

Implementação de um sistema em linha para medida de concentrações de biomassa e metabolitos primários

Isabel Ratão

Eq. Assist. 1º Triénio

Área Departamental de Eng. Alimentar

Escola Superior de Tecnologia

Universidade do Algarve

Resumo Dado os inúmeros processos industriais que tem por base sistemas fermentativos, é fundamental monitorizar as concentrações de biomassa e/ou dos respectivos produtos de fermentação. Esta monitorização é tanto mais eficaz quanto mais rápida e precisa for, pelo que é necessário estudar métodos para a sua implementação em linha de produção.

Neste artigo, pretende-se relacionar a quantidade consumida de reagente regulador do pH com a quantidade de uma enzima extracelular produzida, de modo a permitir o controlo dessa produção em linha. O sistema utilizado como modelo foi a fermentação de uma estirpe floculante da levedura *Kluyveromyces marxianus*, utilizando glucose como fonte de carbono e energia. Esta estirpe produz uma enzima associada ao crescimento, a endopoligalacturonase. Foram realizados ensaios em sistemas contínuo e descontínuo, com vista à comparação de resultados e à demonstração da aplicabilidade do método a qualquer um dos referidos sistemas.

A fase de crescimento celular em sistema fechado ocorreu entre as três e meia e as nove horas de fermentação. Adequando o modelo descrito por Vicente *et al.* (1998) à produção de proteína, obteve-se uma relação muito satisfatória, pelo que se concluiu que a utilização deste modelo é possível para produtos associados ao crescimento. Aquando da realização de culturas em sistema contínuo foi possível provar que a determinação da relação entre a taxa de produção de protões e a taxa de produção de biomassa serve para detectar o afastamento das condições óptimas de crescimento celular e/ou produção de metabolitos.

1- Introdução

Muitos dos processos industriais para a produção de biomassa ou metabolitos de valor acrescentado são baseados em tecnologia de fermentação, pelo que é muito importante monitorizar a concentração de biomassa e produtos formados. Embora a indústria Biotecnológica tenha levado ao desenvolvimento de muitos sensores que podem ser usados para detectar a presença de metabolitos, a sua precisão e reproductibilidade ainda é muito limitada. Assim, existe uma necessidade premente de estabelecer a informação necessária para estimar as variáveis de processo (concentração de metabolitos e biomassa) a partir de outros parâmetros cuja medição seja mais fácil (Wang *et al.*, 1998). Esta monitorização é geralmente feita numa fase de pós-produção. Assim, tendem a ser usados métodos de controlo mais sofisticados, que permitam uma estimativa em linha das variáveis de processo de uma forma simples e reproductível.

De entre todos os instrumentos de medida

disponíveis, o eléctrodo de pH, é o mais utilizado, apesar da sua precisão relativamente baixa.

Durante uma fermentação podem ocorrer duas situações: se o pH não for regulado, a sua variação pode ser relacionada com a variação da concentração de biomassa ou metabolitos primários (associados ao crescimento). Se o pH for regulado é possível encontrar uma relação entre a quantidade de reagente de controlo de pH utilizado e a biomassa ou metabolitos produzidos (Pons *et al.*, s.d.). Em muitos casos, a taxa de reacções biológicas pode ser calculada a partir da quantidade de base ou ácido necessário para manter o pH constante. Já é possível estimar a taxa de reacção de uma enzima usando avançados sistemas de controlo de pH (Shioya, 1989). Outros trabalhos provam que existe uma relação metabólica directa entre a quantidade de reagente regulador de pH usada e a quantidade de biomassa produzida (Castrillo *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 1998) e indicam a possibilidade de monitorizar os produtos ligados ao crescimento (Vicente *et al.*, 1998).

De facto, quando um produto de fermentação aparece como resultado do metabolismo primário, a sua concentração aumenta proporcionalmente à concentração da biomassa. Os processos de utilização do substrato, síntese de biomassa e formação de produto estão ligados como numa simples reacção química (Bailey e Ollis, 1986). Para uma fermentação específica onde são formados biomassa e produtos primários, pode ser definido um coeficiente de rendimento ($Y_{P/X}$) que pode ser definido como a relação entre a quantidade de produto e o aumento de biomassa (Bailey e Ollis, 1986).

Uma vez que a produção de metabolito primários está directamente relacionada com a síntese de biomassa, deverá ser possível estabelecer uma relação entre estes semelhante à que foi obtida para a dependência entre a biomassa e o consumo de reagente controlador do pH. Uma vez conhecido o rendimento de produção de biomassa relativamente à produção de protões (Y_{X/H^+}) e o rendimento de produto ($Y_{P/X}$), deverá ser possível usar a taxa de consumo de reagente de pH para estimar a evolução da concentração dos produtos primários (Castrillo *et al.*, 2000).

O principal objectivo deste trabalho foi estudar a relação existente entre a produção de protões, o crescimento celular e os produtos ligados ao crescimento como uma extensão do modelo proposto por Vicente *et al.*, (1998). O sistema usado como modelo foi a fermentação de *Kluyveromyces marxianus*, usando glucose como fonte de carbono e energia. Esta estirpe produz uma enzima ligada ao crescimento – endopoligalacturonase. Os resultados obtidos deverão poder ser aplicados a outros sistemas celulares.

2 - Material e métodos

O sistema usado como modelo foi uma fermentação da estirpe *Kluyveromyces marxianus* (CH4-1) isolada da fermentação do cacau no Brasil por Schwan e Rose (1994), usando glucose como fonte de carbono e energia. Foram usados sistemas de cultura contínua e fechada de modo a que os resultados pudessem ser comparados e que fosse demonstrada a aplicabilidade do modelo aos dois tipos de sistema.

2.1. Cultura em sistema fechado

Para preparar o inóculo, a estirpe foi cultivada num meio desenvolvido por Schwan e Rose (1994),

durante 12 horas a 150 r.p.m. e 30 °C e foi armazenado a 4 °C num meio contendo 10 g/l de glucose, 3 g/l de extracto de levedura, 3 g/l de extracto de malte, 5 g/l de peptona e 20 g/l de agar. Tanto o meio, como o material foram esterilizados a 121 °C durante 20 minutos.

Foi também usado outro meio de cultura desenvolvido por Schwan e Rose (1994), contendo 10 g/l de glucose, 1 g/l de extracto de levedura, 3 g/l de sulfato de amónio, 4.5 g/l de dihidrogenofosfato de potássio, 0.25 g/l de sulfato de magnésio heptahidratado e 0.33 g/l de cloreto de cálcio dihidratado. Esta fermentação desenvolveu-se num biorreactor de 10 litros (Biostat ED, B. Braun, Alemanha). Este reactor, com capacidade de auto esterilização possuía sensores de temperatura, pH e oxigénio dissolvido, uma válvula para controlo de pressão e várias portas para adição de inóculo, meios de fermentação e reagente controlador de pH. Estava ainda equipado com sistemas de controlo automático para a temperatura, pH e nível de espuma, embora estes dois últimos não fossem usados.

A fermentação ocorreu sem arejamento, uma vez que a endopoligalacturonase apresenta maior rendimento de produção em condições microaerofílicas (Barnby, 1990). As fermentações estudadas começaram com uma densidade óptica de cerca de 0.2 (0.5 g de biomassa por litro de solução) e pH 5.00±0.01. Foram colhidas amostras no arranque da fermentação e a intervalos de hora e meia durante todo o processo. O pH foi ajustado manual e continuamente durante toda a fermentação com hidróxido de sódio, sendo esta considerada como terminada quando toda a glucose se esgotou.

A biomassa foi determinada, após homogeneização, por densidade óptica a 620 nm num espectrofotómetro (Jasco, Japão), usando água destilada como branco (através de uma curva de calibração de densidade óptica vs. peso seco). Depois de centrifugadas a 5000 r.p.m. (Sigma 4K10, B. Braun, Alemanha), o sobrenadante foi analisado para a determinação da concentração de açúcares redutores usando o método DNS (Miller, 1959), amónia usando um Kit TC ureia/amónia (cat. 542946 da Boehringer Mannheim, Alemanha), etanol, acetato de etilo e acetaldeído determinados por cromatografia gasosa (CP 9001, Chromapack, Holanda), usando coluna de Halcomide M18 a 1 % e CW a 4 %, 400 Csorb WAW 6080 mesh- (Chrompack, Holanda), proteínas, usando o método de Bradford (1976) e a actividade da endopoligalacturonase (método da cianoacetamida, Honda *et al.*, 1982).

As proteínas solúveis e a actividade enzimática foram determinadas após diálise contra água destilada durante 16 horas usando membranas com MWCO 14 000 Da (Medicell, USA). Depois de dializadas, as amostras foram concentradas 30 vezes (por desidratação com polietilenoglicol – PEG 20 000, seguida de reconstituição com um volume de água trinta vezes inferior) e analisadas por Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) para isolar a poligalacturonase das restantes proteínas presentes na amostra. Em cada fracção recolhida após FPLC, foram quantificadas as proteínas solúveis e a actividade da poligalacturonase.

2.2. Cultura contínua

A fermentação contínua teve lugar num reactor de 7 litros, em Perpex[®] – airlift. Este reactor estava equipado com sensores para a temperatura, pH e oxigénio dissolvido assim como várias portas para entrada de meio, saída de efluente e tomada de amostras. A temperatura foi mantida a 30 °C por meio de uma dupla camisa por onde circulava água aquecida. O reactor foi esterilizado com uma solução de hipoclorito de sódio a 10 % durante 24 horas. O meio de cultura utilizado foi o anteriormente descrito, excepto no que se refere à concentração de glucose, que foi aumentada para 50 g/l.

O sistema foi mantido fechado durante as primeiras 18 horas, após as quais, a bomba de alimentação foi ligada dando-se início à fermentação em sistema contínuo. Foram estudados quatro estados estacionários a taxas de diluição de 0.04, 0.07, 0.1 e 0.15 h⁻¹. Para cada estado estacionário, e durante pelo menos 2 horas, o ajuste de pH foi feito manualmente através de uma bureta, de modo a determinar com precisão a quantidade de base consumida. Foi considerado que se atingiu um estado estacionário sempre que a concentração de biomassa e glucose se mantiveram constantes durante, pelo menos, quatro horas e meia. Foram colhidas amostras em todos os estados estacionários e analisadas relativamente aos mesmos parâmetros descritos para a cultura em sistema fechado. Excepção feita para a biomassa que foi determinada directamente por peso seco (secagem durante 12 horas a 121 °C) e viabilidade celular (método do azul de metileno).

3 - Resultados e discussão

3.1. Fermentação em sistema fechado

A figura 1 mostra uma fermentação típica para a estirpe *Kluyveromyces marxianus* (CH4-1).

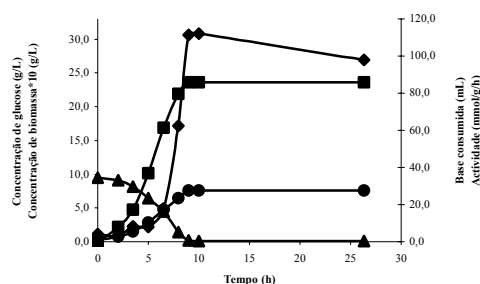


Figura 1. Gráfico representativo da evolução da fermentação em sistema fechado; glucose (▲); biomassa (●); actividade enzimática (◆); base consumida (■).

Em todas as fermentações, a fase de crescimento ocorreu entre as três e as nove horas e meia de cultivo.

A análise ao etanol apresentou o valor máximo de 4.5 g/l no final da fase de crescimento.

Observou-se também que o reagente de controlo do pH (NaOH) consumido foi proporcional à biomassa formada como descrito por Vicente *et al.*, (1998).

A actividade da endopoligalacturonase foi determinada durante todas as fermentações, tendo-se verificado um aumento significativo durante a fase de maior crescimento, correspondendo à produção de proteínas simultaneamente ao crescimento. Foi determinada em termos de quantidade de ácido galacturónico formado (através da acção da endopoligalacturonase presente na amostra) num litro de meio, durante uma hora, a partir do ácido poligalacturónico adicionado.

Analisaram-se ainda outros metabolitos como o acetato (não detectado), acetaldeído e acetato de etilo que foram detectados em quantidades insignificantes (0.008 e 0.01 g/l, no máximo).

Foi estudada a relação entre a taxa de reagente controlador do pH consumido e a quantidade de biomassa produzida, com o objectivo de relacionar estes valores com a quantidade de enzima produzida e estabelecer a relação entre a quantidade de reagente controlador do pH utilizado e a enzima formada. Conhecendo estes dados será possível estabelecer uma estratégia para monitorizar o processo de produção de produtos ligados ao crescimento.

3.1.1. Determinação da taxa específica de produção de protões (q_{H⁺})

Como foi avançado anteriormente por Castrillo *et al.*, (1995) a troca de protões entre a célula e o meio responsável pela variação de pH observadas em culturas biológicas é um processo de várias componentes onde estão envolvidos diferentes mecanismos. A actividade metabólica gera ou consome protões, dependendo do padrão metabólico que prevaleça. O equilíbrio de dissociação dos substratos adicionados, ou produtos podem contribuir para o aparecimento ou desaparecimento de protões. Outros componentes do meio podem fornecer uma capacidade tampão que varia de acordo com o meio e as condições da cultura.

A segunda contribuição pode ser eliminada se os substratos forem adicionados ao mesmo pH da cultura, no caso da cultura contínua ou semi-contínua ou se o pH da cultura for ajustado ao da fermentação no seu início (sistema fechado). Em muitos casos, como é o da cultura em açúcar em condições aeróbias, a contribuição da produção externa de metabolitos ácidos ou básicos pode ser considerada negligenciável. Quando a cultura está em condições de pH constante, qualquer variação na concentração de pH é compensada pela adição de ácido ou base ao meio. Uma vez que estes também serão sujeitas à capacidade tampão do meio, este elemento é anulado e os equivalentes de ácido ou base adicionados podem ser usados como uma medida directa da taxa metabólica de produção/consumo de H^+ pela cultura. Estudos nos quais foi observada uma associação entre o crescimento e a variação do pH do meio parecem mostrar que a actividade metabólica é a principal razão para a troca de protões entre o meio e as células (Huth *et al.*, 1990a,b,c; Kotyc, 1989 e Sigler e Höfer, 1991). Estes resultados foram confirmados por Castrillo *et al.* (1995) que, depois da determinação rigorosa da taxa específica de produção de protões (q_{H^+}), concluiu que a via de assimilação do azoto é a principal responsável pelas variações de pH do meio durante o crescimento celular em condições aeróbias.

Segundo Castrillo *et al.*, (1995), a determinação do q_{H^+} compreende dois passos:

- Determinação do fluxo de ácido/base necessário para manter o pH constante.
- Aplicação do balanço de massa aos protões presentes no meio.

O primeiro passo consiste na medida do volume da base que foi usado para manter o pH da cultura constante durante um determinado intervalo de tempo. Representando estes dados num gráfico tempo vs. volume de base consumida, o seu declive

corresponde ao consumo de base (ml/h).

O próximo passo é a aplicação do balanço de massa de protões ao meio do reactor

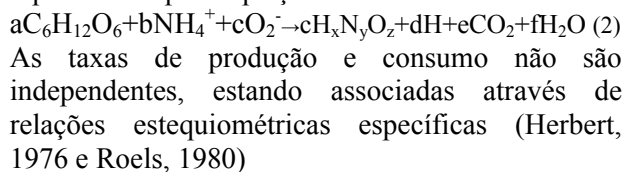
$$[\text{acumulação}] = [\text{entrada}] - [\text{saída}] + [\text{aparecimento/desaparecimento no meio devido ao metabolismo celular}] - [\text{aparecimento/desaparecimento no meio devido à adição externa de ácido ou base}] \quad (1)$$

3.1.2. Determinação da taxa específica de produção de biomassa (q_{biomassa})

A taxa específica de produção de biomassa representa a variação da produção de biomassa em equivalentes, por grama de biomassa média no período de tempo considerado, por hora (Castrillo e Ugalde, 1994; Herbert, 1976 e Vicente *et al.*, 1998). Um equivalente de biomassa é definido como uma mole de biomassa, considerando que a biomassa tem a fórmula $CH_{1.79}O_{0.57}N_{0.15}$ (Castrillo e Ugalde, 1994).

A aplicabilidade do método descrito por Vicente *et al.*, (1998) a culturas em sistema fechado foi confirmada para a estirpe *K. marxianus* (CH4-1), tendo sido calculada a relação $q_{H^+}/q_{\text{biomassa}}$ para esta estirpe.

Para cada organismo, a quantidade de azoto por peso seco depende de vários factores, entre os quais a fonte de carbono e as condições de cultura. Apesar de poderem ocorrer variações pode ser considerada aproximadamente constante, sendo possível formular uma composição elementar média para a biomassa (Herbert, 1976 e Oura, 1972). Na maior parte das formulações, após normalização para que contenha um átomo de carbono obtêm-se quantidades de azoto à volta dos 0.15 (Oura, 1972; Verduyn *et al.*, 1991; Castrillo e Ugalde, 1994; Roels, 1980 e Stonnleitner e Käppeli, 1986). É a partir deste conceito que são formuladas as equações estequiométricas para o crescimento, onde a composição da biomassa tem a fórmula geral $CH_xO_yN_x$ normalizada para conter um átomo de carbono (Castrillo e Ugalde, 1994; Herbert, 1976 e Oura, 1972). A reacção global para o crescimento em glucose e sais de amónio pode ser representada pela equação



$$q_{H^+}/q_N = d/b \quad (3)$$

e

$$q_{H^+}/q_{biomassa}=d \quad (4)$$

O azoto presente nos reagentes vai ser usado para formar biomassa, portanto,

$$b=z \quad (5)$$

Segundo Castrillo *et al.*, (1995), quando são usados sais de amónio como fonte de azoto, verifica-se a relação

$$q_{H^+}/q_N=1 \quad (6)$$

e

$$q_{H^+}/q_{biomassa}=b=d=z \quad (7)$$

Será esperada uma relação directa entre a taxa específica de produção de protões (q_{H^+}) e a taxa específica de produção de biomassa ($q_{biomassa}$), que corresponderá à quantidade de azoto na biomassa.

A figura 2 representa a evolução do q_{H^+} , $q_{biomassa}$ e $q_{H^+}/q_{biomassa}$ durante um processo de cultivo.

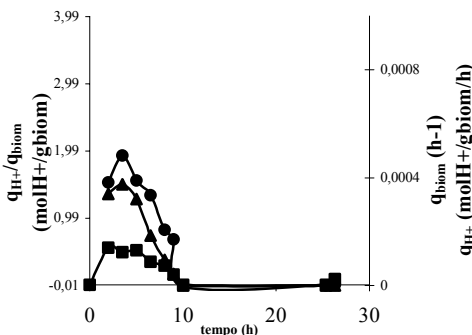


Figura 2. Evolução da relação $q_{H^+}/q_{biomassa}$ (■) ao longo da fermentação; $q_{biomassa}$: (●); q_{H^+} : (▲).

Este coeficiente tem um valor médio de 0.41, superior ao 0.15 esperado, segundo consta na literatura para sistemas com metabolismo respiratório e respiro-fermentativo (Oura, 1972; Roels, 1980; Verduyn *et al.*, 1991 e Vicente *et al.*, 1998). O desvio deste valor deve-se, provavelmente, ao facto do metabolismo presente ser fermentativo, devido à limitação de oxigénio. Não é introduzido ar no vaso de cultura uma vez que a sua presença tem um efeito inibitório na produção da enzima em estudo. No início da fermentação, a relação $q_{H^+}/q_{biomassa}$ é 0.15, o que pode ser devido à presença de oxigénio suficiente para que exista um metabolismo respiratório. Uma vez eliminados todos os factores conhecidos que podem levar ao desvio do valor 0.15 esperado, pode suspeitar-se que o metabolismo fermentativo produz compostos capazes de influenciar o valor de q_{H^+} . A determinação desses compostos não estava no âmbito deste trabalho, pelo que isto pode ser uma proposta para desenvolver futuramente. Assim, pode-se dizer que, nestas condições, o valor de q_{H^+} pode ser utilizado para observar desvios ao valor de 0.15, o que

permite concluir que as condições não são favoráveis para a produção de metabolitos primários. Geralmente, condições anaeróbias de crescimento causam uma diminuição na produção deste tipo de metabolitos, ao mesmo tempo que fomentam o aparecimento de outros produtos que normalmente trazem outros problemas aos processos de separação a jusante. Assim, é desejável desenvolver um método que permita a detecção dessas condições desfavoráveis, o mais cedo possível, de modo a poder estudar-se as possibilidades e tomar medidas correctivas. Este método poderá ser, como foi dito anteriormente, a determinação da relação $q_{H^+}/q_{biomassa}$.

3.1.3. Estimativa da concentração de biomassa

Como foi mostrado por Vicente *et al.*, (1998), para uma cultura em sistema fechado com glucose e sulfato de amónio como fontes de energia e azoto, respectivamente, é possível estimar a concentração de biomassa através da expressão

$$C_{X,(t+\Delta t)} = C_{X,t} + N_{OH^-} \cdot Y_{X/H^+,\Delta t} / V \quad (8)$$

$$N_{OH^-} = n^\circ \text{ de moles de } OH^-$$

$$Y_{X/H^+,\Delta t} = \mu / q_{H^+} \quad (9)$$

μ – taxa específica de crescimento (h^{-1})

$$Y_{X/H^+,\Delta t} = q_{biomassa} / q_{H^+} \quad (10)$$

A figura 3 permite confirmar que o processo acima descrito permite uma correcta estimativa da biomassa neste caso.

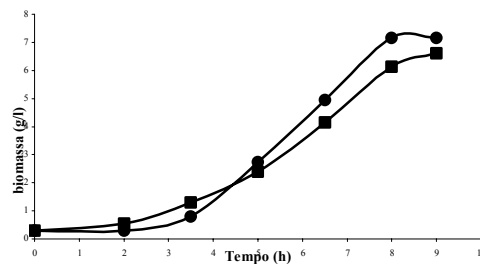


Figura 3. Comparação entre a biomassa estimada (●) para uma dada cultura, a partir de uma cultura modelo, e a biomassa efectivamente obtida (■).

3.1.4. Estimativa da concentração de proteína

Uma vez confirmada a possibilidade de estimativa da biomassa a partir do conhecimento da quantidade de reagente controlador do pH consumido, tentou-se estimar a concentração de produtos ligados ao crescimento, através do mesmo método. O produto utilizado como modelo foi a poligalacturonase produzida pela *K. marxianus*

(CH4-1).

Quando o principal produto de um sistema de cultivo aparece como resultado de um metabolismo primário, a sua concentração aumenta proporcionalmente à concentração de biomassa. Assim, para uma dada fermentação, onde são obtidos biomassa e produtos primários, pode ser definido um coeficiente ($Y_{P/X}$) definido como a relação entre as quantidades de produto e de biomassa formados num determinado período de tempo. Uma vez que existe uma relação directa entre produtos primários e biomassa, é esperada uma relação semelhante à que foi estabelecida para a relação da biomassa com o q_{H^+}

$$P_{(t+\Delta t)} = P_{(t)} + \Delta P_{\Delta t} \quad (11)$$

Onde P é a concentração de produto (mole de ácido galacturónico por unidade de tempo de reacção e por grama de proteína, por unidade de volume).

$$Y_{P/X} = \Delta P / \Delta C_X \quad (12)$$

Então

$$P_{(t+\Delta t)} = P_{(t)} + Y_{P/X} \cdot \Delta C_{X,\Delta t} \quad (13)$$

e

$$\Delta C_{X,\Delta t} = (1/V) \cdot N_{OH^-} \cdot Y_{X/H^+} \Delta t \quad (14)$$

então

$$P_{(t+\Delta t)} = P_{(t)} + (1/V) \cdot N_{OH^-} \cdot Y_{X/H^+} \Delta t \quad (15)$$

$Y_{P/X}$ pode ser determinado em experiências independentes (Bailey e Ollis, 1986), directamente ou através da relação

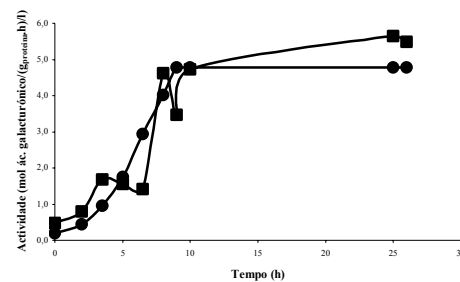
$$Y_{P/X} = (Y_{P/S} / Y_{X/S}) \quad (16)$$

Onde $Y_{P/S}$ é definido como gramas de produto obtido por grama de substrato consumido e $Y_{X/S}$ é definido como grama de biomassa obtida por grama de substrato consumido.

O valor de $Y_{P/X}$ é dado em moles de ácido galacturónico por grama de proteína e por hora de reacção, por grama de biomassa. Esta quantidade de proteína deverá corresponder inteiramente à quantidade de endopoligalacturonase, pelo que a sua separação foi feita por FPLC. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que as percentagens de recuperação da actividade e proteína total foram muito baixas (cerca de 10 a 15 %). Estes resultados podem ser devidos à técnica de concentração necessária para a análise. Durante o processo de concentração, a membrana fica totalmente seca, o que pode causar a desnaturação da proteína ou a sua adsorção às paredes da membrana. Devido a esta limitação todos os cálculos foram efectuados com os valores de proteína total após diálise da amostra através de uma membrana 14 000 MWC. Foi considerado como aproximação possível que todas as proteínas com tamanho igual ou superior a 14 000 Da são endopoligalacturonases.

Uma vez determinados os valores de Y_{X/H^+} e $Y_{P/X}$, é possível utilizar a taxa de consumo de reagente controlador do pH para estimar a evolução da concentração de produtos primários. Esta estimativa também pode ser feita através da relação entre a biomassa estimada e o $Y_{X/P}$, que é o inverso do $Y_{P/X}$ anteriormente definido.

Os resultados obtidos estão presentes na figura 4 em comparação com a actividade determinada experimentalmente para uma fermentação típica nas condições estudadas. Ambas as curvas são semelhantes, o que leva a concluir que o modelo apresentado pode ser usado de um modo muito satisfatório.



Figura

4. Comparação entre as actividades enzimáticas específicas real (■) e estimada (●) para uma dada fermentação tipo.

3.2. Fermentação em sistema contínuo

Devido a importância da produção de produtos de valor acrescentado (cuja poligalacturonase é um caso) em sistemas de cultura contínuos e uma vez demonstrada a possibilidade da estimativa da concentração de biomassa através do conhecimento da quantidade de reagente controlador de pH utilizado para o crescimento (Vicente *et al.*, 1998), tentou-se estender essa possibilidade de estimativa aos produtos primários, neste caso particular, a uma endopoligalacturonase.

Foram realizadas culturas contínuas a diferentes estados estacionários e seguidamente analisadas. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 1.

Considera-se que se atingiu um novo estado estacionário quando a concentração de biomassa é constante no efluente do reactor (Stafford, 1986), assim como a concentração de substrato e a actividade enzimática.

Uma vez atingido um estado estacionário, foram colhidas várias amostras para serem analisadas e foi determinada a taxa de consumo de reagente regulador de pH. Finalizado este processo, fez-se variar a taxa de diluição e esperou-se que se

atingisse um novo estado estacionário para se repetir o procedimento anteriormente descrito.

Tabela 1. Resultados obtidos durante a cultura em contínuo com glucose (50 g/l) como fonte de carbono e sulfato de amónio como fonte de azoto.

Taxa de diluição (h ⁻¹)	0.04	0.08	0.1	0.15
Conc. biomassa (g/l)	4.24	4.37	3.35	2.77
Conc. proteína dialisada (mg/l)	29.7	21.4	15.8	12.7
Actividade (mmol/l/h)	37.6	37.5	43.6	26.2
Actividade (mmol/g proteína/h)	1.27	1.76	2.75	2.06
Conc. de etanol (g/l)	15.8	14.4	14.8	9.93
Conc. de acetato de etilo (g/l)	6.88E-2	3.35E-2	2.15E-2	8.97E-3
Conc. de acetaldeído (g/l)	1.08E-2	8.50E-3	1.81E-2	1.50E-2
Conc. de amónia (g/l)	0.663	0.567	0.536	0.441
Taxa de adição de reagente regulador do pH (ml/h)	9.22	17.6	20.6	24.3

Tal como nas fermentações em sistema fechado, a taxa de reagente controlador do pH consumido foi determinada através do declive da curva tempo *vs.* volume consumido. A contribuição da base adicionada para o valor de q_{H^+} foi determinada mais uma vez. Para este efeito foi necessário determinar a taxa de consumo de amónia (q_{NH_3}) e aplicar as correcções correspondentes, para determinar o valor real do q_{H^+} que corresponde ao metabolismo do carbono. Uma vez feita esta determinação, chega-se à conclusão que a concentração de amónio varia em torno de um ponto médio, pelo que se decidiu não considerar este valor para a determinação do q_{H^+} . Analisando a tabela 1 pode-se concluir que a concentração de acetaldeído e acetato de etilo são muito baixas. Mesmo assim, foram feitas as correcções propostas pelo método apresentado por Vicente *et al.*, (1998). O meio de cultura foi alimentado a um pH de 4.20, pelo que foi necessário subtrair a sua contribuição para o consumo de reagente regulador do pH.

A partir dos valores apresentados na tabela 2 é possível determinar a relação $q_{H^+}/q_{biomassa}$ para diferentes estados estacionários. Pode verificar-se que estes valores estão mais próximos de 0.15, talvez devido às condições oxidativas presentes no bioreactor (a mistura é feita pelo ar – airlift). Estes resultados confirmam que a relação $q_{H^+}/q_{biomassa}$ pode ser utilizada para calcular possíveis desvios às condições óptimas da cultura.

4 - Conclusão

Os dados obtidos por Vicente *et al.*, (1998) foram confirmados através da realização de culturas em sistema fechado. O valor da relação $q_{H^+}/q_{biomassa}$

para esta estirpe foi determinado e é 0.41, valor superior ao 0.15 descrito na literatura (Oura, 1972; Verduyn *et al.*, 1991 e Vicente *et al.*, 1998) provavelmente devido ao metabolismo ser fermentativo por limitação de oxigénio. Usando este modelo para a produção de proteína foi obtida uma relação muito satisfatória entre os valores estimados e aqueles que foram obtidos experimentalmente nas culturas usadas como modelo, o que leva à conclusão de que o modelo pode ser aplicado a produtos ligados ao crescimento.

Tabela 2. Cálculos dos parâmetros relevantes efectuados para a fermentação contínua (*act.* corresponde à actividade da enzima, em unidades de mmol ác. galacturónico/g proteína/h).

Taxa de diluição (h ⁻¹)	0.04	0.08	0.1	0.15
q_{H^+} corrigido (mmol/h/g biomassa)	0.300	0.564	0.857	1.23
$q_{biomassa}$ (h ⁻¹)	0.04	0.08	0.1	0.15
$q_{proteína}$ (mg/h/g biomassa)	0.344	0.522	0.427	0.569
$q_{H^+}/q_{biomassa}$ (mol/mol biomassa)	0.188	0.176	0.214	0.204
Produtividade (<i>act</i> /h)	0.051	0.141	0.275	0.310
Conc. de biomassa obtida (g/l)	4.24	4.37	3.35	2.77
Actividade obtida (<i>act</i>)	1.27	1.76	2.75	2.06

As relações obtidas para as culturas em sistema contínuo revelam a possibilidade de detecção de possíveis desvios às condições óptimas de fermentação e/ou de produção de produtos, considerando como condições óptimas metabolismos respiratórios ou respiro-fermentativos.

5 -Referências

- Bailey, J. L.; Ollis, D. F. (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. 2^a ed. Mac
 Barnby, F. M.; Morpheth, F. F. e Pyle, D. L. (1990). Endopolygalacturonase Production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, Purification, and Partial Characterization of the Enzyme. Enzyme and Microbial Technology. 12, 891-897.
 Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-254.
 Castrillo, J. I.; de Miguel, I. e Ugalde, U. O. (1995).

- Proton Production and Consumption Pathways in Yeast Metabolism. A Chemostat Culture Analysis. *Yeast*. 11, 1353-1365.
- Castrillo, J. I. e Ugalde, U. O. (1994). A General Model of Yeast Energy Metabolism in Aerobic Chemostat Culture. *Yeast*. 10, 185-197.
- Castrillo, J. I.; Vicente, A; Teixeira, J. A. e Ugalde, U. (2000). On-line Estimation of Biomass and Growth-linked Products Synthesis Through pH Control Analysis. *Research Advances in Biotechnology and Bioengineering*, vol 1. 17.
- Herbert, D. (1976). Stoichiometric Aspects of Microbial Growth. In: A. C. R. Dean, D. C. Ellwood, C. G. T. Evans e J. Melling, eds. *Continuous Culture 6: Applications and New Fields*. Ellis Horwood Limited, 1-30.
- Honda, S.; Nishimura, Y.; Takahashi, M.; Chiba, H. And Kakemi, K. (1982). A manual method for the spectrophotometric determination of reducing Carbohydrates with 2-cyanoacetamide. *Analytical Biochemistry*. 119. 194-199.
- Huth, J.; Blasig, R.; Werner, S. e Mueller, H. G. (1990a). The Proton Extrusion of Growing Yeast Cultures as an On-line Parameter in Fermentation Processes: Determination of Biomass Production and Substrate Consumption in Batch Experiments with *Candida maltosa* EH 15D. *Journal of Basic Microbiology*. 30, 481-488.
- Huth, J; Werner, S. e Mueller, H. G. (1990b). The Proton Extrusion of Growing Yeast Cultures as an On-line Parameter in Fermentation Processes: Quantitative Determination of Growth from Miligram Amounts of Substrate in Minimized Fed-batch Fermentation Apparatus. *Journal of Basic Microbiology*. 30, 489-497.
- Huth, J; Werner, S. e Mueller, H. G. (1990c). The Proton Extrusion of Growing Yeast Cultures as an On-line Parameter in Fermentation Processes: Ammonia Assimilation and Proton Extrusion are Correlated by an 1:1 Stoichiometry in Nitrogen-limited Fed-batch Fermentations. *Journal of Basic Microbiology*. 30, 561-567.
- Kotyk, A. (1989). Proton Extrusion in Yeast. In: S. Fleischer e B. Fleischer, eds. *Methods in Enzymology*. Vol. 174 (Biomembranes, Part C). New York: Academic Press, 1989. 592-603.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
- Oura, E. (1972). The Effect of Aeration on the Growth Energetics and Biochemical Composition of Baker's Yeast. PHd thesis. Helsínquia University. Helsínquia.
- Pons, M. N., Garrido-Sanchez, L. e Engasser, J. M. (s.d.) Observability by pH in Bioprocesses. p.227-231.
- Roels, J. A. (1980). Application of Macroscopic Balances to Microbial Metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. 22, 2457-2514.
- Schwan, R. F. e Rose, A. H. (1994) Polygalacturonase Production by *Kluyveromyces marxianus*: Effect of Medium Composition. *Journal of Applied Bacteriology*. 76, 62-67.
- Shioya, S. (1989). Measurement of Biological Reaction Rates Using Advanced pH Control Systems. p. 15-22.
- Sigler, K. e Höfer, M. (1991). Mechanisms of Acid Extrusion in Yeast. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 1071, 375-391.
- Stonnleitner, B. e Käppeli, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by Its Limited Respiratory Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis. *Biotechnology and Bioengineering*. 28, 927-937.
- Verduyn, C.; Stouthamer, A. H.; Scheffers, W. A. e van Dijken, J. P. (1991). A Theoretical Evaluation of Growth Yields of Yeasts. *Antoine van Leeuwenhoek*. 59, 49-63.
- Vicente, A; Castrillo, J. I.; Teixeira, J. A. e Ugalde, U. (1998). On-line Estimation of Biomass Through pH Control Analysis in Aerobic Yeast Fermentation Systems. *Biohecnology and Bioengineering*, 58, (4) 445-450.
- Wang, F.-S., Lee, W.-C. & Chang, L.-L. (1998). On-line State Estimation of Biomass Based on Acid Production in *Zymomonas mobilis* Cultures. *Bioprocess Engineering*. 18, 329-333.