



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Fisiologia da toxicidade ácida em culturas descontínuas de  
*Xanthomonas campestris***

Ana Teresa Fialho Caeiro Caldeira

Dissertação para obtenção do grau de mestre em: Química Analítica- Aplicação a  
Processos Bioquímicos e Biotecnológicos

Setembro de 1997



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Fisiologia da toxicidade ácida em culturas descontínuas de  
*Xanthomonas campestris***



88 854

Ana Teresa Fialho Caeiro Caldeira

Dissertação para obtenção do grau de mestre em: Química Analítica- Aplicação a  
Processos Bioquímicos e Biotecnológicos

Setembro de 1997



## Resumo

Estudou-se o efeito de 0,15mM de ácido acético, na forma não ionizada, no crescimento de *Xanthomonas campestris* e na produção de xantano. Em culturas descontínuas de *Xanthomonas campestris* o ácido acético promoveu uma diminuição do crescimento do microrganismo e um aumento na produção de xantano. Parece provável que estes dois parâmetros estejam relacionados entre si e sejam o resultado duma maior canalização da fonte de carbono da produção de células para a produção de xantano, devido à diminuição do pH interno, induzida pelo ácido. Observou-se, na presença de 0,15mM de ácido acético, na forma não ionizada, uma estimulação da actividade enzimática da ATPase (aumentou 28,2%) e um decréscimo do teor em ATP (diminuiu 26,0%). A estimulação da actividade enzimática e a diminuição do teor de ATP foram relacionados com a saída de prótons para o exterior da célula à custa de energia, hidrólise de ATP (como consequência da diminuição do pH interno, induzida pelo ácido), parecendo constituir um mecanismo de restabelecimento do gradiente de prótons, de modo a manter um valor de pH interno homeostático. O aumento da produção de xantano parece estar relacionado com a possibilidade de formação de ATP por vias alternativas, devido ao desacoplamento energético que o ácido induz.

## Abstract

The effect of the addition of 0,15mM of the undissociated form of acetic acid in the microbial growth of *Xanthomonas campestris* and in the xanthan production, was studied. In batch cultures of *Xanthomonas campestris* 0,15mM of the undissociated form of acetic acid decreases cell growth and stimulates xanthan production. The stimulation of xanthan production and the decrease of microbial growth were apparently correlated. They were, probably, the result of a carbon flux diversion from cell formation to product synthesis. 0,15 mM of the undissociated form of acetic acid stimulated ATPase activity and decreased ATP. The ATPase activation and the decrease of ATP were associated with the passage of protons across the membrane at the expense of cell energy, linked to ATP hydrolysis, in consequence of the regulation of the intracellular pH. This appears to constitute a mechanism that generates a proton gradient for the maintenance of an intracellular pH homyostatic. Xanthan overproduction was related with the alternative pathways for ATP synthesis because the uncoupling conditions induced by the acid resulted in an energy deficiency.

## **Palavras chave**

*Xanthomonas campestris*

Xantano

Exopolissacátido

Estimulação da produção de xantano

Ácidos orgânicos

Ácido acético

Toxicidade ácida

Estimulação da ATPase

## **Key words**

*Xanthomonas campestris*

Xanthan

Exopolysaccharide

Xanthan overproduction

Organic acids

Acetic acid

Acid stress

ATPase activation

## Agradecimentos

Ao Doutor José Carlos Roseiro, do INETI, pela orientação, pelo apoio científico, e ainda, pela disponibilidade e amizade demonstradas ao longo da realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Maria dos Santos Arteiro, do Departamento de Química da Universidade de Évora, pela orientação e apoio científico, pelo encorajamento e pela amizade.

Ao Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais, do Departamento de Química da Universidade de Évora, pelas facilidades concedidas na realização deste trabalho, pelas palavras encorajadoras e pelo incentivo que sempre me dispensou.

A todas as pessoas do Departamento de Química da Universidade de Évora, pelo apoio que me prestaram.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica, do laboratório Ferreira de Miranda e do laboratório de águas, em especial ao Amilcar pela colaboração prestada.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial à Dora e ao Henrique pelo carinho e amizade com que sempre me trataram.

Aos meus pais, aos meus irmãos, ao Alexandre, ao Luís Miguel, à Bisa e à Tita por todo o apoio que me deram.

Ao meu pai, por me ter ensinado a gostar de estudar.

---

## Índice Geral

	<b>Página</b>
Resumo	i
Abstract	ii
Palavras chave/Keywords	iii
Agradecimentos	iv
Índice geral	v
Lista de tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Símbolos	xi
I- Introdução	1
1- O xantano-Algumas generalidades	2
2- Introdução ao tema da tese	5
II- Materiais e Métodos	8
1- Microrganismos	9
2- Condições de cultura	9
2.1- Fermentações em frascos agitados	9
2.1.1- Preparação dos inóculos	9
2.1.2- Desenvolvimento das culturas	9
2.2- Fermentações em vaso de fermentação	10
2.2.1- Preparação dos inóculos	10

---

2.2.2- Desenvolvimento das culturas	10
2.2.3- Vaso de fermentação	11
3- Métodos analíticos	14
3.1- Determinação da concentração celular	14
3.2- Determinação da concentração de polissacárido	15
3.3- Quantificação da glucose	15
4- Actividade Enzimática da ATPase	16
4.1- Preparação das amostras	16
4.2- Preparação da fracção de ATPase	16
4.3- Determinação da concentração total de proteína	17
4.4- Determinação da actividade enzimática da ATPase	17
4.5- Determinação da concentração de fósforo inorgânico	18
5- Concentração de ATP	18
5.1- Preparação das amostras	19
5.2- Determinação da concentração de ATP	19
6- <i>Software</i> utilizado	
III- Culturas Descontínuas de <i>Xanthomonas campestris</i> em Presença de Ácido Acético	20
1- Introdução	21
2- Resultados	22
2.1- Perfis das fermentações	22

---

2.2- Validação de resultados por análise de variância	34
2.2.1- Taxa específica de crescimento	36
2.2.2- Taxa volumétrica de produção de xantano	37
2.2.3- Taxa volumétrica de consumo de glucose	37
2.2.4- Rendimento em xantano	38
2.2.5- Rendimento em biomassa	38
2.2.6- Rendimento específico em xantano	38
3- Discussão	39
IV- Estimulação da Actividade Enzimática da ATPase em Presença de Ácido Acético	44
1- Introdução	45
2- Resultados e Discussão	48
V- Conclusões	63
VI- Bibliografia	66
Anexos	76
A- Reagentes	77
B- Meios de Cultura	81
C- Perfis das Fermentações	84
D- <i>Software</i> utilizado para o controle do pH	95

## Lista de tabelas

	<b>Página</b>
Tabela 1- Parâmetros cinéticos das fermentações (A-J) na ausência e na presença de 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada.	24
Tabela 2 - Taxas específicas de crescimento antes e depois da adição de 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada.	32
Tabela 3 - Análise de variância dos parâmetros cinéticos calculados para as fermentações realizadas na ausência do ácido (A-E), e na presença de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada, adicionado às 22-24 horas de crescimento (F-J).	35
Tabela 4 - Atividades enzimáticas da ATPase antes e após a adição de 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada, para fermentações em vaso fermentador.	49
Tabela 5 - Atividades enzimáticas de ATPase antes e após a adição de 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada, para fermentações em frascos agitados.	51



## Lista de figuras

	<b>Página</b>
Fig. 1 -Estrutura química do xantano-unidade de repetição	4
Fig. 2 - Vaso fermentador.	12
Fig. 3 - Esquema da tampa do vaso de fermentação com respectivas portas de acesso.	13
Fig. 4 - Perfil da fermentação F.	25
Fig. 5 - Perfil da fermentação A.	28
Fig. 6 - Médias dos parâmetros cinéticos da tabela 1 na ausência e na presença de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada.	29
Fig.7 - Representação esquemática da F-ATPase existente nas membranas das bactérias.	46

- Fig.8 - Perfil de variação da média das actividades enzimáticas da ATPase com o tempo em fermentações efectuadas em vaso de fermentação, onde foi adicionado 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada. 50
- Fig.9- (a) - Variação da concentração de ATP com o tempo para duas fermentações em vaso fermentador, após a adição de 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada.(b) - Perfil de variação da actividade enzimática da ATPase nas duas fermentações. 54
- Fig.10- (a) - Variação da concentração de ATP com o tempo para duas fermentações em frasco agitado, após a adição de 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada.(b) - Perfil da variação da actividade enzimática da ATPase nas duas fermentações. 55
- Fig.11 - Variação da concentração de ATP com o tempo, após a adição de 0,15 mM de ácido acético na forma não ionizada. 56

## Símbolos

EPS- Exopolissacárido

ATP- Trifosfato de adenosina.

DNA- Ácido desoxirribonucleico.

YMA- *Yeast malt agar*.

YM- *Yeast malt*

HA- Ácido acético na forma não ionizada..

EDTA- Etileno diamina tetra acético.

BSA- Albumina de soro bovino.

TCA- Ácido tricloroacético.

$\sigma$ - Desvio padrão.

Pi- Fósforo inorgânico.

$\mu$ - Taxa específica de crescimento.

$q_{xan}$ - Taxa volumétrica de formação de xantano.

$q_{glu}$ - Taxa volumétrica de consumo de glucose.

glucons.- Glucose consumida.

$Y_{P/S}$ - Rendimento em xantano.

$Y_{X/S}$ - Rendimento em biomassa.

$Y_{P/X}$ - Rendimento específico em xantano.

$\mu_0$ - Taxa específica de crescimento calculada antes da adição do ácido acético.

$\mu_{AC}$ - Taxa específica de crescimento calculada depois da adição do ácido acético.

ANOVA- *Analysis of variance*.

H<sub>0</sub>- Hipótese nula.

H<sub>a</sub>- Hipótese alternativa.

p- nível de significância do teste F de Fisher.

NS- Não significativo.

SQ- Soma dos quadrados.

gl- Graus de liberdade.

MQ- Média dos quadrados.

F- Parâmetro da distribuição F de Fisher.

F crit- F crítico.

RNA- Ácido ribonucleico.

## **I- Introdução**

## 1- O xantano- Algumas generalidades

A goma de xantano é um heteropolissacárido bio sintético extracelular, polianiónico, de elevado peso molecular, produzida por bactérias do género *Xanthomonas*.

A produção do exopolissacárido (EPS) parece estar relacionada com pressões do meio em que o microrganismo vive, sendo reconhecida como um mecanismo de defesa contra agressões exteriores. De facto, a formação de uma camada viscosa em redor das células torna-as mais resistentes a variações de temperatura e radiações (Leach *et al.*, 1957), protegendo-as também contra desidratação, predações e inibidores do crescimento (Evans *et al.*, 1979).

*Xanthomonas campestris* é uma bactéria Gram-negativa, fitopatogénica específica para plantas do género brassica, que produz uma substância com viscosidade superior a 7000cps, o xantano.

Os estudos da produção de xantano, com a espécie *Xanthomonas campestris* (B-1459) iniciaram-se nos anos 50, no *Northern Regional Research Laboratory*. Esta goma foi comercializada com o nome de *keltrol* pela companhia *Kelco*, começando a ser produzida industrialmente em 1963. Foi pela primeira vez autorizada a sua utilização em aditivos alimentares em 1969, nos Estados Unidos (Paul *et al.* 1986). Em 1974 uma directiva da comissão da Comunidade Económica Europeia aprovou a sua utilização na indústria alimentar.

As soluções de xantano são altamente estáveis em diferentes condições de pH, temperatura e concentração de sais. As propriedades reológicas da goma de xantano, associadas à sua natureza pseudoplástica, tornam-na utilizável nas mais diversas aplicações, que vão desde a indústria alimentar até à farmacêutica, cosmética, têxtil, cerâmica, petrolífera, entre outras (Kennedy *et al.* 1984).

Para além de meios definidos, têm sido propostas diversas substâncias na produção de xantano, como por exemplo os desperdícios de indústrias de produtos alimentares, dos quais os hidrolizados de cereais, o licor de soja, os soros lactosados (Sutherland, 1990) e a polpa de alfarroba (Roseiro *et al.*, 1991) constituem alguns exemplos. Estes resíduos podem, por tratamentos apropriados, tornar-se licores fermentescíveis que, utilizados pelas bactérias na produção de xantano, constituem um valor acrescentado. No entanto, certas características destes substractos, como por exemplo a presença de ácidos orgânicos, nomeadamente o ácido acético, podem constituir factores de inibição ao crescimento microbiano.

Têm-se observado que organismos sujeitos a aumentos graduais de ácidos orgânicos potenciam um valor sub-letal máximo, relativamente a esses ácidos. Raja *et al.* (1991) observaram uma diminuição nas perturbações causadas nas moléculas de DNA de *Escherichia coli*, em organismos em que a habituação aos ácidos foi potenciada. A transferência, para estes organismos, de plasmídeos com DNA alterado pela presença de ácidos conferiu-lhes uma maior capacidade de regeneração desse DNA. Esta possibilidade abre um caminho interessante na procura de espécies mais adaptadas à metabolização de substractos complexos.

A Figura 1 mostra um esquema da estrutura química do xantano. A unidade de repetição estrutural deste polímero é constituída por duas moléculas de glucose, uma de ácido glucurónico e duas de manose. Os resíduos de glucose ligam-se por intermédio de ligações  $\beta$ -1,4, formando um esqueleto semelhante ao da celulose. As cadeias laterais de manose-ácido glucurónico-manose surgem alternadamente a partir de cada resíduo de glucose. Um dos resíduos de manose é acetilado e o outro é piruvatado (Kennedy *et al.*, 1984 e Betlach *et al.*, 1987). Em 1981, Ielpi *et al.* efectuaram a síntese deste polímero, *in vitro*.

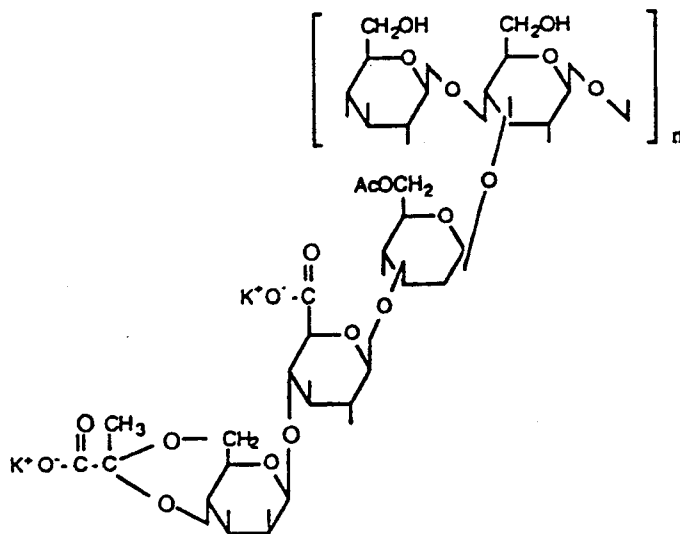


Figura 1- Estrutura química do xantano- unidade de repetição.



## 2- Introdução ao tema da tese

Roseiro (1991), com a introdução de diferentes concentrações de ácido isobutírico no meio de cultura de *Xanthomonas campestris*, observou uma inibição do crescimento deste microrganismo. Verificou também que este ácido, em pequenas concentrações, pode estimular a produção de xantano.

Esgalhado (1993) estudou o efeito dos ácidos acético, pentanóico, octanóico e isobutírico no metabolismo de *Xanthomonas campestris*.

Pires (1996) estudou o efeito de diferentes concentrações de ácido acético em culturas descontínuas de *Xanthomonas campestris*.

Os trabalhos levados a cabo por estes autores mostraram a existência de uma estimulação na produção de xantano por *Xanthomonas campestris* quando os referidos ácidos se encontram em concentrações sub-letais no meio de cultura. A estimulação da produção de xantano foi relacionada com um desvio do fluxo de carbono da síntese celular para a formação de produto (Roseiro, 1991 e Esgalhado, 1993) e, na presença do ácido isobutírico, observou-se um desvio do fluxo total de carbono da biomassa para a síntese de xantano (Roseiro *et al.*, 1996). Após a entrada da fonte de carbono nas células de *Xanthomonas campestris*, a via Entner-Doudoroff é reconhecida como a principal via de metabolização, sendo-lhe atribuída o catabolismo de mais de 80% da glucose disponível a este microrganismo. Apenas uma pequena parte de glucose parece ser metabolizada através do ciclo das pentoses-fosfatos. O ciclo dos ácidos

tricarboxílicos parece ocorrer na sequência das vias de Entner-Doudoroff e pentoses-fosfatos, não havendo indícios da via glicolítica (Katznelson, 1955; Katznelson, 1957 e Zagallo & Wang, 1967). Esgalhado (1993), na presença de concentrações sub-letais de ácidos orgânicos, sugeriu a existência de alterações no metabolismo do referido organismo, nomeadamente a estimulação do ciclo das pentoses-fosfatos (com o aumento da actividade enzimática da 6-P-Gluconato desidrogenase) e a estimulação da fosfomanose isomerase, enzima envolvida na síntese do xantano. Pires (1996) observou também um aumento da actividade enzimática da 6-P-Gluconato desidrogenase em presença de concentrações sub-letais de ácidos orgânicos e verificou ainda um aumento da actividade enzimática da malato-desidrogenase, enzima envolvida no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Roseiro *et al.* (1996) observaram, na presença de concentrações sub-letais de ácido isobutírico, um aumento na actividade enzimática da fosfo-2-dehidro-3-deoxigluconato-aldolase, enzima da via de Entner-Doudoroff, aumento na actividade enzimática da 6-P-Gluconato desidrogenase e da fosfomanose isomerase e sugeriram a existência de um mecanismo de resistência à agressão ácida por meio da indução de um sistema de remoção de protões da célula, à custa de ATP. Segundo estes autores, o consumo suplementar de ATP causará uma deficiência de energia, impedindo que o crescimento do microrganismo seja máximo e canalizando carbono para a biossíntese de xantano.

Com este trabalho pretende-se confirmar o mecanismo de protecção à toxicidade ácida em *Xanthomonas campestris*, verificar o nível de estimulação da ATPase e a existência de desacoplamento energético.

## **II- Materiais e métodos**

## 1- Microrganismos

Utilizou-se uma estirpe de *Xanthomonas campestris*, F- 302. A estirpe foi conservada por liofilização e, depois da abertura do liofilizado, as bactérias foram mantidas em rampas de *yeast malt agar*, YMA, (ver anexo B) a 4°C. Antes da utilização do microrganismo foram produzidas novas rampas, colocadas a crescer a 30°C durante 48 horas.

## 2- Condições de Cultura

### 2.1- Fermentações em frascos agitados

#### 2.1.1- Preparação dos inóculos

Adicionaram-se células de uma rampa YMA a 100mL de meio *yeast malt*, YM, (ver anexo B), num erlenmeyer de 1L. As culturas foram agitadas a 30°C, durante 24 horas, num agitador recíproco a 100 cic/min.

#### 2.1.2- Desenvolvimento das culturas

Juntou-se 50mL do inóculo descrito em 2.1.1 a erlenmeyers de 1000mL, contendo 500mL de meio de cultura descrito por Roseiro *et al.* (1992) (ver anexo

B). O pH do meio de cultura, aproximadamente 3,2, foi elevado a 6 com NaOH 2M. As fermentações foram efectuadas a 28°C (Esgalhado *et al.*, 1995), durante 72 horas, num agitador recíproco, a 100 cic/min.

Às fermentações em que foi adicionado ácido acético a meio da fase exponencial, após 22-24 horas de fermentação, juntou-se ácido acético 0,15mM na forma não ionizada (HA).

## **2.2- Fermentações em vaso de fermentação**

### **2.2.1- Preparação dos inóculos**

Num frasco Erlenmeyer de 2L, juntaram-se células de duas rampas YMA a 200mL de meio YM. As culturas foram incubadas a 30°C, durante 24 horas, num agitador recíproco a 100 cic/min.

### **2.2.2- Desenvolvimento das culturas**

Adicionaram-se, assepticamente, 130mL do inóculo descrito em 2.2.1 a um vaso fermentador de 2000mL (ver 2.2.3), contendo 1300mL de meio de cultura definido. O fermentador e o meio foram esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C e à pressão de 1 bar, durante 45 minutos. O meio de cultura foi ajustado a pH 6 com NaOH 2M. As fermentações foram efectuadas a 28°C,

durante 72 horas com arejamento de 1 vvm (volume de ar/volume de meio x minuto) e uma agitação inicial de 300 rpm (rotações/minuto). A agitação foi progressivamente aumentada no decorrer da fermentação de modo a que o oxigénio dissolvido não fosse inferior a 40 %.

Nas fermentações em que foi adicionado ácido acético a meio da fase exponencial, ao fim de 22-24 horas de fermentação, juntou-se ácido acético 0,15mM na forma não ionizada.

### **2.2.3- Vaso de fermentação**

O fermentador utilizado neste trabalho foi um fermentador LH, série 210 (California, USA) (Figura 2).

O vaso de vidro tinha uma capacidade de 2 litros e uma tampa em aço inoxidável com 15 portas de acesso (figura 3).

O sistema de agitação foi efectuado por um motor (Figura 2 E) com ligação a duas turbinas de seis pás, tipo Rushton (Figura 2 B).

O arejamento efectuou-se com o auxílio de um compressor, cuja saída, ligada a um rotâmetro, permitiu controlar o volume de ar introduzido. A entrada de ar no vaso de vidro efectuou-se por um difusor em anel (Figura 2 A).



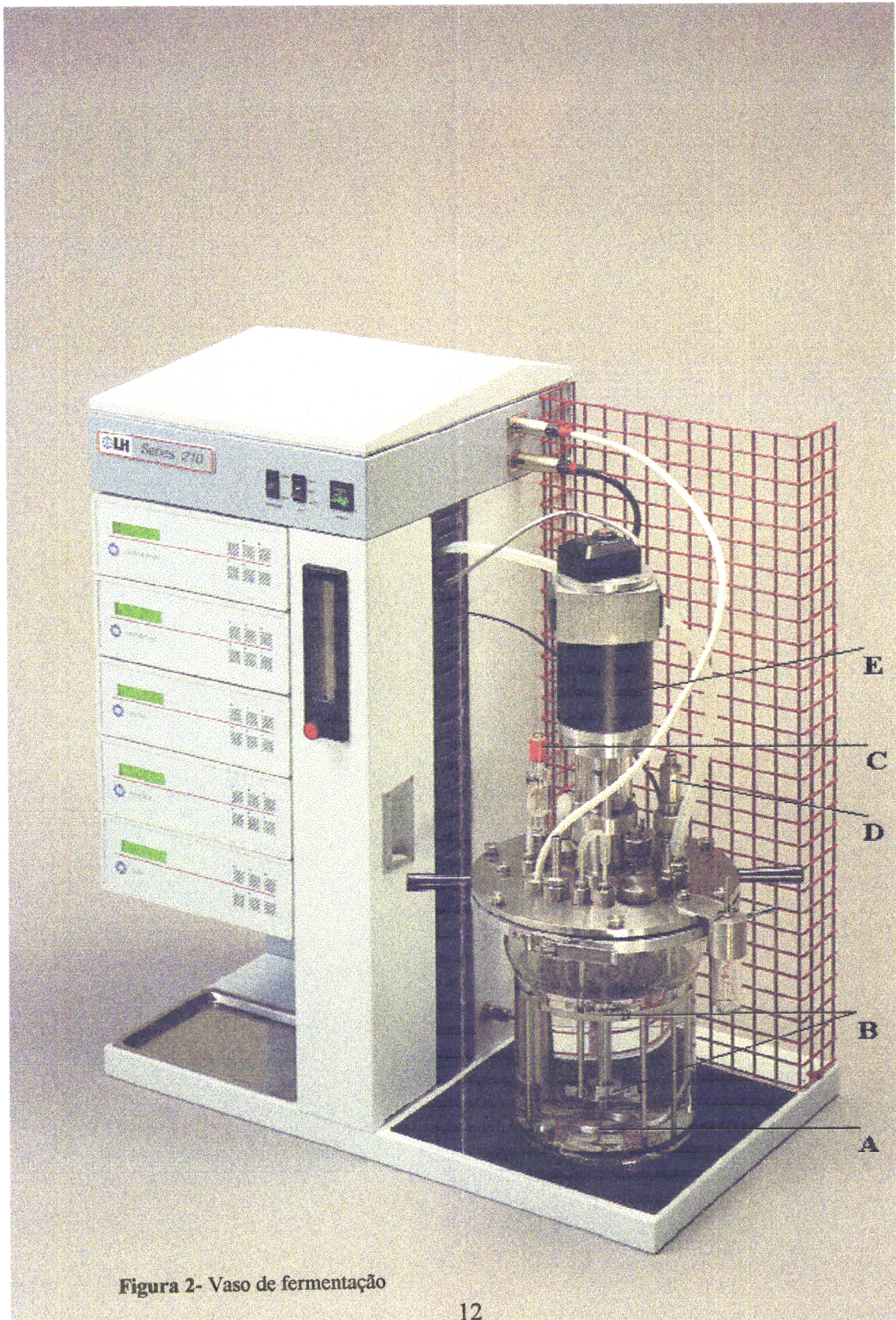
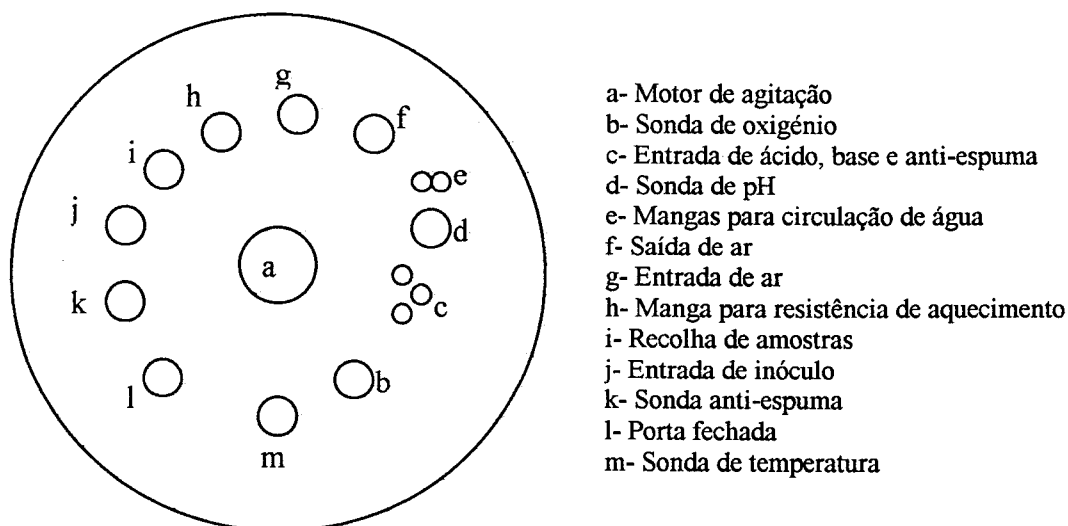


Figura 2- Vaso de fermentação





**Figura 3-** Esquema da tampa do vaso fermentador, com respectivas portas de acesso.

O pH da cultura mediu-se com um eléctrodo de vidro combinado (INGOLD, Urdorf, Suíça) (Figura 2 C), esterilizado com o vaso fermentador nas condições descritas, e controlou-se pela adição de NaOH 2M ou HCl 2M. Devido a uma avaria no módulo de controle de pH do fermentador, aquela unidade foi substituída por um computador ligado com uma interface a duas bombas peristálticas e a um potenciómetro (CRISON, micro pH 2002) (ver anexo D).

A temperatura mediu-se com uma sonda de platina e controlou-se automaticamente com um sistema de circulação de água e uma resistência.

A medição do oxigénio dissolvido realizou-se, continuamente, com uma sonda (INGOLD, Urdorf, Suíça) também esterilizada juntamente com o vaso fermentador (Figura 2 D).

O controle da espuma efectuou-se pela adição manual de polipropilenoglicol 2025, 2% (v/v) em água, no início da fermentação.

### **3- Métodos analíticos**

#### **3.1- Determinação da concentração celular**

Para cada amostra retiraram-se, em duplicado, 5mL de cultura e diluíram-se 1/10 com água destilada. A mistura centrifugou-se numa centrífuga refrigerada (Hermle Z 382 K, Gosheim, Alemanha) a 18000g durante 35 minutos (Roseiro *et al.*, 1993). O sobrenadante foi utilizado para a determinação da glucose. Repetiu-se o procedimento e o resíduo resultante foi depois ressuspendido em 5mL de água destilada e colocado numa estufa a 80°C, em recipientes previamente tarados, até peso constante.

### 3.2- Determinação da concentração de Polissacárido

A concentração de polissacárido foi determinada por precipitação do polímero existente em 5mL de meio de cultura, com dois volumes de etanol (98% v/v), seguido de separação por intermédio de uma tela de rede calibrada, com 250  $\mu$ m de malha (Hydro-Bios). O polissacárido, juntamente com a rede calibrada, foram levados a peso constante, numa estufa a 80°C.

### 3.3- Quantificação da Glucose

A concentração da glucose residual determinou-se por intermédio de um kit enzimático SIGMA, no sobrenadante de 5mL de cultura, diluída 1/10 com água destilada e centrifugada durante 35 minutos a 18000 g.

O doseamento efectuou-se com os reagentes do kit de glucose (Sigma Biochemicals, Kit 315). A absorvância das amostras determinou-se espectrofotometricamente a 505 nm (em cuvettes de vidro com 1cm de percurso óptico), num espectrofotómetro de ultra violeta-visível de feixe duplo (Hitachi, modelo U-2000, Tóquio, Japão), equipado com um módulo de regulação de temperatura. Antes das medições as amostras foram incubadas durante 10 minutos à temperatura de 37°C.

## 4- Actividade Enzimática da ATPase

### 4.1- Preparação das amostras

Retiraram-se amostras do fermentador, ou dos frascos agitados, antes da adição do ácido acético (depois de decorridas 22-24 horas de fermentação), passados quinze, trinta, sessenta e cento e oitenta minutos.

Diluíram-se 16mL do meio de cultura, 1/10 com água destilada, e centrifugaram-se a 18000g e 4°C durante 35 minutos. O precipitado ressuspendeu-se em 2mL de tampão sacarose 0,25M, EDTA 1mM e Tris-HCl 5mM pH 7,4 (Johnson *et al.*, 1967 & Cain *et al.*, 1987).

### 4.2- Preparação da fracção de ATPase

Desintegraram-se 2mL de amostra preparada em 4.1, com 1,5mL de contas de vidro (Sigma, 0,5mm de diâmetro), num vortex durante 1 minuto, intercalando com 1 minuto em gelo e repetindo este procedimento durante oito vezes (Rosa, M. F. *et al.*, 1991).

Os homogenatos centrifugaram-se durante 5 minutos a 9000g. No sobrenadante determinou-se a concentração de proteína total e a actividade enzimática da ATPase.

#### 4.3- Determinação da Concentração Total de Proteína

No sobrenadante das amostras preparadas em 4.2 determinou-se a concentração de proteínas pelo método de Folin-Lowry, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão (Lowry *et al.*, 1951). As amostras foram medidas em cuvettes de vidro, com 1cm de percurso óptico, a 720nm, num espectrofotómetro de ultra violeta-visível com feixe duplo (Hitachi, modelo U-2001, Tóquio, Japão).

#### 4.4- Determinação da Actividade Enzimática da ATPase

A actividade enzimática da ATPase foi determinada incubando a membrana plasmática (sobrenadante preparado em 4.2) (com 2,50 a 10,82µg de proteína) a 30°C, durante 10 minutos em meio contendo 0,125M de sacarose, 2mM de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 60mM de Tris-HCl pH 7,4 (Cain *et al.*, 1987), 50mM de KCl e 0,2mM de molibdato de amónio (Goffeau *et al.*, 1981).

Após essa primeira incubação adicionou-se ATP 0,1M (Cain *et al.*, 1987) e efectuou-se uma segunda incubação durante 5 minutos. A reacção foi terminada com a adição de 500µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) a 500µL da mistura reaccional.

Centrifugou-se a mistura durante 5 minutos para precipitação da proteína e determinou-se a concentração de fósforo inorgânico (Pi) no sobrenadante.

A actividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{g}$  de Pi libertado/(mg proteína x minuto).

#### **4.5- Determinação da concentração de fósforo inorgânico**

A concentração de Pi libertado em 4.4 foi determinada colorimetricamente com reagente sulfato ferroso-molibdato de amónio, utilizando  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  como padrão. As absorvâncias das amostras foram lidas em cuvettes de vidro de 1,3mL, a 762nm, num espectrofotómetro de ultravioleta-visível com feixe duplo (Hitachi, modelo U-2000, Tóquio, Japão).

### **5- Concentração de ATP**

#### **5.1- Preparação das amostras**

Retiraram-se amostras do fermentador ou dos frascos agitados antes da adição do ácido acético, ao fim de quinze minutos, passados trinta, sessenta e

cento e oitenta minutos. Centrifugou-se 1 mL de cada uma das amostras a 5000g durante 6 minutos, juntamente com 1mL de TCA 12% (p/v).

### **3.3- Determinação da concentração de ATP**

O doseamento do ATP foi efectuado com o kit enzimático Sigma (Sigma Biochemicals, Kit 366). As absorvâncias das amostras foram medidas, em cuvettes de quartzo de 1cm de percurso óptico, a 340nm num espectrofotómetro de ultravioleta-visível de feixe duplo (Hitachi, modelo U-2001, Tóquio, Japão).

## **6- Software utilizado**

Na validação de resultados por análise de variância utilizou-se o programa *Microsoft Excel para Windows 95, versão 7.0, Copyright© 1985-95, Microsoft Corporation.*

**III- Culturas Descontínuas de *Xanthomonas campestris* em Presença de  
Ácido Acético**



## 1- Introdução

A inibição do crescimento microbiano através da adição de ácidos fracos é utilizada desde há muito tempo na conservação de alimentos. A presença de ácidos orgânicos tem sido descrita por vários autores como introduzindo alterações metabólicas nos microrganismos, podendo conduzir à sua morte. No entanto, concentrações sub-letais destes ácidos ou de outros agentes lipofílicos podem estimular a formação de produtos microbianos (Souw, 1979, Rosa *et al.*, 1990, Viegas *et al.*, 1991, Roseiro *et al.*, 1991a, Esgalhado, 1993, Pires, 1996, Roseiro *et al.*, 1996, entre outros).

O ácido acético constitui um agente anti-microbiano largamente utilizado na indústria alimentar (Warth, 1977). A sua toxicidade tem sido relacionada com a forma não ionizada (a ionização do ácido depende do pH do meio (pKa 4,76 a 20°C), uma vez que os ácidos fracos na forma não ionizada entram livremente nas células, são solúveis na membrana fosfolipídica, e ionizam-se no citoplasma (devido ao facto de o valor do pH ser mais elevado), causando uma diminuição no pH interno (Booth, 1985 & Pampulha *et al.*, 1989) que pode conduzir à morte do microorganismo.

## 2-Resultados

### 2.1- Perfis das fermentações

Efectuaram-se cinco fermentações na ausência de ácido acético e outras cinco na presença de 0,15mM deste ácido, na forma não ionizada. As fermentações foram realizadas nas condições descritas em 2.2 (Materiais e Métodos). Utilizou-se a concentração de ácido acético na forma não ionizada acima referida uma vez que aquele valor constitui uma concentração de ácido não letal para *Xanthomonas campestris* (Esgalhado, 1993 & Pires, 1996), em que a duração da fase de latência no crescimento do microrganismo não é significativamente aumentada (Esgalhado, 1993 & Esgalhado *et al.*, 1996) e, a esta concentração, a taxa volumétrica de produção de xantano parece ser máxima (Pires, 1996).

A partir dos dados de cada fermentação calculou-se a taxa específica de crescimento,  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ), a taxa volumétrica de formação de xantano,  $q_{\text{xan}}$  ( $\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), a taxa volumétrica de consumo de glucose,  $q_{\text{glu}}$  ( $\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), o rendimento em xantano,  $Y_{P/S}$  (g/g), o rendimento em biomassa,  $Y_{X/S}$  (g/g) e o rendimento específico em xantano,  $Y_{P/X}$  (g/g).

A Tabela 1 mostra os resultados referentes às 10 fermentações. As culturas efectuadas na presença de ácido acético (F-J) apresentaram, em média, valores de taxa específica de crescimento de  $0,026 \text{ h}^{-1}$  (com um desvio padrão,  $\sigma$ , de

0,0025h<sup>-1</sup>), variando entre 0,023 e 0,039h<sup>-1</sup>. A concentração máxima de biomassa foi, em média, de 3,991g/L. O valor mais elevado ocorreu na fermentação F, 4,209g/L, e o valor mais baixo teve lugar na fermentação H, 3,387g/L.

Estas fermentações apresentaram, em média, uma concentração máxima de xantano de 11,77g/L (com  $\sigma$  de 0,90g/L). A concentração mais elevada de xantano, 12,52g/L, ocorreu na fermentação F e a mais baixa, 10,78g/L, na fermentação H. A taxa volumétrica média de formação de xantano foi 0,219gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (com  $\sigma$  de 0,035 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), tendo variado entre 0,192gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 0,274gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Os perfis destas fermentações apresentam fases de latência entre 3 a 6 horas e fases exponenciais de cerca de 45 horas (anexo D, fermentações F-J).

O crescimento microbiano correspondeu a um consumo de 79,5% de glucose deixando um resíduo de 20,5%. A taxa volumétrica de consumo de glucose foi 0,492 gdm<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> (com  $\sigma$  de 0,215 gdm<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup>). O rendimento de produção de xantano foi 0,503g/gglucose (com  $\sigma$  de 0,031g/gglucose) e variou entre 0,452g/gglucose e 0,529g/gglucose. O rendimento de produção de biomassa foi 0,171g/gglucose (com  $\sigma$  de 0,008g/gglucose) e variou entre 0,156 g/gglucose e 0,176g/gglucose. O rendimento específico de formação de xantano foi 2,955g/gcélulas (com  $\sigma$  de 0,192g/gcélulas) e variou entre 2,650 e 3,183g/gcélulas.

Tabela 1- Parâmetros cinéticos das fermentações (A-J) na ausência e na presença de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada.

Fermentações	$\mu$	$q_{xan}$	$q_{glu}$	glucons.	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
Sem ácido							
A	0,026	0,143	0,444	23,61	0,427	0,170	2,508
B	0,036	0,159	0,332	16,85	0,488	0,220	2,222
C	0,036	0,137	0,368	18,82	0,427	0,209	2,043
D	0,025	0,141	0,528	18,61	0,412	0,226	1,819
E	0,045	0,159	0,958	26,29	0,386	0,164	2,363
Com ácido acético 0,15mM na forma não ionizada							
F	0,028	0,202	0,597	23,98	0,522	0,176	2,974
G	0,039	0,194	0,181	23,90	0,452	0,171	2,650
H	0,023	0,274	0,539	21,70	0,497	0,156	3,183
I	0,026	0,192	0,393	23,76	0,517	0,174	2,965
J	0,024	0,235	0,749	23,50	0,529	0,176	2,463

$\mu$  ( $h^{-1}$ )- Taxa específica de crescimento.  $q_{xan}$  ( $g L^{-1} h^{-1}$ )- Taxa volumétrica de formação de xantano.  $q_{glu}$  ( $g L^{-1} h^{-1}$ )- Taxa volumétrica de consumo de glucose ( $g dm^{-3} h^{-1}$ ). glucons. ( $g/L$ )- Glucose consumida.  $Y_{P/S}$  ( $g/g$ glucose)- Rendimento em xantano.  $Y_{X/S}$  ( $g/g$ glucose)- Rendimento em biomassa.  $Y_{P/X}$  ( $g/g$ glúculas)- Rendimento específico em xantano.

Na Figura 4 pode observar-se o perfil de uma das fermentações em que se adicionou 0,15mM de ácido acético ao fim de 23,25h.

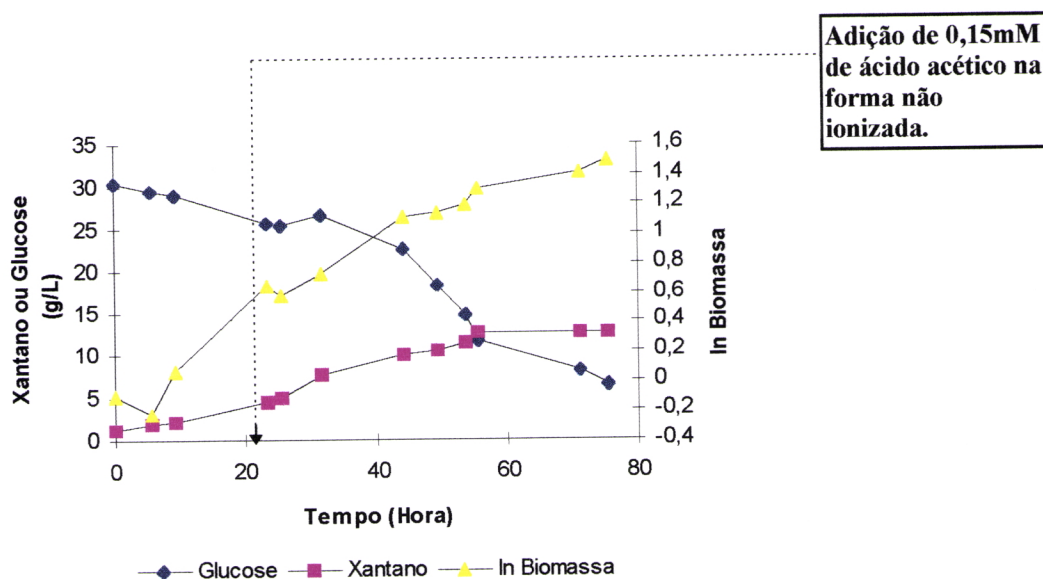


Figura 4 - Perfil da fermentação F.

A fermentação decorreu durante 75,5 horas. Durante as primeiras 5,5 horas não houve aumento da concentração celular (fase de latência) e a formação de xantano foi muito reduzida. Verificou-se depois uma fase de crescimento exponencial da biomassa, durante cerca de 45 horas. A concentração de biomassa aumentou de 0,900 para 4,209g/L. Na fase de maior crescimento são visíveis duas zonas: a primeira, antes da adição do ácido, com uma taxa específica de crescimento de  $0,047h^{-1}$  e a segunda, depois da adição do ácido, com uma taxa específica de crescimento inferior:  $0,028h^{-1}$ . A concentração máxima de xantano

foi 12,52g/L, com uma taxa de produção de  $0,202\text{gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$ , um rendimento de 0,522g/g glucose e um rendimento específico de formação de xantano de 2,974g/g células. Foram consumidas durante a fermentação 23,98g/L de glucose, 78,93% da glucose inicial, com uma taxa volumétrica de consumo de  $0,597\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . No final da fermentação a glucose residual foi 21,07%.

As fermentações efectuadas na ausência de ácido acético (A-E) apresentaram um valor médio de taxa específica de crescimento de  $0,034\text{h}^{-1}$  (com  $\sigma$  de  $0,008\text{h}^{-1}$ ), com variações entre  $0,025\text{h}^{-1}$  e  $0,045\text{h}^{-1}$ . A concentração máxima de biomassa foi, em média,  $4,032\text{gL}^{-1}$ , tendo ocorrido o valor mais elevado na fermentação E,  $4,300\text{gL}^{-1}$ , e o mais baixo na fermentação B,  $3,701\text{gL}^{-1}$ . O rendimento em biomassa foi  $0,198\text{g/gglucose}$  (com  $\sigma$  de  $0,0288\text{g/gglucose}$ ), variando entre  $0,164\text{g/gglucose}$  e  $0,226\text{g/gglucose}$ . A concentração máxima de xantano foi, em média,  $8,83\text{gL}^{-1}$  e a sua taxa volumétrica de formação  $0,149\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  (com  $\sigma$  de  $0,010\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), com valores que oscilaram entre  $0,137\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e  $0,159\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . O rendimento em xantano variou entre  $0,386\text{g/gglucose}$  e  $0,488\text{g/gglucose}$ , apresentando o valor médio de  $0,428\text{g/gglucose}$  (com  $\sigma$  de  $0,037\text{g/gglucose}$ ). A taxa específica de formação de xantano foi, em média,  $2,191\text{g/gcélulas}$  (com  $\sigma$  de  $0,270\text{g/gcélulas}$ ), com variações entre  $1,189\text{g/gcélulas}$  e  $2,508\text{g/gcélulas}$ . Os perfis destas fermentações apresentaram fases de latência entre 3-7 horas e fases exponenciais de cerca de 40 horas. O crescimento microbiano correspondeu a um consumo de 74,71% de

72 horas de fermentação, um resíduo de 25,3%. A taxa volumétrica de utilização da glucose apresentou o valor médio de  $0,526 \text{ gdm}^{-3}\text{h}^{-1}$  (com  $\sigma$  de  $0,253 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

Na Figura 5 (referente à fermentação A) pode observar-se o perfil de uma das fermentações realizadas na ausência do ácido.

A fermentação decorreu durante 72 horas. Durante as primeiras 4 horas não houve aumento da concentração celular e a formação de xantano foi muito reduzida. Ao longo de aproximadamente 40 horas, verificou-se um crescimento exponencial da biomassa, seguido de uma fase de crescimento mais reduzido. Nesta fermentação, a concentração celular variou entre 0,900 e 4,019g/L, com uma taxa específica de crescimento de  $0,030\text{h}^{-1}$  e com um rendimento de produção de biomassa de 0,170g/g glucose. A concentração máxima de xantano foi 10,08g/L, com uma taxa de produção de  $0,144 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , com um rendimento de 0,427g/g glucose e um rendimento específico de formação de xantano de 2,508g/gcélulas. Durante a fermentação foram consumidos 23,6g/L de glucose, 79,7% da glucose inicial, ficando no final da fermentação um resíduo de 20,3%. A taxa volumétrica de consumo,  $q_{\text{glu}}$ , foi  $0,444 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

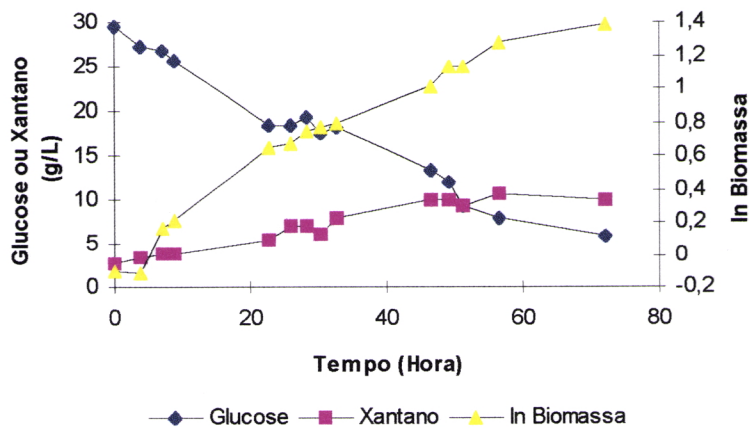
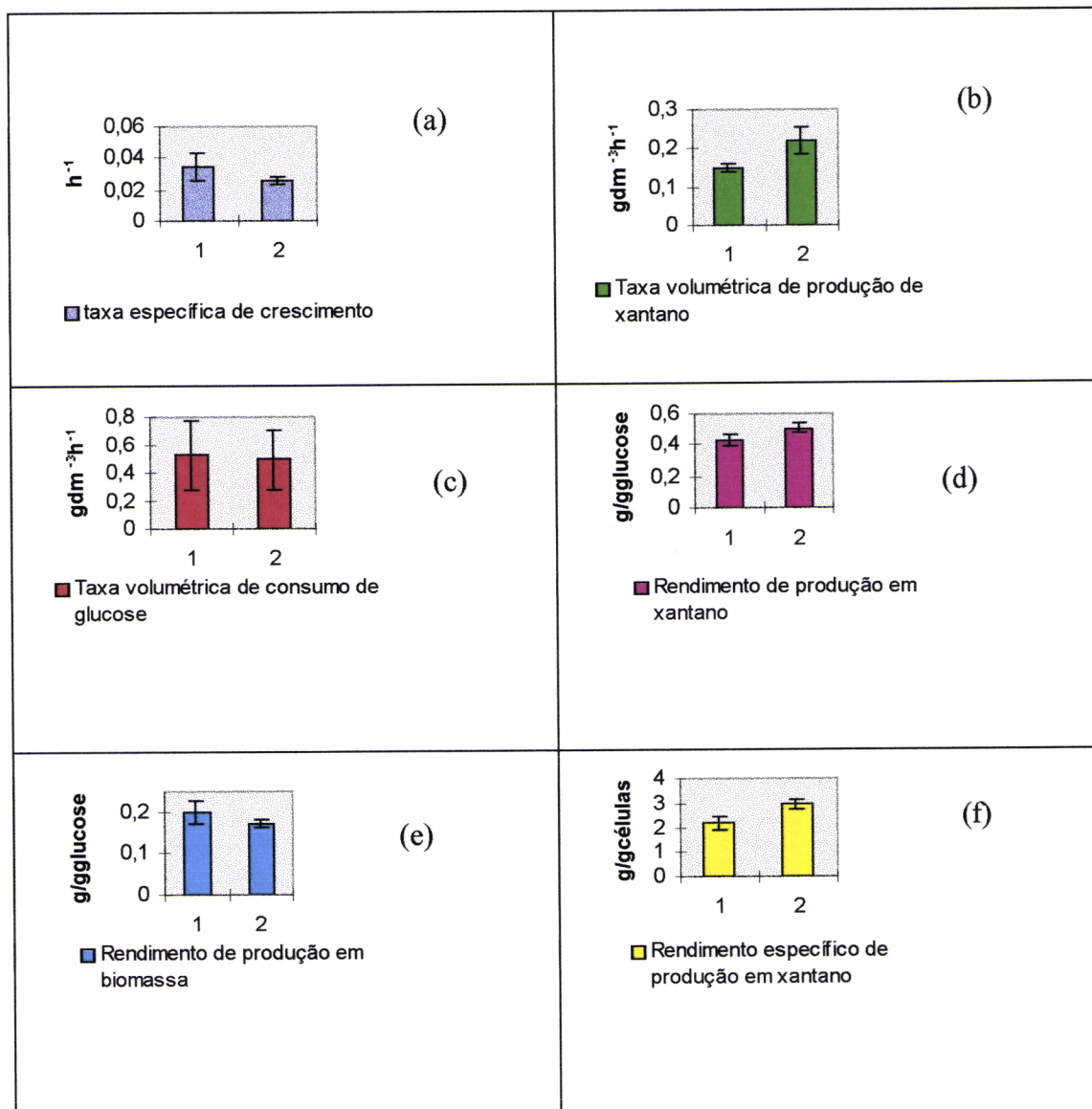


Figura 5 - Perfil da fermentação A.

A Figura 6 resume as variações encontradas nos parâmetros cinéticos, para as fermentações realizadas na ausência do ácido acético e para as fermentações realizadas na presença de 0,15mM de ácido acético na sua forma não ionizada.





**Figura 6** - Médias dos parâmetros cinéticos da Tabela 1 na ausência de ácido (1) e na presença de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada (2). (a)- Taxa específica de crescimento. (b)- Taxa volumétrica de produção de xantano. (c)- Taxa volumétrica de consumo de glucose. (d)- Rendimento de produção em xantano. (e)- Rendimento de produção em biomassa. (f)- Rendimento específico de produção em xantano.

As maiores taxas específicas de crescimento ocorreram nas fermentações efectuadas na ausência de ácido (Figura 6a), tendo sido observada uma diminuição de 23,5% na taxa específica de crescimento das fermentações em que este foi adicionado.

A taxa volumétrica de produção de xantano foi mais elevada, em média, nas fermentações realizadas na presença do ácido (Figura 6b). Esta taxa sofreu um aumento de 47,0% em relação à taxa volumétrica de produção de xantano nas fermentações realizadas sem o ácido. A taxa volumétrica de consumo de glucose (Figura 6c) e o  $Y_{XS}$  (Figura 6e) não sofreram, praticamente, alterações relativamente às fermentações efectuadas na ausência e na presença de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada: a primeira diminuiu 6,5% e a segunda diminuiu 13,8% com a presença do ácido. Embora a taxa volumétrica de consumo de glucose tenha diminuído ligeiramente nas fermentações realizadas com o ácido acético, verificou-se que houve, em média, um maior consumo de glucose, mais 4,8% do que nas fermentações realizadas sem o ácido, o que está de acordo com as maiores concentrações finais de xantano obtidas nestas fermentações.

Os  $Y_{P/S}$  (Figura 6d) e  $Y_{P/X}$  (Figura 6f) foram mais elevados nas fermentações efectuadas com a presença do ácido do que nas fermentações efectuadas na sua ausência: verificou-se um aumento de 17,5% e 34,9%, respectivamente, nas fermentações efectuadas com o ácido acético.

Nas fermentações em que o ácido acético foi adicionado observaram-se fases exponenciais de crescimento durante períodos de tempo ligeiramente

superiores aos verificados nas fermentações efectuadas sem o ácido. Estas diferenças podem estar relacionadas com a existência, nas primeiras fermentações, de uma fase de adaptação ao ácido, durante algumas horas, mobilização de ATPases, o que irá depois prolongar a fase de maior crescimento. Uma vez restabelecida essa adaptação fisiológica, o crescimento continua com taxas de crescimento mais baixas.

Nas fermentações efectuadas na presença de ácido acético observaram-se, como já foi referido, taxas específicas de crescimento diferentes antes e depois da adição do ácido. Na Tabela 2 podem observar-se as taxas específicas de crescimento para as fermentações realizadas na presença do ácido, calculadas antes ( $\mu_0$ ) e depois da adição do ácido ( $\mu_{Ac}$ ).

As taxas específicas de crescimento calculadas antes da adição do ácido acético, até às primeiras 22-24 horas de fermentação, foram superiores às taxas específicas de crescimento calculadas depois da adição de 0,15mM de ácido acético na sua forma não ionizada, respectivamente:  $0,047h^{-1}$  e  $0,027h^{-1}$ .

Ocorreu, em média, uma diminuição de 42,6% na taxa específica de crescimento com a introdução de 0,15mM de ácido. Esta diminuição foi superior à diminuição encontrada quando se compararam as taxas específicas de crescimento globais (calculadas durante as cerca de 40 horas de crescimento exponencial) das fermentações realizadas com e sem o ácido. Estas diferenças

Tabela 2- Taxas específicas de crescimento antes e depois da adição de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada.

Fermentações	$\mu_0$	$\mu_{Ac}$
F	0,047	0,028
G	0,046	0,038
H	0,071	0,022
I	0,044	0,014
J	0,026	0,034

sugerem que, nas próprias fermentações em que o ácido não é adicionado, haja também diminuição da taxa específica de crescimento no momento em que os teores de xantano começam a ser mais elevados. Behrens *et al.* (1985) verificaram que culturas de *Xanthomonas campestris*, desenvolvendo-se em fontes de carbono que não possam ser usadas na síntese de xantano, crescem exponencialmente até ao esgotamento da fonte de azoto. No entanto, se o carboidrato puder ser usado como precursor do xantano, o crescimento logarítmico é interrompido por uma fase transiente com crescimento mais reduzido. Durante essa fase ocorrem modificações nos componentes celulares, nomeadamente no RNA, e há actividades enzimáticas mais baixas para a

replicação celular. É após esta fase que se observa uma maior acumulação de xantano.

## 2.2- Validação de resultados por análise de variância

Para cada um dos parâmetros cinéticos referidos no ponto 2 foi efectuada uma análise de variância a um factor (ANOVA). Compararam-se os parâmetros das fermentações realizadas na ausência de ácido acético com os parâmetros das fermentações realizadas com a introdução, a meio da fase exponencial de crescimento, de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada. Realizou-se também a análise comparativa das taxas específicas de crescimento calculadas até às 22-24 horas de crescimento, antes e depois da adição do ácido acético, para as fermentações F-J.

As hipóteses testadas foram:

Hipótese nula (H<sub>0</sub>)- a variação encontrada deve-se ao erro experimental e à variabilidade biológica.

Hipótese alternativa (H<sub>a</sub>)- A variação encontrada deve-se à presença do ácido.

Consideraram-se os seguintes níveis de significância:

$p^1 > 0,05$ - não significativo- NS

$0,01 < p \leq 0,05$ - pouco significativo- \*

$0,001 < p \leq 0,01$ - significativo- \*\*

$p \leq 0,001$ - muito significativo- \*\*\*

---

<sup>1</sup> p- nível de significância do teste.

Tabela 3 - Análise de variância dos parâmetros cinéticos calculados para as fermentações realizadas na ausência do ácido (fermentações A-E) e na presença de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada, adicionado às 22-24 horas de crescimento (fermentações F-J).

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	Valor-p	F crit
<b>Taxa específica de crescimento</b>						
Entre Grupos	0,000144	1	0,000144	3,860963	0,085007	5,317645
Dentro dos Grupos	0,000299	8	3,74E-05			
Total	0,000444	9				
<b>Taxa específica de crescimento (a)</b>						
Entre Grupos	0,00104	1	0,00104	5,962178	0,040453	5,317645
Dentro dos Grupos	0,001396	8	0,000175			
Total	0,002436	9				
<b>Taxa volumétrica de formação de xantano</b>						
Entre Grupos	0,012816	1	0,012816	19,12896	0,002369	5,317645
Dentro dos Grupos	0,00536	8	0,00067			
Total	0,018176	9				
<b>Taxa volumétrica de consumo de glicose</b>						
Entre Grupos	0,002924	1	0,002924	0,052954	0,823776	5,317645
Dentro dos Grupos	0,441757	8	0,05522			
Total	0,444681	9				
<b>Rendimento em xantano</b>						
Entre Grupos	0,014246	1	0,014246	12,02293	0,008475	5,317645
Dentro dos Grupos	0,00948	8	0,001185			
Total	0,023726	9				

(Continua)

(Continuação da Tabela 3)

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor p</i>	<i>F crit</i>
<b>Rendimento em biomassa</b>						
Entre Grupos	0,00185	1	0,00185	4,096567	0,077576	5,317645
Dentro dos Grupos	0,003612	8	0,000452			
Total	0,005462	9				
<b>Rendimento específico em xantano</b>						
Entre Grupos	1,460004	1	1,460004	26,59432	0,000867	5,317645
Dentro dos Grupos	0,439193	8	0,054899			
Total	1,899197	9				

SQ- soma dos quadrados. gl- graus de liberdade. MQ- média dos quadrados. F- parâmetro da distribuição F de Fisher. Valor-p- nível de significância do teste. F crit- F crítico.

(a)- Apenas para as fermentações em que foi adicionado o ácido acético. Comparam-se as taxas específicas de crescimento calculadas antes e depois da adição do ácido.

### 2.2.1- Taxa Específica de Crescimento

Compararam-se as taxas específicas de crescimento para as fermentações realizadas na ausência e na presença de ácido. A diminuição encontrada (Figura 6a) não foi significativa ( $p=0,085007$ .NS). Foi também efectuada uma ANOVA relativamente às taxas específicas de crescimento calculadas antes e depois da



adição do ácido acético, nas fermentações em que este foi adicionado (Tabela 3(a)). Verificou--se que, para estas fermentações, houve uma diminuição da taxa específica de crescimento depois da adição do ácido, sendo esse decréscimo pouco significativo ( $p=0,040453^*$ ).

### **2.2.2- Taxa Volumétrica de formação de xantano**

Compararam-se as taxas volumétricas de formação de xantano para as fermentações realizadas na ausência e na presença do ácido acético. O aumento da taxa volumétrica de formação de xantano na presença do ácido (Figura 6b) foi significativo ( $p=0,002369^{**}$ ).

### **2.2.3- Taxa volumétrica de consumo de glucose**

As taxas volumétricas de consumo de glucose calculadas para as fermentações realizadas na ausência e na presença de ácido acético 0,15mM na forma não ionizada (Figura 6c ), não apresentaram diferenças significativas ( $p=0,823776.NS$ ).

#### **2.2.4- Rendimento em xantano**

O aumento do rendimento de produção em xantano na presença do ácido (Figura 6d ) foi significativo ( $p=0,008^{**}$ ).

#### **2.2.5- Rendimento em biomassa**

Compararam-se os rendimentos de produção em biomassa para as fermentações realizadas na ausência e na presença do ácido acético. As diferenças encontradas (Figura 6e) foram não significativas ( $p=0,0776,NS$ ).

#### **2.2.6- Rendimento específico em xantano**

Compararam-se os rendimentos específicos de produção em xantano para as fermentações realizadas na ausência e na presença do ácido acético. O aumento do rendimento específico em xantano nas fermentações efectuadas na presença do ácido (Figura 6f) foi muito significativo ( $p=0,0009^{***}$ ).

### 3- Discussão

Os conservantes alimentares, usados como inibidores de proliferação microbiana, entre os quais se encontra o ácido acético, exercem efeitos específicos no metabolismo dos microrganismos. Contudo, a inibição do crescimento é, em parte, causada pelo seu efeito no pH interno (Booth, 1985). Estudos sobre o mecanismo da acção anti-fúngica do ácido benzóico sugerem que a sua acção tóxica seja causada pela dissociação desse ácido no citoplasma. A forma não ionizada pode entrar nas células por difusão passiva e, como o pH interno é superior ao pKa, o ácido dissocia-se no citoplasma (Krebs *et al.*, 1983). No entanto, o fluxo de prótons para o exterior da célula também deve ser um factor a ter em consideração no efeito tóxico deste ácido (Warth, 1977 e Warth, 1989).

Young *et al.* (1993) estudaram o efeito dos ácidos acético, láctico e cítrico no pH intracelular de *Listeria monocytogenes* Scott A. Verificaram que o pH interno depende, para a mesma concentração total de ácido, do ácido utilizado. Observaram também que as taxas de crescimento deste microrganismo são influenciadas pelo pH interno. Pampulha *et al.* (1989) verificaram que, em *Saccharomyces cerevisiae*, o pH interno não depende da concentração total de ácido acético no exterior das células, mas sim da concentração da sua forma não ionizada, existindo uma forte correlação entre a inibição da fermentação e a diminuição do pH interno. Também em *Saccharomyces cerevisiae* os ácidos

octanóico (Viegas *et al.*, 1989 e Viegas *et al.*, 1995) e decanóico (Viegas *et al.*, 1989) causaram diminuição da taxa específica de crescimento e do rendimento em biomassa, evidenciando a toxicidade da forma não ionizada destes ácidos, e promoveram um aumento no rendimento em etanol.

Em *Leuconostoc oenos*, os ácidos decanóico e dodecanóico actuaram como factores de crescimento (Capucho *et al.*, 1994). Concentrações baixas de outros ácidos fracos foram também referidas por Warth (Warth, 1977 e Warth, 1988) como factores de crescimento. Este autor, através da introdução no meio de cultura de ácidos fracos (usados como conservantes), aponta a estimulação da fermentação e a redução do crescimento de *Saccharomyces bailli*, como consequência da energia necessária para o mecanismo de eliminação desses ácidos (Warth, 1977).

Concentrações sub-letais dos ácidos acético, pentanóico, octanóico e isobutírico foram descritos por Esgalhado (1993) como inibidores do crescimento celular e estimuladores da produção de xantano. A inibição do crescimento, por esses ácidos, aumentou com o comprimento da cadeia carbonada apolar. A estimulação da produção de xantano após a adição de ácidos orgânicos, em culturas de *Xanthomonas campestris* foi também observada por outros autores (Souw, 1979; Roseiro, 1991; Pires, 1996 e Roseiro, 1996).

Com este trabalho pretende-se confirmar se a estimulação na produção de xantano está associada com um mecanismo de protecção do microrganismo contra a toxicidade ácida. Com efeito, a adição de 0,15mM de ácido acético na

forma não ionizada estimulou a produção de xantano em todas as culturas de *Xanthomonas campestris*. Esta estimulação manifestou-se através do aumento da taxa volumétrica de produção de xantano, do rendimento em xantano e do rendimento específico em xantano, em relação às fermentações efectuadas na ausência do ácido. Observou-se também uma aparente diminuição no crescimento de *Xanthomonas campestris*, verificando-se uma diminuição na taxa específica de crescimento (embora não significativa quando comparados os dois grupos de fermentações e pouco significativa dentro das fermentações efectuadas na presença do ácido).

A diminuição do crescimento e o aumento da produção de xantano parecem estar relacionados entre si. De facto, comparando as taxas específicas de crescimento com as taxas volumétricas de produção de xantano nas fermentações realizadas na presença de 0,15mM de ácido acético, observa-se que, de uma maneira geral, a níveis de desenvolvimento celular mais baixos ( $\mu$  mais baixos) correspondem produções em xantano mais elevadas (Tabela 1). Estas variações sugerem uma maior canalização do substrato da produção de células para a produção de xantano. Como já foi referido, consumiu-se mais glucose, em média, nas fermentações efectuadas na presença do ácido do que nas fermentações realizadas na sua ausência. Esse aumento do consumo de glucose ( $2,53\text{g L}^{-1}$ ), por si só, não nos parece ser suficiente para explicar o aumento da produção em xantano (em média, aumentou  $2,94\text{g L}^{-1}$ ) o que mais uma vez sugere a possibilidade de canalização do carbono do crescimento celular para a produção

de xantano. Em culturas de *Xanthomonas campestris*, na presença de concentrações sub-letais de ácido isobutírico, observou-se um desvio de 10% do fluxo de carbono da síntese de biomassa para a produção de xantano (Roseiro *et al.*, 1996). Estes autores sugeriram o aumento da via glicolítica (com formação de ATP a nível do substracto), como alternativa à produção de ATP, devido a um possível desacoplamento energético causado pela presença do ácido. Parece provável que a relação entre a diminuição do crescimento e o aumento da produção em xantano, observados no nosso caso, sejam também o resultado duma maior canalização da fonte de carbono da produção de células para a produção de xantano, como consequência da diminuição do pH interno, induzida pelo ácido.

A inibição do crescimento microbiano, causada por ácidos orgânicos, é geralmente atribuída a dois factores: diminuição do pH interno (que pode causar inibição de enzimas intracelulares) e dissipação da força potenciomotriz (que pode inibir os sistemas de transporte dependentes de  $\Delta\text{pH}$ ). Vários autores observaram em *Xanthomonas campestris*, sujeitas a condições de toxicidade ácida, atenuação de algumas actividades enzimáticas e estimulação de outras, em condições semelhantes às deste trabalho (Esgalhado, 1993; Roseiro *et al.*, 1996 e Pires, 1996). Parece também ter ocorrido uma diminuição da força potenciomotriz, evidenciada pela diminuição do teor em ATP, a que se faz referência no capítulo IV. O aumento da actividade enzimática da ATPase pode surgir como um mecanismo de restabelecimento do gradiente de protões, de modo a manter o pH citoplasmático em valores compatíveis com a vida de

*Xanthomonas campestris*. Este aumento de actividade enzimática consome ATP, que deste modo, deixará de estar disponível para o crescimento (Figura 7). Assim, a redução do crescimento parece, em parte, ser consequência das necessidades energéticas durante a eliminação do ácido (o que está de acordo com o aumento da actividade enzimática da ATPase, referida no capítulo IV) e o aumento da produção em xantano parece ocorrer na sequência de vias alternativas no metabolismo do microrganismo, induzidas pelo desacoplamento energético produzido pela toxicidade ácida.

**IV- Estimulação da Actividade Enzimática da ATPase em Presença de Ácido**

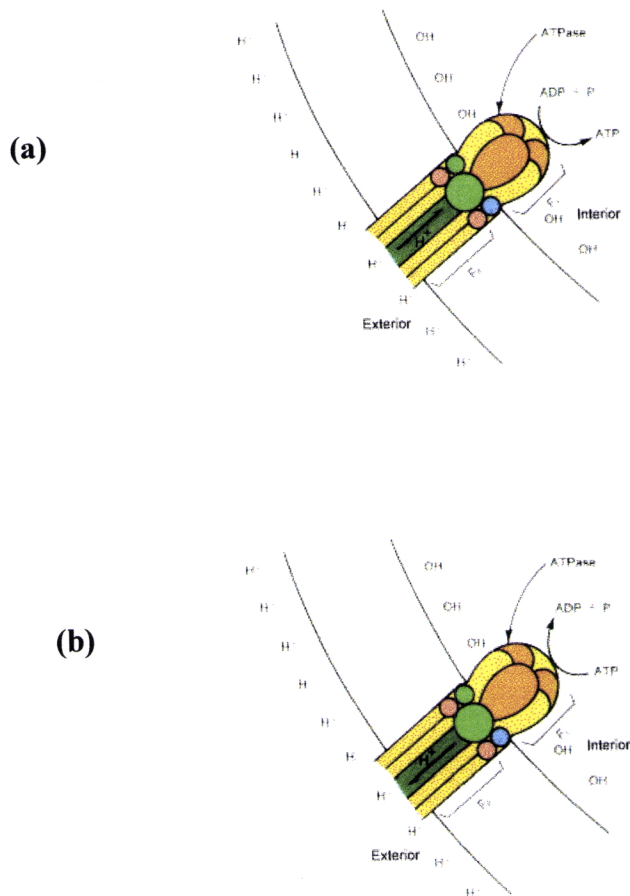
**Acético**



## 1- Introdução

O complexo enzimático ATP sintetase ou F-ATPase está presente nas membranas das bactérias, cloroplastos e mitocôndrias (Sabbert, D., 1996). A estrutura da ATPase é bipartida por duas subunidades principais:  $F_0$  e  $F_1$ .  $F_0$  é uma proteína transmembranária que contém um canal para a translocação de prótons.  $F_1$  é uma proteína periférica da membrana. A função da F-ATPase é acoplar a translocação de prótons através de  $F_0$  com a síntese de ATP em  $F_1$  (Figura 7a). Pode, no entanto, funcionar no sentido inverso, isto é, promover a saída de prótons da célula com hidrólise de ATP (Marquis, 1992) (Figura 7b).

O envolvimento da ATPase na expulsão de prótons para o exterior da célula, como mecanismo de proteção contra a toxicidade ácida, tem sido referido por vários autores (Bender *et al.*, 1987; Cole *et al.*, 1987; Dombek *et al.*, 1987; Eraso *et al.*, 1987; Rosa *et al.*, 1991; Viegas *et al.*, 1991; Elzainy *et al.*, 1995, entre outros). Este mecanismo funciona como forma de restabelecimento do pH interno, cuja regulação parece estar ligada à permeabilidade da membrana celular aos prótons (Booth, 1985).



**Figura 7** - Representação esquemática da F-ATPase existente nas membranas das bactérias. (a)- O gradiente protónico, gerado pelo transporte electrónico, pode ser usado para a síntese de ATP, a favor do gradiente electroquímico. (b)- A ATPase pode funcionar em sentido oposto, promovendo o transporte protónico contra o gradiente electroquímico, com consumo de ATP. (Adaptado de Brock, 1991).

Dombek & Ingram (1987) propuseram o envolvimento da ATPase como mecanismo de controle do pH interno em valores próximos da neutralidade. A tolerância aos ácidos para as bactérias *Actinomyces viscosus* e *Lactobacillus casei*

parece depender da quantidade de ATPase na membrana celular e das suas características bioquímicas, especialmente do pH óptimo de actividade, (Bender *et al.*, 1987). A estimulação da ATPase também foi referida por Cole *et al.* (1987) como um dos factores que contribui para manter um valor de pH interno compatível com a vida em *Zygosaccharomyces bailii*. Também a ATPase de *Aspergillus niger* parece ter como função biológica acelerar o fluxo de protões quando o pH intracelular toma valores inferiores aos da gama fisiológica normal (Elzainy *et al.*, 1995).

A activação, *in vivo*, da ATPase de *Saccharomyces cerevisiae*, por ácido octanóico, foi descrita como um mecanismo de resposta à acção do ácido levando a um maior consumo de ATP. A presença do ácido em concentrações sub-letais conduz a valores de pH interno que permitem o crescimento, mas desviam uma grande percentagem de glucose da síntese de biomassa para a produção de energia (Viegas *et al.*, 1995). O etanol também induz, *in vivo*, a activação da ATPase em *Saccharomyces cerevisiae* (Rosa *et al.*, 1991), embora, *in vitro*, cause uma inibição desta enzima (Cartwright *et al.*, 1987 e Alexandre *et al.*, 1994) e também iniba a actividade enzimática da ATPase de *Pichia stipitis* (Meyrial *et al.*, 1995). O ácido acético parece também induzir uma estimulação da actividade enzimática da ATPase de *Saccharomyces cerevisiae* como resultado da saída de protões do citoplasma (Pampulha *et al.*, 1990).

## 2- Resultados e Discussão

A actividade da ATPase e o teor em ATP na ausência e na presença de ácido acético foram avaliados em fermentações efectuadas em descontínuo. As actividades enzimáticas foram determinadas antes da adição do ácido, depois de decorridas 22-24 horas de fermentação, e após a adição de 0,15mM de ácido acético na sua forma não ionizada.

A Tabela 4 apresenta os valores referentes às actividades da ATPase antes da adição do ácido e a sua evolução passados 15, 30, 60 e 180 minutos da adição do ácido acético.

As actividades enzimáticas da ATPase variaram entre 18,061 $\mu$ gPi/mgProt.min e 48,167 $\mu$ gPi/mgProt.min.

A Figura 8 apresenta a variação média da actividade enzimática da ATPase ao longo de 180 minutos após a adição do ácido acético.

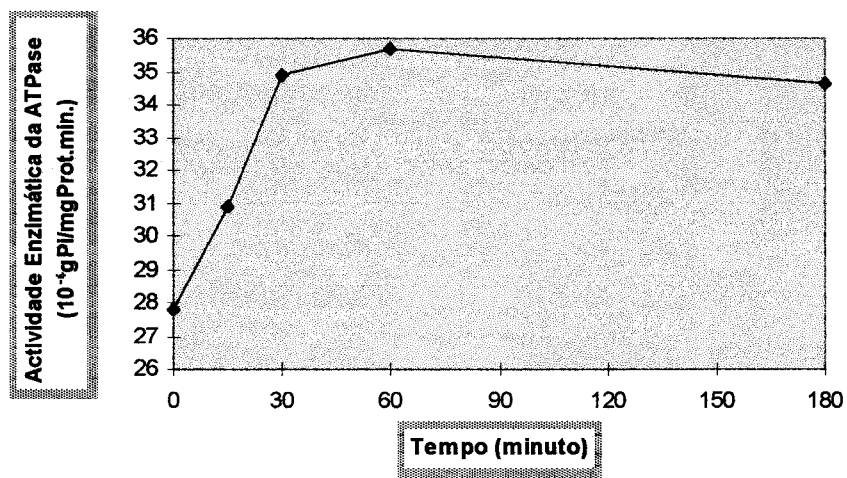
Globalmente verificou-se um aumento acentuado da actividade enzimática da ATPase durante os 30 minutos seguintes à adição do ácido acético. O valor mais baixo da actividade enzimática ocorreu antes da adição do ácido, ao fim de 15 minutos a actividade enzimática aumentou 11,1% e ao fim de 30 minutos o valor foi 25,4% superior ao valor inicial. A partir dos 30 minutos, e até aos 180, a actividade enzimática da ATPase praticamente manteve-se constante.

**Tabela 4 -** Actividades enzimáticas da ATPase antes e após a adição de ácido acético 0,15mM na forma não ionizada, para fermentações em vaso fermentador.

Amostras	Fermentações					
	F	G	H	I	J	
	Actividade Enzimática ( $\mu\text{gPi}/\text{mgProt. min.}$ )					
(1)	20,683	31,045	26,739	28,677	32,032	
(2)	20,527	42,793	24,645	27,887	38,659	
(3)	21,805	38,048	30,804	45,454	38,428	
(4)	18,061	44,823	31,047	48,167	36,327	
(5)		33,200	31,813	38,356	35,273	

(1)- Após 22-24h do início da fermentação e antes da adição do ácido.(2)- 15 minutos depois da adição do ácido.

(3)- 30 minutos depois da adição do ácido. (4)- 60 minutos depois da adição do ácido. (5)- 180 minutos depois da adição do ácido



**Figura 8** - Perfil de variação da média das actividades enzimáticas da ATPase com o tempo em fermentações efectuadas em vaso fermentador, onde foi adicionado 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada.

**Tabela 5** - Actividades enzimáticas da ATPase antes e após a adição de ácido acético 0,15mM na forma não ionizada, para fermentações em frascos agitados.

Amostras	Fermentações	
	9	11
	Actividade Enzimática ( $\mu\text{gPi/mgProt.min.}$ )	
(1)	27,026	22,642
(2)	29,378	24,329
(3)	29,799	24,195
(4)	26,968	25,936
(5)	27,909	22,523

(1)- Passadas 22-24h do início da fermentação e antes da adição do ácido acético.(2)- 15 minutos depois da adição do ácido. (3)- 30 minutos depois da adição do ácido. (4)- 60 minutos depois da adição do ácido. (5)- 180 minutos depois da adição do ácido.

A Tabela 5 mostra os valores referentes às actividades enzimáticas da ATPase antes da adição do ácido e ao fim de 15, 30, 60 e 180 minutos, respectivamente, para fermentações efectuadas em frascos agitados. As actividades enzimáticas variaram entre 22,523 $\mu\text{gPi/mgProt.min}$  e 29,799 $\mu\text{gPi/mgProt.min}$ .

Na Figura 10 (b) está representada a variação média da ATPase ao longo de 180 minutos após a adição do ácido acético, para as fermentações em frascos agitados. A presença de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada

promoveu uma activação da actividade enzimática da ATPase. O valor médio de actividade enzimática mais baixo,  $24,834 \mu\text{gPi}/\text{mgProt}.\text{min}$ . observou-se na ausência do ácido. Para este sistema de cultura em frascos agitados, a maior estimulação da actividade enzimática verificou-se ao fim de 30 minutos após a adição do ácido (ao fim de 15 minutos a actividade enzimática da ATPase foi 8,12% maior e ao fim de 30 minutos o valor foi 8,7% superior que o valor inicial). Entre 60-180 minutos após a adição do ácido acético, a actividade enzimática da ATPase diminui para valores próximos das actividades enzimáticas iniciais (Figura 10 (b) e Tabela 5).

Determinou-se a concentração de ATP em amostras recolhidas antes e durante os 180 minutos após a adição do ácido acético. Nas diferentes fermentações houve uma diminuição da concentração de ATP ao longo do tempo, tendo as concentrações variado entre  $1,360$  e  $4,680 \mu\text{mol}/\text{dL}$ .

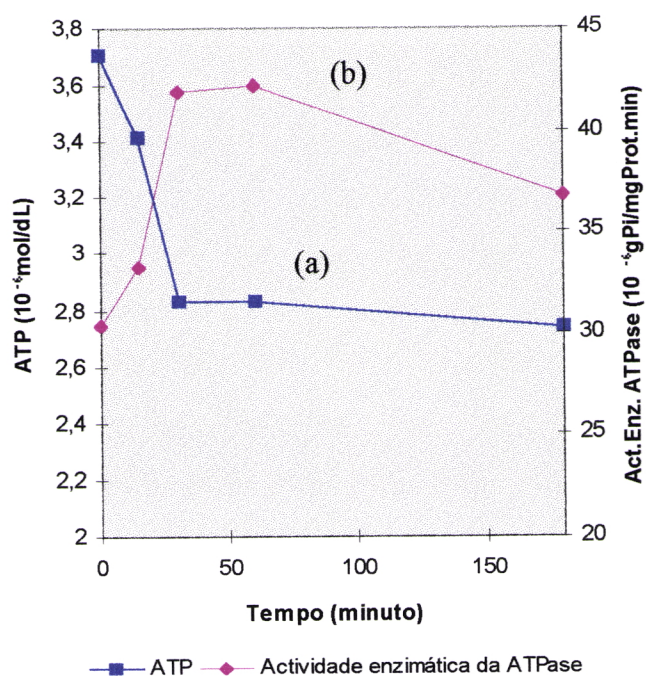
A Figura 9 (a) mostra o perfil de variação do ATP para duas das fermentações efectuadas em vaso de fermentação e na Figura 10 (a) pode ver-se o perfil de variação do ATP para duas das fermentações realizadas em frascos agitados.

A diminuição da concentração de ATP foi mais brusca nas fermentações realizadas em vaso de fermentação, ocorrendo a maior variação nos primeiros 30 minutos (Figura 9). Entre os 30 e os 180 minutos a variação de ATP foi pequena, não se tendo praticamente registado alterações no perfil de variação.

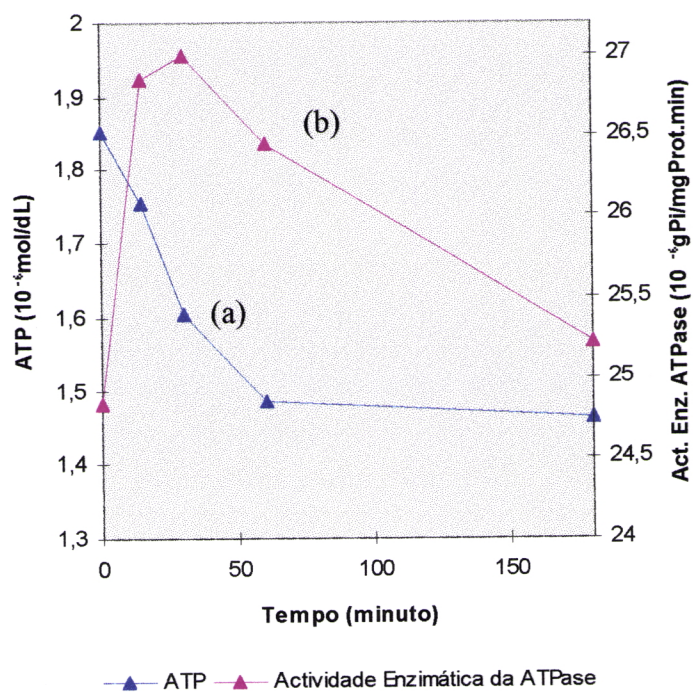


Nas fermentações em frasco agitado as maiores variações na concentração de ATP ocorreram até aos 60 minutos. Entre os 60 e os 180 minutos o perfil de variação manteve-se praticamente constante e a variação na concentração de ATP foi pequena (Figura 10).

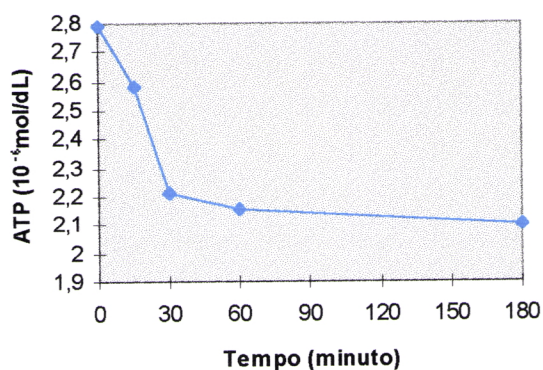
Globalmente, a concentração de ATP diminuiu durante os 180 minutos após a adição do ácido acético, Figura 11. Nos primeiros 30 minutos as diminuições foram mais bruscas, observando-se uma diminuição menos acentuada entre os 30 e os 180 minutos após a adição do ácido.



**Figura 9-** (a)- Variação da concentração de ATP com o tempo para duas fermentações em vaso fermentador, após a adição de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada. (b)- Perfil de variação da actividade enzimática da ATPase nas duas fermentações



**Figura 10** - (a)- Variação da concentração de ATP com o tempo para duas fermentações em frasco agitado, após a adição de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada. (b)- Perfil de variação da actividade enzimática da ATPase nas duas fermentações.



**Figura 11** - Perfil de variação da média das concentração de ATP com o tempo, após a adição de 0,15mM de ácido acético na forma não ionizada, para 4 fermentações.

Registou-se uma maior estimulação da actividade enzimática da ATPase de *Xanthomonas campestris* em vaso fermentador do que em frascos agitados. Um dos factores responsáveis pelas diferenças entre estes dois sistemas de cultura pode ser resultante do sistema de agitação, menos eficaz em frascos agitados. O sistema em fermentador é mais eficiente, permitindo um contacto mais íntimo entre o ácido e as células no meio viscoso. A possibilidade de limitação de oxigénio nos frascos agitados poderá também conduzir a um aumento das células não viáveis, o que irá repercutir-se na menor estimulação da ATPase para estas fermentações. Por outro lado, Eraso & Gancedo (1987) verificaram, em

leveduras, que a activação da ATPase depende do estado de crescimento dos microrganismos. Só numa fase de crescimento logarítmico já avançada, ou na fase estacionária, é que os microrganismos estão aptos a activar as suas ATPases na presença de ácidos. Estes autores também observaram que apenas as células onde a activação da ATPase ocorre, conseguem manter um valor de pH interno constante, quando incubadas com tampões ácidos. Por semelhança com o que se passa nestes organismos, esta talvez seja uma das causas das diferentes activações encontradas nas ATPases entre *Xanthomonas campestris* crescendo em vaso fermentador e em frascos agitados. Nestes últimos, a concentração celular foi em geral mais baixa, quando se adicionou o ácido acético. O desenvolvimento destas culturas pode não ter sido suficiente para atingirem uma maturidade necessária e exibirem a mesma activação da ATPase, sendo o nível de estimulação, para a mesma concentração de ácido acético introduzida, mais baixo quando comparado com as células do vaso de fermentação.

O perfil de variação do ATP nos dois sistemas (Figuras 9 e 10) é semelhante, sendo, no entanto, a diminuição mais acentuada no vaso de fermentação (26,0%, em média), onde também a actividade enzimática é mais elevada do que nos frascos agitados (21,1%, em média). Proporcionalmente houve um maior decréscimo do ATP, em relação ao aumento da actividade enzimática, no frasco agitado do que no vaso de fermentação (Figuras 9 e 10), o que sugere maior eficiência na resposta do segundo sistema em relação ao

estabelecimento de vias de produção de ATP, o que coincide também com a melhor transferência de oxigénio neste sistema.

As Figuras 9 e 10 mostram o perfil das variações simultâneas de ATP e actividade enzimática de ATPase. Na Figura 9, referente a duas fermentações efectuadas em vaso fermentador, pode observar-se que até aos 30 minutos após a adição do ácido a actividade enzimática da ATPase e o teor em ATP são inversamente proporcionais. Essa variação sugere a saída de protões do interior para o exterior da célula (aumento da actividade enzimática da ATPase) à custa do consumo de ATP. Entre 30-60 minutos o valor da ATPase é elevado e o ATP não diminui, o que leva a crer na existência de produção de ATP. Entre 60-180 minutos pareceu ocorrer uma tendencia para a diminuição da actividade enzimática da ATPase enquanto que o ATP não varia, o que também se observa na Figura 10. Esta diminuição da actividade enzimática sugere um efeito mais atenuado do ácido acético no pH interno. A saída de protões da célula será mais reduzida e a actividade enzimática da ATPase também diminuirá. O facto de o ATP não aumentar sugere, por um lado, a continuação de desacoplamento energético entre a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa e, por outro, como o gasto em ATP para excretar protões é mais reduzido (actividade enzimática da ATPase mais baixa), é provável que este esteja a ser usado noutras funções fisiológicas, eventualmente na produção de xantano, uma vez que esta é mais elevada.

A diminuição do pH interno com a introdução no meio de cultura de agentes lipofílicos é geralmente explicada por dois mecanismos: aumento da polaridade das membranas (os agentes lipofílicos diminuem as interações hidrófobas lípido-lípido e lípido-proteína, alterando a organização espacial das membranas e aumentando a sua permeabilidade aos prótons) e dissociação dos ácidos fracos no interior da célula (devido ao pH do citoplasma ser próximo da neutralidade). Qualquer dos dois mecanismos reduz a força potenciometriz, o que induz um certo desacoplamento energético entre a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, principal via de produção de ATP. Cartwright *et al.* (1986) verificaram uma diminuição da força potenciometriz com a adição de etanol na membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Concentrações sub-letais dos ácidos fórmico e propiónico inibiram a síntese de DNA em *Escherichia coli*. As moléculas de DNA não sofreram alterações físicas, embora a divisão celular tenha sido inibida (Cherrington, *et al.* 1991a). A morte celular de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. na presença destes ácidos não está associada a uma perda da integridade da membrana celular (Cherrington, *et al.* 1991b). Por semelhança com o que se passa para estes organismos, e sabendo que a forma não ionizada do ácido é permeável à membrana de *Xanthomonas campestris*, parece-nos que o segundo mecanismo (dissociação do ácido no interior da célula) seja, provavelmente, o que mais contribui para a diminuição do pH interno. O aumento da actividade enzimática da ATPase, devido à excreção de prótons do interior para o exterior da célula (Figura 7), parece, no nosso caso, surgir como um

mecanismo de resposta a esta possível diminuição do pH interno. A saída de prótons, contra o gradiente electroquímico é feita à custa do consumo de ATP, o que está de acordo com as diminuições no teor de ATP encontradas nos dois sistemas estudados (vaso fermentador e frascos agitados). A diminuição da taxa específica de crescimento parece ocorrer como consequência de parte da energia ser usada para a libertação dos prótons, não ficando disponível para o crescimento. Por outro lado, o facto do teor em ATP diminuir, durante os primeiros minutos após a adição do ácido, e depois se manter, embora a actividade enzimática da ATPase seja maior do que era antes da adição do ácido, poderá estar relacionado com a produção de ATP pela via glicolítica. O aumento de actividade das enzimas da via glicolítica no metabolismo de *Xanthomonas campestris*, com a introdução de concentrações sub-letais de ácidos orgânicos no meio de cultura foi observado por vários autores (Esgalhado, 1993; Roseiro *et al.*, 1996; Pires, 1996) e relacionado com o desacoplamento energético na fosforilação oxidativa, surgindo como mecanismo de regulação metabólica que conduz a uma maior produção de energia (Roseiro *et al.*, 1996).

Cheng & Piper (1994) referem-se a uma deficiência respiratória como um dos factores responsáveis pela acção inibidora dos ácidos fracos no crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae*, a baixos valores de pH. A nós, parece-nos provável que a taxa respiratória de *Xanthomonas campestris* seja mais elevada na presença do ácido acético. De facto, o aumento da respiração permite a oxidação de coenzimas, o que poderá contribuir para uma maior eficiência metabólica, que



neste caso estará relacionada com a maior produção de xantano. Por outro lado, a libertação de protões para o exterior da célula, contribui para aumentar o potencial electroquímico que, com a introdução do ácido acético no interior das células, diminuiu.

O desacoplamento energético e consequente redução da fosforilação oxidativa pode conduzir a uma produção de ATP por oxidações parciais da glucose que origine produtos metabólicos mais direccionados à síntese de xantano. A produção de Exopolissacáridos (EPS) pode ser entendida como um sistema de excreção metabólica relacionado com a produção e utilização de ATP (Linton *et al.*, 1989). A própria ATPase pode ter associado um transporte secundário de outras substâncias (Serrano, 1996), que, a ser alterado, pode induzir modificações no metabolismo de *Xanthomonas campestris*, no sentido de uma maior produção de xantano.

A utilização do acetato por parte da bactéria, na acetilação das moléculas de xantano (Figura 1) ou no ciclo dos ácidos tricarbóxicos é outro dos factores que poderá ter influenciado a produção daquele composto, embora o teor de acetato resultante da dissociação do ácido não nos pareça, por si só, responsável pelo aumento da produção deste exopolissacárido. Pires (1996), para fermentações realizadas na ausência e na presença de ácido acético, observou uma concentração final de acetato idêntica, parecendo, assim, que os grupos acetato são utilizados pela bactéria. Pampulha & Loureiro-Dias (1990) investigaram o efeito do ácido acético no transporte da glucose em

*Saccharomyces cerevisiae* e concluíram que este ácido não afecta o transporte da glucose. O efeito do ácido na inibição enzimática faz-se sentir devido à acidificação do citoplasma.

Segundo Jarman & Pace (1984), a energia necessária para a síntese do xantano não provém exclusivamente do catabolismo Entner-Doudoroff e ciclo dos ácidos tricarboxílicos, mas também da própria via biossintética do exopolissacárido. A possibilidade de formação de xantano por esta via poderá ser um dos caminhos que conduzem a aumentos da sua produção quando as condições energéticas do meio são adversas (desacoplamento entre respiração e fosforilação oxidativa).

Por tudo o que acima foi exposto, os dois sistemas estudados sugerem-nos que a activação da ATPase no mecanismo de controle do pH citoplasmático assumam um papel chave no metabolismo de *Xanthomonas campestris*, em presença de concentrações sub-letais de ácido acético, conduzindo a maiores rendimentos e taxas de produção de xantano.

**V - Conclusões**

Da análise dos resultados expostos nos capítulos anteriores deste trabalho, parece-nos lícito concluir:

- a adição de 0,15mM de ácido acético, na forma não ionizada, afectou o desenvolvimento das culturas descontínuas de *Xanthomonas campestris*, diminuindo a taxa específica de crescimento.
- a estimulação da produção de xantano, com a presença do ácido, foi evidenciada pelo aumento da taxa volumétrica de produção de xantano, do rendimento em xantano e do rendimento específico em xantano, em relação às fermentações efectuadas na ausência de ácido acético.
- o aumento do consumo de glucose nas fermentações realizadas na presença do ácido não parece ser suficiente para explicar o aumento da produção de xantano.
- a diminuição do crescimento e aumento da produção de xantano parecem estar inter-relacionados.
- a diminuição do teor em ATP foi relacionada com uma possível diminuição da força potenciometriz, induzida pelo ácido.

- o aumento da ATPase foi relacionado com um mecanismo de restabelecimento do gradiente de prótons de modo a manter um valor de pH homeostático.
- o perfil de variação simultânea de ATPase e ATP foi semelhante nos dois sistemas estudados: vaso fermentador e frascos agitados.
- o aumento da actividade enzimática e consequente diminuição de ATP foram relacionados com a saída de prótons para o exterior da célula, à custa de energia.
- a tendência do teor em ATP para valores constantes, quando actividade enzimática ainda se encontra estimulada, atribuiu-se a novas vias de produção de ATP.
- o aumento da produção de xantano parece estar relacionado com a possibilidade de formação de ATP por vias alternativas à fosforilação oxidativa, devido ao desacoplamento energético que o ácido induz.

## **V- Bibliografia**

- Alexandre, H. & Charpentier, C. (1994) The plasma membrane ATPase of *Kloeckera apiculata*: purification, characterization and effect of ethanol on activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **10**, 704-708.
- Behrens, U., Fiedler, S. & Stottmeister, U. (1985) Physiological Adaptation in the Synthesis of the Extracellular Polysaccharide Xanthan. *Acta Biotechnol.* **5**, 109-113.
- Bender, G. R. & Marquis, R. E. (1987) Membrane ATPase and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2124-2128.
- Betlach, M. R., Capage, M. A., Dotherty, D. H., Hassler, R. A., Henderson, N. M., Vanaderslice, R. W., Marrelli, D. J. & Ward, M. B. (1987) Genetically engineered polymers: manipulation of xanthan biosynthesis. In *Progress in Biotechnology 3: industrial polysaccharides*. Vol. 3, ed. Yalpani, M., 35-50. Amsterdam: Elsevier.
- Booth, I. R. (1985) Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiological Reviews* **49**, 359-378.
- Brock, T. D. & Madigan, M. T. (1991) *Biology of Microorganisms*, 6ª edição, 109, Prentice- Hall International Editions, Englewood Cliffs.

Cain, K. & Skilleter, D. N. (1987) Preparation and Use of Mitochondria in Toxicological Research, in *Biochemical toxicology a practical approach*, eds K. Snell & B. Mullock, 217-252, IRL Press, Oxford.

Capucho, I. & San Romão, M. V. (1994) Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology Biotechnology* **42**, 391-395.

Cartwright, C. P., Juroszek, j., Beavan, M. J., Ruby, F. M., Morais, S. & Rose, A. H. (1986) Ethanol Dissipates the Proton-motive Force across the Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **132**, 369-377.

Cartwright, C. P., Veazey, F. J. & Rose, A. H. (1987) Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* **133**, 857-865.

Cherrington, C. A., Hinton, M., Pearson, G. R. & Chopra, I. (1991a) Inhibition of *Escherichia coli* K12 by short chain organic acids: lack of evidence for induction of the SOS response. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 156-160.

Cherrington, C. A., Hinton, M., Pearson, G. R. & Chopra, I. (1991b) Short chain organic acids at pH 5 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 161-165.



Cole, M. B. & Keenan, M. J. H. (1987) Effects of weak acids and external pH on the intracellular pH of *Zygosaccharomyces bailli*, and its implications in weak-acid resistance. *Yeast* **3**, 23-32.

Dombek, K. M. & Ingram, L. O. (1987) Ethanol production during batch fermentations with *saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 1286-1291.

Elzainy, T. A. & Ali, T. H. (1995) Participation of a proton-translocating plasma membrane ATPase, acid phosphatase and alkaline phosphatase in ATP degradation by *Aspergillus niger* extracts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1239**, 91-97.

Eraso, P. & Gancedo, C. (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* **224**, 187-192.

Esgalhardo, M. E. (1993) *Toxicidade ácida em culturas contínuas e descontínuas de Xanthomonas campestris*. Tese de Mestrado. Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa.

Esgalhardo, M. E., Roseiro, J. C. & Amaral Collaço, M.T. (1995) Interactive Effects of pH and Temperature on cell Growth and Polymer Production by *Xanthomonas campestris*. *Process Biochemistry* **30**, 667-671.

Esgalhardo, M. E., Roseiro, J. C., Amaral Colção, M-T. (1996) Kinetics of acid toxicity in cultures of *Xanthomonas campestris*. *Food Microbiology* **13**, 441-446.

Evans, C. G. T., Yeo, R. G. & Ellwood, D. C. (1979) Continuous culture on the production of extracellular polysaccharides by *Xanthomonas juglandis*. In *Microbial polysaccharides and polysaccharases*. Ed. Berkeley, R. C. W. & Ellwood, D. C. 51-68. London: Academic Press.

Goffeau, A. & Slayman, C. W. (1981) The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **639**, 197-223.

Goodson, N. R., Smith, D. G. & Rowbury, R. J. (1991) Decreased DNA damage by acid and increased repair of acid-damaged DNA in acid-habituated *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 507-511.

Ielpi, L., Couso, R. O. & Dankert, M. A. (1981) Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. *FEBS Letters* **130**, 253-256.

Jarman, T. R. & Pace, G. W. (1984) Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. *Archives of Microbiology* **137**, 231-235.

Johnson, D. & Lardy, H. (1967) in *Methods in Enzymology* **10**. Estabrook, R. W. & Pullman, M. E. (eds), p 95 Academic Press Inc., London and New York.

---

Katznelson, H. (1955) Metabolism of phytopathogenic bacteria, I comparative studies on the metabolism of representative species. *Journal of Bacteriology* **70**, 469-475.

Katznelson, H. (1957) Metabolism of phytopathogenic bacteria, II metabolism of carbohydrates by cell-free extracts. *Journal of Bacteriology* **75**, 540-543.

Kennedy, J. F. & Bradshaw, I. J. (1984) Production, properties and applications of xanthan. *Progress of Industrial Microbiology* **19**, 319-371.

Krebs, H. A., Wiggins, D. & Stubbs, M. S. (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoat. *Biochemistry Journal* **314**, 657-663.

Leach, J. G., Lilly, V. G., Wilson, H. A. & Purvis, M. R. (1957) Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exsudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. *Phytopathology* **47**, 113-120.

Linton, J. D. & Rye, A. J. (1989) The relationship between the energetic efficiency in different micro-organisms and the rate and the type of metabolite over-produced. *Journal of Industrial Microbiology* **4**, 85-96.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, L. & Randall, R. J. (1951) Protein measure with the Folin phenol reagent. *Journal Biol. Chem.* **193**, 265-275.

---

Marquis, R.E. (1992) ATPase and ion currents. *Encyclopedia of Microbiology* **1**, 161-169.

Meyrial, V., Delgenes, J. P., Romieu, C. Moletta, R. & Gounot, A. M. (1995) Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 535-540.

Pampulha, M. E. & Loureiro-Dias, M. C. (1989) Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology Biotechnology* **31**, 547-550.

Pampulha, M. E. & Loureiro-Dias, M. C. (1990) Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology Biotechnology* **34**, 375-380.

Paul, F., Morin, A. & Monsan, P. (1986) Microbial Polysaccharides With Actual Potential Industrial Applications. *Biotech. Adv.* **4**, 245-259.

Pires, F. M. (1996) *Efeito da adição de ácido acético a culturas descontínuas de Xanthomonas campestris*. Relatório de Estágio, INETI.

- Raja, N., Goodson, M., Smith, D. G. & Rowbury, R. J. (1991) Decreased DNA damage by acid and increased repair of acid-damaged DNA in acid-habituated *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 507-511.
- Rosa, M. F. & Sá- Correia, I. (1991) In Vivo Activation by Ethanol of Plasma Membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 830-835.
- Roseiro, J. C. (1991) *Improvement of xanthan fermentation technology using carbon-based feeds*. Tese de Doutoramento, School of Chemical Engineering, University of Birmingham.
- Roseiro, J. C., Esgalhardo, M. E., Emery, A. N. & Amaral-Collaco, M. T. (1996) Technological and Kinetic Aspects of Sublethal Acid Toxicity in Microbial Gum Production. *Journal of Chemical and Technological Biotechnology* **65**, 258-264.
- Roseiro, J. C., Gírio, F.M., Kará, A. & Amaral Collaço, M.T. (1993) Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* batch cultures. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 381-386.
- Roseiro, J. C., Esgalhardo, M.E., Amaral Collaço, M.T. & Emery, A. N. (1992) Medium Development for Xanthan Production. *Process Biochemistry* **27**, 167-175.

---

Sabbert, D., Engelbrecht, S. & Junge, W. (1996) Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Letters to Nature* **381**, 623-625

Serrano, R. (1996) Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Tragetes and Defense Responses. *International Review of Cytology* **165**, 1-52.

Sutherland, I. W. (1990) Cambridge studies in biotechnology: biotechnology of microbial exopolysaccharides **9**, 54-88. Cambridge: Cambridge University Press.

Viegas, C. A. & Sá-Correia, I (1991) Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid . *Journal of General Microbiology* **137**, 645-651.

Viegas, C. A. & Sá-Correia, I (1995) Toxicity of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* at temperatures between 8,5 and 30°C. *Enzyme and Microbial Technology* **17**, 826-831.

Viegas, C. A., Rosa, M. F. ; Sá-Correia, I. & Novais, J. M. (1989) Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 21-28.

Warth, A. D. (1977) Mechanism of Resistance of *Saccharomyces bailii* to Benzoic, Sorbic and Other Weak Acids Used as Food Preservatives. *Journal of Applied Bacteriology* **43**, 215-230.

Warth, A. D. (1988) Effect of Benzoic Acid on Growth Yield of Yeasts Differing in Their Resistance to Preservatives. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 2091-2095.

Young, K. M. & Foegeding, P. M. (1993) Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. *Journal of Applied Bacteriology* **74**, 515-520.

Zagallo, a. C. & Wang, C. H. (1967) Comparative Glucose Catabolism of *Xanthomonas* Species. *Journal of Bacteriology* **93**, 970-975.

**Anexos**



## **Anexo A- Reagentes**

Na tabela seguinte estão indicados os reagentes utilizados no decorrer deste trabalho, respectiva fórmula química e firma a que foram adquiridos:

<b>Reagentes</b>	<b>Fórmula Química</b>	<b>Firma</b>
Ácido acético (100%)	$C_2H_4O_2$	Merck
Ácido bórico	$H_3BO_3$	Merck
Ácido cítrico monohidratado	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Riedel-deHaen
Ácido clorídrico (37%)	HCl	Merck
Ácido sulfúrico (95-97%)	$H_2SO_4$	Merck
Ácido tricloroacético	$C_2HCl_3O_2$	Sigma
Agar		Difco
ATP	$C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$	Sigma
BSA		Sigma
Carbonato de cálcio	$CaCO_3$	Merck
Carbonato de sódio	$Na_2CO_3$	Merck
Cloreto de ferro III hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Merck
Cloreto de magnésio hexahidratado	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Merck
Cloreto de potássio	KCl	Merck

Dextrose	$C_6H_{12}O_6$	Difco
Dihidrogenofosfato de potássio	$KH_2PO_4$	Merck
EDTA	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	Merck
Extracto de levedura		Difco
Extracto de malte		Difco
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Merck
Hidróxido de sódio	NaOH	Merck
Molibdato de amónio	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Sigma
Óxido de zinco	ZnO	Merck
Peptona		Difco
Polipropilenoglicol 2025		BDH
Reagente de Folin Ciocalteus		Merck
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Merck
Sulfato de amónio	$(NH_4)_2SO_4$	Merck
Sulfato de cobre pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Merck
Sulfato de ferro heptahidratado	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck
sulfato de magnésio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck

Tartarato de potássio e sódio tetrahidratado	$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	Merck
Tris (hidroximetil) aminometano	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma

**Anexo B- Meios de cultura**

---

### 1- Meio de Yeast Malt (YM)

Reagentes	Quantidade (g/l)
Extracto de levedura	3
Extracto de malte	3
Peptona	5
Dextrose	10

### 2 - Meio de Yeast Malt Agar (YMA)

Reagentes	Quantidade (g/l)
Extracto de levedura	3
Extracto de malte	3
Peptona	5
Dextrose	10
Agar	20

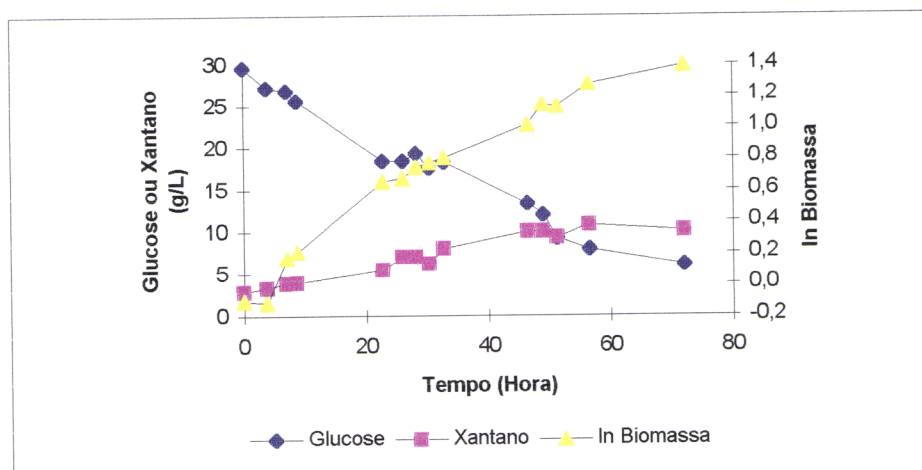
3- Meio otimizado para a produção de *Xanthomonas campestris* (Roseiro *et al.*,  
1992)

Reagentes	Quantidade (g/l)
Ácido bórico	0.0072
Ácido clorídrico (37%)	0.16 ml/l
Ácido cítrico monohidratado	2.0000
Carbonato de cálcio	0.0290
Cloreto de ferro III hexahidratado	0.0042
Dihidrogenofosfato de potássio	7.2000
Glucose	30.0000
Óxido de zinco	0.0060
Sulfato de amónio	3.4000
Sulfato de magnésio heptahidratado	0.2400

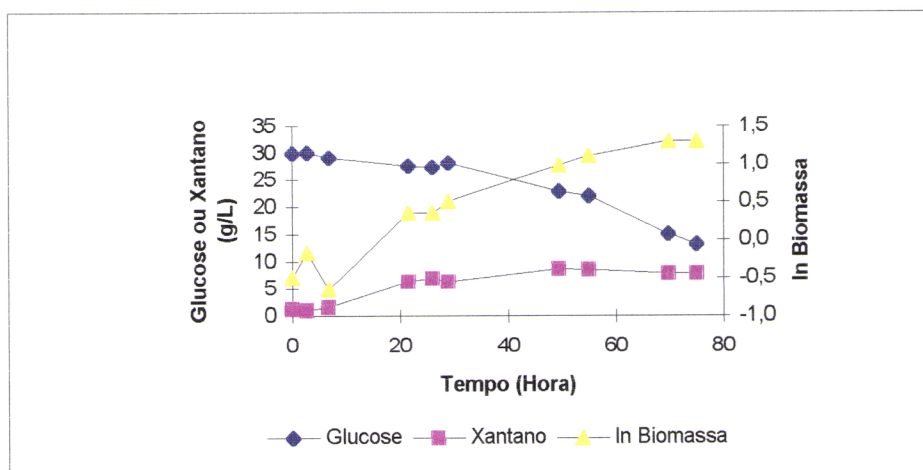
**Anexo C- Perfis das fermentações A-J**



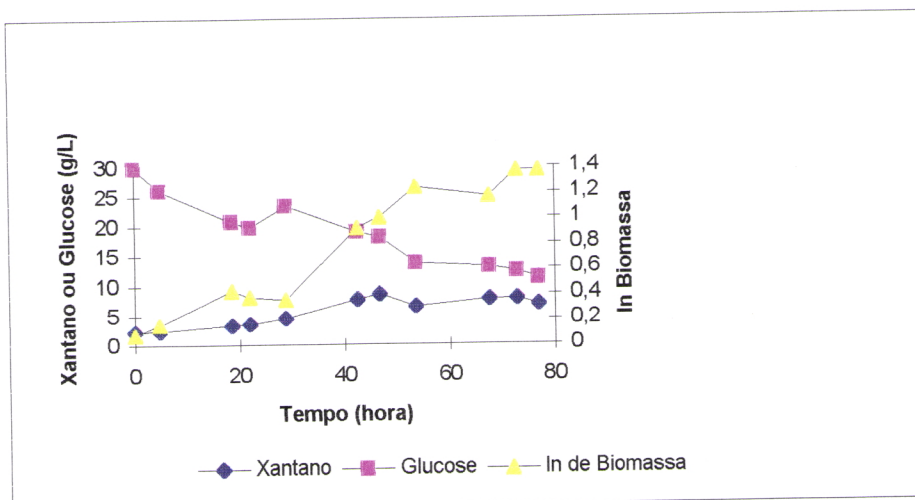
Fermentação A			
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa
0,00	29,61	2,80	-0,11
3,75	27,20	3,32	-0,12
7,00	26,78	3,80	0,17
8,75	25,58	3,90	0,21
22,75	18,42	5,44	0,65
26,00	18,38	7,00	0,67
28,25	19,30	7,04	0,74
30,25	17,54	6,16	0,77
32,75	18,24	8,02	0,80
46,50	13,34	9,98	1,01
49,00	11,99	10,02	1,14
51,25	9,26	9,30	1,13
56,50	7,92	10,78	1,28
72,00	6,00	10,08	1,39



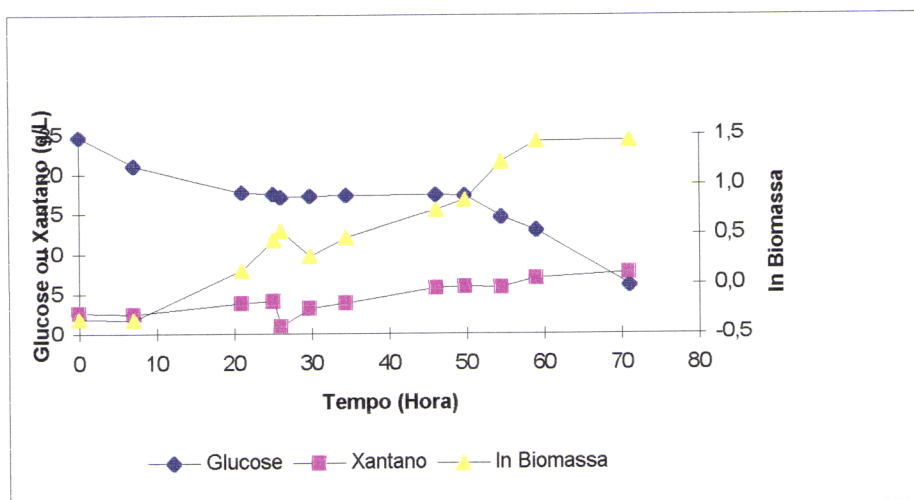
Fermentação B			
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa
0,00	30,02	1,20	-0,50
2,75	30,10	0,90	-0,17
6,75	29,19	1,58	-0,65
21,50	27,63	6,32	0,36
26,00	27,38	6,86	0,36
29,00	28,21	6,26	0,51
49,50	22,93	8,70	0,98
55,00	22,02	8,54	1,11
69,75	15,10	7,82	1,31
75,00	13,17	7,82	1,31



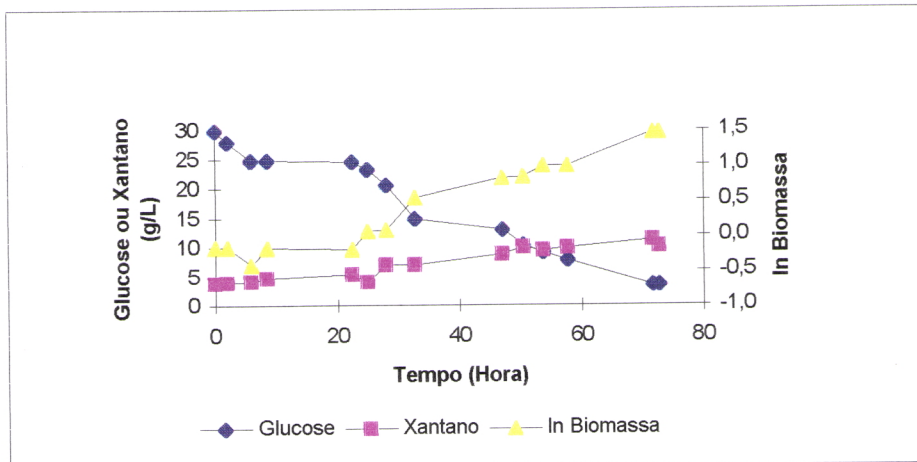
Fermentação C			
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa
0,00	29,93	2,32	0,08
4,75	26,11	2,38	0,16
18,50	20,84	3,38	0,43
22,00	19,83	3,60	0,38
28,75	23,36	4,54	0,36
42,50	19,04	7,74	0,92
46,75	18,17	8,56	1,00
53,50	13,77	6,48	1,24
67,50	13,12	7,74	1,17
72,75	12,33	7,78	1,37
77,00	11,11	6,86	1,37



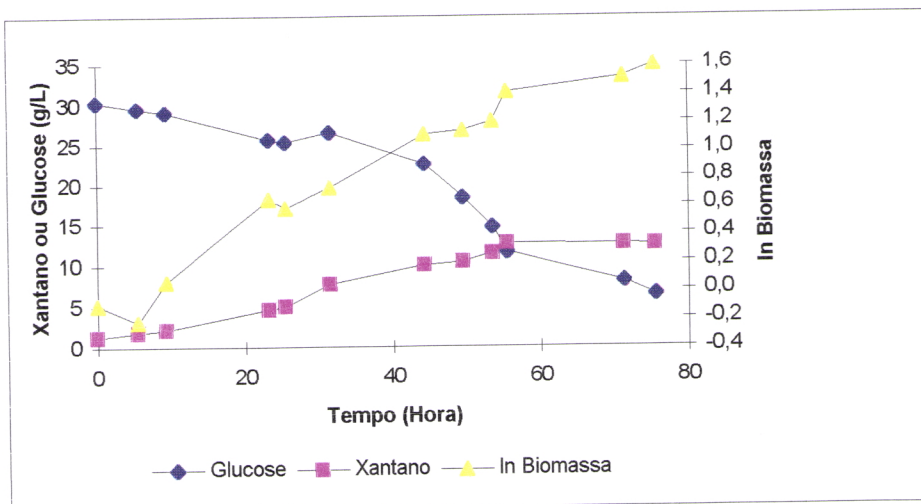
Fermentação D				
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa	
0,00	24,65	2,66	-0,35	
7,00	21,06	2,50	-0,36	
21,00	17,78	3,86	0,13	
25,00	17,46	4,14	0,44	
26,00	17,06	0,96	0,53	
29,75	17,22	3,26	0,28	
34,50	17,30	3,86	0,47	
46,00	17,38	5,76	0,74	
49,75	17,34	5,90	0,84	
54,50	14,63	5,80	1,22	
59,00	12,99	6,90	1,43	
71,00	6,03	7,66	1,44	



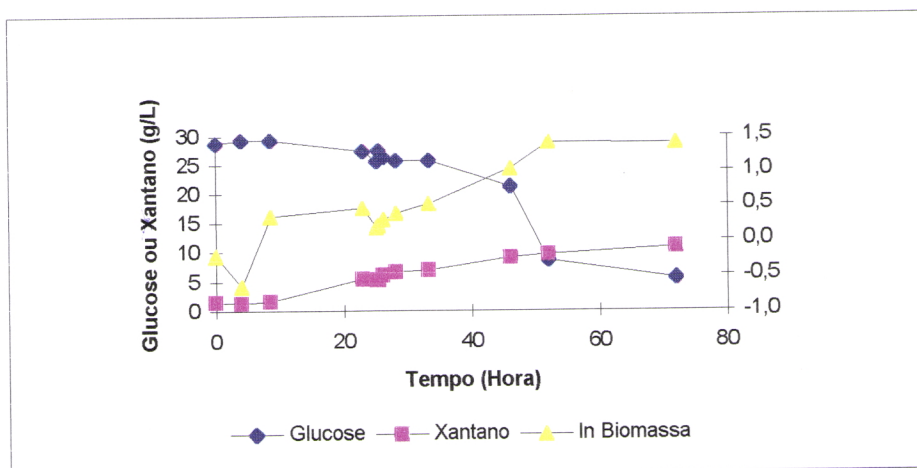
Fermentação E			
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa
0,00	29,84	3,86	-0,17
2,00	27,87	4,00	-0,17
5,90	24,71	4,22	-0,42
8,50	24,71	4,68	-0,17
22,50	24,47	5,40	-0,20
25,00	23,21	4,12	0,06
28,00	20,52	7,00	0,08
32,75	14,84	7,04	0,54
47,00	12,95	8,80	0,82
50,50	10,34	9,98	0,83
53,75	9,16	9,42	0,99
57,75	7,82	9,86	0,99
71,75	3,55	11,24	1,46
72,75	3,55	10,16	1,46



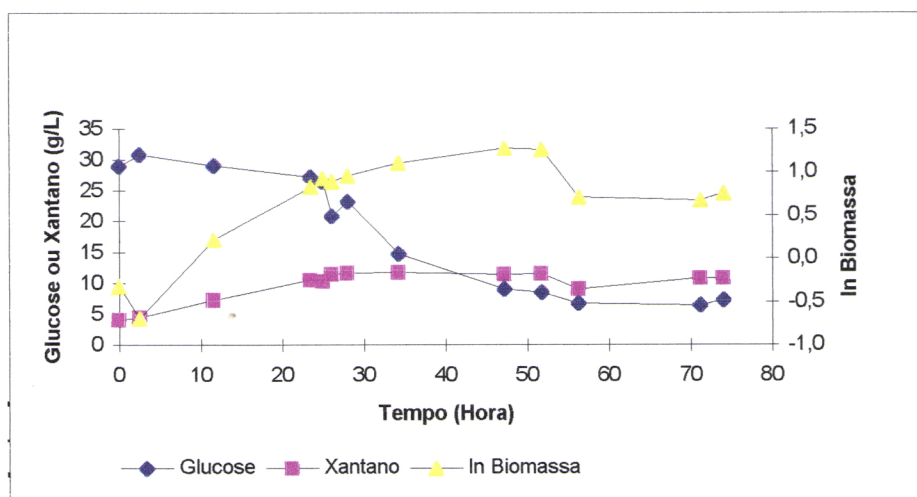
Fermentação F				
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa	
0,00	30,38	1,26	-0,11	
5,50	29,56	1,82	-0,22	
9,25	29,15	2,12	0,06	
23,25	25,69	4,60	0,64	
25,50	25,36	5,04	0,58	
31,50	26,59	7,68	0,72	
44,25	22,56	10,04	1,11	
49,50	18,35	10,42	1,13	
53,50	14,72	11,48	1,19	
55,50	11,59	12,64	1,41	
71,25	8,05	12,56	1,51	
75,50	6,40	12,52	1,60	



Fermentação G			
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa
0,00	28,74	1,56	-0,22
4,00	29,39	1,34	-0,65
8,55	29,39	1,70	0,34
23,00	27,34	5,36	0,46
25,13	25,60	5,32	0,18
25,45	27,42	5,28	0,21
26,15	26,26	6,04	0,29
28,15	25,69	6,62	0,38
33,30	25,69	6,94	0,52
46,15	21,23	9,06	1,02
52,00	8,54	9,58	1,41
72,00	5,49	10,80	1,40

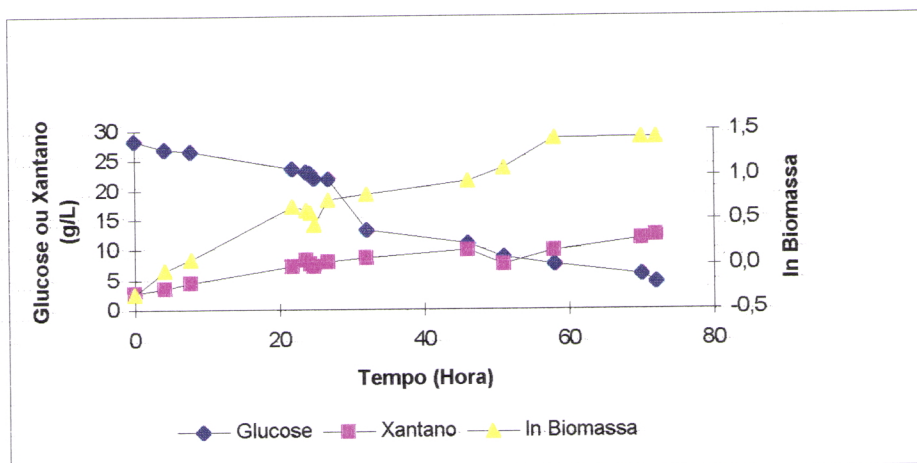


Fermentação H				
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa	
0,00	28,99	4,00		-0,33
2,50	30,81	4,50		-0,69
11,58	29,08	7,26		0,22
23,48	27,23	10,44		0,83
24,98	26,44	10,32		0,93
26,00	20,84	11,44		0,89
28,00	23,29	11,62		0,96
34,25	14,76	11,76		1,11
47,25	9,00	11,40		1,28
51,75	8,53	11,50		1,26
56,30	6,71	9,00		0,71
71,25	6,47	10,78		0,68
74,00	7,29	10,78		0,76

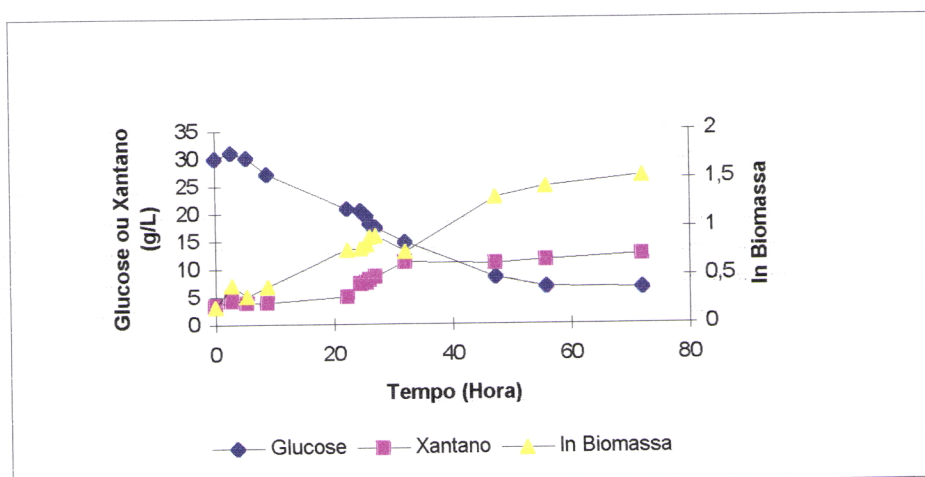




Fermentação I				
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa	
0,00	28,26	2,80	-0,33	
4,15	26,84	3,58	-0,06	
7,75	26,52	4,50	0,06	
21,75	23,68	7,28	0,65	
23,75	23,13	8,32	0,61	
24,25	22,89	7,66	0,58	
24,75	22,02	7,26	0,45	
26,75	21,87	8,00	0,72	
32,00	13,26	8,66	0,79	
46,00	11,05	9,88	0,94	
51,00	8,76	7,58	1,09	
58,00	7,58	9,84	1,41	
70,00	5,84	11,74	1,42	
72,00	4,50	12,28	1,42	



Fermentação J				
Tempo (Hora)	Glucose (g/L)	Xantano (g/L)	In biomassa	
0,00	29,97	3,54	0,18	
2,75	31,02	4,26	0,41	
5,25	30,08	3,92	0,29	
8,75	27,26	3,98	0,39	
22,25	20,84	4,98	0,76	
24,50	20,50	7,36	0,78	
25,50	19,40	7,52	0,82	
26,00	18,00	8,04	0,90	
27,00	17,45	8,66	0,91	
32,00	14,76	11,22	0,74	
47,25	8,53	10,94	1,31	
55,75	6,71	11,48	1,42	
72,00	6,47	12,44	1,53	



## **Anexo D-Software utilizado para o controle do pH**

```
TO = TIMER
GOSUB inicializaplacas
```

```
-----
GOSUB desactuabombaacido
GOSUB desactuabombabase
```

```
inicio:
```

```
IF INKEY# = "q" THEN END
GOSUB lerph
IF x > 6.1 THEN
    GOSUB actuabombaacido
    PRINT estado
    GOTO inicio
END IF
GOSUB desactuabombaacido
PRINT estado
IF x < 5.9 THEN
    GOSUB actuabombabase
    PRINT estado
    GOTO inicio
END IF
GOSUB desactuabombabase
PRINT estado
GOTO inicio
```

```
-----
inicializaplacas:
```

```
OUT &H313, 153
estado = 0
OUT &H311, 0
OPEN "com1:1200,n,8,2,cd0,cs0,op0,rs,ds0" FOR INPLT AS #1
RETURN
```

```
-----
actuabombaacido:
```

```
estado = 1
estado = estado OR 16
OUT &H311, estado
PRINT "Liga bomba acido"
RETURN
```

```
-----
actuabombabase:
```

```
estado = 1
estado = estado OR 32
OUT &H311, estado
PRINT "Liga bomba base"
RETURN
```

```
-----
desactuabombaacido:
```

```
estado = 0
estado = estado AND 239
OUT &H311, 0
PRINT "Desliga bomba acido"
RETURN
```

```
-----
desactuabombabase:
```

```
estado = 0
estado = estado AND 223
OUT &H311, 0
PRINT "Desliga bomba base"
RETURN
```

```
-----
lerph:
```

```
a:
```

```
INPUT #1, x%
IF MID$(x%, 1, 2) = "V:" THEN
    IF MID$(x%, 1, 2) = "V:" THEN x = VAL(MID$(x%, 3, 9))
    ELSE
        GOTO a
    END IF
b:
INPUT #1, x%
IF MID$(x%, 1, 2) = "T:" THEN
    IF MID$(x%, 1, 2) = "T:" THEN T = VAL(MID$(x%, 3, 9))
    ELSE
        GOTO b
    END IF
PRINT "temperatura: "; T; "      valor: "; x
RETURN
```

---

