geral, um $Y_{ET/Xi}$ mais alto que o Bacillus stearothermophilus lld-15. Os valores relativamente baixos do $Y_{ET/Xi}$ de leveduras se devem, possivelmente, à formação e acúmulo de xilitol no meio, uma vez que, esses microrganismos podem formar 4 mols de xilitol e 1 mol de etanol para cada 5 mols de xilose utilizada (Parisi, 1989). Com Bacillus stearothermophilus, a xilose se converte em xilulose por ação da xilose isomerase. Portanto, o bloqueio da fonte de carbono para síntese de etanol que ocorre

nesta bactéria não se dá nos passos iniciais do metabolismo da xilose, como acontece com leveduras, mas pode se efetuar devido à formação de ácido acético na via PFL ou de seu acúmulo na via PFL_M.

As leveduras Candida shehatae e Pachysolen tannophilus (Preez et al., 1984), extensivamente estudadas para a formação de etanol a partir de xilose, exibem valores de q_{ET} bem mais baixos do que aquele obtido com Bacillus stearothermophilus lld-15, em pH 6,5.

O destino do substrato na via PFL ou PFL_M vai depender, entre outros fatores, da atividade das enzimas envolvidas no processo, como FDH_S e AcDH. Pode-se perceber que a via PFL_M parece ser consistente, uma vez que o traçado de curvas para o fator de conversão do etanol e do ácido acético ($Y_{P/S}$), em função do pH, não é paralelo. É importante salientar que se a via PDH estivesse operando simultaneamente com a PFL, seria difícil haver um $Y_{ET/S}$ menor que $Y_{AC/S}$, como observado nos valores de pH 6,2, 7,0 e 8,0.

O fato de os $Y_{ET/S}$ e $Y_{AC/S}$ ultrapassarem, em determinados valores de pH, os fatores de conversão teóricos para a via PFL ($0,833 \text{ mol}_P.\text{mol}_S^{-1}$) para a xilose, apóia a via PFL_M sugerida. Esta via não pressupõe uma ramificação que resulte em razões equimolares de ácido acético e etanol. A produção do etanol é função da atividade das enzimas envolvidas no processo de redução do acetaldeído e da disponibilidade de $\text{NADH}+\text{H}^+$. Um desvio deste componente redutor para sistemas de síntese de material celular pode levar a uma queda na produção relativa de etanol, mas não necessariamente de ácido acético. Na via PFL_M, o ácido acético figura como um possível precursor de etanol. A vantagem desse processo seria a síntese de ATP, vinculada à formação de ácido acético, e a oxidação de $\text{NADH}+\text{H}^+$ durante a formação de acetaldeído e de etanol.

Em pH 8,0, o $Y_{FO/S}$ ultrapassou o limite teórico de $1,667 \text{ mol}_{FO}.\text{mol}_{X_i}^{-1}$ previsto para a via PFL, pois só é possível obter, por essa via, 10 mols de ácido fórmico para cada 6 mols de xilose. Isso

indica que a acetil-CoA formada pela via PFL foi desviada para outras vias importantes do metabolismo celular. Nesse caso, $Y_{Fo/S}$ pode passar do valor teórico devido ao cálculo de s' que, como já referido, foi calculado pela fórmula:

$$ds' = k(dp_{ET} + dp_{AC})$$

Se o teor de xilose usado pela via PFL fosse obtido com base no ácido fórmico produzido, os valores de $Y_{ET/S'}$ e de $Y_{AC/S'}$ seriam 22,3% mais baixos e mesmo assim o $Y_{AC/S'}$ permaneceria acima do limite teórico.

O cálculo do fator de conversão, utilizando apenas o substrato que entra na via PFL, oferece condições de se estabelecerem estimativas do potencial da via em produzir etanol, sem que outros processos interfiram na avaliação. Quando se leva em consideração todo o substrato utilizado pelo microrganismo para se calcular o $Y_{ET/S}$, só se terá um fator de conversão alto, e até mesmo acima do teórico para a via metabólica em questão, em casos excepcionais, onde o crescimento e a síntese de metabólitos outros forem reduzidos ou até paralisados, e o substrato for direcionado quase que exclusivamente para a via de produção de etanol.

O maior valor de q_{ET} obtido em pH 6,5 evidencia que as enzimas responsáveis, na via PFL_M, pela síntese de etanol estão, neste pH, mais ativas que nos demais valores de pH, independentemente do número de células presentes.

Em bactérias que possuem PDC como Zimomonas (Dawes, 1963; MacGill et al., 1965; Payton, 1984), Erwinia (Haq & Dawes, 1971) e Sarcina (Stephenson & Dawes, 1971), a formação de CO₂ é esperada em virtude da ação direta desta enzima sobre o ácido pirúvico. Como Bacillus stearothermophilus não possui PDC, a evolução de CO₂, resultante do metabolismo anaeróbico, que se observou durante todo o experimento, não provém da descarboxilação do ácido pirúvico.

Se o substrato fosse glicose ou sacarose, o CO_2 poderia ser produzido na via pentose fosfato devido à descarboxilação do ácido 6-fosfoglicônico para a formação de ribulose-5-fosfato (Apêndice A). A presença de CO_2 nos gases de saída se deve, provavelmente, à descarboxilação do ácido fórmico pela FDH (Fig. 40).

O fato de o valor de q_s diminuir com o aumento de pH, pode estar relacionado com o efeito deste sobre a energia de manutenção (m) ou sobre o desvio do substrato para a síntese de metabólitos. Tem sido demonstrado, em Zimomonas mobilis, que o pH externo atua sobre o metabolismo não associado ao crescimento, e que a energia de manutenção diminui com o aumento do pH (Lawford & Ruggiero, 1990). Os resultados de Y_{ATP} obtidos em pH 6,2 quando comparados com aqueles conseguidos em pH 6,5, 7,0 e 8,0 indicam que a energia de manutenção, para Bacillus stearothermophilus lld-15, aumenta em pH mais alcalino. Logo, a redução de q_s pode estar vinculada ao menor desvio da fonte de carbono. De fato, foi apenas em pH 6,2, que se detectou a formação de ácido láctico.

O Y_{ATP} tem sido descrito como uma constante que possui um valor médio de 10,5 ($\text{g}_x \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{ATP}}$), independentemente do microrganismo usado (Bauchop & Elsdén, 1960; Stephenson & Dawes 1971; Dirar & Collins, 1972; Hempfling & Mainzer, 1975). Apesar de um número razoavelmente grande de autores terem encontrado valores de Y_{ATP} próximos de 10,5 ($\text{g}_x \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{ATP}}$), podem-se encontrar valores bem mais altos (Hobson & Summers, 1967; Moustafa & Collins, 1968; Vries et al., 1970; Russell & Baldwin, 1979) e também muito mais baixos que 10,5 (McGill et al., 1965; Haukeli & Lie, 1971; Dirar & Collins, 1972). Muitos autores têm observado que o Y_{ATP} depende do microrganismo (Stouthamer & Bettethausen, 1973), da composição química do meio cultura (Haukeli & Lie, 1971; McGill et al., 1965), da taxa de diluição (Vries et al., 1970), da fonte de carbono e das condições de cultivo (Kröger, 1974). Podem ser encontrados valores que vão de 3,4 (Dirar & Collins, 1972) a 26,3 ($\text{g}_x \cdot \text{mol}^{-1}_{\text{ATP}}$) (Russell

& Baldwin, 1979). Pelo que se observa na literatura e no presente trabalho, o Y_{ATP} não parece ser uma constante absoluta. O valor do Y_{ATP} do Bacillus stearothermophilus lld-15 mostrou depender do pH externo. Em pH 6,2, houve um acoplamento mais efetivo entre o catabolismo e o anabolismo que nos demais valores de pH.

A dificuldade encontrada para iniciar o crescimento da bactéria, em fermentador, pode ser explicada pela presença de inibidores desenvolvidos no meio. Estes podem se originar durante o período de ajuste das condições de trabalho do fermentador, que normalmente é feito para evitar variações bruscas quando da transferência do inóculo. O meio complexo não evitou que tais inibidores se formassem e nem protegeu a bactéria da ação inibitória. De um modo geral, meios complexos além de interferir nos processos metabólicos, permitindo que nutrientes normalmente não assimiláveis se tornem úteis ao microrganismo (Moustafa & Collins, 1969), impedem que nutrientes importantes na formação de determinados produtos do metabolismo não sejam utilizados (Drew & Domain, 1973).

Meios definidos têm sido usados para elucidar o mecanismo de ação de nutrientes no metabolismo, para evidenciar diferenças entre microrganismos, para facilitar a identificação dos agentes químicos que participam da formação de inibidores e para determinar a estabilidade do microrganismo e do próprio meio de cultura.

A fase "lag", ausente no meio definido BSTSM, indica que o inóculo apresentava, no momento da transferência, uma condição fisiológica adequada. A não existência da fase de desaceleração e a presença concomitante da fase de declínio abrupto, observadas no meio BSTSM, foram causadas, possivelmente, por autólise celular. Isso demonstra que o referido meio de cultura transmite instabilidade ao microrganismo. Esta instabilidade pode ser causada pela formação e acúmulo de substâncias tóxicas ou pelo bloqueio no

transporte de determinados nutrientes. As substâncias tóxicas podem se originar tanto do metabolismo celular, causando instabilidade intrínseca, como da reação puramente química dos componentes do meio de cultura, resultando em instabilidade extrínseca.

A precipitação de algum componente do meio, como o FeCl_3 , pode ter uma participação importante na instabilidade extrínseca. A coloração do precipitado, observado no meio, sugeriu o envolvimento do FeCl_3 no processo. Além de o nutriente se tornar menos disponível à célula quando se precipita ou forma colóides (Postgate, 1965; Pirt, 1975), pode também acarretar um bloqueio no transporte de nutrientes devido à neutralização de cargas na superfície externa da membrana celular. Quando os colóides se fixam na superfície externa da membrana celular, podem interferir na permeabilidade, nutrição, excreção e, possivelmente, na respiração. Além disso, o excesso de ferro sólido nas proximidades da célula pode causar um aumento na concentração de ferro solúvel, em decorrência da formação de produtos ácidos de fermentação. Esse excesso de ferro disponível pode provocar um desbalanceamento iônico no protoplasma (Waring & Werkman, 1942a). Concentrações de ferro acima de $3\text{-}4\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ causam redução no crescimento de microrganismos e forma, ao mesmo tempo, precipitados (Waring & Werkman, 1942b). A precipitação de determinados componentes do meio de cultura parece ocorrer com relativa freqüência. O problema tem sido minimizado através de filtração (Waring & Werkman, 1942b; Bauchop & Elsdén, 1960), de acidificação do meio (Bauchop & Elsdén, 1960), do uso de agentes quelantes (Waring & Werkman, 1942a), da redução no teor do agente precipitante (Macpherson & Miller, 1963) e da manutenção do precipitado em suspensão uniforme por meio de agitação contínua do meio contido no reservatório (Linton et al., 1975).

Outra alternativa que pode reduzir a precipitação é a adição dos agentes precipitantes do meio após a autoclavagem. As

temperaturas de trabalho usadas durante todo o experimento com Bacillus stearothermophilus 11d-15 foram de 65 a 70 °C. Portanto, a adição de sais de ferro acima de 2 µg.ml⁻¹ depois da autoclavagem pode prevenir a precipitação do FeCl₃ no reservatório, mas não no interior do fermentador. Por este motivo, o procedimento não foi utilizado, optando-se por reduzir a concentração de FeCl₃, de 7,0 (BSTSM) para 1,0 mg.l⁻¹ (meio G).

O crescimento da bactéria, no meio BSTSM durante as duas primeiras horas iniciais e em batelada, pode ter ocorrido devido aos nutrientes trazidos juntamente com o inóculo ou devido às reservas celulares. Esse fato explica o baixo crescimento apresentado e a falta da fase "lag". A ausência dessa fase observada no meio G+CaCl₂, não significa, necessariamente, que este meio seja mais adequado ao crescimento do microrganismo que o meio G sem a adição do CaCl₂. As diferentes concentrações de inóculo também parecem não ser a causa desse fenômeno. A concentração do inóculo utilizada no meio BSTSM foi cerca de 11 vezes menor que no meio G+CaCl₂, enquanto a concentração do inóculo no meio G foi apenas 5,5 vezes menor que em G+CaCl₂. Se a concentração do inóculo fosse, nesse experimento, a causa da "lag" observada, a fase de crescimento no meio BSTSM deveria ser mais longa que aquela observada no meio G. As diferenças encontradas na fase "lag" entre os diferentes meios se devem, possivelmente, à fase de crescimento na qual o inóculo se encontrava no momento da transferência.

O idêntico comportamento que o microrganismo apresenta nos meios G e G+CaCl₂, durante a fase de desaceleração, revela que a redução no teor de ferro adicionado ao meio promove maior estabilidade, independentemente da adição de cálcio.

Como o meio G+CaCl₂ apresentou turvação provocada pela concentração de cálcio usada, a avaliação comparativa entre os meios deve ser tomada com cautela. Em todo o caso, ficou

demonstrado que a precipitação provocada pelo cálcio não apresenta o mesmo quadro de inibição que se obtém com ferro. A precipitação do ferro, além de não permitir um bom desenvolvimento do microrganismo, parece provocar lise devido, provavelmente, à falta de nutrientes ao nível celular. Comportamento semelhante tem sido observado com culturas de Bacillus stearothermophilus submetidas à deficiência de carbono (Coultate & Sundram, 1975).

O efeito do precipitado de ferro sobre o Bacillus stearothermophilus lld-15 se torna evidente quando se compara, em cultura contínua, o comportamento do microrganismo em meio G com aquele obtido em meio BSTSM. Embora baixas concentrações de extrato de levedura possam limitar o crescimento de microrganismos (Perez et al., 1992), Amartei et al. (1991a) observaram que, com o meio BST-MM e em cultura contínua, esta linhagem exige extrato de levedura e triptona para apresentar um bom crescimento. O meio BST-MM difere do BSTSM, aqui usado, apenas no que diz respeito à concentração de vitaminas. O meio BST-MM possui 10^2 vezes mais vitaminas que o meio BSTSM. Mesmo assim, os resultados obtidos aqui são praticamente os mesmos, ou seja, a densidade óptica obtida ficou em torno de 0,2. É interessante observar que a densidade óptica, neste trabalho, atingiu o valor de aproximadamente 1,2 quando apenas o teor de ferro foi reduzido (meio G). A mesma densidade óptica foi conseguida por Amartei et al. (1991a), apenas quando foram adicionados extrato de levedura e triptona ao meio de cultura. Esses aditivos atuam, possivelmente, como agentes quelantes, evitando a precipitação do sal de ferro no meio.

A oscilação irregular, observada no crescimento do Bacillus stearothermophilus no meio BSTSM durante o período de 52 horas, pode ser explicada com base na formação de produtos do metabolismo que afetam, juntamente com o precipitado formado, o crescimento do microrganismo. O mesmo comportamento não foi observado por Amartei et al. (1991a). A concentração de ferro disponível para o

microrganismo, no fermentador, pode ser, num determinado momento, completamente diferente daquela que se presume existir no reservatório. Se se assumir que o Bacillus stearothermophilus 11d-15 possui sistema enzimático suficiente para produzir o sideróforo, o baixo nível de ferro disponível à cultura induziria a formação desses compostos. A taxa volumétrica de formação de sideróforo tende a ser menor quanto menor for a concentração celular no meio. Num determinado período, o microrganismo pode estar produzindo os agentes quelantes numa taxa específica de formação também muito baixa. A oscilação pode ser explicada tanto pelo excesso como pela deficiência do metal no meio.

A deficiência e o excesso de ferro podem alterar o valor de μ , acarretando arraste de células, quando $\mu < D$. Se essa situação perdurasse por longos períodos, haveria, sem dúvida, um arraste completo. As condições do meio devem permitir que μ atinja valores maiores que D , provocando um novo aumento no número de células. A repetição desse ciclo causa a oscilação observada.

O precipitado, portanto, induz um desbalanceamento metabólico profundo, em consequência, possivelmente, de períodos de deficiência seguidos de períodos de toxicidade. Os resultados sugerem que precipitados de ferro, presentes no meio, aliados à capacidade do microrganismo em tornar o metal disponível, fazem com que o meio seja inadequado para o crescimento, independentemente do sistema de cultivo utilizado. Embora não se espere que em sistemas contínuos de fermentação haja variação na população microbiana e na concentração de nutrientes no tempo, o fenômeno de oscilação nesses sistemas tem sido reportado (Sikyta & Slezák, 1965; Boddy et al., 1967; Essajee & Tanner, 1979; Jöbses et al., 1986; Jarzebski, 1992). Oscilações, quando não provocadas por controles imperfeitos das condições de cultivo, se devem, provavelmente, às interações por "feedback". Nesse caso, as interações podem se dar entre a

célula e um parâmetro do meio ambiente, entre reações intracelulares interligadas, como nas divisões sincrônicas, e, finalmente, entre diferentes populações (Harrison & Topiwala, 1974). Acredita-se que a oscilação no crescimento de Bacillus stearothermophilus 11d-15, observada no meio BSTSM, seja do tipo onde existam interações, por "feedback", entre a célula e um parâmetro do meio.

Os resultados sugerem que a adição, ao meio de cultura, de $7,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de FeCl_3 não causa instabilidade. Mas, se esta concentração provocar a formação de precipitados, como ocorreu no meio definido BSTSM, a estabilidade celular fica comprometida. Como no meio complexo BSTCM, com adição de $7,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de FeCl_3 , não houve formação de precipitados, a estabilidade celular não foi afetada. Havendo precipitação, a concentração de ferro se torna excessiva, se os ácidos produzidos atuarem sobre o precipitado. Como os volumes de trabalho do fermentador e do reservatório foram de 1 a 20 litros, respectivamente, o precipitado que se dissolver no fermentador fornecerá ferro numa concentração 20 vezes maior que a desejada.

O problema de se iniciar o crescimento em fermentador que se observou anteriormente em meio complexo (BSTCM), continuou também ocorrendo com os três meios definidos. Portanto, o meio de cultura possui ainda outros componentes que provocam, direta ou indiretamente, inibição. Problema semelhante foi detectado com Bacillus stearothermophilus por (Rowe et al., 1975). A inibição ocorrida tanto em frascos de Erlenmeyer como em fermentador com chicanas de aço inoxidável, mostra que este inibidor difere daquele observado por Hernandez & Johnson (1967) com Escherichia coli, onde o aço inoxidável, presente no fermentador, fazia parte do processo inibitório.

O meio G, sendo adequado ao crescimento da bactéria, foi usado para investigar o comportamento da mesma durante o processo de

transição. Esse processo pode provocar parada no crescimento ou fazer com que a célula entre em dormência, sem que a viabilidade celular seja afetada. Morte celular (sem lise) e dormência, embora sejam processos distintos, afetam, de forma semelhante, a avaliação do crescimento quando medida em peso seco, ou seja, seguindo o modelo distribuído. Em cultura contínua, quando morte celular (com ou sem lise) ou dormência acontecem, o balanço de microrganismos se estabelece da seguinte forma:

$$\begin{aligned} Vdx &= \mu x V dt - j_M x V dt - j_L x V dt - F x dt \\ dx/dt &= \mu x - j_M x - j_L x - D x \\ dx/dt &= [(\mu - j_M - j_L) - D] x \\ dx/x &= [(\mu - j_M - j_L) - D] dt \\ \int_{x_0}^x (1/x) dx &= \int_0^t [(\mu - j_M - j_L) - D] dt \\ x &= x_0 e^{[(\mu - j_M - j_L) - D]t} \\ \ln x &= \ln x_0 + [(\mu - j_M - j_L) - D]t \end{aligned}$$

no regime estacionário, $dx/dt = 0$,

logo:
$$\mu = j_M + j_L + D$$

j_M , referindo-se à taxa de morte celular sem lise, pode ser removido da equação, porque a avaliação do crescimento, em termos de peso seco, leva em consideração o número total de células do sistema. Nesse caso, uma célula morta sem lise e outra apenas dormente não poderão ser distinguidas entre si. Supondo que o sistema de cultivo seja batelada ($D=0$) e que j_L e μ sejam zero, pode-se ter, na prática, um $dx/dt = 0$, com um valor alto de j_M . Assim, a equação:

$$dx/dt = x(\mu - j_M - j_L - D)$$

se torna
$$dx/dt = x(-j_M)$$

o que não satisfaz a condição de batelada anteriormente

estabelecida, ou seja, matematicamente, dx/dt não se torna zero quando j_m é diferente de zero. Isso significa que a concentração de células atinge um platô e se mantém neste nível porque o método analítico de crescimento, ou seja, o modelo distribuído, não distingue as células mortas sem lise das viáveis com taxa de crescimento nula. Quando, no entanto, a análise de crescimento levar em consideração a variação de células viáveis no tempo (dx_v/dt), como no modelo segregado estruturado, o valor de j_m deve ser introduzido.

Considerando o sistema contínuo e eliminando j_m pelos motivos acima discutidos, tem-se:

$$dx/dt = x(\mu - j_L - D)$$

no regime estacionário, $dx/dt = 0$

logo: $\mu = j_L + D$

tomando d_c como taxa de decaimento, ou seja, $d_c = (j_L + D)$

então: $\mu = d_c$

$$\ln x = \ln x_0 + (\mu - d_c)t$$

$$\ln x = \ln x_0$$

Se $\mu = 0$, $dx/dt < 0$ e não havendo lise celular, ou seja, $j_L = 0$, então:

$$d_c = D$$

logo: $x = x_0 e^{-Dt}$

o valor de x se reduz com o tempo numa taxa igual a D . Se $\mu = 0$, $dx/dt < 0$ e ocorrer lise celular, ou seja $j_L > 0$,

então $d_c > D$

logo: $x = x_0 e^{-(j_L + D)t}$

Se $\mu > 0$, $j_L = 0$ e, mesmo assim, $dx/dt < 0$, então:

$$D > \mu$$

Se, numa determinada condição, D for sempre maior que μ , haverá arraste completo e D será também sempre maior que μ_{MAX} . Isso

explica o comportamento do microrganismo na transição de aerobiose para anaerobiose. Como:

$$x = x_0 e^{(\mu_{MAX} - j_L - D)t}$$

O valor de j_L sendo desprezível, a equação se torna igual àquela na qual se obtém o valor de μ_{MAX} pelo método dinâmico, ou seja:

$$x = x_0 e^{(\mu_{MAX} - D)t}$$

Nesse caso, o valor máximo da inclinação ($\mu_{MAX} - D$) é igual a $(-D)$, quando μ_{MAX} se torna desprezível em relação a D . Valores de inclinação maiores que D , como os observados, significam, portanto, lise celular.

Os valores de j_L obtidos em taxas de diluição e em vvm de ar diferentes, mostrando-se praticamente iguais ($0,03h^{-1}$), denotam uma ação de constante comprometimento celular devido à interrupção abrupta da aeração que independem do valor de D e do volume de ar da fase aeróbica. Esperava-se que o valor de j_L fosse menor onde houvesse menor choque anaeróbico, ou seja, naquele caso em que a aeração fosse mais baixa. Para Bacillus caldotenax crescido em meio mínimo a 65 e 70 °C, foram obtidos valores de K_d (taxa de morte) de 0,03 e 0,07 h^{-1} , respectivamente (Kuhn et al., 1980). Esse fenômeno apresentado pelo Bacillus stearothermophilus lld-15, conhecido como "lise anaeróbica", foi detectado em outros microrganismos e tem sido relacionado com a composição química do meio (Kusaka, 1967; Moustafa & Collins, 1968; Schulp & Stouthamer, 1970).

A ausência de crescimento após a redução de D de 0,240 para 0,1 h^{-1} e, finalmente, para 0 h^{-1} (batelada) indica que a taxa específica de crescimento do microrganismo é nula. Condições de cultivo, como a adição de estabilizadores ao meio, podem ser fundamentais para manter o crescimento e impedir que o processo de

lise se estabeleça irreversivelmente.

A adição de CaCl_2 ao meio desempenhou um importante papel no metabolismo do microrganismo. O crescimento mais baixo em G2 pode ser decorrente de um maior desvio da fonte de carbono para reações não ligadas ao crescimento. Isso é reforçado pelo fato de o valor de q_s no meio G2 ser sempre maior que em qualquer outro meio.

A mudança na taxa de diluição, de 0,07 para 0,240 h^{-1} , estabelecida em G2, não deveria ter acarretado, segundo os princípios básicos do quimiostato, alteração na concentração celular. Quando esta alteração ocorre, se deve ao efeito significativo da energia de manutenção sobre o microrganismo, em baixos valores de D. Foi observado que a adição de cálcio ao meio atua reduzindo o valor de m.

É interessante observar que o meio no qual foram adicionados 5,0 mg.l^{-1} de CaCl_2 (G1) mantém o crescimento em batelada e que, em cultura contínua, o regime estacionário se estabelece apenas quando são empregados baixos valores de D. Dependendo da concentração, o cálcio pode, portanto, reduzir a taxa específica de crescimento do microrganismo.

A relação do cálcio com a estabilidade de microrganismos, de enzimas e, até mesmo, com a recuperação de células lesadas por processos físicos e químicos, tem sido investigada por diversos pesquisadores. O cálcio está envolvido com a viabilidade celular (Stáhl & Ljunger, 1976), promove termoestabilidade de enzimas (Srivastava, 1987), modifica estruturas celulares (Weller & Haug, 1977) e, de um modo geral, protege a célula contra processos físicos e químicos desfavoráveis (Postgate & Hunter, 1962; Durban et al., 1970; Sherwood, 1972; Kotani et al., 1977; Payne, 1978; Jurado et al., 1987; Sreekumar & Basappa, 1992).

A anaerobiose, por sua vez, pode também afetar a composição química celular. Quando a aeração é paralisada, além do decréscimo

na taxa específica de crescimento, pode haver uma correspondente redução na concentração total e relativa de fosfatidiletanolamina, de fosfatidilglicerol e de cardiolipina (Card, 1973; Mosley et al., 1976). Foi verificado que, em determinadas condições de cultivo, a perda da viabilidade celular e a liberação de componentes citoplasmáticos, apresentadas por Bacillus stearothermophilus NCA 2184 podem ser evitadas com a adição de cálcio ou se as células forem submetidas à anaerobiose por 10 a 20 minutos (Mosley et al., 1976). As condições anaeróbicas exibem, portanto, efeitos de proteção semelhantes aos causados pelo cálcio, embora os dois processos de proteção possam apresentar mecanismos de ação diferentes. O aumento no teor de cardiolipina é responsável pela manutenção da viabilidade celular e resistência à lise. Tem-se sugerido que a proteção dada pelo cálcio se deve à formação de pontes de cátions entre grupos de fosfato das moléculas de fosfatidilglicerol (Mosley et al., 1976). Segundo esses autores, a proteção, em condições anaeróbicas, resulta da formação de ligações covalentes entre porções adjacentes de diacilglicerol pela conversão de fosfatidilglicerol em cardiolipina. No sistema de duplo estágio proposto, procuram-se manter, no segundo fermentador, células viáveis com um fator de lise, se não nulo, muito baixo. Se, em condições anaeróbicas, a formação de cardiolipina pela bactéria estiver comprometida, o cálcio adicionado poderá servir como alternativa para manter a viabilidade e atividade celulares.

O CaCl_2 estimula a formação de etanol e, principalmente, a produção de ácido acético. Pelas taxas volumétrica e específica de consumo, verifica-se que as células, em G2, apesar de estarem em menor concentração, mantêm uma alta atividade metabólica. A redução no crescimento, observada em G2, pode estar vinculada ao desvio do metabolismo provocado pelo cálcio, para a síntese de produtos de fermentação e não ao efeito inibitório desses produtos. A formação de etanol está, de certa forma, ligada à taxa específica de

crescimento pois, quantidades detectáveis de etanol só foram observadas em valores de D ($0,240 \text{ h}^{-1}$). Isso pode ser explicado pela maior disponibilidade de substrato por unidade de tempo, proporcionada pelo aumento de D . Silley & Armstrong (1985) demonstraram que, em processos contínuos, D não afeta a formação de produtos de fermentação se o suprimento de substrato por unidade de tempo for constante. Altos valores de D estimulam a formação de tais produtos e baixas taxas de diluição promovem altos valores de $Y_{x/s}$ com pouca formação de produto de fermentação (Russell & Baldwin, 1979).

O cálcio parece direcionar o metabolismo do microrganismo para a via PFL. Sendo, porém, a enzima PFL sensível ao oxigênio, é pouco provável que, mesmo em condições parcialmente aeróbicas, seja esta a via utilizada. Se a PDH substituir a PFL, haverá, como resultado, a formação de acetil-CoA, de CO_2 e de $\text{NADH}+\text{H}^+$. O destino da acetil-CoA, formada pela PDH, não foi, seguramente, aquele proposto por Hartley et al. (1987) e Hartley & Shama (1987) (Apêndice A). Segundo os autores, o ácido acético não seria produzido e haveria formação de dois mols de etanol por mol de glicose consumida. O que se observou foi um $Y_{\text{ET/SAC}}$ de $0,271 (\text{mol}_{\text{ET}} \cdot \text{mol}_{\text{SAC}}^{-1})$ e um $Y_{\text{AC/SAC}}$ de $1,828 (\text{mol}_{\text{AC}} \cdot \text{mol}_{\text{SAC}}^{-1})$. Em todos os casos, $Y_{\text{AC/SAC}}$ foi sempre maior que o de etanol. Isso indica que a formação de ácido acético é uma prioridade celular devido a sua vinculação com a formação de ATP. Os $\text{NADH}+\text{H}^+$ obtidos na reação de descarboxilação do ácido pirúvico indo, na sua maioria, participar de outras reações metabólicas importantes, como formação de ATP, via fosforilação oxidativa, provoca limitação de poder redutor para a formação de etanol. A relação molar etanol:ácido acético, que deveria ser de 1:1, sendo de 1:6,75, indica que essa limitação realmente existe. O ácido acético sendo um intermediário para a formação de etanol, o sucesso da reação depende apenas da disponibilidade de O_2 de $\text{NADH}+\text{H}^+$, e da

atividade das enzimas envolvidas no processo.

A alta concentração de ácido acético, nos meios onde o cálcio foi adicionado, indica que este componente ativa a PDH, em condições parcialmente aeróbicas. Em Saccharomyces cerevisiae, a regulação dessa enzima é feita por fosforilação (inativação) e desfosforilação (ativação), mediante a ação da piruvato desidrogenase quinase e da piruvato desidrogenase fosfatase, respectivamente (Uhlinger et al., 1986). O cálcio atua ativando a piruvato-fosfatofosfatase. Essa enzima, removendo o grupo fosfórico da PDH, devolve à essa última sua atividade catalítica (Randle et al., 1974; Randle et al., 1981; Reed & Pettit, 1981). Supondo que o ciclo de Krebs esteja operando em condições limitantes devido à baixa disponibilidade de O_2 , é possível que esteja havendo um acúmulo intracelular de acetil-CoA. A alta concentração desta pode estimular a PTA para formar acetilfosfato. Este, sob ação da AcK, se transforma em ácido acético, liberando ATP.

Os parâmetros cinéticos obtidos, nos meios em meio G e e $G+CaCl_2$, em função da variação de D mostram que o microrganismo não segue o modelo proposto por Herbert et al. (1956). A teoria do crescimento microbiano em cultura contínua e em condições limitantes de um nutriente não estabelece alteração na concentração de células em função da variação de D, como ocorreu nas faixas de 0,06 a 0,36 h^{-1} . O balanço de massa para substrato crescimento-limitante, quando a cultura se acha em regime estacionário, resulta na seguinte equação:

$$x = Y_{x/s}(s_0 - s)$$

Uma vez que s_0 (nas taxas de diluição entre 0,06 e 0,66 h^{-1}) e s são constantes, a redução da concentração celular observada no intervalo de 0,06 a 0,36 foi causada pelo $Y_{x/s}$. Isso acontece quando a fonte de carbono é desviada para processos que não estão relacionados com crescimento celular. A energia para manutenção

celular, por exemplo, é um processo que contribui de forma decisiva para esse desvio.

Em valores baixos de D , a célula deve promover um balanço entre $Y_{x/sc}$ e m , de modo que o crescimento seja mantido. Se não houver este balanceamento, ou seja, se a energia de manutenção for constante em qualquer que seja a taxa de diluição, podem-se obter valores de $Y_{x/sc}$ extremamente altos. Em $0,06 \text{ h}^{-1}$, quase todo o substrato foi usado para a manutenção celular. Embora Klebsiella aerogenes possa utilizar 90% da energia total consumida para manutenção celular (Stouthamer & Bettenhausen, 1973), é pouco provável que, para manter a concentração de células observada em $0,06 \text{ h}^{-1}$, o Bacillus stearothermophilus lld-15 tenha exibido um $Y_{x/s}$ da ordem de 16 g de células por mmol de substrato. O valor de m estimado no presente trabalho foi menor que aquele obtido para Bacillus caldotenax (Kuhn et al., 1980). Esses autores também obtiveram os mesmos desvios na cinética de crescimento aqui encontrados com Bacillus stearothermophilus lld-15. Variações de $Y_{x/s}$ com o aumento de D têm sido atribuídas ao decréscimo na concentração de O_2 por ocasião do aumento da taxa de diluição. Foram constatadas, no entanto, grandes variações nos valores de $Y_{x/s}$ mesmo mantendo um severo controle da concentração de oxigênio dissolvido (Senior et al., 1972). A existência de m leva a uma alteração na teoria do quimiostato e provoca diferenças entre $Y_{x/s}$ (total) e $Y_{x/sc}$. Nesse caso, as concentrações de substrato (s) e de células (x) devem ser estabelecidas, em regime estacionário, considerando o coeficiente m . Sabendo-se que a taxa específica de consumo total de substrato é definida como:

$$q_s = \mu/Y_{x/sc} + m$$

e que:

$$q_s = q_{sMAX} s / (s + K_s)$$

logo:

$$\mu/Y_{x/sc} + m = [q_{sMAX} s / (s + K_s)]$$

$$\mu = [Y_{x/sc} q_{sMAX} s / (s + K_s)] - mY_{x/sc}$$

como: $\mu_{MAX} = Y_{X/SC} q_{SMAX}$

então: $\mu = [\mu_{MAX} s / (s + K_s)] - mY_{X/SC}$

$$s\mu + \mu K_s = \mu_{MAX} s - K_s mY_{X/SC} - s mY_{X/SC}$$

$$\mu K_s + K_s mY_{X/SC} = -s\mu + \mu_{MAX} s - s mY_{X/SC}$$

$$\mu K_s + K_s mY_{X/SC} = s(\mu_{MAX} - \mu - mY_{X/SC})$$

$$s = (\mu K_s + K_s mY_{X/SC}) / (\mu_{MAX} - \mu - mY_{X/SC})$$

no regime estacionário, $\mu = D$, e $s = \tilde{s}$;

logo: $\tilde{s} = K_s (D + mY_{X/SC}) / (\mu_{MAX} - D - mY_{X/SC})$

A equação: $\mu = [\mu_{MAX} s / (s + K_s)] - mY_{X/SC}$

mostra a relação entre μ e s . Em batelada, o valor de s representa o teor de substrato limitante adicionado ao meio. Se esta concentração for suficiente apenas para a manutenção (s_M), o número de células manter-se-á constante enquanto s_M estiver presente. A equação acima revela que, se for traçado um gráfico de μ contra s , obtém-se uma reta com uma inclinação $\mu_{MAX}/(s + K_s)$ e um intercepto $-mY_{X/SC}$, ou seja, quando s for igual a zero, μ será igual a $-mY_{X/SC}$. Isso significa que μ assume o valor zero antes de s se tornar nulo. O valor de s , no ponto no qual $\mu = 0$, é chamado de s_M , isto é, corresponde ao teor de substrato necessário apenas para a manutenção celular. Assim:

$$0 = [\mu_{MAX} s_M / (s_M + K_s)] - mY_{X/SC}$$

Isolando s_M : $s_M = K_s mY_{X/SC} / (\mu_{MAX} - mY_{X/SC})$

Na equação: $\tilde{s} = K_s (D + mY_{X/SC}) / (\mu_{MAX} - D - mY_{X/SC})$

quando a concentração de substrato não for suficiente para promover crescimento, μ se torna zero. Para que a concentração celular naquele determinado ponto não varie, o valor de D deverá ser zero, ou seja, o regime estacionário se estabelece, num intervalo de tempo infinitesimal, quando o fluxo é paralisado. O processo

contínuo, no caso, se transforma em batelada e $\tilde{s}$ se equivale, nesse intervalo de tempo infinitesimal, a s_M . Nesse caso:

$$\tilde{s} = K_s m Y_{X/SC} / (\mu_{MAX} - m Y_{X/SC})$$

O balanço de massa para substrato crescimento-limitante, em condições nas quais m é um fator importante e onde $\tilde{s}$ difere de s_M , pode ser descrito como:

$$ds/dt = D(s_0 - s) - \mu x / Y_{X/SC} - mx$$

sendo:

$$\mu = \mu_{MAX} s / (s + K_s) - m Y_{X/SC}$$

$$ds/dt = D(s_0 - s) - \{[(\mu_{MAX} s / (s + K_s)) - m Y_{X/SC}] x / Y_{X/SC}\} - mx$$

no regime estacionário $\mu = D$, $x = \bar{x}$ e $s = \tilde{s}$; logo:

$$0 = D(s_0 - \tilde{s}) - \{[(\mu_{MAX} \tilde{s} / (\tilde{s} + K_s)) - m Y_{X/SC}] / Y_{X/SC}\} + m \} \bar{x}$$

a concentração de $\bar{x}$ no fermentador será:

$$\bar{x} = D(s_0 - \tilde{s}) / [(D/Y_{X/SC}) + m]$$

$$\bar{x} = D(s_0 - \tilde{s}) Y_{X/SC} / (D + m Y_{X/SC})$$

ou ainda:

$$\bar{x} = (s_0 - \tilde{s}) Y_{X/SC} / [1 + (m/D) Y_{X/SC}]$$

se todo o substrato que chegar ao fermentador for suficiente apenas para manutenção celular ($s_c = 0$), ou seja, $\mu = 0$, porque:

$$\mu = \mu_{MAX} s_c / (s_c + K_s)$$

Isso significa que $(s_0 - s) = s_M$, pelo menos momentaneamente. Neste caso, o regime estacionário é perturbado e μ difere de D ;

$$\text{logo: } ds/dt = D(s_0 - s) - \{[(\mu_{MAX} s / (s + K_s)) - m Y_{X/SC}] / Y_{X/SC}\} + m \} x$$

$$\text{ou: } ds/dt = D(s_M) - \{[(\mu_{MAX} s / (s + K_s)) - m Y_{X/SC}] / Y_{X/SC}\} + m \} x$$

e, finalmente, a equação se resume a:

$$ds/dt = D(s_0 - s) - mx$$

ou

$$ds/dt = D s_M - mx$$

com $\mu = 0$, o arraste de células se dá segundo a equação:

$$dx/dt = x(-D)$$

quando x diminua, $D(s_0 - s)$ se reduz de acordo com a equação:

$$D(s_0 - s) = mx + ds/dt$$

como D e s_0 são constantes, a redução na diferença $(s_0 - s)$ só é possível se s tender para s_0 . O incremento de s pode não ser observado na análise de açúcares, mas ser notado pelo crescimento que, a partir desse ponto, o microrganismo passa a exibir. Assim, a cultura pode entrar em novo regime. Nesse caso, $ds/dt = 0$, $\mu = D$ e a concentração de células volta a ser definida como:

$$\tilde{x} = D(s_0 - \tilde{s})Y_{x/sc} / (D + mY_{x/sc})$$

Se $\tilde{s}$ for desprezível no meio, a equação se resume a:

$$\tilde{x} = Ds_0Y_{x/sc} / (D + mY_{x/sc})$$

O processo de perturbação do regime se repete cada vez que D é alterado. O aumento de x foi evidenciado apenas quando a taxa de diluição cresceu de 0,06 para 0,30 h^{-1} . Nesta faixa de D , observa-se uma relação linear entre x e D , com um coeficiente de determinação de 0,997 e um coeficiente angular de 1,038. Para valores de D muito pequenos, pode-se dizer que:

$$\tilde{x} = Ds_0Y_{x/sc} / mY_{x/sc}$$

ou:

$$\tilde{x} = Ds_0/m$$

A diminuição no número de células, que ocorre durante o decréscimo de D , é um recurso utilizado pelo microrganismo no sistema contínuo para aumentar a disponibilidade de substrato necessário ao crescimento e assim, se manter no meio. O $Y_{x/s}$ é, na verdade, uma relação na qual o valor de x é dividido pela soma de dois números independentes, ou seja, Δs_c e Δs_m . Assim:

$$Y_{x/s} = x / \Delta s \quad (\text{fator de conversão total})$$

$$Y_{x/sc} = x / \Delta s_c \quad \text{e se refere ao fator de conversão verdadeiro}$$

onde: $\Delta s = \Delta s_c + \Delta s_M$ representa o teor de substrato usado

A redução da taxa de diluição acarreta, no fermentador, uma diminuição na concentração de substrato por unidade de tempo. Supondo que, para um determinado número de células, o Δs_M seja constante, no momento em que Δs_c se torna zero, o único substrato disponível é o Δs_M , ou seja:

$$\Delta s = \Delta s_M$$

Nesse instante, a massa celular continua viável, mas seu número vai decrescer, numa taxa igual a D , e o $Y_{X/S}$ diminuir. Este se reduz porque o número de células diminui e o Δs continua sendo utilizado na forma de Δs_M . Com a queda no número de células, as exigências por Δs_M se reduzem. Se Δs for constante, a queda em Δs_M acarretará um aumento de Δs_c , permitindo crescimento. O novo regime estacionário se estabelece quando $D = \mu$, mas as células, nessa nova taxa de crescimento, parecem ter aumentadas as exigências por Δs_M . O aumento provoca uma redução no novo $Y_{X/S}$ e na concentração celular, porque o valor de Δs_c atual foi diminuído em relação ao Δs_c anterior. A partir de um determinado limite, cada diminuição de D provoca uma redução na concentração de células e no $Y_{X/S}$. Essas reduções são geradas por um fator que poderia ser chamado " Δs limitante". O Δs se mostrou constante, na faixa de D compreendida entre 0,06 e 0,66. No conceito " Δs limitante", a redução da taxa de diluição não provoca queda no número de células, obedecendo a teoria do quimiostato, se o Δs não for limitante. Isso pressupõe a existência de um "pool" intracelular de Δs , que pode ser chamado de Δs_p , cujas dimensões vão depender da fração Δs_M . Quanto maior o valor de Δs_M , menor o de Δs_p . Portanto, do Δs total partem, com destinos diferentes, as frações Δs_c , Δs_p e Δs_M , representando, respectivamente, o substrato utilizado para crescimento, formação do "pool" e manutenção celular. A presença do "pool" garante a

constância dos valores de x e $Y_{x/s}$, que ocorre na faixa de D compreendida entre $0,36$ e $0,66 \text{ h}^{-1}$. Quando Δs_M aumenta, a célula transfere parte do Δs_p para Δs_M , deixando intacto o Δs_c . Isso faz com que se mantenham constantes o número de células e o fator de conversão total ($Y_{x/s}$). Quando o Δs_p se torna zero, qualquer aumento de Δs_M resulta em queda de $Y_{x/s}$ e de x , porque parte do Δs_c está sendo transferida para Δs_M . O sistema passa a operar em processo " Δs limitante". Assim, pode-se representar o valor de x como:

$$Y_{x/s} = x / (\Delta s_c + \Delta s_p + \Delta s_M)$$

logo:

$$x = Y_{x/s} (\Delta s_c + \Delta s_p + \Delta s_M)$$

No metabolismo celular existe, portanto, prioridade no que diz respeito às três frações. O grau de importância se dá na seguinte ordem: $\Delta s_M > \Delta s_c > \Delta s_p$. A prioridade estabelece um balanço entre Δs_M , Δs_c e Δs_p de modo a satisfazer às exigências celulares. O Δs_c só será comprometido pelo aumento de Δs_M , quando não mais existir Δs_p . Nessa fase, o processo de recuperação de Δs_c se faz, como já discutido, com a redução no número de células.

O fato de a concentração de células viáveis, no regime estacionário, manter-se constante, independentemente da alteração de D , quando este varia de $0,36$ para $0,60 \text{ h}^{-1}$, mostra que o coeficiente de manutenção afeta a teoria do quimiostato apenas em determinadas faixas de D . Quando a taxa de diluição varia de $0,36$ para $0,60 \text{ h}^{-1}$, em momento algum o valor de μ se iguala a 0 , mas num determinado intervalo de tempo t , μ se torna maior ou menor do que D , dependendo da variação de D . Logo em seguida, o regime estacionário se estabelece. A concentração celular se mantém igual àquela obtida antes de o regime ser quebrado pela mudança de D . Assim, tomando a equação:

$$\tilde{x} = D(s_0 - \tilde{s}) Y_{x/sc} / (\mu + mY_{x/sc})$$

verifica-se que, se, na faixa de D compreendida entre 0,36 e 0,66 h⁻¹ a ação de m for anulada pelo Δs_p , e se o regime foi atingido, a equação acima se torna:

$$\tilde{x} = D(s_0 - \tilde{s}) Y_{x/sc} (1/D)$$

ou seja:

$$\tilde{x} = (s_0 - \tilde{s}) Y_{x/sc}$$

como m foi considerado sem efeito sobre a concentração celular, o fator de conversão $Y_{x/sc}$ pode ser substituído por $Y_{x/s}$;

logo:

$$\tilde{x} = Y_{x/s}(s_0 - \tilde{s})$$

$Y_{x/s}$ representa uma constante de proporcionalidade. De fato, na faixa de D de 0,36 a 0,60 h⁻¹, este fator de conversão foi constante. Com isso, se retorna à forma original da cinética de crescimento de microrganismo em cultura contínua na qual, em condições limitantes de substrato, a concentração de x, no fermentador, vai depender de s_0 . Alterações na teoria quantitativa do quimiostato, em certos intervalos de D, têm sido também detectadas com outros microrganismos (Hobson, 1965; Burton & Garver, 1966; Mor & Fiechter, 1968; Moustafa & Collins, 1968; Tempest, 1970; Kuhn et al., 1980; Kloss et al., 1983; Prior, 1984; Robinson et al., 1984; Russel, 1986; Koh et al., 1987). Manifestações metabólicas de determinadas espécies, alterações fisiológicas devido às condições de cultivo, entre outros fatores, podem contribuir para tais modificações.

A falta de arraste completo de células, quando o reator está operando em valores de D superiores ao D_c ou, aproximadamente, iguais a μ_{MAX} , constitui outro fator de desvio da teoria do quimiostato. A não existência de arraste completo das células indica que a bactéria apresenta um μ_{MAX} diferente daquele observado em batelada, ou seja, 0,690 h⁻¹. Neste valor de D, a concentração

de células deveria ser zero e a de s , igualar-se a s_0 . Estudos em batelada, embora indiquem que esta taxa se encontra ao redor de $0,690 \text{ h}^{-1}$, foi possível obter células em regime estacionário, em taxas de diluição de $0,720$ e $0,780 \text{ h}^{-1}$. Tem sido enfatizado que, em condições experimentais, o número de células, embora baixo, nunca atinge valor zero, mesmo que cultivadas em taxas supercríticas (Fiechter, 1975). Regimes estacionários obtidos em valores acima de μ_{MAX} parecem ser fenômenos geralmente encontrados, indicando inadequação nos tratamentos teóricos atuais (Hobson, 1965), alteração no estado fisiológico de microrganismos (Harrison & Lovelless, 1971) ou seleção de linhagens de crescimento rápido em valores elevados de D (Dalton & Postgate, 1969). O arraste pode também não ocorrer devido à agitação imperfeita do sistema (Herbert, 1956; Pirt, 1985). Quando a mistura não é adequada, ao se atingir o D_c , pode haver pontos no fermentador que apresentem $D < D_c$. Estes pontos garantem o regime estacionário, mesmo que o restante do reator esteja operando com $D > D_c$. No presente trabalho, a cultura foi vigorosamente agitada (600 rpm); mesmo assim, pode ser o motivo da falta de arraste completo.

As células podem também se originar do fenômeno chamado "crescimento de parede". Microrganismos podem aderir à superfície do fermentador, formando camadas de células e fazendo com que, depois de atingirem uma determinada concentração, a massa total de bactérias permaneça constante (x''), liberando células filhas (x_p) para o meio de cultura. Esse fenômeno foi também observado por Topiwala & Hamer, (1971). O balanço de biomassa, nessas condições, pode ser descrito como:

$$dxV = \mu x V dt + \mu x_p V dt - F x dt$$

ou: $dx/dt = \mu x + \mu x_p - Dx$

no regime, $dx''/dt = 0$;

então: $Dx'' = \mu \tilde{x} + \mu \tilde{x}_p$

$$Dx'' = \mu(\bar{x} + \bar{x}_p)$$

O balanço do substrato crescimento-limitante seria:

$$dsV = Fs_0dt - Fsdt - \mu x/Y_{x/s}Vdt - \mu x_p/Y_{x_p/s}Vdt$$

$$ds/dt = D(s_0 - s) - \mu x/Y_{x/s} - \mu x_p/Y_{x_p/s}$$

como x e x_p se referem ao mesmo microrganismo, logo, $Y_{x/s} = Y_{x_p/s}$

então: $ds/dt = D(s_0 - s) - (x - x_p)\mu/Y_{x/s}$

quando se estabelece o regime, $ds/dt = 0$;

$$D(s_0 - \bar{s}) = (\bar{x} + \bar{x}_p)\mu/Y_{x/s}$$

como: $Dx'' = \mu(\bar{x} + \bar{x}_p)$

então: $D(s_0 - \bar{s}) = Dx''/Y_{x/s}$

ou seja: $x'' = Y_{x/s}(s_0 - \bar{s})$

Isso significa que, no regime estacionário, o valor de x'' vai depender da concentração do substrato crescimento-limitante (s_0), ou seja, o modelo para cálculo de x'' se aplica a processos com e sem o fenômeno "crescimento de parede". O valor de μ do microrganismo durante o regime estacionário pode ser calculado como segue:

sendo $\bar{x} = Y_{x/s}(s_0 - \bar{s})$

e $D(s_0 - \bar{s}) = (\mu\bar{x} + \mu\bar{x}_p)/Y_{x/s}$

então: $D(s_0 - \bar{s}) = \mu[Y_{x/s}(s_0 - \bar{s}) + \bar{x}_p]/Y_{x/s}$

logo: $\mu = D(s_0 - \bar{s})Y_{x/s}/[Y_{x/s}(s_0 - \bar{s}) + \bar{x}_p]$

Quanto à taxa de morte do microrganismo, o valor estimado neste trabalho ($0,07 \text{ h}^{-1}$) está de acordo com aquele obtido com Bacillus caldotenax a 70°C (Kuhn et al., 1980). Os resultados indicam que o cálcio parece exercer um efeito estimulador sobre o metabolismo do microrganismo. O valor de K_d , obtido no meio com adição de cálcio, foi mais baixo devido, possivelmente, a esse estímulo e não ao fato

de o cálcio proteger a célula do processo de morte ou lise. O valor desta constante poderia também ser deduzido do balanço de substrato, ou seja:

$$ds/dt = D(s_0 - s) - \mu x/Y_{x/s} - K_{ux}/Y_{x/s}$$

no regime: $\bar{x}(D + K_u)/Y_{x/s} = D(s_0 - \bar{s})$

então: $\bar{x} = Y_{x/s}D(s_0 - \bar{s})/(D + K_u)$

linearizando: $1/\bar{x} = 1/[Y_{x/s}(s_0 - \bar{s})] + K_u/[Y_{x/s}(s_0 - \bar{s})]1/D$

$\bar{x}$ será máximo quando todo $s_0 - \bar{s}$ for usado para formação de células,

então: $Y_{x/s}(s_0 - \bar{s}) = \bar{x}_{MAX}$

logo: $1/\bar{x} = 1/\bar{x}_{MAX} + (K_u/\bar{x}_{MAX})1/D$

K_u representa, nesse caso, o valor de D para x atingir a metade de seu valor máximo. K_u , definido também como a taxa de metabolismo endógeno, tem sido responsabilizado pela variação observada no fator de conversão (Martin et al., 1966; Sinclair & Topiwala, 1970; Topiwala, 1971; Esener et al., 1983; Andrews, 1984).

A falta de linearidade observada no gráfico da dupla recíproca $1/Y$ contra $1/D$, para o cálculo de m , mostra que, em determinadas faixas de D , o valor de $Y_{x/s}$ é diminuído. Este fato tem sido observado com certa freqüência (Watson, 1970; Russell & Baldwin, 1979; Silley & Armstrong, 1984). A falta de linearidade pode ser explicada pela síntese, embora não detectada no meio, de produtos de fermentação que ocorre em valores altos de D . O ácido lático parece ser um dos principais produtos de fermentação de Bacillus stearothermophilus lld-15, quando cultivado em altas taxas de diluição. Além do importante efeito tóxico do ácido sobre o crescimento (Herrero et al., 1985), o teor de ATP disponível à célula diminui, comprometendo ainda mais o crescimento celular e o fator de conversão ($Y_{x/s}$).

O fato de a relação entre $Y_{x/s}$ e D ser hiperbólica revela que a taxa específica de crescimento possui valores que limitam o fator de conversão. Foi encontrada semelhante relação não apenas para $Y_{x/s}$ e D , mas também para Y_{ATP} e D , em culturas de Escherichia coli crescidas em anaerobiose e em condições limitantes de glicose (Hempfling & Mainzer, 1975). A mesma relação hiperbólica entre Y_{ATP} e D foi observada em condições aeróbicas (Mainzer & Hempfling, 1976).

De um modo geral, pode-se dizer que a equação básica:

$$x = Y_{x/s}(s_0 - s)$$

representa o comportamento de um determinado microrganismo crescido em cultura contínua e em diferentes taxas de diluição, se $Y_{x/s}$ for independente de D , e se x e $Y_{x/s}$ dependerem apenas do nutriente limitante. Esses dois parâmetros devem manter uma relação de independência com os demais nutrientes do meio. No entanto, mesmo operando um quimiostato nas condições de limitação por um único nutriente, o sistema nem sempre se comporta da maneira ideal. Pelo que se observa na literatura, a forma mais comum de anomalia é a que foi apresentada neste trabalho, ou seja, falta de arraste completo para $D > D_c$ e variação de x e de $Y_{x/s}$ em determinadas faixas de D .

A eficiência de uso do substrato foi alta na taxa de diluição onde a produtividade foi máxima. Esse fato está de acordo com o trabalho de Herbert et al. (1956), onde afirmam que as condições para uma eficiência máxima de produção são obtidas com fluxos de alimentação necessários para atingir D_m , ou um pouco abaixo deste valor, e com concentrações práticas de substrato as mais altas possíveis. A concentração de substrato usada neste experimento não foi alta, para garantir um regime de substrato crescimento-limitante. Portanto, a produtividade máxima obtida é relativa, ou

seja, diz respeito à concentração de s_0 estabelecida.

Como o objetivo principal do primeiro fermentador é produzir microrganismos, combinando alta produtividade de células com eficiência de uso de substrato, as condições de cultivo utilizadas se mostram ideais para obter, no primeiro estágio, células de Bacillus stearothermophilus lld-15.

A forte redução na formação de CO_2 observada em cultura contínua, durante a transição de aerobiose para anaerobiose e o significativo aumento na evolução deste gás, após 35 horas de cultivo, sugerem haver um complexo enzimático responsável pela liberação do CO_2 que opera em condições parcialmente aeróbicas e outro que atua em anaerobiose. Se os complexos fossem os mesmos, o comportamento gráfico da seção A, seria diferente; mostraria uma queda de produção de CO_2 , que se estabilizaria em 0,65% sem atingir, por longo período de tempo, valores aproximadamente nulos. Comportamento similar foi detectado em culturas de Klebsiella aerogenes e de Escherichia coli (Harrison & Loveless, 1971).

Em condições parcialmente aeróbicas, o CO_2 evoluído resulta da ação da PDH sobre o ácido pirúvico. Sabe-se também que, nessas condições, etanol e ácido acético são produzidos. Nesse processo, a acetil-CoA, formada pela via PDH, serve como substrato para a PTA. Para não haver desbalanceamento da relação $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}$, os $\text{NADH}+\text{H}^+$ liberados durante a descarboxilação do ácido pirúvico seriam oxidados diretamente pelo complexo I da fosforilação oxidativa. No estabelecimento da anaerobiose, a PDH é inibida e a síntese de acetil-CoA se efetua pela via PFL. Essa alteração na via de síntese de acetil-CoA não resulta em liberação imediata de CO_2 , mas em formação de ácido fórmico. Como a produção de CO_2 foi restabelecida após 35 horas, assume-se ser este o tempo necessário para que a FDH seja sintetizada e/ou atue sobre o ácido fórmico. O longo período de síntese de novo da FDH, no processo de transição de aerobiose para anaerobiose, se deve, talvez, à ausência de substrato (ácido

fórmico) em concentrações necessárias à indução da enzima, em condições parcialmente aeróbicas. Se o ácido fórmico estivesse presente no meio nas concentrações necessárias à indução, provavelmente, se teria um período de síntese de FDH mais curto. No processo de duplo estágio proposto no Apêndice B, essa indução deve ser constante, uma vez que o referido ácido produzido no fermentador 2 (anaeróbico) é continuamente transferido para o fermentador 1 (parcialmente aeróbico). A síntese da FDH pode ser efetuada sem, necessariamente, a enzima apresentar atividade, por estar em condições parcialmente aeróbicas.

O aumento na evolução de CO_2 imediatamente após terem sido restabelecidas as condições parcialmente aeróbicas sugere a presença da PDH mesmo em condições anaeróbicas, mas não significa, como já discutido, que a enzima, nessas condições, esteja em atividade.

A baixa ou quase nula evolução de CO_2 durante a transição das condições aeróbicas para anaeróbicas e, ao mesmo tempo, do processo contínuo para batelada, sugere vinculação entre a síntese de FDH e a fase exponencial de crescimento. Isso é reforçado pelo fato de haver formação de CO_2 , quando a taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$ foi restabelecida. A formação da FDH pode depender também da concentração de produtos de fermentação, uma vez que em batelada, estes se acumulam no meio. A exaustão da fonte de carbono, durante a fase de transição do sistema contínuo para batelada, não pode ser a causa da falta de evolução de CO_2 porque foram encontrados valores de açúcares residuais relativamente altos.

Os resultados obtidos indicam que existem duas vias para a síntese de etanol e ácido acético em Bacillus stearothermophilus 11d-15. Uma via usa a enzima PFL para a formação de acetil-CoA e a outra emprega a PDH para o mesmo fim. A primeira atua em condições anaeróbicas e a última, em condições aeróbicas, como sugerido na

Figura 40. O fato de haver formação de CO_2 35 horas depois de instaurada a anaerobiose não significa que o início da formação de etanol e de outros produtos de fermentação se dê a partir do mesmo período de tempo. Isso desvincula a formação de CO_2 com a produção de etanol, como já discutido e apresentado na Figura 40.

Trocando-se a fonte de carbono de sacarose para xilose, percebe-se que, em condições parcialmente aeróbicas, a relação molar de 2:1:1 (ácido fórmico:etanol:ácido acético) esperada, também não é obedecida. Os resultados confirmam a fraca ou nula participação da enzima PFL no metabolismo do microrganismo, quando este é cultivado em condições parcialmente aeróbicas e, portanto, a formação de CO_2 observada durante o experimento foi decorrente da atividade da PDH. As condições de parcial aerobiose fornecem meios de se obter etanol por via metabólica diferente daquela convencionalmente aceita para esse microrganismo. A PDH pode participar do processo de produção de etanol, mas apenas como fonte de acetil-CoA. A partir deste ponto, a via que este produto deve seguir vai depender da fisiologia do microrganismo, das condições de cultivo e da composição química do meio de cultura.

É interessante notar que, no momento em que o ácido succínico desaparece do meio, o ácido láctico se torna um dos produtos principais da fermentação. Com isso se percebe que a produção de ácido láctico depende da pressão fisiológica exercida pelo fluxo da via glicolítica. Assim, é possível que, aumentando-se o teor de xilose no meio, o crescimento do microrganismo venha a ser afetado. A reversão genética da linhagem não parece ser a causa da formação de ácido láctico por parte do mutante, uma vez que o processo de formação deste ácido pode ser novamente bloqueado, se as condições de cultivo forem alteradas.

Pelos resultados obtidos verifica-se que o meio, onde houve redução nos teores de biotina e de ácido nicotínico de 100 para 34 $\mu\text{g.l}^{-1}$ e diminuição na concentração de macronutrientes (1/2 da

concentração presente no meio G), apresenta melhor performance para ser usado para o crescimento de Bacillus stearothermophilus 11d-15 no primeiro estágio. Neste meio, o microrganismo, além de apresentar um bom crescimento, produziu etanol como principal produto de fermentação.

Mesmo com a redução na concentração desses nutrientes do meio, ainda não foi solucionado o problema de crescimento que ocorre, com frequência, logo após a inoculação, dando a entender que algum componente do meio desempenha um importante papel no processo inibitório. O meio G(1/2MIC-1/2MAC) dá um bom suporte ao crescimento da bactéria, mas não a protege contra agentes inibidores, principalmente quando o substrato é a xilose.

Tem-se discutido também a capacidade adaptativa de microrganismos durante o crescimento em temperaturas elevadas (Amelunxen & Mudock, 1978). No presente trabalho, não foi incapacidade de adaptação o motivo da falta de crescimento imediato da bactéria a 70 °C, uma vez que a mesma tem mostrado extrema resistência a alterações de temperatura. Culturas rapidamente descongeladas e transferidas diretamente para temperaturas de 65 a 70 °C não apresentam problemas de crescimento. A temperatura está envolvida no processo inibitório, mas de forma indireta.

O restabelecimento da atividade da bactéria a 65 °C mostra que esta não perdeu a viabilidade devido a inibição. É possível que o meio de cultura que se encontra no reservatório seja de diferente composição daquele que se acha no fermentador. A diferença é, sem dúvida, provocada pela temperatura de trabalho (70 °C). No momento da redução da temperatura, de 70 para 65 °C, a taxa de formação de possíveis inibidores, se vinculada à temperatura, deve diminuir ou até ser anulada. Se a formação destes inibidores ainda se efetua, sua taxa, a 65 °C, deve ser sensivelmente menor que a taxa de diluição usada (0,240 h⁻¹). A hipótese de haver diferença entre a

composição química do meio presente no fermentador e a daquele que se encontra no reservatório foi reforçada pela fase "lag" que o microrganismo apresentou antes de iniciar a evolução efetiva de CO_2 , a 65°C . A bactéria se comportou como se um "novo" meio de cultura estivesse alimentando o fermentador. Quando o t_h atingiu o valor de 1,2, a atividade normal do microrganismo foi definitivamente restabelecida. É muito provável que, durante a fase de inibição, uma pequena parte da xilose estivesse disponível ao microrganismo. Caso contrário, haveria arraste completo de células e o teor de CO_2 seria reduzido a zero.

Comparando-se a varredura espectrofotométrica do meio de cultura G(1/2MIC-1/2MAC)-Xi com a da mistura binária "xilose- Na_2HPO_4 ", verifica-se que a reação marrom pode ser aumentada pela interação da mistura com algum outro componente do meio. A interação pode ser semelhante àquela observada com a mistura ternária "xilose- K_2HPO_4 -NaCl". A mistura binária da xilose com um desses dois componentes, isoladamente, não provoca reação marrom, mas, em conjunto, mesmo fraca, apresenta certa tendência a reagir. Ficou, portanto, estabelecido que o Na_2HPO_4 não pode ser adicionado ao meio, em processos de fermentação que utilizam altas temperaturas e que empregam xilose como fonte de carbono e energia.

É interessante observar que essas reações envolvem açúcares que possuem grupo aldeído em sua molécula. Os testes de reação positivos obtidos com xilose e arabinose, e negativos com xilitol e arabinitol, reforçam a hipótese do envolvimento do grupo aldeído no processo de formação de pigmentos inibidores de crescimento. Embora a autoclavagem de açúcares com fosfatos nem sempre iniba microrganismos (Hang e Hong, 1984) podendo, até mesmo, estimulá-los nos estágios iniciais de crescimento (Seargent et al., 1957), a formação do pigmento marrom provocada por aquecimento tem sido responsabilizada, como neste trabalho, por processos inibitórios em microrganismos (Danton & Postgate, 1969; Vadehra & Bellamy 1983).

A reação marrom aqui obtida não envolve aminoácidos, peptídeos ou proteínas mas os efeitos dos pigmentos formados sobre o microrganismo são semelhantes àqueles descritos por O'Brian & Morrissey (1989) para reação de Maillard. É possível que, além de reduzir a disponibilidade de substrato, a reação marrom possa estar envolvida com a inibição do sistema de transporte, inibição enzimática e com a formação de complexos com íons metálicos, tornando-os indisponíveis ao microrganismo.

Se o $Y_{x/s}$ for constante, qualquer fator que reduza o crescimento, como pH (5,9), por exemplo, provoca um aumento no teor de substrato (xilose) residual. A presença de uma maior concentração deste açúcar leva, juntamente com os sais do meio e com a temperatura de trabalho (70 °C), à formação de componentes inibidores. Quando o pH é novamente alterado para seu valor ótimo (6,5), a bactéria, mesmo na presença de vitaminas, não consegue superar a inibição, porque a taxa de formação do agente inibidor é alta. O fato de o crescimento só se restabelecer gradativamente após a redução da temperatura de 70 para 65 °C mostra que o meio está se modificando e se tornando livre desse agente inibidor. Isso se deve à redução de sua taxa de formação (dp_i/dt). Passado o período crítico de recuperação, a temperatura pode ser aumentada de 65 para 70 °C, sem que o crescimento seja afetado. A taxa de formação do inibidor pode aumentar em virtude da elevação da temperatura, mas a baixa concentração de xilose no meio, devido ao crescimento do microrganismo, evita que o processo de síntese seja efetivo. Sabendo-se que:

$$K = (dp_i/dt)1/([A][B])$$

a relação entre K e a temperatura (T) pode ser definida segundo Arrhenius:

$$K = K_0 e^{-E_i/(RT)}$$

logo: $dp_i/dt = (K_0 e^{-E/(RT)}) [A][B]$

Isso explica a inibição que ocorre nos estágios iniciais de fermentação, principalmente se a xilose for a fonte de carbono. O procedimento normal para o preparo do fermentador exige que as condições de trabalho sejam ajustadas horas antes da inoculação para evitar choques ambientais sobre o microrganismo. Tal procedimento promove a reação das frações [A] e [B]. Se a temperatura de trabalho (70 °C) for desencadeante do processo de síntese de inibidores e, conseqüentemente, a xilose ([A]) não estiver disponível, o crescimento que se observa logo após a inoculação se deve à disponibilidade de fonte de carbono presente no inóculo. Quando esta fonte se esgota, o crescimento diminui chegando a níveis extremamente baixos. É necessário, então, reduzir a temperatura (65 °C) para que a taxa de reação química diminua. Ao se retornar à temperatura de 70 °C, a bactéria deve manter baixas as concentrações das frações [A] e [B]. Se isso não ocorrer, a taxa de formação de inibidor dp_i/dt volta a aumentar porque K se eleva com a temperatura e a concentração das frações [A] e [B] também aumentam por falta de consumo. Logo, o processo de inibição recomeça gradativamente. É necessário, pois, que se adicionem substâncias que diminuam o K_s de modo a aumentar a afinidade do microrganismo pelo substrato. Possivelmente, seja essa uma das funções do TPP. Este fator de crescimento garante a estabilidade do microrganismo quando mantido a 70 °C e permite, nessa temperatura a manutenção do regime estacionário por tempo indeterminado.

A recuperação do crescimento a 70 °C só se efetua se TPP for adicionado ao meio e se, ao mesmo tempo, a concentração de inibidores não tiver atingido níveis críticos e se ainda a atividade metabólica, medida em termos de porcentagem de CO₂ nos gases de saída, estiver acima de 3%. Isso explica a não recuperação do crescimento, a 70 °C, mesmo na presença de fatores de

crescimento. Nesses casos, o teor de CO₂, nos gases de saída, esteve abaixo de 3% (0,5 e 1,85%).

A temperatura pode afetar o microrganismo por, entre outros fatores, comprometer o sistema enzimático, alterar os parâmetros cinéticos (Topiwala, 1971; Mainzer & Hempfling, 1976; Kuhn et al., 1980; Fieschko & Humphrey, 1983) e interagir com os componentes químicos do meio (Sripati, 1987). Pode ainda reduzir a disponibilidade de nutrientes, interferir no sistema de transporte, alterar a síntese de produtos do metabolismo (Al-Ssum & White, 1977) e mudar o comportamento do microrganismo em relação a requerimentos nutricionais (Borek & Waelsch, 1951; Campbell & Williams, 1953).

Tem sido enfatizado que a linhagem lld-15 exige a presença de metionina, biotina, ácido nicotínico e tiamina para seu crescimento a 70 °C (Amartey et al., 1991a). Esse fato não foi confirmado no presente trabalho. A 65 °C, o microrganismo não necessita de adição de fatores de crescimento, uma vez que foi possível recuperar sua atividade sem ter que adicionar tais fatores. É provável que o K_s, nessa temperatura, seja mais baixo que em 70 °C. Assim sendo, o consumo de xilose a 65 °C passa a ser eficiente, dificultando a formação de agentes inibidores. Ultrapassado o período crítico, a temperatura pode ser aumentada para 70 °C se TPP for adicionado ao meio. Com isso se mostra que o microrganismo possui, para TPP, auxotrofia temperatura-dependente.

A adição de aminoácidos e vitaminas em meios de cultura, para garantir o crescimento de microrganismos ou a formação de um determinado produto, tem sido uma prática muito utilizada. Frequentemente, os aminoácidos se comportam como fatores de crescimento, sendo, muitas vezes, usados indiscriminadamente.

Esperava-se que a adição dos ácidos aspártico e glutâmico no processo respiro-fermentativo fosse de grande valia para o estímulo do crescimento, uma vez que os componentes do ciclo de Krebs

poderiam ser poupados para funções energéticas. O que se verificou foi uma ligeira redução no fator de conversão e um leve aumento na taxa específica de consumo,, indicando que os aminoácidos entram nos espaços metabólicos ocupados pela fonte de carbono, possivelmente, ao nível do ciclo de Krebs. Se isso realmente ocorrer, o fluxo da glicólise pode ser aumentado e, conseqüentemente, serão obtidas maiores concentrações de produtos como etanol, ácido acético e ácido láctico. O aumento desse fluxo parece ser tão importante que até o ácido fórmico, nessas condições, aparece em concentrações relativamente altas. Isso indica que a via PFL é extremamente influenciada pela composição química do meio, pois, foi estimulada até mesmo em parcial aerobiose.

As vitaminas apresentam um papel interessante no metabolismo do Bacillus stearothermophilus, interagindo com os aminoácidos na formação de produtos. As vitaminas direcionam o metabolismo do microrganismo para a síntese de etanol e ácido acético na presença de aminoácidos. Essa função pode estar diretamente relacionada com todas as vitaminas adicionadas, com uma determinada vitamina ou com a formação de "vitamer", como são chamados os derivados de vitaminas (e.g. piridoxal e piridoxamina provenientes da piridoxina). A síntese ou a não formação de "vitamer" pode afetar de modo significativo o comportamento do microrganismo. Os componentes do meio de cultura podem inibir ou estimular a formação desses derivados. Em Bacillus stearothermophilus, por exemplo, a biossíntese de "vitamer", a partir de biotina, é afetada pela presença de glicose (Papiska & Lichstein, 1968). Como esses derivados podem ser importantes para o crescimento de determinados microrganismos, podem também desempenhar importantes funções no processo de síntese de produtos de fermentação.

No sistema transiente, quando as condições vão se tornando anaeróbicas, a função dos aminoácidos adicionados parece se

modificar. Percebe-se que os aminoácidos dão maior sustentação ao crescimento do microrganismo, agindo, possivelmente, como redutor do choque anaeróbico provocado pela transição.

Os dois aminoácidos utilizados têm como precursores os ácidos oxaloacético e α -cetoglutárico. Na transição de aerobiose para anaerobiose, a concentração destes ácidos, via ciclo de Krebs, vai-se reduzindo. A via dos ácidos tricarboxílicos, em condições anaeróbicas, se modifica, passando a existir de forma não cíclica com duas ramificações, uma oxidativa (síntese de ácido α -cetoglutárico) e outra redutiva (síntese de ácido succínico), que partem de um componente comum, o ácido oxaloacético. Como foram adicionados os ácidos aspártico e glutâmico, as funções metabólicas das ramificações não dependeriam, de forma exclusiva, dos esqueletos de carbono provenientes da glicólise. Isso resultaria no aumento do fluxo da glicólise e, ao mesmo tempo, melhoraria o crescimento. De fato, o crescimento da bactéria sofreu um decréscimo mais acentuado e a taxa específica de crescimento atingiu valores negativos, no meio onde os aminoácidos estiveram ausentes.

A participação da acetil-CoA no processo oxidativo da ramificação dos ácidos tricarboxílicos implica, teoricamente, numa redução no teor de etanol. Assim, no meio onde os aminoácidos estivessem presentes, era de se esperar que houvesse uma maior formação de produtos como ácido acético e etanol. Os resultados mostram que isso é verdadeiro para ácido acético, mas não necessariamente para etanol. Para o microrganismo, a síntese desse ácido é importante porque um mol de ATP é formado para cada mol de ácido produzido. Como este ácido é um forte indutor da α -cetoglutatarato desidrogenase (Amarasingham & Davis, 1965), o microrganismo pode ser estimulado não só a sintetizar, mas também a acumular ácido acético para fins indutivos. Em condições anaeróbicas, a conexão das duas ramificações da via dos ácidos

tricarboxílicos, para fechar o ciclo, não pode se efetuar por falta de α -cetoglutarato desidrogenase. Portanto, o acúmulo de ácido acético pode estar vinculado à tentativa de se fechar o ciclo de Krebs e assim aumentar a eficiência de formação de ATP. A tendência do microrganismo em acumular este ácido compromete o fator de conversão de etanol. A adição de ácido glutâmico poderia ter reduzido o acúmulo do ácido se este estivesse envolvido apenas no processo de indução da enzima α -cetoglutarato desidrogenase, uma vez que o próprio ácido glutâmico é indutor desta enzima.

Os valores de $r_{MAC/ET}$ e de $r_{MFO/AC}$, apresentando valores bem abaixo do esperado, reforçam a hipótese na qual se prevê o envolvimento dos ácidos fórmico e acético na formação do etanol.

Como a ausência de vitaminas, em condições anaeróbicas, favorece a síntese de ácido láctico, e a presença de aminoácidos ajuda a manter o crescimento, o meio que alimenta o fermentador destinado a operar em anaerobiose deve conter vitaminas. Além disso, as vitaminas influenciam o metabolismo da bactéria aumentando seu coeficiente metabólico e estimulando a síntese de etanol.

O crescimento da linhagem lld-15 em hidrolisado de palha de trigo foi um resultado encorajador. O fato de se obter, nesse meio, uma produção de células apreciável em condições parcialmente aeróbicas (0,057 vvm de ar) e uma remoção de xilose da ordem de 80,77%, mostra que o microrganismo é capaz de utilizar poluentes industriais que possuam essa fonte de carbono. Aumentando-se ainda mais a aeração, pode-se incrementar também a taxa volumétrica de consumo de xilose do meio poluente. Se as células formadas não forem de interesse para o processo industrial, serão, sem dúvida, importantes para a nutrição de ruminantes.

A não formação de etanol e dos ácidos acético e fórmico que se observou neste meio talvez se deva ao baixo teor de xilose presente

no hidrolisado. Este meio, embora tenha apresentado coloração marrom, indicadora típica da presença de inibidores, permite um bom crescimento da bactéria, mostrando que, se presentes, não afetaram seu metabolismo.

O emprego do Bacillus stearothermophilus no processo industrial para a formação de etanol ainda depende de estudos no sistema produtivo e da obtenção de linhagens mais adequadas. Mesmo assim, a linhagem lld-15 pode ser utilizada para a síntese de xilose isomerase (EC 5.3.1.5), partindo-se de resíduos industriais a base de xilose. Esta enzima tem ampla aplicação na indústria de alimentos por transformar glicose em frutose. Pode ser também usada na isomerização da xilose em xilulose e esta última ser transformada em etanol via PDC. No processo industrial de produção de glicose isomerase, um dos problemas cruciais reside no fato de se obter linhagens com altos fatores de conversão de enzima e de manter as condições de cultura pura. A contaminação com certos tipos de microrganismos provoca uma importante redução no fator de conversão da enzima. Este problema é sensivelmente reduzido pelo uso da linhagem lld-15, pois a temperatura de trabalho (65 a 70 °C) e o pH (6,5) limitam a contaminação por microrganismos mesofílicos. Além disso, a enzima oferece maior probabilidade de ser utilizada em temperaturas altas (80 °C), o que aumenta a constante de equilíbrio em relação às temperaturas de 55 e 65 °C, geralmente empregadas, e ainda reduz os riscos de contaminação bacteriana durante o processo de isomerização.

Enfim, a presente tese procurou estabelecer condições adequadas para a obtenção de etanol a partir de xilose. Sabe-se que o estudo não teve a pretensão de resolver o problema mas constituiu um avanço promissor para tal. Espera-se a continuação das pesquisas para alcançar as condições ideais que possam contribuir de maneira efetiva na produção de etanol.

BIBLIOGRAFIA

- AIBA, S.; KOIZUMI, J.; MUKHOPADHYAY, S.N. The Effect of temperature on K_{LA} in thermophilic cultivation of Bacillus stearothermophilus. Biotechnol. Bioeng. 26: 1136-1138, 1984.
- ALEXANDER, M.A.; CHAPMAN, T.W.; JEFFRIES, T.W. Continuous ethanol production from d-xylose by Candida shehatae. Biotechnol. Bioeng. 30: 685-691, 1987.
- ALEXANDER, N.J. Acetone stimulation of ethanol production from D-xylose by Pachysolen tannophilus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 203-207, 1986.
- AL-SSUM, R.M.; WHITE, P.J. Effects of biotin deficiency on growth, morphology and sporulation in Bacillus megaterium NCIB758I. J. Gen. Microbiol. 99(2): 343-351, 1977.
- AMARASINGHAM, C.R.; DAVIS, B.D. Regulation of α -cetoglutarate dehydrogenase formation in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 240: 3664-3668, 1965.
- AMARTEY, S.A.; LEAK, D.J.; HARTLEY, B.S. Development and optimization of a defined medium for aerobic growth of Bacillus stearothermophilus lld-15. Biotechnol. Lett. 13(9) : 621-626, 1991a.
- AMARTEY, S.A.; LEAK, D.J.; HARTLEY, B.S. Effects of temperature and medium composition on ethanol tolerance of Bacillus stearothermophilus lld-15. Biotechnol. Lett. 13(9): 627-632, 1991b.
- AMELUNXEN, R.E.; MURDOCK, A.L. Mechanisms of thermophily. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 6(4): 343-393, 1978.
- ANDREWS, G.F. Parameter estimation from batch culture data. Biotechnol. Bioeng. 26: 824-825, 1984.
- ATAAI, M.M.; SHULER, M.L. Simulation of the growth pattern of a single cell of Escherichia coli under anaerobic conditions.

- Biotechnol. Bioeng. 27(7): 1027-1035, 1985.
- ATKINSON, A.; ELLWOOD, D.C.; EVANS, C.G.T.; YEO, R.G. Production of Alcohol by Bacillus stearothermophilus. Biotechnol. Bioeng. 27: 1375-1376, 1975.
- ATKINSON, A.; PHILLIPS, B. W.; CALLOW, D. S.; STONES, W. R.; BRADFORD, P.A. Preliminary separation of enzymes extracted from Bacillus stearothermophilus. Biochem. J. 127: 63-67, 1972.
- BAILLARGEON, M.W.; JANSEN, N.B.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Effect of uptake rate on ethanol production by a xylose-fermenting yeast mutant, Candida s: XF217. Biotechnol. Lett. 5(5): 339-344, 1983.
- BALATTI, P.A.; KRISHNAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. Calcium regulates growth of Rhizobium fredii and its ability to nodulate soybean cv. Peking. Can. J. Microbiol. 37(7): 542-548, 1991.
- BAUCHOP, T.; ELSDEN, S.R. The growth of microorganism to their energy supply. J. Gen. Microbiol. 23: 457-469, 1960.
- BODDY, A.; CLARKE, P.H.; HOULDSWORTH, M.A.; LILLY, M.D. Regulation of amidase synthesis by Pseudomonas aeruginosa 8602 in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 48: 137-145, 1967.
- BOREK, E.; WAELSCH, H. The effect of temperature on the nutritional requirement of microorganisms. J. Biol. Chem. 190(1): 191-196, 1951.
- BUTTON, D.K.; GARVER, J.C. Continuous culture of Torulopsis utilis: a kinetic study of oxygen limited growth. J. Gen. Microbiol. 45: 195-204, 1966.
- BUURMAN, E. T.; PENNOCK, J. TEMPEST, D. W.; MATTOS, M. J. T. DE; NEIJSSEL, O.M. Replacement of potassium in different microorganisms grown in potassium-limited chemostat culture. Arch. Microbiol. 152(1): 58-63, 1989.
- CAMPBELL JR., L.L.; WILLIAMS, O.B. The effect of temperature on the nutritional requirements of facultative and obligate thermophilic bacteria. J. Bacteriol. 65: 141-145, 1953.

- CARD, L.G. Metabolism of Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamine, and cardiolipin of Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 114(3): 1125-1137, 1973.
- CHANG, E.C.; UENG, P.P.; CHEN, L. D-xylose fermentation to ethanol by Schizosaccharomyces pombe cloned with xylose isomerase gene. Biotechnol. Lett. 8(40): 231-234, 1986.
- CHANG, C.H.; HONG, J. The effect of browning reaction on the yeast (S. cerevisiae) fermentation. Biotechnol. Bioeng. 26: 797-799, 1984.
- CHIANG, L.C.; GONG, C.S.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. D-xylose fermentation to ethanol by Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol. 42(2): 284-289, 1981.
- CHUNG, I.S.; LEE, Y.Y.; BECK, M.J. High-cell fermentation of xylose to ethanol by Pachysolen tannophilus using continuous cell recycle. Biotechnol. Bioeng. Sym. (17): 391-400, 1986.
- CLARK, T.; WEDLOCK, N.; JAMES, A.P.; DEVERELL, K.; THORNTON, R.J. Strain improvement of the xylose-fermenting yeast Pachysolen tannophilus by hybridization of two mutant strains. Biotechnol. Lett. 8(1): 801-806, 1986.
- COLE, J.A.; WIMPENNY, J.W.T. The inter-relationships of low potential cytochrome C₅₅₂ and hydrogenase in facultative anaerobes. Biochim. Biophys. Acta, 128: 419-425, 1966.
- COULTATE, T.P.; SUNDARAM, T.K. Energetics of Bacillus stearothermophilus growth: molar growth yield and temperature effects on growth efficiency. J. Bacteriol. 121(1): 55-64, 1975.
- COURTRIGHT, J.B.; HENNING, U. Malate dehydrogenase mutants in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 102(2): 722-728, 1970.
- DALTON, W.; POSTGATE, J.R. Growth and physiology of Azotobacter chroococcum in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 56: 307-319, 1969.

- DAVIES, W.C.; KARUSH, F.; RUDD, J.H. Synthesis of M protein by group a hemolytic streptococci in completely synthetic media during steady-state growth. *J. Bacteriol.* 95(1): 162-168, 1968.
- DAWES, E.A. A symposium on some comparative aspects of intermediary metabolism in micro-organisms. Comparative aspects of alcohol formation. *J. Gen. Microbiol.* 32(1): 151-155, 1963.
- DAWES, I.W.; THORNLEY, J.H.M. Sporulation in Bacillus subtilis theoretical and experimental studies in continuous culture systems. *J. Gen. Microbiol.* 62: 49-66, 1970.
- DELGENES, J.P.; MOLETTA, T.; NAVARRO, J.M. The effect of aeration on D-xylose fermentation by Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis, Kluyveromyces marxianus and Candida shehatae. *Biotechnol. Lett.* 8(12): 897-900, 1986.
- DETROY, R.W.; CUNNINGHAM, R.L.; HERMAN, A.I. Fermentation of wheat straw hemicelluloses to ethanol by Pachysolen tannophilus. *Biotechnol. Bioeng. Sym.* (12): 81-89, 1982.
- DEVERELL, K.F. Ethanol fermentation from wood hydrolysates using Pachysolen tannophilus. *Biotechnol. Lett.* 5(7): 475-480, 1983.
- DIRAR, H.; COLLINS, E.B. End-products, fermentation balances and molar growth yields oh homofermentative Lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 73(2): 233-238, 1972.
- DREW, S.W.; DEMAINE, A.L. Methionine control of cephalosporin C formation. *Biotechnol. Bioeng.* 15(4): 743-754, 1973.
- DRUMMOND, I.W.; SHAMA, G. A rapid gas chromatographic method for the analysis of acidic fermentation products. *Chromatographia*, 15(3): 180-182, 1982.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3): 350-356, 1956.
- DURBAN, E.; GOODNOW, R.; GRECZ, N. Changes in resistance to radiation and heat during sporulation and germination of

- Clostridium botulinum 33A. J. Bacteriol. 102(2): 590-592, 1970.
- ESENER, A.A.; ROELS, J.A.; KOSSEN, N.W.F. The theory and applications of unstructured growth models: kinetic and energetic aspects. Biotechnol. Bioeng. 25(2): 2803-2841, 1983.
- ESSAJEE, C.K.; TANNER, R.D. The effect of extracellular variables on the stability of the continuous baker's yeast-ethanol fermentation process. Process Biochem.: 16-25, May, 1979.
- FEIN, J.E.; TALLIM, S.R.; LAWFORD, G.R. Evaluation of D-xylose fermenting yeast for utilization of a wood-derived hemicellulose hydrolysate. Can. J. Microbiol. 30: 682-690, 1984.
- FELDMAN, K.A.; JANSEN, N.B.; TSAO, G.T. Utilization of wood-based syrup as a fermentation carbon source. Biotechnol. Lett. 10(1): 31-36, 1988.
- FERRARI, M.M.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by Pichia stipitis. Biotechnol. Bioeng. 40(7): 753-759, 1992.
- FIECHTER, A. Continuous cultivation of yeasts. Methods Cell Biol. 11: 97-130, 1975.
- FIESCHKO, J.; HUMPHREY, A.E. Effects of temperature and ethanol concentration on the maintenance and yield coefficient of Zymomonas mobilis. Biotechnol. Bioeng. 25: 1655-1660, 1983.
- FORDYCE, A.M.; CROW, V.L.; THOMAS, T.D. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of Streptococcus lactis. Appl. Environ. Microbiol. 48(2): 332-337, 1984.
- FRIEDRICH, C.G.; BOWIEN, B.; FRIEDRICH, B. Formate and oxalate metabolism in Aucaligenes eutrophus. J. Gen. Microbiol. 115: 185-192, 1979.
- GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLICKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. Production of ethanol from D-xylose using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 41(2): 430-436, 1981.

GRAY, C.T.; WIMPENNY, J.W.T.; HUGHES, D.E.; MOSSMAN, M.R.

Regulation of metabolism in facultative bacteria. I. Structural and functional changes in Escherichia coli associated with shifts between the aerobic and anaerobic states. *Biochim. Biophys. Acta*, 117: 22-32, 1966.

GRAY, G.C.; WALLIS, D.A. Analysis of the acetone-butanol fermentation relative to bioreactor characteristics. *Biotechnol. Bioeng. Sym.* (13): 371-384, 1983.

GYLSWYK, N.O. VAN. Activation of NAD- dependent lactate dehydrogenase in Butyrivibrio fibrisolvens by fructose 1,6-diphosphate. *J. Gen. Microbiol.* 99(2): 441-443, 1977.

HANSEN, R.G.; HENNING, U. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity in Escherichia coli K12. *Biochim. Biophys. Acta*, 12: 355-358, 1966.

HAQ, A.; DAWES, E.A. Pyruvic acid metabolism and ethanol formation in Erwinia amylovora. *J. Gen. Microbiol.* 68: 295-306, 1971.

HARRISON, D.E.F.; TOPIWALA, H.H. Transient and oscillatory states of continuous culture. *Adv. Biochem. Eng.* 3: 167-219, 1974.

HARRISON, D.E.F.; LOVELESS, J.E. Transient response of facultatively anaerobic bacteria growing in chemostat culture to a change from anaerobic to aerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 68(1): 145-52, 1971.

HARTLEY, B.S.; LEAK, D.J.; AMARTEY, S.; GODDARD, P.; DA SILVA, G.A.; SAN MARTIN, R. Ethanol fermentation from straw. In: *Straw - A Valuable Raw Material*. Paper Industries Research Association, Leatherhead, Surrey, U.K., v. 1. : 1-11, 1987.

HARTLEY, B.S.; PAYTON, M.A. Industrial prospects for thermophiles and thermophilic enzymes. *Biochem. Soc. Sym.* 48: 133-146, 1983.

HARTLEY, B.S.; SHAMA, G. Novel ethanol fermentation from sugar cane and straw. *Philos. Trans. R. Soc. London*, v. 321: 555-568, 1987.

- HAUKELI, A.D.; LIE, S. Molar growth yield of yeast in anaerobic batch cultures. *J. Gen. Microbiol.* 69: 135-141, 1971.
- HEMPFLING, W.P.; MAINZER S.E. Effects of varying the carbon source limiting growth on yield and maintenance characteristics of Escherichia coli in continuous culture. *J. Bacteriol.* 123(3): 1076-1087, 1975.
- HERBERT, D.; ELSWORTH, R.; TELLING, R.C. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 41: 601-622, 1956.
- HEREDIA, L.; RATLEDGE, C. Simultaneous utilization of glucose and xylose by Candida curvata D in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* 10(1): 25-30, 1988.
- HERNANDEZ, E.; JOHNSON, M.J. Anaerobic growth yields of Azotobacter cloacae and Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 94(4): 991-995, 1967.
- HERRERO, A.A.; GOMES, R.F.; SNEDECOR, B.; TOLMAN, C.J.; ROBERTS, M.F. Growth inhibition of Clostridium thermocellum by carboxylic acids: a mechanisms based on uncoupling by weak acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 53-62, 1985.
- HIRSCH, C.A.; RASMINSKY, M.; DAVIS, B.D.; LIN, E.C.C. A Fumarate reductase in Escherichia coli distinct from the succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 238(11): 3770-3774, 1963.
- HO, N.W.Y.; STEVIS, P.; ROSENFELD, S.; HUANG, J.J.; TSAO, G.T. Expression of the E. coli xylose isomerase gene by a yeast promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 13: 245-250, 1983.
- HOBSON, P.N. Continuous culture of some anaerobic and facultatively anaerobic rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 38: 167-180, 1965.
- HOBSON, P.N.; SUMMERS, R. The continuous culture of anaerobic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 47: 53-65. 1967.
- HÖFER, M.; BETZ, A.; KOTYK, A. Metabolism of the obligatory aerobic yeast Rhodotorula gracilis. IV. Induction of an enzyme

- necessary for D-xylose catabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 252: 1-12, 1971.
- HOLLAND, R.; PRITCHARD, G.G. Regulation of the L-lactate dehydrogenase from Lactobacillus casei by fructose-1,6-diphosphate and metal ions. *J. Bacteriol.* 121(3):777-784, 1975.
- HOMMES, W.J.; POSTMA, P.W.; TEMPEST, D.W.; NEIJSSSEL, O.M. The influence of the culture pH value on the direct glucose oxidative pathway in Klebsiella pneumoniae NCTC 418. *Arch. Microbiol.* 151(3): 261-267, 1989.
- HSU, E.J.; ORDAL, Z.J. Comparative metabolism of vegetating and sporulating cultures of Clostridium thermosaccharolyticum. *J. Bacteriol.* 102: 369-376, 1970.
- JANSEN, N.B.; FLICKINGER, M.C.; TSAO, G.T. Application of bioenergetics to modelling the microbial conversion of D-xylose to 2,3-butanediol. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 573-582, 1984.
- JARZEBSKI, A.B. Modeling of oscillatory behaviour in continuous ethanol fermentation. *Biotechnol. Lett.* 14(2): 137-142, 1992.
- JEFFRIES, T.W. A comparison of Candida tropicalis and Pachysolen tannophilus for conversion of xylose to ethanol. *Biotechnol. Bioeng. Sym.* (12): 103-110, 1982.
- JEFFRIES, T.W. Effects of culture conditions on fermentation of xylose to ethanol by Candida shehatae. *Biotechnol. Bioeng. Sym.* (15): 149-166, 1985.
- JÖBSES, I.M.L.; EGBERTS, G.T.C.; LUYBEN, K.C.A.M.; ROELS, J.A. Fermentation kinetics of Zymomonas mobilis at high ethanol concentrations: oscillations in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 28(6): 868-877, 1986.
- JURADO, A.S.; SANTANA, A.C.; DA COSTA, M.S.; MADEIRA, V.M.C. Influence of divalent cations on the growth and morphology of Bacillus stearothermophilus. *J. Gen. Microbiol.* 133: 507-513, 1987.

- KABEL, J.J.; ROBINSON, C.W.; MOO-YOUNG, M. Modelling of xylose fermentation to ethanol by sequential isomerization and fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Sym.* 13: 315-329, 1983.
- KIDA, K.; IKBAL,; SONODA, Y.; KAWASE, M.; NOMURA, T. Influence of mineral nutrients on high performance during anaerobic treatment of wastewater from a beer brewery. *J. Ferment. Bioeng.* 71(1): 54-57, 1991.
- KLOSS, M.; IWANENK, K.H.; FENDRIK, I. Physiological properties of Azospirillum brasiliensis s: 7 in malate limited chemostat. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29: 447-457, 1983.
- KOH, J.S.; YAMAKAWA, T; KODAMA, T.; MINODA, Y. Cell mass production of Acinetobacter calcoaceticus in palm oil-limited chemostat culture. *J. Ferment. Technol.* 65(2): 229-232, 1987.
- KOSTIW, L.L.; SOUZA, K.A. Altered phospholipid metabolism in a temperature-sensitive mutant of a thermophilic Bacillus. *Arch. Microbiol.* 107: 49-55, 1976.
- KOTANI, H.; SHINMYO, A.; ENATSU, T. Killer toxin for sake yeast; Properties and effects of adenosine 5'-diphosphate and calcium ion on killing action. *J. Bacteriol.* 129(2): 640-650, 1977.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The yeast. Amsterdam. Elsevier Science Publisher. 1984, 1082:
- KRÖGER. A. Electron-transport phosphorylation coupled to fumarate reduction in anaerobically grown Proteus rettgeri. *Biochim. Biophys. Acta*, 347: 273-289, 1974.
- KUHN, H.J.; COMETTA, S.; FIECHTER, A. Effects of growth temperature on maximal specific growth rate, yield, maintenance, and death in glucose-limited continuous culture of thermophilic Bacillus caldotenax. *Eur. J. appl. Microbiol. Biotechnol.* 10: 303-315, 1980.
- KUSAKA, I. Growth and division of protoplasts of Bacillus magaterium and inhibition of division by penicillin. *J. Bacteriol.* 94(4): 884-888, 1967.

- LASTICK, S.M.; TUCKER, M.Y.; MACKEDONSKI, V.; GROHMANN, K.
Overproduction of E. coli xylose isomerase. *Biotechnol. Lett.* 8(1): 1-6, 1986.
- LAWFORD, H.G.; RUGGIERO, A. Production of fuel alcohol by Zymomonas effect of pH on maintenance and growth-associated metabolism. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 206-211, 1990.
- LEE, H.; ATKIN, A.L.; BARBOSA, M.F.S.; DORSCHIED, D.R.; SCHNEIDER, H. Effect of biotin limitation on the conversion of xylose to ethanol and xylitol by Pachysolen tannophilus and Candida guilliermondii. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 81-84, 1988.
- LEITE, R. de C. *Pró-Alcool: a única alternativa para o futuro 3ª ed.* Campinas. Unicamp, 1990, 76.:
- LINKO, Y.Y.; KAUTOLA, H.; UOTILA, S.; LINKO, P. Alcohol fermentation of D-xylose by immobilized Pichia stipitis yeast. *Biotechnol. Lett.* 8(1): 47-52, 1986.
- LINTON, J.D.; HARRISON, D.E.F.; BULL, A.T. Molar yields, respiration and cytochrome patterns of Beneckea natriegens when growth at different medium dissolved-oxygen tensions. *J. Gen. Microbiol.* 90: 237-246, 1975.
- LYND, R. Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria: critical evaluation of potential and review. In: Fiechter, A., ed. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag, 1989, v. 38, p. 1-52.
- MACGILL, D.J.; RIBBONS, D.W.; DAWES, E.A. Carbohydrate metabolism and growth yield coefficients of Zymomonas anaerobia. *Biochem. J.* 99: 44-45, 1965.
- MACKRAY, G.A.; VAUGHN, R.H. The fermentation of glucose by Bacillus stearothermophilus. *Food Res.* (22): 494-500, 1957.
- MACPHERSON, R.; MILLER, J.D.A. Nutritional studies on Desulfovibrio desulphuricans using chemically defined media. *J.*

- Gen. Microbiol. 31: 365-373, 1963.
- MACY, J.; KULLA, H.; GOTTSCHALK, G. H₂-dependent anaerobic growth of Escherichia coli on L-malate: succinate formation. J. Bacteriol. 125(2): 423-428, 1976.
- MAINZER, S.E.; HEMPFLING, W.P. Effects of growth temperature on yield and maintenance during glucose-limited continuous culture of Escherichia coli. J. Bacteriol. 126(1): 251-256, 1976.
- MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of Pachysolen tannophilus growing on D-xylose. Appl. Environ. Microbiol. 44(4): 909-912, 1982.
- MALESZKA, R.; WANG, P.Y.; SCHNEIDER, H. Yeasts that ferment D-cellobiose as well as D-xylose. Biotechnol. Lett. 4(2): 133-136, 1982.
- MARTIN, E.J.; WASHINGTON, D.R.; HETLING, L.J. Yield in continuous aerobic bacterial fermentation. Biotechnol. Bioeng. 8: 433-452, 1966.
- MAYOU, J. MPN- most probable number. In: Marvin, L.S.. ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Association, 1976, Cap.6. p. 152-162.
- MCCRACKEN, L.D.; GONG, C.S. Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeast. Biotechnol. Bioeng. Sym. (12): 91-102, 1982.
- MOR, J.R.; FIECHTER, A. Continuous cultivation of Saccharomyces cerevisiae. I. Growth on ethanol under steady-state conditions. Biotechnol. Bioeng. 10(2): 159-176, 1968.
- MOSLEY, G.A.; CARD, L.C.; KOOSTRA, W.L. Effect of calcium and anaerobiosis on thermostability of Bacillus stearothermophilus. Can. J. Microbiol. 22(4): 468-474, 1976.
- MOUSTAFA, H.H.; COLLINS, E.B. Molar growth yield of certain lactic bacteria as influenced by autolysis. J. Bacteriol. 16: 117-125, 1968a.

- MOUSTAFA, H.H.; COLLINS, E.B. Molar growth yield of Streptococcus faecalis on pyruvate. *J. Bacteriol.* 97(3): 1496-1497, 1969.
- MOUSTAFA, H.H.; COLLINS, E.B. Role of galactose or glucose-1-phosphate in preventing the lysis of Streptococcus diacetylactis. *J. Bacteriol.* 95(2): 592-602, 1968b.
- MÜTZE, B.; WANDREY, C. Continuous fermentation of xylose with Pachysolen tannophilus. *Biotechnol. Lett.* 5(9): 633-638, 1983.
- NEIRINCK, L.G.; MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Alcohol production from sugar mixtures by Pachysolen tannophilus. *Biotechnol. Bioeng. Sym.* (12): 161-169, 1982.
- NEIRINCK, L.G.; TSAI, C.S.; LABELLE, J.L.; SCHNEIDER, H. Xylitol as a carbon source for growth and ethanol production by Pachysolen tannophilus. *Can. J. Microbiol.* 31: 451-455, 1985.
- NIGAM, J.N.; IRELAND, R.S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M.A. Isolation and screening of yeast that ferment D-xylose directly to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(6): 1486-1489, 1985a.
- NIGAM, J.N.; IRELAND, R.S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M.A. Aerobic fermentation of D-xylose to ethanol by Clavispora s.: *Appl. Environ. Microbiol.* 50(4): 763-766, 1985b.
- O'BRIEN, J.; MORRISEY, P.A. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev Food Sci. Nutr.* 28(3): 211-248, 1989.
- PAPISKA, H.R.; LICHSTEIN, H.C. Biosynthesis of biotina in microorganisms. VII. Effect of glucose on vitamer synthesis by thermophiles. *J. Bacteriol.* 95(3): 1173, 1968.
- PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. In: Fiechter, A. ed. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag, 1989, v. 38:53-87.
- PAYNE, J. Nutrient requirement for the recovery of tellurite resistance by heat-injured Streptococcus faecalis. *J. Gen.*

- Microbiol.** 107: 217-222, 1978.
- PAYTON, M.A. Production of ethanol by thermophilic bacteria. **Trends Biotechnol.** 2(6): 153-158, 1984.
- PAYTON, M.A.; HARTLEY, B.S. Mutants of Bacillus stearothermophilus lacking NAD-linked L-lactate dehydrogenase. **FEMS Microbiol. Lett.** 26(3): 333-336, 1985.
- PEREZ, F.; RIBA, J.P.; STREHAIANO, P. Effect of yeast extract concentration on growth of Schizosaccharomyces pombe. **Biotechnol. Lett.** 14(2): 123-126, 1992.
- PIRT, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. London, Blackwell Scientific Publications, 1975. 275:
- POSTGATE, J.R. Recent advances in the study of the sulfate-reducing bacteria. **Bacteriol. Rev.** 29(4): 425-441, 1965.
- POSTGATE, J.R.; HUNTER, J.R. The survival of starved bacteria. **J. Gen. Microbiol.** 29: 233-263, 1962.
- PREEZ, J.C. DU; PRIOR, B.A.; MONTEIRO, A.M.T. The effect of aeration on xylose fermentation by Candida shehatae and Pachysolen tannophilus. **Appl. Microbiol.** 19: 261-266, 1984.
- PREEZ, J.C. DU; WALT, J.P. VAN DER. Fermentation of xylose to ethanol by strain of Candida shehatae. **Biotechnol. Lett.** 5(5): 357-362, 1983.
- PRINGLE, J.R.; MOR, J.R. Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem. **Methods Cell Biol.** 91: 131-168, 1975.
- PRIOR, A.B. Continuous growth kinetics of Candida utilis in pineapple canned effluent. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 748-752, 1984.
- PUNNAPAYAK, H.; EMERT, G.H. Use of Pachysolen tannophilus in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosics. **Biotechnol. Lett.** 8(1): 63-66, 1986.
- RANDLE, P.J.; DENTON, R.M.; PASK, H.T.; SEVERSON, D.L. Calcium ions and regulation of pyruvate dehydrogenase. **Biochem. Soc.**

Sym: 39: 75-88, 1974.

- RANDLE, P.J.; SALE, G.J.; KERBY, A.L.; KEARNS, A. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation and dephosphorylation. In: Rosen, O.N.; Krebs, E.G. Protein phosphorylation. Cold Spring Harbor, s. ed., 1981, p. 687-699, (Conferences on Cell Proliferation, 8).
- REED, L.J.; PETTIT, F.H. Phosphorylation and dephosphorylation of pyruvate dehydrogenase. In: Rosen, O.N.; Krebs, E.G. Protein phosphorylation. Cold Spring Harbor, s. ed., 1981, p. 701-711, (Conferences on Cell Proliferation, 8).
- ROBINSON, J.A.; TRUELAR, M.G.; CHARACKLIS, W.G. Cellular reproduction and extracellular polymer formation by Pseudomonas aeruginosa in continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 26: 1409-1417, 1984.
- ROWE, J.J.; GOLDBERG, I.D.; AMELUNXEN, R.E. Development of define medium and minimal media for the growth of Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol. 124(1): 279-284, 1975.
- RUSSEL, J.B. Heat production by ruminal bacteria in continuous culture and its relationship to maintenance energy. J. Bacteriol. 168(2): 694-701, 1986.
- RUSSEL, J.B.; BALDWIN, R.L. Comparison of maintenance energy expenditures and growth yields among several rumen bacteria grown on continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 37(3): 537-543, 1979.
- RYCHTERA, M. SCP- production from sulphite waste liquors and ethanol. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MICROBIOLOGY, 12 München, 1978. Proceedings. Microbiol. Appl. Biotechnol. 83: 53-81, 1979.
- SCHAUER, N.L.; FERRY, J.G. Properties of formate dehydrogenase in Methanobacterium formicicum. J. Bacteriol. 150(1): 1-7, 1982.
- SCHLEGEL, H.G. General microbiology. 6^a ed. Cambridge University Press Cambridge, 1986. 587p.

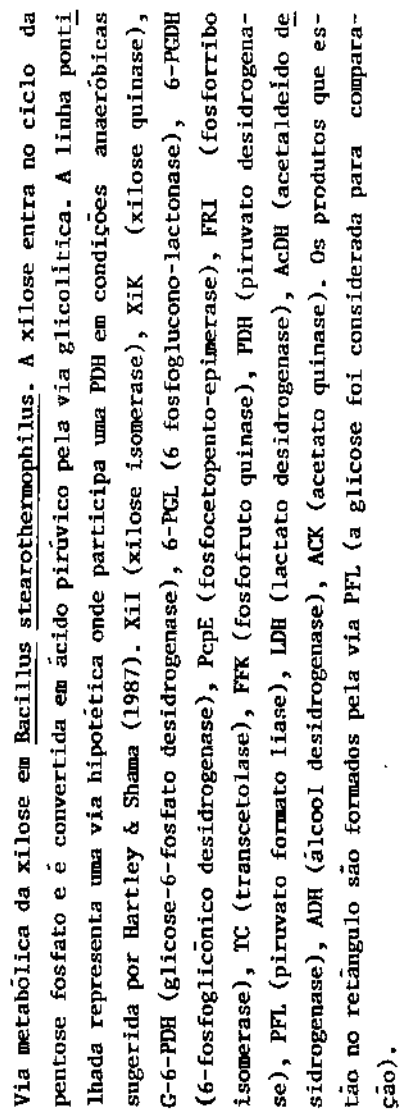
- SCHLEGEL, H.G. Studies on the regulation and genetic of enzymes of Alcaligenes eutrophus. In: Codd, G.A. Aspect of Microbial metabolism and ecology. London, Academic Press, 1984, p. 187-209.
- SCHLEGEL, H.G.; VOLLBRECHT, D. Formation of the dehydrogenases for lactate, ethanol and butanediol in the strictly aerobic bacterium Alcaligenes eutrophus. J. Gen. Microbiol. 117: 475-481, 1980.
- SCHNEIDER, H; WANG, P.V.; MALESKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by yeasts Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Lett. 3(2): 89-92, 1981.
- SCHULP, J.A.; STOUTHAMER, A.H. The influence of oxygen, glucose and nitrate upon the of nitrate reductase and the respiratory system in Bacillus lincheniformis. J. Gen. Microbiol. 46: 195-203, 1970.
- SCHVESTER, P.; ROBINSON, C.W.; MOO-YOUNG, M. Xylose fermentation by Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng. Sym. (13): 131-152, 1983.
- SCHWARTZ, R.; LUCAS, M.T.; ESCALANTE, L.; VASQUEZ, G.; SÁNCHEZ, S. Glutathione formation in Penicillium chrysogenum: stimulatory effect of ammonium. J. Gen. Microbiol. 134(5): 1117-1121, 1988.
- SENIOR, P.J.; BEECH, G.A.; RITCHIE, G.A.F.; DAWES, E.A. The role of oxygen limitation in the formation of poly- β -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of Azotobacter beijerinckii. Biochem. J. 128: 1193-1201, 1972.
- SERGEANT, T.P.; LANKFORD, C.E.; TRAXLER, R.W. Initiation of growth of Bacillus species in a chemical defined medium. J. Bacteriol. 74(6): 728-735, 1957.
- SHERWOOD, M.T. Inhibition of Rhizobium trifolii by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. J. Gen. Microbiol. 71: 351-358, 1972.
- SIKDAR, D.P.; MAJUNDAR, M.K.; MAJUNDAR, S.K. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by Bacillus thuringiensis subs: israelensis. Biotechnol. Lett. 13(7): 511-514, 1991.

- SILLEY, P.; ARMSTRONG, D.G. Changes in metabolism of the rumen bacterium Streptococcus bovis H13/1 resulting from alteration in dilution rate and glucose supply per unit time. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 345-353, 1984.
- SILLEY, P.; ARMSTRONG, D.G. Metabolism of the rumen bacterium Selenomonas ruminantium grown in continuous culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 53-55, 1985.
- SINCLAIR, C.D.; TOPIWALA, H.H. Model for continuous culture which considers the viability concept. *Biotechnol. Bioeng.* 12: 1069-1079, 1970.
- SINGH, A.; KUMAR, P.K.R.; SCHÜGERL, K. Shift in production from acetate to ethanol using metabolic inhibitors in Fusarium oxysporum. *Biotechnol. Lett.* 13(7): 527-532, 1991.
- SIVAKANESAN, R.; DAWES, E.D. Anaerobic glucose and serine metabolism in Staphylococcus epidermis. *J. Gen. Microbiol.* 118: 143-157, 1980.
- SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; CAUWENBERGE, J.E.VAN; KURTZMAN, C.P. Conversion of D-xylose to ethanol by yeast Pachysolen tannophilus. *Biotechnol Bioeng.* 26: 371-384, 1982.
- SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; LADISCH, M.R.; OKOS, M.R. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by Pichia stipitis. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 727-731, 1990.
- SOMMALAINEN, I.; LONDESBOROUGH, J.; KORHOLA, M. An oxidative pathway for D-xylose assimilation by Rhodospiridium toruloides. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1537-1545, 1989.
- SREEKUMAR, O.; BASAPPA, S.C. Effect of calcium salts on ethanol production in high sugar fermentation by free cells of Zymomonas mobilis. *Biotechnol. Lett.* 14(6): 511-514, 1992.
- SRIPATI, C.E. An improved chemically defined medium for mass cultures of Tetrahymena: nutrient uptake and growth regulation. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2581-2588, 1987.

- SRIVASTAVA, R.A.K. Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by Bacillus stearothermophilus. *Enzyme Microb. Technol.* 90: 749-754, 1987.
- STÄHL, S.; LJUNGER, C. Calcium uptake by Bacillus stearothermophilus a requirement for thermophilic growth. *FEBS Lett.* 63(3): 184-187, 1976.
- STEINBÜCHEL, A.; KUHN, M.; NIEDRIG, M.; SCHLEGEL, H.G. Fermentation enzymes in strictly aerobic bacteria: Comparative studies on strains of the Alcaligenes casei and on Nocardia opaca Xanthobacter autotrophicus. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2825-2835, 1983.
- STEPHENSON, M.P.; DAWES, E.A. Pyruvic acid and formic acid metabolism in Sarcina ventriculi and the role of ferredoxin. *J. Gen. Microbiol.* 69: 313-343, 1971.
- STOUTHAMER, A.H.; BETTENHAUSSEN, C. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. A reevaluation of the method for the determination of ATP production by measuring molar growth yields. *Biochim. Biophys. Acta*, 301: 53-70, 1973.
- SUIHKO, M.L.; DRAZIC, M. Pentose fermentation by yeasts. *Biotechnol. Lett.* 5(2): 107-112, 1983.
- SUIHKO, M.L.; POUTANER, K. D-xylulose fermentation by free and immobilized Saccharomyces cerevisiae cells. *Biotechnol. Lett.* 6(3): 189-194, 1984.
- SUMMERS, R.J.; BOUDREAUX, D.P.; SRINIVASAN, V.R. Continuous cultivation of defined media for Cellulomonas s: and Bacillus cereus. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(1): 66-71, 1979.
- SVARACHORN, A.; TSUCHIDO, T.; SHINMVO, A.; TAKANO, M. Autolysis of Bacillus subtilis induced by low temperature. *J. Ferment. Bioeng.* 71(4): 281-283, 1991.
- TEMPEST, D.W. The continuous cultivation of micro-organisms. I. Theory of the chemostat. In: Norris, J.R.: Ribbons, D.W..

- Methods in microbiology, London, Academic Press. 1970. v. 2: 259-276.
- THOMAS, T.D.; ELLWOOD, D.C.; LONGYEAR, V.M.C. Change from homo- to heterolactic fermentation by Streptococcus lactis resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat culture. J. Bacteriol. 138(1): 109-117, 1979.
- THOMAS, T.D.; TURNER, K.W.; CROW, V.L. Galactose fermentation by Streptococcus lactis and Streptococcus cremoris: pathways, products, and regulation. J. bacteriol. 144(3): 672-682, 1980.
- TOPIWALA, H.; HAMER, G. Effect of wall growth in steady-state continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 8(6): 919-922, 1971.
- TOPIWALA, H.; SINCLAIR, C.G. Temperature relationship in continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 8(6): 795-813, 1971.
- TURUNEN, M.; PARKKINEN, E.; LONDESBOROUGH, J.; KORHOLA, M. Distinct forms of lactate dehydrogenase purified from ethanol and lactate producing cells of Clostridium thermohydrosulfuricum. J. Gen. Microbiol. 133: 2865-2873, 1987.
- UHLINGER, D.J.; YANG, C.Y.; REED, L.J. Phosphorylation and dephosphorylation of pyruvate dehydrogenase from baker's. Biochemistry, 25: 5673-5677, 1986.
- VADEHRA, D.V.; BELLAMY, W.D. The inhibition of Thermomonospora by heat sterilized lactose broth. Biotechnol. Lett. 5(1): 63-66, 1983.
- VIENNE, P.; STOCKAR, U. VON. Alcohol from whey permeate: strain selection, temperature, and medium optimization. Biotechnol. Bioeng. Sym. (13): 421-435, 1983.
- VRIES, W. DE; KAPTEIJN, M.C.; BEEK, VAN DER; STOUTHMER, A.H. Molar growth yields and fermentation balances of Lactobacillus casei L3 in batch cultures and in continuous cultures. J. Gen. Microbiol. 63: 333-345, 1970.
- WALLACE, R.J. Control of lactose production by Selenomonas

- ruminantium: homotropic activation of lactose dehydrogenase by pyruvate. J. Gen. Microbiol. 107: 45-52, 1978.
- WARING, W.S.; WERKMAN, C.H. Growth of bacteria in a iron-free medium. Arch. Biochem. Biophys. 1(2): 303-310, 1942a.
- WARING, W.S.; WERKMAN, C.H. Iron requirements of heterotrophic bacteria. Arch. Biochem. Biophys. 1(3): 425-433, 1942b.
- WATSON, T.G. Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 64: 91-99, 1970.
- WAYMAN, M.; PAREKH, S.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P. SO₂-catalysed prehydrolysis of coniferous wood for ethanol production. Biotechnol. Lett. 8(10): 749-752, 1986.
- WAYMAN, M.; TSUYUKI, S.T. Fermentation of xylose to ethanol by Candida shehatae. Biotechnol. Bioeng. Sym. (15): 167-177, 1985.
- WELLER, H.; HAUG, A. Effects of Ca²⁺ and K⁺ on the physical state of membrane lipids in Thermoplasma acidophila. J. Gen. Microbiol. 99(2): 379-382, 1977.
- WIEGEL, J. Formation of ethanol by bacteria. A pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. Experientia, 36: 1434-1445, 1980.
- YAMADA, T.; CARLSSON, J. Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in streptococci. J. Bacteriol. 124(1): 55-61, 1975.



APÊNDICE B.

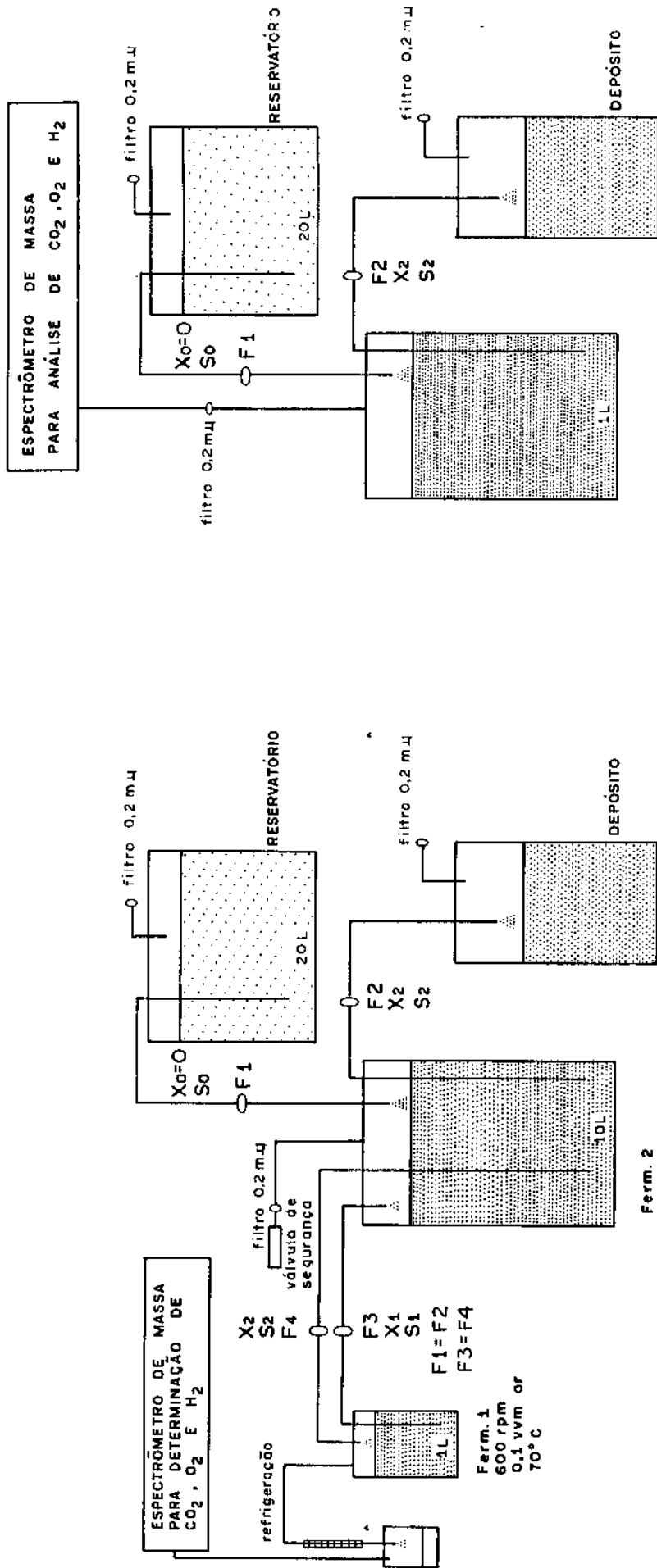


FIGURA A. Sistema de fermentação contínua em duplo estágio. No fermentador 1 as células são induzidas ao crescimento. No fermentador 2 as células são estimuladas a formar produtos de fermentação.

FIGURA B. Sistema contínuo de fermentação de um único estágio sem reciclo de célula.

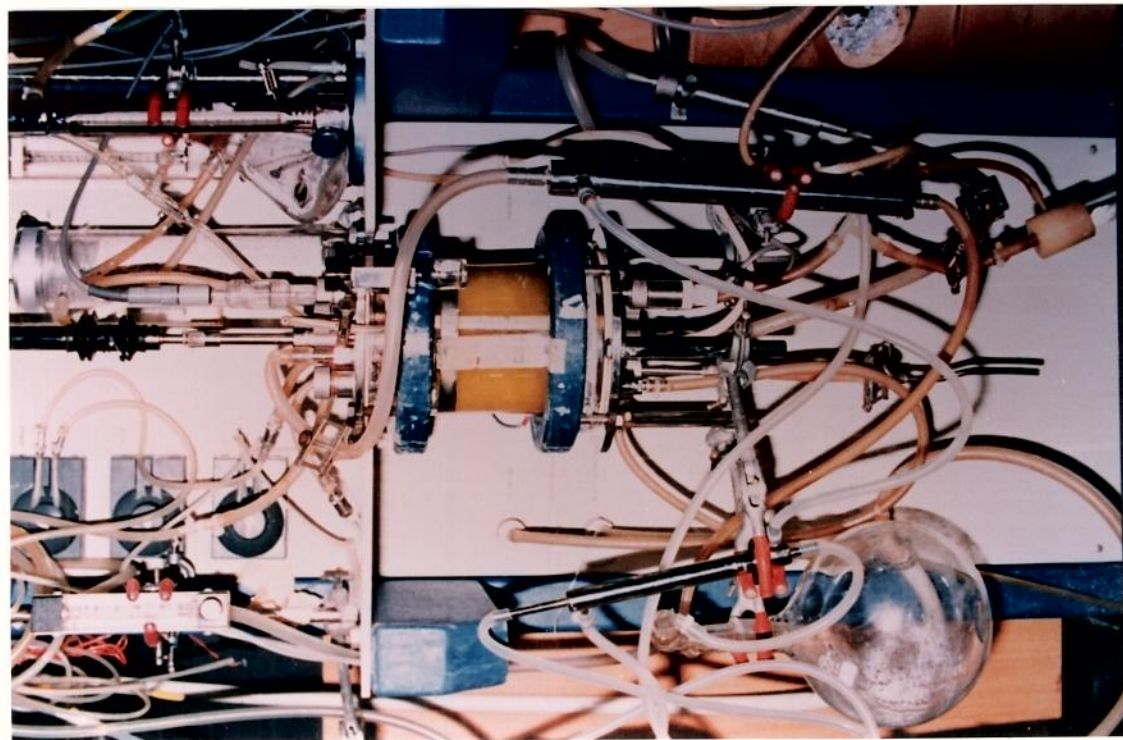


Fig. C. Fermentador de único estágio utilizado neste trabalho.

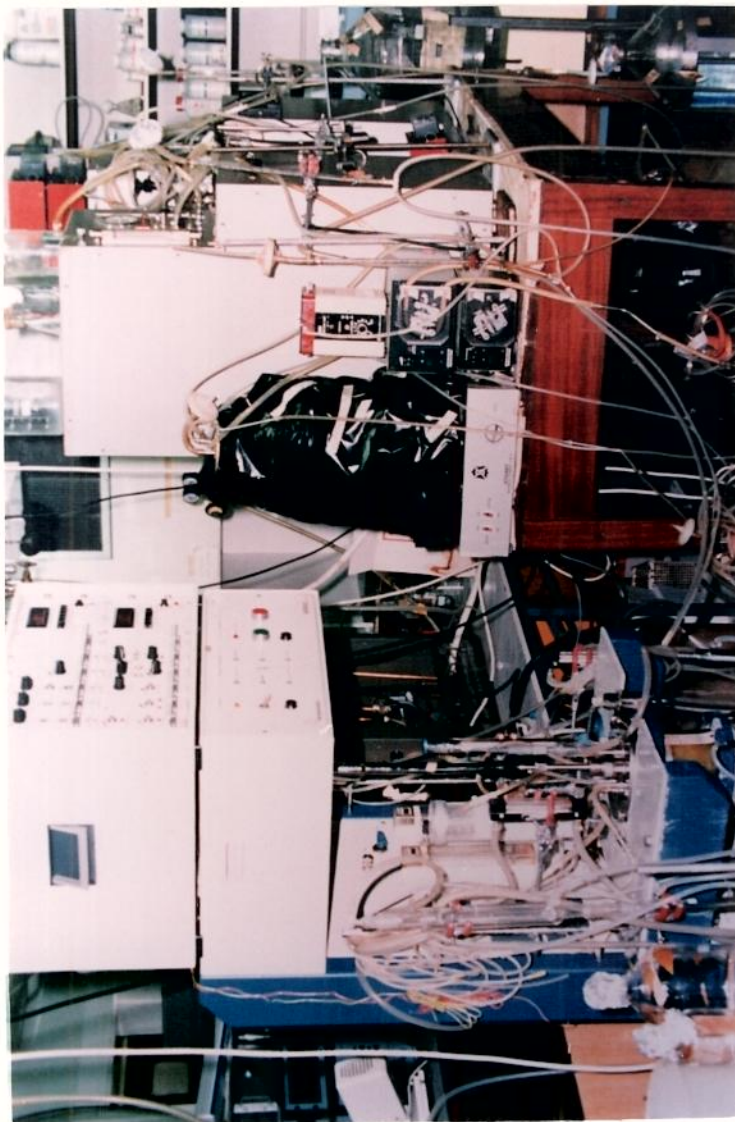


Fig. D. Sistema de fermentação de duplo estágio proposto. O fermentador da direita tem uma capacidade de 10 litros e deve operar em condições anaeróbicas, enquanto que o da esquerda tem capacidade de 1 litro e deve operar em aerobiose parcial. O reservatório de alimentação deve ser envolvido em saco de plástico escuro para proteção das vitaminas contra o efeito da luz.

APÊNDICE C -Meios de Cultura

A composição de cada meio de cultura utilizado está expressa em massa de soluto por litro de água.

Meio BSTCM - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; triptona (Oxoid) 20,0 g; extrato de levedura (Oxoid) 10,0 g; NH_4Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,32 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 2,50 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,27 g; K_2SO_4 (BDH) 1,30 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 3,0 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 7,0 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,8 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,4 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,1 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,2 mg; H_3BO_3 (BDH) 0,02 mg.

Meio BSTSM - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; NH_4Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,32 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 2,50 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,27 g; K_2SO_4 (BDH) 1,30 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 3,0 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 7,0 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,8 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,4 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,1 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,2 mg; H_3BO_3 (BDH) 0,02 mg; EDTA (Sigma) 0,5 mg; biotina (Sigma) 100 μg ; tiamina (Sigma) 100 μg ; ácido nicotínico (Sigma) 100 μg ; metionina (Sigma) 0,2 g.

Estes dois meios, usados pelo Centre for Biotechnology do Imperial College of Science and Technology and Medicine, serviram de base para a formulação dos G, G-(1/2MIC), G-(1/2MIC-1/2MAC), G-(1/2MICNa-1/2MACK), (G₇₀-F)Tpp⁺ e (G₆₅-F)TPP⁻ destinados ao estudo do Bacillus stearothermophilus lld-15. A composição química desses meios é a seguinte:

Meio G - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; NH_4Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,32 g; Na_2HPO_4 (BDH) 2,50 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,27 g; K_2SO_4 (BDH) 1,30 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 3,0 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,0 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,8 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,4

mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,1 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,2 mg; H_3BO_3 (BDH) 0,02 mg; EDTA (Sigma) 0,5 mg; biotina (Sigma) 100 μg ; tiamina (Sigma) 100 μg ; ácido nicotínico (Sigma) 100 μg ; metionina (Sigma) 0,2 g.

Meio G-(1/2MIC) - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; NH_4Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,32 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 2,50 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,27 g; K_2SO_4 (BDH) 1,30 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,5 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,25 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,5 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,4 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,2 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,05 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,1 mg; H_3BO_3 (BDH) 0,01 mg; biotina (Sigma) 100 μg ; tiamina (Sigma) 100 μg ; ácido nicotínico (Sigma) 100 μg .

Meio G-(1/2MIC-1/2MAC) - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; NH_4Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,1 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,25 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,135 g; K_2SO_4 (BDH) 0,65 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,5 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,25 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,5 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,4 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,05 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,1 mg; H_3BO_3 (BDH) 0,01 mg; biotina (Sigma) 34 μg ; tiamina 100 μg ; ácido nicotínico (Sigma) 34 μg .

Meio G-(1/2MICNa-1/2MACK) - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; NH_4Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,1 g; KH_2PO_4 (BDH) 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,135 g; K_2SO_4 (BDH) 0,65 g; NaCl (BDH) 0,05 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,5 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,25 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,5 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,4 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,2 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,05 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,1 mg; H_3BO_3 (BDH) 0,01 mg; biotina (Sigma) 34 μg ; tiamina (Sigma) 100 μg ; ácido nicotínico (Sigma) 34 μg ; metionina (Sigma) 0,2 g.

Meio (G₇₀-F)TPP⁺ - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; NH_4Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,1 g; KH_2PO_4 (BDH) 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,135 g; K_2SO_4 (BDH) 0,65 g; NaCl (BDH) 0,05 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 1,5 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 5,0 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,5 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,4 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,2 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,05 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BDH) 0,1 mg; H_3BO_3 (BDH) 0,01 mg;

pirofosfato de tiamina 100 µg.

Meio (G₆₅-F)TPP⁻ - sacarose ou xilose (Sigma) 10,0 g; NH₄Cl (BDH) 2,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,1 g; KH₂PO₄ (BDH) 1,2 g; MgSO₄. 7H₂O (BDH) 0,65 g; NaCl (BDH) 0,05 g; MnCl₂. 4H₂O (BDH) 1,5 mg; CaCl₂. 2H₂O (BDH) 5,0 mg; FeCl₃. 6H₂O (BDH) 0,5 mg; ZnSO₄. 7H₂O (BDH) 0,4 mg; CuSO₄. 5H₂O (BDH) 0,2 mg; CoCl₂. 6H₂O (BDH) 0,05 mg; NiCl₂. 6H₂O (BDH) 0,1 mg; H₃BO₃ (BDH) 0,01 mg.

Meio Hidrolisado de Palha - o hidrolisado foi obtido do ICI (England) e diluído de forma a se obter uma concentração de xilose de aproximadamente 39 mM. Foram adicionados ao hidrolisado diluído CaCl₂. 2H₂O (BDH) 5,0 mg; ácido oxálico (Sigma) 1,0 g; ácido cítrico (Sigma) 0,5 g e os macronutrientes do meio (G₆₅-F)TPP⁻, quais sejam, NH₄Cl (BDH) 2,0 g; KH₂PO₄ (BDH) 1,2 g; MgSO₄. 7H₂O (BDH) 0,6 g; K₂SO₄ (BDH) 0,65 g. Como controle foi utilizado o hidrolisado diluído apenas com adição de NH₄Cl 2,0 g. Esses dois meios foram esterilizados por filtração (fitros com poro de 0,2 µm - Millipore Corp). As condições de cultivo do microrganismo nesse meio foram: temperatura - 65 °C; pH - 6,5; agitação - 600 rpm; aeração - 0,057 vvm de ar; taxa de diluição - 0,240 h⁻¹.