

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE FUNGOS: I. MODELO MATEMÁTICO PARA O *EREMOTHECIUM ASHBYII* (*)

RUI SERGIO F. DA SILVA (**)

RESUMO

O modelo cinético de Kono foi aplicado ao crescimento do *Eremothecium ashbyii* IZ-1389. O modelo foi estendido para incluir o período de decrescimento do fungo. As previsões das equações do modelo cinético apresentaram boa concordância com os resultados experimentais.

INTRODUÇÃO

A quantificação e previsão do desempenho de sistemas complexos pode ser obtida pelo uso de modelos matemáticos. Quanto mais complexo o sistema tanto mais útil o emprego da modelagem matemática. O crescimento microbiano, com sua complicada cadeia de reações, é um exemplo típico de sistema complexo. Recentemente, BARFORD & HALL⁽¹⁾ apresentaram uma excelente revisão sobre os fundamentos dos modelos matemáticos do crescimento microbiano. Os mesmos autores iniciam a revisão com a clássica equação de Monod e apresentam estudo comparativo sobre os modelos estocásticos e determinísticos (estruturados ou segregados) utilizados para descrever o cultivo microbiano. No entanto, pelo que se sabe, o trabalho mais conceitual apresentado sobre a modelagem matemática no processo fermentativo é devido a FREDRICKSON *et alii*⁽⁴⁾. A equação de Monod, análoga à de Michaelis e Menten para reações enzimáticas, tem sido universalmente empregada com modelo matemático para o crescimento de células. Entretanto, em muitos casos (microrganismos pluricelulares e fermentação descontínua) os resultados previstos pela equação de Monod não apresentam boa concordância com os valores experimentais. KONO⁽⁹⁾ propôs uma nova equação para estudar a velocidade de crescimento de microrganismos, hasteada nos fundamentos da cinética química. O autor, porém, não estendeu seu modelo a todo o ciclo vital, nem aplicou sua

equação para fungos.

KONAK⁽⁷⁾ apresentou uma equação para o crescimento de microrganismos unicelulares (bactérias e leveduras) em fermentação descontínua, que é essencialmente uma generalização da equação autocatalítica da cinética química. Todavia, o autor não chegou a testar seu modelo com dados experimentais. O mesmo autor (KONAK⁽⁸⁾) desenvolveu uma generalização para a equação de Monod, sem contudo eliminar as mais sérias limitações daquela equação.

Por outro lado, o fungo *Eremothecium ashbyii* é conhecido como superprodutor de riboflavina (KOJIMA *et alii*⁽⁶⁾).

A riboflavina (vitamina B₂) é essencial ao metabolismo de todos os animais. Sua deficiência no ser humano pode acarretar problemas de crescimento, bem como, anormalidades oftalmológicas e dermatológicas. A vitamina B₂ é dispensável nas dietas dos bovinos devido à síntese bacteriana no rúmen. Na avicultura e suinocultura, entretanto, é indispensável uma dieta que inclua a riboflavina.

O Brasil ainda importa riboflavina. Além disso, a produção de riboflavina por processo fermentativo torna-se cada vez mais vantajosa, uma vez que a riboflavina sintética depende de matéria-prima não-renovável. Ainda, a formação de riboflavina por fermentação com *Eremothecium ashbyii* normalmente ocorre após a fase de crescimento exponencial (logarítmica), o que torna mais importante o estudo de

todo o ciclo vital do fungo (DEMAIN⁽³⁾). Consequentemente, modelos cinéticos relativos ao crescimento microbiano podem ser utilizados como equações de projeto para ampliação de escala. O objetivo deste trabalho é apresentar modelos matemáticos para quantificar e prever o ciclo vital do *Eremothecium ashbyii*, com base nos princípios da cinética química.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

Foi utilizado o fungo ascomiceto *Eremothecium ashbyii* IZ-1389, fornecido pelo Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo em Piracicaba. A cultura pura foi estocada em tubo de ensaio com ágar-glucose-peptona-extrato de levedura-extrato de malte, previamente esterilizado, incubada a 28°C durante 48-72 horas e conservada em refrigerador (3^o-5^oC) por período não superior a 8 semanas (DA SILVA⁽²⁾).

Meio de cultivo

O meio de cultivo (KAPRÁLEK⁽⁵⁾) era composto de:
– glucose mono-hidratada (cerelose, Merk), 15 g/dm³
– peptona (Difco), 5 g/dm³
– extrato de levedura (Difco), 3 g/dm³
– água destilada para completar 1 dm³
– pH = 6,5 (antes da esterilização)

Condições de cultivo

A fermentação submersa (120 h) foi

(*) Trabalho financiado pela C.P.G./U.E.L.

(**) Professor Titular, Doutor em Ciência de Alimentos. Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos. Centro de Ciências Rurais e de Tecnologia. Universidade Estadual de Londrina - Paraná.

realizada em frascos tipo Erlenmeyer de 500cm³ (valor nominal), com o meio de cultivo totalizando 10% desse volume, a um nível de agitação de 300 ± 5 rotações por minuto (Pscrotherm, G-27, New Brunswick Scientific Co.) e a temperatura de 28^o ± 0,5^oC. Para manutenção de condições assépticas foram utilizados tampões de algodão recobertos com gaze. Os frascos erlenmeyer eram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121^oC. O inóculo vegetativo foi preparado através de pré-fermentação de 24 horas (28^oC, 300min⁻¹) e usado na proporção de 5% em volume (KAPRÁLEK⁽⁵⁾).

Crescimento do fungo

O peso seco do micélio foi estimado por filtração (papel Whatman n^o. 52) do caldo de cultivo, posterior lavagem com água (200 cm³) e secagem a 105^oC ± 2^oC, durante 3 horas. O cálculo do peso seco do micélio pode ser feito, desde que se determine previamente o peso do papel de filtro, cuja perda de umidade seja conhecida.

Modelo matemático

Do ponto de vista da cinética química, a forma geral da equação para o crescimento microbiano pode ser escrita como (KONO⁽⁹⁾):

$$\frac{dX}{dt} = K_1^i \cdot K_2^j \cdot E^i \cdot S^j - K_3P$$

onde,

X = concentração celular
E = concentração de enzima
S = concentração de substrato
P = concentração de produto
K₁, K₂ e K₃ = constantes

A equação (1) indica que o crescimento corresponde a uma reação (limitante) irreversível de ordem (i + j), enquanto que a inibição ou a repressão é equivalente a uma reação (limitante) inversa de 1^a. ordem. Para que essa equação possa ser empregada na modelagem do crescimento microbiano, devem ser estabelecidas as seguintes condições limites (KONO⁽⁹⁾):

i = 1 e j = 0, quando X < X_C

i = 0 e j = 1, quando X ≥ X_C

e, pode-se introduzir a nova condição

i = 0 e j = 0, para valores de X depois de atingido X_M na fase (V) de morte ou autólise.

A concentração crítica (X_C) é a concentração celular limite, existente entre

a fase (III) exponencial e a fase (IV) de desaceleração do crescimento. A concentração máxima (X_M) é o maior valor teórico obtido.

A velocidade de crescimento celular, na fase (I) de adaptação, fase (II) transitória e fase (III) exponencial ou logarítmica pode ser simplificada como segue (KONO⁽⁹⁾):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \phi X \quad (2)$$

sendo μ a velocidade específica e o coeficiente de consumo (φ) tem os seguintes valores:

na fase (I) de adaptação φ = 0

na fase (II) transitória 0 < φ < 1

na fase (III) exponencial φ = 1

O coeficiente de consumo é definido como sendo a fração de todas as células que podem consumir substrato e multiplicar-se num tempo qualquer do crescimento celular.

A velocidade de crescimento na fase (IV) de desaceleração pode ser expressa por (KONO⁽⁹⁾):

$$\left. \frac{dX}{dt} \right|_D = \mu_D (X_M - X) \quad (3)$$

ou,

$$(1) \left. \frac{dX}{dt} \right|_D = \frac{\mu X_C}{(X_M - X_C)} \cdot (X_M - X) \quad (4)$$

uma vez que as velocidades devem ser iguais no limite das fases exponencial e de desaceleração.

A velocidade na fase (V) de autólise pode ser escrita de maneira seguinte:

$$\left. \frac{dX}{dt} \right|_A = -\mu_A X \quad (5)$$

Evidentemente, supõe-se que P é proporcional a X.

A forma integral das equações que representam o ciclo vital é a seguinte:

$$(I) \text{ fase de adaptação} \\ X = X_{\text{inicial}} \quad (6)$$

$$(II) \text{ fase transitória} \\ X = X_{\text{inicial}} + (X_{\text{trans.}} - X_{\text{inicial}}) \cdot \left(\frac{t - t_{\text{inicial}}}{t_{\text{trans.}} - t_{\text{inicial}}} \right)^2 \quad (7)$$

$$(III) \text{ fase exponencial} \\ X = X_C \cdot \exp [\mu (t - t_C)] \quad (8)$$

(IV) fase de desaceleração

$$X = X_M - (X_M - X_C) \cdot$$

$$\left\{ \exp \left[\frac{-\mu X_C}{(X_M - X_C)} \cdot (t - t_C) \right] \right\} \quad (9)$$

(V) fase de autólise

$$X = X_A \cdot \exp [-\mu_A (t - t_A)] \quad (10)$$

onde X_A é a concentração inicial da fase de autólise e t_A o tempo correspondente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados experimentais (Quadro 1), relativos ao peso de micélio, podem ser obtidos os parâmetros do modelo cinético (Quadro 2), utilizando-se um processo gráfico sugerido por KONO⁽⁹⁾. A concentração celular crítica X_C indica o valor limite entre a fase exponencial ou logarítmica e a fase de desaceleração do crescimento. O valor X_M representa a concentração máxima teórica nas condições de cultivo, enquanto que X_A é a concentração inicial da fase de autólise. Evidentemente, a fase de morte ou autólise considerada para completar o ciclo vital do fungo, nada mais é do que um período exponencial ou logarítmico. Entretanto, comparando-se a velocidade de crescimento (μ) com a velocidade de não-crescimento (μ_A), pode-se notar que esta é cerca de 7,5 vezes menor do que aquela. Essa informação é valiosa tendo em vista que a produção de riboflavina fúngica não está associada ao crescimento celular (DEMAIN⁽³⁾). O tempo de duplicação (t_d) estimado para a fase (III) exponencial é de 5,5 horas. Tanto μ como t_d podem ser satisfatoriamente comparados com os respectivos valores encontrados por KOJIMA et alii⁽⁶⁾, que estudou o *Eremothecium ashbyii* IFO-6023. As equações integradas do modelo cinético, para o caso em estudo, podem ser escritas do seguinte modo, com base nas equações (8), (9) e (10):

- 1) fase (III) exponencial:

$$4h \leq t \leq 20,5h \quad (11) \\ X = 3,02 \cdot \exp [0,126 (t - 20,5)]$$
- 2) fase (IV) de desaceleração:

$$20,5h \leq t \leq 71,5h \quad (12) \\ X = 7,12 - 4,10 \cdot \exp [-0,093 (t - 20,5)]$$
- 3) fase (V) de autólise:

$$80h \leq t \leq 120h \quad (13) \\ X = 6,41 \cdot \exp [-0,017 (t - 80)]$$

Como não existem dados experimentais disponíveis não se pode modelar, para

este caso, a fase (I) de adaptação e a fase (II) transitória. Além disso, a fase (III) de crescimento exponencial é relativamente curta ($t_C = 20,5h$), representando aproximadamente 14% do período de fermentação (120h). É possível ainda, que exista uma fase estacionária entre 71,5h e 80h, entretanto não há elementos para verificação dessa suposição. A existência das equações preditivas permite a estimativa da produtividade (velocidade máxima de crescimento) celular, que ocorre após 20,5h (t_C) de fermentação:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{máx.}} = \mu X_C = 0,38 \text{ g/dm}^3 \text{ h}$$

A comparação entre os valores previstos pelo modelo cinético para a concentração celular e os resultados experimentais (Quadro 1) mostra uma ampla concordância. O erro relativo na predição foi sempre inferior a 10% e na grande maioria das vezes não chegou a atingir 6%. Logo, pode-se concluir pela aplicabilidade, pelo menos neste caso, do modelo de Kono para explicar a cinética de crescimento e de decrescimento (não-crescimento) de microrganismo pluricelular (fungo). A próxima etapa desse trabalho, em andamento no nosso laboratório, seria a modelagem da produção de riboflavina por fermentação para possibilitar um estudo conjunto da cinética de decrescimento com a cinética de produção do metabólito.

Quadro 1 – Comparação entre os valores previstos pelo modelo cinético e os resultados experimentais obtidos

Tempo	$X_{\text{exp.}}$	$X_{\text{calc.}}$	$ X_{\text{calc.}} - X_{\text{exp.}} $	$\left \frac{X_{\text{calc.}} - X_{\text{exp.}}}{X_{\text{calc.}}} \right \cdot 100$
(h)	(g/dm ³)	(g/dm ³)	(g/dm ³)	(%)
4	0,366	0,378	0,12	3,17
8	0,612	0,625	0,013	2,08
16,5	1,64	1,82	0,18	9,89
24,5	4,39	4,29	0,10	2,33
31	5,25	5,57	0,32	5,74
43,5	6,47	6,63	0,16	2,41
48	6,69	6,80	0,11	1,62
58	6,94	6,99	0,05	0,71
71,5	6,67	7,08	0,41	5,79
80	6,41	6,41	0,00	0,00
94	4,93	5,04	0,11	2,18
110	3,86	3,84	0,02	0,52
120	3,25	3,23	0,02	0,62

$X_{\text{exp.}}$ = concentração celular experimental (média aritmética de duas repetições)
 $X_{\text{calc.}}$ = concentração celular calculada (estimada)

Quadro 2 – Parâmetros do modelo cinético para o ciclo vital do *E. ashbyii* IZ-1389 no meio de cultivo glucose-peptona-extrato de levedura

X_C	3,02 g/dm ³
X_M	7,12 g/dm ³
X_A	6,41 g/dm ³
μ	0,126 h ⁻¹
A	0,017 h ⁻¹
t_C	20,5 h
t_A	80 h

ABSTRACT

Kono's kinetic model was applied to study the growth of *Eremothecium ashbyii* IZ-1389. The model was extended to include the nongrowth period. The predictions from the model have shown good agreement with experimental data.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARFORD, J.P. & HALL, R.J. *Proc. Biochem.*, 13 (8): 22, 1978.
2. DA SILVA, R.S.F. *Produção de Riboflavina com E. Ashbyii*. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 1976. Tese (Doutorado) Univ. Est. de Campinas - Campinas.
3. DEMAIN, A.L. Riboflavin Oversynthesis. *Annual Review of Microbiology*, 26: 369, 1972.
4. FREDRICKSON, A.G. et alii. Mathematical models for fermentation processes. *Ad. Appl. Microbiol.*, 13: 419, 1970.
5. KAPRÁLEK, F. The physiology of Riboflavin production by *E. Ashbyii*. *J. Gen. Microbiol.*, 29: 403, 1962.
6. KOJIMA, I. et alii. Studies on Riboflavin production by *E. Ashbyii*. 1. On inhibiting factors of Riboflavin production and their control. *J. Ferment. Technol.*, 50 (10): 716, 1972.
7. KONAK, A.R. Derivation of a generalized Monod equation and its application. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 24: 453, 1974.
8. ---. An equation for batch bacterial growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 271, 1975.
9. KONO, T. Kinetics of microbial cell growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 10: 105, 1968.